

UNIVERZA V LJUBLJANI



FAKULTETA ZA FARMCIJO

Vanda Matuc

**ANALIZA GENA ZA FENILALANIN - HIDROKSILAZO PRI
BOLNIKI S HIPERFENILALANINEMIJO**

Magistrski študij laboratorijska biomedicina

MAGISTRSKA NALOGA

UNIVERZA V LJUBLJANI



FAKULTETA ZA FARMCIJO

Magistrski študij laboratorijska biomedicina

Vanda Matuc

**ANALIZA GENA ZA FENILALANIN - HIDROKSILAZO PRI
BOLNIKI S HIPERFENILALANINEMIJO**

**ANALYSIS OF PHENYLALANINE HYDROXYLASE GENE
IN PATIENTS WITH HYPERPHENYLALANINEMIA**

Magistrska naloga

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. genet.

ZAHVALE

»Precej je treba vedeti, preden opaziš, kako malo veš.«

Karl Heinrich Waggenerl

Mentorici doc. dr. Katarini Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. genet. se iskreno zahvaljujem, da me je vseskozi vodila in mi pomagala s svojim znanjem. Hvala vam tudi za vso moralno podporo, ki sem je bila deležna v trenutkih, ko sem jo najbolj rabila.

Vodji laboratorija, Mirjani Zupančič, mag. med. biokem., se zahvaljujem, da mi je omogočila opravljanje dela v laboratoriju Pediatrične klinike v Ljubljani.

Posebna zahvala gre mojemu matičnemu laboratoriju za citogenetiko. Tinki, Jerneju, predvsem pa Maji se zahvaljujem za vso pomoč, ki sem je bila z njihove strani deležna, za njihovo znanje in za prenekatero »brco v rit«, ki sem jo dobila, ko sem jo potrebovala, da sem se premaknila korak naprej in bližje cilju.

Zahvaljujem se tudi puncam iz laboratorija molekularne genetike, za vso pomoč in nasvete pri delu. Jurka, Eva in Nina, hvala.

Hvala tudi vsem ostalim iz Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike za podporo, ki sem je bila deležna z vaše strani tekom študija.

Zahvala gre tudi doc. Dr. Urhu Grošlju, dr. med. in asist. mag. Mojci Žerjav Tanšek, dr. med. iz Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrične klinike v Ljubljani za strokovno podporo pri izvedbi magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi vsem prijateljem, ki ste kakorkoli pripomogli, da je bilo moje življenje v času študija znosnejše in zabavnejše. Preveč vas je, da bi vas vse naštela.

Največjo hvaležnost pa izkazujem svoji družini, staršema in bratu, ki so me v vseh letih študija nesebično podpirali, mi nudili oporo in bili na razpolago kadarkoli sem jih potrebovala.

Nazadnje se zahvaljujem svojemu fantu Janezu Cucku. Brez odvečnih besed ... samo ... HVALA, DA SI!!!

Izjava: Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem., spec. lab. med. genet.

Vanda Matuc

KAZALO

1. POVZETEK.....	I
ABSTRACT.....	II
2. SEZNAM OKRAJŠAV	III
3. UVOD.....	1
3.1 POMEMBNEJŠI ZGODOVINSKI MEJNIKI RAZISKOVANJA BLAGHE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE.....	1
3.2 EPIDEMIOLOGIJA IN NABOR GENETSKIH SPREMEMB BLAGHE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE.....	2
3.3 GENETSKE ZNAČILNOSTI BLAGHE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE.....	3
3.4 FENOTIPSE ZNAČILNOSTI BLAGHE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE V POVEZAVI Z GENOTIPOM.....	5
3.4.1 Encimski fenotip	5
3.4.2 Presnovni fenotip.....	6
3.4.3 Klinični fenotip PKU	8
3.5 ZDRAVLJENJE BLAGHE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE..	9
3.5.1 Dietno zdravljenje.....	10
3.5.2 Zdravljenje s tetrahidrobiopterinom (BH ₄).....	11
4. NAMEN DELA, CILJI IN HIPOTEZE.....	12
5. METODE IN MATERIALI	13
5.1 SHEMA POTEKA DELA.....	13
5.2 PREISKOVANCI.....	13
5.3 GENETSKA ANALIZA GENA PAH.....	14
5.3.1 Vzorci in osamitev DNA iz periferne krvi	14
5.3.2 Določitev koncentracije in čistoče DNA	15

5.3.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	16
5.3.4	Preverjanje dolžine produktov PCR.....	21
5.3.5	Sekvenčna reakcija.....	22
5.3.6	Etanolna precipitacija sekvenčne reakcije	24
5.3.7	Analiza fragmentov DNA na genetskem analizatorju ABI 3500	25
5.3.8	Interpretacija genetskih sprememb	26
5.3.9	Povezava genotipa s presnovnim fenotipom.....	26
5.3.10	Primerjava genetskih sprememb pri slovenskih bolnikih z blago HFA in PKU 27	
5.3.11	Izračun pojavnosti blage HFA v Sloveniji.....	27
5.4	STATISTIČNE METODE IN ANALIZA	27
6.	REZULTATI	29
6.1	PREISKOVANCI.....	29
6.2	NABOR SPREMEMB GENA PAH PRI BOLNIKI S HFA.....	29
6.3	PRIMERJAVA VZROČNIH SPREMEMB V GENU PAH PRI SLOVENSKIH BOLNIKI S HFA IN PKU	34
6.4	NABOR GENOTIPOV PRI SESTAVLJENIH HETEROZIGOTIH	35
6.5	NOVE GENETSKE SPREMEMBE.....	37
6.6	ANALIZA VPLIVA GENOTIPA NA FENOTIP	38
6.6.1	Games - Howellov test	39
6.6.2	Generaliziran linearni model	39
6.6.3	Tukey test.....	40
6.7	POJAVNOST BLAGE HFA V SLOVENIJI	40
7.	RAZPRAVA	41
7.1	PREISKOVANCI.....	41
7.2	NABOR SPREMEMB GENA PAH PRI BOLNIKI S HFA.....	41

7.3	PRIMERJAVA VZROČNIH SPREMEMB V GENU PAH PRI SLOVENSКИH BOLNIKIИ Z BLAGO HFA IN PKU	42
7.4	NABOR GENOTIPOV PRI SESTAVLJENIH HETEROZIGOTIИ	43
7.5	NOVE GENETSKE SPREMEMBE	44
7.6	ANALIZA VPLIVA GENOTIPA NA FENOTIP	44
7.7	POJAVNOST BLAGE HFA V SLOVENIИ	46
8.	SKLEPI	47
9.	LITERATURA	48

KAZALO SLIK

Slika 1:	Pozicija gena <i>PAH</i> na kromosomu 12	4
Slika 2:	Struktura proteina PAH.....	6
Slika 3:	Hidroksilacija fenilalanina v tirozin.....	7
Slika 4:	Shema poteka genetske analize gena <i>PAH</i>	13
Slika 5:	Shematski prikaz verižne reakcije	17
Slika 6:	Enačba za izračun volumna vzorca DNA	17
Slika 7:	Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primera drugačnosmiselne genetske spremembe v heterozigotni obliki	30
Slika 8:	Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primera delecije v heterozigotni obliki..	30
Slika 9:	Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primer intronske genetske spremembe v heterozigotni obliki	31
Slika 10:	Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primer nesmiselne genetske spremembe v heterozigotni obliki	31
Slika 11:	Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primer nove genetske spremembe p.W326X v eksonu 10.....	37

Slika 12: Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primer nove genetske spremembe p.V45I v eksonu 2.	37
Slika 13: Diagram prikazuje statistično značilno povezavo med posameznimi skupinami pri 95% intervalu zaupanja	39
Slika 14: Diagram prikazuje statistično značilno povezavo med posameznimi skupinami pri 95% intervalu zaupanja, ko poleg vpliva genotipa vključimo še starost bolnikov	40

KAZALO TABEL

Tabela 1: Incidenca blage HFA in PKU glede na posamezno državo s pripadajočimi najpogostejšimi znanimi genetskimi spremembami	3
Tabela 2: Kriterij za prepoznavanje presnovnega fenotipa pri bolnikih s PKU in blago HFA.	8
Tabela 3: Tabela reakcijske zmesi za reakcijo PCR.	19
Tabela 4: Optimizirani pogoji pomnoževanja PCR za eksone gena PAH.....	19
Tabela 5: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje eksonov gena PAH	20
Tabela 6: Pogoji pomnoževanja sekvenčne reakcije.	24
Tabela 7: Nabor vzročnih sprememb gena PAH pri bolnikih z blago HFA v slovenski populaciji, njihova pogostnost in značilnosti	32
Tabela 8: Pogostost pojavljanja posameznih polimorfizmov glede na bazo ExAC in v naši populaciji.	33
Tabela 9: Pogostost pojavljanja posameznih polimorfizmov glede na bazo ExAC in v naši populaciji, glede na homozigotno in heterozigotno obliko.....	34
Tabela 10: Nabor vzročnih sprememb gena PAH pri bolnikih s PKU v slovenski populaciji, njihova pogostnost in značilnosti.....	34
Tabela 11: Nabor kombinacij genotipov PAH in lastnosti posamezne spremembe pri bolnikih z blago HFA v slovenski populaciji	36
Tabela 12: rezultati in silico analiz novih genetskih sprememb.	38
Tabela 13: Rezultati Games – Howellove analize (P vrednosti) s katero smo primerjali vpliv genotipa med skupinami na fenotip.....	39

Tabela 14: Vpliv starosti na genotip v primerjavi s prispevkom genotipa.....	39
Tabela 15: P vrednosti med posameznimi skupinami, ki smo jih dobili, ko smo v test vključili še korigirano starost.....	40

1. POVZETEK

Blaga hiperfenilalaninemija (HFA) je avtosomno recesivno podedovana bolezen, ki nastane kot posledica prirojene motnje v hidroksilaciji fenilalanina (Phe) zaradi znižane aktivnosti encima fenilalanin-hidroksilaze. Posledično pride do motenj pri presnovi fenilalanina v tirozin, kar privede do povišanih vrednosti fenilalanina v krvi. Blaga HFA ima enako genetsko osnovo kot fenilketonurija (PKU), vendar gre v primeru blage HFA za dosti milejšo obliko bolezni z zmerno do blago povišanimi vrednostmi Phe v krvi. Vzročnega zdravljenja bolezni ne poznamo. Pri hujših oblikah bolezni, oziroma pri močno povišanih vrednostih Phe, je potrebna čim hitrejša uvedba dietnega zdravljenja z omejitvijo vnosa Phe. Zato je ključnega pomena presejalno testiranje novorojencev na PKU, ki se v Sloveniji izvaja od leta 1979. Namen magistrske naloge je bila opredelitev povezave med koncentracijo Phe pri preiskovancih z blago HFA in genotipom gena za fenilalanin-hidroksilazo (*PAH*). V analizo je bilo vključenih 97 preiskovancev z blago HFA, ki so imeli koncentracijo Phe višjo od 200 $\mu\text{mol/L}$. Opredelili smo nabor 22 genetskih sprememb na skupno 194 neodvisnih alelih. Po dve genetski spremembi sta bili prisotni pri 21 preiskovancih, po ena sprememba pri 39 preiskovancih, pri preostalih preiskovancih nismo opredelili sprememb. Najpogosteje je bila zastopana genetska sprememba p.R408W v eksonu 12. Druge pogostejše genetske spremembe so bile p.A403V, p.R158Q, p.A300S in p.E390G. Pri 21 bolnikih, ki so imeli po dve spremembi, smo opredelili 19 različnih genotipov. Pri tem sta se ponavljali dve kombinaciji genotipa, in sicer: p.A403V v kombinaciji s p.D415N in p.A403V v kombinaciji s p.Phe55fs. Opredelili smo tudi dve novi, še neopisani spremembi (p.W326X in p.V45I). Primerjava nabora opredeljenih genetskih sprememb pri bolnikih s HFA, s spremembami predhodno opredeljenimi pri slovenskih bolnikih s PKU, je pričakovano pokazala razlike v naboru in frekvenci sprememb. Najpomembnejša razlika med skupinama je, da v skupini z blago HFA nismo določili nobene genetske spremembe v homozigotni obliki. Povprečna vrednost fenilalanina preiskovancev z blago HFA, ki niso imeli opredeljene vzročne spremembe v genu *PAH*, je bila 129 $\mu\text{mol/L}$, preiskovancev z eno vzročno spremembo 157 $\mu\text{mol/L}$ in preiskovancev z dvema vzročnima spremembama 300 $\mu\text{mol/L}$. Dokazali smo statistično značilno povezavo med genotipom in presnovnim fenotipom bolnikov z blago HFA.

ABSTRACT

Mild hyperphenylalaninaemia (HPA) is an autosomal recessive inherited disease that occurs as a consequence of an inborn aberration of hydroxylation of phenylalanine due to deficiency of phenylalanine hydroxylase. Consequently, a disturbance in the metabolism of phenylalanine to tyrosine results in elevated blood levels of phenylalanine (Phe). Mild HPA has the same etiology as phenylketonuria (PKU), but in the case of mild HPA the disease presents itself in milder form with moderately to mildly elevated blood levels of Phe. There is no causal treatment of the disease. In the case of severe forms of the disease or heavily increased Phe levels, introduction of dietary treatment limiting the Phe intake is necessary. Newborn screening of PKU in Slovenia was implemented in 1979. The aim of this master's thesis was to evaluate the link between Phe concentrations in patients with mild HPA and the genotype of the *PAH* gene. The analysis was carried out on 97 patients with mild HPA who had the Phe concentration higher than 200 $\mu\text{mol/L}$. We have detected 22 genetic variants on 194 independent alleles. Two variants per individual were detected in 21 patients, one per individual in 39 patients while there were no variants in the remaining ones. The genetic variant p.R408W in exon 12 was the most frequent variant detected in this study. Other frequent variants were p.A403V, p.R158Q, p.A300S and p.E390G. Among 21 patients with two variants, 19 different genotypes were identified, where two combinations were more common, namely: p.A403V in combination with p.D415N and p.A403V in combination with p.Phe55fs. We have also identified two novel previously unidentified variants (p.W326X and p.V45I). We compared defined set of genetic variants in patients with HPA to genetic variants previously identified among Slovenian PKU patients who, as expected, showed differences in spectrum and frequency. The most important difference was that there were no causal genetic variants in homozygous form present in the mild HPA group. The average value of phenylalanine in subjects with mild HPA and without any causal genetic variant in the *PAH* gene was 129 $\mu\text{mol/L}$, among subjects with one identified causal variant 157 $\mu\text{mol/L}$ and among subjects with two identified causal variants 300 $\mu\text{mol/L}$. We demonstrated statistically significant association between genotype and metabolic phenotype of patients with mild HPA.

2. SEZNAM OKRAJŠAV

A	adenin
Ala	alanin
Agr	arginin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	aspartat
B1	tiamin
B12	kobalamin
B2	riboflavin
B6	piridoksin
BH ₂	dihidrobiopterin
BH ₄	tetrahidrobiopterin
bHFA	blaga hiperfenilalaninemija
BLAST	Program za primerjavo zaporedja nukleotidov z referenčnimi bazami podatkov (<i>angl. Basic local alignment search tool</i>)
bp	bazni par
C	citozin
dbSNP	podatkovna baza polimorfizmov (<i>angl. The Single Nucleotide Polymorphism database</i>)
ddNTP	2', 3'-dideoksinukleozid trifosfat
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
G	gvanin
Gln	glutamin
GTP	gvanozin - 5' - trifosfat
HCl	klorovodikova kislina
HFA	hiperfenilalaninemija
HGMD	podatkovana baza genetskih spremembv človeku (<i>angl. The Human Gene Mutation Database</i>)
Ile	izolevcin
IQ	inteligentni količnik
kb	kilo baza
kDa	kilo dalton
Leu/L	levcin
LNAA	dolgoverižne nevtralne aminokislinae

M	molarno
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
PAH	fenilalaninska hidroksilaza
PAHdb	baza podatkov o spremembah za gen za fenilalaninsko hidroksilazo
PAL	fenilalanin amonijak liaza
PCR	verižno pomnoževanje s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEA	preostala encimska aktivnost
Phe	fenilalanin
PKU	fenilketonurija
Pro	prolin
rpm	obrati na minuto (okr. angl. <i>Revolutions Per Minute</i>)
Ser	serin
T	timin
Thr	treonin
Trp	triptofan
U	uracil
UKC	Univerzitetni klinični center
UV	ultravijolična svetloba
Val/V	valin

3. UVOD

Blaga hiperfenilalaninemija (blaga HFA; MIM#26100) je avtosomno recesivno podedovana bolezen, ki spada med presnovne motnje aminokislina fenilalanin, kamor uvrščamo tudi fenilketonurijo (PKU). Bolezni sta posledica prirojene motnje v hidrosilaciji esencialne aminokislina fenilalanin (Phe), zaradi česar pride do povišanih vrednosti le-te v krvi (hiperfenilalaninemija) (1 - 5). Blaga HFA in PKU sta bolezni, ki imata enako genetsko osnovo, fenotipsko pa ju ločimo glede na nivo fenilalanina v telesnih tekočinah. Poznamo blago, zmerno in klasično PKU ter blago HFA kot ločeno klinično entiteto (1 - 4, 8). Ne glede na vrsto bolezni, je tveganje za razvoj kognitivnih in drugih motenj zaradi povišanih koncentracij fenilalanina pomembnejši dejavnik, zaradi katerega se bolnikom z močno povišanimi koncentracijami fenilalanina predpiše dietno zdravljenje z omejenim vnosom aminokislina Phe (1 - 5).

3.1 POMEMBNEJŠI ZGODOVINSKI MEJNIKI RAZISKOVANJA BLAGE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE

Bolezen je odkril in prvi opisal norveški zdravnik in biokemik I.A. Følling, leta 1934, in jo povezal z duševno nerazvitostjo. V 50. letih prejšnjega stoletja je bila dokazana znižana aktivnost jetrnega encima fenilalanin-hidroksilaze (PAH), ki sodeluje pri presnovi aminokislina, uvedeno pa je bilo tudi učinkovito dietno zdravljenje z omejitvami vnosa fenilalanina. Desetletje kasneje so bili razviti prvi testi za presejalno testiranje novorojencev, ki so se postopoma širili in uveljavili po svetu (2). Pri nas je še do 70. let 20. stoletja večina otrok zaradi previsokih koncentracij fenilalanina razvila hudo duševno nerazvitost, od leta 1979 pa se na celotnem območju Slovenije izvajajo presejalni testi za fenilketonurijo za novorojence (8 - 10). V Sloveniji se vse bolnike s PKU in blago HFA, ki so bili prepoznani na presejalnem testiranju, spremlja na Pediatrični kliniki v Ljubljani, na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove. V 80. letih je bilo določeno nukleotidno zaporedje gena za fenilalanin hidroksilazo (PAH), kar je predstavljalo osnovo za kasnejše raziskave gena PAH v različnih populacijah (2). V slovenski

populaciji so bile do sedaj izvedene samo genetske analize bolnikov s PKU (3, 8), ne pa tudi bolnikov z blago HFA.

3.2 EPIDEMIOLOGIJA IN NABOR GENETSKIH SPREMEMB BLAGE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE

Blaga HFA in PKU spadata med bolezni, ki so prisotne v celotni svetovni populaciji, najpogosteje v kavkazijski rasi (incidenca je 1:10.000) ter redkeje pri črnski in azijski rasi (2). Za blago HFA ni popolnih podatkov o incidenci bolezni in naboru posameznih najpogostejših genetskih sprememb, saj raziskave večinoma vključujejo samo PKU oziroma vse podskupine bolezni skupaj, je pa incidenca blage HFA nižja od incidence PKU (3 - 4, 11). V slovenski populaciji je skupna incidenca PKU in blage HFA 1:10.000, znani podatki za ostale populacije pa so zbrani v Tabeli 1.

Incidenca bolezni močno niha tudi med posameznimi etničnimi skupinami, tako je znotraj evropskih meja pogostejša pri konsangvinih populacijah (Turčija in Severna Irska), medtem ko ima Finska relativno nizko incidenco (Tabela 1) (2, 3, 8 - 9).

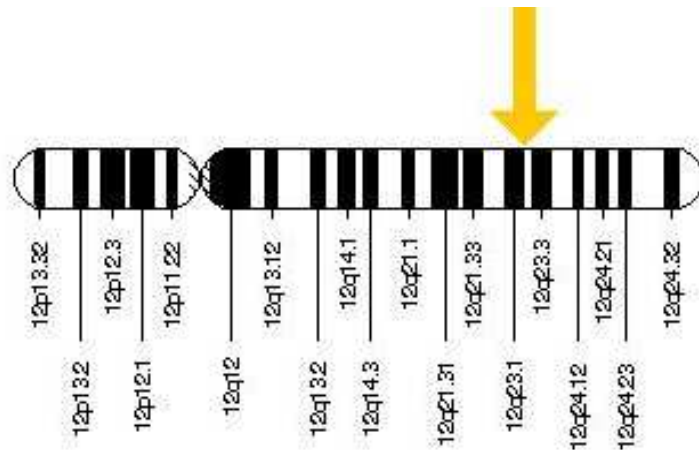
Prav tako je za vsako posamezno populacijo značilen specifičen nabor in delež genetskih sprememb. Raziskave evropske populacije PKU prikazujejo nabor 29 različnih genetskih variant s pojavnostjo vsaj 3% (Tabela 1)(2, 12).

Tabela 1: Incidenca blage HFA in PKU glede na posamezno državo s pripadajočimi najpogostejšimi znanimi genetskimi spremembami (2, 3, 8 - 9, 12).

DRŽAVA	INCIDENCA PKU	NAJPOGOSTEJŠA GENETSKA SPREMEMBA PKU	OSTALE GENETSKE SPREMEMBE PKU	NAJPOGOSTEJŠA GENETSKA SPREMEMBA BLAGE HFA
Slovenija	1:10.000	p.R408W	p.R158Q; p.A403v; p.P281L; p.E390G; p.R261Q	Ni podatka
Turčija	1:5.049	IVS10nt-11G>A	p.R261Q; p.R158Q; p.R252Q	Ni podatka
S. Irska	1:4.500	p.R408W	p.165T; p.F39L; p.L348V; p.Y414C; p.F299C; p.R408Q	p.T380M
Nemčija	1:8.000	p.R408W	p.R158Q; p.P281L; p.R261Q; IVS10-11G>A;p.Y414C; IVS12+G>A	p.U245A; p.A403V; p.J306V
Belgija	1:10.000	IVS12NT+1G>A	p.R408W; IVS10-11G>A; p.P281L; p.R261Q; p.R158Q	Ni podatka
Poljska	1:8.000	p.R408W	p.Y414C; IVS12+1G>A; IVS10-11G>A; p.R261Q; p.R158Q	p.A403V; p.R279H;p.A300S
ZDA	1:15.000	p.R408W	IVS12+1G>A; p.Y414C; IVS10-11G>A; p.F39L	Ni podatka
S. Kitajska	1:100.500	p.R243Q	p.R111X; p.Y356X; p.R413P	Ni podatka
Japonska	1:70.000	p.R413P	p.R243Q; p.R241C; p.Y356X; p.R111x	Ni podatka

3.3 GENETSKE ZNAČILNOSTI BLAGE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE

Gen za fenilalanin-hidroksilazo se nahaja na daljši ročici kromosomsa 12, na regiji 12q23.2 (Slika 1), v razponu približno 171kb (22). Sestavljen je iz 13 eksonov, katerih povprečna dolžina znaša 170 bp, in pripadajočih intronov v povprečni velikosti 6390 bp. Najdaljša sta ekson 13 (892 bp) in intron 2 (17874 bp), najkrajša pa ekson 9 (57 bp) in intron 10 (556 bp) (1 -3, 21).



Slika 1: Pozicija gena *PAH* na kromosomu 12 (59).

V bazi podatkov *PAHdb* (okr. angl. *The Human PAH Mutation Knowledgebase*; <http://www.pahdb.mcgill.ca/>, dostop maja 2016) je opisanih preko 500 vzročnih genetskih sprememb, ki znižujejo aktivnost encima *PAH*, kar vodi v zmanjšano presnovo fenilalanina v tirozin. Glede na stopnjo preostale katalitske aktivnosti encima pa ločimo posamezne fenotipske oblike bolezni (blaga HFA, PKU) (3, 22), ki so podrobneje opisane v poglavju 3.4.

Zaradi visokega števila genetskih sprememb v genu *PAH* je večina bolnikov s to boleznijo sestavljenih heterozigotov. Najpogostejša genetska sprememba se nahaja v eksonu 12. Gre za nukleotidno substitucijo, ki povzroči spremembo aminokislina arginin na aminokislinskem mestu 408 v triptofan (p.Arg408Trp) (22).

Po podatkih v *PAHdb* je med vsemi opisanimi spremembami gena *PAH* 63% drugačnosmiselnih genetskih sprememb (angl. missense mutations), ki v večini primerov vodijo do spremenjene encimske funkcije. Sledijo jim majhne delecije (angl. small deletion) (13%) in tihe spremembe (angl. silent mutation) (7%), pri katerih spremenjeni kodon kodira isto aminokislino. V 5% se pojavljajo nesmiselne spremembe (angl. nonsense mutations), pri katerih se uvede eden izmed STOP kodonov (TAG, TAA, TGA). Majhne insercije (angl. small insertion) se pojavljajo s frekvenco do 1%, medtem ko so velike delecije izjemno redke (<1%) (3, 21, 22).

3.4 FENOTIPSKÉ ZNAČILNOSTI BLAGE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE V POVEZAVI Z GENOTIPOM

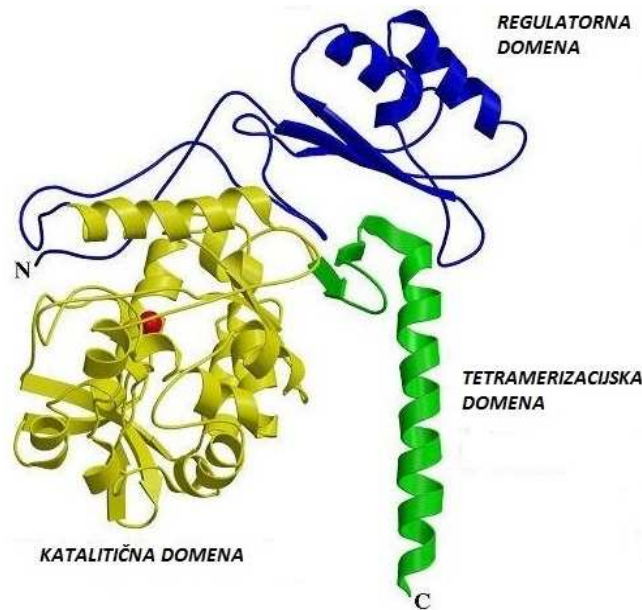
PKU in blaga HFA spadata med klasične monogenske bolezni presnove. Znanih je mnogo kompleksnih lastnosti, s katerimi prepoznamo tri različne fenotipske nivoje, na katere pomembno vplivajo genetske spremembe v genu *PAH* (3, 23).

3.4.1 Encimski fenotip

Gen *PAH* se primarno izraža v jetrih in ledvicah, prisoten pa je tudi v fibroblastih in placenti, vendar je stopnja izražanja relativno nizka. Monomerna oblika encima *PAH* je organizirana v tri funkcionalne domene:

- Regulatorna domena na N-terminalnem koncu (aminokislinski ostanki 1 - 142).
- Katalitična domena (aminokislinski ostanki 143 - 410), ki vsebuje 26 - 27 aminokislin, pomembnih za vezavo kofaktorja BH₄.
- Tetramerizacijska domena na C-terminalnem koncu (aminokislinski ostanki 411 - 452) (31, 32).

50kDa veliki monomeri se zvijejo v funkcionalni encim *PAH*, ki se v fizioloških pogojih nahaja v ravnovesju med dimerno, tetramerno in oligomerno obliko, ki pa je izjemno nestabilna (3, 22, 24, 25, 26).



Slika 2: Struktura proteina PAH (prirejeno po 60).

Drugačnosmiselne genetske spremembe v genu *PAH* najpogosteje povzročijo nepravilno zvitje terciarne strukture proteina (angl. misfolding), kar privede do nepravilnega delovanja encima. Zaradi hitrejšje proteolitske razgradnje je v celicah posledično prisotna manjša količina encima, kar je tudi glavni razlog za pomanjkljivo katalitično aktivnost in posledično povišano koncentracijo fenilalanina (24, 27, 28).

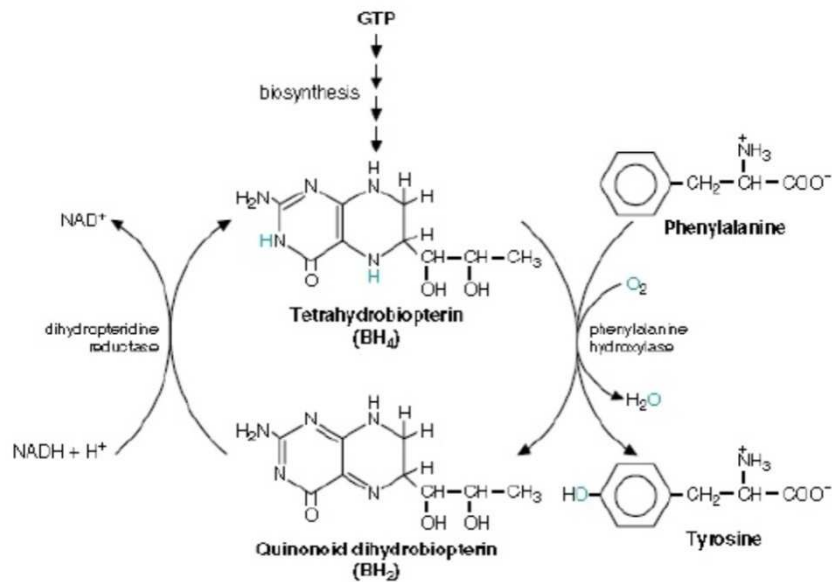
3.4.2 Presnovni fenotip

Presnovni fenotip se izraža v spremembah homeostaze fenilalanina oz. nivoja fenilalanina v krvi. Na nivoju fenilalanina v krvi temelji klinična klasifikacija bolezni na podskupine PKU in blago HFA (1, 3, 4).

Del fenilalanina, ki ga vnesemo v organizem, se razgradi z metabolno transaminacijo v fenil-piruvat in oksidativno dekarboksilacijo v fenil-acetat. Glavna presnovna pot fenilalanina pa je hidrosilacija fenilalanina v tirozin (1 - 3, 29):

- Encim PAH regulira hidrosilacijo fenilalanina v citosolu ledvičnih in jetrnih celic, za svoje delovanje potrebuje kofaktor BH_4 (tetrahidrobiopterin), ki nastaja iz GTP (gvanozin-5'-trifosfat) in se tekom procesa oksidira v BH_2 (dihidrobiopterin). Za nadaljnjo nemoteno presnovo tirozina iz fenilalanina se

BH₂ z dihidrobiopterin-reduktazo v prisotnosti NADH in H⁺ ponovno pretvori v BH₄. Reakcije potekajo v prisotnosti molekul kisika in Fe²⁺. Zaradi okvare encima PAH se fenilalanin kopiči v telesnih tekočinah in tkivih (hiperfenilalaninemija) (1 - 3, 30).



Slika 3: Hidroksilacija fenilalanina v tirozin (povzeto po 61).

Zaradi raznolikosti genetskih sprememb gena *PAH* se pomanjkanje aktivnosti encima kaže s širokim spektrom presnovnih fenotipov, ki so osnova za klinično razlikovanje med posameznimi oblikami fenilketonurije in blage HFA.

Na podlagi presnovnega fenotipa razdelimo PKU in blago HFA v štiri podskupine, glede na najvišjo vrednost fenilalanina v krvi ob postavitvi diagnoze (Tabela 2) (1 - 3, 5, 29).

Tabela 2: Kriterij za prepoznavanje presnovnega fenotipa pri bolnikih s PKU in blago HFA.

PRESNOVNI FENOTIP	KONCENTRACIJA FENILALANINA V KRVI ($\mu\text{mol/L}$)
Normalen	50 - 120
Blaga HFA	120 - 600
Blaga PKU	600 - 900
Zmerna PKU	900 - 1200
Klasična PKU	>1200

Presnovni fenotipi bolnikov so v večini primerov vezani na genotip gena *PAH*. Fenotip bolnikov, ki so sestavljeni heterozigoti, določa preostanek aktivnosti encima, ki je odvisen od obeh prisotnih genetskih sprememb. Tako ima blažji presnovni fenotip bolnik z genetsko spremembo, ki ohranja višjo rezidualno aktivnost encima. Presnovni fenotip pri PKU se izrazi pri genetski spremembi s povsem izgubljeno ali močno znižano rezidualno aktivnostjo encima. Zadnje se v večini primerov kaže kot presnovni fenotip klasične oblike PKU. Večina raziskav je potrdila ujemanja med genotipom in presnovnim fenotipom pri genetskih spremembah, ki povsem izničijo aktivnost encima. Pogostejša pa so neskladja pri spremembah z večjo preostalo encimsko aktivnostjo (3, 18, 31, 32).

3.4.3 Klinični fenotip PKU

Razvojni zaostanek, ki je posledica nevrotoksičnega vpliva fenilalanina na možganski razvoj in funkcijo, je eden izmed glavnih simptomov PKU (6). Nezdravljeno PKU, poleg nižjega inteligenčnega količnika, povezujejo tudi z razvojem drugih znakov, kot so zaostanek v rasti, mikrocefalija, ekcemi, hipopigmentacija, epilepsija, avtizem, vedenjske težave, značilen vonj kože in demielinizacija, katere posledica je poškodba zaščitne mielinske ovojnice (3, 7, 22, 33, 34). Posamezniki lahko razvijejo tudi resnejše psihološke probleme, ki se kažejo kot depresija, tesnoba in fobije, ki se izrazijo predvsem v tretji in četrti dekadi življenja. V odrasli dobi se lahko pojavi tudi tresenje, ohromelost spodnjih okončin in paraliza ene strani telesa (7).

Popolnoma razvit klinični fenotip najdemo izključno pri bolnikih, ki so bili rojeni kjer ni uvedenega ali pa v času njihovega rojstva še ni bilo uvedeno presejalno testiranje novorojencev na fenilketonurijo. Pri preprečevanju težkih posledic bolezni ima ključno vlogo zgodnja uvedba dietnega zdravljenja, ki močno zmanjša možnost okvare osrednjega živčevja in s tem pri posameznikih prepreči mnogo komplikacij povezanih s težjo obliko bolezni (3, 35).

Več raziskav kaže, da se lahko tudi pri posameznikih, ki dosledno upoštevajo strogo dieto, razvijejo nevrokognitivne posledice bolezni, še posebej deficiti vodstvenih funkcij (težave pri planiranju, organizaciji, motnje delovnega spomina,...) ter ostali nevrološki znaki (7).

Pri bolnikih s PKU je nevrološki izid močno povezan s starostjo ob začetku zdravljenja in kasnejšo presnovno urejenostjo. Pri bolnikih, starih od nič do dvanajst let, je bil IQ nižji za 1,3 - 3,1 točke, za vsako dodatno povišanje fenilalanina za 100 $\mu\text{mol/L}$ nad povprečno vrednostjo meritev (3, 7, 35). Nasprotno pa imajo bolniki z blago HFA, s koncentracijo fenilalanina v krvi v intervalu med 120 - 600 $\mu\text{mol/L}$, povprečen IQ, prav tako pa ne razvijejo izrazitih nevroloških in nevropsiholoških odstopanj, ki so značilne za blago ali klasično obliko PKU. Pri bolnikih, z nivojem fenilalanina v krvi pod 360 $\mu\text{mol/L}$, ni potrebe po uvedbi dietnega zdravljenja in sledenjem nivoja fenilalanina med morebitno nosečnostjo (3, 36). Visoke koncentracije fenilalanina med nosečnostjo so nevarne za plod, saj nanj vplivajo teratogeno in povzročajo hude okvare otroka že pred rojstvom. Vrednosti fenilalanina v krvi nad 900 $\mu\text{mol/L}$ v 70 - 95% povzročijo razvojni zaostanek in mikrocefalijo ter pri 15% prirojene srčne napake in globalen zaostanek v plodovem razvoju. Posledice pri plodu so močno odvisne od koncentracije fenilalanina pri nosečnici, zato je med nosečnostjo potrebna stroga dieta, redno spremljanje nivoja fenilalanina in vzdrževanje njegove koncentracije v krvi pod 360 $\mu\text{mol/L}$ (3, 37, 38).

3.5 ZDRAVLJENJE BLAGE HIPERFENILALANINEMIJE IN FENILKETONURIJE

Zdravljenja samega vzroka bolezni ne poznamo, obstajajo pa učinkoviti načini, ki preprečujejo razvoj kliničnega fenotipa bolezni. Najučinkovitejše in najpomembnejše je dietno zdravljenje s kontroliranim vnosom fenilalanina (3, 39, 40, 41). Zadnje čase

pa se uveljavlja tudi dopolnilno zdravljenje z BH_4 , na katerega je odzivna večina bolnikov z ustrezno jetrno aktivnostjo encima (3, 41).

Razvoj novih načinov zdravljenja, ki pa še niso v uporabi, poteka v smeri:

- Dietnega zdravljenja z dolgoveržnimi nevtralnimi aminokislinami (angl. large neutral amino acids - LNAA), ki povzročijo specifično redukcijo in posledično znižanje koncentracije fenilalanina v možganih in v krvi (42, 43, 44).
- Terapije z encimom fenilalanin-amonijak-liaza (angl. phenylalanine ammonia lyase - PAL), ki katalizira deaminacijo fenilalanina do prostega amonijevega iona in trans-cimetne kisline.
- Genske terapije, pri kateri poskušajo z virusnimi prenašalci v jetra vstaviti funkcionalen gen za encim fenilalanin-hidroksilazo. Raziskave so potekale na živalskih modelih, kjer pa se je učinek izkazal za kratkotrajnega (41, 45).

Zdravljenje je nujno potrebno pri bolnikih z vsemi oblikami fenilketonurije, medtem ko zdravljenje pri bolnikih z blago HFA, ki imajo koncentracije fenilalanina v krvi med 360 - 600 $\mu\text{mol/L}$, ni nujno potrebno in je odvisno od posameznika. Je pa vzdrževanje koncentracij fenilalanina v krvi pod 360 $\mu\text{mol/L}$ nujno pri nosečnicah za preprečitev maternalne fenilketonurije (38).

3.5.1 Dietno zdravljenje

Fenilketonurija je bila prva presnovna bolezen, ki so jo uspešno zdravili z uvedbo diete, kar je vodilo v hiter razvoj presejalnega testiranja novorojencev (1, 3, 41).

Dieta je najpomembnejši ukrep pri zdravljenju PKU in je zelo specifična za vsakega posameznika, saj je odvisna od bolnikove starosti, telesne teže in stopnje okvare encima. Dietno zdravljenje je sestavljeno iz živil z nizko vsebnostjo beljakovin ter s hkratno zagotovitvijo zadostnega vnosa ostalih aminokislin s pomočjo ustreznih prehranskih preparatov. Primeren vnos kalorij se dodatno zagotavlja z nizko beljakovinskimi živali, kot sta določeno sadje in zelenjava (1, 3, 5, 41).

Dieta je doživljenjska, vendar se po otrokovem 10. letu nekoliko ublaži, saj visoke koncentracije fenilalanina v krvi takrat nekoliko manj vplivajo na že razvite možgane. V odrasli dobi je priporočeno vzdrževanje nivoja fenilalanina v krvi pod

700 $\mu\text{mol/L}$, saj višje koncentracije še vedno negativno vplivajo na razvoj nevrološke simptomatike (41, 46, 47).

Dieta pa ima lahko tudi negativne posledice. Nizka vsebnost beljakovin v dieti posledično vodi v pomanjkanje aminokislin, vitaminov in mineralov (kalcij, vitamini B1, B2, B6 in B12) ter nenasičenih maščobnih kislin. To pomanjkanje vodi v razne presnovne motnje, zmanjšano mineralizacijo kosti ter nevrološke motnje zaradi pomanjkanja vitamina B12 (41, 48). Prav zaradi tega je ob dieti nujno potrebno uživanje aminokislinskih preparatov, ki zagotovijo aminokislino, vitamine in minerale, potrebne za normalen razvoj (49, 50).

3.5.2 Zdravljenje s tetrahidrobiopterinom (BH_4)

V zadnjih nekaj letih se je v klinični praksi uveljavilo zdravljenje z BH_4 , saj je bilo dokazano, da se pri bolnikih, odzivnih na BH_4 , poveča toleranca na fenilalanin, kar pomeni zmanjšano potrebo po strogi dieti in uporabi preparatov (51 – 55).

BH_4 povečuje stabilnost encima PAH, za učinkovitost pa je potrebna zadostna jetrna aktivnost encima. Zato imajo bolniki z blažjo obliko genetske spremembe in vsaj delno ohranjeno aktivnostjo encima, boljši odziv na zdravljenje kot bolniki s hujšo obliko bolezni (41).

Bolniki, ki so potencialno odzivni na zdravljenje z BH_4 , morajo biti pred uvedbo zdravljenja testirani s testom obremenitve z BH_4 . Test izvedemo tako, da bolnik nekaj dni uživa dieto z normalno vsebnostjo beljakovin. Koncentracijo fenilalanina izmerimo pred ter 4, 8 in 24 ur po peroralnem odmerku 20 mg/kg BH_4 . Odziv na BH_4 se izračuna kot odstotek znižanega krvnega fenilalanina 8 ali 24 ur po zaužitju BH_4 . Kot kriterij odzivnosti se najpogosteje upošteva padec koncentracije fenilalanina za vsaj 30% glede na izhodiščno vrednost po obremenitvi (55 - 58).

4. NAMEN DELA, CILJI IN HIPOTEZE

Namen te magistrske naloge je opredelitev povezave med koncentracijo fenilalanina v krvi preiskovancev z blago HFA in genotipom gena *PAH*. V analizo bomo vključili bolnike, ki so imeli koncentracije fenilalanina v krvi višje od 200 $\mu\text{mol/L}$ in zato spadajo v skupino bolnikov z blago HFA.

Cilji:

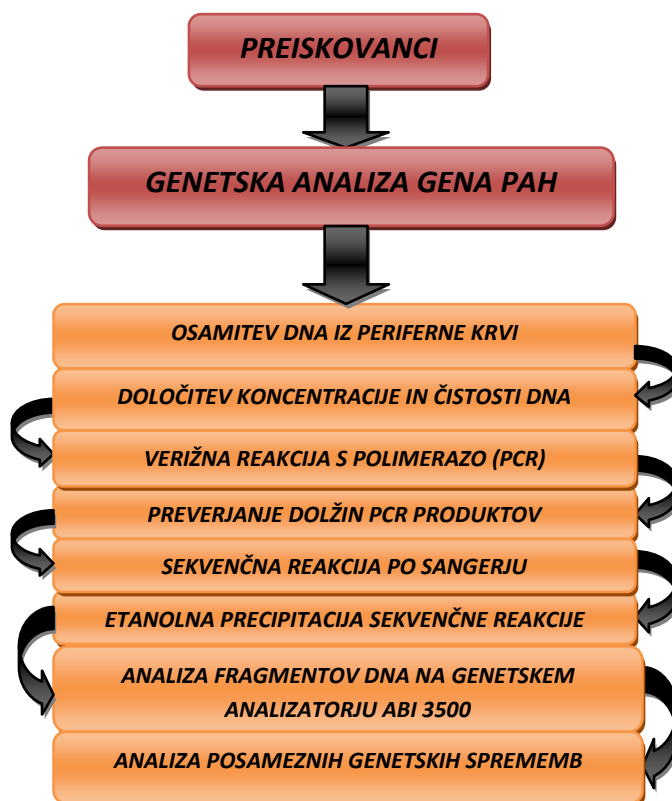
- Opredelitev genetskih sprememb v genu *PAH*, v skupini preiskovancev z blago povišanimi vrednostmi fenilalanina.
- Primerjava nabora opredeljenih genetskih sprememb pri bolnikih z blago HFA s spremembami, ki so bile predhodno opredeljene pri slovenskih bolnikih s PKU.
- Opredelitev povezav med posameznimi genetskimi spremembami in nivojem fenilalanina v krvi preiskovancev (presnovni fenotip).

Hipoteza:

V genu *PAH* so pri preiskovancih z blago HFA prisotne genetske spremembe, ki so povezane s povišanimi vrednostmi fenilalanina v krvi preiskovancev. Nivo fenilalanina pri posamezniku z blago HFA je povezan s specifičnimi genetskimi spremembami v genu *PAH*.

5. METODE IN MATERIALI

5.1 SHEMA POTEKA DELA



Slika 4: Shema poteka genetske analize gena PAH.

5.2 PREISKOVANCI

Spremljanje vseh skupin bolnikov z blago HFA in PKU je v Sloveniji centralizirano na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni Pediatrice klinike, UKC Ljubljana. V raziskavo smo vključili 97 bolnikov, ki so kadarkoli ob merjenju fenilalanina v krvi presegli koncentracijo 200 $\mu\text{mol/L}$. Od tega je bilo v času vključitve v raziskavo 13 bolnikov starejših od 18 let, medtem ko so ostali spadali v skupino otrok oziroma mladostnikov. Vsi vključeni preiskovanci oziroma starši mladoletnih preiskovancev so podali pisno privolitev k sodelovanju v raziskavi. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 29/03/09).

5.3 GENETSKA ANALIZA GENA PAH

5.3.1 Vzorci in osamitev DNA iz periferne krvi

Vzorec za genetsko analizo gena *PAH* je deoksiribonukleinska kislina (DNA), ki jo izoliramo iz periferne venske krvi, odvzete v epruveto z dodanim antikoagulantom EDTA (etilendiaminotetraocenta kislina).

Genomsko DNA smo osamili s setom Flexi gene[®] DNA kit (Qiagen) po navodilih proizvajalca.

DELOVNI POSTOPEK

a) Reagenti in kemikalije

- pufer FG1 za lizo celic,
- liofilizirana QIAGEN Proteaza, ki jo resuspendiramo v 1,4 mL pufru za hidracijo (FG3),
- pufer FG2 za denaturacijo celic, ki ga uporabimo za pripravo mešanice s Proteazo QIAGEN. Mešanico za en vzorec pripravimo tako, da 25 µL proteaze dodamo 2,5 mL pufru FG2;
- pufer FG3 za hidracijo celic,
- 100% izopropanol,
- 70% etanol, ki ga pripravimo z redčenjem 100% etanola.

b) Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirke (Eppendorf),
- 50 mL centrifugirke (Falcon TPP),
- pipete Gilson (10, 100, 200 µL) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- vodna kopel (Precithern[®] PFV),
- centrifuga (Megafuge, 1.OR, Heraeus),

➤ vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Thermolyne).

c) Postopek izolacije DNA iz 5 mL periferne venske krvi

V 50 mL centrifugirke odpipetiramo 12,5 mL pufru za lizo FG1 in dodamo 5 mL krvi, počasi premešamo in centrifugiramo 7 min pri 2300 rpm. Pazljivo odlijemo supernatant in obrnemo centrifugirko pokončno, na čisto papirnato brisačo, za približno 2 min. Oborini dodamo 2,5 mL proteazne mešanice FG2/QIAGEN in takoj dobro premešamo na vibracijskem mešalniku, da se pelet popolnoma homogenizira. Vzorce inkubiramo 15 min v vodni kopeli pri 65 °C. Dodamo 2,5 mL 100% izopropanola in z obračanjem mešamo, dokler se ne pojavi viden precipitat DNA. Po 5 minutnem centrifugiranju pri 2300 rpm odlijemo supernatant, centrifugirko obrnemo na čisto papirnato brisačo in osušimo. Oborino nadalje speremo z dodatkom 2,5 mL 70% etanola in vorteksiramo 5 sekund. Ponovno centrifugiramo 5 min pri 2000 rpm, odlijemo supernatant in centrifugirko obrnemo na čisto papirnato brisačo. Pelet sušimo najmanj 5 min na zraku. Po 5 minutah dodamo 400 µL pufru za hidracijo FG3 in pustimo na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan raztopljeno DNA prenesemo v označene mikrocentrifugirke in shranimo v hladilniku (62).

5.3.2 Določitev koncentracije in čistoče DNA

Predpogoj za uspešno nadaljnje delo je kvalitetno izolirana DNA. Količino in čistost izolirane DNA smo določili spektrofotometrično, z merjenjem absorbance. Z meritvijo absorbance pri 260 nm vzorcu določimo koncentracijo. Spektrofotometrično merjenje temelji na dejstvu, da baze v molekuli DNA absorbirajo UV svetlobo z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Vzorec DNA je primeren za nadaljnjo molekularno genetsko analizo, če je izmerjena koncentracija vsaj 50 µg/ml. Čistost izolirane DNA oziroma stopnjo kontaminacije s proteini nam pove razmerje absorbanc A_{260}/A_{280} . Vzorec DNA je primeren za nadaljnjo analizo, če je razmerje A_{260}/A_{280} med 1,7 in 2,0.

DELOVNI POSTOPEK

a) Instrumenti in oprema

- UV spektrofotometer (Lambda 25, Perkin Elmer),
- centrifuga,
- pipete in sterilni nastavki,
- deionizirana voda (dH₂O),
- 1,5 ml sterilne mikrocentrifugirke,
- mikro-kvarčne kivete (Helma).

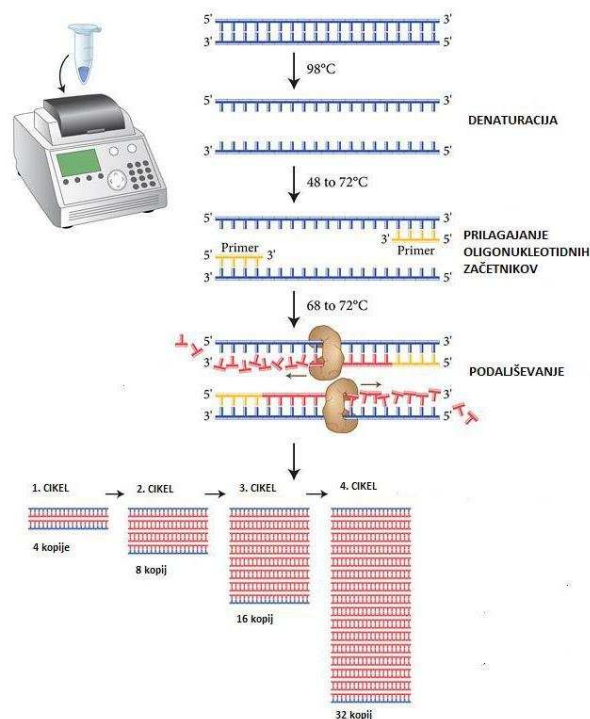
b) Postopek

Pred začetkom meritev smo prižgali spektrofotometer. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 990 µL dH₂O, dodali 10 µL izhodne raztopine DNA in dobro premešali. S pomočjo destilirane vode smo najprej izmerili koncentracijo slepe raztopine (angl. blank). Po merjenju slepe raztopine smo odčitali absorbanco vzorca pri 260 nm in 280 nm ter določili razmerje absorbanco (R) in koncentracijo izolirane DNA.

5.3.3 *Verižna reakcija s polimerazo (PCR)*

Metoda omogoča pomnoževanje specifičnih področij DNA iz minimalne količine DNA vzorca. Pomnoževanje omogoča termostabilen encim DNA-polimeraza, ki katalizira sestavljanje posameznih monomernih podenot (dNTP) v polimerno verigo DNA. Območje, ki ga želimo pomnožiti, omejimo z izbiro dveh kratkih molekul enoverižne DNA ali t.i. oligonukleotidnih začetnikov (angl. primer), ki sta komplementarna verigi DNA.

Reakcija je sestavljena iz treh korakov, ki se ciklično ponavljajo. Prvi korak v reakciji je denaturacija dvojne vijačnice, do katere pride zaradi segrevanja reakcijske zmesi. Sledi ji prileganje (angl. annealing) oligonukleotidnih začetnikov pri nekoliko nižji temperaturi. V zadnjem koraku (podaljševanje) se temperatura nekoliko dvigne, DNA polimeraza pa začne podaljševati obe novonastali verigi, od 5' konca proti 3' koncu, kar privede do tvorbe nove komplemetarne verige. Reakcija je ciklična, vsak cikel se ponovi 35X (63).



Slika 5: Shematski prikaz verižne reakcije (povzeto po 64).

DELOVNI POSTOPEK

a) Reagenti in kemikalije

- Preiskovančev vzorec, ki ga redčimo do koncentracije $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ z vodo za injiciranje. Za izračun volumna vzorca DNA in vode pri redčenju uporabimo enačbo:

$$c \cdot V = c_1 \cdot V_1 + c_2 \cdot V_2$$

$$V = V_1 + V_2$$

c...končna koncentracija ($100 \text{ ng}/\mu\text{L}$)

V...končen volumen

c1...koncentracija raztopine izolirane DNA

V1...volumen raztopine izolirane DNA (ki ga moramo dodati, da dobimo želen končni volumen z želeno koncentracijo)

c1...koncentracija DNA v vodi

V1...volumen vode (ki ga moramo dodati, da dobimo želen končni volumen z želeno koncentracijo)

Slika 6: Enačba za izračun volumna vzorca DNA

- Delovna raztopina oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 10 pmol/ μ L, ki jo pripravimo z redčenjem izvornih raztopin v 1,5 mL mikrocentrifugirke tako, da 10 μ L izvorni raztopini začetnih oligonukleotidov s koncentracijo 100 pmol/ μ L dodamo 90 μ L vode za injiciranje.
- GoTaq® Mater Mix (Promega),
- voda brez sledov nukleaz (angl. nuclease-free water).

b) Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirke(Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- nosilci za vzorce in podstavki za nosilce vzorcev (vse Applied Biosystems),
- 0,2 mL reakcijske epruvete in pripadajoči pokrovčki (vse Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (MaxiMixII, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems),
- voda za injiciranje (Braun),
- centrifuga 320R (Hettich).

c) Postopek reakcije PCR

Vse reagente, shranjene v zamrzovalni skrinji, smo odtajali, na kratko premešali in izračunali skupno količino reagentov potrebnih za reakcijsko mešanico (Tabela 3). Pred pripravo reakcijske mešanice smo prižgali aparat za PCR ter z alkoholom očistili delovno površino in instrumente, ki jih bomo uporabljali.

Tabela 3: Tabela reakcijske zmesi za reakcijo PCR (64).

REAKCIJSKA ZMES ZA PCR	1X [μ L]
GoTaq®Mater Mix	10
H ₂ O	7
Primer R	1
Primer F	1
DNA	1
Σ	20

V označen nosilec (datum, oznaka gena, vzorci) smo pripravili reakcijske epruvete za posamezne vzorce in dodatno za slepi vzorec. Dalje smo pripravili delovno mešanico za PCR in jo razdelili v pripravljene epruvete. Dodali smo začetne oligonukleotide in DNA preiskovancev. Epruvete smo dobro zaprli, premešali in kratko centrifugirali, da se znebimo morebitnih mehurčkov. Nosilec smo vstavili v aparat za PCR in zagnali ustrezen program (Tabela 4) (65).

Tabela 4: Optimizirani pogoji pomnoževanja PCR za eksone gena PAH.

OPTIMIZIRANI POGOJI POMNOŽEVANJA		
<i>Začetna denaturacija</i>		95 °C, 5'
35 X	<i>Denaturacija</i>	95 °C, 30"
	<i>Prileganje začetnikov</i>	58 °C, 30"
	<i>Podaljševanje verige</i>	72 °C, 30"
<i>Končno podaljševanje</i>		72 °C, 7'
<i>Hlajenje</i>		10 °C, ∞

Z reakcijo PCR smo pomnožili posamezne eksone gena PAH, pri čemer smo uporabili začetne oligonukleotide, navedene v tabeli 5 in povzete po (3).

Tabela 5: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje eksonov gena PAH (povzeto po 3); (OKRAJŠAVE in KRATICE: ^aF - okr. angl. forward; R - okr. angl. reverse; ^bnukleotidno zaporedje oligonukleotidnega začetnika; ^cbp - bazni par).

Ekson	Začetni oligonukleotid ^a	Nukleotidno zaporedje 5'-3'^b	Dolžina (bp)^c
1	1F	GCC CTA AAA AGC CAG AGA CC	189
	1R	ATG AAA CCA GGA AGC ACC AG	
2	2F	CTT GCT TTG TCC ATG GAG GT	244
	2R	AAC ATG GAA GTT TGC TAC GAC A	
3	3F	CAT CTT TGG CCT GCG TTA GT	282
	3R	GGA GTT ACT TAT GTT GCA AAA TTC C	
4	4F	GGG ATC CCC ACT TCT GAT CT	223
	4R	AGT GGA GGA GAG GCA CTG AA	
5	5F	ATG CAC TGT CAT GGC TTG AG	199
	5R	TCT TCC CCT CAA CAA GCA AG	
6	6F	CTA ACC TGC GTT CTG CTG TG	284
	6R	CCA TTG ACC CTG ATG TGG AC	
7	7F	AAA GGT CTC CTA GTG CCT CTG A	233
	7R	GCA ACT GGT AGC TGG AGG AC	
8	8F	GGC TTG GCT TAA ACC TCC TC	237
	8R	TGT ACC TGG TTT CCG CTC TT	
9	9F	CAG GGT CTA TGT GGG CTG TT	246
	9R	TCA AAG ACC TGA GGG CCA TA	
10	10F	TCC CTT CAT CCA GTC AAG GT	195
	10R	CCT TGG TTC CTG TGA AGG TC	
11	11F	GCA GCA GGG AAT ACT GAT CC	218
	11R	GCT CAC CTT TGT CAC CAC CT	
12	12F	CTC TAG GGA GGT GTC CGT GT	300
	12R	GCG ATG GTA GGG AAA GAC AG	
13	13F	TGC TTT GCA CTG AGG ACA CT	207
	13R	TGC TTT TCG GAC TTT TTC TGA	

5.3.4 Preverjanje dolžine produktov PCR

Agarozno gelsko elektroforezo uporabljamo za ločevanje molekul DNA glede na njihove velikosti, kar dosežemo s premikom negativno nabitih molekul nukleinskih kislin skozi agarozni gel v električnem polju.

DELOVNI POSTOPEK

a) Reagenti in kemikalije

- 10X pufer TBE (1M Tris HCl, 20 nM EDTA, 650 mM borova kislina), pripravimo tako, da 108 g TRIS baze (Sigma Aldrich) in 55 g borne kisline (Kemika) natehtamo v 1000 mL merilno bučko. Dodamo 40 mL 0,5 M EDTA s pH 8 (Riedel) in merilno bučko dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL. Pustimo, da se sestavine raztopijo in dobro premešajo s pomočjo magnetnega mešala.
- 1x koncentrirani TBE pufer dobimo z 10-kratnim redčenjem koncentriranega TBE pufra z destilirano vodo,
- Barvilo Syber Safe DNA gel stain (Invitrogen),
- Velikostni standard oziroma označevalec velikosti DNA (angl. Step Ladder 50 bp) (Sigma),
- Agarozna (Sigma – Aldrich).

b) 2% agarozni gel pripravimo tako, da v erlenmajarico natehtamo 1,6 g agaroze, dolijemo 80 mL 1x pufra TBE in dodamo 8 μ L barvila Syber Safe. Vse skupaj dobro premešamo in raztopimo agarozo v mikrovalovni pečici. Dolijemo destilirano vodo in ohladimo gel na približno 60 °C. Med hlajenjem pripravimo kalup z glavnički, kamor vlijemo gel. Ko se gel strdi, odstranimo glavničke in prenesemo gel v kadičko za elektroforezo, napolnjen z 1x pufrom TBE.

c) Instrumenti in oprema

- Tehnica (Sartorius TE6101),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,

- erlenmajerica,
- merilni valj,
- urno steklo,
- mikrovalovna pečica Sharp R – 939,
- 0,2 mL reakcijske epruvete (Applied Biosystems),
- sistem za agarozno gelsko elektroforezo: nosilec za gel in glavniček (Biorad),
- transluminator G: Bix Syngene.

d) Postopek agarozne elektroforeze

Po zaključku reakcije PCR smo 8 μ L produkta prenesli v žepke 2% agaroznega gela. Poleg vzorca smo na gel nanesti tudi velikostni standard, da smo določili velikost nukleinskih kislin. Elektroforezo smo pustili delovati 20 minut pri 90V. Pod UV lučjo transluminatorja smo preverili prisotnost in dolžino produktov PCR in gel fotografirali. Produkti so pomnoženi uspešno, če je jasno vidna lisa produkta PCR.

5.3.5 Sekvenčna reakcija

Najpogosteje uporabljena metoda za določanje specifičnega nukleotidnega zaporedja DNA amplikona je metoda po Sangerju oziroma dideoksi metoda. Metoda temelji na vgradnji fluorescentno označenih dideoksinukleotidov (ddNTP), ki ustavijo izgradnjo verige DNA. Med potekom sekvenčne reakcije se različno označeni ddNTP zaradi kemijske modifikacije vežejo na terminalni konec DNA verige in zaustavijo njeno sintezo. Vsak ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ima na 3' koncu vezano drugačno fluorescentno barvilo. Po končani sekvenčni reakciji dobimo zmes različno dolgih, pomnoženih fragmentov, ki se končajo vsak z enim od ddNTP.

DELOVNI POSTOPEK

a) reagenti in kemikalije

- ExoSAP – IT encim (USB Corporation) predhodno odmrznemo in premešamo,
- Big Dye Terminator 5X pufer (Applied Biosystems),
- Big Dye Terminator 3.1 reagent (Applied Biosystems), ki ga razredčimo z Big Dye Terminator pufrom, tako da 25 μL izvorne tekočine dodamo 87,5 μL pufra.
- Začetni oligonukleotidi s koncentracijo 10 pmol/ μL ,
- dH₂O.

b) instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μL) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- nosilci za vzorce in podstavki za nosilce vzorcev (vse Applied Biosystems),
- 0,2 mL reakcijske epruvete in pripadajoči pokrovčki (vse Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems),
- centrifuga universal 320R (Hettich).

c) Postopek sekvenčne reakcije

Na seznam za sekvenčno reakcijo smo napisali vrstni red reakcij. V vsako reakcijsko epruveto smo dodali 1 μL encima ExoSAP – IT, s katerim dosežemo encimsko razgradnjo neuporabljenih začetnih oligonukleotidov in deoksinukleotid trifosfatov iz reakcije PCR. Dodali smo 2,5 μL produkta PCR, dobro premešali, na kratko centrifugirali in mešanico inkubirali na aparatu za PCR. Inkubacija je potekala 15 min

pri 37 °C, nato pa še 15 min pri 80 °C, da smo deaktivirali encim. Po končani inkubaciji smo v vsako epico dodali 16,2 µL predhodno pripravljenega BDT Big Dye Terminator) reagenta, ki poleg navadnih nukleotidov vsebuje različno fluorescentno označene ddNTPje, in 0,3 µL ustreznega začetnega oligonukleotida. Reakcijske mešanice smo dobro premešali, centrifugirali in pomnožili v aparatu za PCR pod ustreznimi pogoji (Tabela 6).

Tabela 6: Pogoji pomnoževanja sekvenčne reakcije.

POGOJI SEKVENČNE REAKCIJE		
<i>Začetna denaturacija</i>		96 °C, 1'
25 X	<i>Denaturacija</i>	96 °C, 10"
	<i>Prileganje začetnikov</i>	50 °C, 5"
	<i>Podaljševanje verige</i>	60 °C, 4'
<i>Hlajenje</i>		4°C, ∞

5.3.6 Etanolna precipitacija sekvenčne reakcije

Po končani sekvenčni reakciji smo pred nadaljnjo analizo iz reakcijske mešanice odstranili nevgrajene ddNTP je, saj višek barvila, s katerim so označeni, vpliva na kvaliteto začetnega dela sekvenčnega elektroferograma in na kvaliteto prepoznavanja nukleotidov. Sekvenčno reakcijo smo očistili s postopkom etanolne precipitacije.

DELOVNI POSTOPEK

a) Reagenti in kemikalije

- 100 % etanol in 3 M natrijev acetat, ki ju pripravimo glede na število sekvenčnih reakcij (N) tako, da v čaši zmešamo $N \times 50 \mu\text{L}$ etanola in $N \times 2 \mu\text{L}$ natrijeva acetata,
- 70 % etanol, ki ga pripravimo z redčenjem 100% etanola,
- Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems).

b) Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 µL) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,

- 0,2 mL reakcijske epruvete in pripadajoči pokrovčki (vse Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi MixII, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems),
- centrifuga Universal 320R (Hettich).

c) Postopek etanolne precipitacije

V vsako sekvenčno reakcijo smo dodali 52 μ L mešanice 100% etanola in 3 M natrijevega acetata. Vzorce smo dobro premešali in inkubirali 10 minut na ledu. Po inkubaciji smo nosilec s sekvenčnimi reakcijami centrifugirali 45 minut pri 3990 rpm. Po končanem centrifugiranju smo nosilec obrnili na zloženo staničevino in narobe obrnjenega ponovno centrifugirali 1 minuto pri 500 rpm, da smo se znebili supernatanta. V posamezne epice smo dodali po 70 μ L 70% etanola in ponovili centrifugiranje pri prejšnjih pogojih. V epicah je ostala precipitirana sekvenčna reakcija, ki smo jo sušili dodatnih 10 minut pri sobni temperaturi. Produkte sekvenčne reakcije smo raztopili v 20 μ L formamida in denaturirali 5 minut pri 95 °Cv aparatu za PCR.

5.3.7 Analiza fragmentov DNA na genetskem analizatorju ABI 3500

Z analizatorjem ABI 3500 ločimo in detektiramo različno dolge odseke nukleinskih kislin po principu kapilarne elektroforeze. Pri kapilarni elektroforezi se fragmenti DNA ločujejo v tanki kapilari, napolnjeni s polimerom. V polimeru se fragmenti ločijo po velikosti zaradi različne afinitete do negativnega potenciala.

Odseke DNA, ki so se ločili po velikosti, presvetlimo z laserjem, kar povzroči, da označena DNA fluorescira. Oddano fluorescenco zazna detektor, podatke pa nato analiziramo z analitsko programsko opremo, ki nam izriše elektroferogram, natančneje z računalniškim programom Sequencing Analayses Software 5.4 (Applied Biosystems).

5.3.8 Interpretacija genetskih sprememb

Za analizo nukleotidnega zaporedja DNA in prepoznavanje genetskih sprememb v genu *PAH* smo uporabili računalniški program BLAST (angl. Basic local alignment search tool) (66), s katerim smo primerjali nukleotidno zaporedje pomnoženega odseka gena *PAH* z referenčnim zaporedjem gena, objavljenega v bazi zaporedij GenBank (referenčna številka NG_008690.1) (67).

Vse prepoznane genetske spremembe smo preverili v bazah podatkov *PAHdb* (angl. Phenylalanine Hydroxylase Locus Specific Database) in HGMD professional (angl. The Human Gene Mutation Database, (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) ali v že objavljeni literaturi, dostopni v bazi podatkov PubMed (68, 70, 71). V podatkovni bazi dbSNP (angl. The Single Nucleotide Polymorphism database) smo preverili, ali je opredeljena sprememba že znana in prisotna v splošni populaciji (69). Spremembe, ki v teh bazah še niso bile opisane, smo obravnavali kot nove. Poimenovali smo jih po priporočeni nomenklaturi združenja HGVS (Human Genome Variation Society, <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) in njihovo potencialno vzročnost preverili z orodji Swift (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) in Mutation Taster (www.mutationtaster.org) (72 - 75). Z uporabo teh treh bioinformacijskih orodij smo ocenili verjetnost, da vplivajo na funkcijo proteina in so lahko vzrok za klinično sliko.

Vse ugotovljene nukleotidne spremembe smo potrdili s ponovnim določanjem zaporedja gena, ki smo ga pomnožili iz ponovno razredčene preiskovančeve DNA.

5.3.9 Povezava genotipa s presnovnim fenotipom

Presnovni fenotip preiskovancev smo opredelili na podlagi vrednosti fenilalanina v krvi ($\mu\text{mol/L}$), ki smo jo pridobili iz razpoložljive laboratorijske dokumentacije. V preiskavo smo vključili preiskovance, ki so imeli koncentracijo fenilalanina v krvi v območju, ki je značilen za blago HFA in sicer glede na v uvodnem delu opisane kriterije za ugotavljanje presnovnega fenotipa.

V podatkovnih bazah *PAHdb* in HGMD professional smo poiskali podatke o pomenu posamezne opredeljene genetske spremembe in njenem vplivu na presnovni fenotip ter podatke o preostali encimski aktivnosti (PEA) mutiranega encima PAH, izraženo

kot delež aktivnosti encima (%) glede na encimsko aktivnost nespremenjenega encima (68, 70).

5.3.10 Primerjava genetskih sprememb pri slovenskih bolnikih z blago HFA in PKU

Za primerjavo podatkov genetskih sprememb med obema oblikama bolezni smo uporabili podatke pridobljene v tej raziskavi in podatke iz predhodnih raziskav slovenske populacije bolnikov s PKU (3, 8). V predhodno raziskavo je bilo do leta 2012 vključenih 107 bolnikov, ki zaradi povišanih vrednosti Phe v krvi potrebujejo dietno zdravljenje in so vodeni na Pediatrični kliniki v Ljubljani.

5.3.11 Izračun pojavnosti blage HFA v Sloveniji

Pojavnost blage HFA v Sloveniji smo ocenili tako, da smo izračunali razmerje med skupnim številom bolnikov s presnovnim fenotipom blage HFA, rojenih v obdobju od 1.1.1990 do 31.12.2014, in številom vseh živorojenih otrok v Sloveniji v istem obdobju. Podatek o številu živorojenih otrok smo pridobili na spletni strani Statističnega urada Republike Slovenije (dosegljivo na: <http://www.stat.si>) (76).

5.4 STATISTIČNE METODE IN ANALIZA

Pridobljene podatke za posameznega bolnika smo s programsko opremo Microsoft Office Excel 2010 vnesli v tabele. Za statistično obdelavo podatkov smo izbrali statistični program Minitab, verzijo 17.2.1 (Pennsylvania State University).

Z uporabo parametričnega statističnega testa ANOVA (analiza variance) smo primerjali osnovne genotipske lastnosti in laboratorijske vrednosti preiskovancev. Preiskovance smo razdelili v tri skupine (skupina preiskovancev brez genetskih sprememb, skupina z vzročno spremembo na enem alelu in skupina z vzročnima spremembama na obeh alelih) pri katerih smo ugotavljali, če so razlike statistično značilne za posamezno skupino.

Za nadaljevanje statistične analize smo uporabili dve *post hoc* metodi, s katerima smo preverili vpliv določenih spremenljivk na izmerjeno koncentracijo fenilalanina v krvi. Z Games - Howellovim testom smo preverili vpliv genotipa na fenotip v posamezni skupini. Nadalje smo analizo razširili in poleg vpliva genotipa vključili še starost kot neodvisno spremenljivko, saj nas je zanimalo, če ima starost na fenotip močnejši vpliv kot genotip. Pri tem smo uporabili generaliziran linearni model, s katerim smo korigirali razlike med skupinami in starostjo ter preverili, če ima starost statistično večji vpliv od genotipa. S Tukey primerjalnim testom smo dodatno preverjali, ali na koncentracijo fenilalanina vpliva tudi starost preiskovancev oziroma smo naredili ponovno primerjavo, kako genotip, v odvisnosti od starosti, vpliva na fenotip.

Spremenljivko smo opredelili kot statistično značilno, kadar je bila P vrednost $\leq 0,05$.

6. REZULTATI

6.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo zajeli 97 bolnikov, ki so bili povabljeni na obravnavo na Klinični oddelek za endokrnologijo, diabetes in bolezni presnove Pediatrične klinike Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani v obdobju od septembra 2011 do konca avgusta 2015. Preiskovanci, ki so bili zajeti v raziskavo, so imeli vsaj enkrat ob merjenju koncentracijo fenilalanina v krvi višjo od 200 $\mu\text{mol/L}$. V raziskavo je bilo tako vključenih 42 deklet in 55 fantov s povprečno starostjo 10,5 let, od tega je bilo 13 preiskovancev starejših od 18 let.

6.2 NABOR SPREMEMB GENA PAH PRI BOLNIKI S HFA

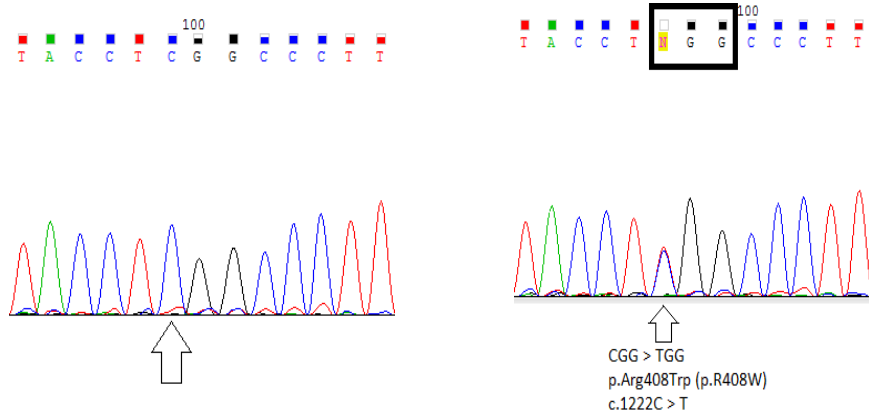
Genetske spremembe, ki so v analizirani skupini preiskovancev vzrok za blago HFA, smo dokazali na 81 od 194 neodvisnih alelov (42%). Skupno smo opredelili 22 različnih vzročnih sprememb, od tega je bilo:

- 16 drugačnosmiselnih sprememb (72%),
- 3 spremembe, ki vplivajo na izrezovanje (14%),
- 2 nesmiselni spremembi (9%),
- 1 manjša delecija (5%).

Spremembi na obeh alelih sta bili prisotni pri 21 preiskovancih, sprememba na enem alelu pri 39 preiskovancih, medtem ko pri preostalih 37 preiskovancih vzročne spremembe niso bile prisotne. Vse opredeljene vzročne spremembe so bile prisotne v heterozigotni obliki.

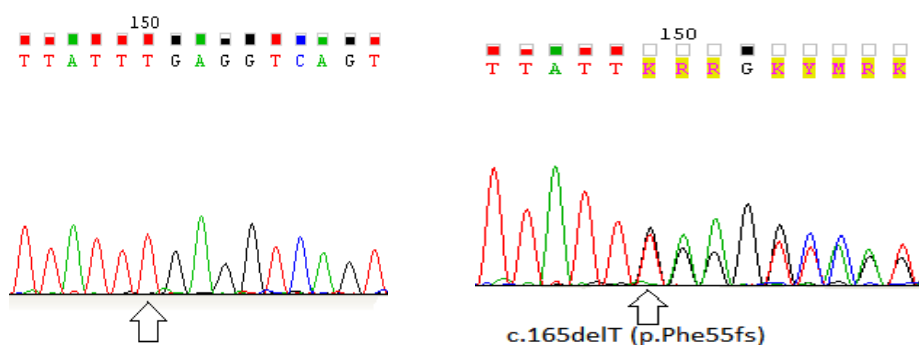
Najpogosteje je bila zastopana sprememba p.R408W v eksonu 12 (9,8% vseh mutiranih alelov). Druge pogoste genetske spremembe so bile: p.A403V (7,7%), p.R158Q (9%), p.A300S (6%) in p.E390G (6%). Vse spadajo med drugačnosmiselne

genetske spremembe, pri katerih pride do substitucije, kar vodi do nastanka novega kodona, ki kodira drugo aminokislino in s tem spremeni nastajajoči polipeptid.



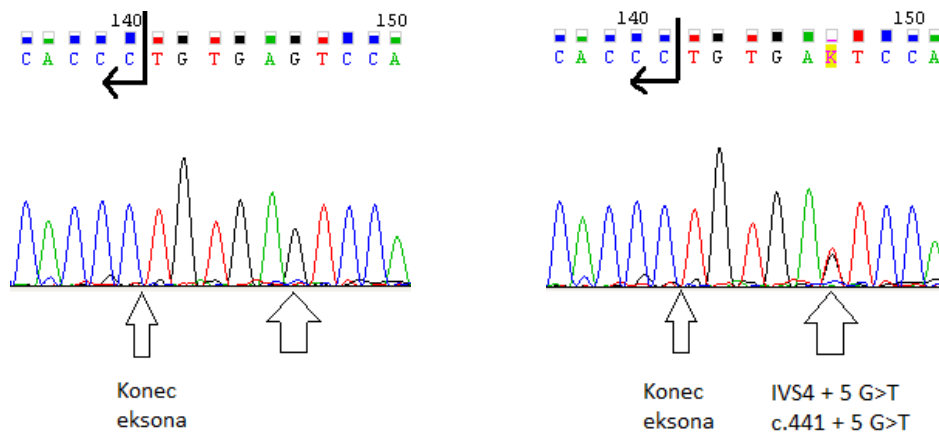
Slika 7: Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primera drugačnosmiselne genetske spremembe v heterozigotni obliki. V tem primeru je prikazana najpogosteje zastopana genetska sprememba p.R408W, ki se nahaja v eksonu 12 gena PAH.

5% opredeljenih sprememb je predstavljala delecija c.165delT (p.Phe55fs) v eksonu 2, ki povzroči spremembo bralnega okvirja in nastanek prezgodnjega terminacijskega kodona, ki povzroči prezgodnjo zaustavitev transkripcije proteina PAH na mestu 55. Posledično nastane krajši protein (55 aminokislina namesto 452 amonokislin), ki je najverjetneje tudi nepravilno zvit in katalitično manj aktiven (24, 26).

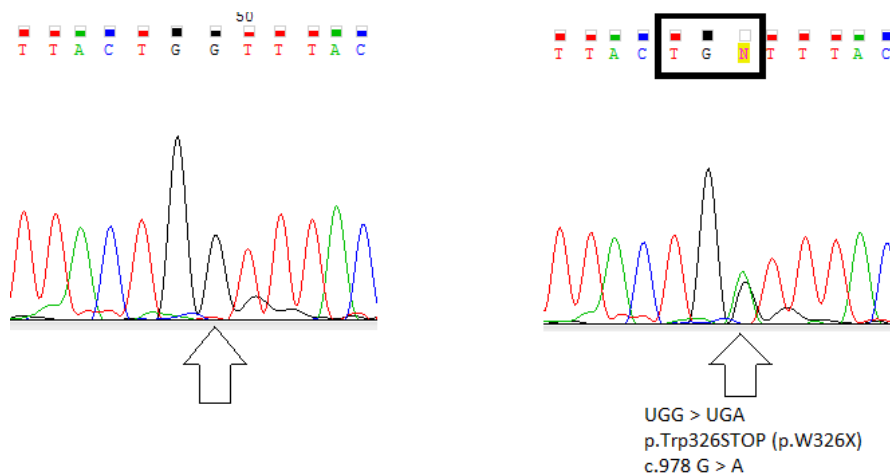


Slika 8: Prikaz normalnega zaporedja gena PAH in primera delecije v heterozigotni obliki. V tem primeru gre za delecijo (c.165delT) na eksonu 2 v genu PAH.

Ostale genetske spremembe gena *PAH*, ki so zastopane v manj kot 5% glede na posamezno genetsko spremembo in se pojavijo v genu *PAH*, spadajo med genetske spremembe, ki vplivajo na izrezovanje in se nahajajo v intronskih regijah.



Slika 9: Prikaz normalnega zaporedja gena *PAH* in primer intronske genetske spremembe v heterozigotni obliki. V tem primeru gre za IVS4 + 5 G>T v intronu 4.



Slika 10: Prikaz normalnega zaporedja gena *PAH* in primer nesmiselne genetske spremembe v heterozigotni obliki. V tem primeru gre za spremembo p.W326X v eksonu 10.

Tabela 7: Nabor vzročnih sprememb gena PAH pri bolnikih z blago HFA v slovenski populaciji, njihova pogostnost in značilnosti; (OKRAJŠAVE in KRATICE: PEA (%) – predvidena encimska aktivnost spremenjenega gena PAH in vitro; NP-ni podatka, Del – delecija; Drug – drugačnosmiselna; Spl – povezana z izrezovanjem; Ne – nesmiselna).

<i>Položaj</i>	IME GENETSKE SPREMEMBE	PEA (%)	DELEŽ(%)	VRSTA GENETSKE SPREMEMBE
Ekson 2	p.Phe55>fs (c.165delT)	0	4/194 (2,06)	Del
Ekson 2	p.R158Q (c.133G>A)	NP	2/194 (1,03)	Drug
Ekson 2	p.L48S (c.143T>C)	39	2/194 (1,03)	Drug
Ekson 2	p.V45A (c.134T>C)	NP	1/194 (0,52)	Drug
Ekson 3	p.L62P (c.185T>C)	NP	2/196 (1,03)	Drug
Intron 4	IVS4+5G>T (c.441+5G>T)	NP	1/194 (0,52)	Spl
Ekson 5	p.R158Q (c.473G>A)	10	7/194 (3,6)	Drug
Ekson 6	p.I224T (c.671T>C)	NP	1/194 (0,52)	Drug
Ekson 6	p.V177L (c.529G>C)	NP	2/194 (1,03)	Drug
Ekson 6	p.V190A (c.569T>C)	100	1/194 (0,52)	Drug
Ekson 7	p.V245A (c.734T>C)	51	3/194 (1,54)	Drug
Ekson 7	p.R243X (c.727C>T)	<1	1/194 (0,52)	Ne
Ekson 7	p.P281L (c.842C>T)	<1	2/194 (1,03)	Drug
Ekson 8	p.A300S (c.898G>T)	31	5/194 (2,58)	Drug
Intron 8	IVS8-7A>G (c.913-7A>G)	NP	1/194 (0,52)	Spl
Intron 8	IVS8-2A>G (c.913-2A>G)	0	2/194 (1,03)	Spl
Ekson 10	p.W326X (c.978G>A)	NP	1/194 (0,52)	Ne
Ekson 10	p.S349P (c.1045T>C)	<1	1/194 (0,52)	Drug
Ekson 11	p.E390G (c.1169A>G)	77	5/194 (2,58)	Drug
Ekson 12	p.A403V (c.1208C>T)	66	15/194 (7,73)	Drug
Ekson 12	p.R408W (c.1222C>T)	1	19/194 (9,79)	Drug
Ekson 12	p.D415N (c.1243G>A)	72	3/194 (1,54)	Drug

Poleg sprememb, ki vplivajo na funkcijo proteina in povzročajo bolezen, smo našli tudi osem že opisanih polimorfizmov, ki so pogosto prisotni v zdravi populaciji. Prisotni so bili v homozigotni ali heterozigotni obliki. Od tega so štirje polimorfizmi eksonski:

- p.Q232Q (rs1126758),
- p.V245V (rs1042503),
- p.L385L (rs772897),
- p.N426N (rs59326968),
- p.Tyr414= (rs1801152).

Trije polimorfizmi pa se nahajajo v intronskih regijah:

- c.168 + 19 T>C (rs17842947),
- c.353 – 22 C>T (rs2037639),
- c.969 + 43 G>T (rs1522306).

Genetski polimorfizem je genetska sprememba, ki je prisotna pri več kot 1% populacije (angl. minor allele frequency, MAF > 0,01). Pogostost pojavljanja polimorfizmov v evropski populaciji smo preverjali v bazi ExAC (angl. Exome Aggregation Consortium) in vrednosti pogostosti posameznih polimorfizmov primerjali s polimorfizmi, prisotnimi v naši preiskovani populaciji (Tabela 8). Poleg pogostosti vseh polimorfizmov smo med seboj preverjali tudi delež posameznih polimorfizmov v homozigotni in heterozigotni obliki (Tabela 9) in tako poskušali ovrednotiti ali imajo posamezni polimorfizmi vpliv na povišane vrednosti Phe pri naših preiskovancih.

Tabela 8: Pogostost pojavljanja posameznih polimorfizmov glede na bazo ExAC in v naši populaciji.

POLIMORFIZEM	POGOSTOST polimorfizma v bazi ExAC (%)	POGOSTOST polimorfizma v preiskovani populaciji (%)
p.Gln232=	59	32
p.Val245=	26	19,6
p.Leu385=	85	4
p.Asn426=	0,05	0,5
p.Tyr414=	1,3	0,5
c.168+19C>T	16	7,2
c.353-22C>T	24	11,3
c.959+43G>T	41	0,5

Tabela 9: Pogostost pojavljanja posameznih polimorfizmov glede na bazo ExAC in v naši populaciji, glede na homozigotno in heterozigotno obliko.

POLIMORFIZEM	DELEŽ homozigotov v bazi ExAC (%)	DELEŽ homozigotov v preiskovani populaciji (%)	DELEŽ heterozigotov v bazi ExAC (%)	DELEŽ heterozigotov v preiskovani populaciji (%)
p.Gln232=	35	12	24	20
p.Val245=	6,6	6,2	19,4	13,4
p.Leu385=	72	0	13	4
p.Asn426=	0	0	0,05	0,5
p.Tyr414=	0,02	0	1,28	0,5
c.168+19C>T	2,6	0	13,4	7,2
c.353-22C>T	5,9	0	18,1	11,3
c.959+43G>T	17	0	24	0,5

6.3 PRIMERJAVA VZROČNIH SPREMEMB V GENU PAH PRI SLOVENSКИH BOLNIKI H Z BLAGO HFA IN PKU

Tabela 10: Nabor vzročnih sprememb gena PAH pri bolnikih s PKU v slovenski populaciji, njihova pogostnost in značilnosti; (OKRAJŠAVE in KRATICE: PEA (%) – predvidena encimska aktivnost spremenjenega gena PAH in vitro).(Povzeto po 3).

Položaj	IME GENETSKE SPREMEMBE	PEA (%)	DELEŽ(%) vzročnih genetskih sprememb pri PKU	DELEŽ(%) vzročnih genetskih sprememb pri blagi HFA
Ekson 1	p.L15Gfs (c.43 44insAG)	0	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 1	p.G19Gfs (c.56+1delACAGG)	0	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 2	p.V45A (c.134T>C)	NP	1/214 (0,5)	1/194 (0,52)
Ekson 2	p.R158G (c.133G>A)	NP	0/214 (0,0)	2/194 (1,03)
Ekson 2	p.L48S (c.143T>C)	39	5/214 (2,3)	2/194 (1,03)
Ekson 2	p.Phe55>fs (c.165delT)	0	6/214 (2,8)	4/194 (2,06)
Intron 2	IVS2+5G>C (c.168+5G>C)	NP	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 3	p.L62P (c.185T>C)	NP	1/214 (0,5)	2/194 (1,03)
Ekson 3	EX3del14765 (g.21560 26324del14765)	0	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 4	p.N133Rfs (c.398 401 delATCA)	0	5/214 (2,3)	0/194 (0,0)
Intron 4	IVS4+5G>T (c.441+5G>T)	NP	1/214 (0,5)	1/194 (0,52)
Ekson 5	p.R158Q (c.473G>A)	10	19/214 (8,9)	7/194 (3,6)
Ekson 5	p.R157S (c.471 A>C)	NP	2/214 (0,9)	0/194 (0,0)
Ekson 5	EX5del1955 (g.50448 51402del1955)	0	3/214 (1,4)	0/194 (0,0)

Ekson 6	p.V177L (c.529G>C)	NP	1/214 (0,5)	2/194 (1,03)
Ekson 6	p.E178G (c.533A>G)	39	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 6	p.V190A (c.569T>C)	100	1/214 (0,5)	1/194 (0,52)
Ekson 6	p.Q190A (c.569T>C)	NP	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 6	p.I224T (c.671T>C)	NP	0/214 (0,0)	1/194 (0,52)
Ekson 7	p.R243X (c.727C>T)	<1	1/214 (0,5)	1/194 (0,52)
Ekson 7	p.V245A (c.734T>C)	51	1/214 (0,5)	3/194 (1,54)
Ekson 7	p.R252W (c.754C>T)	<1	2/214 (0,9)	0/194 (0,0)
Ekson 7	p.R261Q (c.782G>A)	41	9/214 (4,2)	0/194 (0,0)
Ekson 7	p.E280K (c.838G>A)	4	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 7	p.P281L (c.842C>T)	<1	14/214 (6,5)	2/194 (1,03)
Ekson 8	p.A300S (c.898G>T)	31	1/214 (0,5)	5/194 (2,58)
Intron 8	IVS8+2T>C (c.912+2T>C)	0	3/214 (1,4)	0/194 (0,0)
Intron 8	IVS8-7A>G (c.913-7A>G)	NP	1/214 (0,5)	1/194 (0,52)
Intron 8	IVS8-2A>G (c.913-2A>G)	0	4/214 (1,9)	2/194 (1,03)
Intron 10	IVS10-11G>A (c.1066-11G>A)	0	4/214 (1,9)	0/194 (0,0)
Intron 10	IVS10-3C>T (c.1066-3 C>T)	NP	5/214 (2,3)	0/194 (0,0)
Ekson 10	p.S349P (c.1045T>C)	<1	1/214 (0,5)	1/194 (0,52)
Ekson 10	p.W326X (c.978G>A)	NP	0/214 (0,0)	1/194 (0,52)
Ekson 11	p.K363Nfs (c.1089delG)	0	1/214 (0,5)	0/194 (0,0)
Ekson 11	p.E390G (c.1169A>G)	77	14/214 (6,5)	5/194 (2,58)
Ekson 12	p.A403V (c.1208C>T)	66	15/214 (7,0)	15/194 (7,73)
Ekson 12	p.R408W (c.1222C>T)	1	63/214 (29,4)	19/194 (9,97)
Ekson 12	p.D415N (c.1243G>A)	72	5/214 (2,3)	3/194 (1,54)
Ekson 12	IVS12+1G>A (c.1315+1G>A)	0	7/214 3,3)	0/194 (0,0)

Pri slovenskih bolnikih s PKU je bila genetska sprememba, ki povzroča bolezen, dokazana pri 209 od 214 neodvisnih alelov (3, 8). Pri bolnikih s HFA pa smo v tej raziskavi vzročne spremembe opredelili pri 81 od 194 alelov. Pri bolnikih s PKU so bile spremembe s PEA manj kot 5% prisotne pri 118 od 214 alelov (55,2 %), pri bolnikih s HFA pa pri 29 od 194 alelov (14,9%).

6.4 NABOR GENOTIPOV PRI SESTAVLJENIH HETEROZIGOTIH

Pri 21 bolnikih, ki so imeli prisotni spremembi na obeh alelih, je bilo prisotnih 19 različnih kombinacij genotipov. Pri tem sta se ponovili dve kombinaciji, in sicer:

- p.A403V v kombinaciji s p.D415N,
- p.A403V v kombinaciji s p.Phe55fs.

Pri vseh sestavljenih heterozigotih, kjer so bili na voljo podatki, smo izračunali tudi povprečje PEA (%), da smo lažje ovrednotili preostalo encimsko aktivnost PAH in vitro.

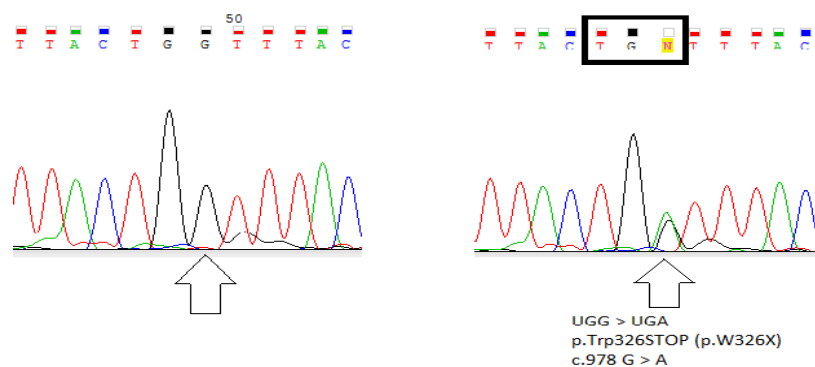
Tabela 11: Nabor kombinacij genotipov PAH in lastnosti posamezne spremembe pri bolnikih z blago HFA v slovenski populaciji; (OKRAJŠAVE in KRATICE: PEA (%) – predvidena encimska aktivnost spremenjenega gena PAH in vitro).

		GENOTIP					POVPREČEN PEA (%)
		Alel 1			Alel 2		
	IME GENETSKE SPREMEMBE	FENOTIP	PEA (%)	IME GENETSKE SPREMEMBE	FENOTIP	PEA (%)	
1	p.A300S (c.898G>T)	bHFA	31	p.E390G (c.1169A>G)	bHFA	77	54
2	p.A300S (c.898G>T)	bHFA	31	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	48,5
3	p.A300S (c.898G>T)	bHFA	31	IVS4+5G>T (c.441+5G>T)	PKU	Ni podatka	NP
4	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.Phe55fs (c.165delT)	PKU	0	33
5	p.R158Q (c.473G>A)	PKU	10	p.E390G (c.1169A>G)	bHFA	77	43,5
6	p.V45I (c.133G>A)	NOVA	Ni podatka	p.W158G (c.473G>A)	PKU	Ni podatka	NP
7	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.R408W (c.1222C>T)	PKU	1	33,5
8	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.D415N (c.1243G>A)	bHFA	72	69
9	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.V245A (c.734T>C)	bHFA	51	58,5
10	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.V190A (c.569T>C)	PKU	100	83
11	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	IVS8-2A>G (c.913-2A>G)	PKU	0	33
12	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.A300S (c.898G>T)	bHFA	31	48,5
13	p.A403V (c.1208C>T)	bHFA	66	p.P281L (c.842C>T)	PKU	< 1	33,5
14	p.R158QW (c.473G>A)	PKU	10	p.V177L (c.529G>C)	PKU	Ni podatka	NP
15	p.R408W (c.1222C>T)	PKU	1	p.E390G (c.1169A>G)	bHFA	77	39
16	p.R408W (c.1222C>T)	PKU	1	p.A300S (c.898G>T)	bHFA	31	16
17	p.R408W (c.1222C>T)	PKU	1	p.V245A (c.734T>C)	bHFA	51	26
18	p.R408W (c.1222C>T)	PKU	1	p.V177L (c.529G>C)	PKU	Ni podatka	NP

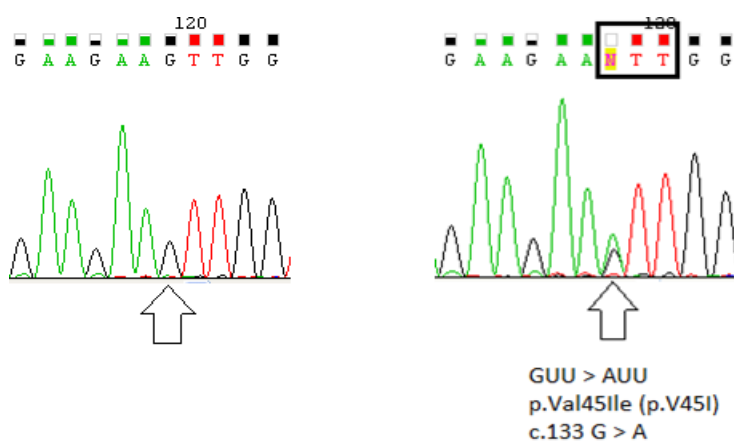
19	p.V245A (c.734T>C)	bHFA	51	p.R158Q (c.473G>A)	PKU	10	30,5
----	-----------------------	------	----	-----------------------	-----	----	------

6.5 NOVE GENETSKE SPREMEMBE

Opredelili smo tudi dve novi, do sedaj še neopisani spremembi v genu *PAH*. Sprememba c.978G>A povzroči zamenjavo aminokislina triptofan na mestu 326 v predčasen terminacijski kodon (p.W326X). Sprememba c.133G>A pa povzroči zamenjavo aminokislina valin na mestu 45 v izolevcin (p.V45I).



Slika 11: Prikaz normalnega zaporedja gena *PAH* in primer nove genetske spremembe p.W326X v eksonu 10.



Slika 12: Prikaz normalnega zaporedja gena *PAH* in primer nove genetske spremembe p.V45I v eksonu 2.

Vpliv novih genetskih sprememb v genu *PAH* na presnovni fenotip smo ocenili z uporabo različnih *in silico* spletnih bioinformacijskih orodij, ki nam podajo napoved o vzročnosti genetske spremembe. Uporabili smo orodja Sift, PolyPhen – 2 in Mutation Taster, ki napovedujejo ali genetska sprememba vpliva na fenotip bolezni (72, 74, 75). Pri oceni vzročnosti z orodjem Sift velja, da je sprememba vzročna, če so vrednosti nižje od 0,05 in da tolerira spremembo, če je rezultat višji od 0,05. Pri ostalih bioinformacijskih orodjih velja, da je sprememba vzročna, če se vrednosti približujejo 1. Izidi testov za posamezno genetsko spremembo so prikazani v spodnji tabeli (Tabela 12). Kot vzročno genetsko spremembo smo obravnavali spremembo, ki smo ji z vsaj dvema uporabljenima orodjema napovedali vplivna funkcionalnost proteina.

Tabela 12: rezultati in silico analiz novih genetskih sprememb.

GENETSKA SPREMEMBA	SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster
p.W326X (c.978G>A)	Ni podatka	Ni podatka	1
p.V45I (c.133G>A)	0,22	0,006	0,99

6.6 ANALIZA VPLIVA GENOTIPA NA FENOTIP

Na podlagi genetske analize smo vse preiskovance razdelili v tri skupine, ki smo jih med seboj statistično primerjali:

- Skupina O: brez prisotnih vzročnih sprememb gena *PAH*,
- Skupina 1: prisotna vzročna sprememba na enem alelu,
- Skupina 2: prisotni vzročni spremembi na obeh alelih.

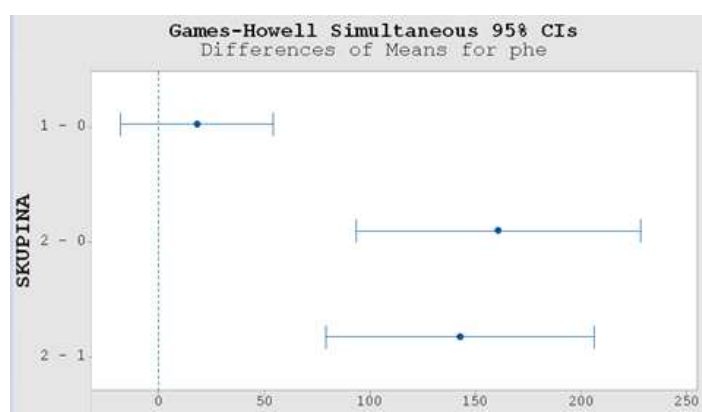
S statističnimi primerjalnimi testi smo preverjali vpliv na fenotip (koncentracija fenilalanina v krvi) v odvisnosti od genotipa kot prve spremenljivke in dodatno vpliv starosti kot druge neodvisne spremenljivke.

6.6.1 Games - Howellov test

Z Games - Howellovim testom smo primerjali vpliv, ki ga ima posamezna skupina genotipa na fenotip. V Tabeli 13 so prikazane posamezne P vrednosti, ki povejo kakšna je statistična značilnost med posameznimi skupinami, kar je prikazano tudi grafično na Sliki 13.

Tabela 13: Rezultati Games – Howellove analize (P vrednosti) s katero smo primerjali vpliv genotipa med skupinami na fenotip.

PRIMERJANE SKUPINE GENOTIPOV	P VREDNOST
1 - 0	0,455
2 - 0	0,000
2 - 1	0,000



Slika 13: Diagram prikazuje statistično značilno povezavo med posameznimi skupinami pri 95% intervalu zaupanja (x os: primerjane skupine genotipov; y os: koncentracija Phe v krvi).

6.6.2 Generaliziran linearni model

Z generaliziranim linearnim modelom smo v statistično analizo vključili še starost preiskovancev. V Tabeli 14 vidimo vpliv starosti in kakšen je njen prispevek na fenotip v primerjavi s prispevkom genotipa.

Tabela 14: Vpliv starosti na genotip v primerjavi s prispevkom genotipa.

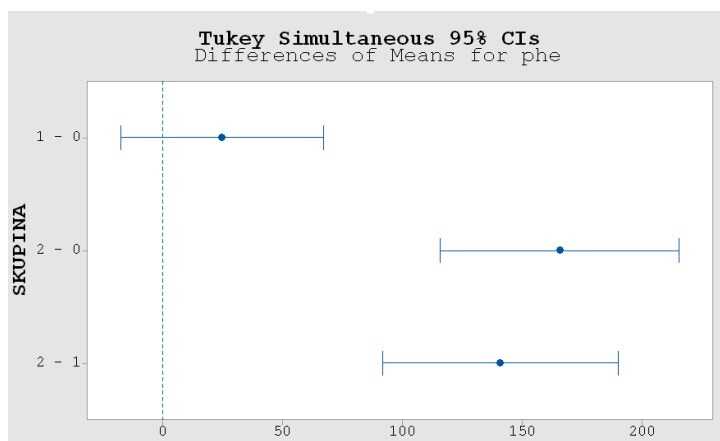
	P VREDNOST	PRISPEVEK (%)
STAROST	0,056	1,20
GENOTIP	0,000	41,88

6.6.3 Tukey test

Pred primerjavo s Tukey testom smo z generaliziranim linearnim modelom korigirali starost, da so bili končni rezultati testa starostno prilagojeni. Rezultati v Tabeli 15 prikazujejo P vrednosti med posameznimi skupinami.

Tabela 15: P vrednosti med posameznimi skupinami, ki smo jih dobili, ko smo v test vključili še korigirano starost.

PRIMERJANE SKUPINE GENOTIPOV	P VREDNOST
1 - 0	0,348
2 - 0	0,000
2 - 1	0,000



Slika 14: Diagram prikazuje statistično značilno povezavo med posameznimi skupinami pri 95% intervalu zaupanja, ko poleg vpliva genotipa vključimo še starost bolnikov (x os: primerjane skupine genotipov; y os: koncentracija Phe v krvi).

6.7 POJAVNOST BLAGE HFA V SLOVENIJI

Pojavnost blage HFA v Sloveniji je približno 1:2.590. Izračun temelji na podatku, da se je med letoma 1990 in 2014 v Sloveniji rodilo 492.040 otrok, med katerimi jih je 190 razvilo blago hiperfenilalaninemijo.

7. RAZPRAVA

V nalogi smo želeli z analizo gena *PAH* povezati opredeljene genotipske spremembe s presnovnim fenotipom preiskovancev, ki imajo koncentracijo fenilalanina v krvi v območju, ki je značilen za blago HFA. Večina dosedanjih raziskav povezav genetskega ozadja s povišanimi vrednostmi fenilalanina se je omejila na bolnike z vrednostmi, ki so značilne za fenilketonurijo (12). V raziskavo so bili vključeni vsi bolniki, ki so bili na dieti, čeprav njihove vrednosti fenilalanina niso bile močno povišane (1, 3, 18). Naša raziskava je v slovenski populaciji prva podrobnejša raziskava, osredotočena na genetsko ozadje bolnikov z blago HFA in na opredelitev vpliva genotipa na presnovni fenotip bolnikov.

7.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 97 bolnikov, ki so vodeni na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove Pediatrične klinike v Ljubljani kot bolniki z blago HFA. V nacionalnem registru bolnikov s PKU in blago HFA je zavedenih 118 bolnikov s PKU in 171 bolnikov z blago HFA (leto 2012). Bolniki, vključeni v to raziskavo, predstavljajo 33% vseh bolnikov in 57% bolnikov z blago HFA ter so s tem reprezentativen vzorec slovenske populacije bolnikov z blago HFA.

7.2 NABOR SPREMEMB GENA *PAH* PRI BOLNIKI S HFA

Pri preiskovani skupini preiskovancev smo opredelili nabor 22 različnih genetskih sprememb, od tega dve, ki po dostopnih podatkih v literaturi še nista bili opisani pri bolnikih s PKU ali blago HFA.

Glede na bazo podatkov *PAHdb*, kjer so zbrane vse znane spremembe v genu *PAH*, je bilo v naši skupini preiskovancev več drugačnosmiselnih (72% v primerjavi s 63%) in nesmiselnih (9% v primerjavi z 5%) genetskih sprememb ter nekoliko manj manjših delecij (5% v primerjavi z 13%). Delež ostalih sprememb je bil primerljiv z deležem v

bazi oziroma jih v naši preiskovani skupini nismo opredelili. Vzrok za manjši delež nesmiselnih sprememb in večjih delecij je verjetno v tem, da so to običajno spremembe, povezane s popolno izgubo preostale aktivnosti encima PAH in so zato pogosteje prisotne pri bolnikih s PKU. Pri bolnikih z blago HFA so spremembe, povezane s popolno izgubo preostale aktivnosti, najpogosteje prisotne le na enem alelu v kombinaciji z milejšo spremembo na drugem alelu (8).

Glede na rezultate te analize se največji delež vzročnih sprememb pri bolnikih s HFA nahaja v eksonu 12 (46%), manj v eksonih 2 (11%), 8 (10%), 5 (9%) in 11 (6%). Zato je smiselna strategija genetske diagnostike pri slovenskih bolnikih z blago HFA usmerjena na te eksone, saj so v ostalih eksonih vzročne spremembe redkeje prisotne. Takšna strategija, ki je podobna strategiji analize gena pri bolnikih s PKU (3) in temelji na prednostni analizi odsekov, kjer so spremembe pogostejše, lahko pomembno skrajša čas in stroške analize.

Poleg opisanih vzročnih genetskih sprememb smo opredelili tudi osem že opisanih polimorfizmov, katerih pogostost smo primerjali s pogostostjo polimorfizmov iz baze ExAC. Frekvence genetskih polimorfizmov pri naših preiskovancih ne odstopajo bistveno od frekvenc v splošni evropski populaciji iz baze ExAC. Zaradi tega ne moremo trditi, da imajo ti genetski polimorfizmi kakršenkoli vpliv na povišano koncentracijo fenilalanina pri preiskovancih z blago HFA.

7.3 PRIMERJAVA VZROČNIH SPREMOMB V GENU PAH PRI SLOVENSKIH BOLNIKIHZ BLAGO HFA IN PKU

Primerjali smo nabor sprememb v genu *PAH* pri bolnikih z blago HFA, ki so bile opredeljene v tej raziskavi s predhodno opisanim naborom sprememb v genu *PAH* pri bolnikih s PKU (8, 9). Najpomembnejša razlika je, da v skupini bolnikov z blago HFA ni bilo bolnikov, ki bi imeli vzročno spremembo prisotno v homozigotni obliki.

Sprememba p.I224T je po podatkih iz literature povezana z nastankom fenilketonurije (79). V naši skupini bolnikov je bila opredeljena kot edina sprememba pri enem bolniku v heterozigotni obliki. To pa lahko razloži njegov blagi fenotip ne glede na povezavo genetske spremembe s hujšo obliko bolezni.

Vse spremembe v genu *PAH*, ki so bile prisotne pri bolnikih z obema oblikama bolezni, smo primerjali med seboj glede na pogostnost pojavljanja v posamezni

skupini bolnikov. Pri bolnikih z blago HFA sta se v nekoliko višjem deležu pojavili dve spremembi: p.W326X (1,04%) in p.A403V (2,08%), obe opisani kot spremembi povezani z blago HFA (78, 81, 82). Pri bolnikih s PKU pa je bilo sprememb, ki se pojavljajo v višjem deležu, nekoliko več: p.L48S (1,27%), p.E390G (3,92%), p.R158Q (5,30%), p.P281L (5,47%) in p.R408W (19,61%).

Vse vzročne genetske spremembe, ki so se pri bolnikih s PKU pojavile v deležu, večjem od 5% (p.R158Q; 5,30%, p.P281L; 5,47% in p.R408W; 19,61%), so opisane kot spremembe povezane z razvojem fenilketonurije (82). V naši skupini bolnikov z blago obliko bolezni so bile te spremembe vedno prisotne v kombinaciji z genetsko spremembo, ki jo povezujemo z blago HFA. V nekaterih primerih pa so bile prisotne pri bolnikih z le eno opredeljeno genetsko spremembo, kar razloži blažji fenotip bolnikov s blago HFA. Izjema sta bila dva bolnika z blago HFA, ki sta bila sestavljena heterozigota za dve spremembi povezani s PKU, ki sta podrobneje obravnavana v poglavju 7.4.

Pri slovenskih bolnikih s PKU se spremembe s preostalo encimsko aktivnostjo, nižjo od 5%, nahajajo mnogo pogosteje kot pri bolnikih s HFA. Visoka predvidena preostala encimska aktivnost pri bolnikih s HFA tako lahko razloži blažji fenotip bolnikov s HFA (80).

7.4 NABOR GENOTIPOV PRI SESTAVLJENIH HETEROZIGOTIH

21 bolnikov je bilo sestavljenih heterozigotov in so imeli prisotni po dve različni vzročni spremembi v heterozigotni obliki. Večina preiskovancev je imela vsaj na enem alelu prisotno genetsko spremembo, ki jo v homozigotni obliki povezujejo z razvojem blage HFA, kar lahko razloži njihov blag fenotip. Samo dva preiskovanca sta imela na obeh alelih prisotno vzročno spremembo, ki jo v homozigotni obliki povezujejo s fenilketonurijo. Preiskovanca sta sestavljena heterozigota za genetske spremembe p.R408W in p.V177L oz. p.R158G in p.V177L (20, 82). Pri teh dveh preiskovancih bi pričakovali, da bosta imela težji presnovni fenotip, značilen za PKU, ne pa blago HFA. Njuna vrednost fenilalanina je bila v mejah, značilnih za blago HFA, saj je imel prvi preiskovanec koncentracijo Phe 590 $\mu\text{mol/L}$, drugi preiskovanec pa 266 $\mu\text{mol/L}$. Ker je bila sprememba p.V177L prisotna pri obeh bolnikih, je zelo verjetno, da ta sprememba manj vpliva na encimsko aktivnost. Žal pa v literaturi ni opisan PEA (%) te spremembe, da bi lahko natančneje ovrednotili preostalo encimsko

aktivnost pri teh dveh preiskovancih. Verjetno pa je tudi, da na presnovni fenotip vplivajo dodatni genetski ali okoljski dejavniki, ki ublažijo vpliv sprememb.

7.5 NOVE GENETSKE SPREMEMBE

Prepoznali smo dve novi, v literaturi še neopisani genetski spremembi v genu *PAH*. Prva nova sprememba p.W326X (c.978G>A) je bila prisotna pri preiskovancu v heterozigotni obliki, pri tem pa na drugem alelu nismo opredelili spremembe. Sprememba p.W326X povzroči nastanek terminacijskega kodona, zaradi česar posledično pride do krajšega proteina, ki je najverjetneje tudi nepravilno zvit in nefunkcionalen. Na sosednjem nukleotidu je že bila opisana sprememba c.977G>A, ki povzroči isto aminokislinsko spremembo in je povezana s PKU (77). Tako sprememba p.W326X samostojno v heterozigotni obliki lahko razloži njegov blažji presnovni fenotip, z vrednostjo Phe v krvi 249 $\mu\text{mol/L}$ ob zadnjem.

Druga nova genetska sprememba p.V45I (c.133G>A) povzroči spremembo valina na aminokislinskem mestu 133 v izolevcin. Na istem aminokislinskem mestu je pri bolnikih z fenilketonurijo že opisana sprememba p.V45A (c.134T>C), ki spremeni aminokislino valin v alanin (78). Z bioinformacijskimi orodji smo ocenili verjetnost vzročnega vpliva spremembe na presnovni fenotip. Orodji Sift in PolyPhen-2 sta predvidela, da sprememba ni vzročna. Nasprotno je orodje Mutation Taster predvidevalo, da bi genetska sprememba lahko bila vzročna. Ker sta dve uporabljeni orodji predvideli, da je sprememba benigna, je nismo obravnavali kot vzročno genetsko spremembo.

7.6 ANALIZA VPLIVA GENOTIPA NA FENOTIP

Namen magistrske naloge je bilo opredeliti povezavo med genotipom in presnovnim fenotipom bolnikov z blago HFA.

Pri 37 preiskovancih vzročnih sprememb, ki bi razložile klinično sliko, nismo opredelili. Pri teh bolnikih je verjetno, da se takšne spremembe nahajajo v regulatornih regijah ali v globokih intronskih področjih, ki niso bile vključene v

analizo. Povprečna vrednost fenilalanina v tej skupini preiskovancev je bila 129 $\mu\text{mol/L}$, kar je v mejah referenčnih vrednosti. V skupini je izrazito izstopal le en bolnik. Njegova vrednost fenilalanina je bila ob zadnjem merjenju 441 $\mu\text{mol/L}$, kar pa glede na njegovo starost, 26 let, ni močno povišano, saj je v odrasli dobi priporočeno vzdrževanje nivoja fenilalanina pod 700 $\mu\text{mol/L}$ (41, 46, 47). Pri tem bolniku bi bilo smiselno razširiti analize na regulatorna in oddaljena intronska področja ter tako poiskati možni genetski vzrok povišanega fenilalanina.

Pri 39 preiskovancih smo opredelili prisotno vzročno spremembo le na enem alelu. Ta skupina preiskovancev je imela povprečno vrednostjo fenilalanina 157 $\mu\text{mol/L}$ in prisotne heterozigotne genetske spremembe, ki jih v homozigotni obliki povezujejo z blago HFA bodisi s PKU. Izmed skupaj 16 genetskih sprememb, opredeljenih v tej skupini bolnikov, je bilo 17 sprememb pri 30 bolnikih, ki jih v homozigotni obliki povezujejo s PKU. Med njimi je bila najpogosteje (pri 14 bolnikih) zastopana sprememba p.R408W. Spremembe, ki so v homozigotni obliki vzrok za klasično obliko fenilketonurije, se v heterozigotni obliki skladno s pričakovanju ne izražajo s hudim presnovnim fenotipom.

Pri 21 bolnikih sta bili prisotni vzročni spremembi na obeh alelih. Povprečna vrednost fenilalanina v krvi v tej skupini je bila 300 $\mu\text{mol/L}$. Ti bolniki so genetsko sestavljeni heterozigoti. 16 bolnikov ima prisotno eno genetsko spremembo povezano z razvojem PKU, drugo pa povezano z blažjo obliko HFA. Tako se njihov presnovni fenotip ujema s pričakovanji (36). Izjema sta dva bolnika, ki imata na obeh alelih prisotno spremembo, ki jo povezujemo z razvojem fenilketonurije. Preiskovanca sta sestavljena heterozigota za genetske spremembe p.R408W in p.V177L oz. p.R158G in p.V177L. Njuna koncentracija fenilalanina je bila v mejah, ki so določene za blago HFA (120 – 600 $\mu\text{mol/L}$) (3, 4). Za spremembo p.V177L ni znan PEA in zato ne moremo natančneje ovrednotiti njene preostale encimske aktivnosti. Sklepamo pa, da najverjetneje ne vpliva pomembno na encimsko aktivnost.

Povezavo genotipa s fenotipom smo dodatno ocenili še s statistično analizo podatkov. S *post hoc* metodami smo preverjali vpliv genotipa in dodatno še vpliv starosti na izmerjeno koncentracijo fenilalanina v krvi preiskovancev.

Z Games - Howellovim testom smo primerjali vpliv, ki ga ima posamezna skupina genotipa na fenotip. Med skupinama 1 in 0 ($P > 0,05$) ni značilne statistične razlike, medtem ko je med ostalimi skupinami ($P < 0,05$) razlika vpliva genotipa na fenotip statistično značilna. Tako sklepamo, da obstaja statistično značilna povezava med preiskovanci z dvema in eno spremembo ter dvema in nobene spremembe in

njihovim presnovnim fenotipom, medtem ko med skupinama z nič in eno genetsko spremembo in presnovnim fenotipom teh bolnikov ni statistično značilne razlike.

Razširjena analiza s starostjo kot dodatno neodvisno spremenljivko ni pokazala statistično značilnega vpliva starosti na fenotip. Sicer se je P vrednost (0,056) močno približala statistično značilni vrednosti 0,05, vendar je vpliv genotipa statistično mnogo značilnejši ($P = 0,00$). To smo še dodatno potrdili, ko smo izračunali procentni doprinos, ki ga ima starost (1,20%) na koncentracijo fenilalanina in je v primerjavi z doprinosom, ki ga ima genotip (42%), znatno nižji.

Statistično analizo smo dopolnili s Tukey testom, ki je potrdil prejšnje rezultate. P vrednosti kažejo na isto statistično značilnost kot Games - Howellov test, čeprav smo v zadnji test vpeljali še korigirano spremenljivko – starost. Ponovno smo potrdili, da starost, v primerjavi med skupinami, nima statistično značilnega vpliva, ter da ne obstaja statistično značilna povezava med skupinama 1 in 0. Statistično značilnost pa smo na podlagi P vrednosti ponovno dokazali med skupinama 2 in 1 ter 2 in 0 in s tem dodatno potrdili, da starost nima statistično značilnega vpliva, medtem ko genotip močno vpliva na koncentracijo fenilalanina.

Statistični rezultati bi nam lahko bili v korist pri prihodnjih genetskih analizah kot opora, koliko patoloških sprememb pričakovati pri preiskovancih z določenimi povprečnimi vrednostmi fenilalanina.

7.7 POJAVNOST BLAGE HFA V SLOVENIJI

Pojavnost blage HFA v Sloveniji znaša približno 1:2.590, kar je nekoliko manj kot so znašale dosedanje ocene (1:3.500) (3, 8). Prav tako je pojavnost blage HFA pri nas nižja kot pri večini drugih evropskih in kavkazijskih populacijah, za katere velja splošna ocena pojavnosti med 1:4.500 in 1:10.000 (3, 4, 11).

8. SKLEPI

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo:

- Pri 97 bolnikih s HFA smo opredelili nabor 22 sprememb v genu *PAH* na skupno 194 neodvisnih alelih. Najpogosteje je bila zastopana genetska sprememba p.R408W, druge pogoste genetske spremembe so bile: p.A403V, p.R158Q, p.A300S in p.E390G.
- Spremembe so bile razporejene po celotni kodirajoči regiji gena *PAH* z izjemo eksonov 1, 9 in 13, kjer sprememb nismo našli. Od tega se je največ genetskih sprememb nahajalo na eksonu 12 (46%).
- Prepoznali smo dve novi, še neopisani spremembi v genu *PAH* (p.W326X in p.V45I), ki sta zelo verjetno povezani z razvojem blage HFA.
- Primerjava nabora opredeljenih genetskih sprememb pri bolnikih s HFA s spremembami predhodno opredeljenimi pri slovenskih bolnikih s PKU je pričakovano pokazala razlike v naboru in frekvenci sprememb. Najpomembnejša razlika med skupinama je, da v skupini z blago HFA nismo določili nobene genetske spremembe v homozigotni obliki.
- Pri slovenskih bolnikih s HFA se spremembe s preostalo encimsko aktivnostjo nižjo od 5% nahajajo mnogo redkeje kot pri bolnikih s PKU.
- Povprečna vrednost fenilalanina preiskovancev z blago HFA, ki niso imeli opredeljene vzročne spremembe v genu *PAH*, je bila 129 $\mu\text{mol/L}$, preiskovancev z eno vzročno spremembo 157 $\mu\text{mol/L}$ in preiskovancev z dvema vzročnima spremembama 300 $\mu\text{mol/L}$. Dokazali smo statistično značilno povezavo med genotipom in presnovnim fenotipom bolnikov z blago HFA.
- Pojavnost blage HFA v Sloveniji smo ocenili na 1/2590, kar je nižje v primerjavi s sosednjimi populacijami.

S temi ugotovitvami potrjujemo predpostavljeno hipotezo.

9. LITERATURA

- 1) <http://www.medgen.mcgill.ca/scriver/pah/MMBID-Chapter77.pdf>
- 2) Scriver CR. The *PAH* gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat*; 2007; 28(9): 831-45.
- 3) Grošelj U. Analiza gena za fenilalaninsko hidroksilazo in ugotavljanje povezave s fenotipom [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2012
- 4) Hanley WB. Non - PKU mild hyperphenylalaninemia (MHP) - The dilemma. *Mol Genet and Metab*; 104: 23 - 26
- 5) Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010; 376: 1417-27.
- 6) Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria, *Trends Genet* 1999; 15: 267-72.
- 7) Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Gene Tests* 2011; 8: 697 - 707.
- 8) Grošelj U, Tanšek ŽM, Trebušak PK, Battelino T. Genetske in klinične značilnosti bolnikov s fenilketonurijo v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 2013; 11: S767 - 777.
- 9) Battelino T, Kržišnik C, Pavlin K. Early detection and follow up of children with phenylketonuria in Slovenia. *Zdrav Vestn* 1994; 63: 25-8.
- 10) Šmon A, Grošelj U, Tanšek ŽM, Biček A, Oblak A, Zupančič M, Kržišnik C, Repič LB, Murko S, Hojker S, Battelino T. Newborn screening in Slovenia. *Zdrav Vestn* 2015; 54: S86 - 90.
- 11) Lambert DM. The genetic epidemiology of HPA in Quebec. *Health Sciences* 1994; S: 1 - 165
- 12) Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*. 2003; 21(4): 345 - 356.

- 13) Tezel B, Dilli D, Bolat H, Sahman H, Ozbas S, Acıcan D, Ertek M, Kose MR, Dilmen U. The Development and Organization of Newborn Screening Programs in Turkey. *J Clin Lab Anal* 2013; 00: 1–7.
- 14) Ozgfil M, Ozalp I, Coakun T, Yllmaz E, Erdem H, Ayter \$. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *Med Genet* 1993; 30: 129-130.
- 15) Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum Genet* 1997; 100: 189-94.
- 16) Grant DB, Smith I. Survey of neonatal screening for primary hypothyroidism in England, Wales, and Northern Ireland 1982-4. *British Med* 1988; 296: 1355 – 1358.
- 17) 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.
- 18) Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H, Zheng XY. [Phenylketonuria mutations in Northern China](#). *Mol Genet Metab* 2005; 86: S107-18.
- 19) [Okano Y](#), [Asada M](#), [Kang Y](#), [Nishi Y](#), [Hase Y](#), [Oura T](#), [Isshiki G](#). Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. *Hum Genet* 1998; 103: 613 - 618.
- 20) Guldberg P, Levy HL, Hanley WB, Koch R, Matalon R, Rouse BM et al. Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the maternal PKU collaborative study. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 84-94.
- 21) Scriver CR, Hurtubise M, Konecki D, Phommarnh M, Prevost L, Erlandsen H et. al. PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat* 2003; 21: 333-44.
- 22) Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *Clin Biochem Rev* 2008; 29: 31-41.
- 23) Scriver CR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr* 2002; 140: 502-6.

- 24) Gjetting T, Petersen M, Guldborg P, Güttler F. Missense mutations in the N – terminal domain of human phenylalanine hydroxylase interfere with binding of regulatory phenylalanine. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1353 – 1360.
- 25) Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 103-25.
- 26) 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.
- 27) Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyperphenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat* 2003; 21: 357-69.
- 28) 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.
- 29) Güttler F. Hyperphenylalaninemia diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediat Scand* 1980; 280: 1-80.
- 30) Roberts MR, Pavon JA, Fitzpatrick PF. The kinetic mechanism of phenylalanine hydroxylase: intrinsic binding and rate constants from single turnover experiment. *Biochem* 2013; 52(6): 1062 – 1073.
- 31) Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC. Structural Studies on Phenylalanine Hydroxylase and Implications Toward Understanding and Treating Phenylketonuria. *PEDIATRICS* 2003; 112 (6): 1557 – 1565.
- 32) Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 103-25.
- 33) Mazur A, Jarochowicz S, Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Kwolek A, Oltarzewski M. Evaluation of somatic development in adult patients with previously undiagnosed and/or untreated phenylketonuria. *Med Princ Pract* 2010; 19: 46-50.

- 34) Baieli S, Pavone L, Meli C, Fiumara A, Coleman M. Autism and phenylketonuria. *J Autism Dev Disord* 2003; 33: 201-4.
- 35) Smith I, Beasley MG, Ades AE. Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1990; 65: 472-8.
- 36) Weglage J, Pietsch M, Feldmann R, Koch HG, Zschocke J, Hoffmann G, Muntau-Heger A, Denecke J, Guldborg P, Güttler F, Möller H, Wendel U, Ullrich K, Harms E. Normal clinical outcome in untreated subjects with mild hyperphenylalaninemia. *Pediatr Res*. 2001; 49(4): 532-6.
- 37) Widaman KF, Azen C. Relation of prenatal phenylalanine exposure to infant and childhood cognitive outcomes: results from the international maternal PKU collaborative study. *Pediatrics* 2003; 112: 1537-43.
- 38) Levy HL, Ghavami M. Maternal phenylketonuria: a metabolic teratogen. *Teratology*. 1996 Mar; 53(3): 176-84.
- 39) 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.
- 40) Campistol J, Gassió R, Artuch R, Vilaseca MA; PKU Follow-up Unit. Neurocognitive function in mild hyperphenylalaninemia. *Dev Med Child Neurol* 2011;53: 405-8.
- 41) Bélanger-Quintana A, Burlina A, Harding CO, Muntau AC. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2011; 104:19-25.
- 42) Van Spronsen FJ, De Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, Van Rijn M.J. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *Inherit Metab Dis*. 2010; 33(6): 671-6.
- 43) 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.
- 44) Sarkissian CN, Gamez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol Genet Metab* 2005; 86: S22-S26.

- 45) MacDonald MJ, D’Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 273-82.
- 46) 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.
- 47) Rocha JC, Martins MJ. Oxidative stress in Phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 381-98.
- 48) Spronsen FJ. Mild hyperphenylalaninemia: to treat or not to treat. *J Inherit Metab Dis*. 2011; 34(3): 651–656.
- 49) Spronsen FJ. The truth of treating patients with phenylketonuria after childhood: the need for a new guideline. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(6): 673 - 679.
- 50) Schaefer F, Burgard P, Batzler U, Rupp A, Schmidt H, Gilli G, Bickel H, Bremer HJ. Growth and skeletal maturation in children with phenylketonuria. *Acta Paediatr*. 1994; 83(5): 534-41.
- 51) 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.
- 52) Levy L, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK et.al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R- BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomized placebo-controlled study. *Lancet* 2007; 370: 504-10.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) Fiege B, Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr* 2007; 150: 627-30.
- 56) Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterinresponsiveness among hyperphenylalaninemias: A study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab* 2002; 77: 304-13.
- 57) Blau N. Defining tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in PKU. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31: 2-3.
- 58) 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.
- 59) <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAH>
- 60) <https://www.google.si/imgres?imgurl=http://www.pahdb.mcgill.ca/images/ssiem-2002-dublin>
- 61) <http://www.scribd.com/doc/65297109/Metabolizam-aminokiselina#scribd>
- 62) <https://www.qiagen.com/si/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/flexigene-dna-kit/>
- 63) McPherson M, Møller S. PCR. Garland Science; 2007: 305
- 64) <http://www.slideshare.net/MetheeSri/principle-of-pcr>
- 65) <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20green%20master%20mix%20protocol.pdf>
- 66) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 67) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- 68) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

- 69) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- 70) <http://www.pahdb.mcgill.ca/>
- 71) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- 72) <http://www.mutationtaster.org/>
- 73) <http://www.hgvs.org/mutnomen>
- 74) http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html
- 75) <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>
- 76) <http://www.stat.si>
- 77) Grošelj U, Tanšek ŽM, Kovač J, Hovnik T, Trebušak PK, Battelino T. Five novel mutations and two large deletions in a population analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 142-48.
- 78) Eisensmith RC, Woo SL. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum Mutat* 1992; 1:13-23.
- 79) Réblová K, Kulhánek P, Fajkusová L. Computational study of missense mutations in phenylalanine hydroxylase. *J Mol Model* 2015; 21:70.
- 80) [Burgard P](#), [Rupp A](#), [Konecki DS](#), [Trefz FK](#), [Schmidt H](#), [Lichter-Konecki U](#). Phenylalanine hydroxylase genotypes, predicted residual enzyme activity and phenotypic parameters of diagnosis and treatment of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 1996; 155:11-5.
- 81) [Desviat LR](#), [Pérez B](#), [Ugarte M](#). Molecular basis of non-PKU hyperphenylalaninaemia in Spain: prevalence of A403V, a mutation with high residual activity. [J Inherit Metab Dis](#). 1996; 19(2):227-30.
- 82) [Danecka MK](#), [Woidy M](#), [Zschocke J](#), [Feillet F](#), [Muntau AC](#), [Gersting SW](#). Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria. [J Med Genet](#). 2015; 52(3):175-85.

