

Aus dem
Charité Centrum 17 für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt
Endokrinologie, Gastroenterologie und Stoffwechselmedizin
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Krude

Habilitationsschrift

Neue Erkenntnisse und Strategien in der Behandlung der Phenylketonurie

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Julia B. Hennermann

Eingereicht: Februar 2013
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Jutta Gärtner, Göttingen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. soz. Josef Weglage, Münster

Inhaltsverzeichnis

Häufig benutzte Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
1.1. Enzymdefekt bei Phenylketonurie	5
1.2. Klinische Symptome unbehandelter Patienten mit Phenylketonurie	6
1.3. Diagnosestellung der Phenylketonurie.....	6
1.4. Klassifizierung der Phenylketonurie	7
1.5. Prävalenz und Vererbung der Phenylketonurie	8
1.6. Behandlung der Phenylketonurie	8
2. Eigene Arbeiten.....	11
2.1. PUBLIKATION 1: Hennermann JB, Vetter B, Wolf C, Windt E, Bührdel P, Seidel J, Mönch E, Kulozik AE. Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia in Eastern Germany: A Characteristic Molecular Profile and 15 Novel Mutations. 2000. Hum Mutat 15:254-260.....	11
2.2. PUBLIKATION 2: Hennermann JB, Roloff S, Gellermann J, Vollmer I, Windt E, Vetter B, Plöckinger U, Mönch E, Querfeld U. Chronic Kidney Disease in Adolescent and Adult Patients with Phenylketonuria. 2012. J Inherit Metab Dis, DOI 10.1007/s10545-012-9548-0	19
2.3. PUBLIKATION 3: Hennermann JB, Bühner C, Blau N, Vetter B, Mönch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. 2005. Mol Genet Metab 86:S86-S90	32
2.4. PUBLIKATION 4: Trefz FK, Burton BK, Longo N, Martinez-Pardo Casanova M, Gruskin DJ, Dorenbaum A, Kakkis ED, Crombez EA, Grange DK, Harmatz P, Levy HL, Lipson MH, Milanowski A, Randolph LM, Vockley G, Whitley CB, Wolff JA, Bechuk J, Christ-Schmidt H, Hennermann JB. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. 2009. J Pediatr 154:700-707	38
2.5. PUBLIKATION 5: Burton BK, Nowacka M, Hennermann JB, Lipson M, Grange DK, Chakrapani A, Trefz F, Dorenbaum A, Imperiale M, Kim SS, Fernhoff PM. Safety of Extended Treatment with Sapropterin Dihydrochloride in Patients with Phenylketonuria: Results of a Phase 3b Study. 2011. Mol Genet Metab 103:315-322	49
2.6. PUBLIKATION 6: Hennermann JB, Roloff S, Gebauer C, Vetter B, von Arnim-Baas A, Mönch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin in phenylketonuria: Treatment strategies and prediction of long-term responders. 2012. Mol Genet Metab 107:294-301.....	58
2.7. PUBLIKATION 7: Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, Classification, and Genetics of Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin (BH4) Deficiencies. 2011. Mol Genet Metab 104:S2-S9	68
3. Diskussion	77
3.1. Phenylalanin-bilanzierte diätetische Therapie	77
3.1.1. Langzeitprobleme unter Phenylalanin-bilanzierter Diät	77

3.1.2. Nierenfunktion bei Patienten mit Phenylalanin-bilanzierter Diät	78
3.1.3. Genese der Nierenschädigung unter Phenylalanin-bilanzierter Diät.....	79
3.2. Therapie mit Tetrahydrobiopterin (BH4).....	81
3.2.1. Identifikation von langzeit-BH4-responsiven PKU-Patienten	82
3.2.2. Prädiktive Parameter für Langzeit-BH4-Responsivität	84
3.2.3. Langzeittherapie mit Tetrahydrobiopterin (BH4)	85
3.3. Ausblick	87
4. Zusammenfassung	88
5. Literaturangaben aus dem freien Text	90
Danksagung	98
Erklärung	99

Häufig benutzte Abkürzungen

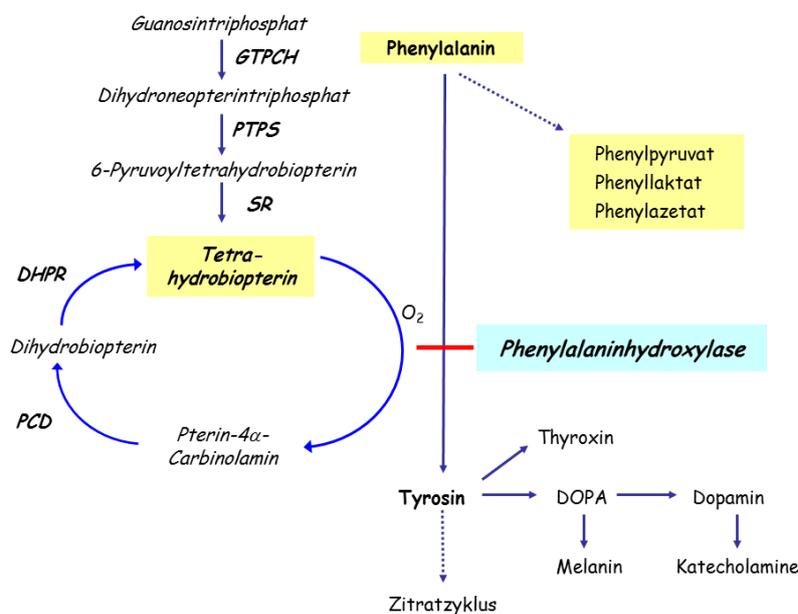
BH4	6R-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GMP	Glykomakropeptide
HPA	Hyperphenylalaninämie
KG	Körpergewicht
LNAA	Lange neutrale Aminosäuren
PAH	Phenylalanin-4-Hydroxylase
Phe	Phenylalanin
PKU	Phenylketonurie
Sapropterin	Sapropterin-Dihydrochlorid
Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Die Phenylketonurie (PKU, MIM 261600) ist die häufigste angeborene Störung im Aminosäurenstoffwechsel und die erste angeborene Stoffwechselerkrankung, bei der eine diätetische Therapie etabliert wurde (Scriver und Kaufman 2001). Obwohl die diätetische Therapie bereits in den 1950er Jahren erstmals beschrieben wurde (Bickel et al. 1953), hat sich in der Behandlung der PKU jahrzehntelang wenig verändert. Erst in den letzten Jahren begann die erfolgreiche Suche nach neuen Therapieoptionen zur Behandlung der PKU.

1.1. Enzymdefekt bei Phenylketonurie

Ursächlich für die PKU ist eine Defizienz der Phenylalanin-4-Hydroxylase (PAH, EC 1.14.16.1) (Scriver und Kaufman 2001). Die PAH katalysiert die Hydroxilierung von Phenylalanin (Phe) zu Tyrosin (Tyr) unter Mithilfe des aktiven Pterins 6R-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH4) als Kofaktor, molekularem Sauerstoff und Eisen (s. Abbildung 1). BH4 wird in drei Schritten aus Guanosinriphosphat synthetisiert, über eine Hydroxilierungsreaktion in das inaktive Pterin-4 α -Carbinolamin umgewandelt und dann mittels zweier Enzyme über Dihydrobiopterin regeneriert (Walter et al. 2006). Sowohl eine PAH-Defizienz als auch Defekte in der Synthese oder Regeneration von BH4 resultieren in einem Anstieg der Phe-Blutkonzentrationen. Normale Phe-Blutkonzentrationen liegen im Neugeborenenalter bei $\leq 180 \mu\text{mol/L}$, ab dem 3. Lebensmonat bei $\leq 130 \mu\text{mol/L}$ (Clayton et al. 1980).



Bei einer PAH-Defizienz resultiert ein Anstau von Phe, ein Abfall von Tyr sowie eine Umwandlung von Phe in die α -Ketosäuren Phenylpyruvat, Phenyllaktat und Phenylazetat.

Enzyme des BH4-Zyklus sind:
 Guanosinriphosphat-Zyklohydrolase, *GTPCH*;
 Pyruvoyltetrahydrobiopterin-Synthase, *PTPS*;
 Sepiapterin-Reduktase, *SR*;
 Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase, *PCD*;
 Dihydropteridin-Reduktase, *DHPR*.

Abbildung 1: Abbaustörung bei Phenylketonurie (nach Mönch et al. 2006, Walter et al. 2002)

1.2. Klinische Symptome unbehandelter Patienten mit Phenylketonurie

Kinder mit PKU sind bei Geburt klinisch unauffällig. Unbehandelt führt die Erkrankung jedoch zu einer irreversiblen schweren Hirnschädigung, resultierend in geistiger Behinderung (IQ zwischen 30-50), Mikrozephalie, EEG-Veränderungen, zerebralen Krampfanfällen, Pyramidenbahnzeichen, Tremor und Verhaltensstörungen. Durch den Mangel an Tyrosin und die verminderte Bildung von Melanin weisen nicht-behandelte PKU-Patienten eine Pigmentarmut der Haut und Haare auf. Typisch ist zudem ein den Patienten eigener „mäuseartiger“ Geruch, bedingt durch den Anstau von Phenylketonen (Pitt 1971, Scriver und Kaufman 2001).

Die Aufklärung des Pathomechanismus der Hirnschädigung bei Patienten mit PKU ist Gegenstand vieler Studien. Eine wichtige Rolle spielt der L-Aminosäuren-Transporter LAT1 an der Bluthirnschranke. Der LAT1-Transporter bindet selektiv an lange neutrale Aminosäuren (LNAA) (Boado et al. 1999, Choi und Pardridge 1986). Zu den LNAA zählen Tryptophan, die verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin sowie Tyrosin und Phenylalanin (Matalon et al. 2007). Da die Bindung der LNAA an den LAT1-Transporter einem kompetitiven Prozess folgt, führen hohe Phe-Blutkonzentrationen zu einer verminderten Aufnahme anderer LNAA über die Bluthirnschranke (Pietz et al. 1999). Intrazerebral resultieren daher bei PKU-Patienten mit hohen Phe-Blutkonzentrationen erniedrigte Konzentrationen anderer LNAA, insbesondere der von Tyrosin und Tryptophan (McKean 1972, Pietz et al. 1999). Dies bedingt eine verminderte Synthese der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (Burlina et al. 2000, Butler et al. 1981, McKean 1972), aber auch eine Hemmung der zerebralen Proteinsynthese mit folgender Myelinisierungsstörung (Bauman und Kemper 1982, Binek-Singer und Johnson 1982, Hughes und Johnson 1978). Beides scheint hauptursächlich für die kognitiven Störungen bei Patienten mit PKU zu sein (de Groot et al. 2010). In den letzten Jahren konnten zudem weitere Faktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Hirnschädigung bei Patienten mit unbehandelter PKU haben: Hohe intrazerebrale Phe-Konzentrationen interagieren mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül L1 CAM sowie mit Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR γ). Dies scheint zu einem verminderten Neuritenwachstum und zur Apoptose zu führen (Hartwig et al. 2006, Schumacher et al. 2008).

1.3. Diagnosestellung der Phenylketonurie

Die PKU wurde erstmals 1934 von dem Norweger Ivar Asbjørn Følling beschrieben (Følling 1934). Følling erkannte den Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Phenylpyruvat im Urin und einer mentalen Retardierung. Der Nachweis von Phenylpyruvat

gelang Følling mittels des Eisen(III)-Chlorid-Tests. Dieser sogenannte „Windeltest“ wird bei Phe-Blutwerten $>900 \mu\text{mol/L}$ positiv und war die erste Methode zur Diagnose einer PKU (Böhles et al. 1999).

1963 wurde von dem amerikanischen Mikrobiologen Robert Guthrie erstmals das Screening auf Phenylketonurie aus getrockneten Blutstropfen mit Hilfe des Bakterien-Hemmtests beschrieben (Guthrie und Susi 1963). Diese Methode wurde als Neugeborenen-Screening kurze Zeit später auch in Deutschland etabliert: in der BRD im Jahr 1969 und in der DDR im Jahr 1971 (Mathias und Bickel 1986, Machill et al. 1994). Seit 2005 wird die PKU bundesweit durch das standardisierte erweiterte Neugeborenen-Screening mittels Tandem-Massenspektrometrie erfasst (BANz 2005). Durch eine frühe Diagnosestellung im Neugeborenen-Screening und einen rechtzeitigen Therapiebeginn wird bei Patienten mit PKU eine mentale Retardierung verhindert und eine weitgehend normale Entwicklung gewährleistet. Das langfristige Outcome ist jedoch im Wesentlichen abhängig von der individuellen Stoffwechseleinstellung (Waisbren et al. 2007).

1.4. Klassifizierung der Phenylketonurie

Abhängig von dem Genotyp, von der PAH-Restenzymaktivität und somit von der Schwere der Erkrankung sind verschiedene Verlaufsformen der PKU mit unterschiedlichen Phänotypen beschrieben. In den deutschsprachigen Ländern erfolgt die Klassifizierung der PKU in drei unterschiedliche Phänotypen: die klassische PKU, die milde PKU und die Hyperphenylalaninämie (HPA). Sowohl die klassische wie auch die milde PKU sind behandlungspflichtig, während Individuen mit einer HPA keine Therapie benötigen, da ihre Phe-Blutwerte auch unter normaler Kost nicht $>600 \mu\text{mol/L}$ ansteigen und keine Gefahr einer neurologischen Schädigung besteht (Weglage et al. 1996). Die Einteilung in die verschiedenen PKU-Phänotypen erfolgt nach etablierten Kriterien anhand der maximalen Phe-Blutwerte vor Therapiebeginn und der täglichen Phe-Toleranz (Guldberg et al. 1998, Güttler et al. 1994) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der verschiedenen PKU-Phänotypen nach klinischen Kriterien

PKU-Phänotyp	Maximaler Phe-Wert im Blut	Phe-Toleranz
Klassische PKU	$>1.200 \mu\text{mol/L}$	$<20 \text{ mg/kg/die}$
Milde PKU	$600 - 1.200 \mu\text{mol/L}$	$20 - 50 \text{ mg/kg/die}$
HPA	$<600 \mu\text{mol/L}$	$>50 \text{ mg/kg/die}$

1.5. Prävalenz und Vererbung der Phenylketonurie

Die Häufigkeit der PKU weist unterschiedliche geographische Verteilungen auf, auch innerhalb Europas. Nach den aktuellen Daten der Deutschen Gesellschaft für Neugeborenen-Screening liegt die Prävalenz aller PKU-Formen in Deutschland bei 1: 5.000. Im Jahr 2010 wurden im Neugeborenen-Screening in der Bundesrepublik Deutschland folgende Prävalenzen erfasst: klassische und milde PKU 1: 9.287; HPA 1: 11.114; BH4-Mangel 1: 677.947; Gesamtzahl 1: 5.022 (<http://www.screening-dgns.de>).

Die Vererbung der PKU folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Das *PAH*-Gen ist auf 12q21-q24.1 lokalisiert, besteht aus 13 Exonen und kodiert 452 Aminosäuren (DiLella et al. 1986, Scriver und Kaufman 2001). Derzeit sind über 700 verschiedene *PAH*-Mutationen beschrieben. Davon sind 61% Missense-Mutationen, 14% Deletionen, 11% Spleißstellen-Mutationen, 6% stille Mutationen, 5% Nonsense-Mutationen und 2% Insertionen. Alle diese bekannten *PAH*-Mutationen sind in einer Gen-Datenbank zusammengefasst (<http://www.pahdb.mcgill.ca>). *PAH* liegt in seiner funktionellen Form als Homotetramer vor. Das tetramere Enzym weist drei unterschiedliche Domänen auf: eine regulatorische Domäne, eine katalytische Domäne sowie eine tetramerisierende Domäne. Das aktive Zentrum der *PAH* liegt in der katalytischen Domäne (Erlandsen und Stevens 1999). Je nachdem, welchen Einfluss die *PAH*-Mutationen auf die Struktur des Tetramers haben, sind diese mit unterschiedlichen Rest-Enzymaktivitäten und daraus folgend mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen assoziiert (Erlandsen und Stevens 1999).

1.6. Behandlung der Phenylketonurie

Zur Verhinderung neurologischer Schädigungen ist bei Patienten mit PKU eine lebenslange Therapie indiziert (MacDonald et al. 2010). Abhängig von dem Lebensalter sind international unterschiedliche Therapieziele zur Behandlung der PKU etabliert. Die in Deutschland aktuell gültigen altersabhängigen Phe-Zielwerte im Blut sind der Tabelle 2 zu entnehmen (Burgard et al. 1999).

Tabelle 2: Phe-Zielwerte nach den aktuellen Empfehlungen zur Behandlung der PKU

Alter	Phe-Zielwerte im Blut
<10 Jahre	40 - 240 µmol/L
10 - 15 Jahre	40 - 900 µmol/L
>15 Jahre	40 - 1.200 µmol/L

Diätetische Behandlung

1953 wurde von dem Deutschen Horst Bickel erstmals die Behandlung der PKU beschrieben. Die Behandlung des zweijährigen Mädchens Sheila mit einem Phe-freien Aminosäurehydrolysat wurde von Bickel in seiner Arbeit „*Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria*“ dargestellt (Bickel et al. 1953). Auch heute noch stellt die Diät die Basis der PKU-Behandlung dar. Grundlage ist eine streng Phe-bilanzierte Diät mit Substitution eines synthetischen Phe-freien L-Aminosäuregemisches (MacDonald et al. 2011, Scriver und Kaufmann 2001). Die diätetische Behandlung der PKU wurde in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich verbessert, insbesondere durch eine Optimierung des Geschmacks und der Zusammensetzung der Aminosäuregemische sowie durch ein stark erweitertes Angebot eiweißarmer Nahrungsmittel. Dennoch ist die Diäteinhaltung für viele Patienten eine große Herausforderung, und die Compliance nimmt häufig im Laufe der Behandlung ab, insbesondere im Adoleszenten- und Erwachsenenalter (MacDonald et al. 2010, Walter et al. 2002).

Alternative Behandlungsoptionen

Erst in den letzten Jahren begann die erfolgreiche Suche nach neuen Therapieoptionen zur Behandlung der PKU. Eine dieser Therapieoptionen ist die Behandlung mit LNAA. Das Prinzip der Behandlung besteht darin, dass LNAA den gleichen LAT1-Transporter wie Phe benutzen, und zwar sowohl an der Bluthirnschranke als auch im Gastrointestinaltrakt (Boado et al. 1999, Choi und Pardridge 1986, Hidalgo und Borchardt 1990). Die Gabe von LNAA senkt daher einerseits die Phe-Konzentration im Blut durch eine verminderte Phe-Aufnahme im Gastrointestinaltrakt und hat andererseits einen neuroprotektiven Effekt durch eine verminderte Phe- und eine erhöhte LNAA-Aufnahme über die Bluthirnschranke. Die Therapie mit LNAA findet ausschließlich Anwendung bei erwachsenen Patienten und ist keine Therapieoption für Kinder und Jugendliche mit PKU (Ahring 2010, Matalon et al. 2007, Schindeler et al. 2007). LNAA-Präparate sind in Deutschland derzeit nicht verfügbar.

Eine andere neue Therapieoption ist die Behandlung mit Glykomakropeptiden (GMP). GMP sind Teile des Molkeproteins und enthalten als einziges natürliches Protein nur sehr geringe Mengen an Phe (2,5-5 mg Phe/g Protein). Zudem haben GMP einen hohen Gehalt an LNAA, der zwei- bis dreifach höher ist als in anderem natürlichem Protein (van Calcar et al. 2009). Als hochwertiges und schmackhaftes Protein stellen GMP eine gute Proteinquelle für die PKU-Behandlung dar, jedoch nur bei Substitution der in GMP fehlenden essentiellen Aminosäuren. Bislang wurden GMP vorwiegend in Studien angewandt, hierbei zeigte sich unter der Gabe von GMP insbesondere ein verbesserter Phe-Umsatz, eine Erleichterung der Diät sowie eine Verbesserung der Compliance (Lim et al. 2007, van Calcar et al. 2009).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Enzymersatztherapie mit Phenylalanin-Ammonium-Lyase. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase ist kein humanes sondern ein pflanzliches Enzym, das die Umwandlung von Phe zu dem nicht-toxischen Metaboliten *trans*-Zimtsäure katalysiert (Gamez et al. 2005). Da eine Enzymersatztherapie mit Phenylalanin-Ammonium-Lyase ein hohes Risiko allergischer Reaktionen birgt, ist für die Therapie eine Konjugation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase mit Polyethylenglycol („PEGylation“) erforderlich (Gamez et al. 2005, Sarkissian et al. 2008). Derzeit werden erste klinische Studien mit der Enzymersatztherapie mit PEGylierter Phenylalanin-Ammonium-Lyase bei erwachsenen Patienten mit PKU durchgeführt (<http://clinicaltrials.gov>).

Die zellbasierte Therapie stellt eine weitere Alternative in der Behandlung der PKU dar. Kürzlich wurde bei einem ersten Patienten mit PKU bei ausgeprägter Incompliance und schlechter Stoffwechseleinstellung eine Hepatozytentransplantation durchgeführt, die jedoch nur zu einem kurzzeitigen Therapieerfolg führte (Stéphenne et al. 2012). Diese Therapiealternative scheint aufgrund der Invasivität sowie der potentiellen Nebenwirkungen keine wirkliche Alternative in der Behandlung der PKU darzustellen. Weitere Therapieoptionen werden derzeit am PKU-Mausmodell erprobt. Die Gentherapie mit Adeno-assozierten Virus-Vektoren, die entweder in der Leber oder im Muskel exprimiert werden, zeigen im PKU-Mausmodell erfolgversprechende Ergebnisse mit langfristiger Korrektur der klinischen wie auch der laborchemischen Auffälligkeiten (Thöny 2010).

Behandlung mit Tetrahydrobiopterin (BH4)

Eine weitere Therapieoption ist die Gabe von BH4, dem Kofaktor der PAH, die erstmals von Kure und Mitarbeitern im Jahr 1999 beschrieben wurde (Kure et al. 1999). Sie berichteten über vier Patienten mit einer Erhöhung der Phe-Blutkonzentrationen, die keinen Defekt der BH4-Synthese oder -Regeneration sondern eine Defizienz der PAH aufwiesen und dennoch nach der Gabe von BH4 einen deutlichen Abfall ihrer Phe-Werte zeigten. Alle vier Patienten waren compound-heterozygot für Mutationen im *PAH*-Gen. Diese PKU-Form wird *BH4-responsive PKU* genannt. In der letzten Dekade wurden zahlreiche Patienten mit einer BH4-responsiven PKU beschrieben (Bernegger und Blau 2002, Levy et al. 2007, Muntau et al. 2002, Trefz et al. 2010). Die Mehrzahl dieser Patienten wies einen milden PKU-Phänotyp auf. Die Therapie mit BH4 stellt neben der lebens einschränkenden Phe-bilanzierten Diät die erste zugelassene alternative Behandlungsoption für Kinder und Jugendliche mit einer PKU dar.

Im Folgenden werden in dieser Arbeit Langzeitprobleme bei der diätetischen Behandlung der PKU sowie Besonderheiten der Langzeittherapie mit BH4 evaluiert.

2. Eigene Arbeiten

- 2.1. PUBLIKATION 1: **Hennermann JB**, Vetter B, Wolf C, Windt E, Bührdel P, Seidel J, Mönch E, Kulozik AE. Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia in Eastern Germany: A Characteristic Molecular Profile and 15 Novel Mutations. 2000. Hum Mutat 15:254-260

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Besonderheiten des genotypischen Spektrums der PKU-Patienten aus dem Ostteil Deutschlands. Wir untersuchten 302 Patienten aus 290 Familien, die in den Stoffwechsellaboren Berlin, Leipzig und Jena betreut wurden. Insgesamt identifizierten wir 75 verschiedene Mutationen, von denen 15 Mutationen bislang nicht beschrieben waren. Von diesen 15 neu identifizierten Mutationen waren elf Punktmutationen (p.M1R, p.Q20L, p.L41P, p.R155P, p.E183Q, p.S231F, p.Y325C, p.E330D, p.G344R, p.G344V, p.F410S), eine Spleiß-Mutation (IVS9+1G>A) und drei Deletionen (c.737delC, c.838del8bp, c.1357-1361del). Elf dieser neu identifizierten Mutationen waren mit einer klassischen PKU, drei mit einer milden PKU und nur eine Mutation mit einer HPA assoziiert.

Bei der phänotypischen Klassifizierung zeigte sich ein sehr hoher Anteil an Patienten mit einer klassischen PKU (77% aller untersuchten Patienten); lediglich 14% der Patienten wiesen eine milde PKU und 9% eine HPA auf. Bei der Untersuchung des *PAH*-Genotyps bestätigte sich demnach eine hohe Frequenz an Nullmutationen. Zudem zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der PKU-Population ohne und der PKU-Population mit Migrationshintergrund. Bei der ostdeutschen PKU-Population ohne Migrationshintergrund war die Nullmutation p.R408W in 40% aller Allele nachweisbar, die Spleiß-Mutationen IVS12+1G>A und IVS10-11G>A in 8% bzw. 3% nachweisbar. Bei PKU-Patienten mit türkischem Migrationshintergrund wurden am häufigsten die beiden Spleiß-Mutationen IVS10-11G>A (57% aller Allele) und IVS2+5G>C (15% aller Allele) identifiziert. Keiner der PKU-Patienten mit türkischem Migrationshintergrund wies die in der deutschen Population häufigen Mutationen p.R408W oder IVS12+1G>A auf. Unterschiedliche Häufigkeiten der *PAH*-Mutationen sind bereits innerhalb Europas beschrieben (Eisensmith et al. 1995, Zschocke et al. 1997) und konnten anhand unserer Daten auch für Deutschland bestätigt werden.

Auffallend waren in der hier untersuchten PKU-Population die hohe Inzidenz an Patienten mit einer klassischen PKU und der sehr hohe Anteil an Nullmutationen im *PAH*-Gen. Die Bestimmung des Genotyps und somit auch die Prädiktion des daraus resultierenden Phänotyps sind essentiell für Entscheidungen über mögliche Therapieoptionen, wie im Folgenden dargestellt wird.

- 2.2. PUBLIKATION 2: **Hennermann JB**, Roloff S, Gellermann J, Vollmer I, Windt E, Vetter B, Plöckinger U, Mönch E, Querfeld U. Chronic Kidney Disease in Adolescent and Adult Patients with Phenylketonuria. 2012. J Inherit Metab Dis, DOI 10.1007/s10545-012-9548-0

Bei PKU-Patienten erfolgt der Hauptteil der Proteinzufuhr, nämlich 75-95% der Gesamt-Proteinzufuhr, über die Gabe des Phe-freien synthetischen Aminosäurengemisches. Aminosäurengemische bestehen aus Mono-Aminosäuren, die schneller metabolisiert werden als Aminosäuren, die aus natürlichem Protein stammen (Mönch et al. 1996). Es ist außerdem bekannt, dass die Proteinzufuhr einen relevanten Einfluss auf die Nierenfunktion hat (Brenner et al. 1982; King und Levey 1993). Wir untersuchten daher den Einfluss der Phe-bilanzierten Diät auf die Nierenfunktion von adoleszenten und erwachsenen Patienten mit PKU. Bei 67 Patienten im Alter zwischen 15-43 Jahren wurden die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie der effektive renale Plasmafluss mittels Isotopen-Clearance (⁵¹Cr-EDTA, ¹²³J-Hippuran), die Retentionsparameter, die Protein- und Elektrolyt-Ausscheidung im Urin, eine Nierenultraschalluntersuchung und eine 24-Stunden-Blutdruckmessung durchgeführt.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag die Gesamtproteinzufuhr der untersuchten PKU-Patienten bei 0.96 ± 0.23 g/kg KG/Tag. 24% der Patienten waren übergewichtig (BMI 25-30 kg/m²), 13% der Patienten adipös (BMI >30 kg/m²). Eine arterielle Hypertonie zeigte sich bei 23% der Patienten, zudem fehlte bei 41% der Patienten der physiologische nächtliche Blutdruck-Abfall. Die Blutdruckwerte waren nicht mit GFR, Proteinzufuhr oder Proteinurie assoziiert, jedoch signifikant mit dem BMI. 19% der Patienten wiesen eine Erniedrigung der GFR auf, 31% eine Proteinurie, 7% eine Mikroalbuminurie und 23% eine Hyperkalziurie. Mit steigender Proteinzufuhr fiel die GFR signifikant ab, bezogen auf die aktuelle Gesamtprotein-Zufuhr, die aktuelle Zufuhr an synthetischem Eiweiß und die lebenslange Proteinzufuhr. Auch die Proteinurie war signifikant mit steigender Proteinzufuhr assoziiert. Die erhöhte Kalziumausscheidung war mit der aktuellen Proteinzufuhr, insbesondere der Zufuhr an synthetischem Eiweiß assoziiert; es gab jedoch keinen Einfluss der lebenslangen Proteinzufuhr auf die Kalziumausscheidung. Mittels multivarianter Regressionsanalyse zeigten sich lediglich Proteinurie und aktuelle Gesamt-Proteinzufuhr als unabhängige Prädiktoren der GFR mittels Isotopen-Clearance ($p < 0,005$). Der Vergleich der Patientengruppe mit eingeschränkter GFR mit der Patientengruppe mit normaler GFR erbrachte ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich Proteinurie und lebenslanger Proteinzufuhr (s. Tabelle 3). Eine Assoziation mit den unterschiedlichen Genotypen der Patienten und der Nierenfunktion oder der arteriellen Hypertonie ergab sich nicht.

Keiner der Patienten wies eine Hyperaminoazidurie auf. Die Phe-Konzentration im Urin war auf $0,713 \pm 0,375$ mmol/g Kreatinin erhöht und korrelierte signifikant mit aktuellen sowie lebenslangen Phe-Plasmakonzentrationen, GFR, Proteinurie, und systolischem Blutdruck. Die Phe-Plasmakonzentration war zum Zeitpunkt der Untersuchung 796 ± 317 $\mu\text{mol/L}$ (aktuelle Empfehlungen für Patienten >15 Jahre 40-1200 $\mu\text{mol/L}$; Burgard et al. 1999) und lag nur bei 4 von 67 Patienten oberhalb des therapeutischen Zielbereiches. Aktuelle oder lebenslange Phe-Plasmakonzentrationen korrelierten nicht mit GFR, Proteinurie oder Blutdruck.

Anhand dieser Daten konnten wir erstmals nachweisen, dass PKU-Patienten unter der Phe-bilanzierten Diät eine chronische Nierenerkrankung (eingeschränkte Nierenfunktion, Proteinurie) sowie eine arterielle Hypertonie entwickeln können.

Tabelle 3: Alter, BMI, Protein-Zufuhr, Protein- Ausscheidung, Kalzium-Ausscheidung sowie systolischer Blutdruck in PKU-Patienten mit verminderter und mit normaler GFR

GFR	Anzahl der Patienten	GFR (ml/min/1,73m ²)	Alter (Jahre) ¹	BMI (kg/m ²) ¹	Zufuhr natürliches Protein (g/kg/die) ¹	Zufuhr synthet. Protein (g/kg/die) ¹	Zufuhr Gesamt Protein (g/kg/die) ¹	Lebenslange Diät* (Jahre) ²	Urin-Protein (g/g Krea) ²	Urin-Kalzium (g/g Krea) ¹	Systolischer Blutdruck (mm/Hg) ¹
vermindert	11	87 ± 8,5 (64 - 94)	23,2 ± 4,3	24,0 ± 4,5	0,31 ± 0,24	0,65 ± 0,42	0,96 ± 0,27	20 ± 2,7	150 ± 79	0,15 ± 0,16	125 ± 13
normal	48	111 ± 13,1 (95 - 149)	23,9 ± 6,8	23,7 ± 4,0	0,31 ± 0,19	0,67 ± 0,35	0,97 ± 0,23	15 ± 6,0	135 ± 252	0,16 ± 0,07	125 ± 10

Angabe der Daten in Mittelwert ± Standardabweichung

¹ nicht signifikant; ² p = 0,03

*Lebenslange Diät: kumulative Anzahl der Jahre, in denen die tägliche Proteinzufuhr die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung von 1985 überschritt (DGE Empfehlung 1985).

Obwohl sich die aktuelle Protein-Zufuhr bei Patienten mit verminderter und normaler GFR nicht unterschied, war die kumulative Anzahl der Jahre, in denen die tägliche Proteinzufuhr die Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung von 1985 überschritt, bei Patienten mit verminderter GFR signifikant höher als bei Patienten mit normaler GFR. Zudem war die Proteinausscheidung bei Patienten mit verminderter GFR signifikant höher als bei Patienten mit normaler GFR. Unterschiede bezüglich des Alters, des BMI, der Kalziumausscheidung sowie des Blutdrucks ergaben sich bei den beiden Patientengruppen nicht.

- 2.3. PUBLIKATION 3: **Hennermann JB**, Bühner C, Blau N, Vetter B, Mönch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. 2005. *Mol Genet Metab* 86:S86-S90

BH4 stellt eine neue Option in der Behandlung der PKU dar. Nach der Erstbeschreibung der BH4-responsiven PKU in 1999 (Kure et al. 1999) wurden zunächst ausschließlich Patienten mit einer milden PKU beschrieben, die auf BH4 ansprachen. In dieser Studie untersuchten wir erstmals das Langzeit-Ansprechen auf BH4 bei Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp.

Wir führten einen BH4-Belastungstest bei 40 im Neugeborenenenscreening diagnostizierten Neugeborenen mit einer Phe-Serumkonzentration $>240 \mu\text{mol/L}$ durch. 18 der 40 Patienten zeigten ein Ansprechen im BH4-Belastungstest. 5 dieser 18 BH4-responsiven Patienten wiesen einen schweren PKU-Phänotyp auf, entsprechend einer Phe-Toleranz von $<20 \text{ mg/kg KG/Tag}$ und einer Phe-Serumkonzentration von $>1000 \mu\text{mol/L}$ bei Diagnosestellung. Diese 5 Patienten wurden über einen Zeitraum von 24 Monaten (5,5-29 Monate) mit BH4 in einer Dosierung von 20 mg/kg KG/Tag behandelt. Alter bei Behandlungsbeginn war im Median 1,2 Monate. Alle 5 Patienten zeigten ein dauerhaftes Ansprechen auf BH4: bei stabiler Stoffwechseleinstellung konnte die Phe-Toleranz unter der BH4-Therapie deutlich gesteigert werden. Vor Beginn der BH4-Therapie betrug die tägliche Phe-Toleranz 18-19 mg/kg , sie stieg unter BH4-Gabe auf 30-80 mg/kg an und fiel nach Beendigung der BH4-Therapie wieder auf 12-17 mg/kg ab. Die Mutationsanalysen ergaben eine Compound-Heterozygotität für eine Nullmutation und eine variante *PAH*-Mutation bei vier Patienten sowie eine Homozygotität für eine variante *PAH*-Mutation bei einem Patienten.

Mit diesen Daten konnten wir erstmals nachweisen, dass eine BH4-Responsivität nicht auf milde PKU-Phänotypen beschränkt ist, sondern dass auch Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp BH4-responsiv sein können und auf eine Langzeitbehandlung mit BH4 ansprechen.

- 2.4. PUBLIKATION 4: Trefz FK, Burton BK, Longo N, Martinez-Pardo Casanova M, Gruskin DJ, Dorenbaum A, Kakkis ED, Crombez EA, Grange DK, Harmatz P, Levy HL, Lipson MH, Milanowski A, Randolph LM, Vockley G, Whitley CB, Wolff JA, Bebachuk J, Christ-Schmidt H, **Hennemann JB**. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. 2009. J Pediatr 154:700-707

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Wirkung von Sapropterin-Dihydrochlorid (Sapropterin), der synthetisch hergestellten Form von BH₄, auf eine Steigerung der Phe-Toleranz bei Kindern mit PKU im Alter zwischen 4-18 Jahren. Diese multizentrische, internationale, randomisierte und Placebo-kontrollierte Doppelblind-Studie wurde in zwei Teilen durchgeführt. Im ersten Studienteil wurde das Ansprechen auf Sapropterin bei insgesamt 90 Patienten über einen Zeitraum von 8 Tagen untersucht. 50 von 90 Patienten zeigten ein Ansprechen auf Sapropterin mit einem Abfall der Phe-Blutwerte um $64,0 \pm 17,5\%$. 46 dieser 50 Patienten wurden in den zweiten Teil der Studie eingeschlossen. In diesem Studienteil wurden diese 46 Patienten randomisiert (3:1) mit 20 mg/kg KG/Tag Sapropterin oder mit Placebo über einen Zeitraum von zehn Wochen behandelt. Drei Wochen nach Randomisierung wurde die Phe-Zufuhr alle zwei Wochen abhängig von den aktuellen Phe-Blutwerten mittels Gabe von Milch- oder Eiweißpulver adaptiert.

In den ersten drei Wochen nach Randomisierung zeigte sich in der Sapropterin-Gruppe ein signifikanter Abfall der Phe-Blutkonzentration von $149 \pm 134 \mu\text{mol/L}$, in der Placebo-Gruppe zeigte sich dagegen keine signifikante Veränderung der Phe-Blutkonzentration. Über einen Zeitraum von zehn Wochen konnte die Phe-Zufuhr bei den Patienten, die Sapropterin erhielten, signifikant um $20,9 \pm 15,4 \text{ mg/kg KG/Tag}$ gesteigert werden, bei den Patienten der Placebo-Gruppe zeigte sich keine signifikante Steigerung der Phe-Zufuhr. Die Differenz der Phe-Steigerung zwischen der Sapropterin- und der Placebo-Gruppe war signifikant mit $17,7 \pm 4,5 \text{ mg/kg KG/Tag}$. 12 der 33 Patienten (36%) der Sapropterin-Gruppe tolerierten einen Anstieg der Phe-Zufuhr von $\leq 10 \text{ mg/kg KG/Tag}$, 10 Patienten (30%) einen Anstieg von 11-30 mg/kg KG/Tag und 11 Patienten (33%) einen Anstieg von 31-50 mg/kg KG/Tag. Keiner der 12 Patienten der Placebo-Gruppe tolerierte einen Anstieg der Phe-Toleranz auf $\geq 10 \text{ mg/kg KG/Tag}$, 7/12 Patienten zeigten keinen Anstieg der Phe-Toleranz. Schwere Nebenwirkungen traten nicht auf; häufigere Nebenwirkungen in der Sapropterin-Gruppe waren Kopfschmerzen, Rhinorrhoe sowie gastrointestinale Probleme.

Anhand dieser Daten konnten wir nachweisen, dass bei BH4-responsiven PKU-Patienten unter der Behandlung mit Sapropterin die individuelle Phe-Toleranz bei gleichzeitig stabilen Phe-Blutkonzentrationen signifikant gesteigert werden kann.

- 2.5. PUBLIKATION 5: Burton BK, Nowacka M, **Hennermann JB**, Lipson M, Grange DK, Chakrapani A, Trefz F, Dorenbaum A, Imperiale M, Kim SS, Fernhoff PM. Safety of Extended Treatment with Sapropterin Dihydrochloride in Patients with Phenylketonuria: Results of a Phase 3b Study. 2011. Mol Genet Metab 103:315-322

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Sicherheit der Langzeittherapie mit Sapropterin bei BH4-responsiven Patienten mit PKU. Die Studie war eine multizentrische, multinationale Phase 3b-Open-Label-Anschlussstudie. Alle 111 Studienteilnehmer im Alter von $16,4 \pm 10,2$ Jahren (Spanne: 4-50 Jahre) hatten zuvor an einer Phase 3-Sapropterin-Studie teilgenommen. Die durchschnittliche Studienteilnahme betrug 659 ± 221 Tage, die gesamte Dauer der Sapropterin-Exposition bei allen Patienten 799 ± 238 Tage. Die durchschnittliche Sapropterin Dosis lag bei $16,2 \pm 4,7$ mg/kg/Tag.

Die meisten der unter Sapropterin beobachteten unerwünschten Ereignisse wurden als leicht oder mittelschwer und als nicht medikamentenassoziiert eingestuft. Zu den häufigsten möglicherweise medikamentenassoziierten unerwünschten Ereignissen zählten virale Gastroenteritiden, Erbrechen und Kopfschmerzen (jeweils 4,5%). Bei 7 Patienten traten schwerwiegende unerwünschte Ereignisse auf, von denen nur eines, ein gastroösophagealer Reflux, als möglicherweise medikamentenassoziiert klassifiziert wurde. 3 Patienten beendeten die Behandlung wegen möglicherweise medikamentenassoziierten unerwünschter Ereignisse. Diese waren Konzentrationsschwierigkeiten und Stimmungsschwankungen, Thrombozytopenie sowie intermittierende Diarrhoe. Bei 2 Patienten zeigte sich eine intermittierende Transaminasenerhöhung, bei 24 Patienten eine transiente nicht-behandlungsbedürftige Neutropenie (neutrophile Granulozyten $<1,5 \times 10^9/L$) und bei 13 Patienten eine Thrombozytopenie, bei lediglich 4 davon mit Thrombozytenzahlen $<100 \times 10^9/L$. Weitere Laborveränderungen ergaben sich bei den Studienteilnehmern nicht. Die Phe-Blutwerte blieben bei der Mehrzahl der Patienten unter Sapropterin-Therapie innerhalb des Zielbereiches.

Anhand dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Langzeittherapie mit Sapropterin in einer Dosierung von 5-20 mg/kg KG/Tag ein gutes Sicherheitsprofil aufweist und von den Patienten gut toleriert wird.

- 2.6. PUBLIKATION 6: **Hennermann JB**, Roloff S, Gebauer C, Vetter B, von Arnim-Baas A, Mönch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin in phenylketonuria: Treatment strategies and prediction of long-term responders. 2012. Mol Genet Metab 107:294-301

Trotz der Erstbeschreibung der BH4-responsiven PKU vor mehr als 10 Jahren fehlen weiterhin Empfehlungen zur Identifizierung von PKU-Patienten, die langzeit-BH4-responsiv sind. Ziel dieser Studie war daher zum einen die Identifizierung von Parametern, die eine Langzeit-BH4-Responsivität vorhersagen, zum anderen die Etablierung eines strukturierten Prozederes zur Etablierung der BH4-Langzeittherapie.

Wir untersuchten 116 diätpflichtige PKU-Patienten im Alter von 4-18 Jahren (Median 8,8 Jahre) auf ihre mögliche Langzeit-BH4-Responsivität. Patienten mussten mindestens zwei der folgenden drei Kriterien erfüllen: positiver neonataler BH4-Belastungstest, potentiell BH4-responsiver Genotyp, milder Phänotyp. 23/116 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien und erhielten eine BH4-Langzeittherapie über mindestens drei Monate. Die Steigerung der diätetischen Phe-Zufuhr sowie die Anpassung der Aminosäuren-Zufuhr erfolgten nach einem genau definierten Protokoll. Die Therapie mit BH4 wurde bei allen Patienten in einer Dosierung von 20 mg/kg KG/Tag gestartet und nach Protokoll reduziert. Änderungen der Diät sowie der BH4-Gabe erfolgten abhängig von den jeweiligen Phe-Plasmakonzentrationen.

18 der 23 selektierten Patienten zeigten ein dauerhaftes Ansprechen auf die Behandlung mit BH4, 5 dagegen nicht. Die 18 Patienten, die dauerhaft auf die Therapie mit BH4 ansprachen, wurden über einen Zeitraum von 48 ± 27 Monaten mit einer BH4-Dosis von $14,9 \pm 3,3$ mg/kg KG/Tag behandelt. Unter der BH4-Therapie konnte die initiale Phe-Toleranz von 452 ± 201 mg/Tag auf 1593 ± 647 mg/Tag gesteigert werden, was einem Anstieg der Phe-Toleranz um $275 \pm 151\%$ entsprach. Bei 8 der 18 mit BH4 behandelten Patienten konnte das Phe-freie Aminosäurengemisch abgesetzt werden, 10 Patienten benötigten weiterhin ein Aminosäurengemisch in einer Dosierung von $0,63 \pm 0,23$ g Protein/kg KG/Tag. 7/18 Patienten berichteten über gastrointestinale Nebenwirkungen unter der BH4-Therapie.

Wir verglichen die laborchemischen, klinischen und molekulargenetischen Daten der Patienten, die langzeit-BH4-responsiv waren, mit denen der Patienten, die nicht langzeit-BH4-responsiv waren. Die Kombination folgender Parameter ergab den höchsten prädiktiven Wert für Langzeit-BH4-Responsivität: Phe-Konzentration bei Diagnosestellung <1200 $\mu\text{mol/L}$, Phe/Tyr-Ratio bei Diagnosestellung <15 , Phe/Tyr-Ratio unter diätetischer Behandlung <15 , Phe-Toleranz im Alter von drei Jahren >20 mg/kg KG/Tag, positiver

neonataler BH4-Belastungstest und mindestens eine potentiell BH4-responsive Mutation ($p = 0,00024$). Sogar bei Vergleich der Parameter, die bereits kurz nach Diagnosestellung in der Neonatalperiode verfügbar sind (Phe-Konzentration und Phe/Tyr-Ratio bei Diagnosestellung, neonataler BH4-Belastungstest und Genotyp), ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Langzeit-BH4-Responder und der Nicht-Responder ($p = 0,02$).

Anhand der in dieser Studie identifizierten Parameter wird es möglich, bereits kurz nach der Diagnosestellung einer PKU eine potentielle Langzeit-BH4-Responsivität vorherzusagen und somit früh die Entscheidung über eine eventuelle BH4-Therapie zu treffen.

- 2.7. PUBLIKATION 7: Blau N, **Hennermann JB**, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, Classification, and Genetics of Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin (BH4) Deficiencies. 2011. Mol Genet Metab 104:S2-S9

Abschließend fasst dieser Artikel das derzeitige Wissen, die neuen Entwicklungen sowie häufige Schwierigkeiten bei Diagnosestellung, Klassifizierung und genetischen Analysen aller Störungen im Phe-Stoffwechsel, d. h. sowohl des PAH-Mangels wie auch der Störungen in der BH4-Synthese und -Regeneration, zusammen. Alle Patienten, die im Neugeborenen-Screening mittels Tandem-Massenspektrometrie mit einer Phe-Erhöhung auffallen, müssen auf eine Störung der BH4-Synthese und -Regeneration untersucht werden. Aus einer einzigen Trockenblutkarte können sowohl die Analyse der Aminosäuren Phe und Tyr als auch die Analyse der Pterine (Neopterin und Biopterin) sowie die Aktivität der Dihydropteridin-Reduktase durchgeführt werden. Nach der Diagnosestellung empfiehlt sich baldmöglichst eine Klassifizierung der Patienten in den jeweiligen PKU-Phänotyp. Der PKU-Phänotyp wird durch die Phe-Blutwerte und durch die tägliche individuelle Phe-Toleranz bestimmt, aber auch durch ein potentielles Ansprechen auf BH4. Nach den aktuellen Empfehlungen sollte der BH4-Belastungstest mit der Gabe von synthetischem BH4, Sapropterin, in einer Dosierung von 20 mg/kg/Tag durchgeführt werden. Nach einem initialen Screening Test über einen Zeitraum von 24-48 Stunden sollte der BH4-Test über mehrere Wochen fortgeführt werden. Anhand des Genotyps, d. h. anhand der Kombination der Mutationen beider PAH-Allele, kann die Schwere der PKU, d. h. der biochemische Phänotyp, aber auch ein potentielles Ansprechen auf BH4 leichter bestimmt werden. Zudem kann mit einer Phe-Belastung und der hierbei erzielten Phe-Umsetzungsrate der PKU-Phänotyp sicher klassifiziert werden.

Die Einteilung in die verschiedenen PKU-Phänotypen und die Klassifizierung des *PAH*-Genotyps ist essentiell für mögliche Therapie-Entscheidungen, insbesondere der Therapie mit BH4, sowie für eine adäquate Beratung der betroffenen Familien.

3. Diskussion

3.1. Phenylalanin-bilanzierte diätetische Therapie

Seit Einführung des Neugeborenen Screenings auf PKU in Deutschland in den späten 1960er bzw. frühen 1970er Jahren werden Patienten mit einer PKU frühzeitig diagnostiziert und rechtzeitig behandelt. Das Outcome von PKU-Patienten ist jedoch abhängig von der individuellen Stoffwechseleinstellung: Ein Phe-Anstieg um 100 µmol/L in dem kritischen Alter der ersten 12 Lebensjahre bedingt einen Abfall des IQs um 1,3-3,1 Punkte, wie eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse ergab (Waisbren et al. 2007).

Obwohl die Phe-bilanzierte Diät bereits in den 1950er Jahren erstmals beschrieben wurde, hat sich in der Behandlung der PKU und in der Zusammensetzung der diätetischen Therapie erst in den letzten Jahren einiges geändert. Wegen Complianceproblemen (MacDonald et al. 2010, Walter et al. 2002), Einschränkungen der Lebensqualität (Cotugno et al. 2011) und möglicher Langzeitfolgen durch die Phe-bilanzierte Diät begann die Suche nach neuen Optionen in der Behandlung der PKU.

3.1.1. Langzeitprobleme unter Phenylalanin-bilanzierter Diät

Mikronährstoff-Defizite, insbesondere ein Vitamin B12-Mangel, sind eines der möglichen Langzeitprobleme bei Patienten mit PKU. Dies betrifft jedoch vorwiegend Patienten mit ausgeprägter Incompliance, Patienten, die ihre diätetische Therapie ohne eine adäquate Proteinversorgung beenden, oder Patienten mit HPA und streng veganer Ernährung (MacDonald et al. 2011). Weitere bekannte Langzeitprobleme bei adoleszenten und adulten Patienten mit PKU sind Osteopenie bzw. Osteoporose (Hoeks et al. 2009, Schwahn et al. 1998) sowie neurologische Defizite, wie Tremor, verminderte Leistungen bei neuropsychologischen Untersuchungen und Marklager-Veränderungen (Pérez-Dueñas et al. 2005, Moyle et al. 2007, Anderson und Leuzzi 2010).

Adipositas

Unsere Daten bestätigten das Auftreten von Übergewicht bzw. Adipositas bei knapp 40% der adoleszenten und adulten PKU-Patienten. Ein Zusammenhang zwischen Phe-bilanzierter Diät und Adipositas wurde auch in anderen Studien bereits beschrieben, vorwiegend bei PKU-Patienten weiblichen Geschlechts (Acosta et al. 2003, Burrage et al. 2012, White et al. 1982). Dennoch bestätigen unsere wie auch früher erhobene Daten, dass eine Erhöhung des BMI bei PKU-Patienten nicht mit einer erhöhten Gesamtkalorienzufuhr assoziiert sein muss (Acosta 1996). Wir konnten aufzeigen, dass der BMI invers mit der

Zufuhr an Gesamtprotein bzw. synthetischem Protein korreliert. Die unregelmäßig über den Tag verteilte Proteinzufuhr sowie die hohe Kohlenhydratzufuhr der Phe-bilanzierten Diät haben einen Einfluss auf die Ausschüttung von Insulin und auf die Ausschüttung des Appetit-anregenden Hormons Ghrelin, was als eine der möglichen Ursache der Adipositas bei PKU-Patienten postuliert wurde (MacLeod et al. 2010, Weigel et al. 2007).

Arterielle Hypertonie

Anhand unserer Untersuchungen konnten wir erstmals nachweisen, dass PKU-Patienten ein erhöhtes Risiko aufweisen, eine arterielle Hypertonie zu entwickeln (Publikation 2). Bei einem Viertel der adoleszenten und adulten PKU-Patienten wurde eine arterielle Hypertonie diagnostiziert. Zudem fehlte bei über 40% der Patienten der physiologische nächtliche Blutdruckabfall. Das Auftreten einer arteriellen Hypertonie war signifikant mit ansteigendem BMI assoziiert, nicht jedoch mit der Proteinzufuhr, der GFR oder der Proteinausscheidung. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine mögliche arterielle Hypertonie bei Patienten mit PKU ein weiteres sekundäres Gesundheitsproblem darstellt. Die Langzeituntersuchungen bei Patienten mit PKU sollten daher unbedingt auch regelmäßige Blutdruck-Kontrollen, insbesondere bei übergewichtigen und adipösen Patienten, beinhalten.

3.1.2. Nierenfunktion bei Patienten mit Phenylalanin-bilanzierter Diät

Wir konnten zudem erstmals nachweisen, dass PKU-Patienten unter der lebenslangen Phe-bilanzierten Diät eine chronische Nierenerkrankung mit eingeschränkter Nierenfunktion, Proteinurie, Mikroalbuminurie und Hyperkalziurie entwickeln können (Publikation 2). Multiple lineare Regressionsanalysen ergaben eine signifikante Assoziation der GFR, gemessen mittels ^{51}Cr -EDTA Isotopen-Clearance, mit der aktuellen Gesamt-Protein-Zufuhr und der Proteinurie. Daraus folgt, dass die Proteinzufuhr und die Proteinurie unabhängig voneinander an dem Pathomechanismus der Nierenschädigung bei Patienten mit PKU beteiligt sind.

Einschränkung der Glomerulären Filtrationsrate

Die GFR, gemessen mittels ^{51}Cr -EDTA Isotopen-Clearance, war signifikant mit steigender Proteinzufuhr assoziiert, sowohl mit der aktuellen als auch mit der lebenslangen Proteinzufuhr, sowohl mit der Zufuhr an Gesamtprotein als auch mit der Zufuhr an synthetischem Protein. 19% der Patienten wiesen eine eingeschränkte GFR auf, lediglich 7% eine Hyperfiltration. Die Proteinzufuhr scheint somit ein wichtiger Risikofaktor in der Genese der chronischen Nierenerkrankung bei Patienten mit PKU zu sein.

Proteinurie

Eine Proteinurie wurde bei über 30% der PKU-Patienten nachgewiesen, eine Mikroalbuminurie bei 7% der Patienten. Unsere Analysen bestätigen, dass die Proteinurie eine unabhängige Variable der Nierenschädigung bei Patienten mit PKU ist. Eine Hyperaminoazidurie fand sich bei keinem Patienten. Die Phe-Ausscheidung im Urin korrelierte jedoch signifikant mit der Proteinurie und der GFR. Dies führte zu der Annahme, dass die erhöhte Phe-Konzentration im Urin einen zusätzlichen Einfluss auf die Nierenschädigung bei Patienten mit PKU haben könnte.

Übergewicht ist ein bekannter Risikofaktor bei der Entwicklung einer Glomerulosklerose (Kambham et al. 2001). Dies entspricht unseren Daten, die eine signifikante Assoziation zwischen BMI und GFR nachwies. Dennoch zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem BMI und der Proteinausscheidung. Eine Adipositas scheint somit ein weiterer Risikofaktor für eine chronische Nierenerkrankung bei PKU-Patienten zu sein.

Hyperkalziurie

23% der untersuchten Patienten zeigten eine Hyperkalziurie. Die Kalziumausscheidung stieg mit steigender Proteinzufuhr signifikant an, vor allem mit steigender Zufuhr an synthetischem Protein, wobei die lebenslange Proteinzufuhr keinen Einfluss auf die Kalziumausscheidung hatte. Eine mögliche Hyperkalziurie birgt somit ein weiteres Langzeitrisiko für PKU-Patienten. Dennoch war die Hyperkalziurie nicht mit verminderter GFR, Proteinurie oder arterieller Hypertonie assoziiert, und nur wenige Patienten wiesen eine Nephrokalzinose auf. Eine Assoziation mit den Serumkonzentrationen von 25-Hydroxy-Vitamin D(3) oder 1,25-Dihydroxy-Vitamin D(3) bestand ebenfalls nicht. Obwohl die aktuellen Empfehlungen zur Nährstoffzufuhr eine höhere Vitamin D-Zufuhr bei Adoleszenten und Erwachsenen anraten (German Nutrition Society 2012), wies keiner der hier untersuchten PKU-Patienten einen Vitamin D-Mangel auf.

3.1.3. Genese der Nierenschädigung unter Phenylalanin-bilanzierter Diät

Mehrere Pathomechanismen können als Ursache der renalen Schädigung bei Patienten mit PKU in Erwägung gezogen werden:

1. Ein Zusammenhang zwischen der diätetischen Proteinzufuhr und der Nierenfunktion ist seit langem bekannt (Brenner et al. 1982; King und Levey 1993). Die Hyperfiltrationstheorie besagt, dass eine hohe Proteinzufuhr zu einem akuten Anstieg des renalen Plasmaflusses und der GFR führt, resultierend in Hyperfiltration, glomerulärer Schädigung und chronischer Niereninsuffizienz (Bernstein et al. 2007; Brenner et al. 1996). Daher wird bei Patienten mit

terminaler Niereninsuffizienz eine protein-restriktive Kost empfohlen (Brenner et al 1982; Fouque und Aparicio 2007). Die Gesamt-Proteinzufuhr bei PKU-Patienten übersteigt häufig die geltenden Diät-Empfehlungen (MacDonald et al. 2011), und auch in unserem Patientenkollektiv wurde die empfohlene Gesamt-Proteinzufuhr deutlich überschritten. Dennoch lag die Gesamt-Proteinzufuhr der untersuchten PKU-Patienten noch in dem Bereich einer „normalen“ westlichen Ernährung, weshalb die Gesamt-Proteinzufuhr als alleiniger Faktor eine chronische Nierenerkrankung bei Patienten mit PKU nicht hinreichend erklärt (Fouque und Aparicio 2007; Halbesma et al. 2009).

2. Die Proteinzufuhr bei PKU-Patienten unterscheidet sich jedoch in ihrer Zusammensetzung deutlich von der Proteinzufuhr Gesunder und besteht zu mehr als Zweidritteln aus dem synthetischen Aminosäurengemisch. Nach Zufuhr des aus Mono-Aminosäuren bestehenden Aminosäurengemisches zeigen sich hohe Plasma-Aminosäuren-Peaks (Gropper et al. 1993, Mönch et al. 1996). Im Tiermodell waren hohe Plasma-Aminosäuren-Spiegel nephrotoxisch und führten zu einem signifikanten Abfall der GFR mit Albuminurie und histologisch nachweisbarer tubulärer Schädigung (Zager et al. 1983). Ein ähnlicher Pathomechanismus könnte demnach ursächlich für die Nierenschädigungen bei Patienten mit PKU sein.

Zudem konnte in Studien ein Einfluss des synthetischen Aminosäurengemisches auf die Steigerung des Blut-Harnstoff-Stickstoffs und die Harnstoff-Synthese nachgewiesen werden (van Calcar et al. 2009). Im Mausmodell resultierte nach der Zufuhr von Aminosäurengemischen eine Zunahme der Nierenmasse, wahrscheinlich bedingt durch eine erhöhte renale Auslastung, um den nach Aminosäuren-Zufuhr anfallenden Harnstoff besser eliminieren zu können (Solverson et al. 2012).

3. Die Ausscheidung von Phe im Urin war signifikant mit der GFR und der Proteinurie assoziiert. Obwohl bislang kein nephrotoxischer Effekt von Phe bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass hohe Phe-Konzentrationen im Urin einen zusätzlichen Einfluss auf die Entwicklung der chronischen Nierenerkrankung bei Patienten mit PKU haben.

4. Erhöhter oxidativer Stress ist bei Patienten mit PKU mehrfach nachgewiesen worden. Ursache hierfür sind die erhöhte Bildung freier Radikale, ein potentieller Mangel an Mikronährstoffen sowie ein Anstieg von Phe und dessen Metaboliten (Ribas et al. 2011). Erhöhter oxidativer Stress könnte eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der renalen Gewebeschädigung und der chronischen Nierenerkrankung bei PKU spielen.

5. Es wurde beschrieben, dass die menschliche Niere eine wichtige Funktion in der Phe-Homöostase einnimmt. PAH wird nicht nur in der Leber sondern auch in der menschlichen Niere exprimiert (Lichter- Konecki et al. 1999), und eine Verminderung der PAH-Aktivität ist

bei Niereninsuffizienz bekannt (Zhao et al. 2012). Die renale *PAH*-Expression könnte daher einen Einfluss auf die Nierenfunktion ausüben, obwohl unsere Daten keinen Zusammenhang zwischen der chronischen Nierenerkrankung und dem *PAH*-Genotyp aufzeigen.

Anhand dieser Daten wird jedoch deutlich, dass bei adoleszenten und adulten Patienten unter einer Phe-bilanzierten Diät regelmäßige Untersuchungen der Nierenfunktion unbedingt durchgeführt sollten.

3.2. Therapie mit Tetrahydrobiopterin

Mit der Erstbeschreibung der BH4-responsiven PKU im Jahr 1999 (Kure et al. 1999) avancierte BH4 zur möglichen Alternative in der Behandlung von Patienten mit PKU. Zunächst war BH4 in Deutschland über Schircks Laboratories (Schweiz) erhältlich. Sapropterin-Dihydrochlorid (Kuvan®; Merck Serono SA, Schweiz), eine synthetisch hergestellte Form von BH4, erhielt 2007 die Zulassung durch die *Food and Drug Administration* in den U.S.A. und 2009 die Zulassung durch die Europäische Arzneimittel-Agentur EMEA in Deutschland (Burnett 2007, Ziesch et al. 2012). Beide BH4-Produkte enthalten die gleiche aktive Substanz 6R-BH4 (Burnett 2007). Die Einführung von BH4 als neue therapeutische Option bei Patienten mit PKU wurde mit großem Optimismus und Enthusiasmus aufgenommen. Es wurde geschätzt, dass mindestens 30% der Patienten mit PKU von einer BH4-Behandlung profitieren könnten (Bernegger und Blau 2002, Zurflüh et al. 2006).

Verschiedene Ursachen für die Wirkung von BH4 bei Patienten mit einer BH4-responsiven PKU wurden diskutiert, wie z. B. Mutationen im Bereich der BH4-bindenden Domäne der PAH, mögliche K_m -Varianten der PAH, eine verminderte Bindung von BH4 an die mutierte PAH oder suboptimale physiologische BH4-Konzentrationen (Aguado et al. 2007, Erlandsen und Stevens 2001, Kure et al. 2004). Inzwischen wird die These des pharmakologischen Chaperoneffekts von BH4 favorisiert. Danach fungiert BH4 in pharmakologisch hohen Dosen als Chaperon und führt zu einer Stabilisierung des mutierten Enzyms, zu einer Verhinderung des Enzymabbaus sowie zu einer Verminderung von Enzymaggregation, was in einer Erhöhung der PAH-Restenzymaktivität resultiert (Muntau und Gersting 2010).

3.2.1. Identifikation von langzeit-BH4-responsiven PKU-Patienten

Eine Langzeittherapie mit BH4 ist mittlerweile bei einigen größeren Patientengruppen mit BH4-responsiver PKU berichtet worden (Burton et al. 2007, Lee et al. 2008, Levy et al. 2007, Trefz et al. 2010). Die meisten dieser Studien konzentrierten sich vorwiegend auf den Effekt von BH4 auf eine Reduktion der Phe-Blutwerte (Burton et al. 2007, Lee et al. 2008, Levy et al. 2007) und nicht auf eine Steigerung der individuellen Phe-Toleranz. In unseren Studien konnten wir jedoch beide Effekte einer BH4-Therapie nachweisen (Publikation 3, Publikation 4, Publikation 6).

Die Steigerung der Phe-Toleranz unter der BH4-Therapie ist für die Patienten von großer Bedeutung, da dies eine größere Freiheit in der Diätführung und eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität impliziert. Gleichwohl gestaltet sich die Identifikation von Patienten mit einer BH4-responsiven PKU, insbesondere solcher Patienten, die auf eine Langzeittherapie mit BH4 ansprechen, weiterhin als schwierig. Kriterien zur Identifikation langzeit-BH4-responsiver PKU-Patienten existierten bislang nicht. Uns gelang es erstmals, Kriterien festzulegen, mit denen bereits in der Neonatalperiode potentiell BH4-responsive PKU-Patienten identifiziert werden können (Publikation 6).

BH4-Belastungstest

Ursprünglich wurde der BH4-Belastungstest zur Diagnose von Patienten mit einem Defekt in der Synthese bzw. Regeneration von BH4 etabliert. Diese Patienten zeigen im BH4-Belastungstest bereits 3-7 Stunden nach BH4-Gabe einen Abfall der Phe-Werte (Curtius et al. 1979, Ponzzone et al. 1993). Patienten mit einer BH4-responsiven PKU dagegen weisen im BH4-Belastungstest erst >8 Stunden nach BH4-Gabe einen Abfall der Phe-Werte auf (Kure et al. 1999, Zurflüh et al. 2006). Der BH4-Test wird als positiv gewertet, wenn ein Abfall von mindestens 30% des basalen Phe-Wertes erreicht wird (Bernegger und Blau 2002). In der Praxis werden zur Identifikation von Patienten mit einer BH4-responsiven PKU unterschiedliche BH4-Belastungstests benutzt (Blau et al. 2010). All diese BH4-Belastungstests können jedoch sowohl falsch negative wie auch falsch positive Ergebnisse erbringen, beispielsweise bedingt durch ein verzögertes Ansprechen auf BH4, eine zu niedrige BH4-Dosis, eine zu niedrige Phe-Zufuhr, mangelnde Compliance oder eine katabole Stoffwechselsituation (Blau et al. 2009, Nielsen et al. 2010, Publikation 7). Ein Großteil dieser Störfaktoren scheint im Neugeborenenalter eine weniger bedeutende Rolle zu spielen als in späterem Lebensalter.

In Europa wird derzeit der BH4-Belastungstest bei mindestens der Hälfte der Neugeborenen, die im Neonatalscreening mit einer Phe-Erhöhung von >400 µmol/L

diagnostiziert werden, durchgeführt (Blau et al. 2010). Wir konnten anhand unserer Daten nachweisen, dass der neonatale BH4-Belastungstest über 24 Stunden ein guter prädiktiver Faktor ist, um eine potentielle Langzeit-BH4-Responsivität vorherzusagen. Dennoch können PKU-Patienten, die eine verzögerte BH4-Responsivität aufweisen, sogenannte „*slow responder*“, mit dem BH4-Belastungstest über einen Zeitraum von nur 24 Stunden nicht sicher erfasst werden. Daher muss, zumindest in Einzelfällen, eine Verlängerung des BH4-Belastungstests bis mindestens 48 Stunden in Erwägung gezogen werden (Fiege et al. 2005). Ein positiver BH4-Belastungstest sagt allerdings nicht sicher eine Langzeit-BH4-Responsivität vorher wie auch ein negativer BH4-Belastungstest eine Langzeit-BH4-Responsivität nicht sicher ausschließt.

Identifikation mittels Phänotyps

Wir konnten anhand unserer Daten nachweisen, dass nicht nur Patienten mit einem milden PKU-Phänotyp BH4-responsiv sein können sondern auch Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp (Publikation 3). Auch bei diesen Patienten kann durch die BH4-Therapie sowohl ein Abfall der Phe-Blutwerte als auch eine Steigerung der individuellen Phe-Toleranz erreicht werden.

Langzeit-BH4-Responder können auch anhand klinischer Daten identifiziert werden. Hierzu zählen insbesondere die maximalen Phe-Blutspiegel und die maximale Phe/Tyr-Ratio, sowohl bei Diagnosestellung als auch unter diätetischer Therapie. Die Phe-Toleranz allein scheint kein sicheres Identifikationsmerkmal darzustellen. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass die durch unsere Studien ermittelte Phe-Toleranz mittels ambulanter Kontrollen zu Hause bestimmt wurde, was potentiell fehlerbelasteter ist als eine standardisierte Bestimmung unter stationären Bedingungen.

Identifikation mittels Genotyps

Derzeit sind mehr als 700 verschiedene *PAH*-Mutationen bekannt, und mehr als 400 verschiedene Mutationskombinationen wurden bislang bei Patienten mit einer BH4-responsiven PKU beschrieben (<http://www.biopku.org/biopku>). Meist betrifft dies „mildere“ Mutationen, die mit einer höheren *PAH*-Restaktivität assoziiert sind. Sogenannte Nullmutationen mit nur geringer *PAH*-Restaktivität sind nicht mit einer BH4-Responsivität assoziiert (<http://www.biopku.org/biopku>). Obwohl wir auch bei einigen Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp eine BH4-Responsivität nachweisen konnten, waren alle diese Patienten Träger zumindest einer mildereren oder varianten *PAH*-Mutation (Publikation 3, Publikation 7).

Dennoch zeigen auch unsere Daten, dass der Genotyp allein keine zuverlässige Aussage über eine potentielle Langzeit-BH4-Responsivität liefert. Bei einigen Genotypen, z. B. bei der Kombination mit den *PAH*-Mutationen p.Y414C, p.A403V, p.A300S und p.R261, ist eine BH4-Responsivität sicher zu erwarten, bei einigen anderen Mutationen dagegen nicht immer. Einen Erklärungsansatz hierfür liefert die These der sogenannten interallelicen Komplementation. Von einer interallelicen Komplementation spricht man, wenn Mutationen in Compound-Heterozygotie vorliegen und das daraus resultierende Genprodukt weniger oder mehr aktiv ist als das Genprodukt der Mutationen in homozygotem Zustand (Leandro et al. 2011). Dies ist von besonderer Bedeutung bei Erkrankungen, die eine hohe Rate an compound-heterozygoten Genotypen aufweisen. Für die PKU trifft dies in besonderem Maße zu, da bis zu 75% der Patienten einen compound-heterozygoten Genotyp aufweisen (Publikation 1, Leandro et al. 2011). Kürzlich wurde außerdem nachgewiesen, dass variante *PAH*-Mutationen abhängig von ihrer zweiten Mutation *in trans* unterschiedlich auf BH4 reagieren. Ein Beispiel hierfür bietet die Missense-Mutation p.R261Q: In homozygotem Zustand ist diese Mutation mit einer BH4-Responsivität assoziiert, in Heterozygotie mit einer Nullmutation dagegen nicht (Staudigl et al. 2011). Dies wird ebenfalls durch unsere Untersuchungen bestätigt, in denen wir eine Langzeit-BH4-Responsivität bei Patienten mit Homozygotie für p.R261Q nachweisen konnten, bei Patienten mit einer Compound-Heterozygotie für p.R261Q allerdings nicht.

Auch wenn die molekulargenetische Analyse des *PAH*-Gens bei der PKU keinen diagnostischen Stellenwert besitzt, so konnten auch wir anhand unserer Daten aufzeigen, dass die Aussagekraft dieser Analyse gerade für eine mögliche Therapieoption mit BH4 von großer Bedeutung ist (Publikation 7).

3.2.2. Prädiktive Parameter für Langzeit-BH4-Responsivität

Unsere Daten zeigen, dass es keinen einzelnen spezifischen Parameter gibt, der eine Langzeit-BH4-Responsivität vorhersagt. Durch die Analyse bestimmter laborchemischer, molekulargenetischer und klinischer Daten ist jedoch eine sichere Einschätzung über eine potentielle Langzeit-BH4-Responsivität möglich. Die Kombination folgender Parameter erlaubt bereits bei der Diagnosestellung im Neugeborenenalter eine Aussage über eine potentielle BH4-Responsivität: maximale Phe-Konzentration bei Diagnosestellung <1200 µmol/L, maximale Phe/Tyr-Ratio bei Diagnosestellung <15, positiver neonataler BH4-Belastungstest und mindestens eine potentiell BH4-responsive Mutation. Dies ermöglicht eine frühe Einschätzung über mögliche Therapieoptionen und eine entsprechende Beratung der betroffenen Familien.

Zudem gibt es mehrere Faktoren, die eine Langzeit-BH4-Responsivität beeinflussen, wie in besonderem Maße die jeweilige Stoffwechseleinstellung. Eine Langzeittherapie mit BH4 scheint sowohl die Stabilität von PAH als auch den Chaperoneffekt von BH4 zu stärken (Staudigl et al. 2011). Auch aus diesem Grund empfehlen wir eine verlängerte Testung von BH4 bei potentiell langzeit-BH4-responsiven PKU-Patienten. Unsere Daten zeigen überdies, dass einige Patienten nur langsam ihre individuelle Phe-Toleranz steigern können, so dass der Effekt einer BH4-Langzeittherapie erst im Verlauf von mindestens drei Monaten nach Beginn der BH4-Behandlung erkannt werden kann.

Die Annahme, dass 30% der Patienten mit PKU von einer BH4-Behandlung profitieren könnten (Bernegger und Blau 2002, Zurflüh et al. 2006), wurde durch unsere Daten nicht belegt. In unserem Patientenkollektiv lag das Langzeit-Ansprechen auf BH4 bei nur 15%. Möglicherweise ist dies durch unser Patientenkollektiv bestimmt, das eine hohe Rate an Patienten mit einer klassischen PKU und eine hohe Rate an Nullmutationen, insbesondere der Punktmutation p.R408W, aufwies (Publikation 1).

3.2.3. Langzeittherapie mit Tetrahydrobiopterin

Diätumstellung unter BH4-Langzeittherapie

Der Beginn einer Langzeittherapie mit BH4 erfordert strenge Kontrollen der Phe-Blutwerte sowie der Phe-Zufuhr. Dies ist nur bei guter Zusammenarbeit mit den betroffenen Patienten und deren Eltern möglich. Wir etablierten eine effektive Methode, mit der nach einem Stufenplan schrittweise die Phe-Zufuhr gesteigert, die eiweißarmen Lebensmittel durch normale Produkte ersetzt und das Aminosäurengemisch reduziert werden können (Publikation 6). Dieser Stufenplan wurde von den Patienten und deren Eltern sehr gut akzeptiert, obwohl sie der Diätlockerung zunächst mit Angst und großer Vorsicht begegneten. Die Patienten mit PKU, die zuvor ausschließlich eine Phe-bilanzierte Diät erhielten, entwickelten nach Lockerung der Diät unter BH4 besondere Essgewohnheiten. Viele PKU-Patienten lehnten eiweißreiche Lebensmittel ab, insbesondere Kuhmilch, Milchprodukte und Fisch. Ein Großteil der Patienten, die unter der BH4-Therapie ihre Phe-bilanzierte Diät beenden konnten, benötigte weiterhin eine Supplementation mit Vitaminen und Mikronährstoffen. Die Gefahr einer Mikronährstoff-Defizienz wurde durch andere Studien bestätigt (Singh et al. 2010). Unter der Langzeittherapie mit BH4 ist es daher erforderlich, die diätetische Zufuhr und die Serumspiegel bestimmter Mikronährstoffe und Vitamine zu kontrollieren, v. a. die von Kalzium, Eisen, Vitamin B12 und Vitamin D. Dies betrifft vorwiegend Patienten mit PKU, die unter der BH4-Langzeittherapie kein Aminosäurengemisch mehr erhalten.

Wie wir in unseren Studien nachweisen konnten, wurde die Lockerung der Phe-bilanzierten Diät unter der Behandlung mit BH4 sowohl von den Patienten als auch von deren Eltern als eine deutliche Steigerung ihrer Lebensqualität empfunden. Die Lebensqualität wurde in unseren Untersuchungen ausschließlich anamnestisch befragt. Im Gegensatz hierzu wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie keine Steigerung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität unter der Behandlung mit BH4 berichtet (Ziesch et al. 2012).

Dosierung von BH4

Dosierungen von BH4 sind in der Literatur mit 5-20 mg/kg KG/die beschrieben (Lee et al. 2008, Levy et al. 2007). Dennoch benötigten die meisten der von uns untersuchten Patienten höhere BH4-Dosen von mindestens 15 mg/kg KG/die, insbesondere Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp, die unter BH4-Therapie weiterhin ein Aminosäurengemisch einnahmen. Niedrigere BH4-Dosierungen waren lediglich bei einigen wenigen Patienten mit einem milden PKU-Phänotyp effektiv. Dies wurde durch eine kürzlich publizierte Arbeit bestätigt (Staudigl et al. 2011). Wir konnten zudem aufzeigen, dass durch eine Titrierung der individuellen BH4-Dosis eine stufenweise Reduktion der BH4-Dosis erreicht werden kann. Bei Beginn einer BH4-Therapie sollte die initiale Dosis von BH4 bei 20 mg/kg KG/die liegen und individuell nach den Phe-Blutwerten sowie der Phe-Toleranz adaptiert werden.

Nebenwirkungen der BH4-Therapie

In unseren (Publikation 4, Publikation 5) und anderen BH4-Langzeitstudien (Lee et al. 2008, Levy et al. 2007) traten einige unerwünschte Ereignisse wie gastrointestinale Probleme, Rhinorrhoe und Kopfschmerzen auf, die als möglicherweise medikamentenassoziierte Nebenwirkungen von BH4 einzustufen sind. Die gastrointestinalen Probleme unter BH4-Therapie könnten möglicherweise durch den säurehaltigen Charakter des Produktes bedingt sein. Wir konnten außerdem nachweisen, dass einige Patienten unter der BH4-Therapie eine intermittierende Transaminasenerhöhung, eine transiente Neutropenie oder Thrombozytopenie aufwiesen. Auch diese Laborveränderungen sind als möglicherweise medikamentenassoziiert einzustufen. Bei einigen wenigen Patienten zeigte sich unter der BH4-Therapie eine kurzzeitige Erniedrigung der Phe-Blutkonzentration auf Werte <26 µmol/L. Unter der Langzeittherapie mit BH4 sollten daher neben regelmäßigen Kontrollen der Phe-Blutwerte auch regelmäßige Kontrollen der Transaminasen sowie des Blutbildes inklusive Differenzierung erfolgen. Geschmack und Konsistenz von BH4 wurde von einigen Patienten in unserem Patientenkollektiv als sehr unangenehm empfunden; gleichwohl beendete keiner der Patienten die BH4-Therapie aufgrund dieser Unverträglichkeiten.

Indikation für eine BH4-Langzeittherapie

Trotz des positiven Effekts von BH4 auf eine Steigerung der individuellen Phe-Toleranz und auf eine Reduktion der Phe-Blutwerte ist die Indikation zu einer Langzeittherapie mit BH4 nach unseren Ergebnissen streng zu stellen. Insbesondere Patienten mit einer milden PKU profitieren von der BH4-Therapie, während Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp zwar BH4-responsiv sein können, aber unter der Langzeittherapie mit BH4 meist nur eine geringe Steigerung ihrer Phe-Toleranz erreichen. Für eine BH4-Langzeittherapie setzen wir eine mindestens 2,5fache Steigerung der initialen Phe-Toleranz voraus. Dies entspricht auch Daten aus anderen Studien (Singh et al. 2010). Bei der Entscheidung über eine BH4-Langzeittherapie ist zudem der Kostenfaktor zu berücksichtigen. Die von uns kalkulierten Kosten für eine BH4-Therapie in einer Dosis von 10 mg/kg KG/die betragen bereits im Alter von 6 Monaten das 1,5-fache der Phe-bilanzierten Diät inkl. des Aminosäurengemisches, ab dem zweiten Lebensjahr sogar das 2-fache. Bei BH4-Dosierungen von 20 mg/kg KG/die liegen die Kosten dementsprechend zwischen 3- bis 4-fach höher als unter der herkömmlichen diätetischen Therapie.

3.3. Ausblick

BH4 ist nicht nur Kofaktor aromatischer Hydroxylasen sondern auch Kofaktor der Nitritoxid-Synthase. Die Nitritoxid-Synthase und somit auch BH4 nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation der vaskulären Homöostase ein. Eine Depletion von BH4 führt zu endothelialer Dysfunktion, verstärkter Gefäßinflammation sowie der Zunahme arteriosklerotischer Veränderungen und folglich zu kardiovaskulären Erkrankungen (Alkaitis und Crabtree 2012, McNeill und Channon 2012). Der therapeutische Effekt von BH4 auf kardiovaskuläre Erkrankungen wird derzeit in mehreren Studien untersucht. Eine Pilotstudie konnte einen antihypertensiven Effekt von BH4 bei Patienten mit schlecht eingestellter arterieller Hypertonie nachweisen (Porkert et al. 2008), während eine kürzlich veröffentlichte Studie keinen Effekt einer BH4-Therapie auf die Gefäßfunktion und den Redoxstatus von Patienten mit einer koronaren Gefäßerkrankung aufzeigte (Cunnington et al. 2012).

Wie in dieser Arbeit dargestellt, weisen Patienten mit PKU ein erhöhtes Risiko auf, eine arterielle Hypertonie oder eine chronische Nierenerkrankung zu entwickeln. Zudem ist bei Patienten mit PKU erhöhter oxidativer Stress mit vermehrter Bildung freier Radikale beschrieben (Ribas et al. 2011). Die arterielle Hypertonie, die chronische Nierenerkrankung und der erhöhte oxidative Stress bei PKU-Patienten könnten auch durch einen relativen BH4-Mangel bedingt sein. In diesem Zusammenhang könnte BH4 eine zusätzliche Therapieoption bei PKU-Patienten mit arterieller Hypertonie oder chronischer Nierenerkrankung darstellen.

4. Zusammenfassung

Trotz Etablierung neuer Therapieoptionen ist die Phe-bilanzierte Diät weiterhin die Therapie der Wahl bei Patienten mit einer PKU, insbesondere bei Patienten mit einer klassischen PKU. Bekannte Langzeitprobleme bei Patienten mit PKU sind neurologische Defizite, Mikronährstoff-Defizite, Osteopenie und Adipositas. Wie in dieser Arbeit dargestellt, weisen PKU-Patienten unter der Phe-bilanzierter Diät zudem ein erhöhtes Risiko auf, eine arterielle Hypertonie sowie eine chronische Nierenerkrankung mit eingeschränkter Nierenfunktion, Proteinurie, Mikroalbuminurie und Hyperkalziurie zu entwickeln. Mögliche Ursachen der chronischen Nierenerkrankung bei PKU-Patienten sind die hohe Gesamteiweißzufuhr, die hohe Zufuhr von Mono-Aminosäuren über das Aminosäurengemisch, lokale Schädigungen durch die hohe Phe-Ausscheidung sowie erhöhter oxidativer Stress.

Die Therapie mit BH4, dem Kofaktor der PAH, stellt eine alternative Behandlungsoption für einige Patienten mit PKU dar. Das Ansprechen auf BH4 wird bestimmt durch den Genotyp und den daraus resultierenden Phänotyp. Populationen mit einer hohen Rate an Nullmutationen weisen eine geringere Rate an BH4-responsiven PKU-Patienten auf. Anhand unserer Daten konnten wir nachweisen, dass durch die Analyse bestimmter laborchemischer, molekulargenetischer und klinischer Daten bereits in der Neonatalperiode eine Einschätzung über eine potentielle Langzeit-BH4-Responsivität möglich ist.

Bei BH4-responsiven PKU-Patienten führt die Therapie mit BH4 zu einer Reduzierung der Phe-Blutwerte und zu einer Steigerung der individuellen Phe-Toleranz. Die Langzeittherapie mit BH4 sollte nach einem klar definierten Protokoll durchgeführt werden, insbesondere bezüglich der Steigerung der individuellen Phe-Toleranz und der BH4-Dosierung. Gleichwohl muss die Indikation zu einer BH4-Langzeittherapie kritisch gestellt werden. Vorwiegend Patienten mit einer milden PKU profitieren von der BH4-Therapie, während Patienten mit einem schweren PKU-Phänotyp zwar BH4-responsiv sein können, aber unter der Langzeittherapie mit BH4 meist nur eine geringe Steigerung ihrer Phe-Toleranz erreichen. Für eine BH4-Langzeittherapie ist eine mindestens 2,5-fache Steigerung der initialen Phe-Toleranz vorauszusetzen. Die Kosten einer Therapie mit BH4 liegen zwischen 1,5- bis 4-fach höher als die der Phe-bilanzierter Diät. Mögliche Nebenwirkungen der BH4-Langzeittherapie können gastrointestinale Probleme, Kopfschmerzen und Mikronährstoff-Defizite sein.

Dennoch ist die Bedeutung von BH4 in der Behandlung der PKU nicht zu unterschätzen. BH4 nimmt als Kofaktor der Nitritoxid-Synthase eine Schlüsselfunktion in der Regulation der vaskulären Homöostase ein, weshalb eine Depletion von BH4 in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Ein relativer BH4-Mangel

könnte somit bei PKU-Patienten einen Einfluss auf den erhöhten oxidativen Stress, die arterielle Hypertonie und die chronische Nierenerkrankung haben. In diesem Zusammenhang könnte BH4 eine zusätzliche Bedeutung in der Behandlung von PKU-Patienten einnehmen. Andere neue Therapieoptionen werden derzeit sowohl in klinischen Studien als auch in Tiermodellen untersucht, und sie könnten in Zukunft eine mögliche Alternative zu der Phe-bilanzierten Diät darstellen.

5. Literaturangaben aus dem freien Text

Acosta PB, Yannicelli S, Singh R, et al. Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J Am Diet Assoc.* 2003;103:1167-1173.

Acosta PB. Recommendations for protein and energy intakes by patients with phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:S121–S124.

Aguado C, Pérez B, García MJ, et al. BH4 responsiveness associated to a PKU mutation with decreased binding affinity for the cofactor. *Clin Chim Acta.* 2007;380:8-12.

Ahring KK. Large neutral amino acids in daily practice. *Inherit Metab Dis.* 2010;DOI: 10.1007/s10545-010-9069-7.

Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the Cardiac Nitric Oxide Synthases: Tetrahydrobiopterin Synthesis and Recycling. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9:200–210.

Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S3-S9.

BAnz. Bekanntmachung des Bundesministeriums für Gesundheit und soziale Sicherung. Kinder-Richtlinien. Nr. 60 (S. 4833) vom 31.03.2005

Bauman ML, Kemper TL. Morphologic and histoanatomic observations of the brain in untreated human phenylketonuria. *Acta Neuropathol.* 1982;58:55-63.

Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninurias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab.* 2002;77:304-313.

Bernstein AM, Treyzon L, Li Z. Are high-protein, vegetable based diets safe for kidney function? A review of the literature. *J Am Diet Assoc.* 2007;107:644-650.

Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet.* 1953;265:812-813.

Binek-Singer P, Johnson TC. The effects of chronic hyperphenylalaninaemia on mouse brain protein synthesis can be prevented by other amino acids. *Biochem J.* 1982;206:407-414.

Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M, et al. Optimizing the use of Sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2009;96:158-163.

Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, et al. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab.* 2010;99:109-115.

Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:12079-12084.

Böhles H, Hoffmann G, Kohlmüller D, Mayatepek E, Sewell A, Wagner L. Befunde des metabolischen Labors. Darstellung typischer Laborbefunde bei der Diagnostik angeborener Stoffwechselerkrankungen. 1999. SHS Ges. für Klinische Ernährung mbH, Heilbronn.

Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int*. 1996;49:1774-1777.

Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease. *N Engl J Med*. 1982;307:652-659.

Burgard P, Bremer HJ, Bührdel P, et al. Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr*. 1999;158:46-54.

Burlina AB, Bonafé L, Ferrari V, Suppiej A, Zacchello F, Burlina AP. Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J Inherit Metab Dis*. 2000;23:313-316.

Burnett J. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs*. 2007;10:805-13.

Burrage LC, McConnell J, Haesler R, et al. High prevalence of overweight and obesity in females with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2012;107:43-48.

Burton BK, Grange DK, Milanowski A, 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;30:700-707.

Butler IJ, O'Flynn ME, Seifert WE Jr, Howell RR. Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninemia. *J Pediatr*. 1981;98:729-733.

Choi TB, Pardridge WM. Phenylalanine transport at the human blood-brain barrier. Studies with isolated human brain capillaries. *J Biol Chem*. 1986;261:6536-6541.

Clayton BE, Jenkins P, Round JM. *Paediatric Chemical Pathology: Clinical Tests and Reference Ranges*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1980.

Cotugno G, Nicolò R, Cappelletti S, Goffredo BM, Dionisi Vici C, Di Ciommo V. Adherence to diet and quality of life in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr*. 2011;100:1144-1149.

Cunnington C, Van Assche T, Shirodaria C, et al. Systemic and vascular oxidation limits efficacy of oral tetrahydrobiopterin treatment in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2012;125:1356-1366.

Curtius HC, Niederwieser A, Viscontini M, et al. Atypical phenylketonuria due to tetrahydrobiopterin deficiency. Diagnosis and treatment with tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin and sepiapterin. *Clin Chim Acta*. 1979;93:251-262.

D-A-CH Empfehlung: Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung. 2000. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr: Umschau/Braus Verlag.

de Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab*. 2010;99 Suppl 1:S86-S89.

DGE Empfehlung: Deutsche Gesellschaft für Ernährung. 1985. Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr: Umschau Verlag.

DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry*. 1986;25:743-749.

Eisensmith RC, Goltsov AA, O'Neill CO, et al. Recurrence of the R408W mutation in the phenylalanine hydroxylase locus in Europeans. *Am J Hum Genet*. 1995;56:278-286.

Erlandsen H, Stevens RC. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria. *J Inher Metab Dis*. 2001;24:213-230.

Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 1999;68:103-125.

Fiege B, Bonafé L, Ballhausen D, et al. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. *Mol Genet Metab*. 2005;86 Suppl 1:S91-S95.

Følling A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1934;227:169-176.

Fouque D, Aparicio M. Eleven reasons to control the protein intake of patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3:383-392.

Gámez A, Sarkissian CN, Wang L, et al. Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Mol Ther*. 2005;11:986-989.

German Nutrition Society. New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab*. 2012;60:241-246.

Gropper SS, Gropper DM, Acosta PB. Plasma amino acid response to ingestion of L-amino acids and whole protein. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1993;16:143-150.

Guldborg P, Rey F, Zschocke J, et al. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. *Am J Hum Genet*. 1998;63:71-79.

Guthrie R, Susi A. A simple Phenylalanine method for detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963;32:338-343.

Güttler F, Guldborg KF. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene: genetic determinants for the phenotypic variability of hyperphenylalaninemia. *Acta Paediatr*. 1994;407 Suppl:46-56.

Halbesma N, Bakker SJ, Jansen DF et al. High protein intake associates with cardiovascular events but not with loss of renal function. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1797-1804.

Hartwig C, Gal A, Santer R, Ullrich K, Finckh U, Kreienkamp H-J. Elevated phenylalanine levels interfere with neurite outgrowth stimulated by the neuronal cell adhesion molecule L1 in vitro. *FEBS Letters*. 2006;580:3489-3492.

Hidalgo IJ, Borchardt RT. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1028:25-30.

Hoeks MP, den Heijer M, Janssen MC. Adult issues in phenylketonuria. *Neth J Med*. 2009;67:2-7.

Hughes JV, Johnson TC. Experimentally induced and natural recovery from the effects of phenylalanine on brain protein synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1978;517:473-485.

Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int*. 2001;59:1498-1509.

King AJ, Levey AS. Dietary protein and renal function. *J Am Soc Nephrol*. 1993;3:1723-1737.

Kure S, Hou DC, Ohura T, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr*. 1999;135:375-378.

Kure S, Sato K, Fujii K, et al. Wild-type phenylalanine hydroxylase activity is enhanced by tetrahydrobiopterin supplementation in vivo: an implication for therapeutic basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2004;83:150-156.

Leandro J, Leandro P, Flatmark T. Heterotetrameric forms of human phenylalanine hydroxylase: co-expression of wild-type and mutant forms in a bicistronic system. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:602-612.

Lee P, Treacy EP, Crombez E, et al. Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *Am J Med Genet.* 2008;146A:2851-2859.

Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH₄) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2007;370:504-510.

Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab.* 1999;67:308-316.

Lim K, van Calcar SC, Nelson KL, Gleason ST, Ney DM. Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU. *Mol Genet Metab.* 2007;92:176-178.

MacDonald A, Gokmen-Ozel H, van Rijn M, Burgard P. The reality of dietary compliance in the management of phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:665-670.

MacDonald A, Rocha JC, van Rijn M, Feillet F. Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S10-S18.

Machill G, Grimm U, Ahlbehrendt I, Bührdel P, Tittelbach-Helmrich W, Naumann A, Böhme HJ, Seidlitz G, Schneider T. Results of selective screening for inborn errors of metabolism in the former East Germany. *Eur J Pediatr.* 1994;153 Suppl 1:S14-S16.

MacLeod EL, Clayton MK, van Calcar SC, Ney DM. Breakfast with glycomacropeptide compared with amino acids suppresses plasma ghrelin levels in individuals with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;100:303-308.

Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, et al. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:153-158.

Mathias D, Bickel H. Follow-up study of 16 years neonatal screening for inborn errors of metabolism in West Germany. *Eur J Pediatr.* 1986;145:310-312.

McKean CM. The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res.* 1972;47:469-476.

McNeill E, Keith M, Channon KM. The role of tetrahydrobiopterin in inflammation and cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2012;108:832-839.

Mönch E, Herrmann ME, Brösicke H, Schöffner A, Keller M. Utilisation of amino acid mixtures in adolescents with phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:S115-S120.

Mönch E, Link R. Diagnostik und Therapie bei angeborenen Stoffwechselstörungen. SPS Verlagsgesellschaft, 2006, 2. Auflage.

Moyle JJ, Fox AM, Arthur M, Bynevelt M, Burnett JR. Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol Rev.* 2007;17:91-101.

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;33:649-658.

Muntau AC, Röschinger W, Habich M, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med.* 2002;347:2122-2132.

Nielsen JB, Nielsen KE, Güttler F. Tetrahydrobiopterin responsiveness after extended loading test of 12 Danish PKU patients with the Y414C mutation. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:9-16.

Pérez-Dueñas B, Valls-Solé J, Fernández-Alvarez E, et al. Characterization of tremor in phenylketonuric patients. *J Neurol.* 2005;252:1328-1334.

Pietz J, Kreis R, Rupp A, et al. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999;103:1169-1178.

Pitt D. The natural history of untreated phenylketonuria. *Med J Aust.* 1971;1:378-383.

Ponzzone A, Guardamagna O, Dianzani I, et al. Catalytic activity of tetrahydrobiopterin in dihydropteridine reductase deficiency and indications for treatment. *Pediatr Res.* 1993;33:125-128.

Porkert M, Sher S, Reddy U, et al. Tetrahydrobiopterin: a novel antihypertensive therapy. *J Hum Hypertens.* 2008;22:401-407.

Ribas GS, Sitta A, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31:653-662.

Sarkissian CN, Gámez A, Wang L, et al. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:20894-20899.

Schindeler S, Ghosh-Jerath S, Thompson S, et al. The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: an MRS and neuropsychological study. *Mol Genet Metab.* 2007;91:48-54.

Schumacher U, Lukacs Z, Kaltschmidt C, et al. High concentrations of phenylalanine stimulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for the pathophysiology of phenylketonuria. *Neurobiol Dis.* 2008;32:385-390.

Schwahn B, Mokov E, Scheidhauer K, Lettgen B, Schönau E. Decreased trabecular bone mineral density in patients with phenylketonuria measured by peripheral quantitative computed tomography. *Acta Paediatr.* 1998;7:61-63.

Scriver CR, Kaufman S. Phenylalanine hydroxylase deficiency in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, Childs B, Vogelstein B (Eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 2001. McGraw-Hill New York, pp. 1667-1724.

Singh RH, Quirk ME, Douglas TD, Brauchla MC. BH(4) therapy impacts the nutrition status and intake in children with phenylketonuria: 2-year follow-up. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:689-695.

Solverson P, Murali SG, Brinkman AS, et al. Glycomacropeptide, a low-phenylalanine protein isolated from cheese whey, supports growth and attenuates metabolic stress in the murine model of phenylketonuria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E885-895.

Staudigl M, Gersting SW, Danecka MK, et al. The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Hum Mol Genet.* 2011;20:2628-2641.

Stéphenne X, Debray FG, Smets F, et al. Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with Tetrabiopterin non-responsive phenylketonuria. *Cell Transplant.* 2012;21:2765-2770.

Thöny B. Long-term correction of murine phenylketonuria by viral gene transfer: liver versus muscle. *J Inherit Metab Dis.* 2010;DOI: 10.1007/s10545-010-9044-3.

Trefz FK, Scheible D, Frauendienst-Egger G. Long-term follow-up of patients with phenylketonuria receiving tetrahydrobiopterin treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2010;DOI: 10.1007/s10545-010-9058-x.

van Calcar SC, MacLeod EL, Gleason ST, et al. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1068-1077

- Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, et al. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab.* 2007;92:63-70.
- Walter JH, Lee PJ, Burgard P. Hyperphenylalaninaemia in: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH (Eds.). *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment.* 2006. Springer Verlag Heidelberg, pp:221-231.
- Walter JH, White FJ, Hall SK, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet.* 2002;360:55-57.
- Weglage J, Ullrich K, Pietsch M, Fünders B, Zass R, Koch HG. Untreated non-phenylketonuric-hyperphenylalaninaemia: intellectual and neurological outcome. *Eur J Pediatr.* 1996;155 Suppl 1:S26-28.
- Weigel C, Rauh M, Kiener C, Rascher W, Knerr I. Effects of various dietary amino acid preparations for phenylketonuric patients on the metabolic profiles along with postprandial insulin and ghrelin responses. *Ann Nutr Metab.* 2007;51:352-358.
- White JE, Kronmal RA, Acosta PB. Excess weight among children with phenylketonuria. *J Am Coll Nutr.* 1982;1:293-303.
- Zager RA, Johannes G, Tuttle SE, Sharma HM. Acute amino acid nephrotoxicity. *J Lab Clin Med.* 1983;101:130-140
- Zhao YY, Liu J, Cheng XL, Bai X, Lin RC. Urinary metabonomics study on biochemical changes in an experimental model of chronic renal failure by adenine based on UPLC Q-TOF/MS. *Clin Chim Acta.* 2012;413:642-649.
- Ziesch B, Weigel J, Thiele A, et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) in PKU: effect on dietary treatment, metabolic control, and quality of life. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35:983-992.
- Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum Genet.* 1997;100:189-194.
- Zurflüh MR, Fiori L, Fiege B, et al. Pharmacokinetics of orally administered tetrahydrobiopterin in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:725-731.

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen, die mich während meiner klinischen Arbeit und meiner Forschungsarbeit und damit auf dem Weg zu meiner Habilitation begleitet und unterstützt haben. Allen voran danke ich Herrn Dr. Jürgen Herwig, Herrn Dr. Adrian Sewell und Herrn Prof. Dr. Hansjosef Böhles aus der Universitätskinderklinik in Frankfurt, die mir als Erste den Stoffwechsel nahe gebracht haben und denen es gelang, meine Begeisterung für dieses Gebiet zu entfachen.

Aus der Kinderklinik der Charité Berlin danke ich Herrn Prof. Dr. Eberhard Mönch für die jahrelange enge Zusammenarbeit und die gemeinsame Betreuung vieler Patienten mit Phenylketonurie und anderen angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Herrn Prof. Dr. Gerhard Gaedicke danke ich für sein großes Vertrauen, das er stets in mich und in meine Arbeit gesetzt hat. Herrn Prof. Dr. Heiko Krude möchte ich für seine Ratschläge und seine Unterstützung danken.

Ich danke meinen beiden Doktorandinnen Sylvia Roloff und Jeanne-Marie Berger für ihre unermüdliche und sehr engagierte Arbeit sowohl in der Durchführung ihrer Promotionsarbeiten als auch in der Datenerhebung für die verschiedenen BH4-Studien.

Frau Dr. Barbara Vetter danke ich für ihre Unterstützung bei den molekulargenetischen Analysen der PKU-Patienten. Herrn Prof. Dr. Andreas E. Kulozik danke ich für die gemeinsame erfolgreiche Arbeit zu den PKU-Genotypen.

Herrn Prof. Dr. Uwe Querfeld danke ich für die sehr produktive und engagierte gemeinsame Arbeit zu den Nierenschädigungen bei Patienten mit PKU. Ebenso möchte ich Frau Dr. Jutta Gellermann für ihre Hilfe bei der Untersuchung der Nierenfunktion der PKU-Patienten danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Nenad Blau aus dem Kinderspital in Zürich, jetzt Universitätskinderklinik Heidelberg, sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Johan van Hove der University of Colorado in Aurora/USA danke ich für die sehr inspirierende Kooperation bei den Untersuchungen zur Glyzin-Enzephalopathie.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen aus unserem Stoffwechsel-Team, vor allem Frau Christine Gebauer, die unzählige Diätprotokolle unserer PKU Patienten berechnet hat.

Allen PKU-Patienten und deren Familien danke ich für die Teilnahme an den verschiedenen Studien und Untersuchungen.

Schlussendlich und von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und all meinen Freunden für ihr unendliches Verständnis, ihre dauerhafte Unterstützung und ihre nie endenden Ermutigungen.

Erklärung

§ a Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

04.02.2013

Dr. med. Julia B. Hennermann