

AUS DER KLINIK FÜR NEUROLOGIE
DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG
DIREKTOR: PROF. DR. W. H. OERTEL

**Mutationen im *PTS*-Gen
und mögliche Auswirkungen auf Funktion
und Struktur der
6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Friedrich-Alexander Preuße
aus Kiel

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 16.05.2002
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. R. Arnold

Referent: PD Dr. O. Bandmann

Coreferent: Prof. Dr. L. Flores de Jacobi

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Kapitel I : Einleitung | 1 |
| A. Historischer Überblick | 1 |
| B. Biochemische Grundlagen des BH₄-Stoffwechsels und der 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase | 4 |
| 1. Funktionelle Bedeutung von BH₄ | 4 |
| 1.1 Bedeutung von Tetrahydrobiopterin für den Phenylalanin-Metabolismus..... | 5 |
| 1.2 Das Phenylalanin-Hydroxylase-System..... | 8 |
| 2. Die Biosynthese von BH₄ | 9 |
| 3. Die 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase | 11 |
| 3.1 Allgemeine Aspekte | 11 |
| 3.2 Struktur der PTPS..... | 11 |
| 3.3 Struktur des <i>PTS</i> -Gens..... | 17 |
| C. Klinische und molekulare Grundlagen des PTPS-Mangels | 20 |
| 1. Hyperphenylalaninämie durch BH₄-Mangel | 20 |
| 1.1 Allgemeine Aspekte und die unterschiedlichen Enzymdefekte | 20 |
| 1.2 Klinik des PTPS-Mangels | 22 |
| 2. Diagnostik | 23 |
| 2.1 Phenylalaninmessung..... | 23 |
| 2.2 BH ₄ -Belastungstest..... | 24 |
| 2.3 Messung der Pterine..... | 25 |
| 2.4 Neurotransmittermetabolite..... | 27 |
| 2.5 Enzymaktivität..... | 27 |
| 2.6 Pränataldiagnostik | 28 |
| 2.7 Molekulargenetische Diagnostik | 29 |
| 3. Genetik des PTPS-Mangels | 29 |
| 4. Therapie | 33 |
| 5. Prognose | 35 |
| D. Ziele der Untersuchung | 36 |

| | |
|---|----|
| Kapitel II : Methodik | 37 |
| A. Angewandte Methoden | 37 |
| 1. Allgemeine Betrachtung | 37 |
| 2. DNA-Extraktion | 38 |
| 2.1 Aus peripheren Lymphozyten | 38 |
| 2.2 Aus Guthrie-Karten | 38 |
| 3. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) | 39 |
| 4. Enzymverdau zur Detektion von Mutationen | 40 |
| 5. Sequenzierung der PCR-Produkte | 41 |
| 6. Räumliche Darstellung der veränderten Proteine | 42 |
| B. Materialien und Protokolle | 43 |
| 1. DNA-Extraktion | 43 |
| 1.1 Materialien | 43 |
| 1.2 DNA-Extraktion aus Vollblut..... | 43 |
| 1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit..... | 44 |
| 1.4 DNA-Extraktion aus Guthrie-Karten..... | 44 |
| 2. Primersequenzen | 45 |
| 2.1 Primer für die Amplifikation der 6 <i>PTS</i> -Exons..... | 45 |
| 2.2 Die markierten Universalprimer für die <i>Cycle-Sequencing</i> -Reaktion | 45 |
| 2.3 Modifizierter Rückwärtsprimer für den Enzymverdau in Exon 2..... | 45 |
| 3. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) | 46 |
| 3.1 PCR-Reagenzien | 46 |
| 3.2 PCR Ansatz und Konditionen | 46 |
| 4. Enzymverdau | 48 |
| 4.1 Materialien | 48 |
| 4.2 Methode..... | 48 |
| 5. Agarose Gelelektrophorese der PCR-Produkte | 49 |
| 5.1 Materialien | 49 |
| 5.2 Methode..... | 49 |
| 6. Sequenzierung der DNA | 50 |
| 6.1 Materialien | 50 |
| 6.2 Cycle-Sequencing..... | 50 |
| 6.3 Herstellung des Polyacrylamid-Gels | 52 |
| 6.4 Sequenzierungs-Elektrophorese..... | 52 |
| C. Patientendaten | 54 |

| | |
|---|----|
| Kapitel III : Ergebnisse | 58 |
| A. Übersicht der gefundenen Mutationen | 58 |
| B. Sequenzen | 61 |
| R17_I18insR (Exon 1)..... | 61 |
| A22G (Exon 1) | 63 |
| R25Q (Exon 1)..... | 64 |
| E35G (Exon 2) | 65 |
| Poly-T-Segment..... | 67 |
| F40fsX56 (Exon 2)..... | 68 |
| IVS2+14t>c (Intron 2)..... | 70 |
| P87L (Exon 5)..... | 71 |
| Y99X (Exon 5)..... | 72 |
| A101V (Exon 5)..... | 73 |
| Y113C (Exon 6) | 74 |
| G125R (Exon 6)..... | 75 |
| D136G (Exon 6)..... | 76 |
| N138H (Exon 6) | 77 |
| | |
| Kapitel IV : Diskussion | 78 |
| A. Allgemeines | 78 |
| B. Mutationen | 81 |
| R17_I18insR (Exon 1 ; Pat. 03) | 81 |
| A22G (Exon 1 ; Pat 01)..... | 83 |
| R25Q (Exon 1 ; Pat. 08)..... | 85 |
| E35G (Exon 2 ; Pat. 02)..... | 88 |
| F40fsX56 (Exon 2 ; Pat. 9)..... | 89 |
| IVS2+14t>c (Intron 2 ; Pat. 08) | 90 |
| P87L (Exon 5 ; Pat. 04)..... | 90 |
| Y99X (Exon 5 ; Pat. 05 + 09) | 91 |
| A101V (Exon 5 ; Pat. 05) | 92 |
| Y113C (Exon 6 ; Pat. 04)..... | 93 |
| G125R (Exon 6 ; Pat. 07)..... | 94 |
| D136G (Exon 6 ; Pat. 3)..... | 96 |
| N138H (Exon 6 ; Pat. 6)..... | 98 |

| | |
|--|-----|
| C. Patienten | 100 |
| Patient 01 | 100 |
| Patient 02 | 101 |
| Patient 03 | 101 |
| Patient 04 | 102 |
| Patient 05 | 104 |
| Patient 06 | 105 |
| Patient 07 | 105 |
| Patient 08 | 106 |
| Patient 09 | 107 |
| D. Schlußbetrachtung | 108 |
| V. Zusammenfassung | 111 |
| VI. Literaturverzeichnis | 113 |
| Verzeichnis der akademischen Lehrer | 126 |
| Danksagung | 127 |

ABKÜRZUNGEN

| | | | |
|-----------------|---|---------------|---|
| 5HIA | 5-Hydroxyindolacetat | HPLC | <i>High-performance liquid chromatography</i> |
| AR | Aldose-Reduktase | | |
| AS | Aminosäure | IFN- γ | Interferon- γ |
| ARMS | <i>Amplification refractory mutation system</i> | kb | Kilobase |
| ATP | Adenosintriphosphat | mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| Bio | Biopterin | Neo | Neopterin |
| BH ₄ | Tetrahydrobiopterin | PAH | Phenylalanin-Hydroxylase |
| bp | Basenpaare | PCD | Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase |
| cDNA | komplementäre DNA | PCR | Polymerasekettenreaktion |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat | PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| DGGE | Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese | Phe | Phenylalanin |
| DHPR | Dihydropterin-Reduktase | PKU | Phenylketonurie |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | PTPS | 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat | RNA | Ribonukleinsäure |
| gDNA | genomische DNA | SR | Sepiapterin-Redukase |
| GTP | Guanosintriphosphat | TH | Tyrosin-Hydroxylase |
| GTPCH | GTP-Cyclohydrolase | TNF- α | Tumor-Nekrosefaktor- α |
| HVA | Homovanillinsäure | TPH | Tryptophan-Hydroxylase |
| HPA | Hyperphenylalaninämie | ZNS | Zentralnervensystem |

KAPITEL I : EINLEITUNG

A. Historischer Überblick

Die Erkrankung Phenylketonurie (PKU) bzw. Hyperphenylalaninämie (HPA) wurde erstmalig 1934 von dem norwegischen Biochemiker Asbjørn Følling (Følling 1994) beschrieben, der von der Mutter zweier geistig retardierter Kinder wegen deren eigentümlich riechenden Urins konsultiert wurde. Er fand heraus, daß sich der Urin nach Zugabe von Eisenchlorid olivgrün verfärbte. Die Untersuchung des Urins von 430 anderen mental retardierten Patienten ergab eine positive Reaktion bei acht weiteren Patienten.

Unter den insgesamt zehn betroffenen Patienten befanden sich vier Geschwisterpaare, was Følling zu der Annahme veranlaßte, daß es sich um eine erbliche Krankheit handeln mußte.

Die für die Farbreaktion des Urins verantwortliche Substanz wurde als Phenylpyruvat identifiziert, weshalb Følling der neu entdeckten Krankheit den Namen Imbecillitas Phenylpyrouvica gab (Følling 1934). Die von Penrose dann als Phenylketonurie (Penrose 1935; Penrose und Quastel 1937) bezeichnete Erkrankung wurde in zunehmendem Maße beobachtet. Man fand heraus, daß eine hohe Serum-Phenylalanin-Konzentration die Ursache für die Akkumulation des Phenylpyruvats im Urin ist (Følling und Closs 1938). 1947 zeigte Jervis, daß bei Patienten mit PKU eine Verabreichung von Phenylalanin nicht zu dem normalerweise zu beobachtenden Anstieg von Tyrosin führte. Das Enzym, welches diesen Reaktionsschritt katalysiert, ist die Phenylalaninhydroxylase (PAH). Jervis schloß, daß Funktionsstörungen der PAH für die Erkrankung verantwortlich sind (Jervis 1947).

1953 wurde PKU erstmalig durch eine phenylalaninarme Diät erfolgreich behandelt (Bickel et al. 1953; Bickel et al. 1954).

Die Möglichkeit der Therapie verlangte nach einer einfachen Methode, die Erkrankung schnell zu diagnostizieren, zumal eine Diät so früh wie möglich

nach der Geburt erfolgen sollte, um irreversible geistige Schäden zu vermeiden. Guthrie und Susie führten den sogenannten Guthrie-Test ein, der sich zum flächendeckenden Neugeborenen-Screening eignete und als Massenuntersuchung für alle Neugeborenen etabliert wurde (Guthrie und Susie 1963). Es ist inzwischen nachgewiesen, daß bei früher Diagnose und Behandlung eine normale intellektuelle Entwicklung zu erwarten ist (Williamson et al. 1981) und daß der erreichbare IQ eines Kindes im umgekehrten Verhältnis zum Alter steht, in dem die Diät begonnen wurde (Koch, Wenz 1987).

In seltenen Fällen schlug eine phenylalaninarme Diät allerdings als Therapie nicht an. Man bezeichnete diese Form der Phenylketonurie als „atypische“ oder „maligne“ PKU (Danks 1979; Danks 1987). Außerdem beobachtete man bei diesen Patienten zusätzliche neurologische Störungen wie Tremor oder tonisch-klonische Krämpfe.

Man stellte fest, daß hierfür ein Mangel des Coenzym Tetrahydrobiopterin (BH_4) verantwortlich war. BH_4 ist essentieller Cofaktor für PAH sowie andere wichtige Hydroxylasen, wie Tyrosinhydroxylase (TH) und Tryptophanhydroxylase (TPH) (für weitere biochemische Informationen siehe Kapitel I – B). 1969 wurden zwei Patienten von Tada beschrieben, bei denen die herkömmliche Therapie zu keiner Verbesserung führte (Tada et al. 1969). Die Erkrankung der Patienten mit milder Hyperphenylalaninämie wurde damals als eine „genetische Variante der Phenylketonurie“ beschrieben, jedoch später als ein Mangel der Dihydropteridin-Reduktase (DHPR) charakterisiert (Tada et al. 1980).

1974 beschrieb Smith in London drei Kinder mit „PKU“, die einen ungewöhnlichen Verlauf der Erkrankung aufwiesen (Smith, Lloyd 1974). Trotz frühzeitiger Diagnose und Behandlung mit phenylalanin armer Diät entwickelten diese Patienten eine progressive neurologische Erkrankung und starben. Unabhängig davon berichtete Bartholomé in Heidelberg von einem ähnlichen Fall „atypischer“ PKU, bei der die Diätbehandlung keinen Erfolg zeigte (Bartholomé 1974). Der atypische Verlauf, die hohe Toleranz für Phenylalanin und normale PAH-Aktivität im Lebergewebe des Patienten führten zu der Speku-

lation, daß das Syndrom eine neue Form der HPA sei, die durch einen Defekt im BH₄-Metabolismus ausgelöst würde. Smith schlußfolgerte, daß ein Defekt des BH₄-Metabolismus im Gehirn ebenso in einem gestörten Umsatz der Neurotransmitter L-Dopa, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin resultieren müsse (Smith 1974), da für deren Synthese die BH₄-abhängigen Hydroxylasen TH und TPH benötigt werden.

In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Fälle von BH₄-Mangel veröffentlicht (Smith et al. 1975; Bartholomé et al. 1977; Brewster et al. 1976; Butler et al. 1975; Danks et al. 1975; Danks et al. 1976; Kaufman et al. 1975; Rey et al. 1976).

Auf der Annahme basierend, Pterine könnten für die Behandlung nützlich sein, wurde vorgeschlagen, an BH₄-Mangel erkrankte Patienten mit reduzierten Pterinen zu behandeln (Smith et al. 1975). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß intravenös verabreichtes synthetisches BH₄ die Serum-Phe-Konzentration senkt und somit *in vivo* als Cofaktor der hepatischen Phenylalanin-Hydroxylase fungiert (Danks et al. 1976). Allerdings kann BH₄ die Blut-Hirn-Schranke nicht in ausreichender Menge überschreiten (Gal et al. 1976). Zur Behandlung der zentralnervösen Störung werden aus diesem Grund Vorläufersubstanzen von Neurotransmittern wie L-Dopa und 5-Hydroxytryptophan verabreicht (Danks et al. 1975; Bartholomé, Byrd 1975; Butler et al. 1981; Endres et al. 1982a; Endres et al. 1982b; Kaufman et al. 1982; McInnes et al. 1984; Niederwieser et al. 1982; Schaub et al. 1978).

Inzwischen sind über 400 Fälle von BH₄-Mangel weltweit bekannt, die alle durch einen Defekt der an der Synthese bzw. Regenerierung von BH₄ beteiligten Enzyme ausgelöst werden.

Von den am BH₄-Metabolismus beteiligten Enzymen weist die 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase (PTPS) mit knapp 60% am häufigsten einen Defekt auf (Blau et al. 1993). Ursächlich für die Fehlfunktion sind autosomal rezessive Mutationen im *PTS*-Gen (Thöny et al. 1994a; Oppliger et al. 1995a).

B. Biochemische Grundlagen des BH₄-Stoffwechsels und der 6-Pyrovoyl-Tetrahydropterin-Synthase

1. Funktionelle Bedeutung von BH₄

Tetrahydrobiopterin (BH₄) ist essentieller Cofaktor der *Phenylalanin-Hydroxylase* (PAH) sowie der *Tyrosin-3-Hydroxylase* und der *Tryptophan-5-Hydroxylase* (Nichol et al. 1985). Die beiden letztgenannten Enzyme sind Schlüsselenzyme in der Biosynthese biogener Amine (Scriver et al. 1994): Die *Tyrosin-3-Hydroxylase* katalysiert die Hydroxylierung von Tyrosin zu L-DOPA, die Vorläufersubstanz für Dopamin und Noradrenalin; die *Tryptophan-5-Hydroxylase* ist für die Hydroxylierung von Tryptophan zu 5-OH-Tryptophan, der Vorstufe von Serotonin, erforderlich (Kaufman, 1993) (Abb.1.1).

Aus diesem Grunde verursachen Defekte in der Synthese oder Regenerierung von BH₄ nicht nur eine Hyperphenylalaninämie, sondern auch einen Mangel der monoaminen Neurotransmitter, der klinisch zu den charakteristischen progressiven neurologischen Störungen führt (Scriver et al., 1995). Dies läßt sich diagnostisch vor allem auch durch die quantitative Bestimmung der Neurotransmitter und ihrer Abbauprodukte (HVA, 5HIA) nachweisen.

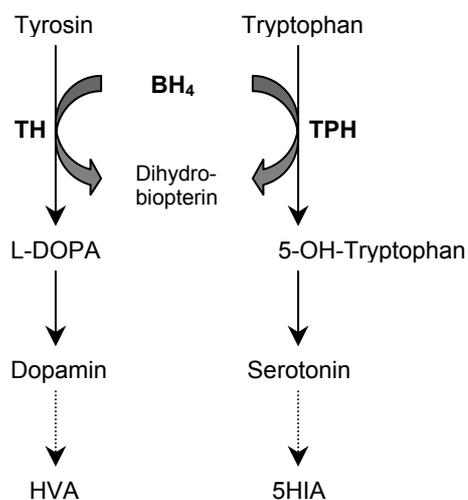


Abb. 1.1: BH₄ als Cofaktor bei der Hydroxylierung von Tyrosin und Tryptophan. TH: Tyrosin-Hydroxylase; TPH: Tryptophan-Hydroxylase, HVA: Homovanillinsäure, 5HIA: 5-Hydroxyindolacetat

Verfügung steht, welches vom Körper aus Phenylalanin synthetisiert werden kann. Während des gesamten Lebens liegt der physiologische Plasma-Phe-Spiegel unter 120 µmol/l.

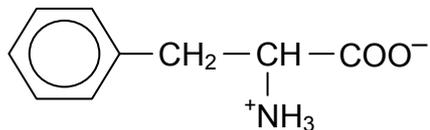


Abb. 1.3: Phenylalanin

Der erste Schritt des normalen Katabolismus von Phenylalanin ist dessen irreversible Hydroxylierung zu Tyrosin (Tyr). Die Hydroxylierung wird von dem Enzym *Phenylalanin-Hydroxylase* (PAH) katalysiert.

Hierzu ist als Reduktionsmittel das Coenzym *Tetrahydrobiopterin* (BH₄) erforderlich (Abb. 1.2+4+6). Dieser Schritt ist entscheidend für den Abbau von Phenylalanin, weil kein anderer Mechanismus für die Spaltung des aromatischen Ringes von Phenylalanin existiert (Milstien und Kaufman 1975). Wird dieser Schritt beispielsweise durch einen Defekt von PAH oder Mangel an BH₄ blockiert, wie es bei der Phenylketonurie der Fall ist, beschränkt sich die metabolische Transformation von Phenylalanin lediglich auf eine Decarboxylierung, Oxidation oder Transaminierung der Alanin-Seitenkette. Die Produkte, die weiterhin einen Phenyl-Ring enthalten, werden dann mit dem Harn ausgeschieden.

Der weitere Katabolismus von Tyrosin beinhaltet dessen Transaminierung zu p-Hydroxy-Phenylpyruvat, Hydroxylierung, Oxidierung und intramolekulare Umlagerung zu Homogentinsäure, Oxidation zu Maleylacetessigsäure und hydrolytische Spaltung in Fumarsäure und Acetoacetat.

Tyrosin ist eine Vorstufe der Thyroidhormone, der Neurotransmitter Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin sowie des Pigments Melanin.

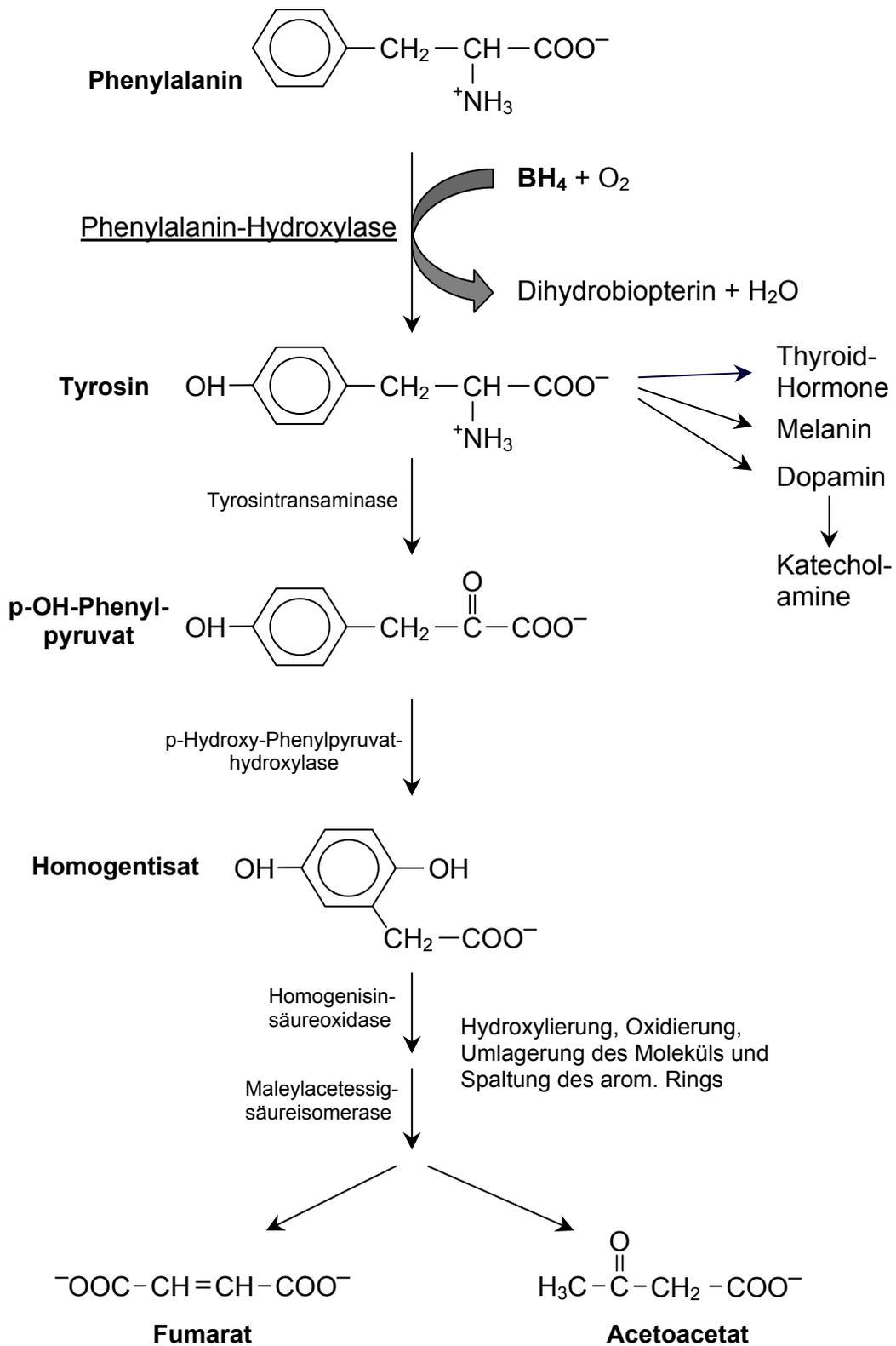


Abb. 1.4: Normaler Phenylalanin-Metabolismus
BH₄: Tetrahydrobiopterin

1.2 Das Phenylalanin-Hydroxylase-System

Das Phenylalanin-Hydroxylase-System ist sehr komplex und besteht aus mindestens vier Komponenten (Nichol et al. 1985; Curtius et al. 1985; Duch, Smith 1991; Kaufman 1993): Drei Enzyme und das Coenzym *Tetrahydrobiopterin* (BH₄) (Abb. 1.5). Die Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin wird von PAH als zentralem Enzym katalysiert. Dieses Enzym ist eine Monooxygenase bzw. eine mischfunktionelle Oxygenase, weil ein Atom des O₂ im Produkt und das andere im H₂O auftaucht.

Als Reduktionsmittel dient das Coenzym Tetrahydrobiopterin, welches zunächst ein Sauerstoffatom an Phenylalanin abgibt, wodurch es zu 4 α -hydroxy-Tetrahydrobiopterin umgewandelt wird (Lazarus et al. 1983). Das nächste Enzym, die Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase (PCD) spaltet H₂O ab, wodurch der Cofaktor in das chinoide Dihydrobiopterin übergeht (Köster et al. 1995; Rebrin et al. 1995; Thöny et al. 1995). Das letzte Enzym, die Dihydrobiopterin-Reduktase (DHPR) regeneriert das Coenzym NADH-abhängig wieder zu BH₄, das wiederum O₂ aufnehmen kann und erneut als Cofaktor zur Verfügung steht.

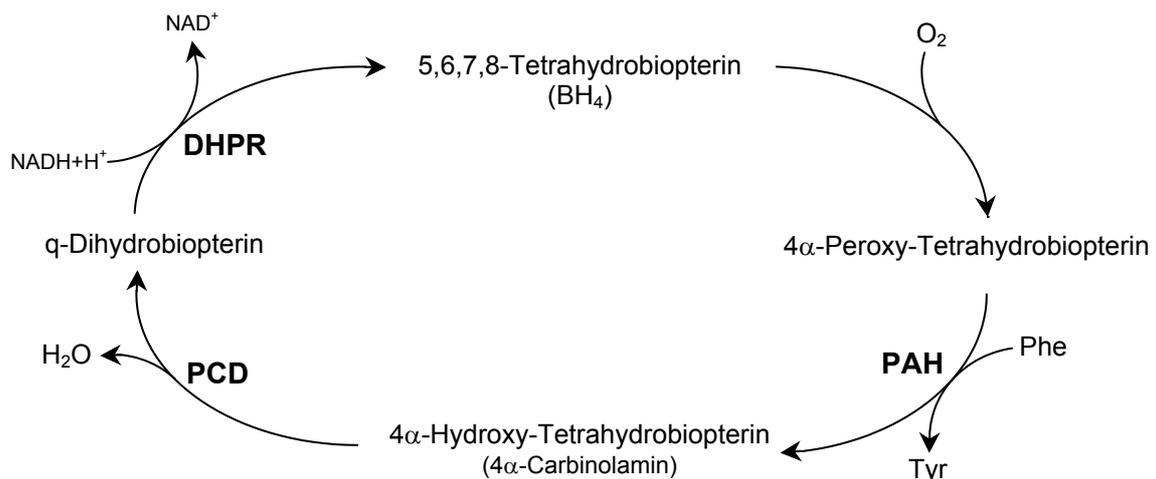


Abb. 1.5: Das Phenylalanin-Hydroxylase-System und Regenerierung von BH₄. PAH: Phenylalanin-Hydroxylase, PCD: Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase, DHPR: Dihydrobiopterin-Reduktase

2. Die Biosynthese von BH₄

Neben der Regenerierung von BH₄ ist die Biosynthese des Cofaktors aus Guanosintriphosphat (GTP) möglich (Abb. 1.6). Das erste Enzym, die *GTP-Cyclohydrolase* (GTPCH) ist das Schrittmacherenzym des Syntheseweges und katalysiert die Bildung von 7,8-Dihydroneopterin-triphosphat aus GTP in einem einzigen Reaktionsschritt (Blau, Niederweiser 1985). GTPCH unterliegt einer Feedback-Inhibition durch BH₄, über eine BH₄-abhängige Komplexbildung zwischen einem p35 Protein und GTPCH (Harada et al. 1993). Diese Inhibition wird wiederum spezifisch durch Phenylalanin gehemmt, was den hohen Biopterin- und Neopterin-Spiegel erklären könnte, der bei Patienten mit Phenylketonurie beobachtet wird. Desweiteren kann die Expression von GTPCH auf Transkriptionsebene in T-Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten durch Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stimuliert werden (Schoedon et al. 1987; Werner et al. 1993).

Im zweiten Schritt katalysiert das Enzym *6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase* (PTPS) die Konversion von 7,8-Dihydroneopterin-triphosphat zu 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin (Nichol et al. 1985; Takikawa et al. 1986). Dieser Umbauvorgang findet in Abhängigkeit von Magnesium und Zink statt und umfaßt die Eliminierung von Triphosphat und eine intramolekulare Redoxreaktion (Bürgisser et al. 1995).

Während GTPCH in hohem Maße von dem p35 Protein reguliert wird, ist bisher für PTPS kein derartiger Regulationsmechanismus bekannt. Jedoch sind bei PTPS posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierung notwendig, um in vivo die vollständige Aktivität zu erreichen (Oppliger et al. 1995b).

Sepiapterin-Reduktase (SR) ist eine für den dritten Schritt erforderliche NADPH-Oxidoreduktase, welche in zwei Stufen die Reduktion von 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin zu BH₄ katalysiert (Smith 1987).

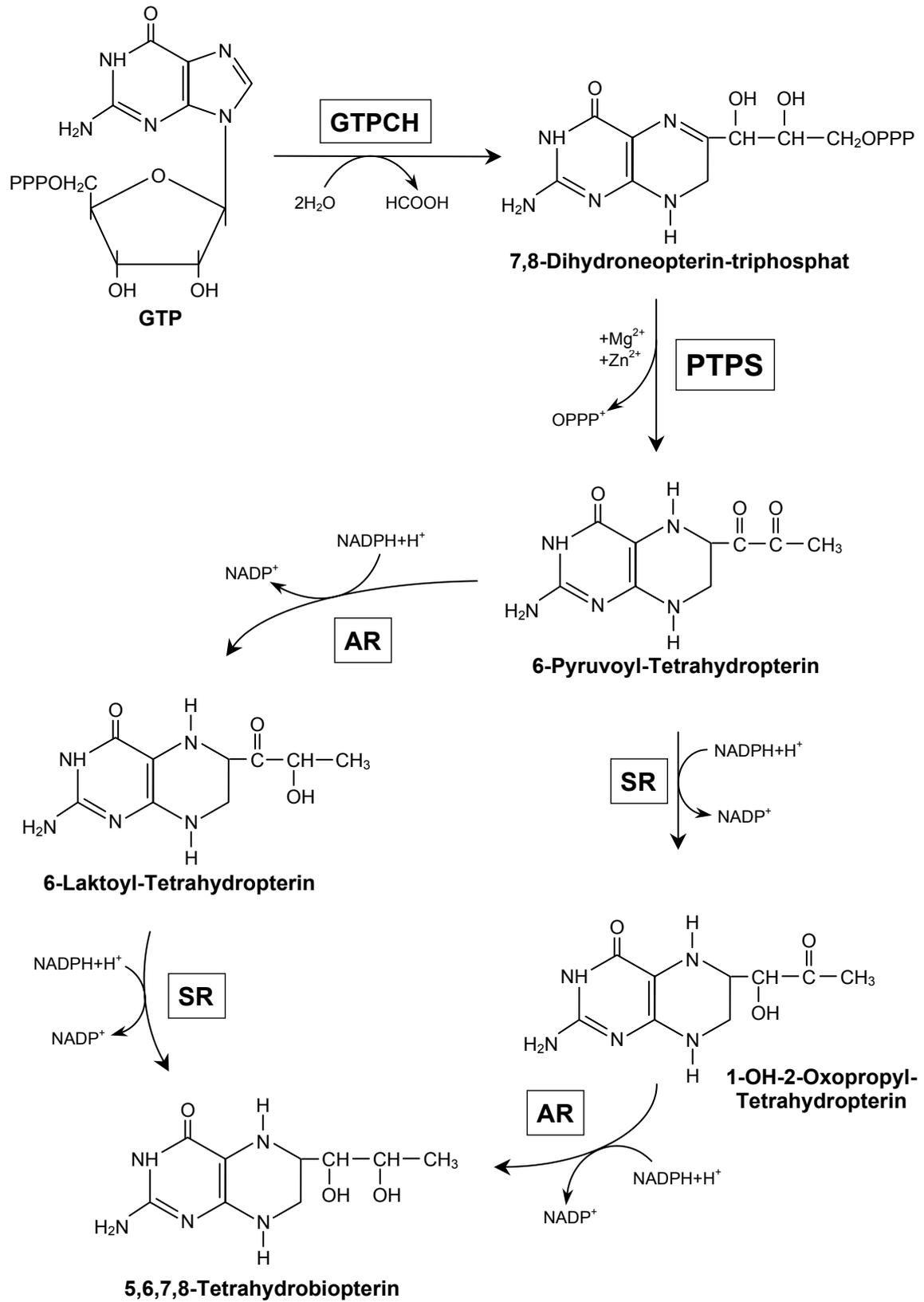


Abb. 1.6: De-novo-Synthese von BH₄. GTPCH: GTP-Cyclohydrolase, PTPS: 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase, SR: Sepiapterin-Reduktase, AR: Aldose-Reduktase

3. Die 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase

3.1 Allgemeine Aspekte

6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase (PTPS, EC 4.6.1.10) ist ein Zn²⁺-abhängiges Metalloprotein und für den zweiten Schritt der *de novo* Biosynthese von 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) aus GTP erforderlich (Duch, Smith 1991). Die Reaktion beinhaltet einen Umbau des Substrats durch einen basisch katalysierten, internen Redox-Transfer und Eliminierung von Triphosphat (Le Van et al. 1988).

Während sich die GTPCH-Aktivität durch Zytokine um bis zu 100-fach steigern läßt, wird die PTPS-Aktivität durch Zytokine nicht oder höchstens um den zwei- bis vierfachen Faktor verstärkt (Thöny et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung der humanen PTPS bei Ser-19 in COS-1-Zellen zu einer mindestens 3-fachen Aktivitätssteigerung führt (Scherer-Oppliger et al. 1999a). Die molekulare Ursache der Aktivitätssteigerung phosphorylierter PTPS gegenüber dem nicht modifizierten Protein ist jedoch noch nicht geklärt.

Durch anti-GTPCH und anti-PTPS Antikörper konnten bei Ratten unterschiedliche Expressionsmuster in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen mit genereller Colokalisation aromatischer Aminosäure-Hydroxylasen nachgewiesen werden (Dassesse et al. 1997). Humane Makrophagen zeigen fast keine PTPS-Aktivität, und in humanen Lymphozyten ist die Aktivität gering (Schoedon et al. 1987). Im Gegensatz dazu weisen unreife Erythrozyten, einschließlich Retikulozyten, eine höhere PTPS-Aktivität als differenzierte Erythrozyten auf, welche wiederum keine GTPCH-Aktivität besitzen (Shintaku et al. 1988).

3.2 Struktur der PTPS

Neuere Untersuchungen sowohl des humanen als auch des tierischen Enzyms (Ratte) führten zu einem besseren Verständnis seiner Funktion und erbrachten detaillierte Informationen über die Struktur auf molekularer Ebene (Bürgisser et al. 1994; Nar et al. 1994; Bürgisser et al. 1995).

Die Säugetier-PTPS ist ein Homooligomer aus 6 identischen 16 kd Untereinheiten (Bürgisser et al. 1994) und benötigt die beiden Metalle Zn²⁺ und Mg²⁺ für ihre Aktivität, wobei Zn²⁺ einen essentiellen Bestandteil des jeweiligen aktiven Zentrums ausmacht. Kristallstrukturanalysen von Ratten-PTPS bestätigen die vermutete homohexameriche Struktur des Enzyms und zeigen weiterhin, daß PTPS aus zwei Trimeren gebildet wird und in seiner Gesamtheit einem Durchmesser und einer Höhe von 60 Å aufweist (Oppliger et al. 1995b). Die folgenden Angaben zur Lokalisation der Aminosäuren beziehen sich auf das Tierische Enzym (Ratte), welches dem humanen in seiner Aminosäuresequenz sehr ähnlich ist (82% Sequenzidentität). Die Kristallisation des humanen Enzyms ist bisher noch nicht gelungen, weshalb auch noch kein humanes Strukturmodell verfügbar ist.

Monomerstruktur: Eine Untereinheit besteht aus einer einzigen kompakten Domäne und ist in eine $\alpha + \beta$ Struktur gefaltet, die aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt besteht (Aminosäuren 10-23, 48-61, 128-132, 137-141), auf dem einseitig ein Paar antiparalleler α -Helices aufgelagert ist (AS 72-88 und 106-120). Die beiden α -Helices sind zwischen den β -Strängen 2 und 3 inseriert und ihrerseits durch ein Segment verbunden, welches ein Tripeptid (89-91) mit β -Strang-Konformation beinhaltet. Dieses hat durch Wasserstoffbrücken Beziehung zu den Aminosäuren 20-24 von β -Strang 1 und erweitert auf diese Weise die komplette β -Faltblattstruktur.

Zwischen den Strängen β -1 und β -2 befindet sich ein Fragment mit einer Länge von 24 Aminosäuren, welches seinerseits ein kurzes, zweifach gewickeltes α -helikales Segment (Aminosäurereste 32-39) beinhaltet, das unterhalb der beiden größeren Helices auf der gleichen Seite des β -Faltblattes liegt (Abb. 1.7).

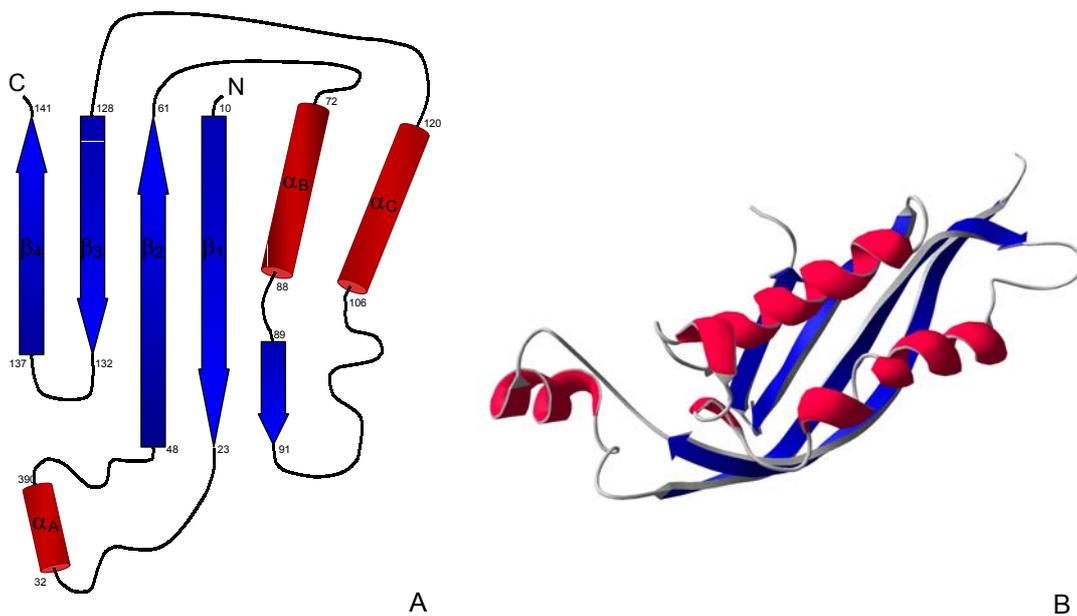


Abb. 1.7: Schematische Darstellung (A) der Sekundärstruktur des 6-PTPS Monomers mit Nummerierung der β-Stränge und α-Helices und (B) der Tertiärstruktur (Peptidrückrad in Band-Darstellung) des Monomers. Die Sekundärstruktur repräsentiert mit ihrer β_αβ_αβ-Einheit in der beschriebenen dreidimensionalen Anordnung ein neuartiges Strukturmotiv (Nar et al. 1994).

Die gesamte Domäne hat eine ellipsoide Form mit den Abmessungen 60 Å x 24 Å x 18 Å (Auerbach; Nar 1997). Topologisch gehört sie zu einer Gruppe von Strukturmotiven, die dadurch charakterisiert wird, daß eine Lage von β-Strängen einer Lage α-Helices angelagert ist, welche beide einen hydrophoben Kern einschließen (Orengo; Thornton 1993).

Trimerstruktur: Drei Untereinheiten stehen wiederum durch eine dreigefaltete molekulare Symmetrieachse in Verbindung und sind durch Wasserstoffbrücken zwischen den N- und C-terminalen β-Strängen der benachbarten Domänen zu einem Trimer zusammengesetzt, wodurch eine ungewöhnliche zwölfsträngige antiparallele β-Faßstruktur entsteht, die von einem Ring α-Helices umgeben ist (Abb. 1.8).

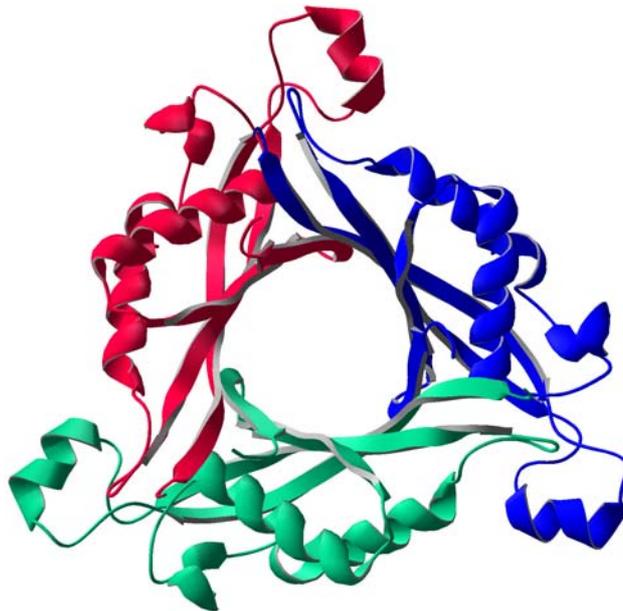


Abb. 1.8: PTPS-Trimer mit Blickrichtung entlang der dreigefalteten Symmetrieachse. Die drei viersträngigen β -Faltblätter der Untereinheiten, welche farblich voneinander abgehoben sind, lagern sich zu einem 12-strängigen antiparallelen β -Faß zusammen, welches von einer Lage α -Helices umgeben ist.

Das Trimer, welches eine diskoide Form aufweist, besitzt einen Durchmesser von 60 Å und eine Höhe von 30 Å. Die gebildete Faßstruktur hat eine leicht konische Form mit einer engeren Öffnung auf der Seite, an der die Monomerenenden lokalisiert sind und schließt eine hydrophile Pore von 6-12 Å Durchmesser ein, in welcher hauptsächlich basische und aromatische Aminosäuren liegen.

Hexamerstruktur: Beide Trimere stehen über eine fast perfekte lokale zweigefaltete Symmetrieachse, welche sich senkrecht zu der kristallographischen Triade befindet, zueinander in Beziehung und bilden durch eine „Kopf an Kopf“-Aneinanderlagerung den aktiven Enzymkomplex (Bürgisser et al. 1994; Nar et al. 1994)(Abb. 1.9).

Die Kontaktregion beider Hälften wird durch den horizontalen Teil der β -Faltblätter zweier Monomere gebildet (Reste 20-24, 48-51, 89-91). Die β -Stränge zweier Untereinheiten laufen dabei fast senkrecht zueinander und sind weniger als 4 Å voneinander entfernt (Nar et al. 1994; Auerbach, Nar 1997).

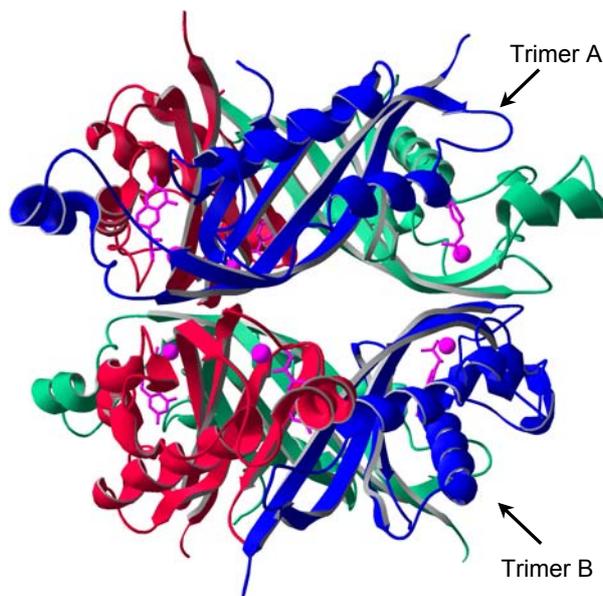


Abb. 1.9: Die Hexamerstruktur der PTPS mit Blickrichtung senkrecht zur β -Faßstruktur Das aktive Enzym ist ein Dimer aus Trimeren mit 3D-Symmetrie. Die beiden Trimeren (A+B) sind dabei „Kopf an Kopf“-artig aneinandergelagert. Die Monomere jeden Trimers sind in unterschiedlichen Farben dargestellt; die 7,8-Dihydroneopterin Substrate und das Zn²⁺-Ion sind rosa gekennzeichnet.

Die hexamerische Anordnung wird durch heterologe rotationssymmetrische Wasserstoffbrücken zwischen den Untereinheiten A und B stabilisiert.

Die Gesamtabmessungen des PTPS-Hexamers betragen 60 Å x 60 Å x 60 Å. Als Konsequenz aus der konischen Form des β -Fasses beider Trimere schließt das Hexamer einen großen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum mit den Abmessungen 20 Å x 20 Å x 15 Å ein, welcher nicht nur zu den Faßenden geöffnet ist, sondern auch äquatorial Verbindung zur Umgebung des Hexamers hat.

Ähnlich wie das PTPS-Hexamer bildet die GTPCH in der Quartärstruktur (Decamer mit D₅-Symmetrie) eine zentrale hydrophile Pore aus. Beide Poren liegen wahrscheinlich während der BH₄-Synthese aneinandergelagert und dienen so der direkten Weiterleitung des Dihydroneopterin-triphosphats (Nar et al. 1994). Der positiv geladene „Tunnel“ beider Enzyme würde auf diese Weise die protonierte Form des Substrats stabilisieren, da die Halbwertszeit der instabilen Zwischenstufe in Pufferlösung nur sehr kurz ist (Milstien, Kaufman 1985).

Das aktive Zentrum: Das Homohexamer beinhaltet sechs katalytische Regionen, welche am Berührungspunkt der beiden Trimere (A+B) lokalisiert sind. Drei Untereinheiten sind jeweils an einer katalytischen Region beteiligt, welche wiederum von zwei Untereinheiten des einen Trimers (A und A') und einer Untereinheit des anderen Trimers (B) gebildet wird. Jede katalytische Region besitzt eine Zn²⁺-Bindungsstelle, die im Zentrum einer 12 Å tiefen Vertiefung liegt. Das Zn²⁺-Ion wird vorübergehend von N_ε-Atomen der drei Histidinreste His^{A23}, His^{A48} und His^{A50} gebunden. Als vierter Ligand bindet an das Zn²⁺-Ion ein Wassermolekül, welches im Komplex durch die C1' und C2' Hydroxylgruppen der Dihydroneopterin-Seitenkette verdrängt wird. Dabei entsteht eine pentavalente Koordination die für katalytische Zn²⁺-Ionen sehr typisch ist (Ploom et al. 1999).

Weitere Liganden sind nicht vorhanden, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß das Substrat nur während der Katalyse von den freien Bindungsstellen gebunden wird (Auerbach, Nar 1997).

Am Boden der Vertiefung befindet sich außerdem ein durch die Aminosäurereste Thr^{A105}, Thr^{A106} und Glu^{A107} gebildetes Strukturmotiv, welches der Purin-Akzeptorstelle in G-Proteinen (Bourne et al. 1991) und der Pterin bindenden Stelle der GTPCH (Nar et al. 1995), Sepiapterin-Reduktase (Auerbach et al. 1997) und der 7,8-Dihydroneopterin-Aldolase (Henning et al. 1998) ähnelt.

Wenn Dihydroneopterin-triphosphat in der entsprechenden Weise in dieser Vertiefung plaziert wird, flankiert sein aromatisches Ringsystem zusätzlich die apolaren Aminosäurereste verschiedener Domänen (Leu^{A25}, Phe^{A39}, Met^{A68}, Met^{A70} und Leu^{A72}).

Der Boden dieser Pterin bindenden Tasche besitzt ein stark negatives elektrostatisches Potential, welches die Bindung des Dihydroneopterin, das bei physiologischem pH protoniert vorliegt, noch verstärkt (Ploom et al. 1999).

Die Substrathälfte, die durch das Enzym konvertiert wird, lagert sich in unmittelbarer Nähe der Zn²⁺-bindenden Region und der Aminosäuren Glu^{A133}, Cys^{A42}, Asp^{B88} und His^{B89} an. Die drei letztgenannten Aminosäuren formieren einen neuartigen Typ einer katalytische Triade, die von verschiedenen Untereinheiten gebildet wird (Bürgisser et al. 1995). Das nukleophile Cystein

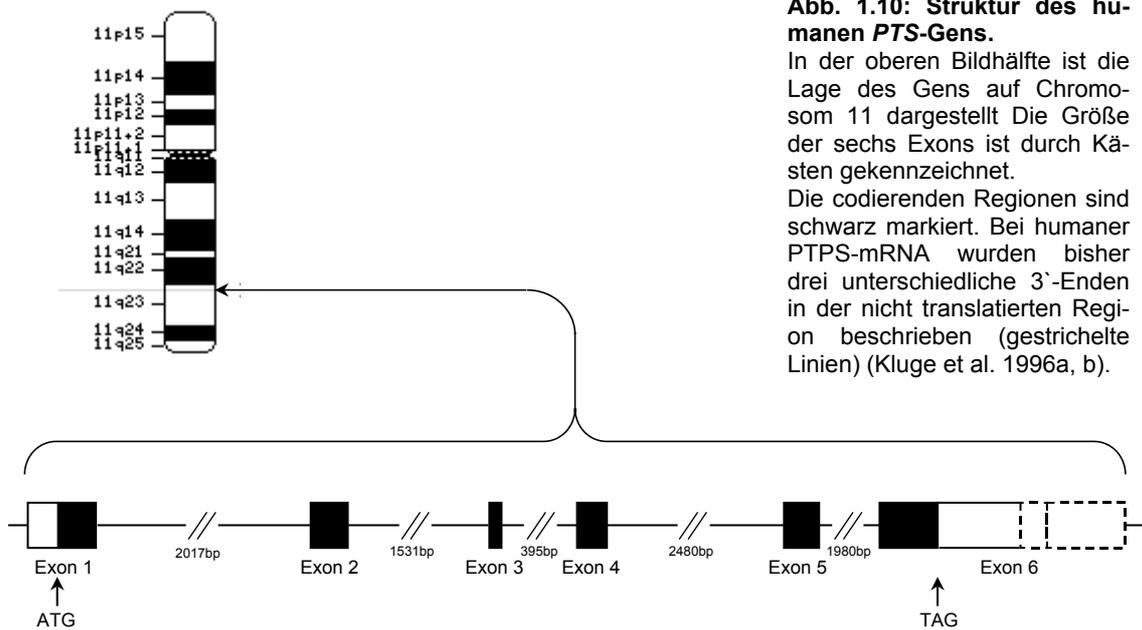
wird dabei durch die beiden anderen Aminosäurereste zur Protonenaufnahme aus der Substratseitenkette aktiviert und spielt somit eine zentrale Rolle im aktiven Zentrum (Ploom et al. 1999).

Die sechs katalytischen Regionen des Enzyms befinden sich nahe der äquatorialen Öffnungen zu dem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum des Hexamers. Der Abstand von einer Metallbindungsstelle des Monomers A beträgt 16 Å zu der entsprechenden Bindungsstelle des Monomers B.

Obwohl die Vertiefungen mit den katalytischen Regionen separiert voneinander vorliegen, sind sie doch durch Wasserstoffbrücken zwischen der Asn⁵¹-Seitenkette einer Untereinheit und der His⁵⁰-Seitenkette einer anderen Untereinheit untereinander verbunden (Nar et al. 1994).

3.3 Struktur des *PTS*-Gens

Das menschliche *PTS*-Gen (Abb. 1.10+11), welches für das Monomer des PTPS-Enzyms codiert, liegt auf dem Chromosom 11q22.3-q23.3, besteht aus sechs Exons mit jeweils unterschiedlicher Länge und umfaßt etwa 8kB (*accession number* der *GenBank*: L76259) (Thöny et al. 1994b; Kluge et al. 1996a). Alle Exon/Intron-Grenzen stimmen mit der GT/AG-Regel (Shapiro, Senapathy 1987) überein. Das erste Exon beginnt mit dem Triplet ATG (Startcodon) und Exon 6 endet mit dem Stopcodon TAG (Abb.1.11). Die bei normalem Spleißen (Entfernung der Introns) des Primär-Transkripts (hnRNA) entstehende mRNA codiert für ein 145 AS langes Polypeptid (PTPS-Monomer), welches nach Zusammenschluß mit fünf weiteren Monomeren zu einem Homohexamer das aktive Enzym bildet (Bürgisser et al. 1994; Nar et al. 1994). Entsprechende cDNAs konnten aus allen untersuchten Zelltypen oder Zelllinien, einschließlich neuronalen Zellen, dargestellt werden (Kluge et al.1996b).



Gelegentlich tritt eine kleine Deletion auf (c.164-168del5bp), die in normalen Fibroblasten, Hapatom-Zelllinien, und neuronalen Zellen beobachtet wurde und ein Überspringen des Exons 3 verursacht (Hsiao et al. 1996; Kluge et al. 1996b). Bemerkenswerterweise ist diese Deletion in dem menschlichen Retropseudogen *PTS-PI* „konserviert“, welches 74% Ähnlichkeit mit dem 3'-Ende der *PTS*-cDNA besitzt und auf dem Chromosom 9p12-p13 lokalisiert ist (Kluge et al. 1996a). Die 23 bp lange Deletion in Exon 3 führt zu einer Verschiebung des Leserasters und dem vorzeitigen Translationsabbruch. Ein in einer solchen Weise stark verkürztes *PTS* Peptid-Fragment ist *in vivo* völlig inaktiv, wenn es exprimiert wurde (Oppliger et al. 1995b). Ob diese „Spleiß-Variante“ in irgendeiner Weise eine regulatorische Funktion besitzt, ist zur Zeit noch nicht bekannt. Bisher ist die Lage der Promotor-Region und des Transkriptions-Starts im humanen *PTS*-Gen nicht geklärt (Thöny et al. 2000).

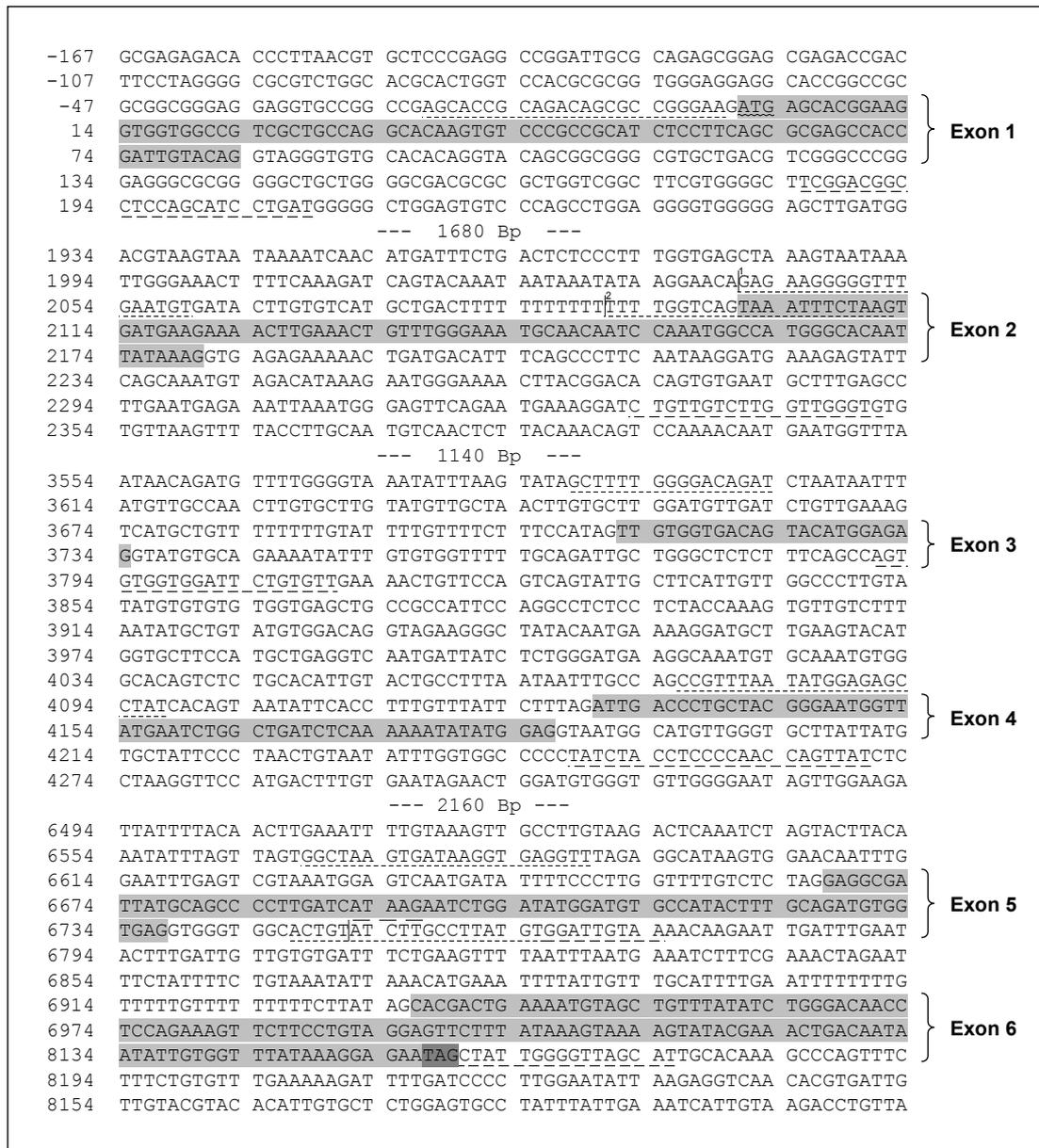


Abb. 1.11: Darstellung der genomischen Sequenz des humanen *PTS*-Gens. Die Numerierung der Basen beginnt mit dem Startcodon (+1). Die sechs Exons sind grau unterlegt, das Startcodon mit Wellenlinie unterstrichen und das Stopcodon dunkelgrau gekennzeichnet. Die Anlagerungssequenzen der verwendeten Primer sind unterstrichen (Vorwärtsprimer: punktiert; Rückwärtsprimer: gestrichelt). Für Exon 2 wurden zwei unterschiedliche Vorwärtsprimer (1+2) verwendet (s. Methodik). Das vollständige Gen umfaßt 8984 Basenpaare (*accession number* der *GenBank*: L76259).

C. Klinische und molekulare Grundlagen des PTPS-Mangels

1. Hyperphenylalaninämie durch BH₄-Mangel

1.1 Allgemeine Aspekte und die unterschiedlichen Enzymdefekte

Die genetisch bedingte Hyperphenylalaninämie (HPA) ist die häufigste Störung des Aminosäurestoffwechsels (Inzidenz in Deutschland ca.1:6600) und kann sowohl durch einen Defekt der *Phenylalanin-Hydroxylase* (PAH)(McKusick, 1994; Scriver et al. 1995) als auch eine Inaktivität oder Mangel des obligatorischen Cofaktors *Tetrahydrobiopterin* (BH₄) ausgelöst werden. Letzteres findet sich bei etwa 2% aller Patienten mit HPA (Blau et al. 1996a). Ein BH₄-Mangel manifestiert sich in einer Hyperphenylalaninämie, welche nicht auf eine phenylalaninarme Diät anspricht. Klinisch werden zwei unterschiedlichen Formen unterschieden (Blau et al. 1996a). Die häufigere Variante ist der schwere bzw. *zentrale* Typ, der mit verminderter Produktion der monoaminen Neurotransmitter einhergeht, was anhand der Verringerung der Katecholamine und Serotonin sowie ihrer Abbauprodukte Homovanillinsäure und 5-Hydroxyindolacetat im Liquor meßbar ist. Eine seltene Variante ist die partielle bzw. *periphere* Form mit verminderter BH₄-Biosynthese, jedoch normalen Neurotransmittermetaboliten im Liquor.

Ein BH₄-Mangel wird durch Fehlen oder einen Defekt der an seiner Biosynthese und Regenerierung beteiligten Enzyme (Abb.1.5 und 1.6) hervorgerufen. Am weitesten verbreitet ist unter diesen die Einschränkung der PTPS-Aktivität (Blau et al. 1993; McKusick, 1994), die zu einer sehr heterogenen Variante der Erkrankung mit (i), schwerer bzw. *zentraler* (ii) milder bzw. *peripherer* (atypisch) oder (iii) *transienter* Form führen kann (Dhondt, 1984; Blau et al. 1993). Ursächlich hierfür sind Mutationen im *PTS*-Gen, welche autosomal rezessiv vererbt werden. Die molekulare Grundlage für die große Variabilität des Phänotyps ist zur Zeit noch unklar (Thöny und Blau 1997).

Die schwere bzw. *zentrale* Form ist ähnlich wie bei GTPCH-Mangel durch einen Neurotransmitterdefizit im Liquor gekennzeichnet, wohingegen bei der *peripheren* Form normale Konzentrationen der Neurotransmittermetaboliten gemessen werden.

Bei einem Mangel an GTPCH, welcher nur sehr selten beobachtet wird (ca. 4% aller Patienten mit BH₄-Mangel), liegen die gemessenen Konzentrationen von Neopterin, Biopterin und der Neurotransmittermetaboliten deutlich unter den Normwerten. Autosomal dominante Mutationen im *GCH1*-Gen, welches für GTPCH codiert, sind oftmals Ursache der *Dopa-responsiven Dystonie* (DRD) (Ichinose et al. 1994; Segawa, Nomura 1995), jedoch nur in 40-50% der Fälle (Furukawa, Kish 1999).

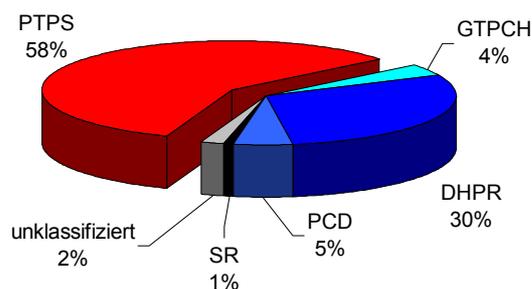


Abb. 1.12: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Enzymdefekte bei Patienten mit BH₄-Mangel. PCD: Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase; DHPR: Dihydrobiopterin-Reduktase; SR: Sepiapterin-Reduktase; die Daten stammen von weltweit insgesamt 435 Patienten die inzwischen in die internationale BIODDEF-Databse aufgenommen wurden (Stand Sep. 2001).

Bei Störungen der Dihydrobiopterin-Reduktase (DHPR), die zweithäufigste Ursache für BH₄-Mangel, sind nur einige Fälle der atypisch milden Form bekannt.

Ein Mangel an PCD (Pterin-4 α -Carbinolamin-Dehydratase) ist ähnlich wie ein GTPCH-Mangel sehr selten und zeigt sich bei Neugeborenen mit unterschiedlich erhöhten Phe-Konzentrationen, welche vorübergehend Werte bis zu 2200 $\mu\text{mol/l}$ erreichen können.

Ein Defekt der Sepiapterin-Reduktase wurde bisher nur in drei Fällen nachgewiesen und ist mit einem Mangel der monoaminigen Neurotransmitter und progressiver psychomotorischer Retardierung verbunden. Es zeigen sich im Urin jedoch normale Pterinwerte. Weiterhin wird bei diesen Patienten keine Hyperphenylalaninämie beobachtet, was sich dadurch erklären ließe, daß die Sepiapterin-Reduktase in peripheren Geweben durch Aldose-Reduktase (AR), Carbonyl-Reduktase (CR) und Dihydrofolat-Reduktase ersetzt werden könnte (Bonafé et al. 2001).

1.2 Klinik des PTPS-Mangels

Schwere zentrale Form: Der klinische Verlauf der Krankheit ist unbehandelt bei Patienten mit schwerer (typischer) Form des PTPS-, DHPR- und GTPCH-Mangels sehr ähnlich (Dhondt 1984). Die Symptome können sich bereits während der ersten Lebenswochen manifestieren, werden jedoch meist erst etwa im vierten Lebensmonat beobachtet (Blau et al. 1996a). In der Neugeborenenphase fallen allerdings hin und wieder ungewöhnliche Verhaltensweisen wie geringe Neigung zum Nuckeln, verminderte Spontanbewegungen oder Schlaffheit auf (Dhondt 1993).

Die gemeinsamen Symptome sind progressive geistige und physische Retardierung und trotz phenylalaninreicher Diät, gekennzeichnet durch epileptische Anfälle (Grand Mal, myoklonische Attacken), Störungen von Tonus und Haltung, von ausgeprägter Hypotonie bis hin zu Opisthotonus und Spastizität, Somnolenz, Bewegungsanomalien sowie infektionslose wiederkehrende Hyperthermien, Hypersalivation und Schluckschwierigkeiten. Schwankungen der Wachsamkeit und der neurologischen Symptome im Tagesverlauf werden ebenfalls beschrieben. Eine Mikrozephalie wird regelmäßig bei DHPR- (33%) und PTPS-Mangel (52%) beobachtet, wohingegen diesbezüglich kaum Informationen über Patienten mit GTPCH-Defekten vorliegen.

Häufig ist die Erkrankung durch eine parkinsonähnliche Symptomatik gekennzeichnet (Dudešek et al. 2001), was auf einen Mangel von Dopamin in den Basalganglien hinweist (Allen et al. 1990).

Nur bei wenigen Patienten mit PTPS-Mangel werden Dystonien beobachtet (Tanaka et al. 1987; Fink et al. 1988). Symptome wie bei Dopa-responsiven Dystonien (DRD; Segawa-Erkrankung), die man lange nur bei Patienten mit GTPCH-Mangel beobachtete (Ichinose et al. 1994; Ichinose et al. 1995; Blau et al. 1995), wurden jedoch bei einem erwachsenen Patienten mit PTPS-Mangel beschrieben, der eine generalisierte Dystonie mit tageszeitlichen Schwankungen der Symptome zeigte (Hanihara et al. 1997).

Milde periphere Form: Die milde (atypische) Form der Erkrankung ist recht selten und wird nur bei etwa 20% der Patienten mit PTPS-Mangel beobachtet. Die periphere Form ist durch normale Neurotransmitterspiegel im Liquor und moderate oder transiente Hyperphenylalaninämie gekennzeichnet (Niederwieser et al. 1987). Eine neurologische Symptomatik wird bei diesen Patienten in der Regel nicht beobachtet.

In einigen Fällen von PTPS-Mangel wurden jedoch neonatale Hypotonien oder akute jedoch transiente Verhaltensanomalien, neurovegetative Zeichen und Schlafschwierigkeiten beschrieben (Blau et al. 1996a).

2. Diagnostik

2.1 Phenylalaninmessung

Alle Neugeborenen unterliegen routinemäßig etwa am 4.-5. Lebenstag zum Nachweis einer Phenylalaninerhöhung im Blut einem Neonatalscreening, bei welchem die Plasma-Phenylalaninwerte mittels eines semiquantitativen Testes, dem sogenannten Guthrie-Test, gemessen werden (Guthrie und Susie 1963). Ein positives Testergebnis wird in der Regel bei Phenylalaninkonzentrationen $>240\mu\text{mol/l}$ erreicht. An den meisten Zentren ist die Methodik gegenwärtig schon auf Tandem-Massenspektroskopie umgestellt worden, wodurch zusätzliche Störungen des Intermediärstoffwechsels erkannt werden können (Zchocke, Hoffmann 1999).

Neben den Patienten mit klassischer PKU weisen auch solche mit BH_4 -Mangel eine Erhöhung der Plasma-Phenylalaninkonzentration auf und wer-

den somit ebenfalls im Neugeborenencreening erfaßt, was eine weitere Untersuchung der Patienten zur genaueren Diagnose der Erkrankung notwendig macht. Bei der schweren *zentralen* Form des PTPS-Mangels beobachtet man eine deutliche Hyperphenylalaninämie mit Phe-Konzentrationen um 1200 µmol/l wohingegen bei Patienten mit der peripheren Form die Hyperphenylalaninämie mit medianen Konzentrationen um 500 µmol/l etwas geringer ausfällt (Blau et al. 1996a).

2.2 BH₄-Belastungstest

Der BH₄-Test erkennt eine fehlende Verfügbarkeit des Cofaktors Tetrahydrobiopterin und kann ggf. im Zusammenhang mit einer Phe-Belastung durchgeführt werden. Der Test zeigt einen BH₄-Mangel durch Absinken der Plasma-Phe-Konzentration nach BH₄-Gabe an (Abb. 1.13) und sollte sich bei erhöhten Phe-Werten als erstes an die Phe-Messung anschließen. Dieser Test ermöglicht somit eine differentialdiagnostische Abgrenzung von BH₄-Mangel gegenüber einem PAH-Mangel und erlaubt in gewissen Grenzen eine Subtyppendifferenzierung bei BH₄-Mangel.

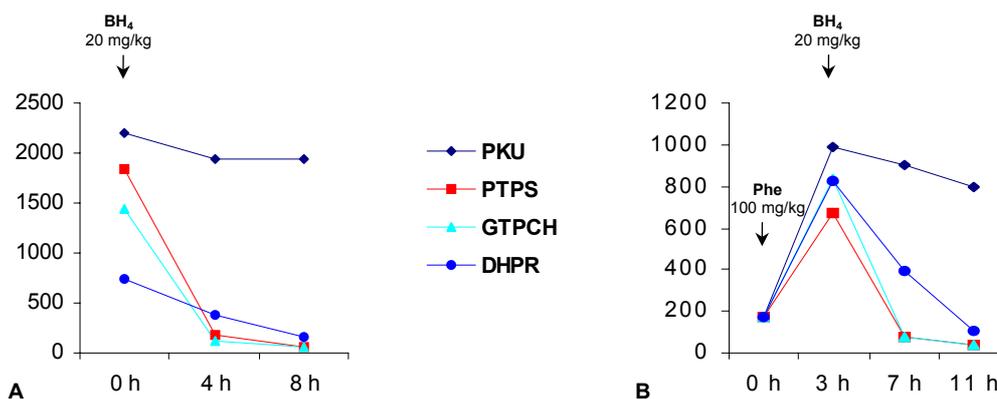


Abb. 1.13: Typische Meßergebnisse der Phe-Konzentrationen nach einem einfachen (A) und einem kombinierten (B) BH₄-Belastungstest bei Patienten mit Hyperphenylalaninämie. Der Test dient zur Differenzierung von PKU Patienten und solchen mit Defekten im BH₄-Metabolismus (Ponzone et al. 1993). Auf den Y-Achsen sind jeweils die Phenylalaninkonzentrationen (µmol/l) aufgetragen.

Kurz vor einer oralen Tetrahydrobiopterin-Gabe (Testdosis 20 mg/kg Körpergewicht) und etwa 4-8 Stunden danach wird die Phenylalaninkonzentration im Plasma gemessen. Bei einem BH₄-Mangel ist ein deutliches Absinken des

Phenylalanins unter den kritischen Bereich zu beobachten, was bei der klassischen PKU nicht der Fall ist (Abb. 1.13). Es konnten jedoch kürzlich auch einige Patienten mit sogenannter *BH₄-sensitiver Phenylketonurie* ohne Cofaktormangel beobachtet werden, die ebenfalls nach BH₄-Gabe ein Absinken der Phe-Konzentration zeigten (Kure et al. 1999; Spaapen et al. 2000). Die Kombination einer Phenylalaningabe (100 mg/kg KG) mit dem BH₄-Belastungstest ist besonders dann sinnvoll, wenn die initialen Phenylalaninwerte für einen einfachen BH₄-Belastungstest zu gering sind (<400µmol/l) (Ponzzone et al. 1993).

2.3 Messung der Pterine

Gleichzeitig sollte bei Vorliegen einer Hyperphenylalaninämie (Phe > 180µmol/l) zur differentialdiagnostischen Abgrenzung einer klassischen PKU gegenüber einem BH₄-Mangel eine Messung der Pterine erfolgen. Enzymdefekte in der BH₄-Biosynthese führen zu krankheitsspezifischen Erhöhungen oder Erniedrigungen der Pterine *Biopterin* und *Neopterin*.

Die genannten Metabolite (beide Abbauprodukte der BH₄-Synthese) können sowohl im Urin als auch im Liquor gemessen werden und ermöglichen eine Differenzierung der verschiedenen Subtypen des BH₄-Mangels. Ein hoher Gehalt an Neopterin und lediglich Spuren von Biopterin sind charakteristisch für einen PTPS-Mangel (Niederwieser et al. 1986), wohingegen beispielsweise bei einem GTPCH-Mangel auch Neopterin stark erniedrigt ist (Dhondt et al. 1990) (Abb. 1.15).

Durch den Mangel der 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase wird 7,8-Dihydro-neopterin-triphosphat nicht mehr, oder zumindest unzureichend zu 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin konvertiert, was in einer Akkumulation von 7,8-Dihydro-neopterin-triphosphat in den Geweben der betroffenen Patienten resultiert. Diese Zwischenstufe wird dann durch Pyrophosphatase dephosphoryliert und als Dihydroneopterin, sowie als dessen Oxidationsprodukt Neopterin ausgeschieden (Abb. 1.14).

Als Folge findet man hohe Konzentrationen von Neopterin, Monapterin (Iso-mer von Neopterin) und 3-Hydroxysepiapterin im Urin. Biopterin dagegen ist bei Patienten mit PTPS-Mangel nur noch in Spuren nachweisbar.

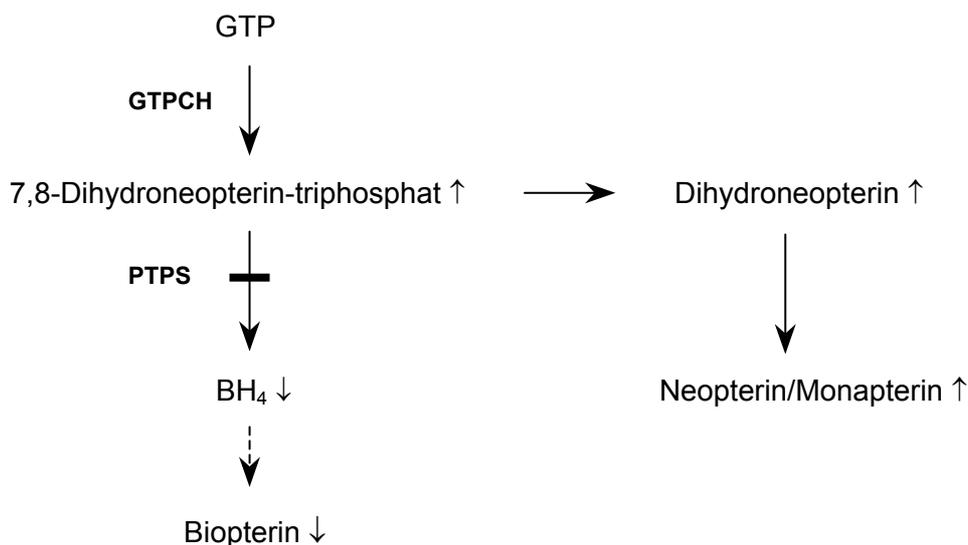


Abb. 1.14: Pathologischer Pterin-Metabolismus bei PTPS-Mangel. ↑ : Erhöhung der Konzentration, ↓ : Erniedrigung der Konzentration; der Enzymdefekt ist durch den Querbalken dargestellt.

Eine Analyse der Pterine sollte möglichst vor Beginn einer phenylalaninarmen Diät erfolgen und wird in den meisten Labors mittels HPLC (*high-performance liquid chromatography*) durchgeführt (Dhondt et al. 1981; Niederwieser 1984).

Bei der schweren *zentralen* Form des PTPS-Mangels beobachtet man im Vergleich zu den anderen Enzymdefekten die höchsten Neopterinkonzentrationen und die größte Differenz von Neopterin zu Biopterin (Abb. 1.15). Bei der milden *peripheren* (atypischen) Form liegen die Neopterinkonzentrationen sowohl im Urin als auch im Liquor beinahe ebenso hoch wie bei der *zentralen* Variante, die Biopterinkonzentration ist jedoch etwas höher, liegt allerdings immer noch unter den Normalwerten.

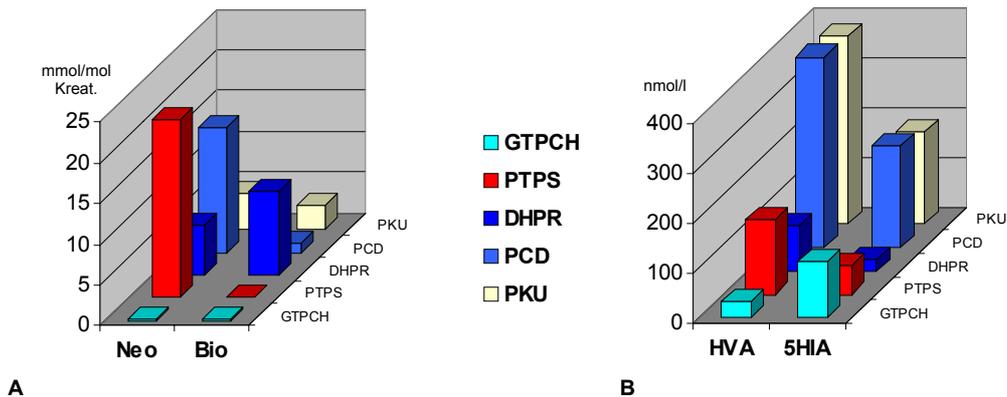


Abb. 1.15: Typische Meßwerte der Pterine im Urin (mmol/mol Kreat) (A) und Neurotransmittermetabolite im Liquor (nmol/l) (B) bei Patienten mit unterschiedlichen Defekten im BH_4 -Metabolismus. Neo: Neopterin; Bio: Biopterin; HVA: Homovanillinsäure; 5HIA: 5-Hydroxyindolacetat (Blau et al. 1996a). Auf den Y-Achsen sind jeweils die Konzentrationen der Metabolite aufgetragen.

2.4 Neurotransmittermetabolite

Das bedeutendste Unterscheidungskriterium zwischen der schweren *zentralen* und der milden *peripheren* Form ist jedoch die Konzentration der Neurotransmittermetabolite Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolacetat (5HIA) im Liquor, die bei der *zentralen* Variante deutlich verringert sind, sich jedoch beim *peripheren* Typ im normalen Bereich bewegen. Hierdurch wird plausibel, daß die Kenntnis des genauen Typus der Erkrankung auch Konsequenzen für die Behandlung mit Neurotransmittervorstufen hat.

2.5 Enzymaktivität

Ein zusätzliches diagnostisches Kriterium stellt neben der Mutationsanalyse letztlich der Nachweis der Enzymaktivität dar. Die Aktivität aller an der BH_4 -Synthese und Regeneration beteiligten Enzyme kann in Lebergewebe, Erythrozyten und Fibroblasten gemessen werden. Bei Verdacht auf Cofaktormangel ist routinemäßig insbesondere die Messung der DHPR-Aktivität (Guthrie-Karten) von Bedeutung, da sich durch die Kombination mit der Pterin-Messung meist schon eine genaue Diagnose stellen läßt (Dhondt 1991). Es wurden inzwischen verschiedene Methoden zum Nachweis der PTPS-Aktivität in der Leber (Yoshioka et al. 1984; Niederwieser et al. 1985; Dhondt et al. 1985), sowie in Erythrozyten (Shintaku et al. 1988) entwickelt.

Gewöhnlich werden nur 5-10 mg Lebergewebe oder 100 µl Erythrozyten für den Test benötigt, der auf der Messung von BH₄ basiert, das in Anwesenheit von NADPH, Magnesium und SR aus Dihydroneopterin (Substrat) gebildet wird. Das in der Reaktion entstandene BH₄ wird fluorometrisch mittels HPLC als Biopterin gemessen.

Bei Patienten mit der zentralen Form des PTPS-Mangels besteht in der Leber keine meßbare PTPS-Aktivität mehr, während in Erythrozyten 0-8% (in Einzelfällen noch bis zu 20%) Restaktivität gefunden wird (Niederwieser, Curtius 1987; Shintaku et al. 1988). Bei der milden peripheren Form wird in Erythrozyten noch eine residuale Aktivität von 7-10% gemessen. Die PTPS-Aktivität ist in jungen Erythrozyten im Vergleich zu älteren Erythrozyten höher. Ebenso zeigen die Erythrozyten von Feten eine deutlich höhere Aktivität als die von Erwachsenen.

Bei obligat Heterozygoten konnten erythrozytäre PTPS-Aktivitäten von 8-31% des Normalen anstelle der Hälfte gemessen werden, allerdings zeigt sich eine assoziierte verringerte Biopterinsynthese nur in etwa der Hälfte der Patienten, was weniger ist, als man erwarten würde. Weil dieser Test nicht in allen Fällen eindeutig zwischen Patienten und obligat Heterozygoten unterscheidet, wurde vorgeschlagen, die Meßergebnisse der PTPS-Aktivität unter Berücksichtigung der Pterinkonzentrationen zu bewerten (Scriver et al. 1987).

2.6 Pränataldiagnostik

Zur Pränataldiagnostik bei Familien mit erhöhtem Risiko für BH₄-Mangel (Familienanamnese) werden üblicherweise die Pterinkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit gemessen (Blau et al. 1989). Die Messung der Enzymaktivität in kulturierten Amniozyten (Guzman, Blau 1992), fetalen Erythrozyten oder Chorionvilli ergänzt die Analyse der Pterine (Blau et al. 1994). Bei Kenntnis der krankheitsauslösenden Mutationen können molekulargenetische Verfahren zur Mutationsanalyse verwendet werden (z.B. Restriktionsenzyme).

2.7 Molekulargenetische Diagnostik

Zur Mutationsanalyse können unterschiedliche Verfahren herangezogen werden. Als Untersuchungsmaterial kann genomische DNA oder cDNA, die z.B. aus Blut, Fibroblasten oder Biopsien gewonnen wird, Verwendung finden. Sind krankheitsauslösende Mutationen in der Familie bekannt, können die Proben ggf. mittels entsprechender Restriktionsenzyme untersucht werden (s. Kap. II). Zum Screening neuer Mutationen eignen sich beispielsweise DGGE (Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese), SSCP (single stranded conformation polymorphism) oder DNA-Sequenzierung des für das entsprechende Enzym codierenden Gens (s. Kap. II). Die Sequenzierung hat den Vorteil sehr hoher Spezifität und Sensitivität, ist jedoch recht kostenintensiv. Die gewonnenen Kenntnisse der Mutationsanalysen könnten nicht nur eine bessere Vorhersagbarkeit des klinischen Verlaufs ermöglichen, sondern auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze wie beispielsweise Gentransfer hilfreich sein (Thöny et al. 1996).

3. Genetik des PTPS-Mangels

Basierend auf der humanen cDNA-Sequenz wurden Mutationsanalysen bei Patienten durchgeführt, die an Hyperphenylalaninämie aufgrund eines PTPS-Mangels erkrankt waren (Ashida et al. 1994; Imamura et al. 1994, Thöny et al. 1994b; Oppliger et al. 1995a+b). Dabei wurden, über die gesamte cDNA verteilt, verschiedene funktionell relevante Mutationen gefunden, welche zu Aminosäureänderungen, Leserasterverschiebungen sowie vorzeitigen Stopcodons führten. Im Gegensatz zu Mutationen des *GCH1*-Gens wurden bisher für das *PTS*-Gen ausschließlich rezessiv erbliche Mutationen gefunden (Thöny et al. 1994a; Oppliger et al. 1995a) Obwohl inzwischen 33 unterschiedliche Mutationen gefunden wurden (Tab. 1.1)(Blau et al. 2000b; Imamura et al. 1999; Liu et al. 1998), wurden nur wenige auf ihre Funktionalität untersucht. Der Zusammenhang zwischen Mutation und Phänotyp ist größtenteils noch unklar (Blau et al. 2000b). In nur sehr wenigen Fällen lie-

gen Daten über Genotyp-Phänotyp-Korrelation vor (Blau et al. 2000a; Oppliger et al. 1997; Scherer-Oppliger et al. 1999b). Funktionelle Untersuchungen von rekombinanten mutierten Proteinen zeigten, daß einige Missense-Mutationen, die bei Patienten mit schwerem PTPS-Mangel gefunden wurden, deutlich reduzierte Enzymaktivität zur Folge hatten. Mutationen wie Nonsense-Mutationen größere Deletionen und Leserasterverschiebungen, die eine Verkürzung des Proteins verursachen (IVS1-3c>g, IVS2-7t>a, V57del, K120X) führen zu instabiler und enzymatisch völlig inaktiver PTPS (Thöny; Blau 1997).

| Mutation (Trivialname) ^a | Lokalisation im Gen | Nukleotid-aberration ^b | Aminosäure-aberration ^c | Häufigkeit der Mutation ^d | Phänotypen |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| S15_R16insR | Exon 1 | c.45_46insCGC | Arg ins bei 16 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| R16C | Exon 1 | c.46C>T | Arg>Cys bei 16 | 1x comp. het. | HPA, peripher |
| R25G | Exon 1 | c.73C>G | Arg>Gly bei 25 | 2x comp. het. | HPA, schwer / mild |
| R25Q | Exon 1 | c.74G>A | Arg>Gln bei 25 | 2x homozygot | HPA, schwer (zentral) |
| L26F | Exon 1 | c.78G>T | Leu>Thr bei 26 | 1x comp. het. | HPA, mild (atypisch) |
| IVS1-3c>g | Intron 1 | c>g bei -3 | del(Lys29-Ser32) | 2x comp. het. 2x homozygot | HPA, schwer (zentral) |
| E35G | Exon 2 | c.104A>G | Glu>Gly bei 35 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| N36K | Exon 2 | c.108C>G | Asn>Lys bei 36 | 2x comp. het. | HPA |
| K38X | Exon 2 | c.116_119del | Lys>Stop bei 38 | 1x comp. het. | HPA, mild (atypisch) |
| N47D | Exon 2 | c.139A>G | Asn>Asp bei 47 | 1x comp. het. | HPA, transient |
| N52S | Exon 2 | c.155A>G | Asn>Ser bei 52 | 23x (comp. het. + homozygot) | HPA, schwer (zentral) |
| IVS2-7t>a | Intron 2 | t>a bei -7 | Lys>Stop bei 54 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| V56M | Exon 3 | c.166G>A | Val>Met bei 56 | 3x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| V56del | Exon 3 | c.166_168del | del Val bei 56 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| V57del | Exon 3 | c.169_171del | del Val bei 57 | 2x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| IVS3+1g>a | Intron 3 | g>a bei +1 | unklar | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| T67M | Exon 4 | c.200C>T | Thr>Met bei 67 | 3x comp. het. 1x homozygot | HPA, schwer (zentral) |
| V70D | Exon 4 | c.209T>A | Val>Asp bei 70 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| L76F | Exon 4 | c.226C>T | Leu>Phe bei 76 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| E81E | Exon 4 | c.243G>A | Glu>Glu bei 81 | 2x homozygot | HPA, schwer (zentral) |

Tab. 1.1: Übersicht der bisher im *PTS*-Gen gefundenen Mutationen (Fortsetzung auf nachfolgender Seite).

| Mutation (Trivialname) ^a | Lokalisation im Gen | Nukleotid- aberration ^b | Aminosäure- aberration ^c | Häufigkeit der Mutation ^d | Phänotypen |
|--|------------------------|---------------------------------------|--|---|------------------------------|
| P87S | Exon 5 | c.259C>T | Pro>Ser bei 87 | 23x (comp. het. + homozygot) | HPA, schwer (zentral) |
| P87L | Exon 5 | c.260C>T | Pro>Leu bei 87 | 2x comp. het. 2x homozygot | HPA, schwer (zentral) |
| D96N | Exon 5 | c.286G>A | Asp>Asn bei 96 | 7x (comp. het. + homozygot) | HPA, schwer (zentral) |
| Y99C | Exon 5 | c.296A>G | Tyr>Cys bei 99 | 1x hemizygot | HPA, zentral, isoliert |
| F100V | Exon 5 | c.298T>G | Phe>Val bei 100 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| T106M | Exon 6 | c.317C>T | Thr>Met bei 106 | 2x comp. het. 1x homozygot | HPA, schwer (zentral) |
| I114V | Exon 6 | c.340A>G | Ile>Val bei 114 | 2x homozygot | HPA, schwer (zentral) |
| D116G | Exon 6 | c.347A>G | Asp>Gly bei 116 | 1x comp. het. | HPA, transient |
| K120X | Exon 6 | c.361_374del | Lys>Stop bei 120 | 1x comp. het. | HPA, peripher |
| V124L | Exon 6 | c.370G>T | Val>Leu bei 124 | 1x comp. het. | HPA, mild (atypisch) |
| K129E | Exon 6 | c.385A>G | Lys>Gly bei 129 | 2x homozygot | HPA, peripher bis zentral |
| D136G | Exon 6 | c.407A>G | Asp>Gly bei 136 | 1x comp. het. | HPA, schwer (zentral) |
| D136V | Exon 6 | c.407A>T | Asp>Val bei 136 | 1x comp. het. 6x homozygot | HPA, schwer (zentral) |

Tab. 1.1: Übersicht der bisher im PTPS-Gen gefundenen Mutationen (Fortsetzung). Die Daten stammen aus der *Database of BH₄ causing Mutations* (BIOMDB) (Blau et al. 2000b). ^a Nomenklatur entsprechend den aktuellen Empfehlungen (Dunnen; Antonarakis 2000). ^b Die Numerierung der Nukleotide ist in Großbuchstaben angegeben, bezieht sich auf die cDNA-Sequenz (GenBank M97655) und beginnt mit Adenosin des ATG-Start-Codons; Kleinbuchstaben beziehen sich auf die Intron-Sequenz (positives Vorzeichen: 5'-Ende, negatives Vorzeichen: 3'-Ende). ^c Die Numerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Triplets (beginnend mit Start-Codon). ^d comp. het. : *compound heterozygot*

Es konnte in einigen Fällen gezeigt werden, daß die relative Enzymaktivität (im Vergleich zum Wildtyp) mancher rekombinant in COS-1-Zellen und *E. coli* exprimierter PTPS-Mutanten deutlich über der in primären Fibroblasten gemessenen Enzymaktivität lag (s. Abb.1.16), was eine aktivitätssteigernde posttranslationale Modifikation der PTPS in eukaryontischen Zellen vermuten läßt (Oppliger et al. 1995b).

Bei einem Patient (Mutation K129E homozygot) mit transientser HPA, entwickelte sich der ursprünglich periphere PTPS-Mangel mit zunehmenden Alter zur zentralen Form der Erkrankung. In Fibroblasten und Erythrozyten des Patienten war keine PTPS-Aktivität nachweisbar, das rekombinant in COS-1-Zellen und humanen Hepatom-Zellen (Hep G2 Zelllinie) exprimierte Protein zeigte jedoch volle Enzymaktivität. Dies läßt vermuten, daß die Aktivität der mutierten PTPS (K129E) zelltypabhängig ist (Oppliger et al. 1997).

Es konnte ein dominant negativer Effekt des Allels N47D nachgewiesen werden, das bei einem Patienten mit transienter HPA *compound* heterozygot gefunden wurde (Scherer-Oppliger et al. 1999b). Ein dominant negativer Effekt mancher Mutationen könnte auch für die niedrige erythrozytäre PTPS-Aktivität verantwortlich sein, wie sie zum Teil bei obligat Heterozygoten gefunden wird (Shintaku et al. 1988).

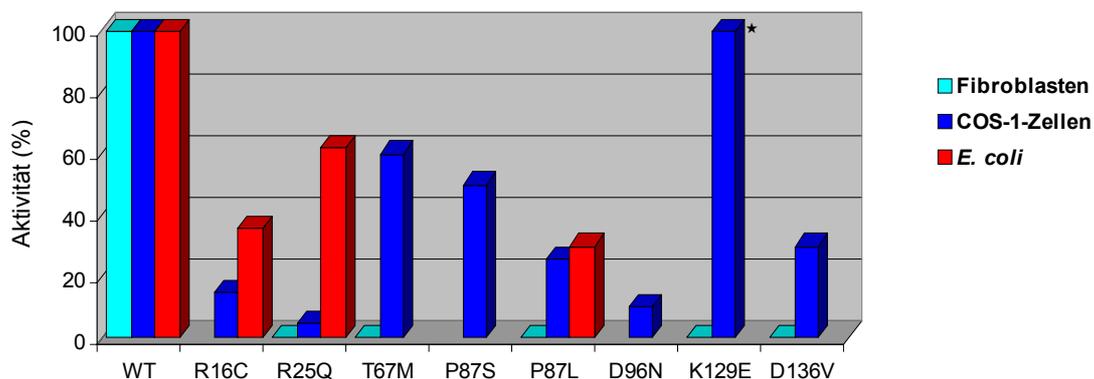


Abb. 1.16: Relative Enzymaktivitäten unterschiedlicher PTPS-Mutanten in verschiedenen Zellen. Die Aktivität wurde in primären Fibroblasten gemessen (nur dargestellt, wenn homozygote Mutationen vorlagen). Einige Mutanten wurden zudem rekombinant in COS-1-Zellen und *E. coli* exprimiert und anschließend die Aktivität bestimmt. Die *in vitro* gemessene Aktivität war oftmals noch höher als die in COS-1-Zellen und *E. coli* bestimmte Aktivität (Daten nicht dargestellt) (Oppliger et al. 1995a; Oppliger et al. 1997; Imamura et al. 1995; Liu & Hsiao 1996; Dudešek et al. 2001). Die in den unterschiedlichen Zelltypen gemessenen Aktivitäten sind in prozentualer Relation zu den jeweils beim Wildtyp (WT) gemessenen Aktivitäten (als 100% definiert) dargestellt. *Die Aktivität der in COS-1-Zellen exprimierten Mutante K129E betrug über 350% im Vergleich zum Wildtyp (Oppliger et al. 1997).

4. Therapie

Während sich die Behandlung bei der klassischen Phenylketonurie (PAH-Mangel) in erster Linie auf eine phenylalaninarme Diät stützt, besteht die Therapie bei BH₄-Mangel wesentlich aus einer Tetrahydrobiopterin-Substitution, welche in der Regel durch die Verabreichung von Neurotransmittervorstufen ergänzt wird (Kombinationstherapie).

Kontrolle des Blut-Phenylalanin-Spiegels: Obwohl Kinder mit BH₄-Mangel eine höhere Phenylalanin-Toleranz als Patienten mit klassischer PKU aufweisen, spielt die genaue Einstellung des Plasma-Phenylalaninspiegels eine besondere Rolle. Erhöhte Plasma-Phe-Spiegel beeinträchtigen den Membrantransport der Neurotransmittervorstufen und bewirken eine kompetitive Hemmung der Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylase (Ponzzone et al. 1987). Die genaue Kontrolle der Phenylalaninkonzentrationen ist daher von noch größerer Bedeutung als bei Patienten mit PAH-Mangel. Manche Patienten mit Neurotransmitter-Therapie zeigen schon neurologische Probleme, wenn die Phenylalaninkonzentrationen 360 µmol/l überschreiten (Blau et al. 1993).

BH₄-Therapie: Bei Patienten mit GTPCH- oder PTPS-Mangel ist die Verabreichung von BH₄ die effizienteste Maßnahme zur Einstellung der Phe-Konzentration. Relativ geringe Dosen von Tetrahydrobiopterin (1-5 mg/kg/T) normalisieren bereits die Plasma-Phe-Konzentration und machen so die Phenylalaninarme Diät überflüssig.

BH₄ ist nicht ausreichend liquorgängig (Gal et al. 1976); auch wenn einzelne Fälle mit günstigem Verlauf unter BH₄-Monotherapie bekannt sind (Endres et al. 1982a, Endres et al. 1982b, Leupold et al. 1982), ist diese in der Regel nicht ausreichend, die charakteristischen neurologischen Folgen der Erkrankung auszuschließen. Zwar konnte gezeigt werden, daß meßbare Mengen von peripher verabreichtem Tetrahydrobiopterin das Gehirn erreichen, wenn größere Dosen (5-20 mg/kg/T) gegeben werden (Ponzzone et al. 1989; Kapatios, Kaufman 1981), doch erweist sich die BH₄-Monotherapie in der Praxis meist als unzureichend, um die normale Syntheserate der zerebralen Neurotransmitter zu gewährleisten.

Neurotransmitterersatz: Eine Behandlung mit L-Dopa und 5-Hydroxytryptophan (5-HT) in Ergänzung zur BH₄-Substitution ist die gängige Therapie bei allen Subgruppen des BH₄-Mangels. Die zusätzliche Gabe von Carbidopa, das die periphere aromatische Aminosäure-Decarboxylase hemmt, reduziert dabei die therapeutische Dosis von L-Dopa. Die verabreichte Dosis von L-Dopa + 10% Carbidopa beträgt initial 1-2 mg/kg/T, bei Kindern unter zwei Jahren 5 und bei Kindern über zwei Jahren 8-10 mg/kg/T. 5-Hydroxytryptophan wird in gleicher Dosierung verabreicht. Nur bei Kindern über zwei Jahren fällt sie mit 6-8 mg/kg/T etwas geringer aus.

Ein genaues Monitoring der Behandlung ist dabei von besonderer Bedeutung und kann am exaktesten über die Konzentrationsmessung der Neurotransmitter im Liquor erfolgen. Eine Einschränkung besteht darin, daß eine regelmäßige Liquorpunktion mit entsprechenden Risiken verbunden ist. Indirekt ist jedoch ein Monitoring der Dopaminkonzentration im Hypothalamus über die Messung der Prolaktin-Spiegel im Blut möglich. Prolaktin dient als sehr sensibler Marker für die hypothalamische Dopaminkonzentration und kann somit zur zusätzlichen Kontrolle der Dopaminkonzentration gemessen werden (Spada et al. 1996; Birnbacher et al. 1998). Allerdings spiegelt Prolaktin nicht den Serotoninumsatz wider. Außerdem wird von ausgeprägten täglichen Schwankungen der Prolaktin-Plasmakonzentrationen berichtet, die durch Stress, Anstrengung und Nahrungseinflüsse bedingt sein können.

Die optimale Dosierung der Neurotransmitter zur effektiven Behebung der Kardinalsymptome sollte somit in erster Linie auf der Basis der klinischen Symptomatik erfolgen (Dudešek et al. 2001). Tägliche Schwankungen werden oft beobachtet und erfordern dann meist Änderungen im Therapieplan. Auch wenn diese Therapie inzwischen recht verbreitet ist (Dudešek et al. 2001), können potentielle Risiken während der neonatalen Gehirnentwicklung noch nicht ausgeschlossen werden, da noch zu wenig Daten von Langzeituntersuchungen bekannt sind und noch nicht endgültig geklärt ist, ob die verabreichten Neurotransmittervorstufen oder Carbidopa womöglich signifikante Nebenwirkungen haben könnten.

5. Prognose

Es hat sich gezeigt, daß die BH₄-Substitution in Kombination mit Neurotransmitterersatz ein recht effizientes, aber immer noch nicht vollständig ausreichendes Therapeutikum darstellt. Die Behandlung führt zwar meist zu einer deutlichen Verbesserung der Symptomatik mit Verschwinden neurologischer Zeichen. Trotzdem werden regelmäßig Sprachstörungen, Schlafprobleme und eine verlangsamte Entwicklung beobachtet. Einige Patienten mit PTPS-Mangel starben sogar, obwohl die Behandlung bereits in den ersten Lebensmonaten begonnen wurde (Blau et al. 1993).

Auch wenn die Ursache des zeitweise unzureichenden Erfolges gelegentlich im zu späten Therapiebeginn zu suchen ist und Ergebnisse größerer Patientengruppen mit sehr frühem Therapiebeginn positivere Ergebnisse erbringen, gibt es Gründe für einen limitierten Therapieerfolg:

- Das Auftreten fetaler Gehirnschäden ist wahrscheinlich, insbesondere bei PTPS-Mangel, weil häufig verringertes Geburtsgewicht, klinische Zeichen und Mikrozephalie schon bei der Geburt beobachtet werden.
- Mögliche iatrogene Schäden der Neurotransmittervorstufen oder Carbidopa können noch nicht ausgeschlossen werden.
- Weiterhin ist es wahrscheinlich, daß das Ansprechen auf die Therapie von der Schwere des metabolischen Defektes abhängig ist, was sich im größeren Therapieerfolg bei Patienten mit nahezu normalen HVA-Konzentrationen im Liquor widerspiegelt (Giugliani et al. 1986).
- BH₄-Mangel führt zu einer Dysfunktion der Stickoxidsynthase, wodurch es zu einer erheblichen Produktion von Sauerstoffradikalen kommt. Hierdurch könnte es zu einem Gewebeschaden kommen, der durch die gängige Therapie nicht zu behandeln ist.

Andererseits ist trotz der genannten Einschränkungen die bisherige Therapie durch eine signifikante Verbesserung des Verlaufs und eine deutliche Verringerung der Letalität der Erkrankung gekennzeichnet. Die Verbesserung pränataler Diagnoseverfahren läßt in Zukunft womöglich auch einen pränatalen Behandlungsbeginn denkbar werden.

D. Ziele der Untersuchung

Zur Zeit liegen noch unzureichende Informationen über die genetische Grundlage vieler Defekte der 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase (PTPS) vor. Trotz umfangreicher klinischer und laborchemischer Daten (BIODEF-Database) wurde ein Großteil der an PTPS-Mangel erkrankten Patienten bisher noch nicht molekulargenetisch, auf Mutationen im *PTS*-Gen untersucht. Auch herrscht immer noch Unklarheit über die Korrelation von Mutation und Phänotyp des klinischen Krankheitsbildes, ebenso wie die sehr unterschiedliche Ausprägung der Symptomatik von einem besonders milden Verlauf bis hin zu schwerer Erkrankung mit progressiven neurologischen Störungen oder sogar letalem Ausgang.

Eine bessere Kenntnis der der Krankheit zugrundeliegenden genetischen Defekte und deren Auswirkung auf die Enzymaktivität ist somit prognostisch als auch therapeutisch von großer Bedeutung.

Im Rahmen der vorgelegten Dissertation wurde eine Sequenzanalyse des *PTS*-Gens bei neun Patienten mit nachgewiesener signifikanter Reduktion der PTPS-Aktivität durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es, die für den Enzymdefekt verantwortlichen Mutationen im *PTS*-Gen zu identifizieren und einen Beitrag zum besseren Verständnis der genetischen Zusammenhänge von Mutation und Phänotyp zu leisten.

KAPITEL II : METHODIK

A. Angewandte Methoden

1. Allgemeine Betrachtung

Es stehen inzwischen eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Verfügung, um Mutationen in einem Gen zu identifizieren. Grundsätzlich ist zwischen Techniken zu unterscheiden, die auch unbekannte Mutationen ausfindig machen können (z.B. Sequenzierung oder Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese [DGGE]) und solchen, die lediglich die Erkennung bereits bekannter Mutationen zulassen (z.B. Enzym-verdau oder Amplification refractory mutation system [ARMS]). Zudem weisen alle Verfahren unterschiedliche Sensitivität und Spezifität bei unterschiedlichem Kosten- und Zeitaufwand auf, was entsprechende Überlegungen zur Wahl der geeigneten Methoden erforderlich macht.

Die im Rahmen dieser Untersuchung zur Verfügung stehenden Patienten wiesen alle einen enzymatisch belegten Defekt der *6-Pyrovoyl-Tetrahydropterin-Synthase* auf. Die Art und Lokalisation der für den jeweiligen Defekt verantwortlichen Mutationen war jedoch nicht bekannt. Wegen der hohen Spezifität und Sensitivität der Methode und der relativ geringen Größe des *PTS*-Gens fiel die Entscheidung auf eine vollständige Sequenzierung der genomischen DNA aller sechs Exons. Zusätzlich wurden auch über die Exongrenzen hinaus die angrenzenden Intronsequenzen analysiert, um auch Spleißmutationen erfassen zu können. Um Fehler auszuschließen, wurden alle Exons zweifach und in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung sequenziert. Zusätzlich wurde die in Exon 2 gefundene Mutation E35G durch Enzymverdau verifiziert.

Nachfolgend werden alle durchgeführten Methoden besprochen und z.T. zusätzliche Hintergründe erklärt. Die detaillierten Angaben zu verwendeten Materialien und die umfassenden Protokolle mit allen wichtigen Arbeitsschritten sind im anschließenden Abschnitt aufgeführt (Kap. II-B: Material und Protokolle).

2. DNA-Extraktion

2.1 Aus peripheren Lymphozyten

Venöse Blutproben werden in EDTA-Röhrchen gesammelt, bei 4°C gelagert (sofern notwendig) und so schnell wie möglich weiterverarbeitet, um den Verlust an DNA-Ausbeute so gering wie möglich zu halten. Die Zellen werden, wie im Einzelnen in Teil B diese Kapitels unter 1.2 beschrieben, vom Plasma getrennt, die Erythrozyten lysiert und die DNA-enhaltenden Leukozyten durch Zentrifugation gesammelt. Die DNA-Extraktion erfolgt mit dem BACC2 Extraktions-Kit (Amersham).

Anschließend wird die DNA in TE-Puffer suspendiert und bei –20°C gelagert.

2.2 Aus Guthrie-Karten

DNA für PCR-Analysen kann außerdem aus getrockneten Blutstropfen oder Guthrie-Karten extrahiert werden, selbst wenn diese schon über Jahre gelagert wurden.

Wir machten die Erfahrung, daß diese Proben, auch wenn sie quantitativ weniger DNA lieferten, ebenso gute Sequenzierergebnisse zuließen wie frisch extrahierte DNA aus Vollblut.

Die Blutstropfen sollten von ausreichender Größe und das Filterpapier gut durchtränkt sein. Die Extraktion der DNA erfolgt wie unter 1.4 in Teil B dieses Kapitels beschrieben.

3. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

1984 veröffentlichte *Kary Mullis* eine neue Methode zur in vitro-Amplifizierung von spezifischen Nucleinsäure-Fragmenten, die inzwischen zu einer der am meisten verwendeten Standardmethoden in der Molekulargenetik avancierte, da sie einfach und schnell anzuwenden ist, in vielen Fällen das Klonen von Genen überflüssig macht und außerdem auch ohne die Verwendung vitaler Zellen durchführbar ist.

Bei dem ursprünglichen Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) wird zunächst eine Trennung der komplementären DNA-Stränge durch Denaturierung bei 90-95°C durchgeführt. Darauf folgend wird das Gemisch auf etwa 50°C abgekühlt und zwei aus ca. 15-25 Basen bestehende Oligonukleotide (Primer) zugesetzt, die jeweils der Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Durch Zusatz einer DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert und die zwischen den Primern gelegene Zielsequenz verdoppelt.

Anschließend wird der aus *Denaturierung, Anlagerung der Primer* und *Extension* bestehende Reaktionszyklus 20-30 Mal wiederholt, woraus eine exponentiellen Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle folgt. Bei 20 Reaktionszyklen ergibt sich so unter realistischen Bedingungen in der Praxis eine 10⁵-fache Amplifizierung der Zielsequenz.

Durch den Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien (Kogan et al. 1987) wird die Zugabe von neuer Polymerase nach jeder *Denaturierung*, welche zuvor eine Inaktivierung der Polymerasen zur Folge hatte, überflüssig. Das von uns verwendete Enzym stammt aus dem in heißen Quellen lebenden Organismus *Thermus aquaticus* und wird folglich als *Taq-Polymerase* bezeichnet.

Durch diese entscheidende Verbesserung und den Einsatz von automatisierten Thermocyclern, die die exakte Temperatursteuerung

übernehmen, ist es möglich geworden, enorme Amplifizierung geringster Mengen Zielsequenz in knapp zwei Stunden durchzuführen.

Die Länge der hier verwendeten Primer betrug jeweils etwa 20 Basen zuzüglich eines 18 Basen langen Schwanzes, der wiederum der Anlagerung der *Cycle-Sequencing*-Primer diente (s.u.). Die resultierenden Produktlängen sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Die Primer für alle sechs Exons des *PTS*-Gens wurden mit dem Oligo-Programm (MedProbe) auf einem Macintosh-Computer entworfen, mit Ausnahme der Primer für Exon 1, die der Literatur entnommen wurden (Liu et al. 1998).

Synthetisiert wurden die Primer von der Firma GIBCO BRL.

Jede PCR lief auf dem Gene Amp[®] PCR System 9700 (PE). Das Protokoll ist im Einzelnen in Teil B dieses Kapitels unter 3.2 beschrieben. Nach jeder PCR wurden 5µl des PCR-Produktes durch Gelelektrophorese auf einem Agarosegel dargestellt, um den Erfolg der Amplifikation zu überprüfen.

4. Enzymverdau zur Detektion von Mutationen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um prokaryontische Phosphodiesterasen, welche die Bindung zwischen bestimmten Nukleotiden innerhalb der Nukleotidkette aufschneiden. Die Schnittstelle liegt dabei an Stellen mit Rotationssymmetrie (Palindrome), und ist für jedes Restriktionsenzym spezifisch. Wird die Basensequenz beispielsweise an einer Stelle durch eine Mutation so verändert, daß eine palindromische Sequenz entsteht, welche durch ein Restriktionsenzym erkannt wird, so läßt sich durch eine Spaltung des DNA-Stranges an dieser Stelle die entsprechende Mutation ausfindig machen. Wir verwendeten diese Methode zum Nachweis der Mutation *E35G* in Exon 2. Allerdings war es erforderlich, durch einen speziell hierfür hergestellten Primer (2.3 Teil B dieses Kapitels) künstlich eine palindromische Sequenz zu schaffen, welche durch die Mutation alleine nicht gegeben war (s. Kap.III–B).

5. Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Sequenzierung der genomischen DNA wurde eine Modifikation der von *Frederick Sanger* entwickelten enzymatischen Kettenabbruchmethode verwendet (*Sanger et al. 1977*). Hierzu folgt nach Amplifizierung der DNA mittels normaler PCR eine zusätzliche *Cycle-Sequencing-PCR*. Der dazu verwendete, am 5'-Ende fluoreszierend markierte Primer setzt am 3'-Ende der PCR-Produkte an und entspricht der Sequenz eines zusätzlichen Schwanzes des Primers, der für die erste PCR eingesetzt wurde.

Die Analyse der Basensequenz wird dadurch möglich, daß die PCR in vier gleich große Ansätze aufgeteilt wird und zusätzlich zu den Desoxyribonukleosidtriphosphaten in jeden Ansatz eine geringe Menge des jeweiligen 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphates gegeben wird. Wird dieses Nukleotid anstelle des normalen Nukleotids in die wachsende Polynukleotidkette eingebaut, so wird das Kettenwachstum beendet, da keine freie 3'-OH-Gruppe für die Polymerisierung mehr vorhanden ist. Es entstehen dadurch also sequenzspezifische Kettenabbrüche. In dem Ansatz, in den beispielsweise zusätzlich Dideoxy-ATP gegeben wurde, weist jeder Kettenabbruch auf das Vorhandensein der Base Adenin an dieser Stelle der Sequenz hin.

Werden anschließend die vier Ansätze nebeneinander auf ein hochauflösendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen, so treten nach der Elektrophorese die verschieden langen Fragmente in Form unterschiedlicher Banden auf, aus denen sich die Sequenz der amplifizierten DNA ablesen läßt. Die Banden können generell durch den Einsatz entweder fluoreszierend bzw. radioaktiv markierter Primer oder Terminatoren sichtbar gemacht werden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde zur automatisierten DNA-Sequenzierung der Sequenzierer ALFexpress (Pharmacia Biotech) verwendet. Die bei der *Cycle-Sequencing-PCR* eingesetzten, mit Cy5 markierten Primer fluoreszieren im Laserlicht und werden während der Elektrophorese von Photometern während ihres „Vorbeiwanderns“ erfaßt und von der Software aufgezeichnet.

Durch den Einsatz der universellen, am 5'-Ende fluoreszierend markierten Primer *M13* und *M13 reverse* bei der Cycle-Sequencing-Reaktion wird eine Markierung der Sequenzierprimer überflüssig, wodurch Zeit und Kosten eingespart werden, weil die universellen Primer für alle Exons einsetzbar sind, sofern bei der ersten PCR Primer mit den entsprechenden Schwänzen am 5'-Ende benutzt wurden (*M13*, *M13 reverse*).

Das 5'-Ende von *M13* entspricht dem jeweiligen Schwanz der Vorwärtsprimer, von *M13 reverse* dem Schwanz der entsprechenden Rückwärtsprimer, welche bei der ersten PCR eingesetzt wurden.

Dieses Vorgehen ermöglicht die Sequenzierung beider gegenläufigen komplementären DNA-Stränge, was die Genauigkeit der Methode noch erhöht und die Fehlerwahrscheinlichkeit verringert. Das detaillierte Protokoll zur Sequenzierung ist in Abschnitt B dieses Kapitels beschrieben.

6. Räumliche Darstellung der veränderten Proteine

Zur Visualisierung der Auswirkungen der Mutationen auf molekularer Ebene wurde ein *Molecular-Modeling* auf der Basis der bereits bekannten Struktur der PTPS der Ratte durchgeführt (Koordinatensatz: 1b66.pdb der *RCSB Protein Data Bank*). Als Software zur Proteindarstellung diente der *Swiss-PdbViewer* (v3.7 beta 2) (Guex, Peitsch 1997). Die Kalkulationen der dreidimensionalen Moleküldarstellungen konnten auf einem handelsüblichen WINTEL-PC durchgeführt werden.

Zur qualitativen Verbesserung der räumlichen Darstellung wurden manche vom *Swiss-PdbViewer* generierten Datensätze anschließend noch mit dem Programm *POV-Ray* (Version 3.1g) berechnet.

B. Materialien und Protokolle

1. DNA-Extraktion

1.1 Materialien

BACC2 Extraktions-Kit (Amersham); 5M Natriumperchlorat (70%); Chloroform; Ethanol absolut; Chelex-Resin (5%ige Suspension Chelex 100 Resin BT der FA. Bio-Rad in H₂O); TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7,4)

1.2 DNA-Extraktion aus Vollblut

1. 5ml EDTA-Blut in einem 50ml Polypropylen Röhrchen (Greiner Labortechnik) mit Reagenz A (Extraktions-Kit) auf 40 ml auffüllen und anschließend für 4 Minuten gründlich durchmischen.
2. 5 min bei 1300 g zentrifugieren.
3. Den Überstand verwerfen; das Pallet 2ml Reagenz B des Nucleon-Extraktions-Kits resuspendieren, gründlich mischen und in 5ml Röhrchen überführen.
4. 500µl 5M Natriumperchlorat-Lösung dazugeben und einige Sekunden schütteln.
5. 2ml Chloroform dazugeben und 10 min mischen.
6. 2 min bei 800 g zentrifugieren.
7. Langsam 300µl Nucleon Resin dazupipettieren und 4 min bei 1400 g zentrifugieren.
8. Den Überstand vorsichtig abpipettieren und in ein neues 50ml Röhrchen umfüllen.
9. Die DNA mit kaltem Ethanol absolut ausfällen und mit einem dünnen, über der Bunsenbrennerflamme sterilisiertem Glasstab in ein weiteres Röhrchen zu 500µl TE-Puffer überführen.
10. DNA-Stammlösung bei –70°C lagern.

1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit

1. 10µl der DNA-Stammlösung in 90µl destilliertem H₂O auflösen (1:10).
2. Die optische Dichte (OD) bei 260nm bestimmen (Absorption mit der von H₂O als Standard vergleichen – Eine OD-Einheit entspricht einer DNA-Konzentration von etwa 50µg/ml – Die Konzentration der DNA-Stammlösung (µg/ml) wird als $OD_{260} \cdot 10 \cdot 50$ berechnet).
3. Dann die OD bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmen und die Ratio $OD_{260}:OD_{280}$ berechnen (Eine Ratio von <1,65 wäre Hinweis auf eine Proteinkontamination und würde eine weitere Aufreinigung der Probe erforderlich machen, was in unserem Fall nicht notwendig war).
4. Falls die Konzentration der DNA-Stammlösung nicht etwa 500µg/ml beträgt, diese durch entsprechende Verdünnung einstellen.

1.4 DNA-Extraktion aus Guthrie-Karten

1. 1ml steriles, destilliertes Wasser in ein 1,5ml Eppendorf-Cup füllen und ein 3x3mm großes Stück Papier aus dem getrocknetem Blutstropfen ausstanzen, dazugeben und vortexen.
2. Bei Raumtemperatur 15-30 min inkubieren und gelegentlich vortexen.
3. Für 2-3 min bei 10000-15000 g zentrifugieren.
4. Den Überstand vorsichtig entfernen und verwerfen, so daß nur das Pellet, das Papierstück und 20-30µl der Flüssigkeit im Gefäß verbleiben.
5. Mit 5% Chelex zu einem Gesamtvolumen von 200µl auffüllen und für 15-30 min im Wasserbad bei 56°C inkubieren.
6. Anschließend für 5-10 s bei max. Stärke vortexen.
7. In kochendem Wasser für weitere 8 min inkubieren.
8. Danach 5-10s bei max. Stärke vortexen und für 2-3 min bei 10000-15000g zentrifugieren.
9. 20µl des Überstandes für PCR verwenden.
10. Den Rest der Probe tiefgekühlt lagern. Für eine erneute Nutzung die Schritte 9. und 10. wiederholen.

2. Primersequenzen

2.1 Primer für die Amplifikation der 6 *PTS*-Exons

| | | Primer (5'-3') | Annealing-temp. | Produktlänge |
|---------------|----------------|---|-----------------|--------------------------|
| Exon 1 | F | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTAGCACCGCAGACAGCGCCGGGAA | 57°C | 268 bp |
| | R | CAGGAAACAGCTATGACCATCAGGATGCTGGAGGCCGTCCGA | | |
| Exon 2 | F | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGAGAAGGGGTTTGAATGT | 55°C | 347 bp |
| | F ₂ | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGITTTTGGTCAGTAAATTTCTAAG | | 297 bp (F ₂) |
| | R | CAGGAAACAGCTATGACCCACCCAACCAAGACAACAG | | |
| Exon 3 | F | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGCTTTTGGGGACAGAT | 55°C | 258 bp |
| | R | CAGGAAACAGCTATGACCAACACAGAATCCACCACACT | | |
| Exon 4 | F | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTCCGTTTAATATGGAGAGCCTAT | 55°C | 231 bp |
| | R | CAGGAAACAGCTATGACCATAACTGGTTGGGGAGGTAGATA | | |
| Exon 5 | F | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTGGCTAAGTGATAAGGTGAGGTT | 55°C | 243 bp |
| | R | CAGGAAACAGCTATGACCTTACAATCCACATAAGGCAAGAT | | |
| Exon 6 | F | <u>TGTA</u> AAACGACGGCCAGTACTGTATCTTGCCTTATGT | 55°C | 372 bp |
| | R | CAGGAAACAGCTATGACCATGCTAACCCCAATAG | | |

Tab. 2.1: Darstellung der verwendeten Primer für alle sechs zu amplifizierenden Exons. Für Exon 2 wurden zwei unterschiedliche Primer verwendet, die sich an unterschiedliche Bereichen am 5'-Ende der Sequenz anlagern und somit zu unterschiedlichen Produktlängen führen. Dies war erforderlich, um den Bereich hinter der *Poly-T-Sequenz* auch in Vorwärtsrichtung sequenzieren zu können (s. Kap. III-B, Abb. 3.6). Der unterstrichene Teil der Sequenz dient jeweils der Anlagerung der unten aufgeführten *Cycle-Sequencing-Primer*. F: Vorwärtsprimer; R: Rückwärtsprimer. Weiterhin ist die spezifische Anlagerungstemperatur und jeweils resultierende Produktlänge angegeben.

2.2 Die markierten Universalprimer für die *Cycle-Sequencing*-Reaktion

M13 vorwärts 5' *-TGTA^{*}AAACGACGGCCAGT

M13 rückwärts 5' *-CAGGAAACAGCTATGACC

2.3 Modifizierter Rückwärtsprimer für den Enzymverdau in Exon 2

5' TCCCAAACAGTTTCAAGGTT 3'

(Als Vorwärtsprimer fand der erste in der oben aufgeführten Tabelle angegebene Primer für Exon 2 (F) Verwendung)

3. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.1 PCR-Reagenzien

Die Primer wurden von der Firma GibcoBRL synthetisiert und in Form getrockneter Pellets geliefert. Diese waren entsprechend ihrer Konzentration in TE-Puffer zu verdünnen, um eine 100µM Stammlösung herzustellen. Die Stammlösung wird 1:40 in H₂O verdünnt, um eine 2,5 µM Gebrauchslösung zu erstellen.

Im einzelnen wurden verwendet:

Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 U/µl), 10X PCR-Puffer und MgCl₂ (50mM) waren als Set bei der Firma GibcoBRL erhältlich.

1,2mM dNTP-Lösung (10X Konzentration) wurde durch Verdünnung von 60µl dNTP (jedes Nukleotid 20 mM, Pharmacia) in 940µl H₂O hergestellt.

Dimethyl Sulfoxid (≥99,9%) war bei der Firma SIGMA erhältlich.

Die DNA-Stammlösung (500µg/ml) wird 1:20 verdünnt, um eine Gebrauchslösung mit der Konzentration von 25 µg/ml zu erhalten.

3.2 PCR Ansatz und Konditionen

Alle Proben liefen auf dem Gene Amp® PCR System 9700 (PE) mit maximaler Aufheizgeschwindigkeit (Ramp Speed).

Es wurde jeweils mit 50µl Ansätzen gearbeitet, die sich wie unten beschrieben zusammensetzten.

Verwendung fanden dabei 200µl PCR-Softtubes der Firma Biozym.

Ansatz Pro Cup (50µl):

| Komponenten | Volumen | Endkonzentration |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 10X PCR-Puffer | 5 µl | 1X |
| 50mM MgCl ₂ | 1,5 µl | 1,5 mM |
| 1,2 mM dNTP | 5 µl | 120 µM (je dNTP) |
| Primer-Mix (je 2,5 µM) | 5 µl (je Primer) | 250 nM |
| Platinum <i>Taq</i> Polymerase | 0,2 µl | 1 Unit |
| DMSO (≥ 99,9%) | 2,5 µl | 5% |
| dest. H ₂ O | 21 µl | |
| DNA Template | 5µl | 125 ng |

PCR-Zyklen:

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Denaturierung | 4 min. bei 95°C |
| 30 Zyklen | { 30 sek. bei 95°C |
| | { 45 sek. bei Annealingtemp.* |
| | { 1 min. bei 72°C |
| Abschließende Extension | 5 min. bei 72°C |
| Abkühlung | auf 4°C |

* Die jeweilige exonabhängige Anlagerungstemperatur (Annealingtemp.) ist der Tabelle der verwendeten Primer zu entnehmen (Tab. 2.1).

Die PCR-Produkte anschließend bei 4°C oder -20°C lagern.

4. Enzymverdau

4.1 Materialien

Restriktionsenzym (*NlaIV*) und der dazugehörige Puffer Y⁺/Tango™ (33 mM Tris-Acetat, 10mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/ml BSA) sind als Set bei der Firma MBI Fermentas erhältlich.

4.2 Methode

Die PCR lief bei den unter 3.2 genannten Konditionen, jedoch gemäß Protokoll mit erhöhter MgCl-Konzentration (2.25 mM).

Als Vorwärtsprimer dient der unter 2.1 aufgeführte Vorwärtsprimer für Exon 2 (F) und als Rückwärtsprimer der unter 2.3 aufgeführte speziell für diesen Zweck modifizierte Primer. Das PCR-Produkt wird wie unten beschrieben mit der Restriktionsendonuklease *NlaIV* verdaut.

1. 15µl Ansatz: 1,5µl Puffer
8,5µl H₂O
0,25µl Restriktionsenzym (2,5 Units)
5µl DNA (PCR-Produkt)
2. Inkubation der Proben im Wasserbad bei der enzymespezifischen Temperatur (37°C) für mindestens 4 Stunden.
3. Auftragen der verdauten Proben auf ein Agarose-Gel für die Gelelektrophorese (siehe unten).

5. Agarose Gelelektrophorese der PCR-Produkte

5.1 Materialien

Loading-Puffer (5X): 30% Glycerin, 5% SDS, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,1% BPB (3ml Glycerin, 0,5ml SDS, 10mg Tris-HCl, 4mg EDTA, 10mg BPB, H₂O ad 10ml).

Größenstandart (1kB Leiter): Gemisch aus 15µl der 1kB-Leiter (Pharmacia), 25 µl Loading-Puffer und 60 µl H₂O.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,5 mg/ml in dest. H₂O.

5.2 Methode

1. Für mittelgroße Gele 3g SEAKEM[®] Agarose (FMC), NuSieve[®] Agarose (FMC) oder ein Gemisch beider zu 150 ml 1X TBE-Puffer (Bio Whittaker) geben. Anschließend gründlich mischen und in der Mikrowelle so lange erhitzen, bis die Agarose vollständig aufgelöst ist.
2. Die Lösung auf etwa 50°C abkühlen lassen, 75µl (0,5µl pro ml Gel) Ethidiumbromid-Stammlösung dazugeben und gründlich mischen
3. Die Agarose in eine Gelform gießen, den Kamm inserieren und das Gel auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Anschließend Kamm entfernen.
4. 5µl des PCR-Produkts oder des Enzymverdau-Reaktionsgemisches mit 2µl Loading-Puffer mischen und in die Taschen des Gels pipettieren. Die 1kB-Leiter als Standard in die anliegenden Taschen pipettieren.
5. Elektrophorese bei 5-10 V/cm (normalerweise 100 V) für eine angemessene Zeit laufen lassen.
6. Nach der Elektrophorese können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

6. Sequenzierung der DNA

6.1 Materialien

Thermo Sequenase™ fluorescent labelled Primer Kit (Amersham LIVE SCIENCE) enthält A- , C- , G- , T- Reagenz (dNTP`s, das entsprechende ddNTP, Magnesiumchlorid, Tween™ 20, Nonidet™ P-40, 2-Mercaptoethanol, thermostabile Pyrophosphatase und Thermo Sequenase DNA-Polymerase) und Formamid Loading-Dye (Formamid, EDTA und Methylviolet).

Sequagel-6 der Firma National Diagnostics umfaßt Monomerlösung (5,7% Acrylamid, 0,3% Methylen-Bisacrylamid und Harnstoff in 0,1M Tris-Borat und 2 mM EDTA-Puffer, pH 8,3) und Pufferlösung (5X TBE-Puffer und Katalysator in deionisiertem dest. H₂O).

Ammoniumpersulfat (98%) von der Firma Sigma, 1X TBE-Puffer (0,1 M Tris-Borat und 2mM EDTA, pH 8,3)

6.2 Cycle-Sequencing

1. Das gewünschte Exon, wie oben beschrieben, mittels PCR amplifizieren und 5µl des PCR-Produktes zur Kontrolle auf einem Agarose-Gel laufen lassen. Das Produkt nur dann sequenzieren, wenn eine einzelne starke Bande sichtbar ist.
2. Das PCR-Produkt durch zentrifugieren über QIUAquick-spin (Qiagen) Reinigungssäulchen den Herstellerangaben entsprechend aufreinigen.
3. Für jedes zu amplifizierende Exon zwei Ansätze erstellen (je einer pro DNA-Strang).

Von jedem Ansatz je 6µl in vier 200µl PCR-Softtubes pipettieren (jedes enthält 2 µl des entsprechenden A-; C-; G-, oder T-Reagenzes) (s. Abb. 2.1).

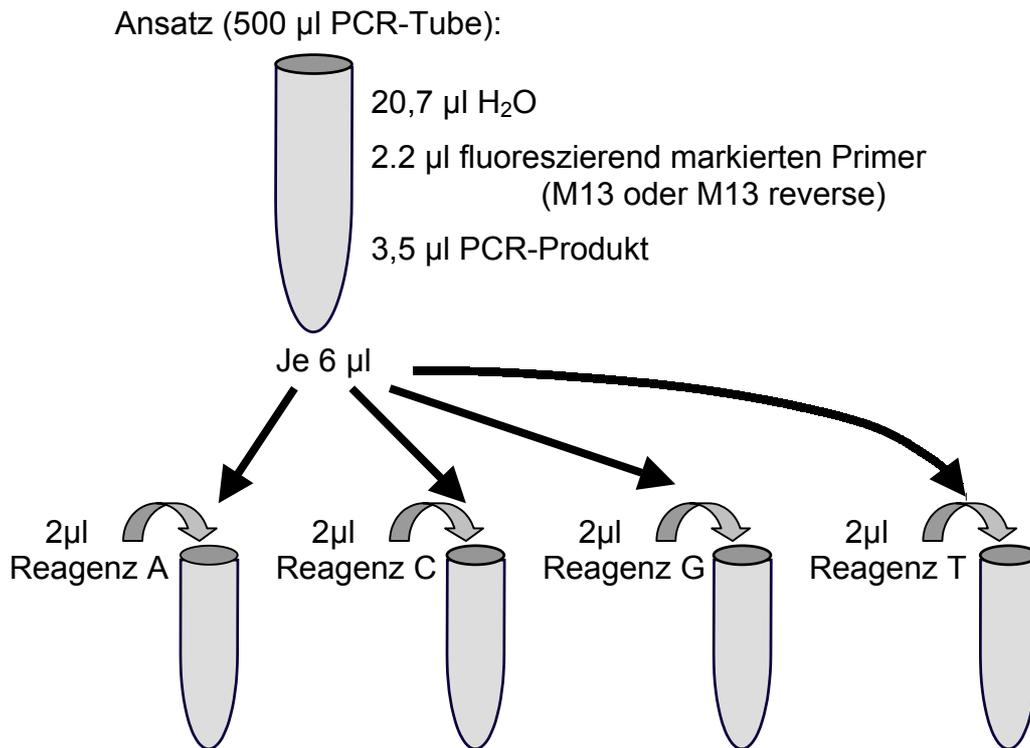


Abb. 2.1: Vorbereitung der Ansätze mit den vier unterschiedlichen *Dideoxynucleosid-triphosphat-Reagenzien* für das *Cycle-Sequencing*. In jedem Röhrchen (200 μl PCR-Softtubes) befinden sich letztlich 8 μl Cycle-Sequencing-Gemisch.

4. Die Cycle-Sequencing-PCR bei folgenden Konditionen auf dem Thermo-Cycler (Gene Amp[®] PCR System PE 9700) mit maximaler Ramp Speed laufen lassen:

| | | | | |
|-------------------------|---|------------------|------------------|-----------------|
| Denaturierung | 2 min. bei 95°C | | | |
| 25 Zyklen | <table> <tbody> <tr> <td>30 sek. bei 95°C</td> </tr> <tr> <td>30 sek. bei 68°C</td> </tr> <tr> <td>1 min. bei 72°C</td> </tr> </tbody> </table> | 30 sek. bei 95°C | 30 sek. bei 68°C | 1 min. bei 72°C |
| 30 sek. bei 95°C | | | | |
| 30 sek. bei 68°C | | | | |
| 1 min. bei 72°C | | | | |
| Abschließende Extension | 5 min. bei 72°C | | | |
| Abkühlung | auf 4°C | | | |

5. Anschließend 2 μl Formamid Loading-Dye zu den PCR-Produkten dazupipettieren und möglichst bald zum Sequenzieren auf das Polyacrylamid-Gel auftragen.

6.3 Herstellung des Polyacrylamid-Gels

1. Die Glasplatten gründlich mit nichtfluoreszierendem Detergenz (Alconox, Aldrich) reinigen, mit destilliertem Wasser und Ethanol absolut abspülen und trocknen lassen.
2. Die Deckplatte unter Verwendung der 0,5mm Spacer auf der Basis positionieren und mit Halteklammern arretieren. Den Kamm etwa bis zur Hälfte am oberen Ende der Apparatur zwischen die Platten schieben.
3. 40ml Monomerlösung und 10ml Pufferlösung (SequaGel-6) in einen dickwandigen Erlenmeyerkolben füllen und unter Rühren für 2-5 min entgasen.
4. 400µl frisch angesetzter 10%iger Ammoniumpersulfat Lösung zugeben und behutsam mischen.
5. Die Lösung vom unteren Rand her mit einer Spritze vorsichtig zwischen die Platten füllen und dabei die Entstehung von Luftblasen vermeiden.
6. Den Kamm nun vollständig einführen, mit Klammern fixieren und das Gel für etwa zwei Stunden polymerisieren lassen.

6.4 Sequenzierungs-Elektrophorese

1. Das Gel in den Sequenzierer (ALFexpress, Pharmacia Biotech) hängen, die Behälter am oberen und unteren Ende des Gels bis zur Markierung mit 1X TBE-Puffer füllen und behutsam den Kamm entfernen.
2. Die Taschen mit Puffer spülen, die Intensität des Lasers überprüfen und das Gerät für 15-30 min bei 34 W laufen lassen.
3. Gegebenenfalls die Proben in der Zwischenzeit durch zweiminütiges Erhitzen auf 90°C denaturieren und auf Eis stellen.
4. Die Taschen des Gels erneut mit Puffer spülen und die Proben in die nummerierten Taschen pipettieren (die Temperatur des Gels sollte etwa 50°C betragen).

5. Nach Überprüfung der Elektroden und der Laserintensität das Gel für 8-12 Stunden bei 34 W laufen lassen.
6. Anschließend die vom Gerät detektierten Banden mit Hilfe der Software (AM V3.02 auf dem OS/2 System) am Computer auswerten:
Aus der Reihenfolge der Banden (Peaks), die die Basen Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin repräsentieren, läßt sich die Sequenz des Gens erstellen.

C. Patientendaten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben von insgesamt neun Patienten mit enzymatisch nachgewiesenem Defekt der 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase auf Mutationen im *PTS*-Gen untersucht.

Die Patienten stammen aus Deutschland und England und sind unterschiedlicher ethnischer Herkunft.

Die detaillierten Patientendaten, laborchemischen Parameter, gemessenen Enzymaktivitäten und klinische Befunde sind, soweit sie verfügbar waren, in den folgenden Tabellen dargestellt (Tab. 2.2-2.4). Im Anschluß sind zum Vergleich die entsprechenden Normwerte der angegebenen Parameter aufgeführt (Tab. 2.5).

| Pat. | Geschl. | Land | ethn. Herk. | Enzymaktivität | Form der Erkrankung |
|------|---------|------|--------------|---|---------------------|
| 01 | m. | GB | arabisch | Enzymdefekt * | zentral |
| 02 | w. | D | kaukasisch | 2,3µU/g Hb (13%) | zentral |
| 03 | w. | D | türkisch | 0,78 µU/g Hb (4,4%) | zentral |
| 04 | m. | D | kaukasisch | 0,11 µU/g Hb (0,6%) | peripher |
| 05 | m. | D | kaukasisch | 0,42 µU/g Hb (2,4%) | zentral |
| 06 | m. | GB | indisch | 2,9 µU/g Hb (16%) | transient |
| 07 | w. | D | türkisch | 0 µU/g Hb (6 J.) 2,97 µU/g Hb (7 J.) | zentral |
| 08 | w. | GB | pakistanisch | 0 µU/g Hb | zentral |
| 09 | m. | D | kaukasisch | Enzymdefekt * | zentral |

Tab. 2.2: Auflistung der einzelnen Daten der untersuchten Patientenproben. In der rechten Seite der Tabelle sind die gemessenen Enzymaktivitäten sowie die Unterform der Erkrankung aufgeführt. Die Enzymaktivität wurde in Erythrozyten (µU/g Hb) gemessen. * Es liegt kein genauer Wert für die Enzymaktivität vor, lediglich ein Defekt ist enzymatisch verifiziert worden.

Bei einigen Patienten standen leider nur begrenzt oder auch keine Angaben mehr zur Klinik oder laborchemischen Parametern zur Verfügung. Ein Enzymdefekt ist aber in allen Fällen nachgewiesen worden, wenn auch in zwei Fällen keine genauen Werte für die Enzymaktivität vorliegen.

| Pat. | Neo (U) mmol/mol Kr. | Bio (U) mmol/mol Kr. | Neo (L) nmol/l | Bio (L) nmol/l |
|------|---|--|--|--|
| 01 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| 02 | 22,9 (2 Wo.) 3,0 (4 J.) | 0,2 (2 Wo.) 1,1 (4 J.) | 103 (2 Wo.) 169 (10 J. 6 Mo.) 69 (10 J. 7 Mo.) 70 (11 J. 9 Mo.) | 63 (2 Wo.) 23 (10 J. 6 Mo.) 8,7 (10 J. 7 Mo.) 7 (11 J. 9 Mo.) |
| 03 | 8,29 (7 J.) | 0,26 (7 J.) | 71,2 (7 J.) 163 (7 J. 1 Mo.) 40 (17 J. 9 Mo.) 57 (19 J.) | 9 (7 J.) 10,4 (7J. 1 Mo.) 2,4 (17 J. 9 Mo.) 3,5 (19 J.) |
| 04 | 18,1 (2 Wo.) 1,85 (13 J.) | 0,2 (2 Wo.) 0,35 (13 J.) | 96,0 (3 Wo.) 87,0 (7 Mo.) | 56,0 (3 Wo.) 15,0 (7 Mo.) |
| 05 | 43,4 (6 Mo.) 16,1 (14 J.) | 0,52 (6 Mo.) 0,13 (14 J.) | 115 (14 J.) 154 (15 J. 7 Mo.) 59,7 (15 J. 8 Mo.) 97 (16 J.) | 19 (14 J.) 14 (15 J. 7 Mo.) 5,3 (15 J. 8 Mo.) 6,9 (16 J.) |
| 06 | 23,0 (19 Tage.) | 0,5 (19 Tage.) | 122 (1 Mo.) 219 (1Mo. 2 Wo.) 236 (1 Mo. 3 Wo.) 56 (5 Mo. 2 Wo.) | 29,1 (1 Mo.) 26,6 (1 Mo. 2 Wo.) 68,3 (1 Mo. 3 Wo.) 12,0 (5 Mo. 2 Wo.) |
| 07 | 12,79 (1,5 Mo.) 1,9 (1,5 J.) 3,0 (16 J.) 1,9 (18 J.) 0,72 (20 J.) | 0,26 (1,5 Mo.) 1,2 (1,5 J.) 1,2 (16 J.) 1,3 (18 J.) 1,43 (20 J.) | 118,2 (5,5 J.) 127 (16, 5 J) 124 (18 J.) 142,8 (20 J.) | 6,6 (5,5 J.) 5,5 (16,5 J.) 2,3 (18 J.) 3,7 (20 J.) |
| 08 | 11,6 (2 Wo.) 9,07 (5 Mo.) | 0,0 (2 Wo.) 0,19 (5 Mo.) | 195,0 (2 Wo.) | 11,2 (2 Wo.) |
| 09 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |

Tab. 2.3: Darstellung der gemessenen Neopterin- und Biopterinwerte im Urin (U) und im Liquor (L). Die Anzahl der Messungen und das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Messung variiert z.T. erheblich, weil nicht alle Patienten regelmäßig untersucht wurden und auch keine genormten Untersuchungskriterien festgelegt wurden. ∅ Daten sind nicht verfügbar.

Von größter Bedeutung sind für uns unter den zur Verfügung stehenden Parametern die Messungen der Enzymaktivität, da eine verminderte Enzymaktivität sicherstes Indiz für funktionelle oder strukturelle Veränderungen des Proteins *in vivo* darstellt. Desweiteren unterliegt die Enzymaktivität nicht den Schwankungen, die bei Neopterin, Biopterin und den Neurotransmittermetaboliten gemessen werden. Die Schwankungen sind jeweils abhängig von Art der Therapie, Therapiebeginn und Änderungen in der Dosierung, die sich zum Teil auch in der klinischen Symptomatik widerspiegeln.

Fast durchgängig erhöht sind die Neopterinwerte, welche sich durch die Therapie mit BH₄ kaum beeinflussen lassen. Im Liquor sind die Biopterinwerte trotz Tetrahydrobiopterin-Substitution meist pathologisch erniedrigt, da dieses Pterin eine unzureichende Passage von der Peripherie ins ZNS aufweist (Gal et al. 1976).

| Pat. | 5HIA (L) mmol/l | HVA (L) mmol/l | Klinik |
|------|--|--|--|
| 01 | ∅ | ∅ | Hypotonus, okkulare Abweichungen, Entwicklungsstörung, Hypertonus (10 M.) |
| 02 | 194 (2 Wo.) 15 (1 Mo. 3 Wo.) 60 (10 J. 6 Mo.) 18 (10 J. 7 Mo.) 7 (11 J. 9 Mo.) | 536 (2 Wo.) 90 (1 Mo. 3 Wo.) 503 (10 J. 6 Mo.) 124 (10 J. 7 Mo.) 110 (11 J. 9 Mo.) | Bei ausschließlicher BH ₄ -Therapie recht guter AGZ abgesehen von Ataxie, Hypotonie, Dystonie der Mukulatur und abnormer Ermüdbarkeit. Bei Absetzen der BH ₄ -Substitution deutliche Verschlechterung der Syptomatik. |
| 03 | 14 (7 J.) 49 (7 J. 1 Mo.) 26 (14 J. 8 Mo.) 67 (17 J. 9 Mo.) 36 (19 J.) | 98 (7 J.) 151 (7 J. 1 Mo.) 141 (14 J. 8 Mo.) 155 (17 J. 9 Mo.) 140 (19 J.) | Bei Diagnosestellung mit erst 7 J. bereits psychomotorische Retardierung, Gangstörung, rezidivierende Krampfanfälle. Nach Therapie mit BH ₄ und Neurotransmittorstufen Verbesserung aber keine vollständige Aufhebung der Retardierung. Patientin ist trotz Therapie geistig wie körp. behindert. |
| 04 | 345 (3 Wo.) 92 (7 Mo.) | 827 (3 Wo.) 291 (7 Mo.) | unauffällige Entwicklung bei regelmäßiger BH ₄ -Substitution |
| 05 | 137 (14 J.) 10 (15 J. 7 Mo.) 32 (15 J. 8 Mo.) 62 (16 J.) | 490 (14 J.) 108 (15 J. 7 Mo.) 83 (15 J. 8 Mo.) 191 (16 J.) | Erhielt als Kleinkind lediglich phenylalaninarme Diät (inkorrekte Diagnose). Zunehmende psychomotorische Retardierung. Verbesserung des AZ nach adäquater Therapie. Nach kurzzeitigem Absetzen der Medikation im Alter von 15 Jahren starke Verschlechterung mit Krampfanfällen. |
| 06 | 390 (1 Mo.) 220 (1 Mo. 2 Wo.) 350 (1 Mo. 3 Wo.) 172 (5 Mo. 2 Wo.) 132 (8 Mo.) | 590 (1 Mo.) 380 (1 Mo. 2 Wo.) 600 (1 Mo. 3 Wo.) 395 (5 Mo. 2 Wo.) 385 (8 M.) | Im ersten Monat Hypertonus, Lethargie und Schluckprobleme, dann mit phenylalaninarmen Diät normale Entwicklung. |
| 07 | 501 (5,5 J.) 102 (16,5 J.) 40 (18 J.) 72 (20 J.) | 333 (5,5 J.) 428 (16,5 J.) 270 (18 J.) 166 (20 J.) | Als Kleinkind psychomotorischer Entwicklungsrückstand mit ausgeprägtem Hypotonus und mentaler Retardierung; später unter adäquat eingestellter Medikation normale Entwicklung bei gutem AGZ. |
| 08 | 113 (2 Wo.) 68 (1 J. 6 Mo.) | 231 (2 Wo.) 131 (1 J. 6 Mo.) | Entwicklungsstörungen (8 T.), Verbesserung mit 2 Wochen; später noch leichte Verzögerung in der Entwicklung und Hypotonus aber Verbesserung unter adäquater Therapie |
| 09 | ∅ | ∅ | ∅ |

Tab. 2.4: Darstellung der ermittelten Neurotransmittermetabolite im Liquor (L) sowie der klinischen Symptomatik. Die Neurotransmittermetabolite 5-Hydroxy-Indolazetat (5HIA) und Homovanillinsäure (HVA) sind infolge verringerter Neurotransmittersynthese bei Patienten mit der zentralen Form der Erkrankung pathologisch erniedrigt, unterliegen jedoch therapieabhängigen Schwankungen. ∅ Daten sind nicht verfügbar.

Zum besseren Verständnis der aufgeführten Werte und um die gemessenen laborchemischen Parameter leichter einordnen zu können, sind abschließend in der folgenden Tabelle alle Normwerte aufgeführt.

| | neonatal | < 1 Jahr | 2-4 J. | 5-10 J. | 11-16 J. | >16 Jahre |
|--------------------------------|----------|----------|---------|---------|----------|-----------|
| Neo (U) mmol/mol Kr. | 1,1-4,0 | 1,1-4,0 | 1,1-4,0 | 1,1-4,0 | 0,2-1,7 | 0,2-1,7 |
| Bio (U) mmol/mol Kr. | 0,5-3,0 | 0,5-3,0 | 0,5-3,0 | 0,5-3,0 | 0,5-2,7 | 0,5-2,7 |
| Neo (L) nmol/l | 9-40 | 9-40 | 9-30 | 9-20 | 9-20 | 9-20 |
| Bio (L) nmol/l | 10-50 | 10-50 | 10-40 | 10-30 | 10-30 | 10-30 |
| 5HIA (L) nmol/l | 144-800 | 114-336 | 105-299 | 88-178 | 74-136 | 66-141 |
| HVA (L) nmol/l | 300-1000 | 295-932 | 211-871 | 144-801 | 133-551 | 115-488 |
| PTPS (FB) μU/mg % | 1,9-2,4 | 1,9-2,4 | 1,9-2,4 | 1,9-2,4 | | |
| PTPS (Ery) μU/g Hb | 34-64 | 34-64 | 34-64 | 34-64 | 11-29 | 11-29 |

Abb. 2.6: Darstellung der Normalwerte der Pterine in Urin (U) und Liquor (L), Neurotransmittermetabolite und der PTPS-Enzymaktivität in Fibroblasten (FB) und Erythrozyten (Ery).

KAPITEL III : ERGEBNISSE

A. Übersicht der gefundenen Mutationen

Im Rahmen der Untersuchung standen Proben von insgesamt neun Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft aus Deutschland und England zur Verfügung, die zur Mutationsanalyse eingehend sequenziert und zum Teil zusätzlich mittels Enzymverdau analysiert wurden.

Es wurden im ganzen zwölf unterschiedliche Mutationen im codierenden Bereich des *PTS*-Gens nachgewiesen. Fünf waren homozygot, die übrigen sieben lagen *compound* heterozygot vor. Es wurden eine Deletion und eine Insertion nachgewiesen, die übrigen zehn Mutationen bestanden in Substitution einzelner Basen. Darunter waren neun Missense-Mutationen und eine Nonsense-Mutation. Nur zwei der Missense-Mutationen waren konservativ (Austausch durch eine chem. verwandte AS), die übrigen sieben waren nichtkonservativ (Austausch durch AS unterschiedlicher Strukturklasse bzw. Polarität). Alle Mutationen waren lediglich auf die Exons 1, 2, 5 und 6 beschränkt wohingegen in Exon 3 und 4 keine Mutationen gefunden wurden. Zusätzlich konnte auch eine Substitution in Intron 2 (nichtcodierende Sequenz) nachgewiesen werden.

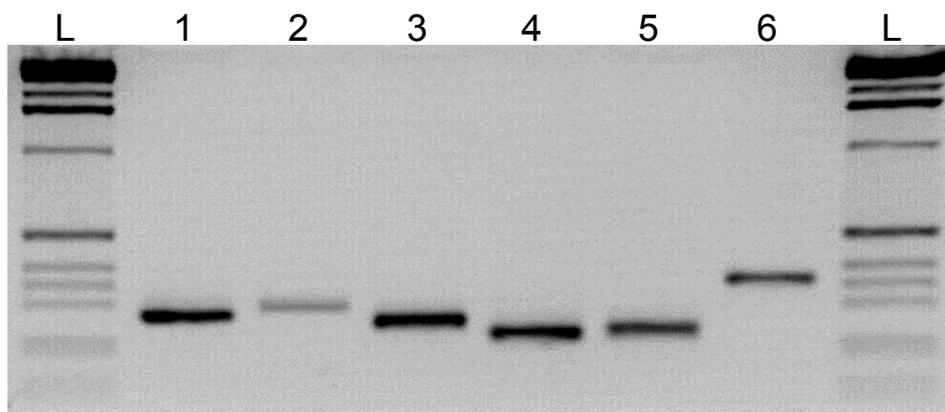


Abb. 3.1: Darstellung der PCR-Amplifikationsprodukte aller sechs Exons des *PTS*-Gens mittels Gelelektrophorese (Agarose). Die Exons sind von 1-6 durchnummeriert. L = Größenstandard (1 kb Leiter).

Die PCR-Amplifikationsprodukte aller sechs Exons des *PTS*-Gens sind in Abb. 3.1 dargestellt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen der Exons in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung sind detailliert in Teil B dieses Kapitels aufgeführt. In der unten abgebildeten Tabelle (Tab.3.1) sind alle im Rahmen dieser Untersuchung gefundenen Mutationen in aufsteigender Reihenfolge (bezogen auf die genomische DNA) dargestellt. Ferner sind die Basenänderungen sowie die Auswirkungen auf die resultierenden Aminosäuren aufgeführt. Die in Intron 2 gefundene Basenänderung (IVS2+14t>c), bei der es sich vermutlich nur um einen Polymorphismus handelt (s. Kap. IV - B), ist in der Tabelle nicht dargestellt.

| Nukleotid-aberration ^a | Mutation (Trivialnahme) ^b | Lokalisation im <i>PTS</i> -Gen | Aminosäuren ^c |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| g.51_52insCGC | R17_I18insR | Exon 1 | Insertion von Arg |
| g.65C>G | A22G | Exon 1 | Ala (aliph.)> Gly (aliph.) |
| g.74G>A | R25Q | Exon 1 | Arg (basisch)> Gln (neutral) |
| g.2121A>G | E35G | Exon 2 | Glu (sauer)> Gly (aliph.) |
| g.2135_2138delTTTG | F40fsX56 | Exon 2 | Verschieb. d. Leserasters mit vorzeitigem Kettenabbruch bei AS 56 |
| g.6683C>T | P87L | Exon 5 | Pro (Imino.)> Leu (aliph.) |
| g.6720C>A | Y99X | Exon 5 | Tyr (arom.)> Stop |
| g.6725C>T | A101V | Exon 5 | Ala (aliph.)> Val (aliph.) |
| g.6959A>G | Y113C | Exon 6 | Tyr (arom.)> Cys (schwef.) |
| g.6994G>A | G125R | Exon 6 | Gly (aliph.)> Arg (basisch) |
| g.7028A>G | D136G | Exon 6 | Asp (sauer)> Gly (aliph.) |
| g.7033A>C | N138H | Exon 6 | Asn (neutral)> His (arom./bas.) |

Tab. 3.1: Tabellarische Auflistung aller entdeckten Mutationen in aufsteigender Reihenfolge im *PTS*-Gen. ^a Die Numerierung der Nukleotide bezieht sich auf die genomische (g.) DNA-Sequenz (*GenBank* L76259) und beginnt mit Adenosin des ATG-Start-Codons. ^b Sequenzveränderung auf Protein-Ebene. Die Numerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz, die AS sind durch *Ein-Buchstaben-Symbol* abgekürzt. ^c Effekt auf die betroffenen Aminosäuren. Die unterschiedlichen Strukturklassen der jeweiligen Aminosäuren sind in Klammern angegeben (aliph. : aliphatisch ; Imino. : Iminosäure ; arom. : aromatisch ; schwef. : schwefelhaltig ; bas. : basisch).

In der folgenden Tabelle (Tab. 3.2) sind die untersuchten Patienten mit den jeweils ermittelten Genotypen dargestellt. Die Basenänderung in Intron 2 (IVS2+14c>t) wurde bei Patient 08 homozygot – zusätzlich zu der Mutation R25Q – nachgewiesen (nicht in Tabelle gezeigt).

| Pat.-Nr. | Genotyp |
|----------|---|
| 01 | [A22G]+[A22G] (homozygot) |
| 02 | [E35G]+[E35G] (homozygot) |
| 03 | [R17_18insR]+[D136G] (<i>compound</i> heterozygot) |
| 04 | [P87L]+[Y113C] (<i>compound</i> heterozygot) |
| 05 | [Y99X]+[A101V] (<i>compound</i> heterozygot) |
| 06 | [N138H]+[N138H] (homozygot) |
| 07 | [G125R]+[G125R] (homozygot) |
| 08 | *[R25Q]+[R25Q] (homozygot) |
| 09 | [F40fsX56]+[Y99X] (<i>compound</i> heterozygot) |

Tab. 3.2: Darstellung der unterschiedlichen Genotypen der untersuchten Patienten. Die Mutationen sind mit den jeweiligen Trivialnamen bezeichnet (Veränderung der AS-Sequenz); Nomenklatur entsprechend den aktuellen Empfehlungen (Dunnen; Antonarakis 2000). * Bei Patient 08 wurde zusätzlich eine Basenänderung in Intron 2 (IVS2+14t>c) gefunden.

B. Sequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzierungsergebnisse der unterschiedlichen Mutationen aufgeführt. Für jede Mutation ist jeweils ein Auszug der relevanten Sequenz des codogenen und des komplementären DNA-Stranges sowie die Kontrollsequenz eines nicht erkrankten Individuums dargestellt.

R17_I18insR (Exon 1)

Diese heterozygote, bei Patient 03 detektierte Mutation führt zu einer Insertion der drei Basen CGC zwischen den Codons 17 und 18 in Exon 1 und verlängert somit das Translationsprodukt um die Aminosäure Arginin. Eine Verschiebung des Leserasters wird, da es sich um die Insertion eines kompletten Codons handelt, nicht erzeugt (sogenannte „*in-frame*-Insertion“).

Weil nur ein Chromosom von der Insertion betroffen ist (Heterozygotie), kommt es bei der Sequenzierung zu einer Verschiebung der beiden Sequenzen um drei Basen, was sich in einer Überlagerung der unterschiedlichen Peaks im Bereich nach der Mutation darstellt (Abb. 3.2a).

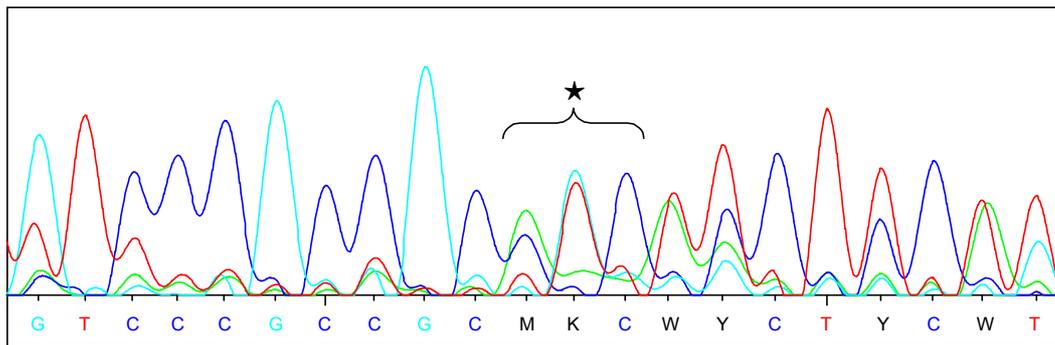


Abb. 3.2a: ★ Insertion des Triplets CGC in Exon 1 zwischen den Codons 17 und 18 (heterozygot)

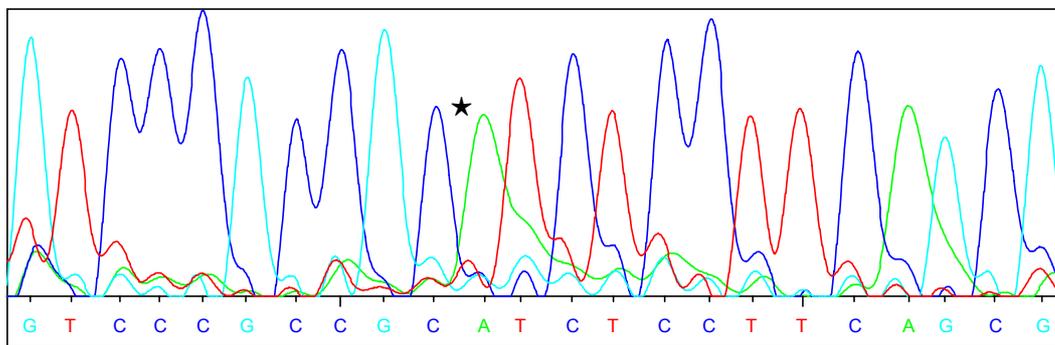


Abb. 3.2b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 1

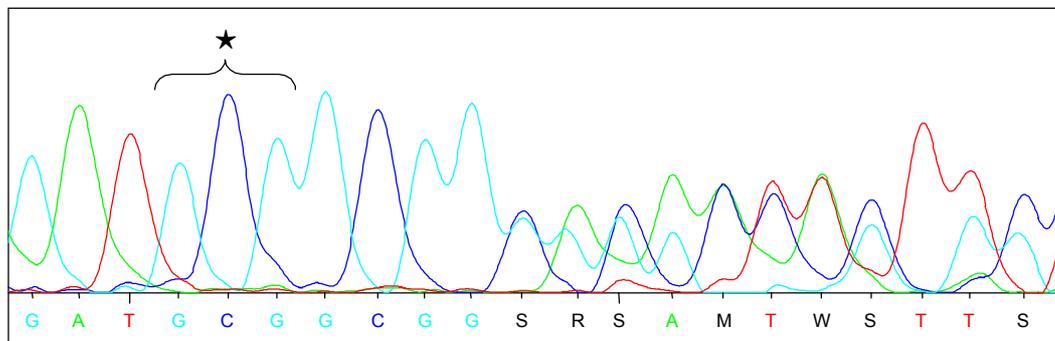


Abb. 3.2c: ★ Insertion des Triplets GCG auf dem komplementären DNA-Strang

A22G (Exon 1)

Diese homozygote Mutation in Exon 1, die bei Patient 01 ermittelt wurde, stellt sich in einer Substitution der Base Cytosin durch Guanin an Position 65 der genomischen DNA des *PTS*-Gens dar. Infolge der Mutation kommt es durch die Änderung in Codon Nr. 22 im Translationsprodukt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin (GCG) durch Glycin (GGG).

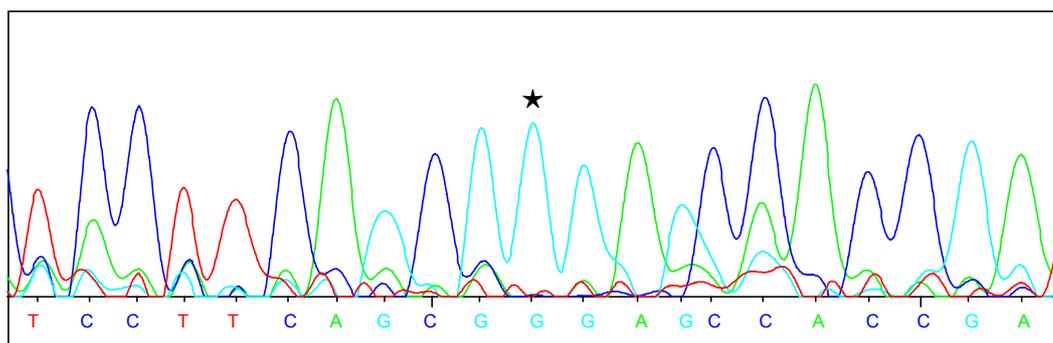


Abb. 3.3a: ★ Substitution der Base C durch G an Position 65 der genomischen DNA in Exon 1 des *PTS*-Gens (homozygot)

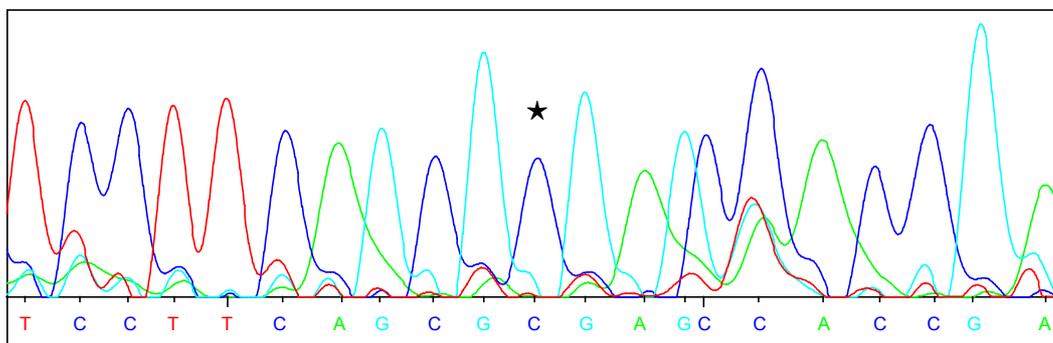


Abb. 3.3b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 1

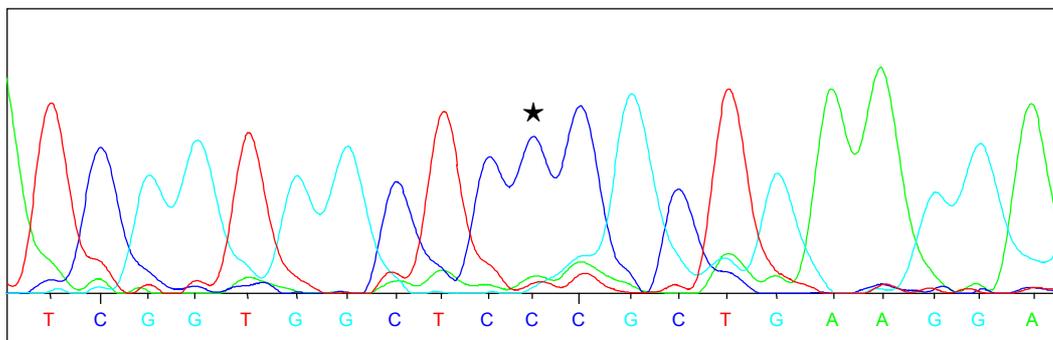


Abb. 3.3c: ★ Substitution der Base G durch C auf dem komplementären DNA-Strang

R25Q (Exon 1)

Diese Mutation in Exon 1, die bei Patient 08 homozygot beobachtet wurde und bereits durch Thöny und Oppliger beschrieben worden ist (Thöny et al. 1994b; Oppliger et al. 1995a), stellt sich in der Substitution der Base Guanin durch Adenin an Position 74 der genomischen DNA des *PTS*-Gens dar. Es handelt sich in diesem Fall um eine „CpG-Mutation“ (s. Kap. IV -B). Das Codon Nr. 25 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Arginin (CGA), sondern für die Aminosäure Glutamin (CAA).

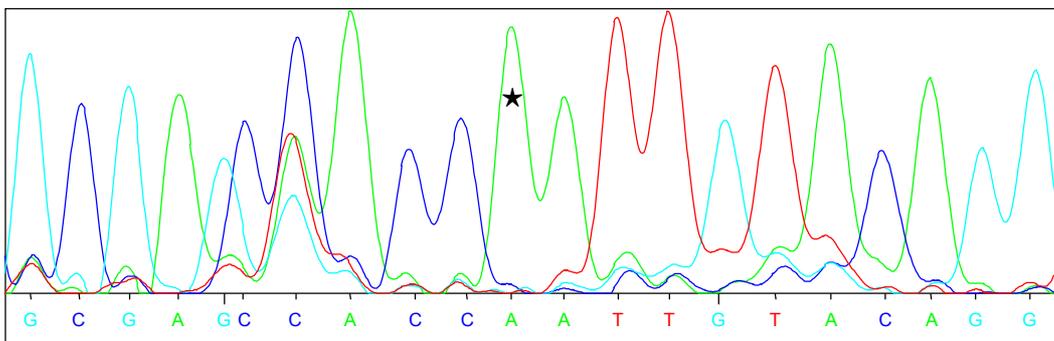


Abb. 3.4a: ★ Substitution der Base G durch A an Position 74 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 1 (homozygot)

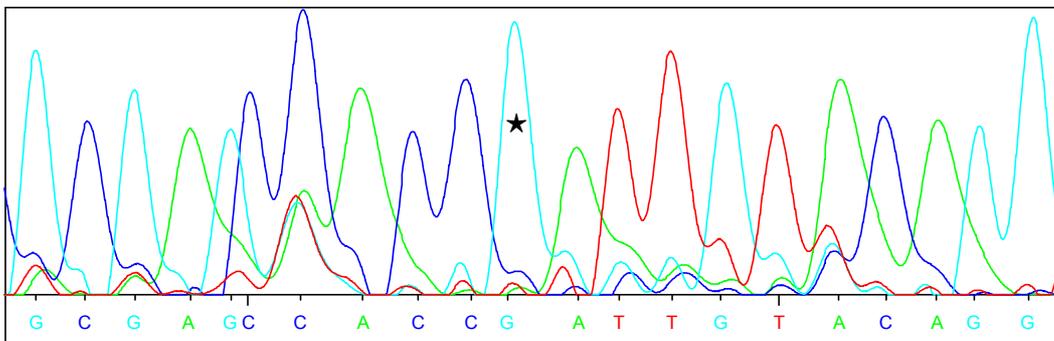


Abb. 3.4b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 1

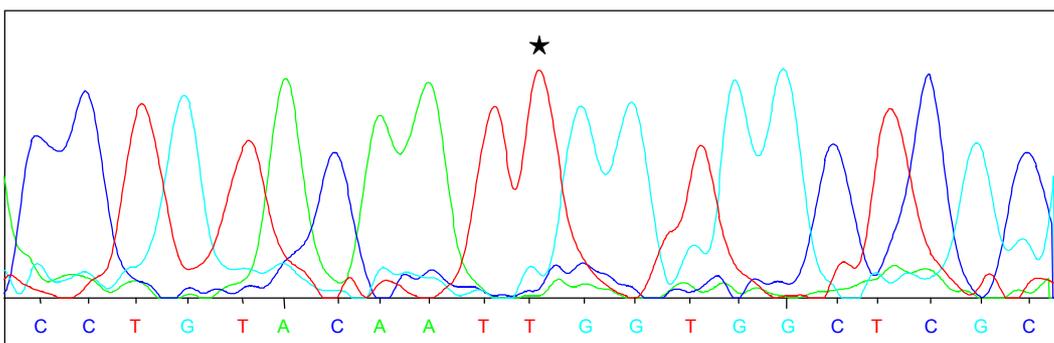


Abb. 3.4c: ★ Substitution der Base C durch T auf dem komplementären DNA-Strang

E35G (Exon 2)

Diese Mutation in Exon 2, die bei Patient 02 homozygot gefunden wurde, besteht in einer Substitution der Base Adenin durch Guanin an Position 2121 der genomischen DNA des *PTS*-Gens.

Das Codon Nr. 35 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Glutaminsäure (GAA) sondern für Glycin (GGA).

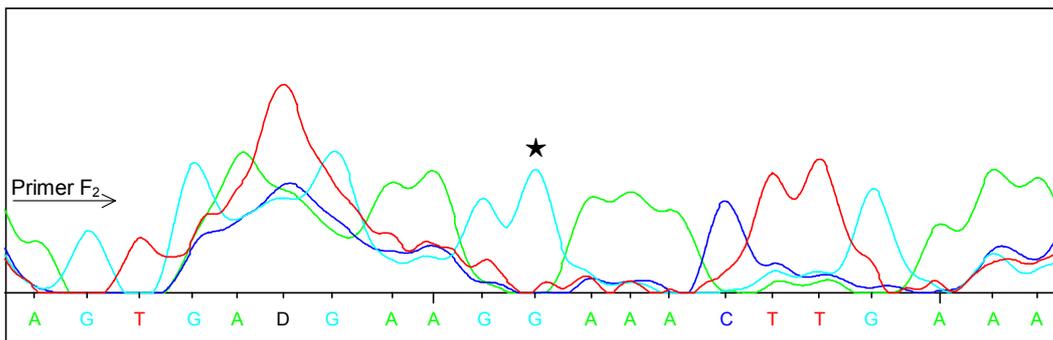


Abb. 3.5a: ★ Substitution der Base A durch G an Position 2121 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 2 (homozygot). Der Pfeil kennzeichnet das Ende des verwendeten Primers F₂. Die wellenartige Erhebung der Sequenz ist vermutlich Folge von unspezifischen Kettenabbrüchen, wie sie häufiger direkt am Beginn einer Sequenz beobachtet wird. Sie wird wahrscheinlich durch "Umklappen" der Anfangssequenz und somit Fehlpaarung verursacht.

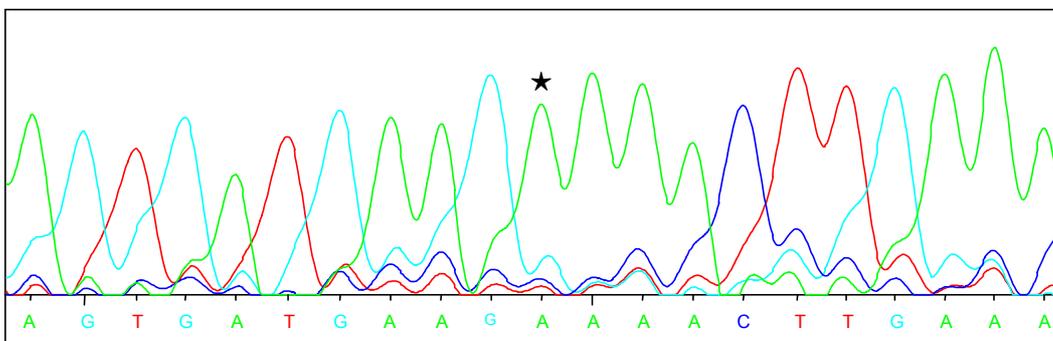


Abb. 3.5b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 2

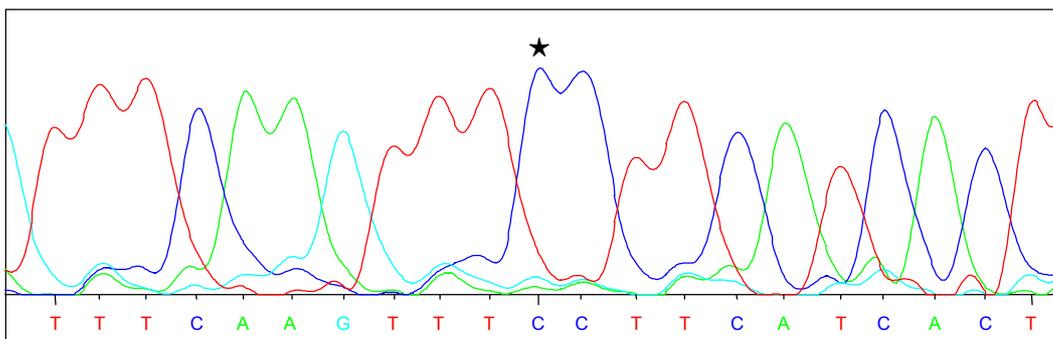


Abb. 3.5c: ★ Substitution der Base T durch C auf dem komplementären DNA-Strang

Zusätzlich zur Sequenzierung wurde für die Mutation E35G ein Enzymverdau durchgeführt (s. Abb. 3.5d). Hierfür wurde eigens ein modifizierter Rückwärtsprimer entwickelt, da durch die Mutation alleine keine palindromische Sequenz entsteht (s. Kap. II - A 3 und II - B 4). Bei Verwendung der beschriebenen Primer (Kap. II-B 2.1+2.3) entsteht ein Amplifikationsprodukt von 119 Basen Länge.

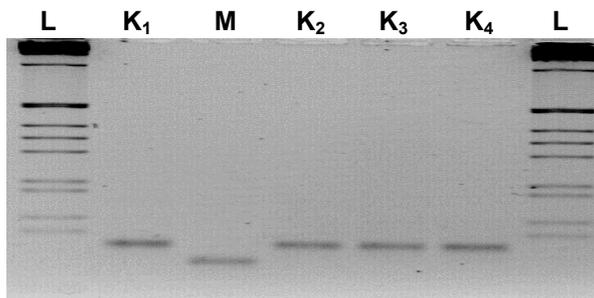


Abb. 3.5d: Enzymverdau des Amplifikationsproduktes aus Exon 2 (modifizierter Rückwärtsprimer) mit dem Restriktionsenzym BspI (NlaIV). L: Größenstandart (1kb Leiter); K₁-K₄: Kontrollen; M: Probe mit Mutation (homozygot)

Bei Vorliegen der Mutation E35G entsteht die palindromische Sequenz 5`...GGAACC...3`, welche durch die Restriktionsendonuklease NlaIV mittig gespalten wird. Als Resultat entstehen zwei Fragmente von 19 bzw. 100 Basen Länge. Das kürzere 19 Basen lange Fragment ist wegen seiner geringen Größe auf dem Agarosegel nicht mehr darstellbar, weshalb man bei Vorliegen der homozygoten Mutation (M) nur eine Bande, die etwas schneller wandert als die der 119 Basen langen Kontrollprodukte (K₁-K₄), erkennen kann. Läge die Mutation heterozygot vor, so wäre noch eine zusätzliche Bande (das größere, ungespaltene Fragment von 119 Basen Länge) sichtbar.

Poly-T-Segment

Sechs Basen vor Exon 2 befindet sich eine Poly-T-Sequenz von 15 Basen Länge. Bei Verwendung des Vorwärtsprimers „Exon 2 F“ (Tab. 2.1), welcher sich vor der besagten Sequenz anlagert, kommt es bei Sequenzierung in Vorwärtsrichtung am Ende des Poly-T-Segmentes zu einem Abriß der lesbaren Sequenz (Abb. 3.6), die dazu führt, daß die nachfolgende Sequenz in Vorwärtsrichtung unlesbar wird. Vermutlich kommt es nach dem Poly-T-Segment zu unspezifischen Kettenabbüchen.

Um den Bereich trotzdem vorwärts sequenzieren zu können, wurde ein zweiter Primer, der sich erst später an die DNA-Templete anlagert (Exon 2 F₂) hergestellt.

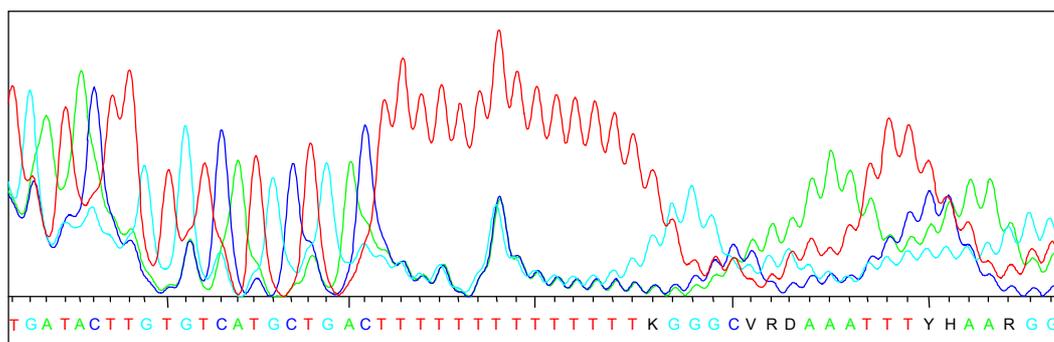


Abb. 3.6: „Abriß“ der Sequenz nach dem Poly-T-Segment vor Exon 2 bei Verwendung des ersten Vorwärtsprimers (s. Protokolle 2.1)

F40fsX56 (Exon 2)

Diese heterozygote bei Patient 09 beobachtete Mutation in Exon 2 zeichnet sich durch eine Deletion der vier Basen TTTG an Position 2135-2138 der genomischen DNA des *PTS*-Gens aus. Weil nur ein Chromosom von der Mutation betroffen ist, verschieben sich im Bereich nach der Mutation die beiden Läufe bei der Sequenzierung um 4 Basen, wodurch eine Überlagerung der Peaks die Sequenz schlecht lesbar macht. Zusätzlich ist eine Reduktion der Peaks auf etwa die Hälfte ihrer ursprünglichen Höhe deutlich erkennbar (Abb. 3.7b).

Weil von der Deletion keine *kompletten* Codons betroffen sind, kommt es infolge der Mutation zu einer Verschiebung des Leserasters (*Frameshift*) und somit zu einer Veränderung der Aminosäuren im Genprodukt (Abb. 3.8a). Infolge der Leserasterverschiebung kommt es zum frühzeitigen Entstehen eines Stopcodons und somit zum Translationsabbruch bereits bei Codon 56.

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 037 | 038 | 039 | 040 | 041 | 042 | 043 | 044 | 045 | 046 | 047 | 048 | 049 | 050 |
| | TTG | AAA | CTG | ^{Del} GGA | AAT | GCA | ACA | ATC | CAA | ATG | GCC | ATG | GGC | ACA |
| A | Leu | Lys | Leu | Gly | Asn | Ala | Thr | Ile | Gln | Met | Ala | Met | Gly | Thr |
| | 037 | 038 | 039 | 040 | 041 | 042 | 043 | 044 | 045 | 046 | 047 | 048 | 049 | 050 |
| | TTG | AAA | CTG | TTT | GGG | AAA | TGC | AAC | AAT | CCA | AAT | GGC | CAT | GGG |
| B | Leu | Lys | Leu | Phe | Gly | Lys | Cys | Asn | Asn | Pro | Asn | Gly | His | Gly |

Abb. 3.7a: A: Sequenz im Bereich der Deletion der vier Basen TTTG in Exon 2 des *PTS*-Gens; B: Kontrollsequenz. In der ersten Zeile ist jeweils die Nummer des Codons, in der zweiten die Sequenz und in der dritten die resultierende Aminosäure angegeben. Der graue Balken kennzeichnet die durch die Deletion veränderten Aminosäuren und der kleine Kasten die Deletion.

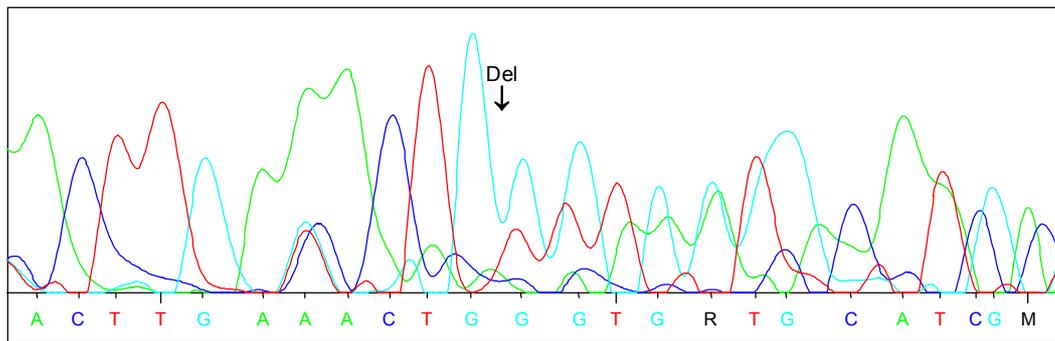


Abb. 3.7b: ↓ Deletion der vier Basen TTTG in Exon 2 an Position 2135-2138 der genomischen DNA des *PTS*-Gens (heterozygot)

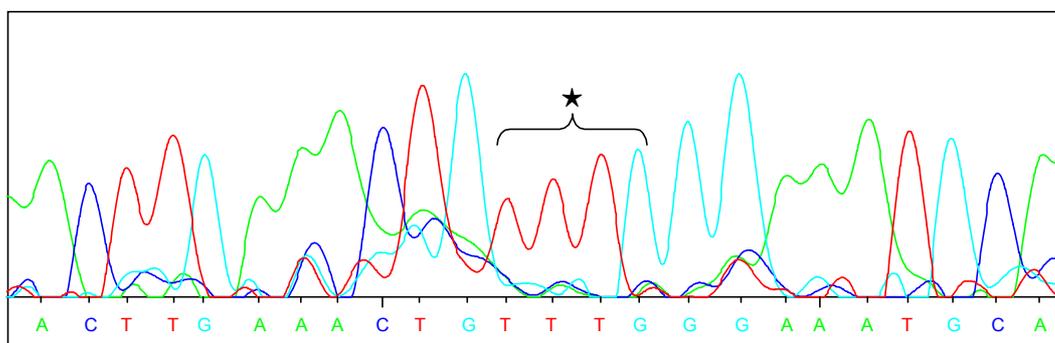


Abb. 3.7c: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 2. ★ Die von der Deletion betroffenen Basen (TTTG) sind durch die Klammer gekennzeichnet.

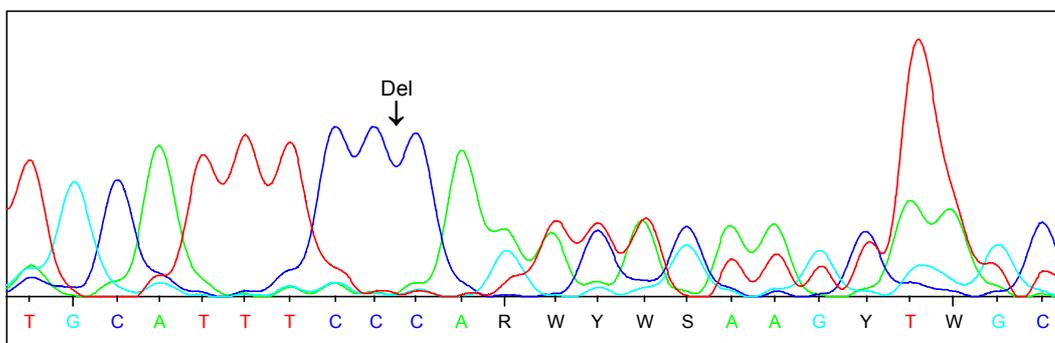


Abb. 3.7d: ↓ Deletion der vier Basen CAAA auf dem komplementären DNA-Strang (heterozygot)

IVS2+14t>c (Intron 2)

Die Substitution der Base Thymin durch Cytosin an Position 2194 der genomischen DNA des *PTS*-Gens (Im Intronbereich, 14 Basen nach Exon 2) wurde bei Patient 08 homozygot nachgewiesen (Abb. 3.8a), zusätzlich zu der Mutation R25Q, die ebenfalls homozygot auftrat. Es liegt in diesem Fall eine Mutation des CpG-Dinukleotids (s. Kap IV-B) vor. Bei dieser Basenänderung im Intronbereich handelt es sich vermutlich nicht um eine krankheitsauslösende Mutation, sondern um einen Polymorphismus (s. Kap. IV - B).

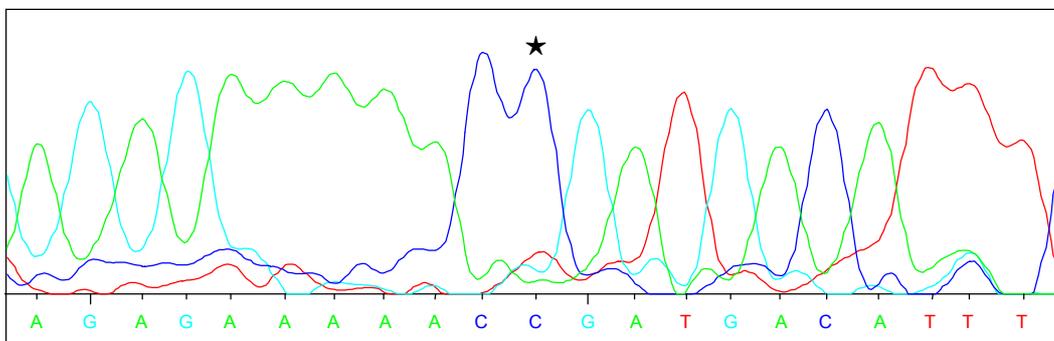


Abb 3.8a: ★ Substitution der Base T durch C an Position 2194 der genomischen DNA des *PTS*-Gens im Intron nach Exon 2 (homozygot)

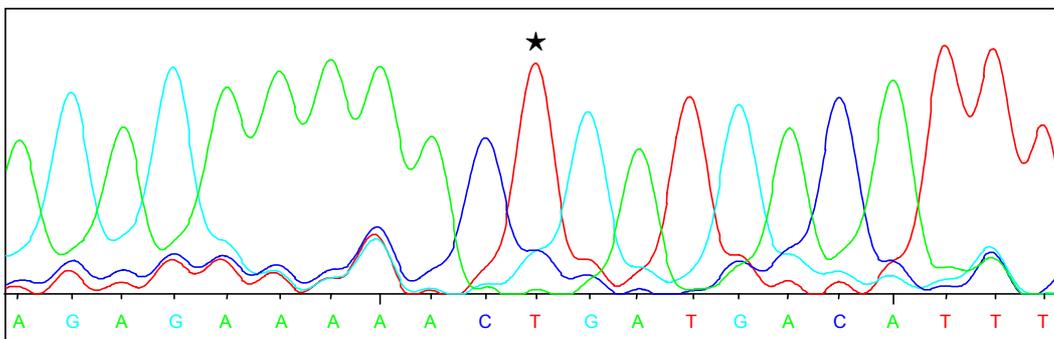


Abb. 3.8c: Kontrolle der relevanten Sequenz (4-24 Basen nach Exon 2)

P87L (Exon 5)

Diese Mutation in Exon 5, die bei Patient 04 heterozygot vorliegt, besteht in einer Substitution der Base Cytosin durch Thymin an Position 6683 der genomischen DNA des *PTS*-Gens (Abb. 3.9a) und wurde bereits von Oppliger beschrieben (Oppliger et al. 1995a).

Das Codon Nr. 87 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Prolin (CCC) sondern für Leucin (CTC).

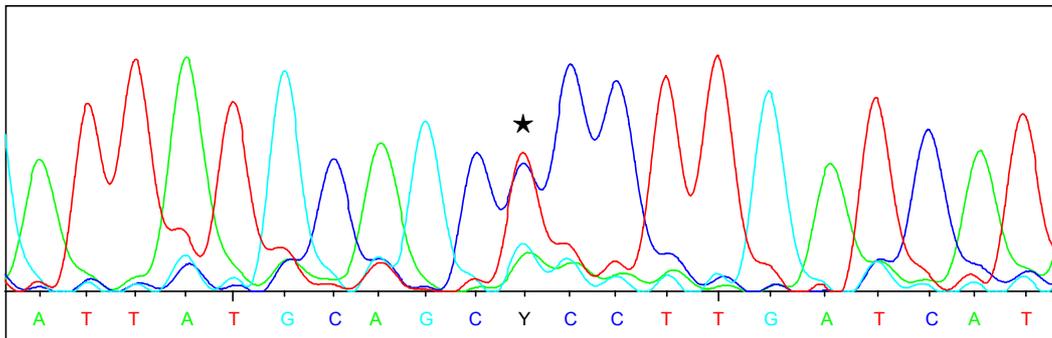


Abb. 3.9a: ★ Substitution der Base C durch T bei Position 6683 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 5 (heterozygot)

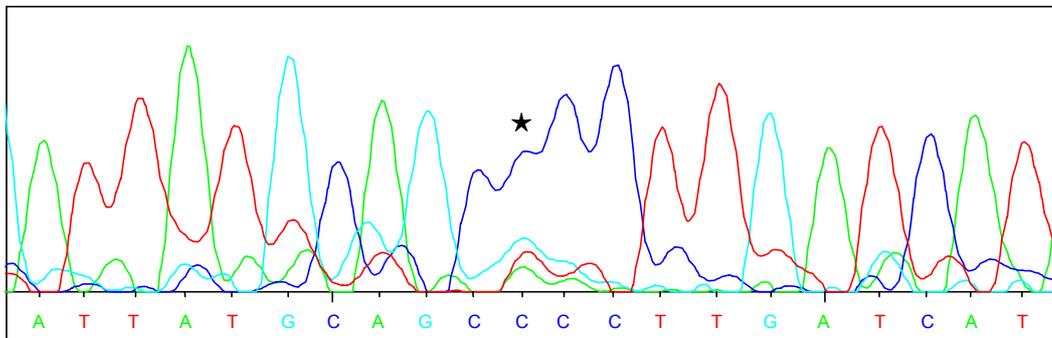


Abb. 3.9b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 5

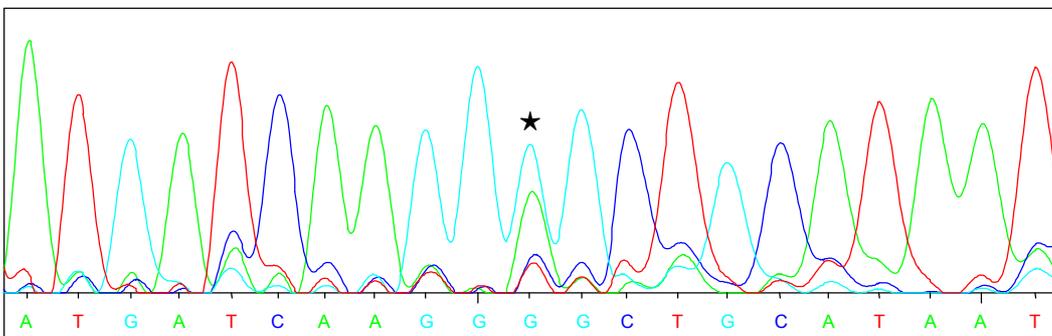


Abb. 3.9c: ★ Substitution der Base G durch A auf dem komplementären DNA-Strang

Y99X (Exon 5)

Die Mutation Y99X wurde in zwei Fällen des untersuchten Patientenkollektivs jeweils in heterozygoter Form, sowohl bei Patient 09 (Abb. 3.10a) als auch bei Patient 05 (Abb.3.11a), nachgewiesen. Bei Patient 05 wurde in Exon 5 zusätzlich unmittelbar benachbart die Mutation A101V gefunden. Die Substitution der Base Cytosin durch Adenin an Position 6720 der genomischen DNA des *PTS*-Gens verändert das Codon Nr. 99, welches zuvor für die Aminosäure Tyrosin (TAC) codierte zu einem Stopcodon (TAA).

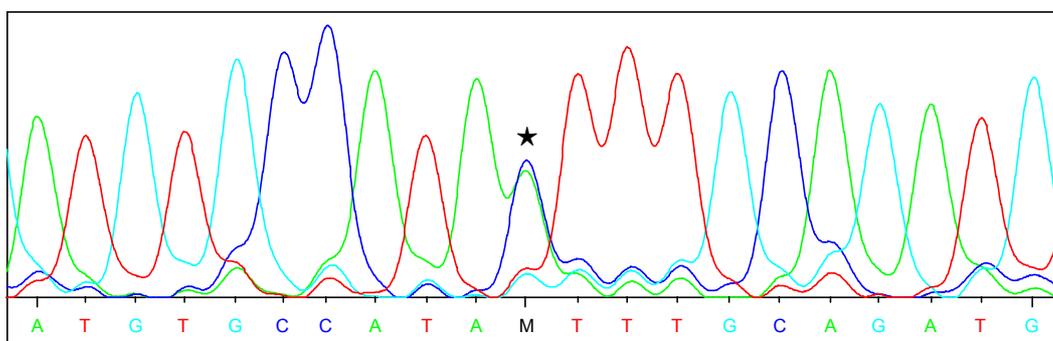


Abb. 3.10a: ★ Substitution der Base C durch A an Position 6720 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 5 (heterozygot)

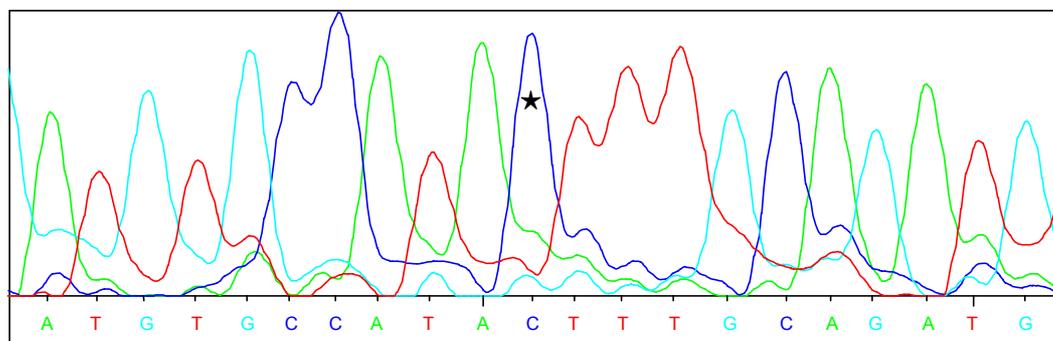


Abb. 3.10b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 5

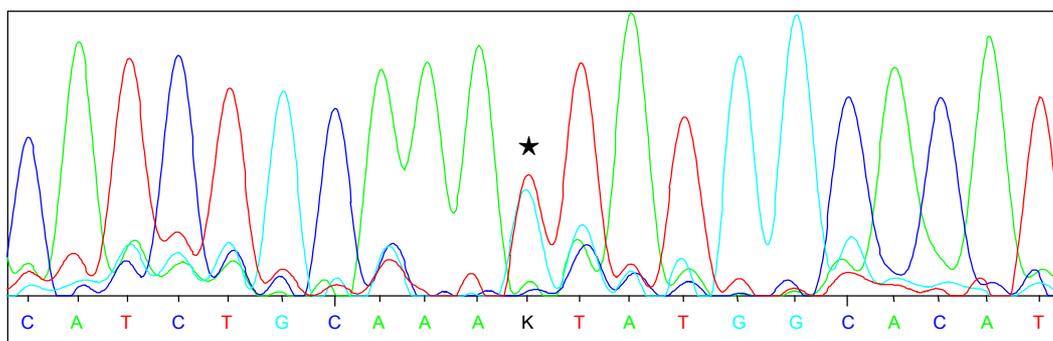


Abb. 3.10c: ★ Substitution der Base G durch T auf dem komplementärem DNA-Strang

A101V (Exon 5)

Die Mutation A101V in Exon 5, die bei Patient 05 heterozygot und dort in unmittelbarer Nachbarschaft zur Mutation Y99X vorliegt (Abb. 3.11a), zeigt sich in der Substitution der Base Cytosin durch Thymin an Position 6725 der genomischen DNA des *PTS*-Gens.

Das Codon Nr. 101 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Alanin (GCA) sondern für Valin (GTA).

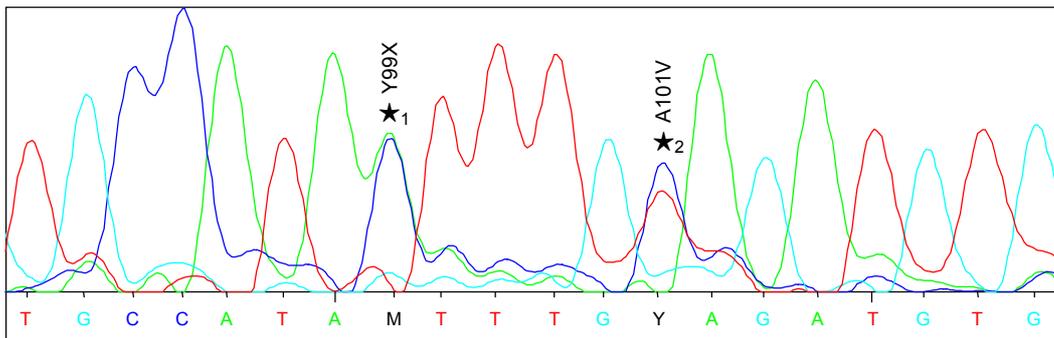


Abb. 3.11a: ★₁ Substitution der Base C durch A an Position 6720 und ★₂ der Base C durch T an Position 6725 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 5 (jeweils heterozygot)

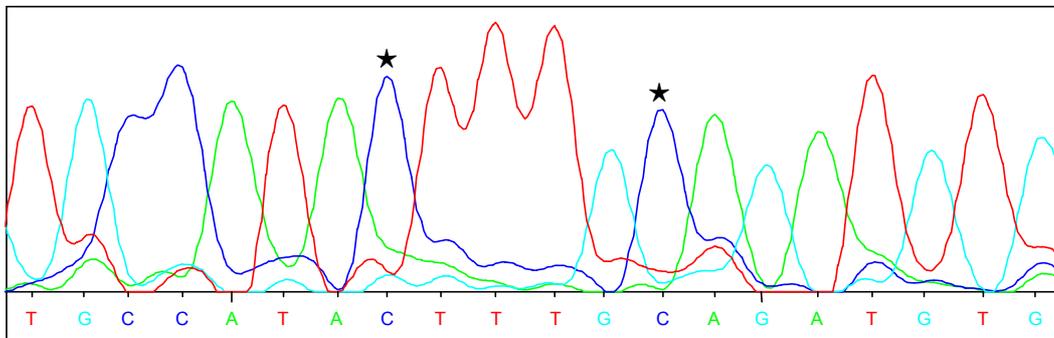


Abb. 3.11b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 5

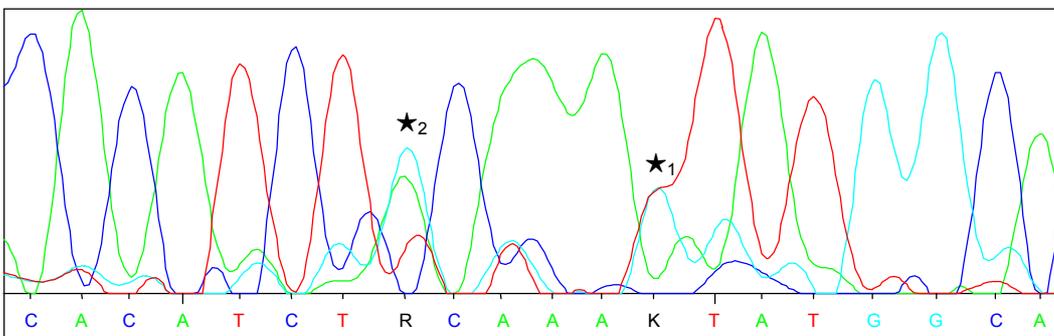


Abb. 3.11c: ★₂ Substitution der Base G durch A und ★₁ Substitution der Base G durch T auf dem komplementären DNA-Strang

Y113C (Exon 6)

Die Mutation Y113C in Exon 6, die bei Patient 04 heterozygot vorliegt, besteht in einer Substitution der Base Adenin durch Guanin an Position 6959 der genomischen DNA des *PTS*-Gens.

Das Codon Nr. 113 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Tyrosin (TAT) sondern für Cystein (TGT).

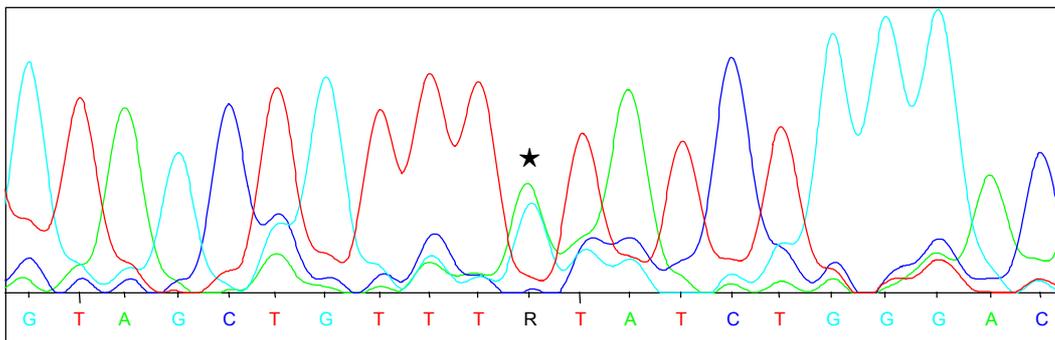


Abb. 3.12a: ★Substitution der Base A durch G an Position 6959 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 6 (heterozygot)

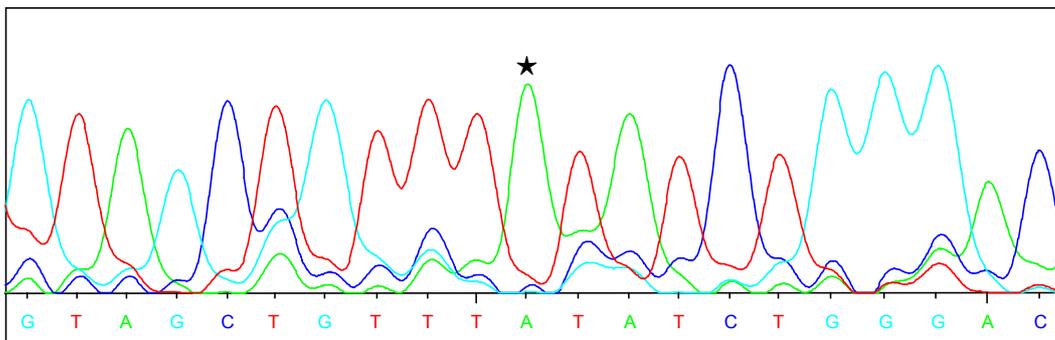


Abb. 3.12b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 6

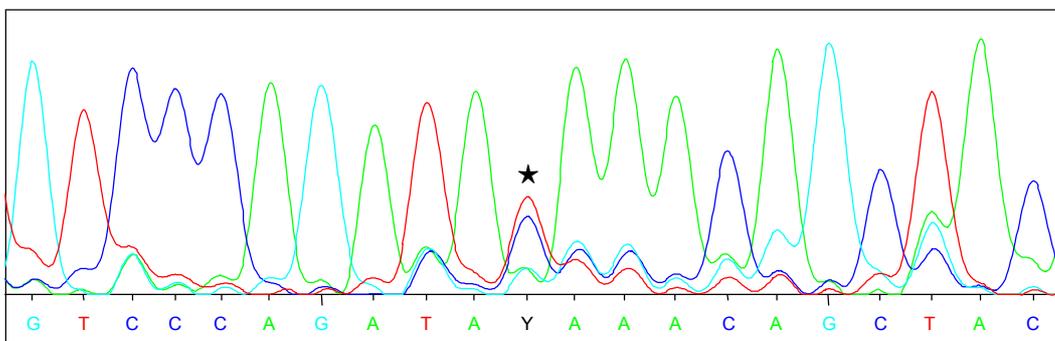


Abb. 3.12c: ★ Substitution der Base T durch C auf dem komplementären DNA-Strang

G125R (Exon 6)

Die Mutation G125R in Exon 6, die bei Patient 07 homozygot vorliegt, zeigt sich in einer Substitution der Base Guanin durch Adenin an Position 6994 der genomischen DNA des *PTS*-Gens.

Das Codon Nr. 125 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Glycin (GGA) sondern für Arginin (AGA).

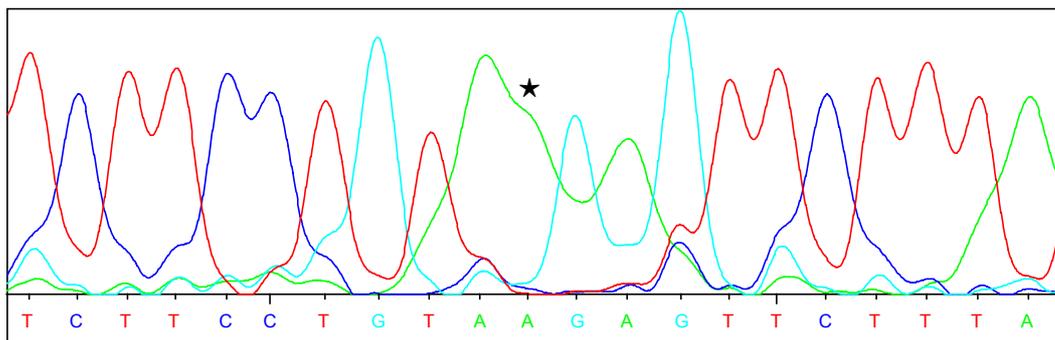


Abb. 3.13a: ★ Substitution der Base G durch A an Position 6994 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 6 (homozygot)

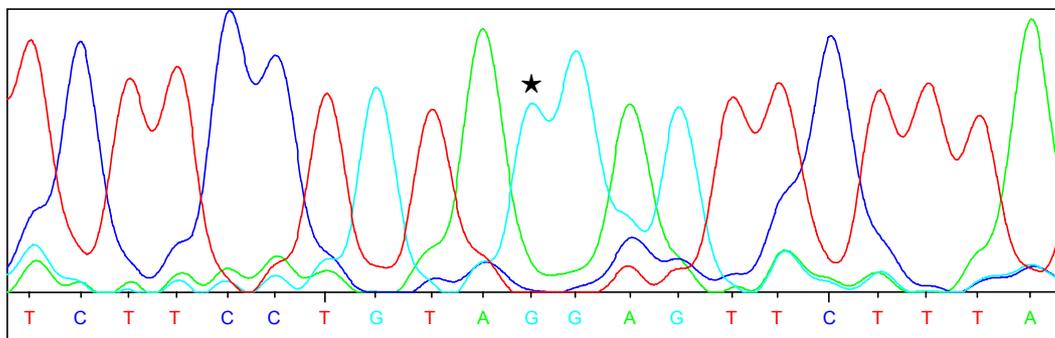


Abb. 3.13b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 6

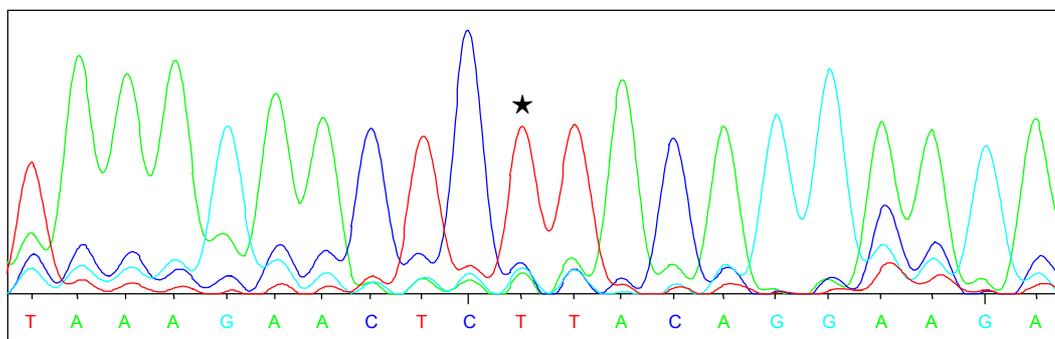


Abb. 3.13c: ★ Substitution der Base C durch T auf dem komplementären DNA-Strang

D136G (Exon 6)

Die Mutation D136G in Exon 6, die bei Patient 03 heterozygot vorliegt, zeigt sich in einer Substitution der Base Adenin durch Guanin an Position 7028 der genomischen DNA des *PTS*-Gens.

Das Codon Nr. 136 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Asparaginsäure (GAC) sondern für Glycin (GGC).

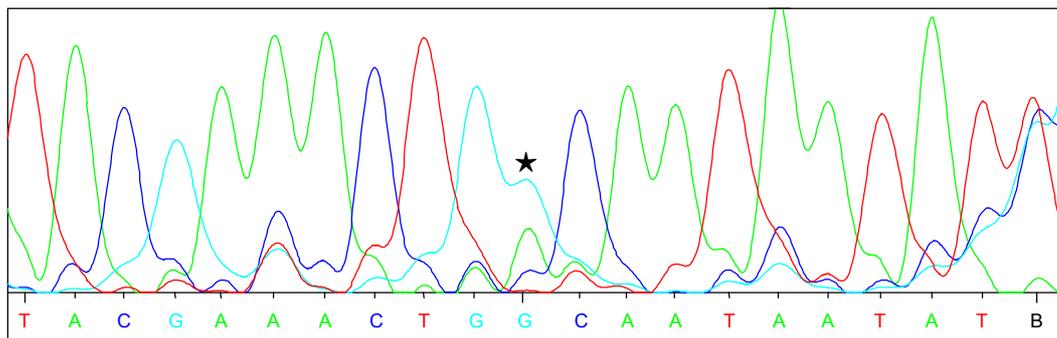


Abb. 3.14a: ★ Substitution der Base A durch G an Position 7028 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 6 (heterozygot)

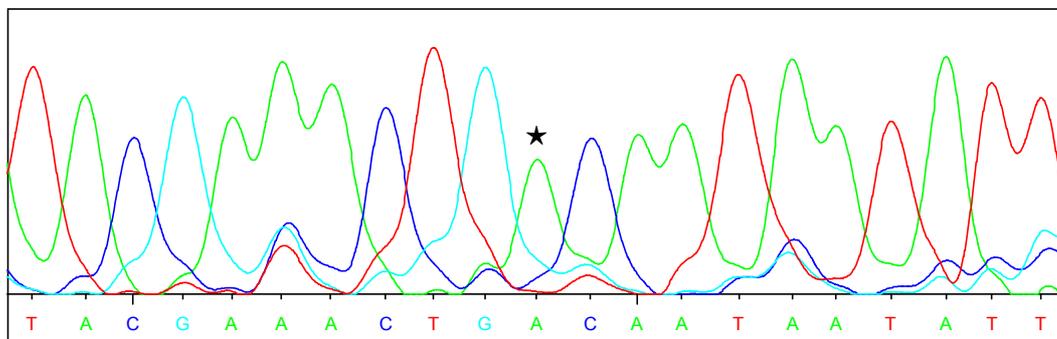


Abb. 3.14b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 6

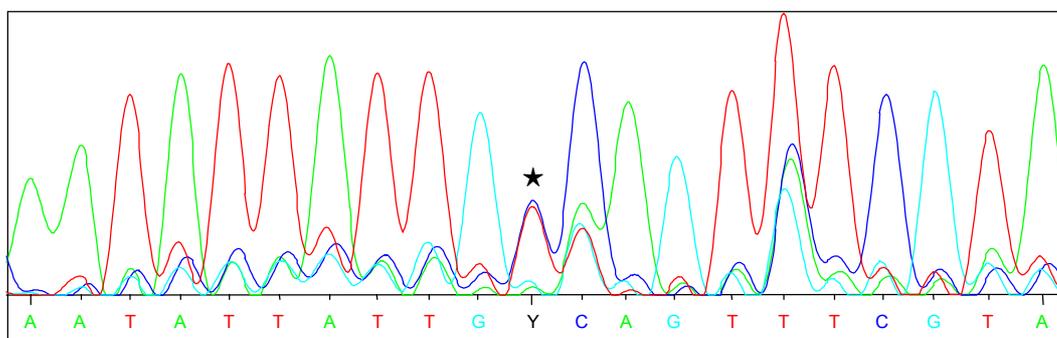


Abb. 3.14 c: ★ Substitution der Base T durch C auf dem komplementären DNA-Strang

N138H (Exon 6)

Die Mutation N138H in Exon 6, die bei Patient 06 homozygot vorliegt, zeigt sich in einer Substitution der Base Adenin durch Cytosin an Position 7033 der genomischen DNA des *PTS*-Gens.

Das Codon Nr. 138 codiert somit nicht mehr für die Aminosäure Asparagin (AAT) sondern für Histidin (CAT).

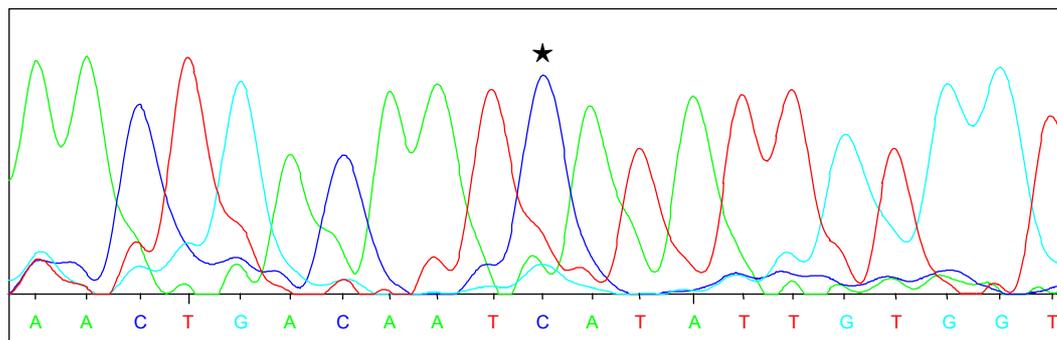


Abb. 3.15a: ★ Substitution der Base A durch C an Position 7033 der genomischen DNA des *PTS*-Gens in Exon 6 (homozygot)

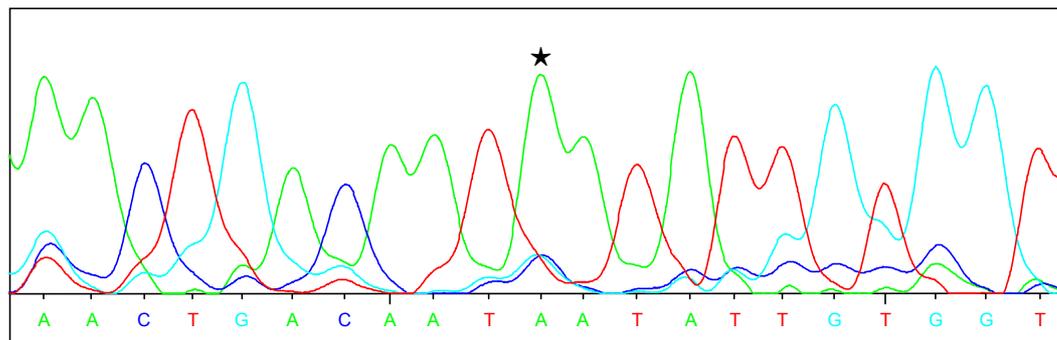


Abb. 3.15b: Kontrolle der relevanten Sequenz in Exon 6

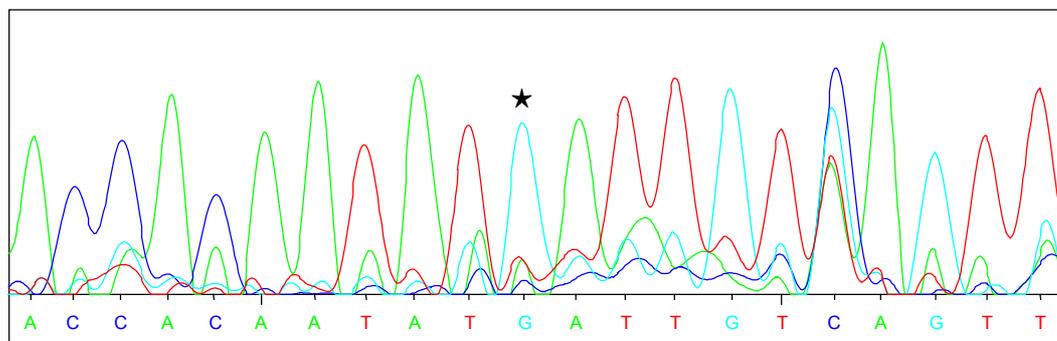


Abb. 3.15c: ★ Substitution der Base T durch G auf dem komplementären DNA-Strang

KAPITEL IV : DISKUSSION

A. Allgemeines

Im Rahmen dieser Untersuchung stand nur eine begrenzte Anzahl von Patienten zur Verfügung, und da klinischen Vergleiche zu anderen Patienten mit denselben Mutationen nicht möglich waren, befaßt sich dieses Kapitel in erster Linie mit dem Einfluß der Mutationen auf molekularer Ebene.

Es ist zur Zeit noch sehr schwierig, die direkten Zusammenhänge zwischen Mutationen und resultierenden Krankheitsbildern aufzuzeigen, da es sich um komplexe multifaktorielle Zusammenhänge handelt und eine Vielzahl von exogenen Kriterien, wie beispielsweise Art und Beginn der Therapie berücksichtigt werden müssen. Für einen objektiven klinischen Vergleich der Patienten müßten diverse Parameter standardisiert werden, was insbesondere Zeitpunkt und Intervall der Liquorentnahme, Untersuchungszeiträume sowie Dosierung der Medikation betrifft.

Da eine genaue Standardisierung dieser Parameter und objektiver Vergleich der klinischen Symptome nicht durchgeführt worden war, spielte für uns in erster Linie die Bestimmung der Enzymaktivität die entscheidende Rolle. Außerdem ist eine verminderte Enzymaktivität unter allen zur Verfügung stehenden Parametern sicherstes Indiz für funktionelle oder strukturelle Veränderungen des Proteins *in vivo*. Weiterhin besitzt dieser Wert eine geringere Variabilität als die übrigen Parameter, die nicht unerheblich von anderen Faktoren beeinflußt werden. Die klinischen Symptome hingegen konnten in dieser Arbeit nur von sekundärer Bedeutung bleiben.

Selbst der Zusammenhang zwischen Mutation und Aktivität des Enzyms ist prospektiv meist nicht klar abzuschätzen. Prognostische Aussagen über die „Schwere“ der Mutation, worüber in diesem Kapitel u.a. diskutiert werden soll, sind somit sehr schwierig und meist unpräzise.

Es gibt unterschiedliche Kriterien, die für einen krankheitsauslösenden Effekt von Mutationen sprechen (Cotton; Scriver 1998). Die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen Mutationen weisen die meisten dieser Kriterien auf:

1. Alle Mutationen betreffen konservierte Bereiche der Aminosäuresequenz.
2. Bei fast allen Aminosäure-Substitutionen kommt es zudem zum Austausch funktionell unterschiedlicher Aminosäuren (nichtkonservative Substitutionen), in den meisten Fällen kommt es sogar zu Ladungsänderungen.
3. Bei den Mutationen die einen vorzeitigen Abbruch der Peptidkette zur Folge haben, ist ein Verlust der Enzymaktivität äußerst wahrscheinlich, insbesondere, weil bei den entsprechenden Fällen funktionell wichtige Bereiche des Enzyms betroffen sind.
4. Um möglichst alle Mutationen zu erfassen, wurden alle sechs Exons des *PTS*-Gens mit den angrenzenden Intronsequenzen auf DNA-Ebene analysiert. Alle untersuchten Patienten waren entweder homozygot für eine Mutation oder *compound* heterozygot für zwei unterschiedliche Mutationen, was ein zusätzlicher Hinweis darauf ist, daß alle vorhandenen Mutationen durch die Analyse erfaßt wurden.

Die funktionelle Analyse von mutiertem rekombinant exprimiertem Protein stellt jedoch den sichersten Nachweis dafür dar, ob eine Mutation Einfluß auf die Enzymaktivität hat, was allerdings wegen der Aufwendigkeit der Methode im Rahmen dieser Dissertation nicht erfolgte.

Um dennoch nähere Aussagen über mögliche Strukturveränderungen bzw. den Einfluß der Mutationen auf das aktive Zentrum machen zu können, wurde ein *Molecular-Modeling* auf der Basis der schon bekannten Struktur des homohexameren Enzyms der Ratte durchgeführt und die Lagebeziehungen der mutierten Aminosäuren zu Ihrer Umgebung innerhalb des Proteins auf molekularer Ebene dargestellt. Als Koordinatensatz diente *1b66* (*RCSB Protein Data Bank*). Zur Darstellung der relevanten Strukturen mittels *Protein-Modeling* wurde die Software *Swiss-PdbViewer* (v.3.7b2) eingesetzt. Der Einfluß, welchen eine Mutation auf Funktion und Struktur des Enzyms haben kann, ist äußerst unterschiedlich. Zum einen existieren Mutationen (auf DNA-Ebene), die zu keiner Aminosäureänderung im Protein führen und

somit in der Regel keinen Einfluß zeigen (sog. stille Mutation) – es sei denn sie beeinflussen das Spleißen. Einige Sequenzveränderungen auf DNA-Ebene haben trotz Aminosäurealteration ebenfalls keine Funktionsänderung des Enzyms zur Folge, da sie die Struktur nicht oder nur minimal verändern. Andere Mutationen können trotz vermeintlich sehr geringen Strukturveränderungen großen Einfluß auf die Aktivität haben, wenn sie das empfindliche Gleichgewicht des aktiven Zentrums oder der Substrat-Bindungsstelle stören. Manche Mutationen führen allerdings zur deutlichen Änderung der Struktur, so daß entweder eine Anlagerung des Substrats kaum mehr möglich ist oder gar die korrekte Faltung der Untereinheiten bzw. deren Aneinanderlagerung zu einer intakten Quartärstruktur nicht mehr erfolgen kann.

Manche Mutationen, wie z.B. Insertionen oder Deletionen, die das nachfolgende Leseraster verschieben und damit auch zu frühzeitigen *Stopcodons* führen können, verursachen meist ebenfalls einen völligen Aktivitätsverlust des Enzyms.

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Beurteilung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen ist, ob Mutationen homozygot oder *compound* heterozygot vorliegen. Bei heterozygoten Mutationen ist es wesentlich schwieriger, die klinische Symptomatik der verursachenden Mutation zuzuordnen bzw. einzuschätzen, ob das klinische Erscheinungsbild hauptsächlich auf eine der beiden Mutationen zurückzuführen ist. All diese Faktoren gilt es soweit wie möglich bei der genaueren Betrachtung der einzelnen Mutationen gegeneinander abzuwägen.

B. Mutationen

Im folgenden Abschnitt werden alle im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen in aufsteigender Reihenfolge (nach Position im *PTS*-Gen) aufgeführt und der mögliche Einfluß auf die Enzymaktivität diskutiert. Zur genaueren Charakterisierung der Mutationen auf molekularer Ebene wurde das strukturell bereits bekannte homohexamere Enzym der Ratte (Koordinatensatz: 1b66.pdb) herangezogen (die Kristallisation der rekombinanten humanen PTPS ist bisher noch nicht gelungen), weshalb sich alle folgenden Lokalisationsangaben auf die Aminosäuresequenz des Ratten-Enzyms beziehen. Die 82 % Sequenz-Identität zum humanen Enzym (alle für die Funktion wichtigen Aminosäuren sind konserviert) lassen es zu, daß Rückschlüsse, die auf das vorhandene Strukturmodell basieren, auch für die humane PTPS gelten (Nar et al. 1994).

Der Ratten-PTPS fehlt jedoch an Position 10 (N-terminales Ende) die Aminosäure Cystein, wodurch an allen folgenden Positionen die Numerierung der humanen Aminosäuren von der Numerierung der Ratten-Aminosäuresequenz um eine Ziffer abweicht (Beispiel: Ala 21 der Ratte entspricht Ala 22 der humanen Sequenz). Alle in dieser Arbeit untersuchten Mutationen liegen in konservierten Bereichen der Ratten- und humanen Sequenz.

R17_I18insR (Exon 1 ; Pat. 03)

Die Mutation R17_I18insR führt zur Insertion der stark basischen Aminosäure Arginin zwischen den Aminosäuren 16 und 17 (17+18 bei humaner PTPS). Die Insertionsstelle ist im vollständigen Homohexamer direkt an der hydrophilen Pore und im Bereich der Äquatorialebene lokalisiert. Die Insertionsbereiche sind um die hydrophile Pore herum sternförmig (etwa 120°) angeordnet und liegen sich, von der Seite her betrachtet, nur durch den schmalen äquatorialen Spalt getrennt, direkt gegenüber (Abb. 4.1). Da sich jeweils zwei Insertionsbereiche der beiden Trimere gegenüberliegen, könnte es auf Grund der stark positiven Ladung des Arginins (bei physiologischen pH-Wert immer vollständig protoniert) zu Abstoßungs-

effekten zwischen beiden Trimeren kommen, die der Ausbildung der intakten Quartiärstruktur im Wege stünden. Als zweiter und wahrscheinlich noch wichtigerer Aspekt wäre zu nennen, daß durch die Insertion die benachbarten Aminosäuren verdrängt, bzw. um eine Position verschoben werden, was sowohl intramolekulare wie auch intermolekulare Konsequenzen für Tertiär- und Quartiärstruktur haben kann.

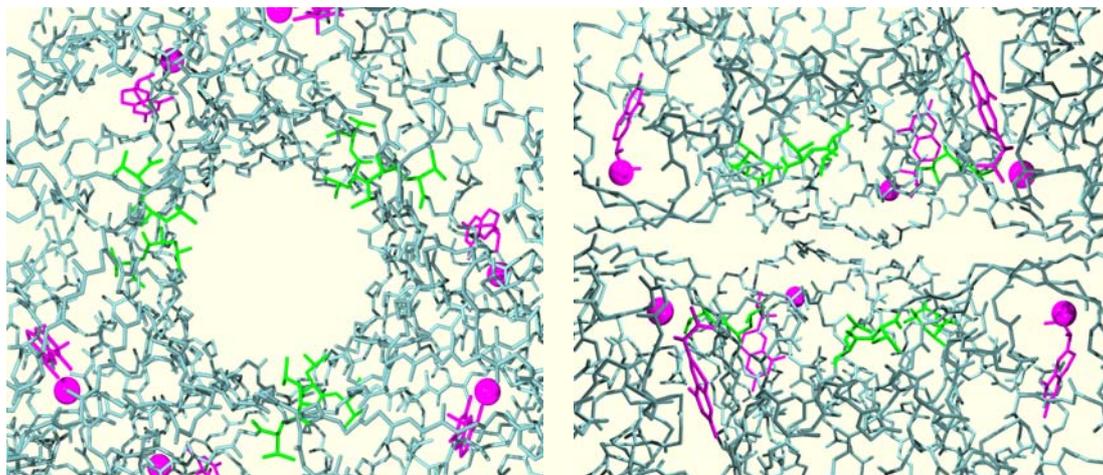


Abb. 4.1: Insertion von Arginin im Bereich der hydrophilen Pore (links) und der Äquatorialebene (rechts) des PTPS-Hexamers (Stabmodell). In beiden Bildhälften ist der gleiche Bereich des Enzyms nur aus unterschiedlichen Blickrichtungen dargestellt. Zur Kennzeichnung des Insertionsbereichs sind die beiden jeweils benachbarten Aminosäuren (Pos. 16+17) jeden Monomers grün, Substrat und Zn^{2+} -Ion rosa gekennzeichnet.

Der Insertionsbereich liegt im ersten β -Strang (β -1), was zur Folge haben kann, daß sich die viersträngige antiparallele β -Struktur innerhalb des Monomers nicht mehr korrekt zusammensetzt (intramolekularer Effekt). Der β -1-Strang bildet jedoch auch Wasserstoffbrücken mit dem β -4-Strang des benachbarten Monomers des selben Trimers. Diese intermolekularen Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen beiden Faltblatt-Strukturen tragen auf diese Weise zur Bildung der porenartigen β -Faß-Struktur bei. Es wäre somit auch denkbar, daß sich durch die Insertion und Verschiebung innerhalb des β -Strangs die Monomere nicht mehr korrekt zum Trimer zusammenlagern (intermolekularer Effekt). Durch eine Verhinderung der korrekten Faltung und Aneinanderlagerung der Untereinheiten wäre sogar eine komplette Insuffizienz des Enzyms denkbar.

Als zusätzlicher Aspekt wäre zu nennen, daß die Mutation innerhalb des Proteinkinase-Erkennungsmotivs $^{16}\text{RRIS}^{19}$ erfolgt. Für die volle Enzymaktivität *in vivo* ist die posttranslationale Phosphorylierung des Enzyms erforderlich. Dazu wird das am Ende der $^{16}\text{RRIS}^{19}$ -Erkennungssequenz liegende Ser 19 beim humanen Enzym phosphoryliert (Scherer-Oppliger et al. 1999a). Eine Beeinflussung der Phosphorylierung durch die Mutation scheint jedoch eher unwahrscheinlich, weil durch die Insertion von Arginin zwischen Arg 17 und Ile 18 die Erkennungssequenz zwar „gestreckt“, aber prinzipiell nicht verändert würde.

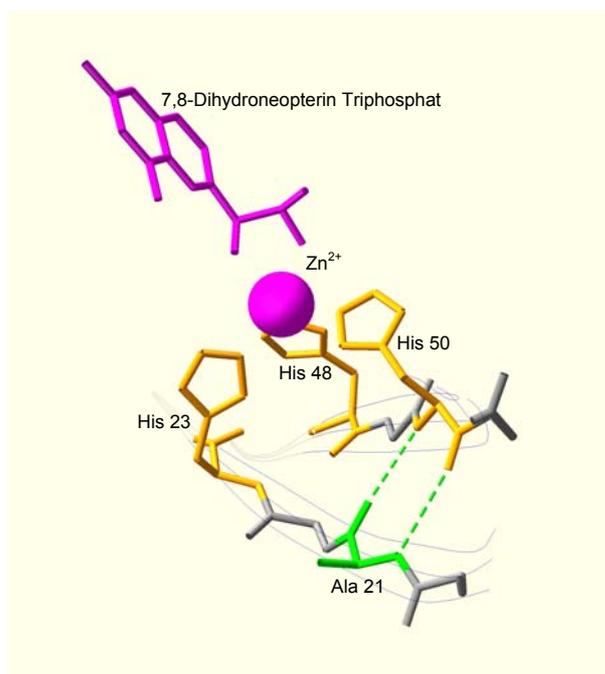
A22G (Exon 1 ; Pat 01)

Bei dem Austausch der Aminosäure Alanin durch Glycin an Position 21 (Position 22 bei humaner PTPS) kommt es nur zu einer minimalen Veränderung der Primärstruktur. Die Aminosäure verliert lediglich ihren Methylrest, wodurch sich nichts an ihrer Ladung ändert und auch die Größe kaum variiert. Bei genauerer Betrachtung allerdings fällt ihre enge Lagebeziehung zum aktiven Zentrum auf. Ala 21 liegt nahe bei der Aminosäure His 23, welche mit den Histidinresten His 48 und His 50 einen wesentlichen Bestandteil der Zn^{2+} -bindenden Region darstellt.

Abb. 4.2: Lagebeziehung der Aminosäure Alanin 21 zur Zn^{2+} -bindenden Region. Ala 21 (grün) ist Bestandteil eines β -Faltblattstranges und ist über Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelt) direkt mit dem Histidinrest His 50 verbunden.

Die drei Histidinreste (orange), die entscheidend an der Bindung des Zn^{2+} -Ions beteiligt sind, partizipieren alle an einer antiparallelen β -Faltblattstruktur (durch dünne blaue Linien gekennzeichnet) und haben enge Lagebeziehung zueinander und zur mutierten Aminosäure Ala 21.

Das Zn^{2+} -Ion steht in pentavalenter Beziehung zu den drei Histidinresten und den beiden Hydroxylgruppen C1' und C2' des Dihydroneopterin-Liganden, was eine sehr typische Formation für katalytische Zn^{2+} -Ionen darstellt (Ploom et al. 1999).



Auch zu den beiden anderen genannten Histidinen hat Ala 21 engen Kontakt, weil alle vier Aminosäuren Bestandteil einer antiparallelen β -Faltblattstruktur sind, in der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ala 21 und His 50, sowie zwischen His 23 und His 48 bestehen (Abb 4.2). So liegt also die Vermutung nahe, daß selbst leichte Veränderungen an Position 21 signifikante Folgen für die Zn^{2+} -bindende Region und somit auch für die Substratbindung und Katalyseeffekte haben könnten.

Zusätzlich liegt Ala 21 auch direkt am Spalt zwischen den beiden Trimeren und befindet sich unweit des nächsten aktiven Zentrums einer benachbarten Domäne des zweiten Trimers. Dem Alanin direkt gegenüberliegend befinden sich die Aminosäuren Asp A 88 und His A 89 der selben Domäne, die mit Cys B 42 der benachbarten Domäne eine katalytische Triade bilden.

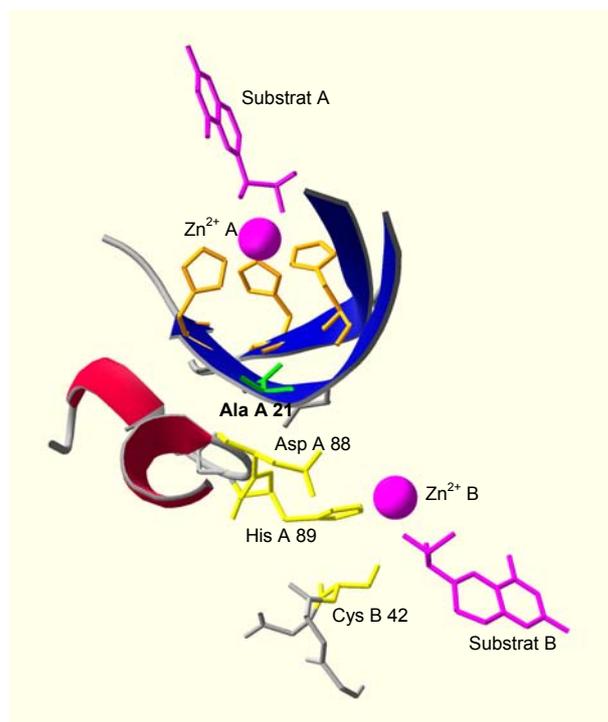
Abb. 4.3: Lagebeziehung der Aminosäure Ala 21 zum aktiven Zentrum der benachbarten Domäne (B).

Im oberen Bildbereich sieht man die Histidinreste (orange) und das Substrat mit Zn^{2+} -Ion des oberen Trimers (A), im unteren Bereich Teile einer Domäne des zweiten Trimers (B).

Die Aminosäuren an Pos. 89-91 stehen über Wasserstoffbrückenbindungen in Kontakt mit dem gegenüberliegenden β -Strang und extendieren so die Faltblattstruktur (blau). Asp A 88 und His A 89 bilden mit Cys B 42 eine von unterschiedlichen Domänen gebildete katalytische Triade (Bürgisser et al. 1995).

Die drei genannten Aminosäuren (gelb) bilden einen essentiellen Bestandteil des aktiven Zentrums der gegenüberliegenden Domäne (B).

Ala 21 (grün) liegt genau am Grenzbe- reich zweier Domänen und beider Tri- mere und zudem in unmittelbarer Nach- barschaft zweier für die Enzymaktivität wichtiger Zonen.



Dabei aktivieren Asp A88 und His A 89 die nukleophile Aminosäure Cys B 42 zur Protonenaufnahme und haben somit eine bedeutende Funktion bei der katalytischen Reaktion an der Substratseitenkette.

Die Tatsache, daß sich das mutierte Alanin an einer „strategisch“ so wichtigen Position befindet und in direkter Nähe zu gleich zwei aktiven Zentren

liegt, läßt es plausibel scheinen, daß die Mutation A22G trotz nur geringer struktureller Veränderungen einen nicht unwesentlichen Einfluß auf die Enzymaktivität haben könnte.

R25Q (Exon 1 ; Pat. 08)

Diese Punktmutation ist vermutlich Folge der Instabilität des CpG-Dinukleotids (p bezeichnet die 3'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen C und G) an Position 73/74 der genomischen DNA des *PTS*-Gens. Cytosin des Dinukleotids wird beim Menschen oft am 5'-C-Atom methyliert. Das resultierende 5-Methylcytosin kann dann relativ leicht spontan zu Thymin desaminiert werden.

Hier ist anzunehmen, daß dieser Mechanismus auf dem komplementären Strang abgelaufen ist, was die Transition G nach A auf dem codogenen Strang bewirkte. Als Resultat codiert das Codon 25 nicht mehr für Arginin sondern für Glutamin.

Auf Grund ihrer relativ hohen Mutabilität – die Mutationsrate ist 8,5 mal so hoch wie der Durchschnittswert bei Dinukleotiden im allgemeinen (Cooper et al. 1995) – sind CpG-Dinucleotide auch häufiger am Auftreten pathogener Mutationen beteiligt (Cooper, Youssoufian 1988), und es werden häufiger unabhängige Mutationsereignisse beobachtet. Die Mutation R25Q wurde bereits vorher von Thöny und Oppliger beschrieben (Thöny et al. 1994b; Oppliger et al. 1995b). Dies könnte auf eine solche unabhängige Wiederholung hinweisen. Eine gemeinsame Herkunft wäre allerdings ebenso möglich.

Durch die beschriebene Mutation kommt es zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin durch das neutrale Glutamin an Position 24 (Pos. 25 bei humaner PTPS). Die enge Lagebeziehung dieser Aminosäure zum aktiven Zentrum ist möglicherweise ausschlaggebend für den Einfluß auf die Enzymaktivität. Die 6-PTPS der betroffenen homozygoten Patientin zeigte keine meßbare Aktivität.

Arg 24 liegt direkt zwischen His 23, welches an der Bindung des zur Katalyse wichtigen Zn^{2+} -Ions beteiligt ist, und Leu 25, das mit anderen Aminosäureseitenketten eine recht apolare Vertiefung zur Aufnahme des Biopterinring-

systems bildet (Abb 4.4). Es wäre somit durchaus denkbar, daß eine Mutation an Position 24 sowohl Einfluß auf die Zinkbindung und damit auf die Katalyse, als auch auf die Bindung des Substrates bzw. des Biopterinringsystems hat und somit die Aktivität des gesamten Enzyms deutlich beeinträchtigen könnte.

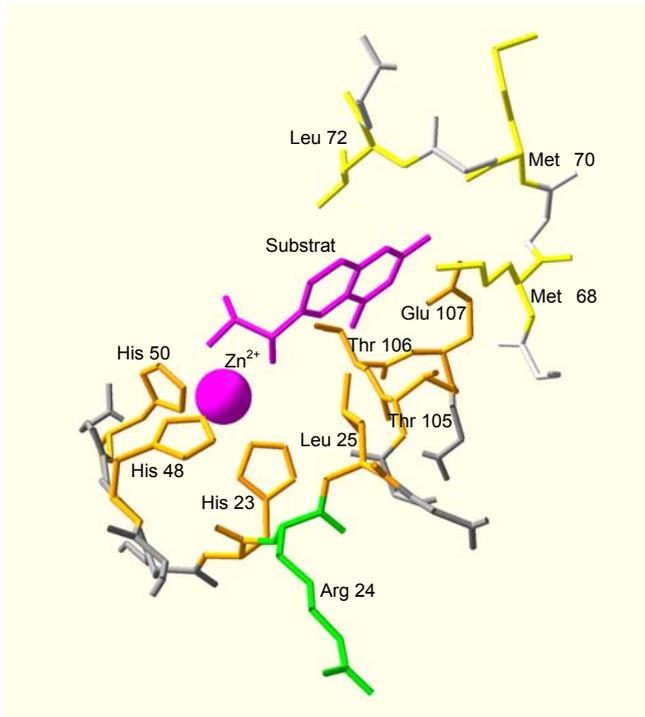


Abb. 4.4: Nähe der mutierten Aminosäure Arginin zum aktiven Zentrum. Arg 24 (grün) liegt zwischen His 23 und Leu 25. Die abgebildeten, am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren gehören zwei unterschiedlichen Domänen an (gelb und orange gekennzeichnet), sind aber alle Bestandteil des selben Trimers. Die gekennzeichneten Seitenketten, ausgenommen der Histidine, formen eine Vertiefung, in der das Biopterinringssystem plaziert ist und somit das Substrat an seiner Bindungsstelle stabilisieren.

Als ein zusätzlicher Aspekt ist sicherlich auch die Lage des Arginins in Bezug auf die Quartärstruktur des Enzyms zu werten.

Im aktiven Enzymkomplex ragen die sechs Argininreste jeweils nach außen in die Peripherie des Enzyms und sind somit auch von Bedeutung für die Löslichkeit des Proteins und die Stabilität der Quartärstruktur (Abb. 4.5).

Werden die langen stark basischen Argininreste durch die kürzeren neutralen Glutaminreste ausgetauscht, hat dies auch eine Minderung der Polarität der Außenseite des Enzyms zur Folge, was eine Stabilitätseinbuße des Enzyms in wässriger Lösung nach sich ziehen könnte.

Zwar ist die Amid-Gruppe des Glutamins trotz ihres nicht-ionischen Charakters noch recht polar, doch würde die ohnehin schon kürzere Seitenkette aus energetischen Gründen nicht so gerade in die Peripherie ragen, wie es beim

Arginin der Fall ist, sondern sich eher etwas seitwärts in den Randbereich des Proteins verlagern, wodurch insgesamt die Polarität der Proteinoberfläche in dieser Region deutlich geringer wäre, als beim Arginin.

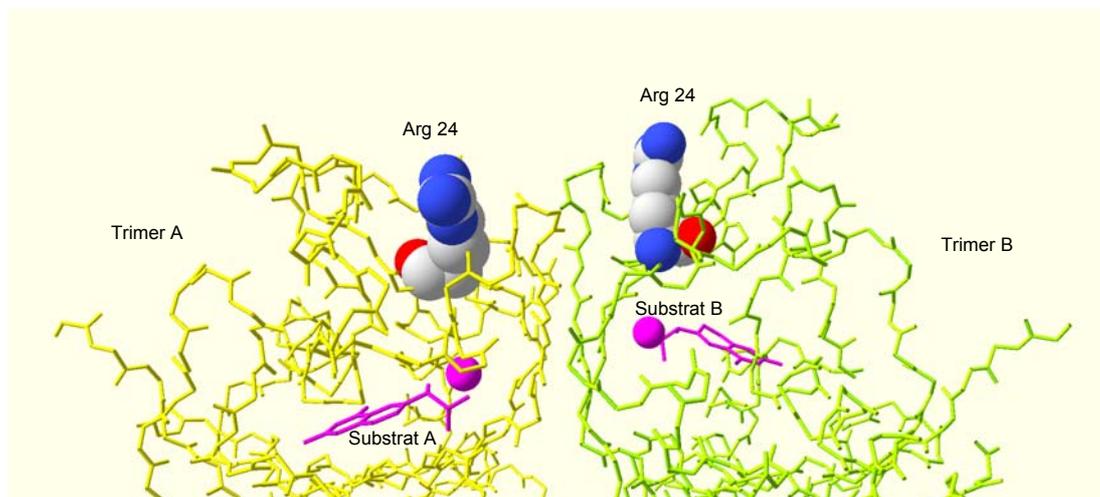


Abb. 4.5: Lokalisation des mutierten Arginins auf der Außenseite des Proteins. Abgebildet ist ein Ausschnitt aus dem Enzym mit zwei der insgesamt sechs Argininreste, die auf der Oberfläche beider Trimere (in grün und gelb) lokalisiert sind. Die Seitenketten des stark polaren Arginins (jeweils mit van-der-Waals-Radien dargestellt) ragen recht weit aus dem Enzym heraus in die Peripherie.

Weiterhin würde sich durch die Mutation die Morphologie der Enzymoberfläche im beschriebenen Bereich ändern, was bei intermolekularen Interaktionen und posttranslationalen Modifikationen von Bedeutung sein könnte, wenn bestimmte Oberflächenstrukturen von möglichen Rezeptoren bzw. entsprechenden Enzymen nicht mehr eindeutig identifiziert werden sollten. Es konnte gezeigt werden, daß die rekombinant in *E. coli* exprimierte Mutante R25Q eine signifikant höhere Aktivität zeigt, als in Cos-1-Zellen und primären Fibroblasten (s. Kap. I - C). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß PTPS in eukaryoten Zellen an dieser Position posttranslationalen Modifikationen unterliegt, die für die volle Enzymaktivität *in vivo* erforderlich sind (Oppliger et al. 1995b).

Einerseits wäre es denkbar, daß Arg 25 selbst für eventuelle posttranslationale Modifikationen erforderlich ist, jedoch könnte auch die veränderte Oberflächenmorphologie in der beschriebenen Region für eine verminderte Aktivierbarkeit des Proteins *in vivo* sprechen.

E35G (Exon 2 ; Pat. 02)

Die Mutation E35G führt zum Austausch der recht großen, sauren Aminosäure Glutaminsäure durch die kleinste aliphatische Aminosäure Glycin an Position 34 (Position 35 bei humaner PTPS). Diese Substitution übt auf das recht weit entfernte aktive Zentrum (über 11 Å) wohl – wenn überhaupt – nur noch einen geringen Einfluß aus. Bei der homozygot betroffenen Patientin ist noch eine residuale Enzymaktivität von 13% meßbar.

Es ist jedoch durchaus denkbar, daß die Mutation einen destabilisierenden Effekt auf die Tertiär- und Quartärstruktur des Enzyms haben könnte. Ähnlich wie Arg 24 ragt der stark polare Rest der Glutaminsäure in die Peripherie des Proteins und fördert so dessen Löslichkeit im wäßrigen Medium (Abb. 4.5 A). Die Substitution durch eine völlig apolare Aminosäure, welche bei Proteinen in wäßriger Lösung meist nach innen gekehrt sind (Abb.4.6 B), könnte somit einen negativen Effekt auf die Stabilität des Enzyms ausüben.

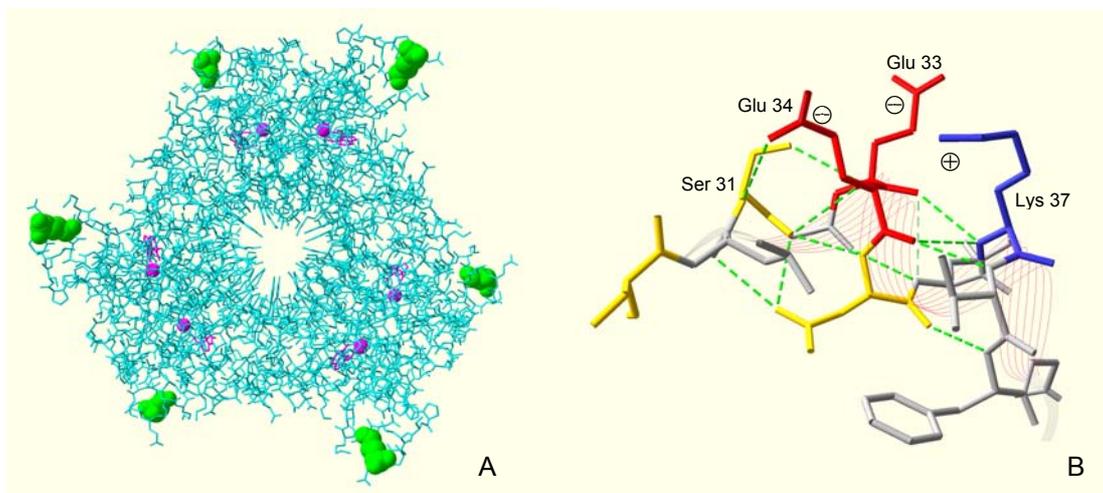


Abb. 4.6: Darstellung des Homohexamers als Skellettmodell mit Blickrichtung entlang der dreifalteten Symmetrieachse (A). Ausschnittsvergrößerung der relevanten Proteinoberfläche (B). Links sind die in die Peripherie ragenden Glutaminsäure-Reste mit van-der-Waals-Radien abgebildet (grün). Die Distanz zu den Dihydroneopterin-Substraten (rosa) beträgt mehr als 11 Å. In der Vergrößerung (B) sind die sauren Aminosäuren in rot, die basischen in blau, die polaren in gelb und die apolaren in grau dargestellt. Der Verlauf der α -Helix ist durch rote Linien angedeutet und die stabilisierenden Wasserstoffbrücken sind grün gekennzeichnet.

Desweiteren ist zu beachten, daß Glu 34 innerhalb einer oberflächlich gelegenen α -Helix liegt. Zwischen der Carboxy-Gruppe der Glu-Seitenkette und dem Ser 31 bildet sich beim Wildtyp eine Wasserstoffbrücke aus, die bei der

Mutante fehlen würde (Abb. 4.6 B). Desweiteren ist anzunehmen, daß sich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen beiden nebeneinanderliegenden negativ geladenen Glutaminsäuren (Glu 33 + Glu 34) und dem positiv geladenen Lys 37 ausbilden, die Einfluß auf die Stabilität der α -Helix haben könnten (Abb. 4.6 B). Die Mutation E35G könnte somit durch Verlust der Wasserstoffbrücke zwischen Glu 34 und Ser 31 und Veränderung der ioni-schen Wechselwirkung zwischen den geladenen Aminosäuren einen destabilisierenden Einfluß auf die Helix ausüben.

Ähnlich wie bei der Mutation R25Q wäre hier durch Veränderung der Oberflächenmorphologie ein negativer Effekt auf aktivitätssteigernde posttranslationale Modifikationen denkbar. Somit ließe sich zumindest eine zwar verminderte aber dennoch deutliche residuale Aktivität des Enzyms von 13% erklären.

F40fsX56 (Exon 2 ; Pat. 9)

Durch die Deletion von vier Basen an Position 2135-2138 der genomischen DNA des *PTS*-Gens kommt es zur Verschiebung des Leserasters, weil von der Deletion kein komplettes Codon betroffen ist.

Infolge dieser Verschiebung entsteht ab der Mutationsstelle eine vollständig veränderte Aminosäuresequenz (Abb. 3.7a) und bei Codon 56 in Exon 3 ein frühzeitiges Stopcodon (Position g.3718-3720). Das exprimierte Polypeptid hat nur noch eine Länge von 55 Aminosäuren. Somit scheint eine funktions-gerechte Genexpression unwahrscheinlich, insbesondere, da durch die strukturellen Veränderungen ab Aminosäure 39 und Verlust von knapp 2/3 der Aminosäuren des gesamten Proteins bedeutende funktionelle Bestandteile des Enzyms verloren gingen. Es sollte somit infolge dieser Mutation keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden können.

IVS2+14t>c (Intron 2 ; Pat. 08)

Bei diesem Austausch von Thymin durch Cytosin in Intron 2 (nichtcodierendes Segment), 14 Basen nach dem Exonende handelt es sich vermutlich nur um einen Polymorphismus, der auf die Expression eines intakten Enzyms wohl keinen Einfluß hat. Anlaß für diese Vermutung ist die Tatsache, daß bei dem Patienten 08 schon eine homozygote Mutation im codierenden Bereich gefunden wurde deren pathogener Effekt bewiesen ist (Oppliger et al. 1995b). Desweiteren liegt der Basenaustausch außerhalb der Spleißsequenz und recht weit vom Exonende entfernt ist, was eine Beteiligung an Spleiß-Mechanismen unwahrscheinlich macht.

Um die Annahme zu verifizieren, daß es sich hier um eine nicht pathogene Basenänderung handelt, sollte man jedoch in einer größeren Population untersuchen, ob die Substitution vermehrt auch bei nicht erkrankten Individuen auftritt. Eine Allelfrequenz von über 1% spräche für einen Polymorphismus.

P87L (Exon 5 ; Pat. 04)

Durch die Mutation P87L kommt es zu einem Austausch der heterozyklischen Iminosäure Prolin durch die aliphatische Aminosäure Leucin an Position 86 (Position 87 bei humaner PTPS). Es ist recht wahrscheinlich, daß sie einen signifikanten Einfluß auf die Enzymaktivität haben könnte.

Das substituierte Prolin, welches am Ende einer α -Helix liegt (Abb. 4.7), befindet sich in unmittelbarer Nähe einer katalytischen Triade (Kap. I-B 5.2), die eine zentrale Rolle im aktiven Zentrum spielt. Durch Prolin kommt es typischer Weise auf Grund seiner Ringstruktur zu einem Abknicken der Peptidkette innerhalb der Proteinstruktur. Bei einem Austausch dieser Iminosäure durch Leucin wäre es durchaus denkbar, daß alleine durch diese Winkeländerung oder gar eine Fortsetzung der α -Helix die Aminosäuren Asp 88 und His 89 nicht mehr in die Nähe von Cys 42 der benachbarten Untereinheit gelangen und somit die Protonenaufnahme aus der Substratseitenkette deutlich gehemmt wäre.

Weiterhin wäre es auch denkbar, daß durch die Substitution des Prolins die α -Helix fortlaufen würde und daß durch diese Strukturveränderung des Monomers gegebenenfalls eine Aneinanderlagerung der Untereinheiten erschwert sein könnte.

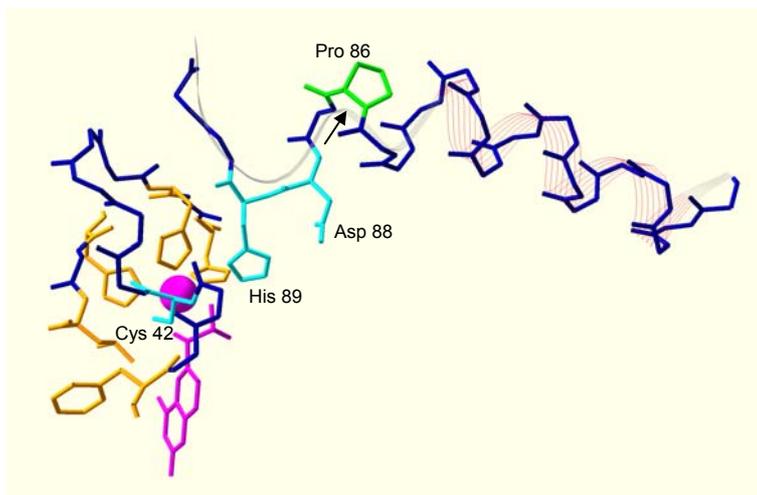


Abb.4.7: Nähe von Pro 86 zur katalytischen Triade. Pro 86 (grün) liegt am Ende einer α -Helix und direkt benachbart zu Asp 88 und His 89, welche zusammen mit Cys 42 der benachbarten Domäne die katalytische Triade des aktiven Zentrums bilden (türkis gekennzeichnet). Weitere am Zentrum beteiligte Seitenketten sind orange und das dazwischenliegende Gerüst ist blau markiert. Der α -helikale Bereich ist durch rote Linien angedeutet. Prolin führt zum Abknicken der Peptidkette (Pfeil) und ermöglicht so die räumliche Nähe der an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren.

Y99X (Exon 5 ; Pat. 05 + 09)

Die Mutation Y99X, kommt gleich bei zwei Patienten (jeweils heterozygot) vor. Infolge der Mutation codiert das Codon 99 nicht mehr für Tyrosin, sondern wird zum Stopcodon umfunktioniert. Dies führt zu einem Abbruch der Polypeptidsynthese an dieser Stelle und resultiert damit in der Expression eines deutlich verkürzten Proteins, dem, verglichen mit dem nativen Produkt, wesentliche funktionelle Bestandteile fehlen. Ähnlich wie bei dem durch die Mutation F40fsX56 verursachten Proteinfragment ist es unrealistisch, daß infolge der Mutation noch ein Enzym mit nachweisbarer Enzymaktivität resultiert.

Auch bei anderen schon bekannten Mutationen im *PTS*-Gen, welche zu einer C-terminalen Verkürzung der primären Sequenz führen (K120X, K54X), konnte gezeigt werden, daß sie zur vollständigen Inaktivierung der Enzymaktivität führen (Thöny et al. 1994b; Oppliger et al. 1995b). Folglich scheint es ziemlich sicher, daß auch Y99X zu einem völligen Verlust der Enzymaktivität führt.

Die Tatsache, daß die Mutation Y99X bei der kleinen Anzahl von untersuchten Patienten gleich zweimal auftritt, wirft die Frage auf, ob es sich an dieser Position, ähnlich wie beim *CpG-Dinukleotid*, um einen sogenannten *hotspot* handelt oder ob die Mutation lediglich zufällig doppelt erscheint. Da beide Patienten aus Deutschland stammen und gleicher ethnischer Herkunft sind, läßt sich vermuten, daß die Mutation möglicherweise in beiden Fällen auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen ist.

A101V (Exon 5 ; Pat. 05)

Die Mutation A101V führt zum Austausch der kleinen aliphatischen Aminosäure Alanin durch die verzweigte aliphatische Aminosäure Valin an Position 100 (Position 101 bei humaner Sequenz). Die ausgeprägt unpolare Valin-Seitenkette liegt in der ausgebildeten Quartärstruktur an der Außenseite des Enzyms und ragt vermutlich, wie in Abb. 4.8 dargestellt, in dessen Peripherie.

Unpolare Aminosäuren (grau) liegen normalerweise im wäßrigen (polaren) Milieu eher zum Inneren der Proteine gekehrt, was entscheidend zur Ausbildung und Stabilität der Tertiärstruktur beiträgt. Man nennt dieses Phänomen auch *hydrophoben Effekt*. Der nach außen geneigte Valin-Rest könnte somit eine gewisse Stabilitätseinbuße der Tertiär- und Quartärstruktur zur Folge haben und somit gegebenenfalls die Enzymfunktion negativ beeinflussen.

Alanin ist zwar auch eine unpolare Aminosäure, hätte aber an dieser Position auf Grund seiner geringeren Größe weniger Effekt auf die Wasserlöslichkeit des Proteins, weil es weniger weit in die Umgebung des Enzyms ragt und auch keine Verzweigung der Seitenkette aufweist.

Es scheint jedoch fraglich, ob diese Substitution einer Aminosäure gleicher Strukturklasse an dieser Position bedeutenden Einfluß auf Struktur oder Funktion des Enzyms ausüben sollte. Vermutlich sind die Auswirkungen dieser Mutation auf die Enzymfunktion als eher gering einzuschätzen.

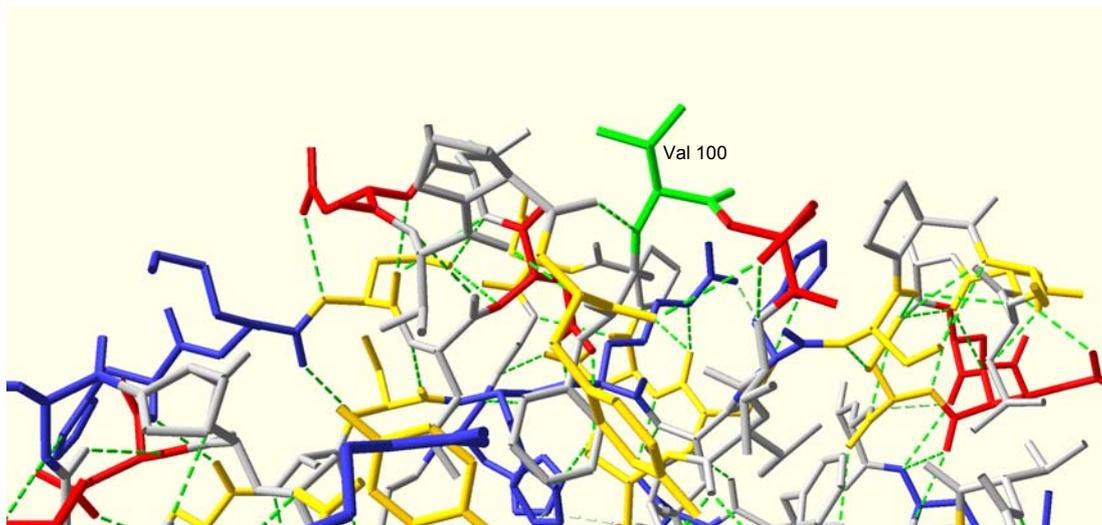


Abb. 4.8: Oberfläche des PTPS-Hexamers im Skelettmodell. Der unpolare (hydrophobe) Valin-Rest (grün) ragt in die Peripherie des Enzyms. Unpolare Aminosäuren auf der Proteinoberfläche beeinträchtigen die Stabilität der Quartärstruktur und widersprechen dem *hydrophoben Effekt*. Saure Aminosäuren sind rot, basische blau, polare gelb und unpolare Aminosäuren grau dargestellt. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als grün gestrichelte Linien visualisiert.

Y113C (Exon 6 ; Pat. 04)

Die Mutation Y113C hat die Substitution der aromatischen Aminosäure Tyrosin durch die schwefelhaltige Aminosäure Cystein an Position 112 (Position 113 bei humaner Sequenz) zur Folge.

Das Tyrosin liegt innerhalb einer der beiden antiparallelen α -Helices (Reste 106-120), die der viersträngigen antiparallelen β -Faltblattstruktur aufgelagert sind. Das Tyrosin ragt dabei mit seiner großen aromatischen Seitenkette in den Raum zwischen Helix und β -Faltblatt (Abb.4.9).

Die Substitution des Tyrosins durch die recht kleine Aminosäure Cystein würde vermutlich zur Bildung einer Kavität in der betreffenden Region führen, da das Cystein den entstehenden Freiraum nicht annähernd ausfüllen kann. Die Kavität könnte zum Kollaps der benachbarten Strukturen und somit zu einer Konformationsänderung des Monomers führen. Folge wäre womöglich

eine insuffiziente Aneinanderlagerung der einzelnen Untereinheiten, wodurch die korrekte Ausbildung der Quartärstruktur in Frage gestellt würde.

Ein weiterer zu bedenkender Aspekt wäre der mögliche Einfluß auf Cys 42. Sollte es zur Ausbildung einer Disulfid-Brücke zwischen Cys 42 und Cys 112 kommen, so hätte dies bedeutenden Einfluß auf die Proteinfaltung. Weiterhin würde die katalytische Triade (Kap. I-B) ihre Funktion verlieren, weil die katalytische Wirkung des Cys 24 durch Bildung einer Disulfid-Brücke aufgehoben würde.

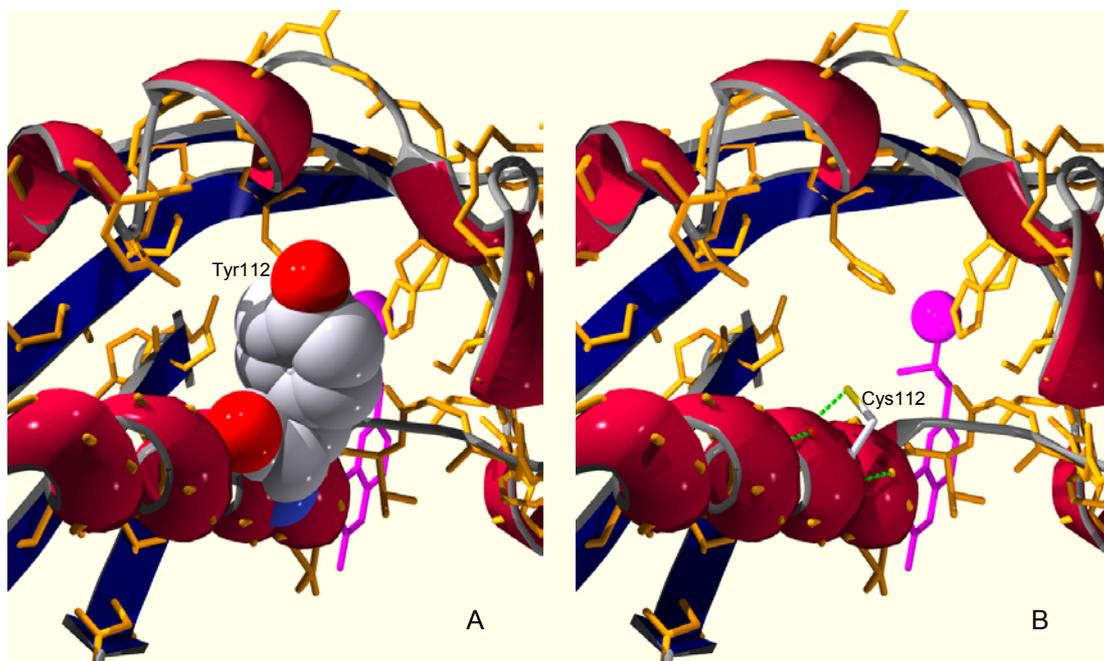


Abb. 4.9: Bildung einer Kavität durch die Substitution von Tyrosin durch Cystein. In der linken Bildhälfte ist Tyr 112 als Kalottenmodell dargestellt, um dessen räumliche Ausdehnung innerhalb eines PTPS-Monomers zu veranschaulichen (A). Die große Seitenkette mit dem aromatischen Ring füllt den Raum zwischen α -Helix und β -Faltblattstruktur deutlich aus. Die Substitution durch das kleine Cystein hätte die Bildung einer Kavität im entsprechenden Bereich zur Folge (B), die zum Kollaps der benachbarten Strukturen führen könnte.

G125R (Exon 6 ; Pat. 07)

Die Mutation G125R führt zum Austausch der kleinsten und unpolaren Aminosäure Glycin durch die besonders langkettige und sehr stark basische Aminosäure Arginin an Position 124 (Position 125 des humanen PTPS-Monomers). Beide Aminosäuren sind in all ihren Eigenschaften extrem gegensätzlich, was schon ohne genauere Betrachtung eine Veränderung der

Enzymfunktion erklären könnte. Arg 124 liegt an der äußeren Öffnung der β -Faß-Struktur, am N-terminalen Ende des dritten β -Stranges, welcher im Monomer am viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt partizipiert. Die Platzierung des polaren Arginins an der Proteinoberfläche, dessen Guanidinogruppe bei neutralem pH vollständig protoniert ist, scheint auf den ersten Blick gegenüber dem unpolaren Glycin im Sinne des *hydrophoben Effekts* vorteilhafter. In unmittelbarer Nähe zu Arg 124 (am N-terminalen Ende des ersten β -Stranges) befindet sich jedoch eine äußerst argininreiche Region, die wegen ihrer positiven Ladung vermutlich eine Abstoßung von Arg 124 zur Folge hat (in Abb. 4.10 durch Pfeil gekennzeichnet). Die Seitenketten der Argininreste 8, 9 und 10 ragen auf Grund ihrer positiven Ladung sternförmig (ca. 120°) auseinander. Die engste räumliche Beziehung entsteht dabei zwischen Arg 10 und Arg 124, zwischen denen die Abstoßung vermutlich auch am stärksten ausgeprägt ist. Begünstigt wird der Abstoßungseffekt wahrscheinlich noch zusätzlich durch das leicht basische Histidin 59, welches sich auf dem β -Strang zwischen den genannten Argininresten befindet.

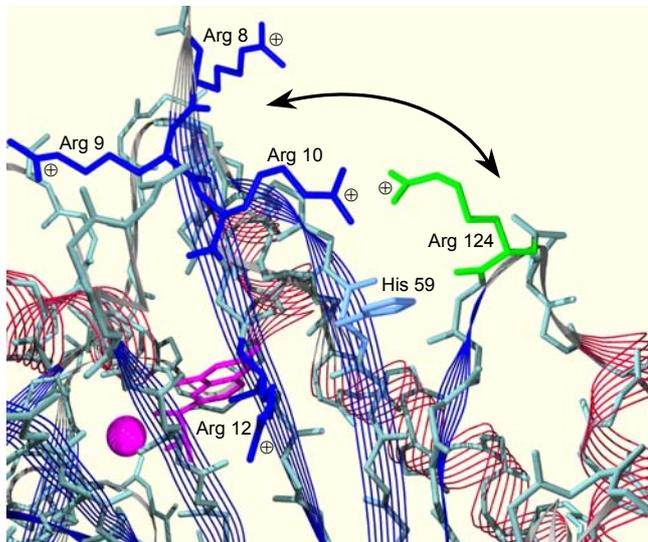


Abb. 4.10: Abstoßender Effekt der basischen Argininreste und dem mutierten Arg 124. Die stark basischen Argininreste Arg 8-10 und das Arg 124, das durch Mutation die Aminosäure Glycin substituiert, werden aufgrund der positiven Ladung ihrer Guanidinogruppe voneinander abgestoßen (durch Pfeil dargestellt). Die Abstoßung führt durch eine Verschiebung der Faltblattstruktur womöglich zur Konformationsänderung des gesamten Proteins. β -Faltblätter sind durch blaue und α -Helices durch rote Linien gekennzeichnet. Die basischen Argininreste sind blau und das mutierte Arg 124 grün dargestellt. Das leicht basische His 59 ist hellblau hervorgehoben.

Bedingt durch die Abstoßung und somit Verzerrung innerhalb des viersträngigen antiparallelen β -Faltblatts im Monomer könnte eine intakte Aneinanderlagerung der einzelnen Untereinheiten zu einer komplexen Faßstruktur deutlich erschwert sein, insbesondere, wenn man bedenkt, daß wegen der

hexamerischen Symmetrie an jeweils drei Punkten der oberen und der unteren Faßöffnung die gleichen abstoßenden Kräfte ansetzen.

Ein anderer Aspekt, der in diesem Zusammenhang wahrscheinlich von noch größerer Bedeutung ist, ist die Positionierung der Arginins an den äußeren Porenöffnungen, die wahrscheinlich der Anlagerung der GTPCH dient.

Die GTPCH ist ein Decamer mit perfekter D_5 -Symmetrie, das eine hydrophile Pore ähnlich der der PTPS einschließt (Auerbach, Nar 1997).

Dihydroneopterin Triphosphat ist eine instabile Zwischenstufe deren Halbwertszeit in Pufferlösung nur sehr kurz ist (Milstien, Kaufman 1985). Der positiv geladene „Tunnel“ beider Enzyme würde die protonierte Form des Substrats stabilisieren und läßt eine direkte Aneinanderlagerung beider Poren-moleküle zur Weiterleitung des Substrats sehr wahrscheinlich erscheinen (Nar et al. 1994). Die Substitution durch das große Arginin direkt am Porende könnte den Zusammenschluß der beiden Enzyme aus sterischen Gründen stören und somit gegebenenfalls die Substratumsetzung *in vivo* deutlich hemmen.

D136G (Exon 6 ; Pat. 3)

Die Mutation D136G führt zur Substitution der sauren Aminosäure Asparaginsäure durch die kleine aliphatische Aminosäure Glycin an Position 135 (Position 136 der humanen Sequenz). Asp 135 befindet sich in der Biegung zwischen dritten und vierten β -Strang und ragt dabei mit ihrer sauren Seitenkette in den zentralen Hohlraum der β -Faß-Struktur. Dieser Bereich liegt zudem etwa auf Höhe der Berührungsfläche beider Trimere.

Die negativ geladene Carboxy-Gruppe der Aspartat-Seitenkette gelangt auf diese Weise in unmittelbare Nähe der positiv geladenen Amino-Gruppe einer Lysin-Seitenkette aus dem gegenüberliegenden Trimer. Bedingt durch ihre unterschiedliche Ladung (beide sind bei physiologischem pH-Wert ionisiert) bildet sich zwischen den Seitenketten eine elektrostatische Bindung aus (Salzbrücke), welche die Trimere zueinander stabilisiert (s. Abb. 4.11).

Bei einem Austausch von Asp 135 durch Glycin könnte keine derartige Wechselwirkung entstehen, da bei Glycin die Seitenkette lediglich aus einem

Wasserstoffatom besteht. Die Mutation D136G könnte somit zu einer Konformationsänderung des gesamten Proteins führen, wenn sich infolge von destabilisierenden Effekten die Untereinheiten nicht mehr korrekt aneinanderlagern sollten. Des Weiteren wäre die Substitution durch eine unpolare Aminosäure zum Innern der hydrophilen Pore unvorteilhaft.

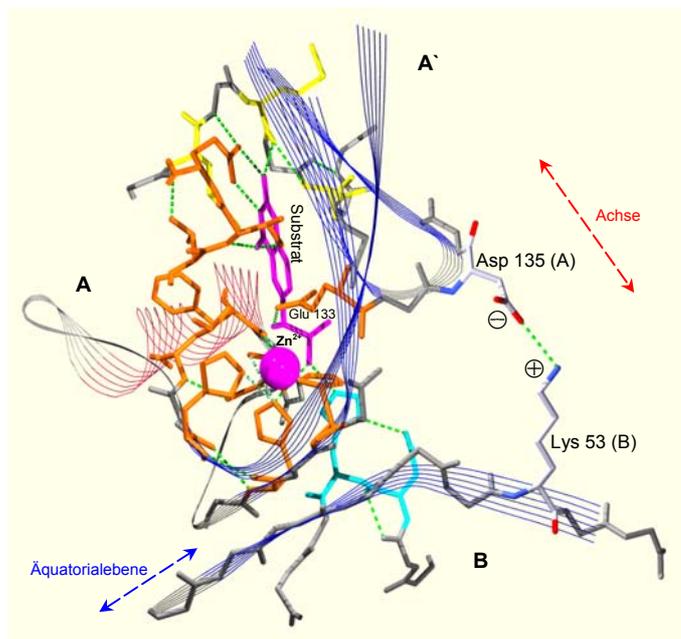


Abb. 4.11: Räumliche Beziehung von Asp 135 zur zentralen hydrophilen Pore und zum aktiven Zentrum. Asp 135 befindet sich auf der Innenseite der porenartigen β -Faß-Struktur an der Berührungsfläche beider Trimere und dreier Untereinheiten nahe des aktiven Zentrums. Sie geht dabei eine elektrostatische Wechselwirkung mit Lys 53 des gegenüberliegenden Trimers ein, die womöglich zur Stabilisierung der Trimere zueinander beiträgt. Die Untereinheiten sind durch Buchstaben, die Äquatorialebene ist durch einen blauen, die Achse der Pore durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Alle am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren sind entsprechend ihrer Untereinheit farblich hervorgehoben (A: orange; A': gelb; B: hellblau).

Als nächster Faktor ist die Nähe von Asp 135 zum aktiven Zentrum zu betrachten. Nur die Aminosäure Thr 134 trennt die Aminosäure von Glu 133, welches seinerseits die Substratseitenkette durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert. Die Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxy-Gruppe der Glutaminsäure und der C1'-OH-Gruppe der Substratseitenkette fixiert diese womöglich in der richtigen Richtung zum für die katalytische Reaktion wichtigen Zn^{2+} -Ion (Kap I – B 5.2).

Es wäre also denkbar, daß die Mutation von Asp 135 zu Glycin eine eingeschränkte Katalysiefähigkeit des aktiven Zentrums zur Folge hat, zum einen weil die Polarität der zentralen Pore abnehmen würde und zum anderen weil die korrekte Substratbindung beeinträchtigt werden könnte.

N138H (Exon 6 ; Pat. 6)

Die Mutation N138H führt zur Substitution der neutralen Aminosäure Asparagin durch Histidin an Position 137 (Position 138 der humanen Sequenz). Asn 137 befindet sich in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum (Abb. 4.12 A), was vermuten läßt, daß eine Mutation in dieser Region nicht ohne Folgen für die Enzymaktivität bleiben sollte.

Der recht polare Imidazol-Ring des Histidins könnte Wasserstoff-Brückenbindungen mit einigen Seitenketten der direkt am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren ausbilden (In Abb. 4.12 B grün dargestellt). Die H-Brücken zu Thr 106 und Glu 133, könnten eine verschlechterte Anlagerung des Substrats zur Folge haben, weil die genannten Aminosäuren selbst durch H-Brücken der Lagestabilisierung des Dihydroneopterin Triphosphats dienen.

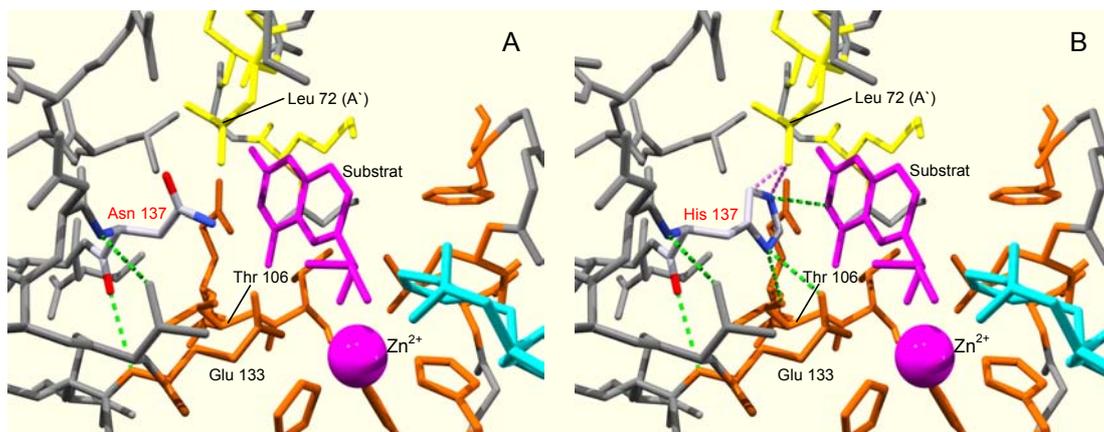


Abb. 4.12: Räumliche Beeinflussung des aktiven Zentrums bei Substitution von Asparagin (A) durch Histidin (B) an Position 137. Der Imidazol-Ring von Histidin interagiert an mehreren Stellen mit Seitenketten der am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren. Einerseits kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken (grün gestrichelt), andererseits kommt es teilweise zu *sterischer Hinderung* durch zu starke Annäherung an Seitenketten (rosa gestrichelt). Die direkt am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren sind entsprechend ihrer Untereinheit farblich gekennzeichnet (A: orange; A': gelb; B: hellblau)

Desweiteren kann das Histidin auch Wasserstoff-Brücken mit dem Ringsystem des Substrats bilden, was ebenso zu einer Lageveränderung und somit verringerten Enzymaktivität führen könnte (Abb. 4.12 B).

Als weiterer hindernder Aspekt ist die Größe und damit Raumforderung des Imidazol-Rings zu betrachten. Bei fast allen durchführbaren *Rotameren* – dies sind räumliche Varianten, die durch Rotation der frei drehbaren C-Atome

der Seitenkette entstehen – kommt es zu sterischen Hinderungen, das bedeutet zu Abstoßungseffekten bedingt durch Überlappungen der Elektronenwolken. Bei Unterschreitung der sogenannten *van-der-Waals-Kontaktdistanz* werden starke Abstoßungskräfte wirksam, welche die Positionierung der Atome in entsprechender Stellung verhindern, bzw. ein Auseinanderdrängen der Strukturen zur Folge hätten (in Abb. 4.12 B rosa gestrichelt dargestellt). Eine schlechtere Substratbindung durch die raumfordernden Prozesse wäre insofern denkbar.

C. Patienten

Dieser Abschnitt umfaßt eine eingehende Darstellung der Patientendaten und soll die im letzten Abschnitt besprochenen Mutationen im Zusammenhang mit den zur Verfügung stehenden klinischen und laborchemischen Parametern der einzelnen Patienten charakterisieren. Soweit wie möglich sollen auch die denkbaren Auswirkungen der unterschiedlichen Mutationen in Hinblick auf ihre klinische Manifestation diskutiert werden. Bei *compound heterozygoten* Mutationen gilt es, eine Wertung hinsichtlich der unterschiedlichen Ausprägung der einzelnen Mutation im gesamten Krankheitsbild zu treffen.

Patient 01

Leider sind die vorliegenden Daten zu diesem Patienten, der homozygot für die Mutation A22G ist, äußerst eingeschränkt. Es wurde zwar ein Enzymdefekt nachgewiesen, doch liegt kein genauer Wert für die Enzymaktivität vor. Die Position der alterierten Aminosäure im aktiven Enzymkomplex und ihre direkte Nähe zu gleich zwei aktiven Zentren läßt allerdings eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität vermuten. Hinweis darauf könnte die Tatsache sein, daß eine zentrale Form der Erkrankung nachgewiesen wurde und daß im Alter von 10 Monaten neurologische Symptome und Entwicklungsstörungen diagnostiziert wurden.

Mit besonderen strukturellen Veränderungen ist bei dieser Mutation vermutlich nicht zu rechnen, dafür aber mit einer verschlechterten Substratbindung und Katalyse durch Beeinflussung der Zn^{2+} -bindenden Region und der *katalytischen Triade*, was durch enzymkinetische Untersuchungen und Bestimmung der Michaelis-Konstante (K_m) belegt werden könnte.

Zusätzliche klinische Daten, die eine weiterführende Diskussion zuließen liegen nicht vor.

Patient 02

Bei Patientin 02, die an der zentralen Form des PTPS-Mangels erkrankt ist, wurde die Mutation E35G homozygot nachgewiesen. Die in Erythrozyten gemessene Enzymaktivität ist mit 13% noch nicht deutlich reduziert. Zwar sind die Neopterinwerte im Liquor zumeist stark erhöht, die Biopterinwerte liegen jedoch eher im Normbereich. Der Allgemeinzustand ist bei alleiniger BH₄-Substitution bis auf leichte transiente neurologische Symptome recht gut.

Alle Parameter sprechen dafür, daß die Mutation nur zu einer Abschwächung der Enzymaktivität und nicht zu einem völligen Verlust der Funktion des Enzyms führt. Ein bedeutender Einfluß der Mutation auf das aktive Zentrum ist wegen des recht großen Abstandes zur alterierten Glutaminsäure recht unwahrscheinlich. Vermutlich führt die Mutation auf Grund ihres Einflusses auf struktureller Ebene (Abb. 4.6) zu einer leichten Konformationsänderung bzw. verminderten Stabilität des Enzyms, die aber immer noch eine erkennbare Aktivität zuläßt. Womöglich spielt aber auch eine veränderte Oberflächenmorphologie eine Rolle. Als Folge wäre möglicherweise ein negativer Effekt auf aktivitätssteigernde posttranslationale Modifikationen denkbar.

Patient 03

Diese Patientin ist *compound* heterozygot für die Mutationen R17_I18insR und D136G. Die Patientin ist an der zentralen Form des PTPS-Mangels erkrankt, zeigt deutliche neurologische Symptome und ist trotz Therapie geistig wie körperlich behindert. Wahrscheinlich ist es wegen zu später Diagnosestellung (erst mit 7 Jahren) und somit verzögerter adäquater Therapie zu irreversiblen zentralnervösen Schäden gekommen, so daß selbst die Substitution von BH₄ und Neurotransmittervorstufen kein völliges Verschwinden der neurologischen Symptomatik mehr bewirken kann. Die in Erythrozyten gemessene Enzymaktivität ist mit 4,4% deutlich verringert. Die gemessenen Neopterin- und Biopterinwerte im Urin und Liquor liegen alle in pathologischen Bereichen.

Alle Parameter sprechen dafür, daß das Enzym in seiner Funktion stark eingeschränkt sein muß, was sowohl funktionelle als auch strukturelle Ursachen haben kann.

Bei beiden Mutationen, sowohl R17_I18insR als auch D136G ist wahrscheinlich davon auszugehen, daß sie eine signifikante Verminderung der Enzymaktivität verursachen sollten, wobei schwer einzuschätzen ist, welche der beiden Mutationen größeren Einfluß auf die Enzymaktivität hat. Womöglich ist D136G von größerer Bedeutung, weil hier sowohl ein Einfluß auf die Struktur als auch auf das aktive Zentrum anzunehmen ist. Allerdings ist letztendlich das genaue Ausmaß der durch die Insertion verursachten strukturellen Veränderung nur schwer abzuschätzen, weil die Veränderungen infolge der Verschiebung der Aminosäuren, die sich weit durch das gesamte Enzym erstrecken können, sehr komplex und kaum exakt vorhersehbar sind.

Zur genaueren Charakterisierung beider Mutationen und um abzuklären, ob R17_I18insR eventuell auch Einfluß auf die Phosphorylierung des Enzyms hat bedarf es noch eingehender funktioneller Analysen beider rekombinant exprimierter Mutanten.

Patient 04

Dieser Patient ist *compound* heterozygot für die Mutationen P87L und Y113C. Er ist an der peripheren Form des PTPS-Mangels erkrankt und zeigt bei regelmäßiger BH₄-Substitution eine unauffällige Entwicklung. Die gemessene Enzymaktivität ist mit 0,6% in Erythrozyten jedoch stark verringert. Hier stellt sich eine deutliche Diskrepanz zwischen der gemessenen Enzymaktivität und klinischer Symptomatik dar. Bei einer so extrem reduzierten Aktivität würde man eigentlich ein wesentlich schwereres Erscheinungsbild der Erkrankung vermuten. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, daß es deutliche Unterschiede der Enzymaktivität in der Peripherie (Erythrozyten) und in zentralnervösen Zellen geben muß. Zwar ist bekannt, daß eine residuale PTPS-Aktivität von unter 20% in Erythrozyten noch ausreichend sein kann, genügend BH₄ für die Biosynthese der Neurotransmitter Dopamin und

Serotonin zur Verfügung zu stellen (Niederwieser et al. 1987), bei einem Wert von 0,6% scheint das jedoch ausgeschlossen.

In einer Untersuchung von T. Oppliger zeigten Fibroblasten mit dem homozygoten P87L-Allel eine Aktivität von unter 1% im Gegensatz zum rekombinanten Enzym *in vitro*, wo eine Aktivität von etwa 30% gemessen wurde (Oppliger et al. 1995b), was ein Hinweis auf eine geringere Stabilität der Mutante *in vivo* oder zellgebundene posttranslationale Modifikationen des Enzyms sein könnte.

Interessanterweise treten bei der peripheren Form der Erkrankung keine deutlichen neurologischen Symptome auf, was bedeuten könnte, daß aus ungeklärten Gründen die Enzymaktivität in Nervenzellen höher wäre als in der Peripherie. Da der von T. Oppliger beschriebene Patient (homozygot für P87L) an der zentralen Form erkrankt ist, wäre zu vermuten, daß der periphere Verlauf der Erkrankung bei Patient 04 womöglich auf einen „abschwächenden Effekt“ der heterozygoten Mutation Y113C zurückzuführen ist.

So wäre beispielsweise denkbar, daß strukturelle oder funktionelle Modifikationen des Enzyms durch zellspezifische Mechanismen in unterschiedlichen Zellen verschieden ausgeprägt sind. Es konnte bereits gezeigt werden, daß PTPS-Mutanten in verschiedenen humanen Zelltypen unterschiedliche Aktivitäten aufwiesen (Oppliger et al. 1997). In Analogie wäre es möglich, daß die Mutation Y113C in Erythrozyten zum Verlust der Enzymaktivität führt, in Nervenzellen jedoch kaum eine Aktivitätsminderung zur Folge hat. So könnte es vielleicht sein, daß es bei der Y113C-Mutante in der Peripherie zum beschriebenen Kollaps der Tertiärstruktur kommt, die in Nervenzellen möglicherweise ausbleibt oder weniger ausgeprägt ist. Eventuell nimmt das Enzym in Nervenzellen auch eine andere Konformation ein, bei der die erwähnte Kavitätenbildung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Denkbar wäre auch, daß in der Peripherie im mutierten Bereich regulatorische Prozesse, wie posttranslationale Modifikationen ansetzen, die in Nervenzellen nicht existieren.

Zur Klärung dieser Fragestellung bedarf es genauer funktioneller Untersuchungen der Y113C-Mutante. Insbesondere der Vergleich der Enzymaktivität

in unterschiedlichen humanen Zellen sollte erfolgen, wobei die Messung der Aktivität in Nervenzellen von besonderer Bedeutung wäre.

Von den beiden bei Patient 04 untersuchten Mutationen scheint P87L diejenige mit der größeren Auswirkung auf die Enzymaktivität zu sein, weil sie sowohl strukturelle Veränderungen verursachen als auch direkten Einfluß auf das aktive Zentrum haben sollte. Die Bildung einer Disulfid-Brücke bei der Mutante Y113C, die vermutlich sowohl zu einer Degradation des Proteins als auch zum völligen Verlust der Enzymaktivität führen würde, scheint recht unwahrscheinlich, weil in einem solchen Falle das gesamte Krankheitsbild des Patienten vermutlich deutlich schwerwiegender wäre.

Patient 05

Patient 05 ist *compound* heterozygot für die Mutationen Y99X und A101V, die beide dicht hintereinander in Exon 5 auftreten. Er ist an der zentralen Form des PTPS-Mangels erkrankt und zeigt typische klinische Symptome mit zunehmender geistiger Retardierung und Verbesserung des Allgemeinzustandes nach BH₄- und Neurotransmitter-Substitution. Nach kurzzeitigem Absetzen der Therapie im Alter von 15 Jahren verschlechterte sich der Zustand des Patienten deutlich.

Die in Erythrozyten gemessene Enzymaktivität ist mit 2,4% stark reduziert. Sowohl die Konzentrationen der Pterine im Urin und Liquor als auch die Neurotransmittermetabolite im Liquor sind weitestgehend pathologisch.

Alle Parameter sprechen für eine starke Einschränkung der Enzymfunktion, die vermutlich in erster Linie auf die C-terminale Verkürzung der Peptidkette durch die Mutation Y99X zurückzuführen ist. Homozygot würde diese Mutation wahrscheinlich in einer völligen Inaktivierung des Enzyms resultieren.

Die Mutation A101V hingegen führt auf Grund der voraussichtlich nur minimalen Veränderung ihrerseits wahrscheinlich nur zu einer leichten Reduktion der Enzymaktivität. Trotzdem ist anzunehmen, daß auch diese Mutation nicht gänzlich ohne Einfluß auf die Enzymaktivität ist, weil in einem solchen Fall infolge der Mutation Y99X mit einer funktionellen Hemizygotie zu rechnen wäre und man damit, wie bei obligat Heterozygoten, eine voraussichtliche

erythrozytäre Enzymaktivität von mindestens 8-31% erwarten sollte. Somit stellt sich die Frage, ob die an der Oberfläche des Enzyms gelegene Aminosäure womöglich in noch nicht bekannte posttranslationale Modifikationen involviert ist. Weiterführende funktionelle Untersuchungen einer homozygoten Rekombinante der Mutation A101V wären jedoch zweckmäßig, um diese Fragestellung klären zu können.

Patient 06

Patient 06 ist homozygot für die Mutation N138H und zeigt einen sehr milden transienten Krankheitsverlauf und mit zunehmenden Alter bei alleiniger phenylalaninreicher Diät eine normale Entwicklung. Lediglich die Neopterin-konzentrationen in Liquor und Urin sind pathologisch erhöht, was schon für einen verringerten Umsatz des Substrats spricht. Die in Erythrozyten gemessene Enzymaktivität ist mit 16% jedoch nicht erheblich reduziert und anscheinend ausreichend für eine weitestgehend normale Entwicklung des Patienten bei alleiniger phenylalaninreicher Diät.

Vermutlich kommt es wegen der Beeinflussung des Histidinrings von Aminosäuren, die direkt am aktiven Zentrum beteiligt sind und durch raumfordernde Prozesse zu einer eingeschränkten Substratbindung, nicht aber zu einer erheblichen Reduktion der Aktivität. Weitere enzymkinetische Untersuchungen zur Substratbindung wären hier interessant.

Patient 07

Patientin 07 ist homozygot für die Mutation G125R. Sie ist an der zentralen Form des PTPS-Mangels erkrankt, zeigte als Kleinkind Entwicklungsrückstand mit mentaler Retardierung und unter späterer adäquater Therapie normale Entwicklung bei gutem Allgemeinzustand. Neopterin- und Biopterinkonzentrationen im Liquor bewegen sich in pathologischen Bereichen, wohingegen sie im Urin weitestgehend normal sind. Im Alter von sechs Jahren war keine Enzymaktivität, mit sieben Jahren allerdings 16% in Erythrozyten meßbar (Messungsfehler?).

Eine Konformationsänderung des gesamten Enzymkomplexes auf Grund von Abstoßungseffekten zwischen den einzelnen Domänen und den β -Strängen hätte vermutlich eine komplette Inaktivität zur Folge. Die Reduktion der Enzymaktivität ist aller Wahrscheinlichkeit nach eher auf eine insuffiziente Aneinanderlagerung der GTPCH an die PTPS zurückzuführen, bedingt durch Positionierung des Arginins am Porenende, was vermutlich eine höhere Instabilität des Dihydroneopterin im „freien“ Intrazellularraum und somit auch eine verringerte Umsetzung des Substrats zur Folge hat. Weitere Messungen der Enzymaktivität *in vivo* und *in vitro* zur Untermauerung dieser Hypothese wären allerdings sinnvoll.

Patient 08

Patientin 08 ist homozygot für die Mutation R25Q. Sie ist an der zentralen Form des PTPS-Mangels erkrankt und zeigt verzögerte Entwicklung in der frühen Kindheit mit Hypotonus der Rumpfmuskulatur, jedoch unter rechtzeitiger adäquater Therapie deutliche Besserung. Sowohl die gemessenen Neopterin- als auch Biopterinkonzentrationen sind pathologisch. Eine Enzymaktivität in Erythrozyten ist nicht nachweisbar.

Es konnte bereits gezeigt werden, daß bei der homozygoten Mutation R25Q die Aktivität in Erythrozyten und Hautfibroblasten unterhalb der Nachweisgrenze lag, wohingegen die rekombinant in *Escherichia coli* exprimierte R25Q-Mutante eine Aktivität von 61% aufwies (Oppliger et al. 1995b, Abb. 1.16). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die in COS-1-Zellen (eukaryotische Zellen) exprimierte Mutante weitestgehend inaktiv ist und der K_m -Wert des rekombinanten Allels *in vitro* etwa um den Faktor 3 erhöht ist, was von einer Verringerung der Substratbindung zeugt (Oppliger et al. 1995b). Die Differenz der Aktivität in *Escherichia coli* und COS-1-Zellen könnte ein Hinweis auf mögliche posttranslationale Modifikationen in Eukaryonten sein, die in *E. coli* nicht stattfinden.

Einerseits wird die Nähe der substituierten Aminosäure zum aktiven Zentrum (Abb. 4.4) durch die verminderte Affinität des Enzyms zum Substrat deutlich, was durch den erhöhten K_m -Wert zum Ausdruck gebracht wird, und zum an-

deren ist es durchaus denkbar, daß gerade der weit nach außen ragende Argininrest auf der Proteinoberfläche mit seiner stark positiven Ladung als möglicher *Rezeptorlocus* für andere Enzyme, die weitere aktivitätssteigernde Modifikationen einleiten, fungieren könnte (Abb. 4.5). Wären bedingt durch die veränderte Oberflächenmorphologie bestimmte aktivitätssteigernde zellspezifische posttranslationale Modifizierungen bei eukaryoten Zellen nicht mehr möglich, so würde das die verringerte Aktivität in Fibroblasten, Erythrozyten und COS-1-Zellen gegenüber *E. coli* erklären.

Weiterhin wurde bei Pat. 08 eine Basensubstitution im Intronbereich beobachtet (IVS2+14t>c). Verschiedene Gründe sprechen dafür, daß es sich dabei vermutlich um einen Polymorphismus handelt, der keinerlei krankheitsauslösenden Effekt hat. Zum einen liegt die substituierte Base nicht im codierenden Bereich und zudem recht weit von der Spleißsequenz entfernt, was die Beteiligung an Spleiß-Mechanismen unwahrscheinlich macht. Desweiteren wurde bei Pat. 08 bereits homozygot die Mutation R25Q gefunden, deren krankheitsauslösender Effekt bereits bekannt ist (Thöny et al. 1994b; Oppliger et al. 1995b). Um jedoch mit Sicherheit sagen zu können, ob es sich bei IVS2+14t>c um einen Polymorphismus handelt, müßte man in einer größeren Population die Prävalenz der Substitution nachweisen. Eine Allelfrequenz von über 1% spräche definitionsgemäß für einen Polymorphismus.

Patient 09

Patient 09 ist *compound* heterozygot für die Mutationen F40fsX56 und Y99X und an der zentralen Form des PTPS-Mangels erkrankt. Weiterhin stehen uns leider keine zusätzlichen klinischen oder laborchemischen Parameter zur Verfügung. In Anbetracht der Tatsache, daß beide Mutationen durch zu frühe Entstehung eines Stopcodons zu einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der Polypeptidsynthese führen und bereits gezeigt werden konnte, daß solche C-terminalen Verkürzungen in einer völligen Inaktivität des Enzyms resultieren (Thöny et al. 1994b; Oppliger et al. 1995b), kann auch ohne weitere Betrachtung mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß bei Patient 09 keine meßbare Enzymfunktion vorliegen sollte.

D. Schlußbetrachtung

Obwohl PTPS-Mangel inzwischen eine recht gut untersuchte Erkrankung ist und die metabolischen Grundlagen der BH₄-Synthese bekannt sind, bleiben doch viele molekulare Konsequenzen der Mutationen des Enzyms *in vivo* ungeklärt. Besonders das heterogene Erscheinungsbild der Erkrankung mit den sehr unterschiedlichen Phänotypen wirft weitere Fragen auf. Die Suche nach der Ursache für das jeweilige Auftreten der zentralen und der peripheren Form der Erkrankung ist in diesem Zusammenhang nach wie vor von besonderem Interesse.

Die Charakterisierung der Mutationen auf der Basis des Strukturmodells des Enzyms mit Hilfe von *Molecular-Modeling* ist ein nützliches Hilfsmittel, um die etwaige Auswirkung von Mutationen auf molekularer Ebene besser verstehen zu können. Allerdings sind dieser Technik noch einige Grenzen gesetzt. Strukturelle Veränderungen lassen sich zwar abschätzen, eine sichere Vorhersage der zu erwartenden Veränderung läßt sich auf Grund der komplexen Einflüsse unterschiedlichster Faktoren jedoch nicht exakt berechnen. Zu bedenken sind zudem noch unzulänglich bekannte zelluläre Wechselwirkungen mit dem Enzym. Bei einigen Mutationen ist es noch unklar, ob die reduzierte Enzymaktivität direkt durch die zu erwartenden Strukturveränderungen bzw. Instabilität des Proteins hervorgerufen wird oder ob durch die Mutation aktivitätssteigernde Wechselwirkungen mit zellulären Strukturen ausbleiben, die beim nativen Enzym für die volle Aktivität erforderlich sind. Eine verhältnismäßig geringere Aktivität *in vivo* wäre somit zumindest plausibel.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen vermuten, daß ein krankheitsauslösender Effekt bei nahezu allen gefundenen Mutationen auf Grund der anzunehmenden Veränderungen auf struktureller Ebene oder Beeinflussung des aktiven Zentrums sehr wahrscheinlich ist. Lediglich die Mutation A101V bei Patient 05 hat womöglich mehr Einfluß auf die Enzymaktivität als man infolge der nur geringfügigen molekularen Veränderungen theoretisch erwarten würde.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnten noch nicht bekannte posttranslationale Modifikationen sein, die im Bereich der mutierten oberflächlichen Region des Proteins ansetzen. Weitere Untersuchungen sollten darüber Aufschluß geben, inwieweit die untersuchten Mutationen wirklich Einfluß auf den Phänotyp zeigen und welche Rolle posttranslationale Modifikationen für die Enzymaktivität spielen. Hierzu zählt einerseits die Analyse der Stabilität des rekombinant exprimierten Proteins und andererseits die Messung der Enzymaktivitäten der rekombinanten Mutanten *in vitro* und *in vivo*. Insbesondere sollten vergleichende Messungen der Aktivitäten in unterschiedlichen humanen Zellen erfolgen.

Da bisher gezeigt werden konnte, daß die PTPS-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung moduliert wird (Scherer-Oppliger et al. 1999a; Thöny et al. 2000), jedoch bisher keine regulatorischen Mechanismen auf Transkriptionsebene bekannt sind, stellt sich die Frage, ob die PTPS-Aktivität in erster Linie durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aktivität bestimmter Mutanten zelltypabhängig ist (Scherer-Oppliger et al. 1999b). Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß in verschiedenen humanen Zellen unterschiedliche posttranslationale Mechanismen zum Tragen kommen, die durch unterschiedliche Mutationen verschieden stark beeinträchtigt werden.

Möglicherweise spielen diese Mechanismen auch eine Schlüsselrolle bei der Ausprägung des zentralen und des peripheren Verlaufs des PTPS-Mangels. Somit wäre es von besonderem Interesse, die gemessene Enzymaktivität der Mutanten in peripheren Zellen (z.B. Leberzellen) mit der meßbaren Aktivität im ZNS zu vergleichen. Diesbezüglich sollte man vor allem die Mutation Y113C untersuchen, die bei dem einzigen Patienten mit peripherem Verlauf der Erkrankung auftrat. Der Vergleich der gemessenen Aktivitäten verschiedener Mutanten in unterschiedlichen Zellen könnte zudem helfen, mehr über die Regulationsprozesse der Enzymaktivität in diversen Zelltypen zu lernen. Es ist inzwischen durch Implantation von menschlichen Stammzellen in das ZNS von Mäusen möglich, in diesen langfristig humane Hirnzellen anzuzüchten (Uchida et al. 2000). So wird es in näherer Zukunft wahrscheinlich

auch umzusetzen sein, die Auswirkungen und Wechselwirkungen des mutierten Enzyms auf humane Nervenzellen *in vivo* zu untersuchen.

Letztlich wären auch röntgenkristallographische Untersuchungen der rekombinanten Mutanten sehr interessant, um so auch Rückschlüsse auf die Aussagekraft und Zuverlässigkeit der computergestützten Vorhersagen machen zu können und um mögliche Fehlerquellen oder Schwächen der Methode zu erkennen. Je mehr Mutationen bezüglich ihrer Auswirkungen auf struktureller Ebene untersucht werden und je umfangreicher das Wissen über die komplexen Zusammenhänge der molekularen Wechselwirkungen ist, um so leichter wird es sein, durch die gewonnenen Kenntnisse auch Rückschlüsse auf die Auswirkungen neuer Mutationen machen zu können.

Wünschenswert jedenfalls wäre es, und dazu soll diese Untersuchung einen Beitrag leisten, daß in Zukunft bei neuen noch unbekanntem Mutationen sich der Einfluß auf Struktur bzw. Funktion des Enzyms sowie das zu erwartende Ausmaß der Erkrankung mit Hilfe von Computerberechnungen vorhersagen ließe.

V. ZUSAMMENFASSUNG

6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase (PTPS) katalysiert den zweiten Schritt der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin (BH₄), einem wichtigen Cofaktor verschiedener Enzyme, einschließlich der hepatischen Phenylalanin-Hydroxylase, der Tyrosin- und der Tryptophan-Hydroxylase. Autosomal rezessiv erblicher PTPS-Mangel verursacht eine Variante der Hyperphenylalaninämie, die meist mit einem Mangel der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin einhergeht. Klinisch beobachtet man häufiger die schwere, von ausgeprägten neurologischen Symptomen begleitete zentrale Form der Erkrankung, die mit Neurotransmittervorstufen und BH₄ behandelt wird, und selten die periphere Form, bei der wegen ausreichender Neurotransmittersynthese oft nur eine BH₄-Substitution notwendig ist.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde bei neun Patienten aus Deutschland und England mit nachgewiesenem PTPS-Mangel eine Mutationsanalyse durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA aller sechs Exons des *PTS*-Gens einschließlich der angrenzenden Intronsequenzen sequenziert und zum Teil zusätzlich mittels Enzymverdau analysiert. Alle für die PCR erforderlichen Primer, ausgenommen für Exon 1, wurden dazu neu entworfen.

Es wurden insgesamt zwölf Mutationen gefunden, darunter waren eine Insertion (R17_I18insR), eine Deletion (F40fsX56), neun Missense- (A22G, R25Q, E35G, P87L, A101V, Y113C, G125R, D136G, N138H) und eine Nonsense-Mutation (Y99X). Fünf Patienten waren homozygot und vier *compound* heterozygot für jeweils zwei Mutationen.

Zur genaueren Charakterisierung der Mutationen erfolgte eine räumliche Darstellung der mutierten Aminosäuren in Relation zu ihrer molekularen Umgebung mittels *Protein-Modeling*. Alle Mutationen erfolgten in konservierten Bereichen der Aminosäuresequenz. Bei nahezu allen untersuchten Mutationen ist auf Grund ihrer Nähe zum aktiven Zentrum oder durch den anzunehmenden Einfluß auf die Struktur des Enzyms ein krankheitsauslösender

Effekt sehr wahrscheinlich. Fünf mutierte Aminosäuren befinden sich in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum (A22G, N138H, R25Q, P87L, D136G), die drei letztgenannten haben vermutlich zusätzlich noch stabilitätsmindernden Einfluß auf die Struktur des Proteins. Bei vier weiteren Mutationen (R17_I18insR, E35G, Y113C, G125R) ist ebenfalls zu erwarten, daß sie einen destabilisierenden Einfluß auf die Tertiär- und Quartiärstruktur des Enzyms haben sollten, weil sie entweder wegen ausgeprägter räumlicher Veränderungen oder sich abstoßender Ladungen unterschiedlicher Aminosäuren einer stabilen Ausbildung der nativen Proteinstruktur vermutlich im Wege stehen. Die Mutation G125R könnte zudem die Aneinanderlagerung der PTPS an GTPCH, dem ersten Enzym der BH₄-Synthese, verschlechtern und somit die Substratumsetzung signifikant herabsetzen. Die Mutationen Y99X und R40fsX56 führen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der Polypeptidsynthese und resultieren vermutlich in einem inaktiven Enzym, insbesondere da bereits gezeigt werden konnte, daß auch andere C-terminal verkürzte Mutanten keine Aktivität aufwiesen. Lediglich die Mutation A101V sollte auf Grund ihrer geringfügigen Änderung (konservative Substitution, weit entfernt funktionell wichtiger Regionen) nur wenig Einfluß auf die Enzymfunktion haben. Der für die Mutation *compound* heterozygote Patient weist jedoch eine kaum meßbare Enzymaktivität und schwere klinische Symptome auf. Dieser Fall demonstriert die Grenzen des *Protein-Modeling* für eine prospektive Einschätzung des pathogenetischen Effektes einer Mutation; so können z.B. an der Oberfläche des Enzyms liegende alterierte Aminosäuren in noch nicht bekannte, für die volle Aktivität aber notwendige posttranslationale Modifikationen involviert sein. Der einzige Patient mit der peripherem Form der Erkrankung war *compound* heterozygot für die Mutationen P87L und Y113C. In Zukunft gilt zu klären, ob das Ausbleiben neurologischer Symptome in diesem Fall auf die Mutation Y113C zurückzuführen ist und ob Tyr 113 womöglich in der Peripherie, jedoch nicht im ZNS für die volle Enzymfunktion erforderlich ist. Aufschluß hierüber können nur anschließende funktionelle Untersuchungen der rekombinant exprimierten Mutanten und Messung deren Aktivität in unterschiedlichen humanen Zelltypen geben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Allen, R.J. ; Young, W. ; Bonacci, J. ; Persico, S. ; Andruszewski, K. ; Schaefer, A.M. (1990): Neonatal dystonic parkinsonism, a "stiff baby syndrome", in bipterin deficiency with hyperprolactinemia detected by newborn screening for hyperphenylalaninemia, and responsiveness to treatment. *Ann Neurol.* 28:434

Anastasiadis, P.Z. ; States, J.C. ; Imerman, B. ; Louie, M.C. ; Kuhn, D.M. ; Levine, R.A. (1996): Mitogenic effects of tetrahydrobiopterin in PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* 49:149-155

Ashida, A. ; Owada, M. ; Hatakeyama, K. (1994): A missense mutation (A to G) of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase in tetrahydrobiopterin-deficient form of hyperphenylalaninemia. *Genomics* 24:408-410

Auerbach, G. ; Nar, H. (1997): The pathway from GTP to tetrahydrobiopterin: Three-dimensional structures of GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biol. Chem.* 378:185-192

Auerbach, G. ; Herrmann, A. ; Gülich, M. ; Fischer, M. ; Jacob, U. ; Bacher, A. ; Huber, R. (1997): The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters. *EMBO J.* 16:7219-7230

Bartholomé, K. (1974): A new molecular defect in phenylketonuria. *Lancet.* 2:1580

Bartholomé, K. ; Byrd, D.J. (1975): L-dopa and 5-hydroxytryptophan therapy in phenylketonuria with normal phenylalanine-hydroxylase activity. *Lancet.* 2:1042-1043

Bartholomé, K. ; Byrd, D.J. ; Kaufman, S. ; Milstien, S. (1977): Atypical phenylketonuria with normal phenylalanine hydroxylase and dihydropteridine reductase activity in vitro. *Pediatrics.* 59:757-761

Bickel, H. ; Gerrard, J. ; Hickmans, E.M. (1953): Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet II:*812-823

Bickel, H. ; Gerrard, J. ; Hickmans, E.M. (1954): The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child. *Acta Paediatr.* 43:64-77

- Blau, N. ; Niederwieser, A. (1985): GTP cyclohydrolases: a review. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23:169-176
- Blau, N. ; Barnes, I. ; Dhondt, J.L. (1996a): International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J. Inher. Metab. Dis.* 19:8-14
- Blau, N. ; Ichinose, H. ; Nagatsu, T. ; Heizmann, C.W. ; Zacchello, F. ; Burlina, A.B. (1995): A missense mutation in a patient with guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency missed in the newborn screening program. *J. Pediatr.* 126:401-405
- Blau, N. ; Kierat, L. ; Matasovic, A. ; Leimbacher, W. ; Heizmann, C.W. ; Guardamagna, O. ; Ponzzone, A. (1994): Antenatal diagnosis of tetrahydro-biopterin deficiency by quantification of pterins in amniotic fluid and enzyme activity in fetal and extrafetal tissue. *Clin. Chim. Acta.* 226:159-169
- Blau, N. ; Niederwieser, A. ; Curtius, H.C. ; Kierat, L. ; Leimbacher, W. ; Matasovic, A. ; Binkert, F. ; Lehmann, H. ; Leupold, D. ; Guardamagna, O. et al. (1989): Prenatal Diagnosis of atypical phenylketonuria. *J. Inher. Metab. Dis.* 12:295-298
- Blau, N. ; Scherer-Opliger, T. ; Baumer, A. ; Riegel, M. ; Matasovic, A. ; Schinzel, A. ; Jaeken, J. ; Thöny, B. (2000a): Isolated central form of tetrahydrobiopterin deficiency associated with hemizygoty on chromosome 11q and a mutant allele of PTPS. *Hum. Mutat.* 16:54-60
- Blau, N. ; Thöny, B. ; Dianzani, I. (2000b): BIOMDB: database of mutations causing tetrahydrobiopterin deficiency. <http://www.bh4.org/biomdb1.html>
- Blau, N. ; Thöny, B. ; Heizmann, C.W. ; Dhondt, J.L. (1993): Tetrahydrobiopterin deficiency: From phenotype to genotype. *Pteridines* 4:1-10
- Blau, N. ; Thöny, B. ; Spada, M. ; Ponzzone, A. (1996b): Tetrahydrobiopterin and inherited hyperphenylalaninemias. *Turk. J. Pediatr.* 38:19-35
- Bonafé, L. ; Thöny, B. ; Penzien, J.M. ; Czarnecki, B. ; Blau, N. (2001): Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J. Hum. Genet.* 69:269-277
- Bourne, H.R. ; Sanders, D.A. ; McCormick, F. (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349:117-127.
- Brewster, T.G. ; Abroms, I.F. ; Kaufman, S. ; Breslow, J.L. ; Moskowitz, M.A. ; Vिलее, D.B. ; Snodgrass, R.S. (1976): Atypical PKU, seizures, and developmental delay with dihydropteridine reductase deficiency. *Pediatr. Res.* 10:446

Bürgisser, D.M. ; Thöny, B. ; Redweik, U. ; Hess, D. ; Heizmann, C.W. ; Huber, R. ; Nar, H. (1995): 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, an Enzyme with a novel type of active site involving both zinc binding and an intersubunit catalytic triad motif; Site-directed mutagenesis of the proposed active center, characterization of the metal binding site and modeling of substrate binding. *J. Mol. Biol.* 253:358-369

Bürgisser, D.M. ; Thöny, B. ; Redweik, U. ; Hunziker, P. ; Heizmann, C.W. ; Blau, N. (1994): Expression and characterization of recombinant human and rat liver 6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase – Modified cysteine residues inhibit the enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* 219:497-502

Butler, I.J. ; Holtzman, N.A. ; Kaufman, S. ; Koslow, S.H. ; Krumholz, A. (1975): Phenylketonuria due to deficiency of dihydropteridine reductase. *Pediatr. Res.* 9:349

Butler, I.J. ; O`Flynn, M.E. ; Seifert, W.E. Jr. ; Howell, R.R. (1981): Neurotransmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninemia. *J. Pediatr.* 98:729-733

Cooper, D.N. ; Krawczak, M. ; Antonorakos, S.E. (1995) In: Scriver, C.R. ; Beaudet, A.L. ; Sly, W.S. ; Valle, D. (eds.): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th ed, McGraw-Hill, New York, 259-291

Cooper, D.N. ; Youssoufian, H. (1988): The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet.* 78(2):151-155

Cotton, R.G.H. ; Scriver, C.R. (1998): Proof of "disease causing" mutation. *Hum. Mutat.* 12:1-3

Danks, D.M. (1987): Pteridines and phenylketonuria. Report of a workshop; introductory comments. *J. Inher. Met. Dis.* 1:47-48

Danks, D.M. ; Cotton, R.G. ; Schlesinger, P. (1975): Tetrahydrobiopterin treatment of variant forms of phenylketonuria. *Lancet.* 2:1043

Danks, D.M. ; Cotton, R.G. ; Schlesinger, P. (1976): Variant forms of phenylketonuria. *Lancet.* 1:1236-1237

Danks, D.M. ; Schlesinger, P. ; Firgaira, F. ; Cotton, R.G. ; Watson, B.M. ; Rembold, H. ; Hennings, G. (1979): Malignant hyperphenylalaninemia – clinical features, biochemical findings, and experience with administration of biopterins. *Pediatr. Res.* 13:1150-1155

Dassesse, D. ; Hemmens, B. ; Cuvelier, L. ; Resibois, A. (1997): GTP-cyclohydrolase-I like immunoreactivity in rat brain. *Brain Res.* 777:187-201

Dhondt, J.L. (1984): Tetrahydrobiopterin deficiencies: preliminary analysis from an international survey. *Pediatrics* 104:501-508

Dhondt, J.L. (1991): Strategy for the screening of tetrahydrobiopterin deficiency among hyperphenylalaninaemic patients: 15 years experience. *J. Inher. Metab. Dis.* 14:117-127

Dhondt, J.L. (1993): Tetrahydrobiopterin deficiencies. Lessons from the compilation of 200 patients. *Developmental Brain Dysfunction* 6:139-155

Dhondt, J.L. ; Cotton, R.G.H. ; Danks, D.M. (1985): Liver enzyme activities in hyperphenylalaninemia due to a defective synthesis of tetrahydrobiopterin. *J. Inher. Metab. Dis.* 8:47-48

Dhondt, J.L. ; Largillière, C. ; Ardouin, P. ; Farriaux, J.P. ; Dautrevaux, M. (1981): Diagnosis of variants of hyperphenylalaninemia by determination of pterins in urine. *Clin. Chim. Acta.* 110:205-215

Dhondt, J.L. ; Tilmont, P ; Ringel, J. ; Farriaux, J.P. (1990): Pterins analysis in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of GTP cyclohydrolase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 13:879-882

Duch, D.S. ; Smith, G.K. (1991): Biosynthesis and function of tetrahydrobiopterin. *J. Nutr. Biochem.* 2:411-423

Dudešek, A. ; Röschinger, W. ; Muntau, A.C. ; Seidel, J. ; Leupold, D. ; Thöny, B. ; Blau, N. (2001): Molecular analysis and long-term follow-up of patients with different forms of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 160:267-276

Dunnen, J.T. den ; Antonarakis, S.E. (2000): Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum. Mutat.* 15:7-12

Endres, W. (1992): Differential diagnosis and therapy of various forms of hyperphenylalaninemia: facts and fiction. *Wien. Klin. Wochenschr.* 104:503-509

Endres, W. ; Blau, N. ; Curtius, H.C. (1989): Newborn screening and treatment of hyperphenylalaninemia due to tetrahydrobiopterin deficiency. In: Schmidt, B.J. et al., ed. *Current Trends in Infant Screening* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 77-82

Endres, W. ; Niederwieser, A. ; Curtius, H.C. ; Ohrt, B. ; Schaub, J. (1982a): Dihydrobiopterin deficiency: monotherapy with tetrahydrobiopterin (BH₄) and diacety BH₄. *Pediatr. Res.* 16:694

- Endres, W. ; Niederwieser, A. ; Curtius, H.C. ; Wang, M. ; Ohrt, B. ; Schaub, J. (1982b): Atypical phenylketonuria due to biopterin deficiency. Early treatment with tetrahydrobiopterin and neurotransmitter precursors, trials of monotherapy. *Helv. Pediatr. Acta.* 37:489-498
- Fink, J.K. ; Barton, N. ; Cohen, W. ; Lovenberg, W. ; Bruns, R.S. ; Hallett, M. (1988): Dystonia with marked diurnal variation associated with biopterin deficiency. *Neurology* 38:707-711
- Følling, A. (1934): Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure im Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Hoppe-Seyler`s Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 277:169-176
- Følling, A. ; Closs, K. (1938): Über das Vorkommen von Phenylalanin im Harn und Blut bei Imbecillitas phenylpyrouvica. *Hoppe-Seyler`s Zeitschrift für Physiologische Chemie* 254:107-114
- Følling, I. (1994): The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr. Suppl.* 407:4-10
- Furukawa, Y. ; Kish, S.J. (1999): Dopa-responsive dystonia: recent advances and remaining issues to be addressed. *Mov. Disord.* 14:709-15
- Gal, E.M. ; Hanson, G. ; Sherman, A. (1976): Biopterin. I. Profile and quantitation in rat brain. *Neurochem. Res.* 1:511-523
- Giugliani, R. ; da-Costa, J.C. ; Dutra-Filho, C.S. ; Dutra, J.C. ; Pereira, M.L.S. ; Niederwieser, A. (1986): Successful therapy of hyperphenylalaninemia due to defective tetrahydrobiopterin metabolism in two siblings. *Rev. Brasil. Genet.* 9:685-692
- Guex, N. ; Peitsch, M.C. (1997): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723
- Guthrie, R. ; Susie, A. (1963): A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338-343
- Guzman, J. ; Blau, N. (1992): 6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase in human tissues and cell lines. *Pteridines* 3:43-45
- Hanihara, T. ; Inoue, K. ; Kawanishi, C. ; Sugiyama, N. ; Miyakawa, T. ; Oniishi, H. ; Yamada, Y. ; Osaka, H. ; Kosaka, K. ; Iwabuchi, K. ; Owada, M. (1997): 6-Pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency with generalized dystonia and diurnal fluctuation of symptoms: A clinical and molecular study. *Movement Disord.* 12:408-411
- Harada, T. ; Kagamiyama, H ; Hatakeyama K. (1993): Feedback regulation mechanisms for the control of GTP cyclohydrolase I activity. *Science* 260:1507-1510

- Heizmann, C.W. ; Leimbacher, W. ; Kierat, L. ; Blau, N. (1991): Measurement of enzymes involved in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin, pterins and neurotransmitter metabolites in various regions of the human brain. In: Blau N. et al., eds Pterins and Biogenic Amines in Neurology, Grosse Pointe: Lakeshore Publishing Co. 95-99
- Henning, M. ; D`Arcy, A. ; Hampele, I.C. ; Page, M.G.P. ; Oefner, C. ; Dale, G.E. (1998): Crystal structure and reaction mechanism of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Staphylococcus aureus*. *Nature Struct. Biol.* 5:357-362
- Hsiao, K.J. ; Liu, T.T. ; Wu, K.F. ; Chiang, S.H. (1996): The mutations found in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficient phenylketonuria. 3rd ISNS Meeting Abs, 63
- Ichinose, H. ; Ohye, T. ; Matsuda, Y. ; Hori, T. ; Blau, N. ; Burlina, A. ; Rouse, B. ; Matalon R. ; Fujita, K. ; Nagatsu, T. ; (1995): Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes – Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J. Biol. Chem.* 270:10062-10071
- Ichinose, H. ; Ohye, T. ; Tkahashi, E. ; Seki, N. ; Hori, T. ; Segawa, M. ; Nomura, Y. ; Endo, K. ; Tanaka, H. ; Tsuji, S. ; Fujita, K. ; Nagatsu, T. ; (1994): Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat. Genet.* 8:236-242
- Imamura, T. ; Okano, Y. ; Sawada, Y. ; Hase, Y. ; Oura, T. ; Isshiki, G. ; Shintaku, H. (1994): A missense mutation of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Japanese. *Pteridines* 5:31
- Imamura, T. ; Okano, Y. ; Shintaku, H. ; Hase, Y. ; Isshiki, G. (1999): Molecular characterization of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Japanese patients. *J. Hum. Genet.* 44(3):163-168
- Imamura, T. ; Okano, Y. ; Shintaku, H. ; Hase, Y. ; Oura, T. ; Isshiki, G. (1995): Molecular characterization of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS) deficiency in Japanese. *Am J. Hum. Genet.* 57 (suppl. 4):A180
- Jervis, G.A. (1947): Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error. *J. Biol. Chem.* 169:651-656
- Kapatos, G. ; Kaufman, S. (1981): Peripherally administered reduced pterins do enter the brain. *Science.* 212:955-956
- Kaufman, S. (1993): New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu. Rev. Nutr.* 13:261-286

- Kaufman, S. ; Kapatos. G. ; McInnes, R.R. ; Schulman, J.D. ; Rizzo, W.B. (1982): Use of tetrahydropterins in the treatment of hyperphenylalaninemia due to defective synthesis of tetrahydrobiopterin: evidence that peripherally administered tetrahydropterins enter the brain. *Pediatrics*. 70:376-380
- Kaufman, S. ; Milstien, S. ; Bartholomé, K. (1975): New forms of phenylketonuria. *Lancet*. 2:708
- Kaufman, S. ; Pollock, R.J. ; Summer, G.K. ; Das, A.K. ; Hajra, A.K. (1990): Dependence of an alkyl glycol-ether monooxygenase activity upon tetrahydropterins. *Biochem. Biophys. Acta*. 1040:19-27
- Kluge, C. ; Brecevic, L. ; Heizmann, C.W. ; Blau, N ; Thöny, B. (1996a): Chromosomal localisation, genomic structure and characterization of the human gene and retropseudogene for 6 pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Eur. J. Biochem*. 240:477-484
- Kluge, C. ; Leimbacher, W. ; Heizmann, C.W. ; Thöny, B, (1996b): Isolation of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase cDNAs from human brain. *Pteridines* 7:91-93
- Koch, R. ; Wenz, E. (1987): Phenylketonuria. *Annu. Rev. Nutr.* 7:117-135
- Kojima, S. ; Ona, S. ; Iizuka, I. ; Arai, T. ; Mori, H. ; Kubota, K. (1995): Antioxidative activity of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin and its inhibitory effect on paraquat-induced cell toxicity in cultured rat hepatocytes. *Free Rad. Res*. 23:419-430
- Koshimura, K. ; Miwa, S. ; Lee, K. ; Fujiwara, M. ; Watanabe, Y. (1990): Enhancement of dopamine release in vivo from the rat striatum by dialytic perfusion of 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. *J. Neurochem*. 54:1391-1397
- Kure, S. ; Hou, D.C. ; Ohura, T. ; Iwamoto, H. ; Suzuki, S. , Sugiyama, N. ; Sakamoto, O. ; Fujii, K. ; Matsubara, Y. ; Narisawa, K. (1999): Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J. Pediatr*. 135:375-378
- Lazarus, R.A. ; Benkovic, S.J. ; Kaufman, S. (1983): Phenylalanine hydroxylase stimulator protein is a 4a-cabinolamine dehydratase. *J. Biol. Chem*. 258:10960-10962
- Leupold, D. ; Wang, M. ; Niederwieser, A. (1982): Tetrahydrobiopterin monotherapy in two siblings with dihydrobiopterin deficiency. In: Wachter, H. et al., eds. *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*. Berlin, New York: Walter de Gruyter 307-317

Le Van, Q. ; Katzenmeier, G. ; Schwarzkopf, B. ; Schmid, C. ; Bacher, A. ; (1988): Biosynthesis of biopterin studies on the mechanism of PTPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151:512-517

Liu, T.T. ; Hsiao, K.J. (1996): Identification of a common 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase mutation at codon 87 in Chinese phenylketonuria caused by tetrahydrobiopterin deficiency. *Hum. Genet.* 98:313-316

Liu, T.T. ; Hsiao, K.J. ; Lu, S.F. ; Wu, S.J. ; Wu, K.F. ; Chiang, S.H. ; Liu, X.Q. (1998): Mutation analysis of the 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase gene in Chinese hyperphenylalaninemia caused by tetrahydrobiopterin synthesis deficiency. *Hum. Mutat.* 11:76-83

Marletta, M.A. ; (1993): Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268:12231-12234

McInnes, R.R. ; Kaufman, S. ; Warsh, J.J. ; Van Loon, G.R. ; Milstien, S. ; Kapatos, G. ; Soldin, S. ; Walsh, P. ; MacGregor, D. ; Hanley, W.B. (1984): Biopterin synthesis defect. Treatment with L-dopa and 5-hydroxytryptophan compared with therapy with a tetrahydropterin. *J. Clin. Invest.* 73:458-469

McKusick, V.A. (1994): Mendelian inheritance in man. Baltimore: Johns Hopkins University Press

Milstien, S. ; Kaufman, S. (1985): Biosynthesis of tetrahydrobiopterin: conversion of dihydroneopterin triphosphate to tetrahydropterin intermediates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:1099-1107

Nar, H. ; Huber, R. ; Auerbach, G. ; Fischer, M. ; Hösl, C. ; Ritz, H. ; Bracher, A. (1995): Active site topology and reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 192:12120-12125

Nar, H. ; Huber, R. ; Heizmann, C.W. ; Thöny, B. ; Bürgisser, D. (1994): Three-dimensional structure of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, an enzyme involved in tetrahydrobiopterin synthesis. *EMBO J.* 13:1255-1262

Nichol, C.A. ; Smith, G.K. ; Duch, D.S. (1985): Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu. Rev. Biochem.* 54:729-764

Niederwieser, A. ; Curtius, H.C. (1987): Tetrahydrobiopterin biosynthetic pathway and deficiency. *Enzyme* 38:302-311

Niederwieser, A. ; Curtius, H.C. Wang, M. ; Leupold, D. (1982): Atypical phenylketonuria with defective biopterin metabolism. Monotherapy with tetrahydrobiopterin or sepiapterin, screening and study of biosynthesis in man.

Eur. J. Pediatr. 138:110-112

Niederwieser, A. ; Leimbacher, W. ; Curtius, H.C. ; Ponzzone, A. ; Rey, F. ; Leupold, D. (1985): Atypical phenylketonuria with "dihydrobiopterin synthetase" deficiency: absence of phosphate-eliminating enzyme activity demonstrated in liver.

Eur. J. Pediatr. 144:13-16

Niederwieser, A. ; Shintaku, H. ; Hasler, T. ; Curtius, H.C. ; Lehmann, H. ; Guaradamagna, O. ; Schmidt, H. (1986): Prenatal diagnosis of "dihydrobiopterin synthetase" deficiency, a variant form of phenylketonuria.

Eur. J. Pediatr. 145:176-178

Niederwieser, A. ; Shintaku, H. ; Leimbacher, W. ; Curtius, H.C. ; Hyanek, J. ; Zeman, J. ; Endres, W. (1987): Peripheral tetrahydrobiopterin deficiency with hyperphenylalaninemia due to incomplete 6-pyrovoyl tetrahydropterin synthase deficiency or heterozygosity. Eur J. Pediatr. 146:228-232

Niederwieser, A. ; Staudenmann, W. ; Wetzel, E. (1984): High-performance liquid chromatograph with column switching for the analysis of biogenic amine metabolites and pterins. J. Chromatogr. 290:237-246

Oppliger, T. ; Thöny, B. ; Kluge, C. ; Matasovic, A. ; Heizmann, C.W. ; Ponzzone, A. ; Spada, M. ; Blau, N. (1997): Identification of mutations causing 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in four Italian families. Hum. Mutat. 10:25-35

Oppliger, T. ; Thöny, B. ; Leimbacher, W. ; Scheibenreiter, S. ; Brandt, N.J. ; Heizmann, C.W. ; Blau, N. (1995a): Mutation analysis in patients with 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. Pteridines 6:141-143

Oppliger, T. ; Thöny, B. ; Nar, H. ; Bürgisser, D. ; Huber, R. ; Heizmann, C.W. ; Blau, N. (1995b): Structural and functional consequences of mutations in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase causing hyperphenylalaninemia in humans: phosphorylation is a requirement for *in vivo* activity. J. Biol. Chem. 270:29498-29506

Orengo, C.A. ; Thornton, J.M. (1993): Alpha plus beta folds revisited: some favoured motifs. Structure 1:105-120

Penrose, L.S. (1935): Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria).

Lancet II:192-94

Penrose, L.S. ; Quastel, J.H. (1937): Metabolic studies in phenylketonuria.

Biochemistry Journal 31:266-71

Ploom, T. ; Thöny, B. ; Yim, J. ; Lee, S. ; Nar, H. ; Leimbacher, W. ; Richardson, J. ; Huber, R. ; Auerbach, G. (1999): Crystallographic and kinetic investigations on the mechanism of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *J. Mol. Biol.* 286:851-860

Ponzone, A. ; Biasseti, S. ; Ferraris, S. ; Guardamagna, O. ; Curtius, H.C. ; Kierat, L. ; Blau, N. (1989): Differential entrance of tetrahydrobiopterin into the brain of patients with 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency. In: Levine R.A. et al., eds. *Pteridines and Biogenic Amines in Neuropsychiatry and Pediatrics*. Grosse Pointe: Lakeshore Publishing Co. 325-334

Ponzone, A. ; Guardamagna, O. ; Ferraris, S. ; Biasseti, S. ; Bracco, G. ; Niederwieser, A. (1987): Neurotransmitter therapy and diet in malignant phenylketonuria. *Eur. J. Pediatr.* 146:93-94

Ponzone, A. ; Guardamagna, O. ; Spada, M. ; Ferraris, S. ; Ponzone, R. ; Kierat, L. ; Blau, N. (1993): Differential diagnosis of hyperphenylalaninemia by a combined phenylalanine-tetrahydrobiopterin loading test. *Eur. J. Pediatr.* 152:655-661

Rey, F. ; Blandin-Savoja, F. ; Rey, J. (1976): Atypical phenylketonuria with normal dihydropteridine reductase activity. *N. Engl. J. Med.* 295:1138-1139

Schallreuter, K.U. ; Zschesche, M. ; Moore, J. ; Panske, A. ; Hibberts, N.A. ; Hermann, F.H. ; Metelmann, H.R. ; Sawatzki, J. (1998): In vivo evidence for compromised phenylalanine metabolism in vitiligo. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 243:395-399

Schaub, J. ; Daumling, S. ; Curtius, H.C. ; Niederwieser, A. ; Bartholomé, K. ; Viscontini, M. ; Schircks, B. ; Bieri, J.H. (1982): Tetrahydrobiopterin therapy of atypical phenylketonuria due to defective dihydrobiopterin biosynthesis. *Arch. Dis. Child* 53:674-676

Scherer-Oppliger, T. ; Leimbacher, W. ; Blau, N. ; Thöny, B. (1999a): Serine 19 of human 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase is phosphorylated by cGMP protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 274(44):31341-31348

Scherer-Oppliger, T. ; Matasovic, A. ; Laufs, S. ; Levy, H.L. ; Quackenbush, E.J. ; Blau, N. ; Thöny, B. (1999b): Dominant negative allele (N47D) in a compound heterozygote for a variant of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency causing transient hyperphenylalaninemia. *Hum. Mutat.* 13:286-289

Schoedon, G. ; Troppmair, J. ; Fontana, A. ; Huber, C. ; Curtius, H.C. ; Niederwieser, A. (1987): Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. *Eur. J. Biochem.* 166:303-310

Scriver, C.R. ; Clow, C.L. ; Kaplan, P. ; Niederwieser, A. (1987): Hyperphenylalaninemia due to deficiency of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. Unusual gene dosage effect in heterozygotes. *Hum. Genet.* 77:168-171

Scriver, C.R. ; Eisensmith, R.C. ; Woo, S.L.C. ; Kaufman, S. (1994): The hyperphenylalaninemia of men and mouse. *Annu. Rev. Genet.* 28:141-165

Scriver, C.R. ; Kaufman, S. ; Eisensmith, R.C. ; Woo, S.L.C. (1995): The hyperphenylalaninemia. In: Scriver C.R. ; Beaudet A.L. ; Sly W.S. ; Valle D. (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed. New York: McGraw Hill, 1015-1075

Segawa, M. ; Nomura, Y. (1995): Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation and dopa-responsive dystonia: Pathognomonic clinical features. In Segawa M, Nomura, Y (eds.): *Age Related Dopamine Dependent Disorders*. Vol. 14. Basel: S. Karger 10-24

Shapiro, M.B. ; Senapathy, P. (1987): RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic. Acids. Res.* 15:7155-7174

Shintaku, H. ; Niederwieser, A. ; Leimbacher, W. ; Curtius, H.C (1988): Tetrahydrobiopterin deficiency: assay for 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase activity in erythrocytes. *Eur. J. Pediatr.* 147:15-19

Smith, G.K. (1987): On the role of sepiapterin reductase in the biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Arch. Biochem. Biophys.* 255:254-266

Smith, I. Clayton, B.E. ; Wolff, O.H. (1975): New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction. *Lancet.* 1:1108-1111

Smith, I. ; Lloyd, J.(1974): Proceedings: Atypical phenylketonuria accompanied by severe progressive neurological illness unresponsive to dietary treatment. *Arch. Dis. Child.* 49:245

Spaapen, L.J.M. ; Backer, J.A. ; Velter, C. ; Loots, W. ; Rubio, M.E. ; Forget, P.P. ; Duran, M. ; Dorland, L. ; Poll, B.T. ; van Amstel, H.K. ; Bekhof, J. ; Blau, N. (2000): Tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia (HPA) in dutch neonates. *J. Inher. Metab. Dis.* 23:45

Synderman, S.E. ; Sandaricq, C. ; Pulmones, M.T. (1987): Successful long term therapy of biopterin deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 10:260-266

Tada, K. ; Narisawa, K. ; Arai, N. ; Ogasawara, Y. ; Ishizawa, S. (1980): A sibling case of hyperphenylalaninemia due to a deficiency of dihydropteridine reductase: biochemical and pathological findings. *Tohoku J. Exp. Med.* 132:123-131

Tada, K. ; Yoshida, T. ; Mochizuku, K. ; Konno, T. ; Nakagawa, H. ; Yokoyama, Y. ; Takada, G. ; Arakawa, T. (1969): Two siblings of : suggestion to a genetic variant of phenylketonuria. *Tohoku J. Exp. Med.* 100:249-253

Takikawa, S. ; Curtius, H.C. ; Redeweik, U. ; Leimbacher, W. ; Ghisla, S. (1986): Biosynthesis of tetrahydrobiopterin Purification and characterization of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase from human liver. *Eur. J. Biochem.* 161:295-302

Tanaka, K. ; Kaufman, S. ; Milstien, S. (1989a): Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cells. *Natl. Acad. Sci. USA* 86:5864-5867

Tanaka, K. ; Matsuo, N. ; Tsuzaki, S. ; Araki, K. ; Tsuchiya, Y. ; Niederwieser, A. (1989b): On-off phenomenon in a child with tetrahydrobiopterin deficiency due to 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency (BH₄ deficiency). *Eur. J. Pediatr.* 148:450-452

Tanaka, K. ; Yoneda, M. ; Nakajima, T. ; Miyatake, T ; Owada, M. (1987): Dihydrobiopterin synthesis defect: an adult with diurnal fluctuations of symptoms. *Neurology* 37 519-522

Thöny, B. ; Blau, N. (1997): Mutations in the GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase genes. *Hum. Mutat.* 10:11-20

Thöny, B. ; Auerbach, G. ; Blau, N. (2000): Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J.* 347:1-16

Thöny, B ; Heizmann, C.W. ; Mattei, M.G. (1994a): Chromosomal location of two human genes encoding tetrahydrobiopterin-metabolizing enzymes: 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase maps to 11q22.3-q23.3, and pterin-4a-carbinolamine dehydratase maps to 10q22. *Genomics* 19:365-368

Thöny, B. ; Leimbacher, W. ; Blau, N. ; Harvie, A. ; Heizmann, C.W. (1994b): Hyperphenylalaninemia due to defects in tetrahydrobiopterin metabolism: molecular characterization of mutations in 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase. *Am. J. Hum. Genet.* 54:782-792

Thöny, B. ; Leimbacher, W. ; Stuhlmann, H. ; Heizmann, C.W. ; Blau, N. (1996): Retrovirus-mediated gene transfer of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase corrects tetrahydrobiopterin deficiency in fibroblasts from hyperphenylalaninemic patients. *Hum Gen. Ther.* 7:1591-1597

Thöny, B. ; Neuheiser, F. ; Blau, N. ; Heizmann, C.W. (1995): Characterization of the human PCBD gene encoding the bifunctional protein pterin-4 α -carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor for the transcription factor HNF-1 α .

Biochem. Biophys. Res. Commun. 219:966-973

Uchida, N. ; Buck, D.W. ; He, D. ; Reitsma, M.J. ; Masek, M. ; Phan, T.V. ; Tsukamoto, A.S. ; Gage, F.H. ; Weissman, I.L. (2000): Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA 97(26):14720-14725

Werner, E.R. ; Werner Felmayer, G. ; Wachter, H. (1993): Tetrahydrobiopterin and cytokines. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 203:1-12

Williamson, M.L. ; Koch, R. ; Azen, C. ; Chang, C. (1981): Correlation of intelligence test results in treated phenylketonuric children. Pediatrics. 68:161-167

Yoshioka, S ; Masada, M. ; Yoshida, T. ; Mizokami, T. Akino, M. ; Matsuo, N. (1984): Atypical phenylketouria due to biopterin deficiency: diagnosis by assay of an enzyme involved in the synthesis of sepiapterin from dihydro- neopterin triphosphate. Zool. Sci. 1:74-81

Zschocke, J. ; Hoffmann, G.F. (1999): Befunde des Neugeborenen Screenings. In: Vademecum Metabolicum. Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselerkrankungen. 2. Aufl., Stuttgart : Schattauer: 6-7

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Aumüller, Austermann, Bandmann, Barth, Beato, Berger, Bittinger, Coca, Czubayko, Daut, Dibbets, Feuser, Fischer, Flores de Jacobi, Fruhsdorfer, Fuhrmann, Gente, Geus, Habermehl, Hasilik, Hochban, Jungclas, Katschinski, Kern, Klötzer, Koolmann, Lammel, Lang, Lehmann, Löffler, Lotzmann, Mannherz, Mc Gregor, Mittag, Mutters, Perst, Pieper, Radsack, Ramaswamy, Röhm, Schachtschabel, Schürmann, Schumacher, Schulte, Schulze, Seitz, Slenzka, Stachniss, Steiniger, Stoll, Umstadt, Vohland, Voigt, Wenz, Westermann, Wisser, Zelder, Zschocke

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Oliver Bandmann für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und nette Zusammenarbeit sowie für die zügige und konstruktive Korrektur sehr bedanken. Ebenso gilt mein Dank Prof. G. F. Hoffmann, in dessen Abteilung der praktische Teil der Arbeit in der Kinderklinik durchgeführt wurde und insbesondere Dr. Dr. Johannes Zschocke, der dort die molekulargenetischen Versuche betreute, in mir mehr und mehr die Begeisterung für die Thematik zu wecken vermochte und mir jederzeit mit konstruktiven und nützlichen Anregungen eine besondere Hilfe war.

Besonders danken möchte ich auch Prof. K.-H. Röhm und seinem Mitarbeiter Marcus Hartmann, die sich die Zeit nahmen, mir einen sehr interessanten "Einführungskurs" in die Welt des *Protein-Modeling* zu geben und mich freundlicherweise auf diesem Gebiet mit Rat und Tat unterstützten.

Danken möchte ich auch meinem Großvater, der mich stets mit seinem gesteigerten Interesse für die Arbeit und deren Werdegang anspornte und somit die Fertigstellung dieser Dissertation wohl deutlich beschleunigte.

An letzter Stelle gilt mein besonderer Dank meiner lieben Frau Astrid, die mich in ganz entscheidender Weise bei dieser Arbeit unterstützte, sei es beim Einarbeiten in die Labormethoden oder beim Korrekturlesen und die mit ihrer unendlichen Geduld mir immer ihr vollstes Verständnis entgegenbrachte.