

LIMBURGS UNIVERSITAIR CENTRUM  
FACULTEIT WETENSCHAPPEN

**DE HETEROGENITEIT VAN  
FENYLKETONURIE IN BELGIE**

Proefschrift voorgelegd tot het behalen  
van de graad van Doctor in de Wetenschappen  
aan het Limburgs Universitair Centrum  
te verdedigen door

VERELST PEGGY

Diepenbeek, 1992





616.39

UNIVERSITÄTSBIBLIOTHEK LUC



03 04 00596968

371161



20 AUG. 1997



616.39

VERE

1992

.luc.luc.luc.



LIMBURGS UNIVERSITAIR CENTRUM  
FACULTEIT WETENSCHAPPEN

# DE HETEROGENITEIT VAN FENYLKETONURIE IN BELGIE

Proefschrift voorgelegd tot het behalen  
van de graad van Doctor in de Wetenschappen  
aan het Limburgs Universitair Centrum  
te verdedigen door

971161

VERELST PEGGY



Diepenbeek, 1992

20 AUG. 1997



Met dank aan ...

- Prof.Dr.Raus, mijn promotor van het Limburgs Universitair Centrum en het Dr.L.Willems-Instituut, voor de mogelijkheden die hij mij bood bij de uitwerking van het onderzoeksproject.
- Dr.B.François, voor zijn onvoorwaardelijke interesse, zijn steun en de overdracht van zijn kennis inzake erfelijke metabole aandoeningen.
- Dr.E.Bosmans, voor de hulp bij de uitbouw van de afdeling Genetische Manipulatie op het Dr.L.Willems-Instituut.
- Dr.H.Dahl, voor het toezenden van de genetische probe (hPH7)
- het I.U.A.P. (Interuniversitaire Attractiepolen), voor het financieel ondersteunen van dit onderzoeksproject.
- de PKU patiënten, hun ouders en familieleden, voor hun koöperatie aan het onderzoeksproject.
- Marianne Diels, voor de contacten die zij onderhield met de PKU families.
- Linda Phillipaerts, voor de hulp bij de praktische uitwerking van de experimenten.
- Eric Pauwels, voor de hulp bij de statistische verwerking van de resultaten.
- de medewerkers van de afdeling Genetische Manipulatie, voor de vele discussies en de goede samenwerking.
- de kollega's van het Limburgs Universitair Centrum en vooral van het Dr.L.Willems-Instituut, voor de aangename werksfeer.
- mijn ouders voor hun morele steun





# INHOUD

|                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>LIJST VAN AFKORTINGEN</b>                                              | <b>vii</b> |
| <b>HOOFDSTUK 1 : INLEIDING</b>                                            | <b>1</b>   |
| <b>1.1. Het metabolisme van fenylalanine</b>                              | <b>1</b>   |
| 1.1.1. De hydroxylase reactie                                             | 1          |
| 1.1.2. Eigenschappen van het fenylalanine hydroxylase                     | 2          |
| 1.1.3. Regulatie van de fenylalanine hydroxylase-aktiviteit               | 4          |
| 1.1.4. Alternatieve routes van fenylalanine metabolisme                   | 4          |
| <b>1.2. Fenylketonurie</b>                                                | <b>5</b>   |
| 1.2.1. Geschiedenis en definitie                                          | 5          |
| 1.2.2. Klinische eigenschappen                                            | 6          |
| 1.2.3. Biochemische eigenschappen                                         | 8          |
| 1.2.4. Diagnose                                                           | 9          |
| 1.2.5. Behandeling                                                        | 12         |
| <b>1.3. Fenotypes van fenylketonurie</b>                                  | <b>13</b>  |
| 1.3.1. Klassieke fenylketonurie                                           | 13         |
| 1.3.2. Hyperfenylalaninemie met "gerelaxeerde"<br>fenylalanine tolerantie | 13         |
| 1.3.3. Hyperfenylalaninemie met "normale" fenylalanine<br>tolerantie      | 14         |



---

|                                                            |               |
|------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1.4. Fenyلكetonurie heterozygositeit</b>                | <b>14</b>     |
| <b>1.5. Genetika van fenyلكetonurie</b>                    | <b>15</b>     |
| 1.5.1. Het fenyلكalanine hydroxylase gen                   | 15            |
| 1.5.2. Haplotypering van het fenyلكalanine hydroxylase gen | 17            |
| 1.5.3. Mutaties van fenyلكetonurie                         | 18            |
| 1.5.4. Verband tussen haplotypes en mutaties               | 18            |
| 1.5.5. Verband tussen haplotypes, mutaties en fenotypes    | 19            |
| 1.5.6. Verband met de aktiviteit van het enzyme            | 20            |
| <b>1.6. Maternale Hyperfenyلكalaninemia</b>                | <b>20</b>     |
| <br><b>HOOFDSTUK 2 : DOELSTELLINGEN</b>                    | <br><b>22</b> |
| <b>2.1. RFLP-haplotypering</b>                             | <b>22</b>     |
| <b>2.2. Bepaling van het gendefekt</b>                     | <b>23</b>     |
| <b>2.3. Korrelatie genotype-fenotype</b>                   | <b>23</b>     |
| <br><b>HOOFDSTUK 3 : MATERIAAL EN METHODEN</b>             | <br><b>24</b> |
| <b>3.1. DNA-bereidingen</b>                                | <b>24</b>     |
| 3.1.1. Bereiding van genomisch DNA                         | 24            |
| 3.1.2. Bereiding van plasmide DNA                          | 25            |
| 3.1.3. Bereiding van faag DNA                              | 25            |
| <b>3.2. Synthese van oligonukleotiden</b>                  | <b>26</b>     |



---

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.3. Enzymatische manipulaties van DNA</b>               | <b>26</b> |
| 3.3.1. Modifikatie en radioactieve merking                  | 26        |
| 3.3.2. Polymerase Chain Reaction                            | 27        |
| <b>3.4. Analyse van DNA</b>                                 | <b>28</b> |
| <b>3.5. Blottechnieken en hybridisaties</b>                 | <b>28</b> |
| 3.5.1. Southern blot-hybridisatie                           | 28        |
| 3.5.2. Dot blot-hybridisatie                                | 29        |
| <b>3.6. Single Stranded Conformation Polymorphism</b>       | <b>30</b> |
| <b>3.7. Transformaties en transfecties in <i>E.Coli</i></b> | <b>30</b> |
| <b>3.8. DNA-sekwentie bepaling</b>                          | <b>31</b> |
| 3.8.1. M13 cloning/dideoxy-methode                          | 31        |
| 3.8.2. Magnetic beads                                       | 32        |
| <b>3.9. RNA-bereiding</b>                                   | <b>32</b> |
| <b>3.10. cDNA-synthese</b>                                  | <b>33</b> |
| <br>                                                        |           |
| <b>HOOFDSTUK 4 : RESULTATEN</b>                             | <b>34</b> |
| <br>                                                        |           |
| <b>DEEL I : RFLP haplotypes van het PAH gen</b>             | <b>36</b> |
| <br>                                                        |           |
| <b>4.1. RFLP : definitie</b>                                | <b>36</b> |
| <br>                                                        |           |
| <b>4.2. Bepaling van RFLP haplotypes van het PAH gen</b>    | <b>38</b> |



---

|                                                                                         |               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>4.3. RFLP haplotypes in de Belgische bevolking</b>                                   | <b>40</b>     |
| 4.3.1. Vergelijking van RFLP allelen op normale en mutante chromosomen                  | 43            |
| 4.3.2. Frequentie van de RFLP haplotypes (N=98;M=98)                                    | 43            |
| 4.3.3. Vergelijking van de Belgische haplotypes met deze van andere Europese populaties | 45            |
| 4.3.4. Informativiteit van de RFLP haplotypes in heterozygoten en prenatale diagnostiek | 48            |
| 4.3.5. Overzicht van de RFLP haplotypes van de PKU patiënten (M=200)                    | 49            |
| <b>4.4. Besluit</b>                                                                     | <b>49</b>     |
| <br><b>DEEL II : Mutaties in het PAH gen</b>                                            | <br><b>51</b> |
| <b>4.5. Opsporing van gekende mutaties in het PAH gen</b>                               | <b>51</b>     |
| 4.5.1. Mutaties in de herkenningsplaats van een restriktie-enzyme                       | 51            |
| 4.5.2. Hybridisatie met allel-specifieke oligonukleotiden (ASO)                         | 53            |
| 4.5.3. Mismatching PCR                                                                  | 54            |
| <b>4.6. Beschrijving van mutaties, die leiden tot PKU</b>                               | <b>55</b>     |
| 4.6.1. Mutaties in codon 272 en 273                                                     | 55            |
| 4.6.2. Mutatie in codon 245                                                             | 57            |
| 4.6.3. Mutatie in codon 243                                                             | 57            |
| 4.6.4. Mutatie in codon 261                                                             | 57            |
| <b>4.7. Mutatie 'hotspots'</b>                                                          | <b>59</b>     |





---

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.8. Mutaties in de Belgische bevolking</b>                                                                         | <b>59</b> |
| 4.8.1. Frequentie van de PKU mutaties (N=200)                                                                          | 61        |
| 4.8.2. Korrelatie tussen mutaties en RFLP haplotypes                                                                   | 61        |
| 4.8.3. Distributie van de mutaties over België                                                                         | 62        |
| 4.8.4. Vergelijking van de Belgische mutaties met deze<br>van andere Europese populaties                               | 64        |
| <b>4.9. Besluit</b>                                                                                                    | <b>66</b> |
| <br>                                                                                                                   |           |
| <b>DEEL III : RELATIE GENOTYPE-FENOTYPE</b>                                                                            | <b>67</b> |
| <br>                                                                                                                   |           |
| <b>4.10. Heterozygote dragers voor PKU</b>                                                                             | <b>67</b> |
| 4.10.1. Effect van het dieet op de plasma fenylalanine en<br>tyrosine concentraties.                                   | 68        |
| 4.10.2. Variatie van de fenylalanine concentratie met de leeftijd.                                                     | 69        |
| 4.10.3. Fenylalanine en tyrosine concentraties in plasma van<br>niet-vastende dragers en niet-dragers van het PKU gen. | 70        |
| 4.10.4. Fenylalanine en tyrosine concentratie in plasma van<br>niet-vastende dragers met verschillende genotype        | 71        |
| <br>                                                                                                                   |           |
| <b>4.11. Patiënten met PKU</b>                                                                                         | <b>72</b> |
| 4.11.1. Plasma fenylalanine concentraties en dagelijkse<br>fenylalanine inname bij verschillende PKU fenotypes         | 73        |
| 4.11.2. Verband tussen het genotype en de enzymatische<br>aktiviteit van PAH bij de patiënt                            | 74        |
| <br>                                                                                                                   |           |
| <b>4.12. Besluit</b>                                                                                                   | <b>77</b> |



---

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>HOOFDSTUK 5 : BESPREKING VAN DE<br/>BEKOMEN RESULTATEN</b> | <b>78</b> |
| <b>5.1. Gebruikte technologie</b>                             | <b>78</b> |
| <b>5.2. Evolutie van fenyketonurie</b>                        | <b>79</b> |
| <b>5.3. Relatie fenotype-genotype</b>                         | <b>81</b> |
| <b>5.4. Richtlijnen voor de toekomst</b>                      | <b>82</b> |
| <br>                                                          |           |
| <b>HOOFDSTUK 6 : SAMENVATTING</b>                             | <b>84</b> |
| <br>                                                          |           |
| <b>APPENDIX</b>                                               | <b>87</b> |
| <br>                                                          |           |
| <b>BIBLIOGRAFIE</b>                                           | <b>90</b> |



## LIJST VAN AFKORTINGEN

|                       |                                          |
|-----------------------|------------------------------------------|
| <b>A</b>              | adenine of adenosine                     |
| <b>ATP</b>            | adenosine 5'-trifosfaat                  |
| <b>BH<sub>4</sub></b> | tetrahydrobiopterine                     |
| <b>bisAA</b>          | N,N'-methyleenbisacrylamide              |
| <b>bp</b>             | basepaar                                 |
| <b>BSA</b>            | 'bovine serum albumin'                   |
| <b>C</b>              | cytosine of cytidine                     |
| <b>cAMP</b>           | cyclisch adenosine monofosfaat           |
| <b>cDNA</b>           | 'complementary' deoxyribonukleïnezuur    |
| <b>Ci</b>             | curie                                    |
| <b>cM</b>             | centimorgans                             |
| <b>cpm</b>            | "counts" per minuut                      |
| <b>ddNTP</b>          | dideoxynukleoside-trifosfaat (N=G,A,T,C) |
| <b>df</b>             | vrijheidsgraden                          |
| <b>DHPR</b>           | dihydropteridine reductase               |
| <b>DNA</b>            | deoxyribonukleïnezuur                    |
| <b>dNTP</b>           | deoxynukleoside-trifosfaat (N=G,A,T,C)   |
| <b>EB</b>             | elektroforesebuffer                      |
| <b><i>E.coli</i></b>  | <i>Escherichia coli</i>                  |
| <b>EDTA</b>           | ethyleendiamine-tetraacetaat             |
| <b>G</b>              | guanine of guanosine                     |
| <b>HPHE</b>           | hyperfenylalaninemie                     |
| <b>IPTG</b>           | isopropyl-1-thio-β-D-galactoside         |
| <b>IQ</b>             | intelligentie quotiënt                   |
| <b>kb</b>             | kilobase                                 |
| <b>kDa</b>            | kilodalton                               |
| <b>K<sub>m</sub></b>  | Michaelis konstante                      |



---

|                        |                                            |
|------------------------|--------------------------------------------|
| <b>LB</b>              | 'Luria Broth'                              |
| <b>mRNA</b>            | 'messenger' ribonukleïnezuur               |
| <b>NAD</b>             | nicotinamide adenine dinukleotide          |
| <b>OD</b>              | optische densiteit                         |
| <b>PAA</b>             | polyacrylamide                             |
| <b>PAH</b>             | fenylalanine hydroxylase                   |
| <b>PAL</b>             | fenylalanine lyase                         |
| <b>PBS</b>             | 'phosphate buffered saline'                |
| <b>PCR</b>             | 'polymerase chain reaction'                |
| <b>PEG</b>             | polyethyleen glycol                        |
| <b>Phe</b>             | fenylalanine                               |
| <b>PKU</b>             | fenylketonurie                             |
| <b>qBH<sub>2</sub></b> | quinonoid dihydropterine                   |
| <b>RF</b>              | replikatieve vorm                          |
| <b>RFLP</b>            | restriktie-fragment-lengte-polymorfisme    |
| <b>RNA</b>             | ribonukleïnezuur                           |
| <b>SDS</b>             | 'sodium dodecyl sulphate'                  |
| <b>SE</b>              | 'saline' EDTA (buffer)                     |
| <b>ss</b>              | 'single stranded'                          |
| <b>SSC</b>             | 'standard saline citrate' (buffer)         |
| <b>SSCP</b>            | 'single strand conformation polymorphism'  |
| <b>STE</b>             | 'saline' Tris EDTA (buffer)                |
| <b>T</b>               | thymine of thymidine                       |
| <b>TAE</b>             | Tris/acetaat (buffer)                      |
| <b>Taq</b>             | <i>Thermus aquaticus</i>                   |
| <b>TE</b>              | Tris/EDTA (buffer)                         |
| <b>TEMED</b>           | N,N,N',N'-tetramethylethyleendiamine       |
| <b>TRH</b>             | tryptofaan hydroxylase                     |
| <b>Tris</b>            | tris(hydroxymethyl)-aminomethaan           |
| <b>Tris.Cl</b>         | Tris-oplossing, pH aangepast met HCl       |
| <b>Trp</b>             | tryptofaan                                 |
| <b>TYH</b>             | tyrosine hydroxylase                       |
| <b>Tyr</b>             | tyrosine                                   |
| <b>UV</b>              | ultraviolet                                |
| <b>Xgal</b>            | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside |



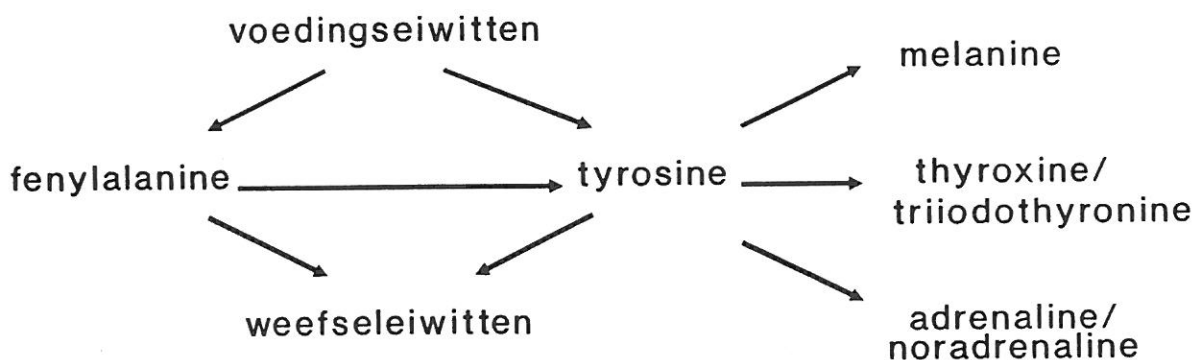


# HOOFDSTUK 1 : INLEIDING

## 1.1. Het metabolisme van fenylalanine

### 1.1.1. De hydroxylase reactie

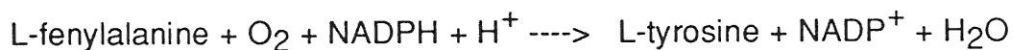
L-fenylalanine is een essentieel aminozuur voor de eiwitsynthese bij de mens. Toch verbruikt een opgroeiend kind slechts 50% van zijn dagelijkse fenylalanine-inname. Deze proportie vermindert nog naarmate de groeisnelheid daalt. De overmaat aan fenylalanine wordt in de lever gehydroxyleerd tot tyrosine en, in mindere mate, eveneens tot andere metabolieten omgezet. Tyrosine is een substraat voor de synthese van melanine en de schildklierhormonen (thyroxine en triiodothyronine). In het centraal zenuwstelsel is het de precursor van amines, zoals dopamine en noradrenaline (figuur 1.1).



**Figuur 1.1. :** *Het normaal metabolisme van fenylalanine en tyrosine*



Het hydroxylatie-systeem bestaat uit 2 componenten : het labiele fenylalanine hydroxylase (PAH) en het min of meer stabiele dihydropteridine reductase (DHPR) (Mitoma, 1956 ; Kaufman, 1957 en 1959). PAH katalyseert de onomkeerbare parahydroxylatie van fenylalanine tot tyrosine ; een reactie, die zich voornamelijk voordoet in de oplosbare leverfractie van verschillende zoogdierspecies (Underfriend en Cooper, 1952 ; Tourian e.a., 1969). De stoichiometrie van deze reactie is



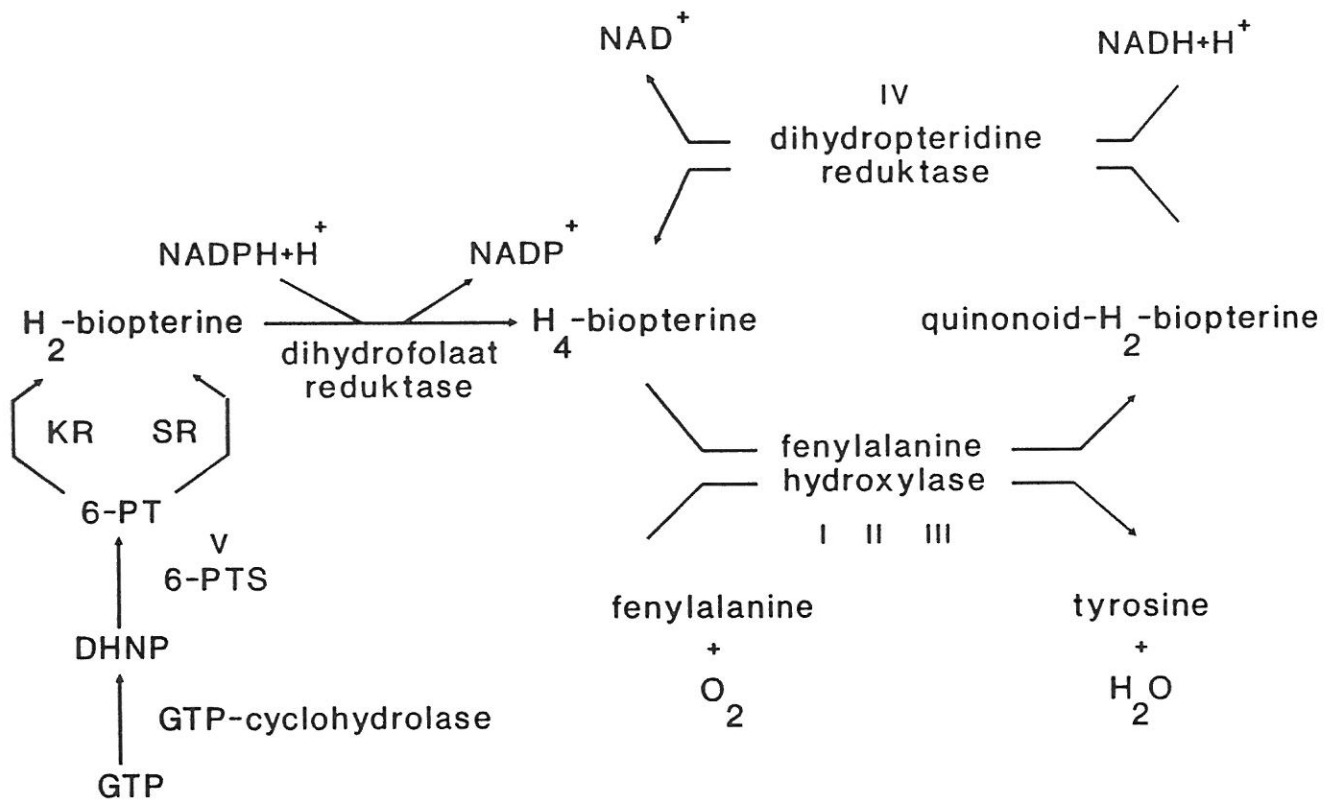
Een zuurstofatoom, afkomstig van atmosferische  $\text{O}_2$ , en elektronen van de cofactor tetrahydrobiopterine ( $\text{BH}_4$ ) worden getransfereerd naar fenylalanine met vorming van tyrosine en  $\text{H}_2\text{O}$  (figuur 1.2). De koppeling van DHPR aan deze reactie zorgt voor de regeneratie van  $\text{BH}_4$  uit quinonoid dihydrobiopterine ( $\text{qBH}_2$ ), een bijproduct van de hydroxylatiereactie.  $\text{BH}_4$  wordt *in vivo* gesynthetiseerd uit guanosine trifosfaat via een opeenvolging van reacties, gekatalyseerd door guanosine trifosfaat cyclohydrolase, 6-pyruvoyl tetrahydropterine synthase, sepiapterine reductase en tetrahydropterine 2'-keto reductase.

Afwezigheid of deficiëntie van het fenylalanine hydroxylase, dihydropteridine reductase of de tetrahydrobiopterine synthase leidt tot een gestoorde oxydatie van het fenylalanine met als gevolg de respectievelijke klinische fenotypes : klassieke fenylketonurie (PKU), hyperfenylalaninemie types II en III en hyperfenylalaninemie types IV en V (figuur 1.2).

### 1.1.2. Eigenschappen van het fenylalanine hydroxylase

Fenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) en tryptofaan (Trp) worden omgezet tot respectievelijk tyrosine, dihydroxyfenylalanine (DOPA) en 5-hydroxytryptofaan (5-HT) door de overeenkomstige hydroxylasen (PAH, TYH, TRH). Zowel de genen als de eiwitten van deze hydroxylasen gelijken sterk op elkaar. Daarom vermoedt men dat ze éénzelfde evolutionaire oorsprong hebben (Ledley e.a., 1985a en 1985b ; Grenett e.a., 1987). Ieder hydroxylase bestaat uit 2 belangrijke domeinen ; een goed gekonserveerd segment aan het car-





**Figuur 1.2. :** De hydroxylatie van fenylalanine en de cofactor transformaties. I, II, III, IV en V zijn de enzymatische blokkades, die leiden tot de verschillende klinische fenotypes. GTP=guanosine trifosfaat ; DHNP=q-D-erythro-7,8-dihydro-7,8-dihydropterine trifosfaat ; 6-PTS=6-pyruvoyl tetrahydropterine synthase ; 6-PT=6-pyruvoyl tetrahydropterine ; SR=sepiapterine reductase ; KR= tetrahydropterine 2'-keto reductase.

boxy terminaal einde met de determinanten voor hydroxylatie en BH<sub>4</sub> interactie en een minder goed gekonserveerd segment aan het amino terminaal einde, dat instaat voor de substratspecificiteit, de fosforylatie van het eiwit en de regulatie van de katalytische activiteit.

Fenylalanine hydroxylase van de rat (Kaufman en Fisher, 1970), de aap (Cotton e.a., 1976) en de mens (Woo e.a., 1974) zijn allen homomultimeren van polypeptiden met een moleculair gewicht van 49-54 kDa. De organisatie van deze monomeren in het actieve enzyme is echter zeer variabel en het is niet geheel duidelijk hoe precies deze organisatie verloopt.



Fenylalanine hydroxylase is het substraat van een cAMP-afhankelijk eiwitkinase (Smith e.a., 1984) en een consensus fosforylatie sekwentie is gelegen nabij het amino terminaal einde van het eiwit.

Het rat enzyme is een metalloproteïne met 1 mol ijzer per mol monomeer (Fisher e.a., 1972), welke essentieel is voor de hydroxylase aktiviteit.

### **1.1.3. Regulatie van de fenylalanine hydroxylase aktiviteit**

Hoewel de opname van fenylalanine door de weefsels een belangrijke rol speelt in de fenylalanine homeostase (0.030 mM tot 0.120 mM), is de aktiviteit van het fenylalanine hydroxylase toch de voornaamste faktor. Deze aktiviteit wordt geregeld via een aantal posttranslationele mechanismen (Kaufman, 1986) ; allosterische aktivatie/inaktivatie van het enzyme door zijn interaktie met het substraat (Phe) of de cofaktor ( $\text{BH}_4$ ) op een andere plaats dan de katalytische site en aktivatie/inaktivatie door glucagon-geïnduceerde fosforylatie/defosforylatie van een specifieke plaats van het enzyme. Het rat PAH wordt daarenboven gestimuleerd door fosfolipiden (Fisher en Kaufman, 1972) en een fenylalanine hydroxylase stimulator (PHS) (Huang e.a., 1973).

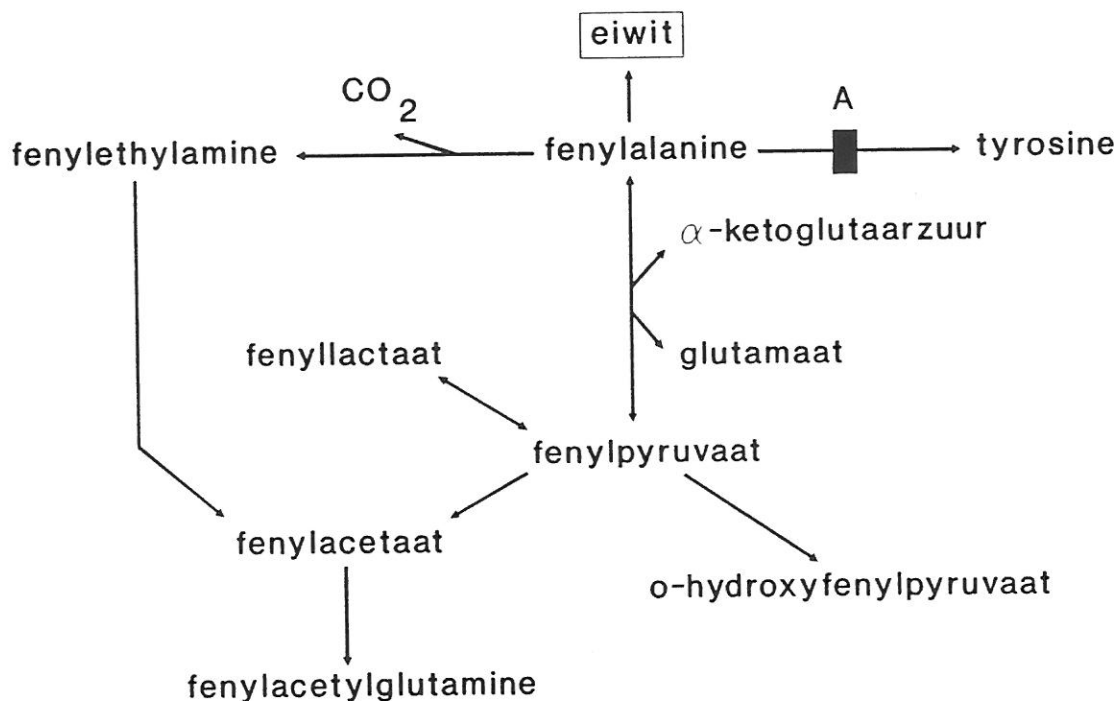
### **1.1.4. Alternatieve routes van het fenylalanine metabolisme**

Fenylalanine kan gemetaboliseerd worden tot andere produkten dan tyrosine (figuur 1.3). De belangrijkste stap is de transaminatie van fenylalanine tot fenylpyruvaat door een specifiek aminotransferase, dat pyruvaat als cosubstraat gebruikt. Fenylpyruvaat kan verder omgezet worden tot fenylacetaat, dat bij de mens hoofdzakelijk met glutamine gekonjugeerd wordt. Het gevormde fenylacetylglutamine wordt in de urine geëxcreteerd. Fenylpyruvaat kan ook omgezet worden tot fenyllactaat door een aromatisch  $\alpha$ -ketozuur reductase of tot o-hydroxyfenylpyruvaat door o-hydroxyfenylpyruvaat oxydase. Dit laatste wordt eveneens in de urine geëxcreteerd.

Anderzijds kan fenylalanine gedekarboxyleerd worden tot fenylethylamine. Een amine oxydase is verantwoordelijk voor de verdere omzetting van dit produkt tot fenyllactaat of fenylacetaat.







**Figuur 1.3. :** Het normale metabolisme van fenylalanine via alternatieve routes. Minder dan 50% van fenylalanine in het serum wordt geïncorporeerd in eiwitten, zelfs bij een maximale groei. A geeft weer waar de omzetting van het fenylalanine in fenylketonurie gestoord is.

## 1.2. Klassieke fenylketonurie (PKU)

### 1.2.1. Geschiedenis en definitie

In 1934 ontdekte Fölling een autosomaal recessief overerfbare metabolische afwijking, gekarakteriseerd door een excessieve excretie van fenylpyruvaat in de urine, een typische muizegeur en een mentale achterstand (Fölling, 1934). Pas in 1947 toonde Jervis aan dat deze ziekte gekarakteriseerd werd door een accumulatie van fenylalanine door een deficiënte oxydatie van fenylalanine tot tyrosine (Jervis, 1947). In 1953 toonde hij aan dat het fenylalanine hydroxylase in de lever van deze patiënten deficiënt is (Jervis, 1953). Een therapie, gebaseerd op een fenylalanine-arm dieet, werd gestart (Bickel e.a.,



1954) en dit bleek niet alleen te leiden tot een verlaging van het fenylalanine in het plasma en een volledige eliminatie van het fenylpyruvaat uit de urine, maar ook tot een verbetering van de mentale ontwikkeling van deze patiënten. De mentale achterstand kon zelfs vermeden worden wanneer het dieet binnen de eerste levensweken gestart werd. Deze observaties hebben uiteindelijk aanleiding gegeven tot het testen van pasgeborenen voor hyperfenylalaninemie. Een simpele en goedkope methode voor de concentratiebepaling van fenylalanine in het bloed van pasgeborenen werd ontwikkeld (Guthrie en Susi, 1963) en leidde tot de diagnose van hyperfenylalaninemie. De grens voor een hyperfenylalaninemie werd konventioneel vastgelegd bij serum-koncentraties  $\geq 150 \mu\text{mol/l}$  of  $\geq 2.5 \text{ mg\%}$  (Güttler en Wamberg, 1977).

### 1.2.2. Klinische eigenschappen

De transformatie van een ogenschijnlijk normale baby naar een ernstig gestoord kind gedurende het eerste levensjaar is het meest treffende klinische verschijnsel van klassieke fenylketonurie (PKU).

De gemiddelde intelligentie quotiënten (IQ) van deze kinderen dalen steil en vrijwel lineair gedurende de eerste 10 maanden. Deze daling houdt aan tot het derde levensjaar, zij het dan minder steil, om vervolgens te stagneren. Het grootste deel van de onbehandelde PKU patiënten heeft dan ook een  $\text{IQ} < 20$ , de rest een  $\text{IQ} < 50$  (figuur 1.4). Studies van intellectueel normale populaties leverden geen enkel geval van PKU op. Toch bestaan ze. Minder dan 4% van alle onbehandelde PKU patiënten heeft immers een IQ boven 60.

Pathologische studies van PKU tonen aan dat de hersenen het meest aangetast zijn. Het hersengewicht is inderdaad ongeveer 1/3 van het normale gewicht. Daarenboven ontwikkelen de mentale defekten zich gedurende het eerste levensjaar, wanneer ook de myelinisatie plaats vindt. Hoe fenylalanine dit complexe proces verstoort, is niet duidelijk.

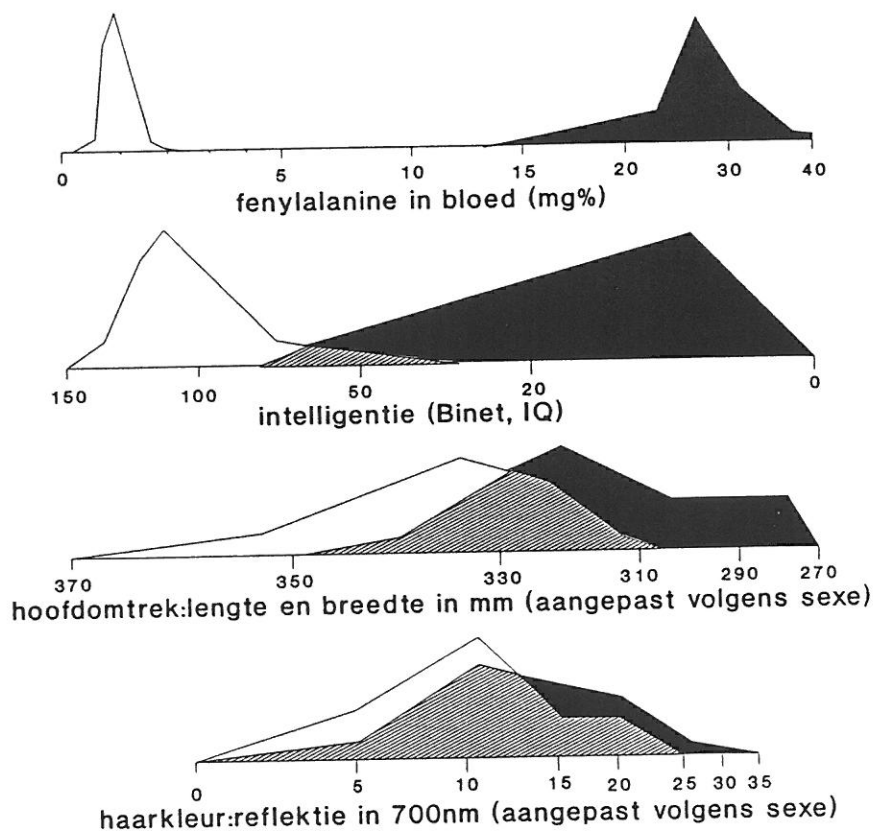
De meeste patiënten zijn rusteloos, agressief, hypersensitief en hyper-actief. Door een hypertoniciteit van de spieren hebben ze een typische "spring"-houding, wat hun agressief gedrag benadrukt. Het merendeel van de onbehandelde patiënten komt dan ook in gespecialiseerde instellingen terecht.



Naast het centraal zenuwstelsel worden eveneens afwijkingen in de ontwikkeling van huid, tanden en beenderen waargenomen. Pigmentverduunningen van het haar, de huid en de irissen zijn karakteristiek voor onbehandelde patiënten (figuur 1.4). Eczema komt frekwent maar niet altijd voor. De oorzaak hiervan is nog onbekend en waarschijnlijk overbenadrukt als klinisch symptoom van PKU. Microcephalie wordt teruggevonden in de helft van de gevallen. De gemiddelde hoofdomtrek is bijna 2 cm kleiner dan normaal (figuur 1.4).

De onbehandelde patiënt heeft een karakteristieke geur, te wijten aan fenylacetaat in de urine en het zweet. Deze geur kan echter afwezig zijn, vermits de overmaat aan zuur geëxcreteerd wordt in de vorm van een glutamine-konjugaat.

De klinische eigenschappen van onbehandelde homozygoten met klassieke PKU werden gedetailleerd beschreven door Knox, 1972.



**Figuur 1.4. :** Enkele karakteristieken van PKU bij patiënten met fenylketonurie (rechts) en een controle populatie (links).



### 1.2.3. Biochemische eigenschappen

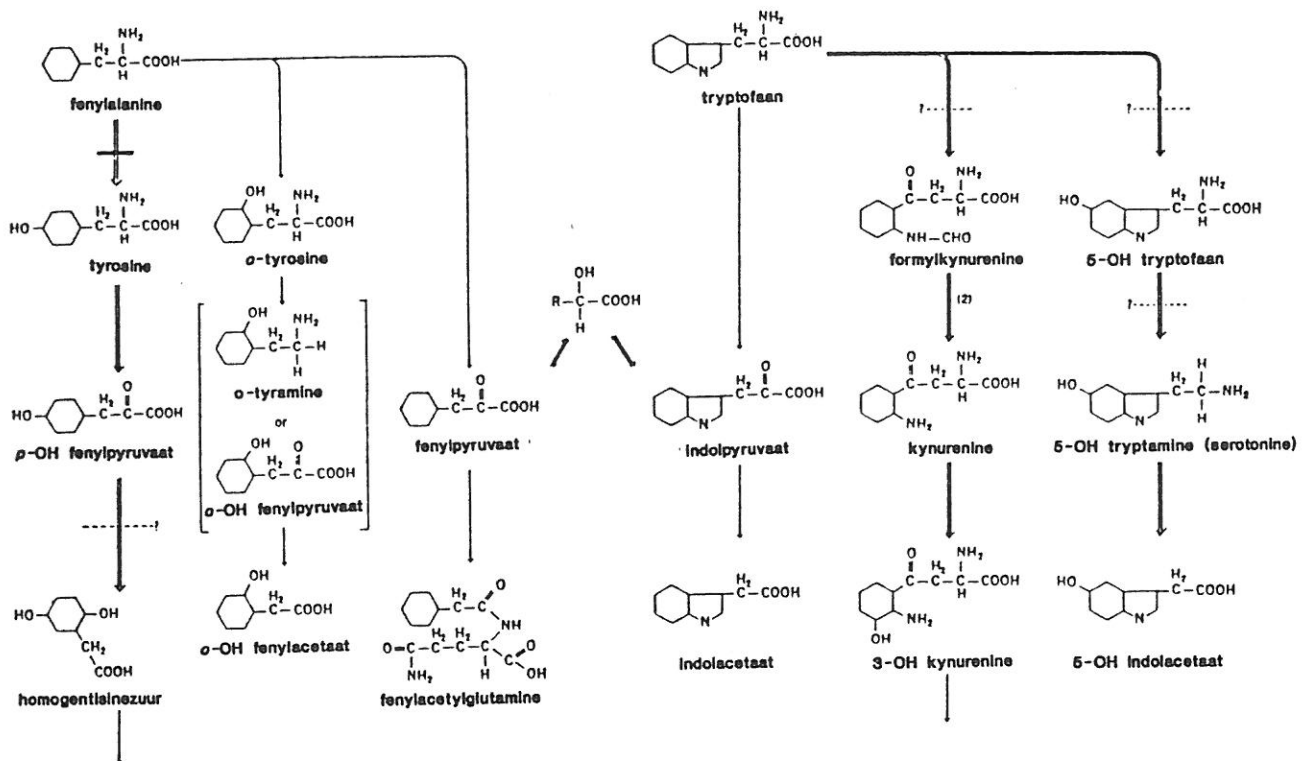
In fenylketonurie wordt fenylalanine in het plasma geaccumuleerd tot een concentratie van  $>1\text{mM}$ . De overmaat wordt gedeeltelijk verwerkt via de alternatieve routes van de fenylalanine degradatie. Fenylpyruvaat en zijn derivaten, o-hydroxyfenylpyruvaat en fenylethylamine worden dan ook in grote hoeveelheden in urine, bloed en zweet teruggevonden. Daarenboven verstoort de hoge fenylalanine concentratie de tyrosine en tryptofaan degradatie (figuur 1.5). Zo is de melanine synthese defekt, wat aanleiding geeft tot pigmentverdunding in PKU. In het plasma konstateert men een daling van serotonine (Pare e.a., 1957, 1958, 1959) en een toename van de excretie van indolderivaten (Drummond e.a., 1966 ; Yarbo en Anderson, 1966). De oorzaak van de defekten in deze metabolisaties is niet geheel achterhaald, maar inhibitie van de enzymatische reacties door fenylalanine en zijn derivaten, verstoord transport van tyrosine en tryptofaan in de cellen, malabsorptie door de nieren of een verandering in de relatieve hoeveelheden van de enzymes, teweeggebracht door het gewijzigde milieu, zijn alle mogelijke verklaringen (Knox, 1972).

In het plasma is er een algemene daling van de andere aminozuren (Efron e.a., 1969), wat hun interactie met fenylalanine in de weefsels benadrukt. De nieren, die normaal relatief kleine hoeveelheden fenylalanine moeten reabsorberen, worden gekonfronteerd met concentraties, die de maximale transportcapaciteiten overschrijden. Daarenboven moet het normale transport van aminozuren in de cellen en hun korrekte inbouw in de eiwitten gewaarborgd blijven, ondanks de hoge fenylalanine concentratie.

Er blijft een groot vraagteken bestaan omtrent de oorzaak van de mentale achterstand in fenylketonurie (Kleinman, 1964). De hypothese dat een overmaat aan fenylalanine interfereert met de opname van neutrale aminozuren in de hersenen behoort tot de mogelijkheden (Kaufman, 1989). Daarenboven zou de hoge intracellulaire fenylalanine concentratie de efflux van neutrale aminozuren uit de weefsels inhiberen, waardoor een tekort ervan in het plasma en de hersenen ontstaat (De Cespedes e.a., 1989). Een andere hypothese is dat de overmaat aan fenylalanine de sulfatide-synthese in de hersenen inhibeert, waardoor het aantal synapsen sterk gereduceerd wordt (Matsuo en Hommes, 1987). De vraag of een tekort aan neurotransmitters,







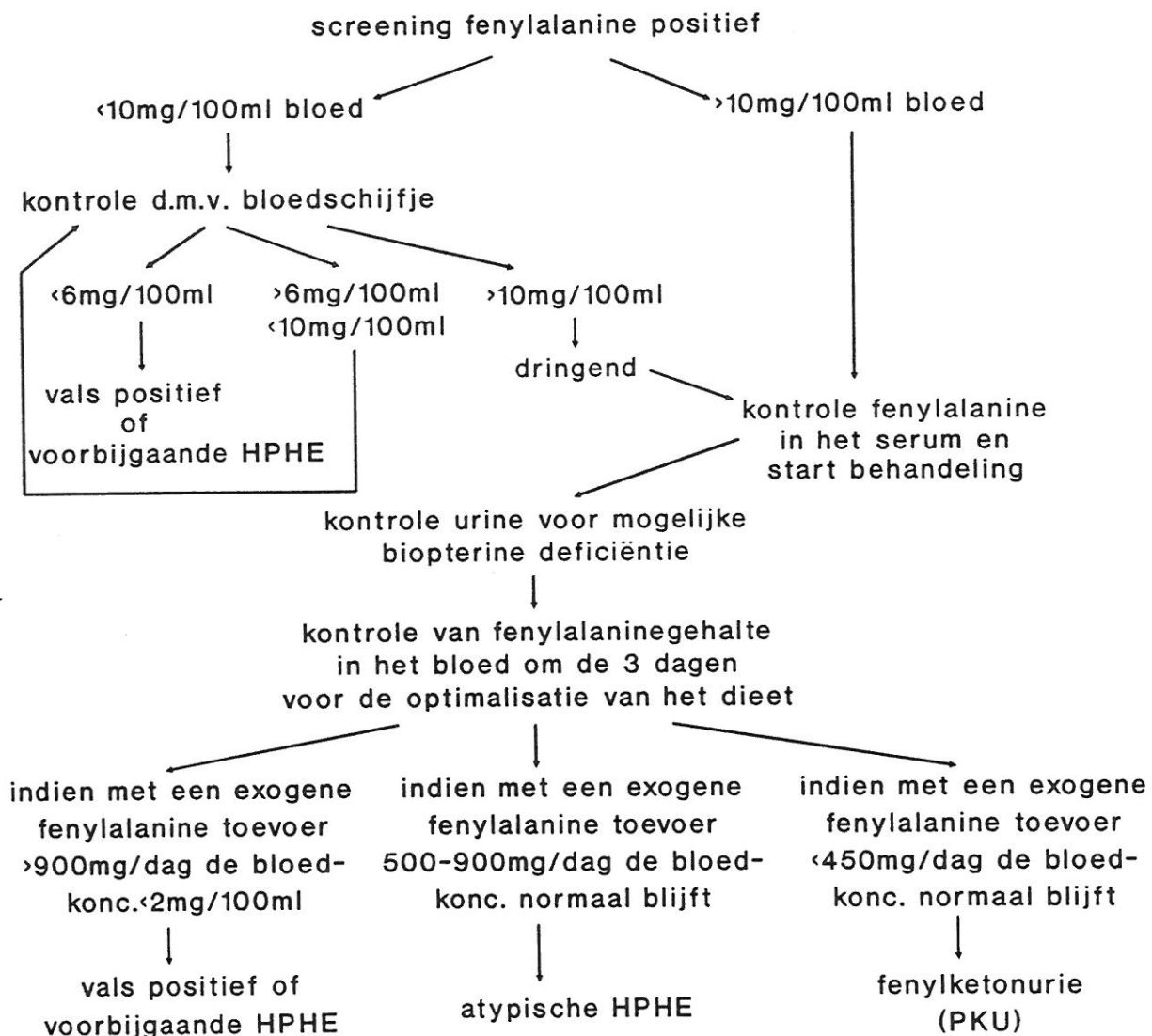
**Figuur 1.5. :** De metabolisatie van fenylalanine, tyrosine en tryptofaan (==>), de lokalisatie van de metabole stop in fenylketonurie en de alternatieve degradaties (->), die leiden tot de metabole karakteristieken van de ziekte.

zoals de gedaalde perifere synthese van serotonine en waarschijnlijk ook noradrenaline (Giovannini e.a., 1988), een essentiële rol speelt in de hersenbeschadiging bij PKU patiënten, blijft onbeantwoord.

#### 1.2.4. Diagnose

De eerste neonatale screeningsprogramma's voor hyperfenylalaninemie, opgestart in 1957 in California (Centerwall, 1957), maakten gebruik van een methode, gebaseerd op de reactie van  $FeCl_3$  met de overmaat fenylpyruvaat in de urine. Eén vierde tot de helft van de patiënten werd echter gemist, wat te wijten is aan de onstabiliteit van dit fenylpyruvaat in de urine of aan een transiente aminotransferase deficiëntie in de neonatale periode. Daarom





**Figuur 1.6. :** *Diagnose van fenylketonurie (PKU) en hyperfenylalaninemie (HPHE) : strategie.*

werd, in 1963, de meer betrouwbare Guthrie Inhibition Assay Test (Guthrie en Susie, 1963) voor de detektie van fenylalanine concentraties in het bloed van



pasgeborenen ontwikkeld. De neonatale screening werd nog vereenvoudigd door het gebruik van gedroogde bloedstaaltjes op filterpapier (Guthrie, 1980). Heden wordt, in het Dr.L.Willems-Instituut, een verhoogde fenylalanine concentratie opgespoord met behulp van dunne laag chromatografie, gevolgd door kwantifikatie met een aminozuur-analyser (LKB, Bromma, Zweden). Sinds 1968 bestaat in België een nationaal screeningsprogramma voor de opsporing van hyperfenylalaninemie bij pasgeboren kinderen. De gevolgde diagnose-strategie wordt weergegeven in figuur 1.6.

De overgang van screeningsprocedure toonde tevens aan dat hyperfenylalaninemie niet synoniem is met klassieke PKU, dat in het verleden beschouwd werd als één klinische en biochemische afwijking (§ 1.3). De frequentie en distributie van fenylketonurie wordt weergegeven in tabel 1.1.

**TABEL 1.1. :** Frekwentie en distributie van patiënten met fenylketonurie (PKU) en hyperfenylalaninemie (HPHE).

|      | land of<br>etnische groep              | frekwentie<br>(per 10 <sup>6</sup><br>geboorten) | referentie                         |
|------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|
| PKU  | Yemenite Joden                         | 190                                              | Thalhammer, 1975                   |
|      | Schotland                              | 190                                              | Thalhammer, 1975                   |
|      | Ierland                                | 190                                              | Thalhammer, 1975                   |
|      | Czechoslovakije                        | 150                                              | Thalhammer, 1975                   |
|      | Polen                                  | 130                                              | Thalhammer, 1975                   |
|      | Hongarije                              | 90                                               | Szabo e.a., 1985                   |
|      | Frankrijk                              | 75                                               | Thalhammer, 1975                   |
|      | Scandinavië                            |                                                  |                                    |
|      | Denemarken                             | 85                                               | Thalhammer, 1975                   |
|      | Noorwegen                              | 70                                               | Saugstad, 1975                     |
|      | Zweden                                 | 25                                               | Thalhammer, 1975                   |
|      | Finland                                | 5                                                | Thalhammer, 1975                   |
|      | Engeland<br>(Londen)                   | 70                                               | Thalhammer, 1975                   |
|      | Italië                                 | 60                                               | Romeo e.a., 1983                   |
|      | China                                  | 50                                               | Liu e.a., 1986                     |
|      | Canada                                 | 45                                               | Walker e.a., 1981                  |
|      | Japan                                  | 5                                                | Thalhammer, 1975                   |
|      | Ashkenazi Joden                        | 5                                                | Thalhammer, 1975                   |
| HPHE | alle landen<br>uitgezonderd<br>Finland | 15-75                                            | Thalhammer, 1975<br>Liu e.a., 1986 |



### 1.2.5. Behandeling

Vermits een PKU kind geen fenylalanine kan verwerken via de hydroxylatie, is slechts een geringe opname voor de eiwitsynthese nodig. Deze hoeveelheid varieert met de leeftijd, gaande van 47 à 90 mg/kg/dag op een leeftijd van 2 à 4 maanden tot 27 mg/kg/dag vanaf éénjarige leeftijd. Patiënten met variante vormen van PAH deficiëntie krijgen uiteraard grotere hoeveelheden te verwerken. Het doel is de bloed fenylalanine concentratie binnen de veilige grenzen van normale individuen te handhaven. Een controle wordt dan ook wekelijks uitgevoerd gedurende het eerste levensjaar, daarna elke 2 tot 4 weken. Over de duur van het dieet wordt tot op heden nog veel gediscussieerd.

Hoewel de behandeling van PKU patiënten succesvol is, zijn er toch enkele limieten. Zo hebben behandelde patiënten vaak voedingstekorten, te wijten aan de semi-synthetische produkten in het dieet (Acosta e.a., 1987). Ondanks hun normale IQ vertonen zij vaak gedragsstoornissen (Smith e.a., 1988) en beëindiging van het dieet kan zelfs leiden tot een daling in IQ score (Scriver e.a., 1988).

Om deze redenen werden een aantal alternatieve behandelingen voorgesteld. Een aanvulling van het fenylalanine-arm dieet met neutrale aminozuren werd voorgesteld om de psychoneurologische ontwikkeling van de patiënten nog te verbeteren (Jordon e.a., 1985). Anderzijds werd onderzocht of PAH niet vervangen kon worden door het bacterieel enzyme PAL, dat fenylalanine omzet tot ammonium en transcinnaminezuur (Bourget en Chang, 1985 en 1986 ; Hoskins e.a., 1984). Ingekapseld in semipermeabele microkapsules vermindert PAL inderdaad de fenylalanine concentraties in het plasma en de hersenen, doch de kostprijs belemmert het gebruik ervan in therapie. Somatische gentherapie, waarbij de expressie van de mutante genen gecorrigeerd wordt door een normaal gen, kan in de nabije toekomst verwacht worden (Ledley, SSIEM, 27th Annual Symposium, Munchen, Sept 1989).





### 1.3. Fenotypes van fenylketonurie

Door de screening voor PKU werd duidelijk dat een groot aantal kinderen met hyperfenylalaninemie toch geen klassieke PKU hebben. De fenylalanine hydroxylase deficiëntie is immers minder ernstig. Vermits deze patiënten verschillend behandeld dienen te worden, is een onderscheid tussen de fenotypes noodzakelijk (Güttler en Hansen, 1977).

#### 1.3.1. Klassieke PKU

Pasgeboren kinderen met klassieke PKU hebben een gemiddelde serum fenylalanine concentratie van 1816  $\mu\text{mol/l}$ . Om bij deze patiënten een bloedconcentratie van 425  $\mu\text{mol/l}$  te handhaven is een dagelijkse inname van minder dan 0.13 mmol per kg lichaamsgewicht nodig. De fenylalanine hydroxylase activiteit in de lever van deze patiënten is slechts 0.27% van het normale. In tegenstelling tot het hydroxylase van normale individuen wordt het niet geïnhibeerd door 0.1 mM Phe noch gestimuleerd door lysolecithine. Dit verklaart waarom een lading van 0.6 mmol fenylalanine per kg lichaamsgewicht niet binnen de drie dagen uit het lichaam verwijderd wordt. Ook een stijging van tyrosine wordt niet waargenomen. Klassieke PKU gaat dan ook steeds gepaard met ernstige mentale achterstand, tenzij een restriktief dieet tijdig gestart wordt.

#### 1.3.2. Hyperfenylalaninemie met "gerelaxeerde" fenylalanine tolerantie (milde PKU)

Pasgeboren kinderen met dit fenotype hebben serum fenylalanine concentraties tussen 625-1522  $\mu\text{mol/l}$ . Over het algemeen is de hydroxylase activiteit in de lever van deze patiënten gekorreleerd met de geobserveerde fenylalanine concentratie. Zo werden activiteiten vanaf 1.5% van het normale teruggevonden. Op een leeftijd van 2 à 5 jaar hebben zij een duidelijk hogere fenylalanine tolerantie van 0.14 tot 0.3 mmol/kg per dag en een lading van 0.6 mmol Phe per kg lichaamsgewicht wordt binnen de 3 dagen uit het lichaam



verwijderd met een stijging van tyrosine als gevolg. Kinderen met milde PKU hebben een IQ gaande van ernstige mentale achterstand tot geen achterstand. Deze variatie kan toegeschreven worden aan verschillende genotypes van de patiënten, maar ook andere factoren, zoals borstvoeding versus kunstvoeding of omgevingsfactoren, kunnen de variatie in de hand werken.

### **1.3.3. Hyperfenylalaninemie met "normale" fenylalanine tolerantie**

Pasgeborenen met dit fenotype hebben fenylalanine concentraties in het serum kleiner dan 605  $\mu\text{mol/l}$ . Een lading van 0.6 mmol fenylalanine per kg lichaamsgewicht wordt bij deze patiënten binnen de 24 uren uit het lichaam verwijderd, wat gepaard gaat met een tyrosine stijging. Daarenboven hebben deze kinderen geen mentale achterstand, waardoor een behandeling ook niet nodig is.

## **1.4. Fenylketonurie heterozygositeit**

Met het oog op genetische raadgeving in een populatie, waar de kans op PKU dragerschap 1:50 is, is de detektie van heterozygote dragers belangrijk. Dit kan gebeuren via ladingstesten of DNA analyses. Hierbij dient opgemerkt te worden dat detektie van dragers zonder PKU geschiedenis in de familie enkel mogelijk is door de directe detektie van de mutatie in het genomische DNA. Op dit ogenblik is dit slechts mogelijk voor 40%-50% van de PKU chromosomen. Om deze redenen wordt een simpele methode, gebaseerd op de Phe/Tyr verhouding bij semi-vastende personen, gebruikt (Hilton e.a., 1986). Deze methode geeft echter een misklassifikatie van 5% in vergelijking met de resultaten van de ladingstesten.

Over het mogelijke selectieve voordeel van heterozygote PKU dragers wordt veel gediscussieerd in de literatuur. Een biochemische voordeel wordt toegeschreven aan de verhoogde Phe/Tyr verhouding, daar het zwangere



PKU heterozygoten zou beschermen tegen de werking van het abortieve mycotoxine ochratoxine A (Woolf, 1975). Anderzijds wordt beweerd dat de meest geringe stijging in fenylalanine concentratie zou leiden tot nonspecifieke mentale retardatie (Bessman, 1972 ; Sartoria e.a., 1988). Dit biochemisch nadeel zou dan gecompenseerd worden door een genetisch voordeel van de PKU heterozygoot.

## **1.5. De genetica van fenyketonurie**

### **1.5.1. Het fenylalanine hydroxylase gen**

Een rat PAH cDNA klonen werd voor het eerst geïsoleerd en geanalyseerd in 1982 (Robson e.a., 1982). Zijn authenticiteit werd bevestigd door vergelijking van de aminozuur-sequentie, afgeleid van de nukleotidesequentie, met deze van een eerder gezuiverd rat PAH. Enkele jaren later werden 2 humane PAH cDNA klonen, phPAH247 (Kwok e.a., 1985) en hPH7 (Speer e.a., 1986), beschreven. Klonering van het phPAH247 cDNA achter een humane metallo-proteïne promotor, gevolgd door insertie in PAH deficiënte NIH 3T3 cellen, leidde tot de expressie van actief enzyme (Ledley e.a., 1985c en 1986), wat betekent dat humaan PAH door slecht één enkel gen gekodeerd wordt. Het is aldus een homopolymeer. Analoge experimenten voor het rat PAH cDNA leverden dezelfde resultaten op (Choo e.a., 1986).

In situ hybridisatie experimenten met phPAH247 toonden aan dat het PAH locus op het menselijke chromosoom 12, q22-q24, gelokaliseerd is (Lidsky e.a., 1985a). Het muis PAH locus, daarentegen, ligt op chromosoom 10, C2-D1 (Ledley e.a., 1988).

Het PAH gen, met een lengte van 90 kb, is opgebouwd uit 13 exons, die van elkaar gescheiden zijn door introns met een lengte van 1-23 kb (DiLella e.a., 1986a). Opmerkelijk is dat aan het 3'-uiteinde van het gen de exons geklusterd zijn. Het volledige mRNA (figuur 1.7) is 2.4 kb. Zijn "Open Reading Frame" van 1353 bp codeert voor een eiwit van 451 aminozuren met een



|                 |                     |                         |                     |                         |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| 15              | 30                  | 45                      | 60                  | 75                      |
| CTT CAT CGT CGT | CCA ACT GAC CTT GAG | TGT TAG TTT CCG GGT     | AAG TTT GGG TAT AAG | TCC CAC CAC CAG TCC CGG |
| 90              | 105                 | 120                     | 135                 | 150                     |
| CAG TGT AGT CAG | TAG TTT GTT GCT GGA | AGT COT TAC CCG CAA AGT | GGG TGT TAC CCG CTA | GAT TAG ACT GTG GCT     |
| 165             | 180                 | 195                     | 210                 | 225                     |
| GCT GGC GTT GAG | CGA AAC CTG CCT GTA | CGT GAG GCC CTA AAA     | AGC CAG AGA CCT CAC | TCC CGG GGA GCC AGC ATG |
| 240             | 255                 | 270                     | 285                 | 300                     |
| TCC ACT GCG GTC | CTG GAA AAC CCA GGC | TTG GGC AGG AAA CTC     | TCT GAC TTT GGA CAG | GAA ACA AGC TAT ATT GAA |
| 315             | 330                 | 345                     | 360                 | 375                     |
| GAC AAC TGC AAT | CAA AAT GGT GCC ATA | TCA CTG ATC TTC TCA     | CTC AAA GAA GAA GTT | GGT GCA TTG GCC AAA GTA |
| 390             | 405                 | 420                     | 435                 | 450                     |
| ASP ANN CYS ANN | GLN ANN GLY ALA ILE | SER LEU ILE PHE SER     | LEU LYS GLU GLU VAL | GLY ALA LEU ALA LYS VAL |
| 465             | 480                 | 495                     | 510                 | 525                     |
| TTG CGC TTA TTT | GAG CAG AAT GAT GTA | AAC CTG ACC CAC ATT     | GAA TCT AGA CCT TCT | CGT TTA AAG AAA GAT CAG |
| 540             | 555                 | 570                     | 585                 | 600                     |
| TAT GAA TTT TTC | ACC CAT TTG GAT AAA | CGT AGC CTG CCT GCT     | CTG ACA AAC ATC ATC | AAG ATC TTG AGG CAT GAC |
| 615             | 630                 | 645                     | 660                 | 675                     |
| ATT GGT GCC ACT | GTC CAT CAG CTT TCA | CGA GAT AAG AAG AAA     | GAC ACA GTG CCC TGG | TTC CCA AGA ACC ATT CAA |
| 690             | 705                 | 720                     | 735                 | 750                     |
| CCT GTG TAC CGT | GCA AGA CCG AAG CAG | TTT GCT GAC ATT GCC     | TAC AAC TAC CGC CAT | GGG CAG CCC ATC CCT CGA |
| 765             | 780                 | 795                     | 810                 | 825                     |
| GTG GAA TAC ATG | GAG GAA GAA AAG AAA | ACA TGG GGC ACA CTC     | TTC AAG ACT CTG AAG | TCC TTG TAT AAA ACC CAT |
| 840             | 855                 | 870                     | 885                 | 900                     |
| GCT TCC TAT GAG | TAC AAT CAC ATT TTT | CCA CTT CTT GAA AAG     | TAC TGT GGC TTC CAT | GAA GAT AAC ATT CCC CAG |
| 915             | 930                 | 945                     | 960                 | 975                     |
| CTG GAA CAC GTT | TCT CAA TTC CTG CAG | ACT TCC ACT GGT TTC     | CGC CTC CGA CCT GTG | GCT GGC CTG CTT TCC TCT |
| 990             | 1005                | 1020                    | 1035                | 1050                    |
| CGG GAT TTC TTG | GGT GGC CTG GCC TTC | CGA GTC TTC CAC TCC     | ACA CAG TAC ATC AGA | CAT GCA TCC AAG CCC ATG |
| 1065            | 1080                | 1095                    | 1110                | 1125                    |
| TAT ACC CCC GAA | CCT GAC ATC TGC CAT | GAG CTG TTG GGA CAT     | GTG CCC TTG TTT TCA | GAT GGC AGC TTT GCC CAG |
| 1140            | 1155                | 1170                    | 1185                | 1200                    |
| TTT TCC CAG GAA | ATT GGC CTT GCC TCT | CTG GGT GCA CCT GAT     | GAA TAC ATT GAA AAG | CTC GCC ACA ATT TAC TGG |
| 1215            | 1230                | 1245                    | 1260                | 1275                    |
| TTT ACT GTG CAG | TTT GGC CTC TGC AAA | CAA GGA GAC TCC ATA     | AAG GCA TAT GGT GCT | GGG CTC CTG TCA TCC TTT |
| 1290            | 1305                | 1320                    | 1335                | 1350                    |
| GGT GAA TTA CAG | TAC TGC TTA TCA GAG | AAG CCA AAG CTT CTC     | CCC CTG GAG CTG GAG | AAG ACA GCC ATC CAA AAT |
| 1365            | 1380                | 1395                    | 1410                | 1425                    |
| TAC ACT GTC ACG | GAG TTC CAG CCC CTG | TAT TAC GTG CCA GAG     | AGT TTT AAT GAT GCC | AAG GAG AAA GTA AGG AAC |
| 1440            | 1455                | 1470                    | 1485                | 1500                    |
| TTT GCT GCC ACA | ATA CCT CGG CCC TTC | TCA GTT CCG TAC GAC     | CCA TAC ACC CAA AGG | ATT GAG GTC TTG GAC AAT |
| 1515            | 1530                | 1545                    | 1560                | 1575                    |
| ACC CAG CAG CTT | AAG ATT TTG GCT GAT | TCC ATT AAC AGT GAA     | ATT GGA ATC CTT TGC | AGT GCC CTC CAG AAA ATA |
| 1590            | 1605                | 1620                    | 1635                | 1650                    |
| AAG TAA AGC CAT | GGA CAG AAT GTG GTC | TGT CAG CTG TGA ATC     | TGT TGA TGG AGA TCC | AAC TAT TTC TTT CAT CAG |
| 1665            | 1680                | 1695                    | 1710                | 1725                    |
| AAA AAG TCC GAA | AAG CAA ACC TTA ATT | TGA AAT AAC AGC CTT     | AAA TCC TTT ACA AGA | TGG AGA AAC AAC AAA TAA |
| 1740            | 1755                | 1770                    | 1785                | 1800                    |
| GTG AAA ATA ATC | TGA AAT GAC AGG ATA | TGA GTA CAT ACT CAA     | GAG CAT AAT GGT AAA | TCT TTT GGG GTC ATC TTT |
| 1815            | 1830                | 1845                    | 1860                | 1875                    |
| GAT TTA GAG ATG | ATA ATC CCA TAC TCT | CAA TTG AGT TAA ATC     | AGT AAT CTG TCG CAT | TTC ATC AAG ATT AAT TAA |
| 1890            | 1905                | 1920                    | 1935                | 1950                    |
| AAT TTG GCA CCT | GCT TCA TTC AAG CTT | CAT ATA TCC TTT GCA     | GAG AAC TCA TAA AGG | AGC ATA TAA GCC TAA ATG |
| 1965            | 1980                | 1995                    | 2010                | 2025                    |
| TAA AAC ACA AGA | CTG TCA TTA GAA TTG | AAT TAT TGG GCT TAA     | TAT AAA TCG TAA CCT | ATG AAG TTT ATT TTC TAT |
| 2040            | 2055                | 2070                    | 2085                | 2100                    |
| TTT AGT TAA CTA | TGA TTC CAA TTA CTA | CTT TGT TAT TGT ACC     | TAA GTA AAT TTT CTT | TAG GTC AGA AGC CCA TTA |
| 2115            | 2130                | 2145                    | 2160                | 2175                    |
| AAA TAG TTA CAA | GCA TTG AAC TTC TTT | AGT ATT ATA TTA ATA     | TAA AAA CAT TTT TGT | ATG TTT TAT TGT AAT CAT |
| 2190            | 2205                | 2220                    | 2235                | 2250                    |
| AAA TAC TGC TGT | ATA AGG TAA TAA AAC | TCT GCA CCT AAT CCC     | CAT AAC TTC CAG TAT | CAT TTT CCA ATT AAT TAT |
| 2265            | 2280                | 2295                    | 2310                | 2325                    |
| CAA GTC TGT TTT | GGG AAA CAC TTT GAG | GAC ATT TAT GAT GCA     | GCA GAT GTT GAC TAA | AGG CTT GGT TGG TAG ATA |
| 2340            | 2355                | 2370                    | 2385                | 2400                    |
| TTT AGG AAA TGT | TCA CTG AAT AAA TAA | GTA AAT ACA TTA TTG     | AAA AGC AAA TCT GTA | TAA ATG TGA AAT TTT TAT |
| 2415            | 2430                | 2445                    |                     |                         |
| TTG TAT TAG TAA | TAA AAC ATT AGT AGT | TTA AAA AAA AAA AAA     | AAA AAA             | AAA AAA                 |

Figuur 1.7. : Nukleotide sekwentie en de translatie van humaan fenylalanine hydroxylase cDNA (klone pPAH247). De onderliggende sekwenties in het 5'-onvertaalde gebied zijn de direkte herhalingen voor de stabiliteit van het mRNA. In het 3'-onvertaalde gebied zijn de signalen voor polyadenylatie onderlijnd.





overeenkomstig moleculair gewicht van ongeveer 50 kDa, wat bevestigd werd in de expressie-experimenten met het PAH cDNA.

### 1.5.2. Haplotypering van het fenylalanine hydroxylase gen

In het PAH gen werden, met 8 enzymen, 10 RFLP's of restrictie-fragment-lengte-polymorfismen gevonden (Lidsky e.a., 1985b). Het patroon van een allel, bepaald door 8 van deze polymorfismen (7 enzymen : *Bgl*II, *Pvu*IIa, *Pvu*IIb, *Eco*RI, *Msp*I, *Xmn*I, *Hin*DIII, *Eco*RV), is een haplotype (§ 4.3.2). Ten minste 43 van de 384 mogelijke haplotypes werden reeds gedefinieerd (Aulehla-Scholz e.a., 1988 ; Woo, 1988) en nieuwe variaties vullen deze lijst steeds aan.

Naast enkele zeldzaam voorkomende haplotypes behoren de meeste normale en mutante allelen tot een beperkt aantal haplotypes (tabel 1.2). Samengevat behoren de meest voorkomende normale allelen tot de haplotypes 1, 2, 4, 5 en 7 in alle onderzochte populaties. Voor de mutante allelen zijn de haplotypes 1, 2, 3 en 4 bij de Kaukasiërs overwegend. In de Turkse en de Italiaanse bevolking overheerst mutant haplotype 6. Haplotype 4 komt het meest voor bij Chinezen en dit is waarschijnlijk het geval voor de gehele Polynesische bevolking. De Yeminiëten en Algerijnen, daarentegen, hebben mutante allelen met een eigen haplotype.

Dankzij RFLP haplotypering kan het mutante allel gevolgd worden in families mét een PKU patiënt én met heterozygote ouders voor de haplotypes. Dit maakt de detektie van PKU dragers mogelijk. Daarenboven kan prenatale diagnose toegepast worden. Zo kan berekend worden dat 90% van de Kaukasische PKU families informatief is voor prenatale diagnose (Lidsky e.a., 1985b), in tegenstelling tot minder polymorfe populaties, zoals in China en Japan, waar slechts 35%-40% van de PKU families informatief blijkt te zijn (Chen e.a., 1989).



**TABEL 1.2. :** Haplotypes in het PAH locus in verschillende populaties, weergegeven in dalende volgorde van voorkomen. De (nummers) zijn het aantal bestudeerde allelen. nk=niet geklassificeerd volgens Woo, 1988

| populatie   | haplotypes<br>PKU-HPHE | haplotypes<br>normaal | referentie                                                  |
|-------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------|
| Denemarken  | 3,2,1,4 (66)           | 1,4,5=7 (66)          | Chakraborty e.a., 1987<br>Güttler e.a., 1987                |
| Schotland   | 1,3,2 (33)             | 1,4,5=7=8 (31)        | Sullivan e.a., 1989                                         |
| Duitsland1  | 2,3,1,4=8 (25)         | 4=7,1,12 (26)         | Reiss e.a., 1988                                            |
| Duitsland2  | 1=4,2,3 (100)          | 1,4,7,2=5 (100)       | Lichter-Konecki e.a., 1988b                                 |
| Duitsland3  | 2,1,4,3 (88)           | 1,4,5,2 (88)          | Aulelha-Scholz e.a., 1988                                   |
| Frankrijk   | 1,2,3,4=38 (74)        | 1,4,7,5 (68)          | Rey e.a., 1988<br>Abadie e.a., 1989                         |
| Canada      | 1=2,3,4 (14)           | 1,4 (14)              | John e.a., 1988                                             |
| Zwitserland | 1,4,2 (38)             | 1,4,5=7 (36)          | Sullivan e.a., 1989                                         |
| Italië      | 1=6,8 (14)             | 1,2 (14)              | Dianzini e.a., 1989                                         |
| Turkije     | 6,1,4 (§')             | 4,7=1,5,2 (64)        | Lichter-Konecki e.a., 1989<br>Stuhrmann e.a., 1989          |
| Algerije    | 38                     |                       | Lyonnet e.a., 1989                                          |
| Polynesië   |                        | 4,1,7,6 (622)         | Hertzberg e.a., 1989                                        |
| China       | 4,11=nk (14)           | 4,1,7,nk (76)         | Hertzberg e.a., 1989<br>Chen e.a., 1989<br>Wang e.a., 1989a |

### 1.5.3. Mutaties van fenylketonurie

Meer dan 30 verschillende mutaties in het PAH gen werden beschreven in de literatuur (§ appendix). Vier van deze mutaties zijn gelegen in de sekwenties die herkend worden door de restrictie-enzymen, die gebruikt worden in de RFLP haplotypering, wat een snelle detectie mogelijk maakt.

### 1.5.4. Verband tussen mutatie en haplotype

In overeenkomst met thalassemie (Orkin, 1984) wordt verwacht dat een bepaalde mutatie enkel voorkomt op een bepaald haplotype. Zo werd in de Deense (DiLella e.a., 1986b en 1987), de Zwitserse en Schotse (Sullivan e.a., 1989) en de Duitse bevolking (Lichter-Konecki e.a., 1988b) de mutatie in codon 408 en de 'splicing mutation' in intron 12 enkel en alleen teruggevon-



den bij allelen met respectievelijke haplotypes 2 en 3. In een andere studie daarentegen, werd bij één van de 10 onderzochte PKU allelen met haplotype 3 de 'splicing mutation' in intron 12 niet gevonden (Aulehla-Scholz e.a., 1988). De associatie kon ook niet bevestigd worden in de Italiaanse populatie, waar slechts 1 op 8 onderzochte haplotypes 3 positief was voor de intron 12 mutatie en 2 op 4 haplotypes 2 hadden een mutatie in codon 408 (Dianzani e.a., 1989). In de Chinese populatie, waar allelen met haplotype 4 het meest voorkomen, werden verschillende mutaties gekarakteriseerd, namelijk in codon 111 (Wang e.a., 1989a), codon 204 (Wang e.a., 1989a) en codon 413 (Wang e.a., 1989b). In Zwitserland en Denemarken, daarentegen, is haplotype 4 geassocieerd met respectievelijk mutaties in codon 414 en codon 158 (Okano e.a., 1990). Haplotype 1 is zeer heterogeen en mutaties in codon 261 (Abadie e.a., 1989) en 281 (Okano e.a., 1991b) werden beschreven. Enkel bij de Yeminitische Joden werd bij alle PKU allelen een deletie in exon 3, geassocieerd met een eigen haplotype, gevonden (Avigad e.a., 1990). Hieruit blijkt duidelijk dat over de gehele wereld verschillende onafhankelijke mutaties aanleiding gegeven hebben tot PKU.

#### **1.5.5. Verband tussen mutatie, haplotype en fenotype**

De identifikatie van fenylalanine hydroxylase allelen door RFLP haplotypering of karakterisatie van de PKU veroorzakende mutatie laat de korrelatie tussen het fenotype van de patiënten met hun genotype mogelijk. Zo hebben homozygoten voor haplotype 2 of 3 steeds klassieke PKU. Hetzelfde klinische fenotype wordt aangetroffen bij patiënten met haplotype-kombinatie 2/3. Meer in het bijzonder resulteert de 'splicing mutation' in intron 12 en de mutatie in codon 408 steeds in klassieke PKU. Maar ook wanneer haplotype 3 een andere mutatie dan deze in intron 12 heeft, wordt hetzelfde fenotype gevonden (Aulehla-Scholz e.a., 1988). De enige uitzonderingen hierop werden gevonden in Denemarken waar milde PKU aangetroffen werd bij patiënten met haplotype-kombinaties 3/1 en 3/4. Waarschijnlijk is dit toe te schrijven aan de verschillende mutaties, die geassocieerd zijn met haplotype 1 en 4. Patiënten met haplotype 1 of haplotype 4 in combinatie met zichzelf of met elkaar kun-



nen immers zowel klassieke als milde PKU hebben, wat de heterogeniteit van mutaties bij deze haplotypes nog eens benadrukt.

#### **1.5.6. Verband met de aktiviteit van het enzyme**

Mutaties in het PAH gen kunnen de produktie van onstabiel mRNA of enzyme veroorzaken, maar ook een stabiel, doch inactief produkt kan gevormd worden. Tothiertoe werden slechts 3 mutaties (codon 158, 261 en 280) gevonden, die aanleiding geven tot de expressie van een stabiel enzyme met gereduceerde aktiviteit (Okano e.a., 1990b ; Lyonnet e.a., 1989). De mutaties in codon 281, 311, 408 en intron 12 veroorzaken de produktie van een onstabiel eiwit in de lever (Dworniczak e.a., 1991 ; Lichter-Konecki e.a., 1988b ; DiLella e.a., 1987 ; Marvit e.a., 1987). Voor de overige mutaties werden de expressie-expermimenten nog niet uitgevoerd. Voldoende informatie, die kan leiden tot de karakterisatie van funktionele eenheden in het enzyme, is dan ook niet voorhanden en het is te voorbarig reeds te stellen dat de plaats van de mutatie in het gen verantwoordelijk is voor het fenotype van de ziekte.

### **1.6. Maternale fenyلكetonurie**

Maternale hyperfenylalaninemie veroorzaakt irreversiebele schade aan de foetus, zoals groeistoornissen, misvormingen, microcephaly en mentale achterstand (Lenke en Levy, 1980). Ten gevolge van de neonatale screening en het succesvol management van patiënten met hyperfenylalaninemie bereikt echter een groter aantal PKU vrouwen de geslachtsrijpe leeftijd. Vermits dit zou leiden tot een tweede generatie mentaal geretardeerde kinderen, is maternale PKU heden het belangrijkste beleidsonderwerp in PKU preventie-programma's (Presymposium Workshop on Maternal PKU, Munchen, Sept 1989).

Twee benaderingsmethoden voor de preventie van maternale PKU werden reeds geëvalueerd : de registratie en opsporing van vrouwen met hyperfenylalaninemie, zodat genetische raadgeving in verband met erfelijkheid





mogelijk wordt (Waisbren e.a., 1988), en een behandeling op basis van een fenylalanine-arm dieet, dat nog voor de conceptie gestart wordt en dat de gehele zwangerschap dient aangehouden te worden opdat het fenylalanine in het bloed de schadelijke concentratie niet zou overschrijden (Lynch e.a., 1988; Hyaneck e.a., 1988 ; Cohen e.a., 1988).



## HOOFDSTUK 2 : DOELSTELLINGEN

In België bestaat sinds 1968 een nationaal programma voor de opsporing van metabole aandoeningen bij pasgeborenen. Eén van de meest voorkomende aandoeningen is fenyلكetonurie. Pasgeborenen met deze aandoening worden onmiddellijk behandeld met een streng, fenyलalanine-arm dieet en, in functie van de leeftijd, wekelijkse of maandelijks gecontroleerd aan de hand van de fenyलalaninespiegel in het bloed. Dankzij de nauwe samenwerking tussen de ouders van deze kinderen, de behandelende geneesheer en het screeningscentrum worden heden meer dan 200 patiënten over gans België, rechtstreeks of onrechtstreeks, op het Dr.L.Willems-Instituut gevolgd. Dit betekent echter niet dat fenyلكetonurie een opgelost probleem is. Nog steeds wordt gestreefd naar de optimalisatie van de behandeling. Ook prenatale diagnostiek en preventie van maternale PKU zijn belangrijke streefdoelen. Ten einde deze doeleinden te bereiken is de kennis van de genetica van fenyلكetonurie onontbeerlijk.

### 2.1. RFLP haplotypering

Dankzij dit onderzoek kunnen dragers binnen een PKU familie opgespoord en een eventuele prenatale diagnose gesteld worden. Daarenboven kan de frequentie en de distributie van de RFLP haplotypes in België, na vergelijking met deze van andere Europese landen, informatie leveren over het ontstaan en de verspreiding van PKU.



## 2.2. Bepaling van het gendefekt

In een tweede fase van het onderzoek zal het defect in het fenylalanine hydroxylase gen, dat de oorzaak van PKU is, opgespoord worden. Hierbij zal gestreefd worden naar de ontwikkeling van een techniek, die een snelle detectie van ongekennde mutaties in het gen mogelijk maakt.

Deze mutaties zullen, na vergelijking met deze in andere Europese landen en het RFLP haplotype waarop zij voorkomen, informatie verschaffen over de evolutie van PKU in Europa en in België in het bijzonder.

## 2.3. Korrelatie genotype-fenotype

Van zodra de opsporing van fenylketonurie gestart werd, kon vrij snel worden aangetoond dat fenylketonurie niet één enkele aandoening is, maar dat deze aandoening gepaard gaat met een breed spectrum van fenotypes. In praktijk wordt het fenotype van een patiënt voorspeld via een korrelatie van de serum fenylalanine concentratie met de dagelijkse fenylalanine inname. Deze beide waarden reflektieren de verstoorde biochemische activiteit van het fenylalanine hydroxylase (PAH). Indien een relatie tussen deze gedaalde PAH activiteit en de bij de patiënt voorkomende specifieke mutatie bestaat, zou dit in de toekomst toelaten in een vroeg stadium (bv. kort na de geboorte) de ernst van de ziekte te 'voorspellen', wat de optimalisatie van de behandeling ten goede zal komen.

Niet alleen PKU patiënten, maar ook dragers van het PKU gen, vertonen een daling in de activiteit van het fenylalanine hydroxylase. Daarom zal getracht worden om via metingen van plasma fenylalanine en tyrosine concentraties heterozygoten te detekteren. Daarenboven kan een korrelatie tussen de bij de PKU drager voorkomende mutatie en de verstoorde biochemische activiteit informatie verschaffen over het effect van gendefekten in het PAH locus op het fenotype van patiënten met fenylketonurie.



## **HOOFDSTUK 3 : MATERIAAL EN METHODEN**

### **3.1. DNA-bereidingen**

#### **3.1.1. Bereiding van genomisch DNA**

Totaal bloed voor DNA extracties wordt afgenomen op EDTA. De erythrocyten worden gelyseerd door toevoeging van 3 volumes hemolysebuffer (155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 1 mM EDTA pH 7.4), gevolgd door een inkubatie van 20 minuten bij 4°C. Vervolgens worden de leucocyten gedurende 15 min aan 2.000 rpm gecentrifugeerd in een gekoelde centrifuge (Jouan CR 4 11 - St.Nazaire, France) en overnacht behandeld met 200 µg/ml proteïnase K (Boehringer, Mannheim, DBR) in SE-buffer (75 mM NaCl, 24 mM EDTA pH 8.0) en 1% SDS. Het DNA wordt vervolgens gezuiverd door hetzij twee fenol/chloroform/isoamylalcohol (24:24:1) extracties en een chloroform/isoamylalcohol (24:1) extractie, gevolgd door een precipitatie met 1 volume isopropanol en 1/30 volume 3 M Na-acetaat pH 5.5, hetzij een zout/chloroform extractie en een precipitatie met 1 volume isopropanol (Mullenbach e.a., 1989).

Microextractie van DNA uit gedroogde bloedspots op filterpapier (Guthrie-kaarten) gebeurt volgens de methode beschreven door McCabe e.a., 1987 : een gedroogde bloedvlek, equivalent aan 50 µl totaal bloed, wordt uitgeknipt en versnipperd. Na een overnacht inkubatie in 3 ml 0.85% NaCl wordt de oplossing gedurende 10 min aan 2.000 rpm gecentrifugeerd in een microcentrifuge. Het filterpapier wordt gewassen met 1.5 ml 0.85% NaCl (5 min schudden), dat aan de pellet, bekomen na centrifugatie, wordt toegevoegd en vervolgens eveneens wordt gecentrifugeerd (10 min aan 2.000 rpm). De





bekomen pellet wordt geïnkubeerd bij 37°C in aanwezigheid van 500 µg/ml proteïnase K (Boehringer, Mannheim, DBR) in 0.5 ml STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) en 25 µl 10% SDS. Het DNA wordt dan gezuiverd door 3 fenolextrakties (500, 250 en 250 µl), 3 etherextrakties (500, 250, 250 µl) en een precipitatie met 25 µl 4M Na-acetaat en 1 ml 100% ethanol.

### 3.1.2. Bereiding van plasmide DNA

Plasmide DNA van *E.coli* wordt geïsoleerd volgens de methode beschreven door Volckaert, 1988 : drie ml van een overnacht cultuur in LB medium (1% Bacto-trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl) worden gecentrifugeerd in een microcentrifuge. De pellet wordt gesuspenderd in 80 µl 10% sucrose, 50 mM Tris.Cl, pH 8.0. Vervolgens wordt lysozyme (Boehringer, Mannheim, DBR) in een eindconcentratie van 10 mg/ml toegevoegd. Na 5 min inkubatie wordt 120 µl Triton Lytische Mix (0.2% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris.Cl, pH 8.0) toegevoegd en zacht gemengd. De gelyseerde cellen worden 20 minuten gecentrifugeerd. Het plasmide DNA in het supernatans wordt gezuiverd door twee fenolextrakties en een Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Zweden) gelfiltratie, gevolgd door een precipitatie met 2 volumes ethanol:isopropanol:3.0 M Na-acetaat pH 5.5 (10:10:1).

### 3.1.3. Bereiding van faag DNA

De bacteriofaag van *E.coli*, M13, bevat een circulaire enkelstreng DNA molekule, die geïsoleerd wordt volgens een protocol van Messing, 1983 : één plaque of 2 µl van een faagstock wordt gedurende 5 uur bij 37°C opgegroeid in 2 ml LB medium (1% Bacto-trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl) met 20 µl *E.coli* cellen, afkomstig van een verzadigde cultuur. Vervolgens worden de bacteriëen gecentrifugeerd. De fagen in het supernatans worden geprecipiteerd door toevoeging van 200 µl 20% PEG 6000, 1.5 M NaCl, gevolgd door een inkubatie van 15 min. Na centrifugatie gedurende 10 min in een microcentrifuge wordt de faagpellet gesuspenderd in H<sub>2</sub>O, waarna het DNA geëx-



traheerd wordt met fenol, gevolgd door een Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Zweden) gelfiltratie en een precipitatie met 2 volumes ethanol:isopropanol:3 M Na-acetaat pH 5.5 (10:10:1).

In de bacterie wordt de enkelstreng DNA-molekule van de M13-bakteriofaag omgezet in een dubbelstreng replicatieve vorm. Na infectie van *E.coli* met M13-bakteriofagen (één plaque of 2 µl faagstock + 20 µl *E.coli* + 2 ml LB-medium) en 5 uur schudden bij 37°C kan de dubbelstreng DNA molecule geïsoleerd worden volgens de methode beschreven door Volckaert, 1988 (§ 3.1.2.).

### 3.2. Synthese van oligonukleotiden

Oligonukleotiden worden gesynthetiseerd op een Applied Biosystems Model 319 DNA-synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA, VS). Na deprotektie en klieving van het oligonukleotide van de kolom met gekoncentreerde ammonium wordt het geprecipiteerd met 1/10 volume 3.0 M Na-acetaat (pH niet aangepast) en 3 volumes 100% ethanol (TRITYL-OFF synthese) of verder opgezuiverd met de Oligonucleotide Purification Catridge of OPC (TRITYL-ON synthese) volgens de aanwijzingen van Applied Biosystems (Foster City, CA, VS).

### 3.3. Enzymatische manipulaties van DNA

#### 3.3.1. Modifikatie en radioactieve merking

Ligaties (vorming van een fosfodiesterverbinding tussen een 5'-fosfaat en een 3'-hydroxylgroep in een DNA-duplex) door T4-DNA-ligase, fosforylaties (transfer van de  $\gamma$ -fosfaat van ATP naar de 5'-hydroxylgroep van DNA en RNA) door T4-polynukleotide kinase, defosforylaties (hydrolyse van de 5'-fosfaat van DNA en RNA) door alkalisch fosfatase en afbraak van DNA door res-



triktie-enzymen (enzymen, die de DNA-dubbelstreng ter hoogte van een specifieke nukleotide-sekwentie knippen) worden allen uitgevoerd volgens de aanwijzingen van de leverancier (Life Technologies, Gaithersburg, MD, VS of Boehringer, Mannheim, DBR of Stratagene, La Jolla, CA, VS). Aan de restriktie-afbraak van genomisch DNA wordt spermidine (Boehringer, Mannheim, DBR) toegevoegd in een eindconcentratie van 3 mM (Pignoud, 1985).

De radioactieve merking van DNA-fragmenten met  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP (3.000Ci/mmol ; Amersham, Buckinghamshire, Groot-Brittannië) gebeurt door 'nick-translatie' (Rigby e.a., 1976) of door 'random-priming' (Feinberg en Vogelstein, 1984) volgens de aanwijzingen van de leverancier (Life Technologies, Gaithersburg, MD, VS). Oligonukleotiden worden radioactief gemerkt met T4-polynukleotide kinase (Life Technologies, Gaithersburg, MD, VS) en  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP (3000Ci/mmol ; Amersham, Buckinghamshire, Groot-Brittannië).

Oligonukleotiden, die via de synthese van een "aminolink-2" (Applied Biosystems, Foster City, CA, VS) zijn voorzien, worden gebiotinyleerd via een overnacht inkubatie met biotine-NHS-ester (Life Technologies, Gaithersburg, MD, VS ; 10 mg/ml N,N-dimethylformamide) in 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  en vervolgens opgezuiverd via een Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Zweden) gelfiltratie.

### 3.3.2. Polymerase Kettingreactie (PCR)

De Polymerase Kettingreactie of PCR is de *in vitro* amplificatie van specifieke DNA-segmenten met behulp van twee oligonukleotide primers - één op elke streng van de DNA-duplex - die het te amplificeren DNA-segment flankeren. Gedurende opeenvolgende cycli van denaturatie, renaturatie en verlenging van de primers door het thermostabiele *Taq*-polymerase wordt het segment tussen beide primers aangerijkt.

Amplifikaties worden uitgevoerd volgens de methode, beschreven door Saiki e.a., 1988 : 100  $\mu\text{l}$  reaktiemengsel bevat 1  $\mu\text{g}$  genomisch DNA in 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.4, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  gelatine, 50 pmol van elke primer, 200  $\mu\text{M}$  van elke dNTP en 2.5 units *Taq*-polymerase (Cetus, Emeryville, CA, VS). Het geheel wordt afgedekt met minerale olie en geamplificeerd in een programmeerbare thermoblok (New Brunswick Scientific, Edison, NJ,



VS) gedurende 35 cycli (1 min bij 95°C, 1 min bij 55°C, 2 min bij 72°C).

### 3.4. Analyse van DNA

De standaardmethode voor de scheiding en identificatie van DNA-fragmenten is de gelelektroforese (Maniatis e.a., 1982). Analyse van DNA-fragmenten gebeurt in 0.6%-2.0% agarosegels (Life Technologies, Gaithersburg, MD, VS) in een 'submarin' systeem (Plexi-labo, Gent, België) met EB-buffer (40 mM Tris.Cl, 0.5 M Na-acetaat, 50 mM EDTA, pH 7.2) als elektroforesebuffer. Enkel de gels, die gebruikt worden in een Southern blot, worden gemaakt en uitgevoerd in TAE-buffer (50 mM Tris-acetaat, 1 mM EDTA, pH 7.7). Kleine DNA-fragmenten en oligonukleotiden worden geanalyseerd via een elektroforese in 6%-20% polyacrylamidegels (PAA-stock : 30% PAA - 2% bisAA). De detektie van het bandenpatroon gebeurt m.b.v. het interkallerende ethidiumbromide, dat bij UV-bestraling fluoresceert.

DNA-fragmenten kunnen geëluëerd worden uit "Low Melting Point" agarosegels (Life Technologies, Gaithersburg, MD, VS). Aan het uitgesneden gelstuk worden 2 volumes H<sub>2</sub>O toegevoegd. Het geheel wordt 15 min bij 65°C geplaatst, waarna het DNA geëxtraheerd wordt met fenol, gevolgd door een Sephadex G50 (Pharmacia, Uppsala, Zweden) gelfiltratie en een precipitatie met 2 volumes ethanol:isopropanol:3.0 M Na-acetaat pH 5.5 (10:10:1). Voor de elutie van oligonukleotiden uit polyacrylamidegels wordt het gelstuk overnacht geschud in 450 µl 0.5 M NaCl + 10 µl 0.05 M Tris en het DNA wordt geëxtraheerd zoals hierboven beschreven.

### 3.5. Blottechnieken en hybridisaties

#### 3.5.1. Southern blot

Voor de transfer van DNA-fragmenten vanuit een gel naar een DNA-





bindende filter (Southern, 1975) wordt het DNA gedenatureerd, geneutraliseerd en vervolgens overgebracht naar de nylonfilter GeneScreen+ (Dupont, Boston, MA, VS) met 10xSSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-citraat) als transferbuffer of m.b.v. een vacuumblot (Bio-rad, Richmond, CA, VS) naar Zeta-Probe GT (Bio-Rad, Richmond, CA, VS). Hierbij worden de aanwijzingen van de leverancier gevolgd. Prehybridisatie en hybridisatie met een radioactieve probe worden uitgevoerd bij 65°C in 1% SDS, 1M NaCl, 10% dextraansulfaat en 100 µg/ml gedenatureerd haringsperma DNA. De wasbeurten worden uitgevoerd met 2xSSC-0.1% SDS, 1xSSC-0.1% SDS en tenslotte met 0.3xSSC-0.1% SDS (20xSSC : 3 M NaCl, 0.3 M Na-citraat). Uiteindelijk wordt het hybridisatiepatroon vastgelegd op Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, Engeland) door autoradiografie.

### 3.5.2. Dot-blot-hybridisatie

Geamplificeerd DNA (1/10 van de reactie) wordt gedenatureerd in 0.4 M NaOH, 10 mM EDTA bij 95°C en op een Zeta-Probe nylonmembraan (Bio-Rad, Richmond, CA, VS) gebracht met behulp van een Bio-Dot blotting apparaat (Bio-Rad, Richmond, CA, VS). Prehybridisatie, gevolgd door een hybridisatie met 2 pmol <sup>32</sup>P-gemerkt oligonukleotide, gebeurt bij 45°C in 3 M tetramethylammonium chloride (Fluka Chemie AG, Buchs, Zwitserland), 50 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 100 µg/ml gedenatureerd haringsperma DNA, 0.1% SDS en 5x Denhardt's oplossing (1% BSA, 1% ficoll 400, 1% polyvinylpyrrolidon 350). Vervolgens worden de filters gewassen ; 5 min bij kamertemperatuur met 2xSSPE-0.1% SDS, 5 min bij 50°C met 5xSSPE-0.1% SDS (20xSSPE : 3.6 M NaCl, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 M EDTA) en 1 uur met de hybridisatiebuffer, zonder Denhardt's en haringsperma DNA, bij een temperatuur in functie van de lengte van het gebruikte oligonukleotide (Melchior e.a., 1973, Wood e.a., 1985). Uiteindelijk wordt het beeld vastgelegd op Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, Engeland) door autoradiografie.



### 3.6. Single Strand Conformation Polymorphism

Onder niet-denaturerende omstandigheden vouwt enkelstreng DNA zich op tot een konformatie, die gestabiliseerd wordt door intrastreng-interacties. Deze konformatie is sekwentie-afhankelijk en kan elektroforetisch aangetoond worden. Dit betekent dat base-substituties herkenbaar worden als verschillen in elektroforetische mobiliteit van de enkelstreng DNA (Orita e.a., 1989).

Praktisch wordt aan een PCR-reaktie met 10 pmol van elke primer, 2 nmol van elke dNTP, 0.1 µg genomisch DNA en 0.25 U *Taq* polymerase in 10 µl 1x PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.4, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µg/ml gelatine) 1 µl α-[<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol ; Amersham, Buckinghamshire, Groot-Brittannië) toegevoegd. Na 30 cycli wordt 1 µl van dit reaktiemengsel gemengd met 100 µl 0.1% SDS, 10 mM EDTA. Hiervan wordt 2 µl gemengd met 2 µl 95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% broomfenolblauw en 0.05% xyleen cyanol, verwarmd bij 80°C en gescheiden op een 6% polyacrylamide gel met 10% glycerol (1 à 5 uur bij 30 W). Het bekomen patroon wordt dan vastgelegd op Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, Engeland) door autoradiografie.

### 3.7. Transformaties en transfecties van *E.coli*

Transformatie van *E.coli* gebeurt in de volgende stammen:

**HB101** ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ):F<sup>-</sup>, hsdS20, recA13, supE44, ara-14, galK2, lacY1, proA2,

rspL20(Smr), xyl-5, leu, mtl-1, lamda-

**JM101** ( $r_K^+$ ,  $m_K^+$ ):F', del(lac proA,B), supE, thi, traD36, lacI<sup>q</sup>, lacZdelM15

**TG1**:K12, F', del(lac pro), supE, thi, hsdD5, traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, lacZdelM15

De transformatie van *E.coli* met plasmide-DNA (HB101) en faag-DNA (JM101, TG1) gebeurt volgens de calciumchloride methode, beschreven door Mandel en Higa, 1970 en Hanahan, 1983. De cellen worden opgegroeid tot de logaritmische fase (OD 550 = 0.4), vervolgens gecentrifugeerd bij 4°C aan



5.000 rpm en opgelost in 1/4 volume 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ . Na een inkubatie van 30 min op ijs worden de cellen opnieuw gecentrifugeerd en gesuspenderd in 1/25 volume 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ . Na een volgende inkubatie van 30 min op ijs wordt 60% glycerol toegevoegd tot een eindconcentratie van 15%, zodat de cellen bewaard kunnen worden bij  $-70^\circ\text{C}$ .

200  $\mu\text{l}$  van deze competente cellen, ontdooid op ijs, wordt gemengd met het te transformeren plasmide-DNA, dat in de bakterie gebracht wordt d.m.v. een 'heat-pulse': 15 min op ijs, 5 min bij  $37^\circ\text{C}$ , 15 min op ijs. Vervolgens worden de cellen gedurende 1 uur bij  $37^\circ\text{C}$  opgegroeid in 2 ml LB medium (1% Bacto-trypton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl), daarna gemengd met 4 ml Soft-Topagar (LB + 0.8% Bacto-agar) en uitgeplaat op agarbodems (LB + 1.6% Bacto-agar) met een gepast antibioticum. De inkubatie gebeurt overnacht bij  $37^\circ\text{C}$ .

Dubbelstreng DNA van M13-fagen wordt ook door een 'heat-pulse' in de bakterie gebracht, doch na inkubatie op ijs worden onmiddellijk 4 ml Soft-Topagar (LB + 0.8% Bacto-agar), 40  $\mu\text{l}$  100 mM IPTG, 40  $\mu\text{l}$  20 mg/ml X-gal en 200  $\mu\text{l}$  cellen in exponentiële fase toegevoegd. Dit mengsel wordt uitgeplaat op agarbodems (LB + 1.6% Bacto-agar) en overnacht geïnkubeerd bij  $37^\circ\text{C}$ .

Transfectie met infectieuze M13 fagen wordt uitgevoerd zoals beschreven door Messing, 1983.

### **3.8. DNA-sekwentie bepaling**

#### **3.8.1. M13 cloning/dideoxy-methode**

Het uitgangsmateriaal voor de dideoxymethode, beschreven door Sanger e.a., 1977, is enkelstreng DNA. Om dit te bekomen wordt het te sekventiëren fragment geligeerd in een M13-vektor (Boehringer, Mannheim, DBR). Uitgaande van een universele primer, gelegen nabij de polylinker, synthetiseert het DNA-polymerase een komplementaire kopij van de enkelstreng. Deze DNA-synthese wordt uitgevoerd in viervoud en gebeurt in aanwezigheid van de vier deoxynukleoside trifosfaten, waarvan één radioactief



gemerkt is, en telkens één dideoxynukleoside trifosfaat, dat verantwoordelijk is voor het stopzetten van de DNA-synthese. Hiervoor wordt de sekwentiekit van Pharmacia, Uppsala, Zweden gebruikt. De gesynthetiseerde en radioactieve fragmenten worden na denaturatie gescheiden op een 6% polyacrylamidegel met 8 M ureum m.b.v. de Sequi-Gen Nucleic Acid Sequencing Cell (Bio-Rad, Richmond, CA, VS). Na het drogen van de gel in de Model 583 Gel Dryer (Bio-Rad, richmond, CA, VS) wordt het sekwentiepatroon vastgelegd op Curix RP2 X-ray film (Agfa-Gevaert, Mortsel, België) door autoradiografie.

### 3.8.2. Magnetic beads

Enkelstreng DNA kan ook verkregen worden met behulp van magnetische korrels voorzien van een streptavidine groep (Dynabeads M-280, Dynal, Oslo, Noorwegen). Hiervoor wordt een PCR-reaktie met één gebiotinyleerde primer en een gewone primer uitgevoerd. 25 µl van deze reaktie wordt aangebracht op de magnetische korrels, die eerst gewassen worden met 1xPBS, 0.1% BSA. Na een inkubatie van 15 min, waarin de biotine gaat binden met de streptavidine groepen van de magnetische korrels, worden de geamplificeerde fragmenten selektief uit de oplossing verwijderd met behulp van een magneet (MPC-2, Dynal, Oslo, Noorwegen). Na een wasbeurt met 1x TE<sup>-4</sup> wordt het dubbelstreng DNA gedenatureerd via een 5 minuten durende inkubatie in 0.15 M NaOH. De ontstane enkelstreng wordt gezuiverd op de MPC-2 en vervolgens gewassen met 1x TE<sup>-4</sup>. Het opgezuiverde en op de magnetische korrels gebonden DNA wordt uiteindelijk opgelost in 10 µl H<sub>2</sub>O en in sekwentie gebracht met de niet-gebiotinyleerd primer van de PCR-reaktie zoals beschreven in § 3.8.1.

### 3.9. RNA bereiding

Vijf ml totaal bloed wordt gedurende 1 uur bij 4°C geïnkubeerd met 2 ml steriel HÄS (Fresenius AG, Bad Homburg, DBR). Langzaam vormen zich twee fasen. De leucocyten kunnen eenvoudig geprecipiteerd worden door centrif-





gatie van de bovenste fase. Hierdoor wordt lyse van de erythrocyten vermeden, vermits deze zich in de onderste fase bevinden. Het RNA wordt vervolgens geëxtraheerd met de RNazol methode (Cinna/Biotech), beschreven door Chomczynski en Sacchi, 1987.

### **3.10. cDNA-synthese**

Voor de synthese van cDNA wordt het 'RiboClone cDNA Synthesis System' van Promega (Madison, WI, VS) gebruikt, dat gebaseerd is op de methode, beschreven door Gubler en Hoffman, 1983.



## HOOFDSTUK 4 : RESULTATEN

Via het nationaal screeningsprogramma voor hyperfenylalaninemie, opgestart in 1968, werden ongeveer 250 PKU patiënten onder de 3.000.000 geteste pasgeborenen in België opgespoord, wat een frekwentie van 1/10.000 betekent. Toch is deze PKU populatie niet homogeen. Volgens de Belgische PKU registratie bestaat er een significant verschil tussen het Vlaamse en Waalse landsgedeelte. De frekwentie van PKU daalt namelijk van 1/6.000 in het Zuid-Oosten tot 1/20.000 in het Noord-Westen van België.

Een genetisch onderzoek bij 110 PKU patiënten, afkomstig uit 99 families, werd uitgevoerd. Hiervan worden er 91 klinisch gevolgd op het Dr.L.Willems-Instituut. De PKU patiënten van 8 families zijn zussen of broers en in 2 families zijn de patiënten zodanig verwant dat zij één gemeenschappelijk gen dragen. In totaal werden aldus 200 onafhankelijke PAH loci onderzocht. De verspreiding van deze patiënten over België wordt weergegeven in figuur 4.1. Via de nationaliteit van de grootouders van de patiënten werd daarenboven afgeleid dat 13% van de onderzochte mutante allelen afkomstig zijn van landen rond de Middellandse Zee (Italië : 10, Spanje : 4, Turkije : 4, Algerije : 2, Marokko : 4 en Griekenland : 2) en 1.5% van Midden-Europa (Polen : 2, Zwitserland : 1).

Verder werkten 103 ouders uit 57 families (11 families met slechts 1 ouder en 46 families met beide ouders) mee aan dit onderzoek. Eén vader werd na paterniteitsonderzoek uitgesloten uit deze studie, wat betekent dat 204 paternale PAH loci onderzocht konden worden.

Uiteindelijk werden ook 28 broers en zussen (23 families) en meer dan 80 andere verwanten van PKU patiënten onderzocht.





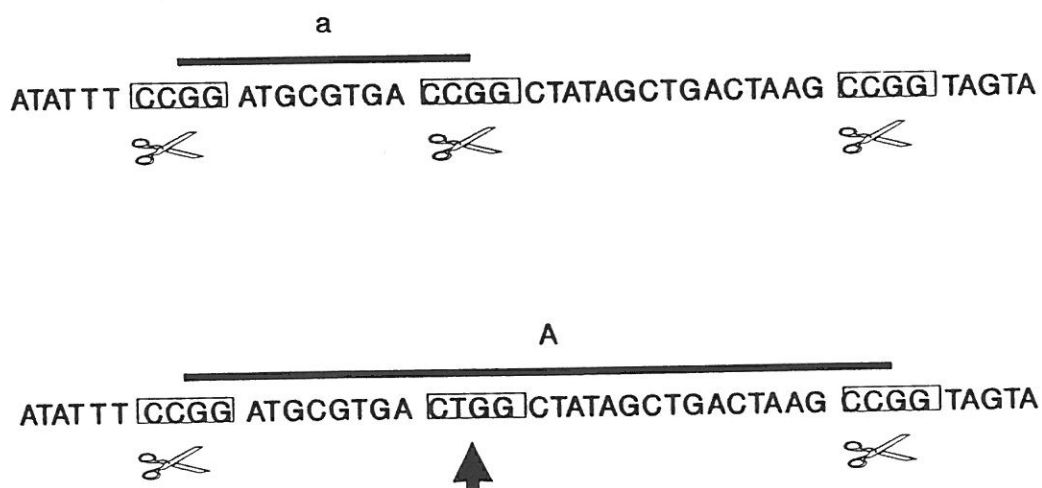
**Figuur 4.1.** : De verspreiding van de onderzochte PKU patiënten over België.



## DEEL 1 : RFLP HAPLOTYPES VAN HET PAH GEN

### 4.1. RFLP : definitie

Bij vergelijking van het DNA van diverse individuen valt op dat geen van allen identiek is. Tal van mutaties, zoals puntmutaties, inserties en deleties, zijn verantwoordelijk voor deze sekwentievariatie in het DNA. Zij komen hoofdzakelijk voor in de introns van het DNA, zodat zij geen enkel voordeel, noch nadeel aan de drager bieden. Een dergelijke mutatie kan ook precies de herkenningssекwentie van een restriktie-enzyme treffen. Bij afbraak van het DNA van verschillende individuen met het betreffende enzyme zullen dan lengteverschillen in de bekomen fragmenten optreden (figuur 4.2.A). Om deze reden spreekt men van "restriktie-fragment-lengte-polymorfisme", afgekort RFLP.



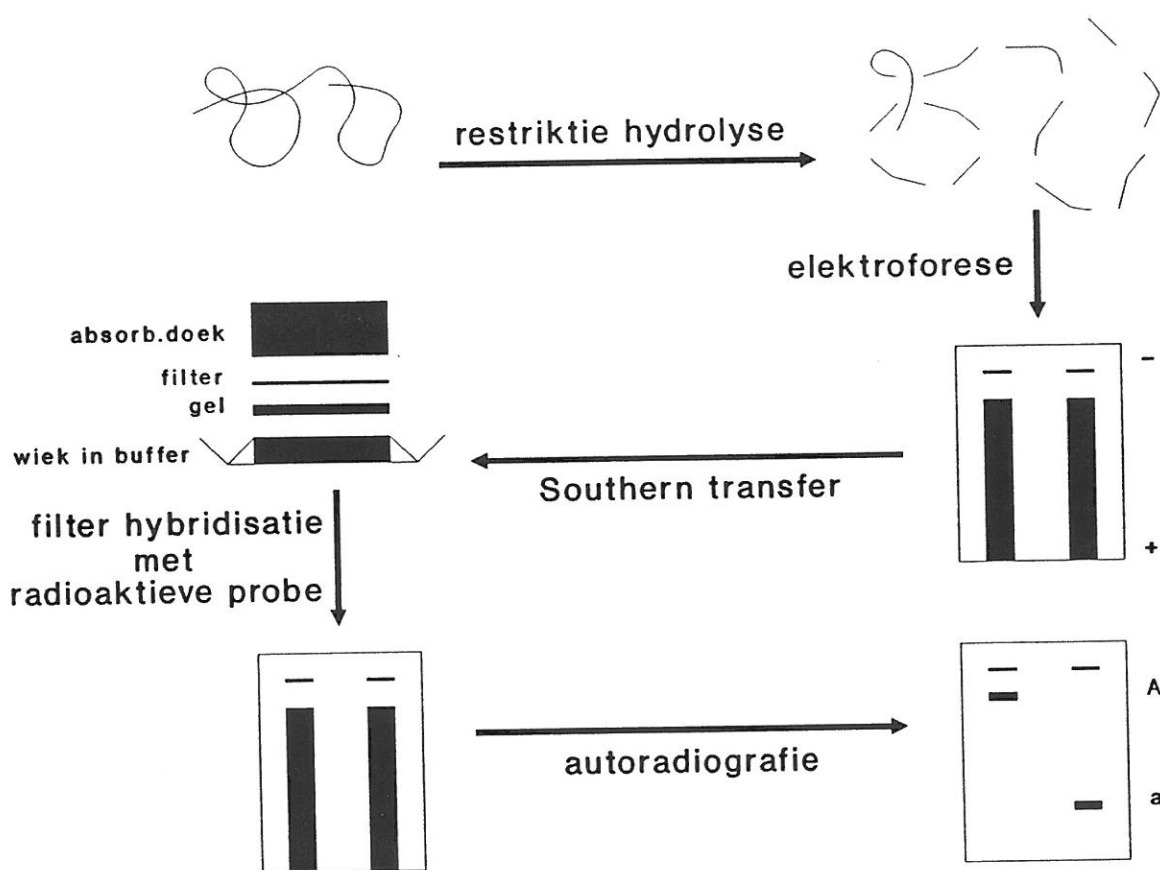
**Figuur 4.2.A.** : Schematische voorstelling van een RFLP, te wijten aan een puntmutatie in de herkenningssекwentie van het restriktie-enzyme MspI.





Het opsporen van zo'n RFLP gebeurt met behulp van een radioactief gemerkte probe ; een nukleotidesequentie, komplementair aan het DNA-fragment waarin de mutatie zich voorgedaan heeft. De werkwijze wordt samengevat in figuur 4.2.B.

Een dergelijke RFLP kan dienst doen als een genetische merker, op voorwaarde dat deze sterk geassocieerd is met het ziekte locus. Via stamboomanalyse kan dan onderzocht worden met welke allelvariante het ziekte locus in de familie segregert.



**Figuur 4.2.B. :** Werkschema voor de opsporing van een RFLP. Menselijke DNA wordt gehydrolyseerd m.b.v. het restriktie-enzyme. De bekomen fragmenten worden gescheiden via agarosegelelektroforese en getransfereerd naar een DNA-bindende filter via Southern blotting. Door hybridisatie met een radioactief gemerkte probe worden na autoradiografie de complementaire fragmenten aan deze probe zichtbaar.



#### 4.2. Bepaling van RFLP haplotypes in het PAH gen

Binnen de introns 2, 3, 5, 8 alsmede voor exon 1 en na exon 13 van het PAH gen zijn 8 verschillende restriktie-fragment-lengte-polymorfismen (RFLP) bekend (tabel 4.1 en figuur 4.3). Informatie hierover wordt met behulp van de desbetreffende enzymen en de probe hPH7 (Speer e.a., 1986) verkregen en gekombineerd tot haplotypes.

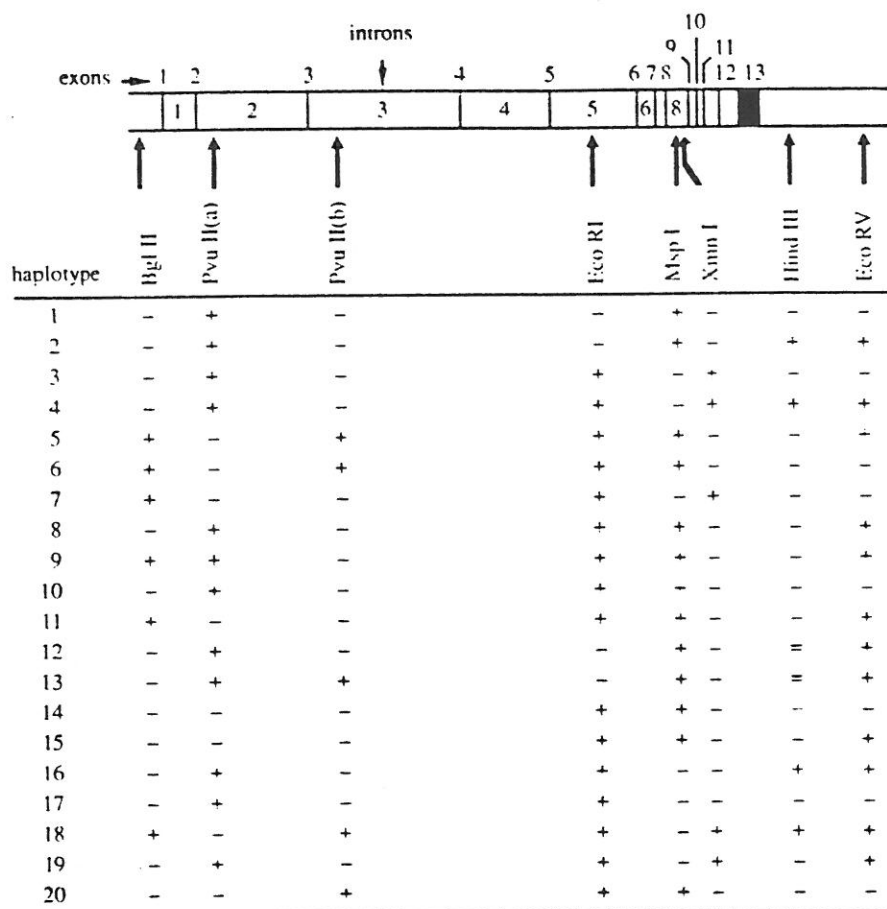
Twee RFLP types worden gedetekteerd in het gen. Allereerst zijn er de basesubstituties, die leiden tot de aan- of afwezigheid van de herkenningplaatsen voor de restriktie-enzymen *Bgl*II, *Pvu*II, *Xmn*I, *Eco*RI, *Eco*RV en *Msp*I. Digestie met *Hin*DIII, daarentegen, levert 3 verschillende allelen op (4.4/4.2/4.0 kb), die door de insertie van DNA met een lengte van respectievelijk 400 bp en 200 bp in het 4.0 kb DNA-prototypefragment ontstaan zijn. Met *Eco*RI worden 2 fragmenten (17 kb en 11 kb) gedetekteerd, doch een invariante band van 17 kb migreert samen met de polymorfe band van dezelfde grootte, zodat interpretatie onmogelijk wordt. Om deze reden wordt een dubbele digestie *Eco*RI/*Bam*HI uitgevoerd met vorming van fragmenten van 8.3 kb en 6.5 kb.

Aangezien *Hin*DIII drie verschillende PAH allelen en de overige enzymen 2 allelen detekteren, kan men uitrekenen dat er  $3 \times 2^7 = 384$  kombinatiemogelijkheden bestaan. Er is een internationale afspraak, door Woo, 1988, geïnitieerd, om elk haplotype met een nummer te voorzien, zodat onderlinge vergelijking mogelijk wordt.

**TABEL 4.1. :** Overzicht van de gebruikte restriktie-enzymen en de grootte van de resulterende DNA-restriktiefragmenten bij de haplotypering van het PAH locus

| restriktie-enzyme            | fragmentlengte (kb) |                           |
|------------------------------|---------------------|---------------------------|
|                              | aanwezig            | indien knipplaats afwezig |
| <i>Bgl</i> II                | 1.7                 | 3.6                       |
| <i>Pvu</i> IIa               | 6.0                 | 19.0                      |
| <i>Pvu</i> IIb               | 9.1                 | 11.5                      |
| <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI | 6.5                 | 8.3                       |
| <i>Msp</i> I                 | 19.0                | 23.0                      |
| <i>Xmn</i> I                 | 6.5                 | 9.4                       |
| <i>Hin</i> DIII              | 4.0                 | 4.2 of 4.4                |
| <i>Eco</i> RV                | 25.0                | 30.0                      |





**Figuur 4.3. :** Schematische voorstelling van het fenylalanine hydroxylase gen. De afstand tussen exon 1 en 13 bedraagt circa 90 kb. Exon 1-13 bij elkaar opgeteld (2.4 kb) representeren het voor het eiwit koderende deel van het gen. De plaatsen waar de restrictie-enzymen een RFLP detekteren, zijn met een pijl aangegeven. Bij de haplotypes geeft (+) de aanwezigheid en (-) de afwezigheid van de knipplaats weer voor de eerste 20 haplotypes.

Afwijkingen in de hybridisatiepatronen kunnen optreden wanneer de PKU mutatie een herkenningssекwentie van het restrictie-enzyme, dat in de RFLP haplotypering gebruikt wordt, zal veranderen (tabel 4.2). Hierdoor ontstaan nieuwe RFLP's, die in tegenstelling tot de reeds beschreven RFLP's nadelig kunnen zijn voor de drager (PKU patiënt) en daarom hoofdzakelijk in de exons en zijn grenzen met de introns van het PAH locus voorkomen. Als voorbeeld worden de resultaten van de haplotypering bij 4 families in figuur 4.4. getoond. In familie 1 is de haplotypering éénduidig, zodat volledig



**TABEL 4.2. :** Overzicht van de restriktie-enzymen, die een 'Europese' PKU mutatie tijdens de haplotypering van het PAH locus aantonen en de grootte van de resulterende fragmenten (kb).

| Haplotype | restriktie-enzyme | exon | lengte (kb) | referentie                  |
|-----------|-------------------|------|-------------|-----------------------------|
| S         | <i>Bam</i> HI     | 7    | 10.0        | Svensson e.a., 1990         |
| X         | <i>Msp</i> I      | 9    | 13.5        | Lichter-Konecki e.a., 1988a |
| T         | <i>Hin</i> DIII   | 11   | 7.5         | Svensson e.a., 1990         |
| Z         | <i>Xmn</i> I      | ?    | 4.5         |                             |

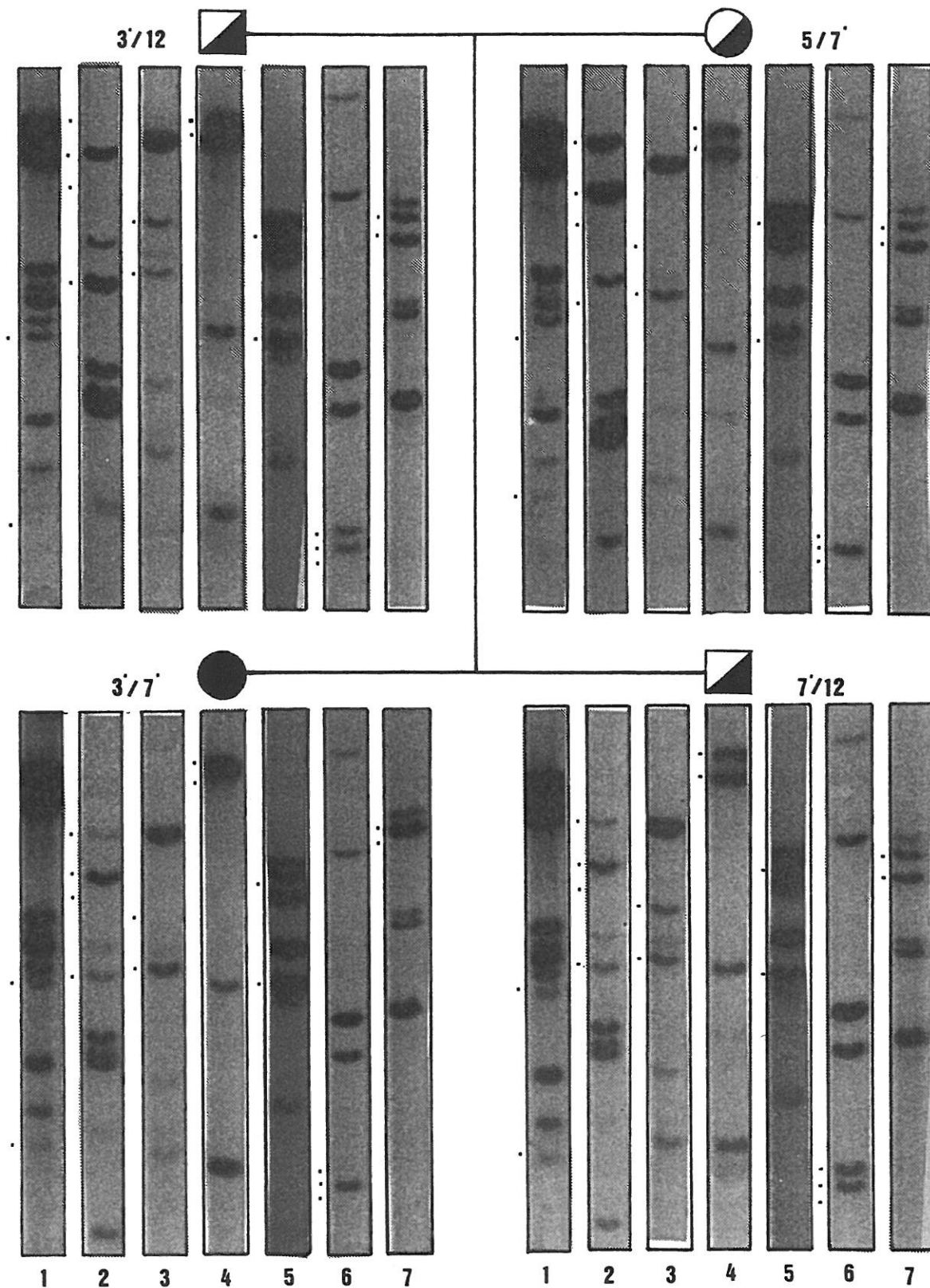
uitsluitsel met betrekking tot PKU dragerschap bij broers en zussen van de patiënt kan gegeven worden. In familie 2 wordt PKU veroorzaakt door een mutatie, die een *Msp*I-knipplaats in exon 9 creëert, wat zichtbaar wordt als een 13.5 kb fragment op de Southern blot analyse. Alle familieleden met dit fragment zijn geïdentificeerd als PKU dragers. In familie 3 is één van beide ouders van de patiënt homozygoot voor haplotype 1, waarvan één met een PKU mutatie. Vermits in deze familie niet uitgemaakt kan worden of het normale dan wel het zieke allel met haplotype 1 doorgegeven wordt, blijft de kans op PKU dragerschap 50%. In familie 4 zijn bij de ouders 2 haplotype-kombinaties mogelijk, waardoor de PKU haplotypes in deze familie niet geïdentificeerd kunnen worden.

#### 4.3. RFLP haplotypes in de Belgische bevolking

Een studie naar de RFLP haplotypes van 110 PKU patiënten uit 99 families werd uitgevoerd. Rekening houdende met verwantschappen werden 200 mutante allelen onderzocht. Parentale haplotypes werden bepaald door vergelijking met deze van het PKU kind. De genen van 102 ouders, afkomstig uit 57 verschillende families, werden onderzocht en een klassifikatie van 196 parentale chromosomen (98 normale en 98 PKU allelen), d.i. 96.1%, was mogelijk.

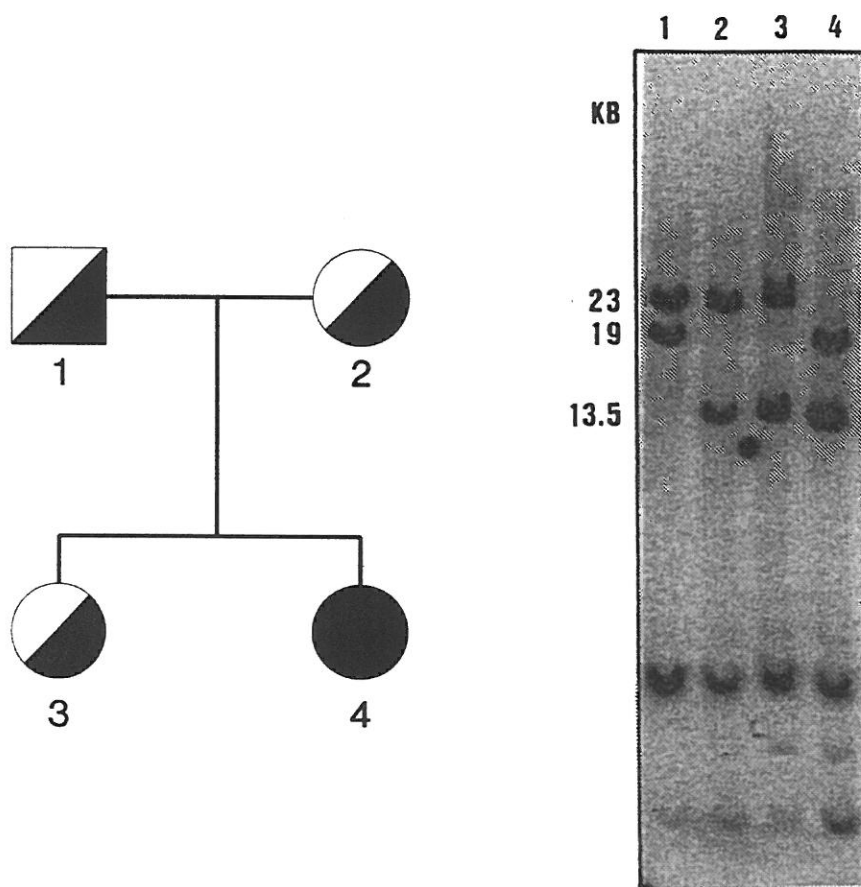




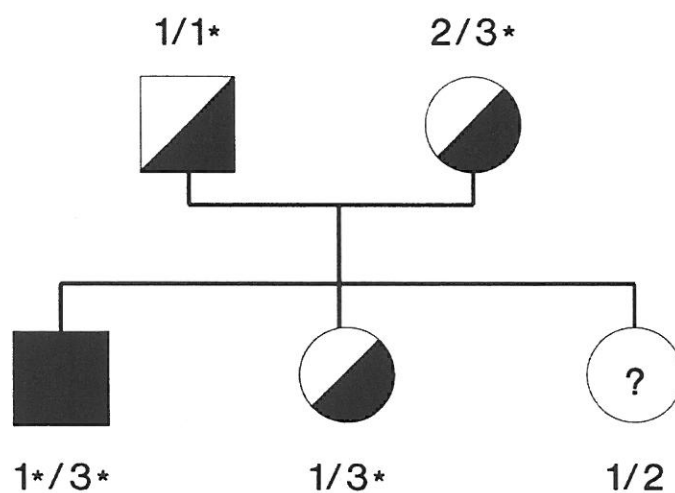


**Figuur 4.4. :** RFLP haplotypering van het PAH locus in familie 1. (□ = man) (○ = vrouw) (□ = homozygoot normaal) (■ = PKU patiënt) (◻ = PKU drager) 1 = BglII, 2 = PvuII, 3 = EcoRI/BamHI, 4 = MspI, 5 = XmnI, 6 = HindIII, 7 = EcoRV



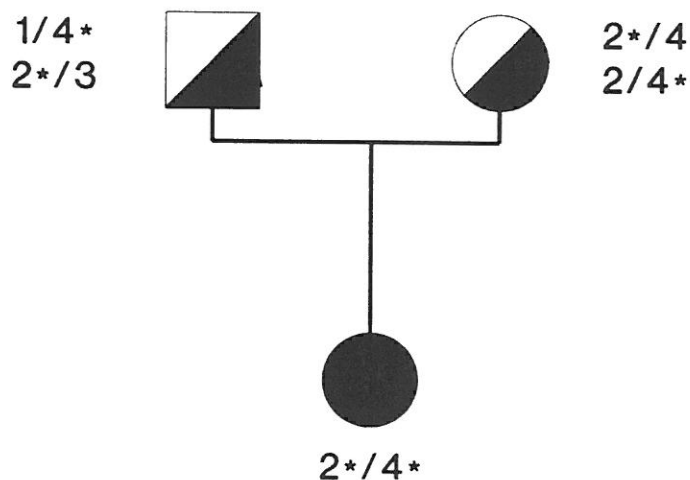


**Figuur 4.4. (vervolg) :** RFLP haplotypering van het PAH locus in familie 2, waar PKU veroorzaakt wordt door een mutatie, die een MspI-knipplaats in exon 9 van het gen creëert, wat resulteert in een band van 13,5 kb.



**Figuur 4.4. (vervolg) :** RFLP haplotypering van het PAH locus in familie 3, waar bepaling van het PKU dragerschap onmogelijk is ten gevolge van de homozygositeit van één van beide ouders..





**Figuur 4.4. (vervolg)** : *RFLP haplotypering van het PAH locus in familie 4, waar verschillende haplotype-kombinaties bij de ouders mogelijk zijn.*

#### 4.3.1. Vergelijking van RFLP allelen op normale en mutante chromosomen

Bij geen enkel van de 8 individuele RFLPs bestaat een significant verschil in de allelfrekwenties tussen normale en PKU chromosomen (tabel 4.3). Voor deze analyse werden de allelen van de haplotypes X, S en Z gelijk gesteld aan deze van het haplotype, dat zou ontstaan indien de mutatie niet aanwezig is.

#### 4.3.2. Frekwentie en distributie van de RFLP haplotypes (N=98;M=98)

Hoewel theoretisch 384 verschillende haplotypes in het PAH locus bestaan, werden slechts 12 hiervan teruggevonden bij de normale allelen (tabel 4.4). Het merendeel van deze allelen (73.4%) is daarenboven geassocieerd met de haplotypes 1, 4, 5 en 7, welke ook in andere Europese populaties de meest voorkomende normale haplotypes zijn (§ 1.5.2).



**TABEL 4.3. : RFLP allelen op normale en PKU chromosomen.**

| enzyme          | allel (kb) | aantal allelen |    |     | $\chi^2$ | df | P  |
|-----------------|------------|----------------|----|-----|----------|----|----|
|                 |            | N              | M  | T   |          |    |    |
| <i>Bgl</i> II   | 3.6        | 68             | 72 | 140 | 0.400    | 1  | ns |
|                 | 1.7        | 30             | 26 | 56  |          |    |    |
| <i>Pvu</i> IIa  | 19.0       | 30             | 20 | 50  | 2.685    | 1  | ns |
|                 | 6.0        | 68             | 78 | 146 |          |    |    |
| <i>Pvu</i> IIb  | 11.5       | 82             | 86 | 168 | 0.667    | 1  | ns |
|                 | 9.1        | 16             | 12 | 28  |          |    |    |
| <i>Eco</i> RI   | 8.3        | 46             | 35 | 81  | 2.546    | 1  | ns |
|                 | 6.5        | 52             | 63 | 115 |          |    |    |
| <i>Msp</i> I    | 23.0       | 34             | 41 | 75  | 1.058    | 1  | ns |
|                 | 19.0       | 64             | 57 | 121 |          |    |    |
| <i>Xmn</i> I    | 9.4        | 64             | 57 | 121 | 1.058    | 1  | ns |
|                 | 6.5        | 34             | 41 | 75  |          |    |    |
| <i>Hin</i> DIII | 4.4        | 8              | 3  | 11  | 2.696    | 2  | ns |
|                 | 4.2        | 63             | 63 | 126 |          |    |    |
|                 | 4.0        | 27             | 32 | 59  |          |    |    |
| <i>Eco</i> RV   | 30.0       | 48             | 45 | 93  | 0.184    | 1  | ns |
|                 | 25.0       | 50             | 53 | 103 |          |    |    |

Bij de mutante allelen wordt een totaal van 16 verschillende haplotypes aangetroffen en 58.1% behoort tot de haplotypes 1, 3 en 4. Bij 5 allelen werd één van de PKU specifieke haplotypes (X, S of Z) teruggevonden.

Er bestaat een significant verschil in de frekwenties van de haplotypes tussen normale en mutante chromosomen. Met een 2 x 8 contingentie tabel, waarbij de haplotypes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12 en 'andere' als afzonderlijke categorieën beschouwd worden, kan berekend worden dat  $\chi^2 = 18.52$  (df=7,  $P < 0.010$ ). De analyse van de 2 x 2 contingentie tabellen voor iedere categorie afzonderlijk toont aan dat de verzameling van de zeldzamere haplotypes ( $P < 0.025$ ) en haplotype 3 ( $P < 0.05$ ) verantwoordelijk zijn voor dit verschil. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat in de categorie van de zeldzame haplotypes de PKU specifieke haplotypes ondergebracht werden.





**TABEL 4.4. :** RFLP haplotypes van het PAH locus in normale en PKU allelen (N=98;M=98). De nummering van de haplotypes is volgens Woo, 1988. Haplotype X, S en Z zijn PKU specifiek.

| haplotype | normale allelen |      | mutante allelen |      |
|-----------|-----------------|------|-----------------|------|
|           | N               | %    | N               | %    |
| 1         | 29              | 29.6 | 21              | 21.4 |
| 2         | 6               | 6.1  | 6               | 6.1  |
| 3         | 3               | 3.1  | 10              | 10.2 |
| 4         | 21              | 21.4 | 26              | 26.5 |
| 5         | 12              | 12.4 | 7               | 7.1  |
| 6         | 2               | 2.0  | 3               | 3.1  |
| 7         | 10              | 10.2 | 4               | 4.1  |
| 9         | 0               | 0.0  | 6               | 6.1  |
| 11        | 3               | 3.0  | 1               | 1.0  |
| 12        | 8               | 8.2  | 2               | 2.0  |
| 27        | 0               | 0.0  | 3               | 3.1  |
| 32        | 2               | 2.0  | 0               | 0.0  |
| 34        | 0               | 0.0  | 3               | 3.1  |
| 36        | 1               | 1.0  | 0               | 0.0  |
| 38        | 0               | 0.0  | 1               | 1.0  |
| 39        | 1               | 1.0  | 0               | 0.0  |
| X         | 0               | 0.0  | 3               | 3.1  |
| S         | 0               | 0.0  | 1               | 1.0  |
| Z         | 0               | 0.0  | 1               | 1.0  |
| totaal    | 98              |      | 98              |      |

#### 4.3.3. Vergelijking van de Belgische haplotypes met deze van andere Europese populaties

Ter vergelijking van de Belgische haplotypes met deze van andere Europese landen worden 2 x n contingentie tabellen opgesteld met de haplotypes 1-7 en 'andere' als afzonderlijke categorieën (tabel 4.5 en 4.6). Indien de verwachte frekwentie van een haplotype in beide bestudeerde populaties kleiner is dan 5.0, wordt dit haplotype gekombineerd met de categorie van 'andere' haplotypes. Hieruit blijkt dat het patroon van de normale haplotypes in België niet significant verschilt van deze in andere Europese landen. Het patroon van de mutante haplotypes, daarentegen, verschilt wel significant tussen België en de andere Europese landen met uitzondering van Schotland. De studie van de 2 x 2 contingentie tabellen voor elke categorie afzon-



**TABEL 4.5. :** Haplotype-frekwenties bij normale chromosomen.

| haplotype | België |
|-----------|--------|
| 1         | 29     |
| 2         | 6      |
| 3         | 3      |
| 4         | 21     |
| 5         | 12     |
| 6         | 2      |
| 7         | 10     |
| andere    | 15     |
| totaal    | 98     |

| haplotype | populatie |     |    |    |     |    |    |    |    |
|-----------|-----------|-----|----|----|-----|----|----|----|----|
|           | DK        | SW  | SC | FR | FRG | PL | CH | IT | TR |
| 1         | 23        | 41  | 10 | 18 | 25  | 27 | 15 | 18 | 8  |
| 2         | 3         | 10  | 1  | 4  | 10  | 6  | 2  | 0  | 5  |
| 3         | 2         | 3   | 2  | 2  | 5   | 2  | 0  | 2  | 1  |
| 4         | 21        | 25  | 4  | 10 | 19  | 21 | 9  | 15 | 26 |
| 5         | 7         | 10  | 3  | 6  | 10  | 12 | 4  | 6  | 7  |
| 6         | 0         | 1   | 1  | 1  | 2   | 1  | 0  | 1  | 1  |
| 7         | 7         | 9   | 3  | 8  | 16  | 6  | 4  | 3  | 8  |
| andere    | 3         | 33  | 7  | 19 | 13  | 11 | 2  | 18 | 18 |
| totaal    | 66        | 132 | 31 | 68 | 100 | 86 | 36 | 63 | 64 |

|                  | België   |    |    |
|------------------|----------|----|----|
|                  | $\chi^2$ | df | P  |
| Zweden (SW)      | 3.77     | 5  | ns |
| Denemarken (DK)  | 6.05     | 4  | ns |
| Schotland (SC)   | 2.87     | 5  | ns |
| Zwitserland (CH) | 4.92     | 5  | ns |
| Turkije (TR)     | 10.75    | 5  | ns |
| Duitsland (FRG)  | 2.94     | 5  | ns |
| Polen (PL)       | 1.35     | 5  | ns |
| Italië (IT)      | 2.38     | 4  | ns |
| Frankrijk (FR)   | 3.90     | 5  | ns |



**TABEL 4.6. :** Haplotype-frekwenties bij PKU chromosomen.

| haplotype | België |
|-----------|--------|
| 1         | 21     |
| 2         | 6      |
| 3         | 10     |
| 4         | 26     |
| 5         | 7      |
| 6         | 3      |
| 7         | 4      |
| andere    | 21     |
| totaal    | 98     |

| haplotype | populatie |     |    |    |     |    |    |    |    |
|-----------|-----------|-----|----|----|-----|----|----|----|----|
|           | DK        | SW  | SC | FR | FRG | PL | CH | IT | TR |
| 1         | 12        | 20  | 10 | 20 | 25  | 10 | 19 | 27 | 18 |
| 2         | 13        | 31  | 3  | 6  | 24  | 53 | 4  | 4  | 1  |
| 3         | 25        | 19  | 6  | 7  | 13  | 2  | 2  | 2  | 1  |
| 4         | 9         | 37  | 2  | 12 | 25  | 11 | 7  | 6  | 15 |
| 5         | 0         | 9   | 1  | 0  | 2   | 4  | 0  | 3  | 2  |
| 6         | 2         | 2   | 0  | 2  | 2   | 4  | 2  | 12 | 25 |
| 7         | 1         | 5   | 0  | 3  | 3   | 1  | 0  | 0  | 0  |
| andere    | 4         | 13  | 11 | 40 | 6   | 1  | 5  | 14 | 2  |
| totaal    | 66        | 136 | 33 | 51 | 100 | 86 | 38 | 68 | 64 |

| België           |          |    |        |         |
|------------------|----------|----|--------|---------|
|                  | $\chi^2$ | df | P      | oorzaak |
| Zweden (SW)      | 18.38    | 6  | <0.005 | >2      |
| Denemarken (DK)  | 33.41    | 4  | <0.001 | <2 >3   |
| Schotland (SC)   | 8.14     | 5  | ns     |         |
| Zwitserland (CH) | 12.32    | 4  | <0.025 | >1      |
| Turkije (TR)     | 44.85    | 5  | <0.001 | >6 <3   |
| Duitsland (FRG)  | 21.62    | 4  | <0.001 | >2      |
| Polen (PL)       | 67.32    | 5  | <0.001 | >2 <3   |
| Italië (IT)      | 24.47    | 6  | <0.001 | >6 <4   |
| Frankrijk (FR)   | 20.77    | 4  | <0.001 | >1 <4   |



derlijk wijst de oorzaak van dit verschil in iedere populatie aan. Hieruit blijkt dat in landen juist ten noorden van België haplotype 3 frekwenter voorkomt, terwijl ten oosten en in mindere mate ten noorden van België haplotype 2 domineert. In Zuid-Europa, daarentegen, komt haplotype 6 relatief frekwenter voor dan in België.

#### **4.3.4. Informativiteit van de RFLP haplotypes in heterozygoten en prenatale diagnostiek**

Indien binnen één familie geen rekombinatie optreedt tussen de haplotypes, kunnen deze gebruikt worden voor prenatale diagnostiek en de bepaling van het PKU dragerschap bij 'gezonde' familieleden van de PKU patiënt. Vermits de 8 verschillende PAH RFLP's binnen het structurele locus gelegen zijn en dit locus daarenboven relatief klein is ( $10^5$  nukleotiden ; 1 cM, de afstand met 1% rekombinatie per generatie, is ongeveer  $10^6$  nukleotiden lang), is de kans op rekombinatie inderdaad gering. Rekombinanten werden tot nu toe dan ook niet teruggevonden in deze studie.

Voor de 43 volledige families (vader, moeder, PKU kind) in deze studie werd de theoretische mogelijkheid voor prenatale diagnostiek en de bepaling van het PKU dragerschap berekend. Zo kon de heterozygositeit bepaald worden voor alle 'gezonde' broers en zussen van de PKU patiënt in 34 families en voor één derde van deze verwanten in 9 families d.i. 86% van de gezonde verwanten, wat hoger is dan de in de praktijk geobserveerde 71%. Onder de 28 broers en zussen van de PKU patiënten werden 13 PKU dragers en 7 normale homozygoten gevonden. In 8 gevallen was de RFLP haplotypering niet informatief voor dit doeleinde. Prenatale diagnostiek is theoretisch mogelijk voor alle foetussen in 34 families en in 50% van de foetussen in nog eens 9 families d.i. 89.5% van de foetussen. Ondanks deze grote informativiteit van de RFLP haplotypes heeft slechts één familie een aanvraag voor prenatale diagnostiek ingediend.





#### 4.3.5. Overzicht van de RFLP haplotypes van de PKU patiënten (M=200)

Tabel 4.7. geeft een overzicht van de RFLP haplotypes van de 200 onderzochte mutante allelen. De uitbreiding van M=98 naar M=200 levert geen opmerkelijke wijzigingen in de frekwenties van de mutante haplotypes in de Belgische bevolking ( $X^2=3.04, df=8, P>0.25$ ).

**TABEL 4.7. :** RFLP haplotypes van het PAH locus in PKU allelen (M=200)

| haplotype | mutante allelen |      |
|-----------|-----------------|------|
|           | N               | %    |
| 1         | 51              | 25.5 |
| 2         | 13              | 6.5  |
| 3         | 24              | 12.0 |
| 4         | 45              | 22.5 |
| 5         | 9               | 4.5  |
| 6         | 10              | 5.0  |
| 7         | 10              | 5.0  |
| 9         | 13              | 6.5  |
| 10        | 1               | 0.5  |
| 11        | 2               | 1.0  |
| 12        | 2               | 1.0  |
| 27        | 4               | 2.0  |
| 34        | 5               | 2.5  |
| 36        | 1               | 0.5  |
| 38        | 1               | 0.5  |
| X         | 5               | 2.5  |
| S         | 3               | 1.5  |
| Z         | 1               | 0.5  |
| totaal    | 200             |      |

#### 4.4. Besluit

In het PAH locus kunnen 8 verschillende RFLP's gedetekteerd worden. De combinatie van deze RFLP's tot één enkel allel is een haplotype. In België kan fenyketonurie niet geassocieerd worden met één bepaalde RFLP, zelfs



niet met één haplotype. Toch kunnen deze haplotypes, dankzij hun grote informativiteit, gebruikt worden voor de detektie van PKU dragers en prenatale diagnostiek. Daarenboven geven de haplotype-frekwenties ons enig inzicht over het ontstaan van PKU. De verdeling van de normale haplotypes is quasi identiek in heel Europa. De haplotypes 1 en 4, gevolgd door de haplotypes 5 en 7, komen het meest voor in alle onderzochte populaties, terwijl de haplotypes 2, 3 en 6 eerder zeldzaam zijn. Dit patroon suggereert dat de haplotypes 1 en 4 evolutief de oudste zijn, waaruit alle andere haplotypes ten gevolge van mutaties en rekombinaties ontstonden. De verdeling van de mutante haplotypes verschilt echter sterk naargelang de onderzochte populatie. Daarenboven valt op dat in verschillende delen van Europa verschillende mutante haplotypes domineren. Hierdoor wordt verondersteld dat PKU veroorzaakt wordt door meerdere mutaties, die elk in één ethnische groep op een welbepaald haplotype ontstaan zijn en van daaruit verspreid werden over de rest van Europa. Zo zou PKU met het haplotype 2 een Balto-Slavische oorsprong hebben en vervolgens in westelijke en oostelijke richting over Europa verspreid zijn (Kalaydjieva e.a., 1991b). In het noord-westen van het continent, meer bepaald Denemarken, zou fenyketonurie veroorzaakt zijn door een mutatie in het PAH locus met haplotype 3, dat van daaruit verspreid werd over de naburige landen. Naar analogie zou in het Middellandse Zeegebied PKU ontstaan zijn door een mutatie in het PAH locus met een haplotype 6. Vermits België in de loop der tijden vele migratiestromingen gekend heeft, is een heterogeniteit aan haplotypes waar te nemen. Hierbij mag echter niet uit het oog verloren worden dat éénzelfde haplotype verschillende mutaties kan dragen of dat 'hotspots' voor mutaties in het PAH locus kunnen voorkomen. Beide verklaringen kunnen immers deze hypothese weerleggen. Enkel een studie van de PKU mutaties kan bewijsmateriaal opleveren voor deze hypothese.



## DEEL II : MUTATIES IN HET PAH GEN

### 4.5. Opsporing van gekende mutaties in het PAH gen

Bij de opsporing van zowel bekende als nieuwe PKU mutaties zal steeds gebruik gemaakt worden van de polymerase kettingreactie voor het oppikken van PAH exons uit het genomische DNA van patiënten en hun familieleden. In tabel 4.8. wordt een overzicht gegeven van de primers, die voor de amplificatie van de PAH exons gebruikt worden.

**TABEL 4.8. :** Overzicht van de gebruikte oligonukleotiden voor de amplificatie van verschillende exons in het PAH locus en de grootte van de PCR-fragmenten (bp).

| exon  | 5'primer              | 3'primer                  | bp  |
|-------|-----------------------|---------------------------|-----|
| 1     | AACCTGCCTGTACGTGAGGC  | CCAAAGTCAGAGAGTTTCCT      | 113 |
| 3     | GTTAGGTTTTTCCTGTTCTGG | CTTATGTTGCAAAATTCCTC      | 300 |
| 5     | TCATGGCTTTAGAGCCCCCA  | TCATGCTGGTATTTTCATCC      | 260 |
| 7     | CTCCTAGTGCCTCTGACTCA  | ACCAGCCAGCAAATGAACCC      | 291 |
| 9     | TCCCCCAATTACAGGAAATT  | GGGACTTACTGTGCGGAGCTT     | 57  |
| 10    | TGCAGCAGGGAATACTGATC  | TAGACATTGGAGTCCACTCTC     | 295 |
| 12    | ATGCCACTGAGAACTCTCTT  | AGTCTTCGATTACTGAGAAA      | 134 |
| 12+13 | interne primer        | TGCAAAGCATATATGAAGCTTGAAT |     |

#### 4.5.1. Mutaties in de herkenningsplaats van een restrictie-enzyme

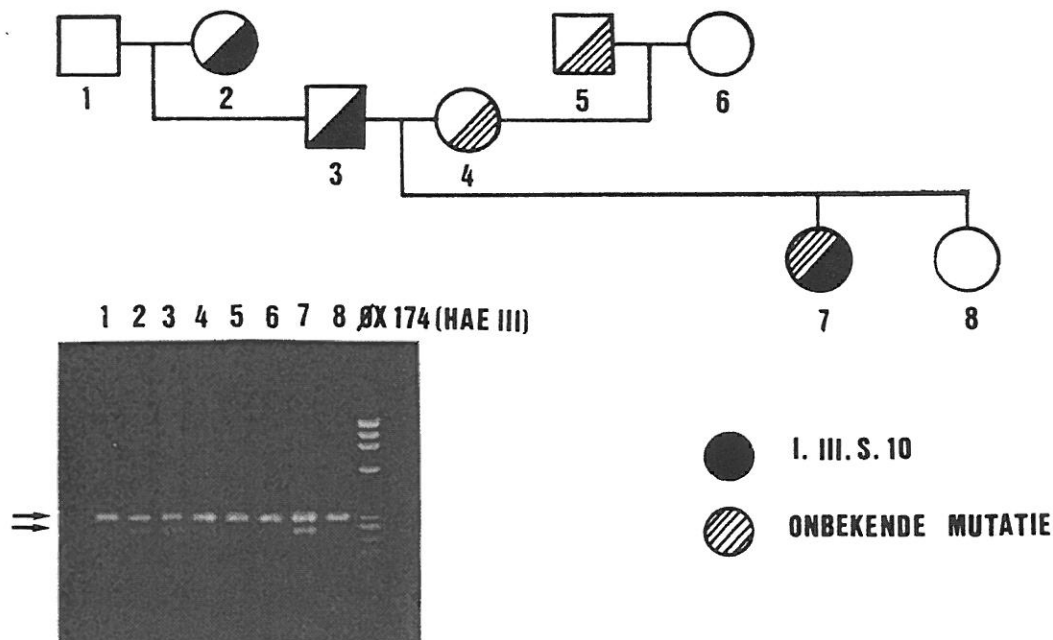
Sommige mutaties, die de oorzaak van PKU zijn, treffen een herkenningssekwentie van restrictie-enzymen, die in de haplotypering gebruikt wor-



den (§ 4.1.2.). Zij kunnen dan ook via dezelfde techniek gedetecteerd worden. Het is echter eenvoudiger en sneller om ze op te sporen via PCR van het PAH exon, waarin de mutatie zich voorgedaan heeft, gevolgd door digestie met het betreffende enzyme. Op dezelfde wijze kunnen mutaties, die sekwenties van andere restrictie-enzymen treffen, opgespoord worden. Een overzicht van deze mutaties wordt gegeven in tabel 4.9. en enkele resultaten worden getoond in figuur 4.5.

**TABEL 4.9.** : Overzicht van de mutaties, die leiden tot het ontstaan (+) of het verdwijnen (-) van een knipplaats voor een bepaald restrictie-enzyme en de grootte van de resulterende fragmenten (bp) na digestie van normaal (N) en mutant (M) DNA met dit restrictie-enzyme.

| mutatie  | exon | restrictie-enzyme | N         | M        |
|----------|------|-------------------|-----------|----------|
| V245V    | 7    | + <i>AluI</i>     | 230       | 200 + 30 |
| R252W    | 7    | - <i>AvaI</i>     | 183 + 108 | 291      |
| R261Q    | 7    | - <i>HinfI</i>    | 155 + 136 | 291      |
| G272X    | 7    | - <i>BamHI</i>    | 169 + 122 | 291      |
| III.S.10 | 10   | + <i>DdeI</i>     | 295       | 246 + 49 |



**Figuur 4.5.** : Screening voor de mutatie in intron 10 (I.III.S.10) in een familie met PKU. ( $\phi$ X174(HaeIII) = 1353bp, 1078bp, 872bp, 603bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp, 118bp, 72bp)



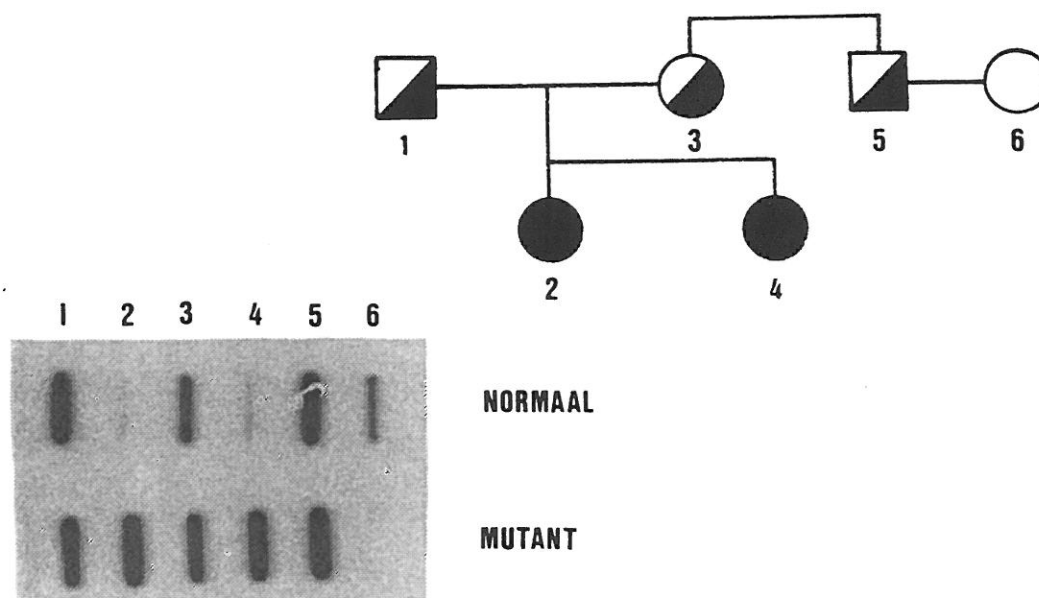


#### 4.5.2. Hybridisatie met allel-specifieke oligonukleotiden

Mutaties kunnen opgespoord worden via een dot-blot hybridisatie van het 'verdachte' PAH exon met enerzijds een normaal oligonukleotide en anderzijds een oligonukleotide, dat de mutatie bevat. Als voorbeeld wordt een dot-blot hybridisatie getoond in figuur 4.6 met allel-specifieke oligonukleotiden voor de mutatie in intron 12 (DiLella e.a., 1987). Een overzicht van de gebruikte mutante en normale oligonukleotiden wordt gegeven in tabel 4.10.

**TABEL 4.10.** : Overzicht van de gebruikte allel-specifieke oligonukleotiden, die gebruikt worden voor de opsporing van specifieke puntmutaties in PAH gen van PKU patiënten

| mutatie | normaal              | mutant               |
|---------|----------------------|----------------------|
| I065T   | CTGACCCACATTGAATCTAG | CTGACCCACACTGAATCTAG |
| R158Q   | GTGCAAGACGGAAGCAGTTT | GTGCAAGACAGAAGCAGTTT |
| R243X   | GGTTTCCGCCTCCGACCGT  | GGTTTCCGCCTCTGACCTGT |
| E280K   | TATACCCCCGAACCGTGAGT | TATACCCCCAAACCGTGAGT |
| R408W   | ACAATACCTCGGCCCTTCT  | ACAATACCTTGGCCCTTCT  |
| Y414C   | GTTCGCTACGACCCATACAC | GTTCGCTGCGACCCATACAC |
| IVS12   | CCATTAACAGTAAGTAAT   | CCATTAACAATAAGTAAT   |



**Figuur 4.6.** : Screening voor de mutatie in intron 12 van het PAH locus in een familie met PKU

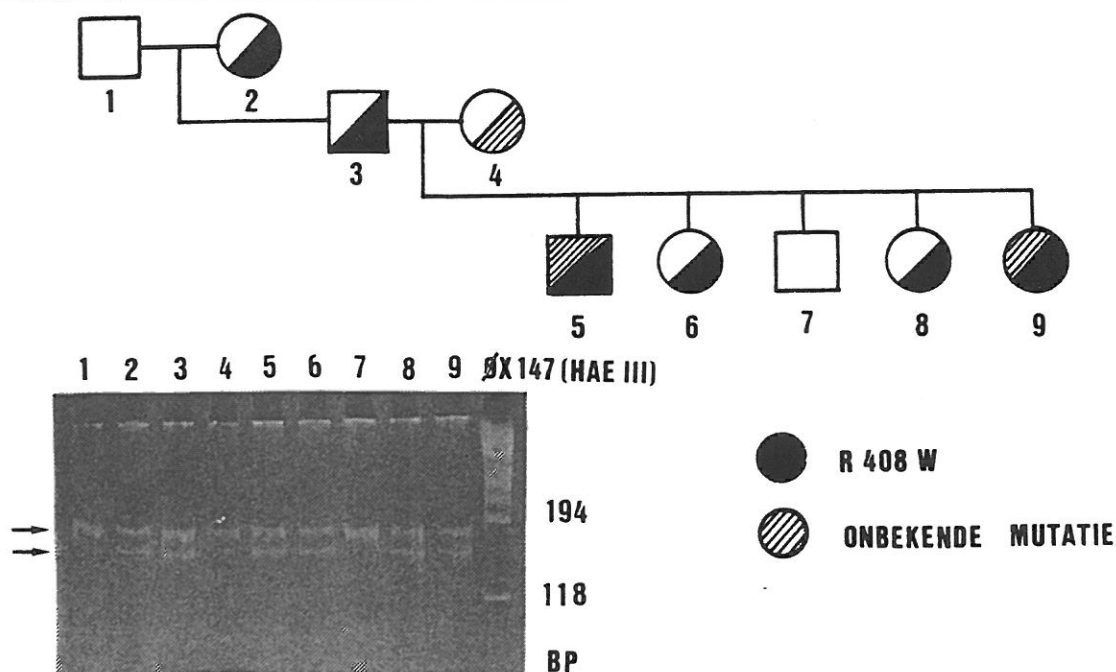


### 4.5.3. Mismatching PCR

In de 'mismatching' PCR (Seibel e.a., 1990) is één van beide primers zodanig gekozen dat zijn 3'-uiteinde juist één nukleotide naast de PKU veroorzakende mutatie gelegen is. Dit uiteinde is daarenboven zo gemanipuleerd dat, indien de mutatie aanwezig is, een restrictieplaats via PCR gecreëerd wordt. Een overzicht van de gebruikte oligonukleotiden wordt gegeven in tabel 4.11 en een voorbeeld wordt getoond in figuur 4.7.

**TABEL 4.11.** : Overzicht van de 'mispurende' oligonukleotiden, die gebruikt worden voor de opsporing van specifieke puntmutaties in PAH gen van PKU patiënten

| mutatie | ontstane restrictieplaats | oligonukleotide                |
|---------|---------------------------|--------------------------------|
| I065T   | <i>Pst</i> I              | TCTTTCTTTAAACGAGAAGGTCTAGCTGCA |
| R158Q   | <i>Bgl</i> II             | TAGTTGTAGGCAATGTCAGCAACTAGATC  |
| P281L   | <i>Bgl</i> II             | AGCCCATGTATACCCAGATC           |
| R408W   | <i>Bcl</i> I              | GATCATTCTCAGTTCGCTACGACCCATACA |
| Y414C   | <i>Pvu</i> II             | CCACAATACCTCGGCCCTTCTCAGTCAGCT |

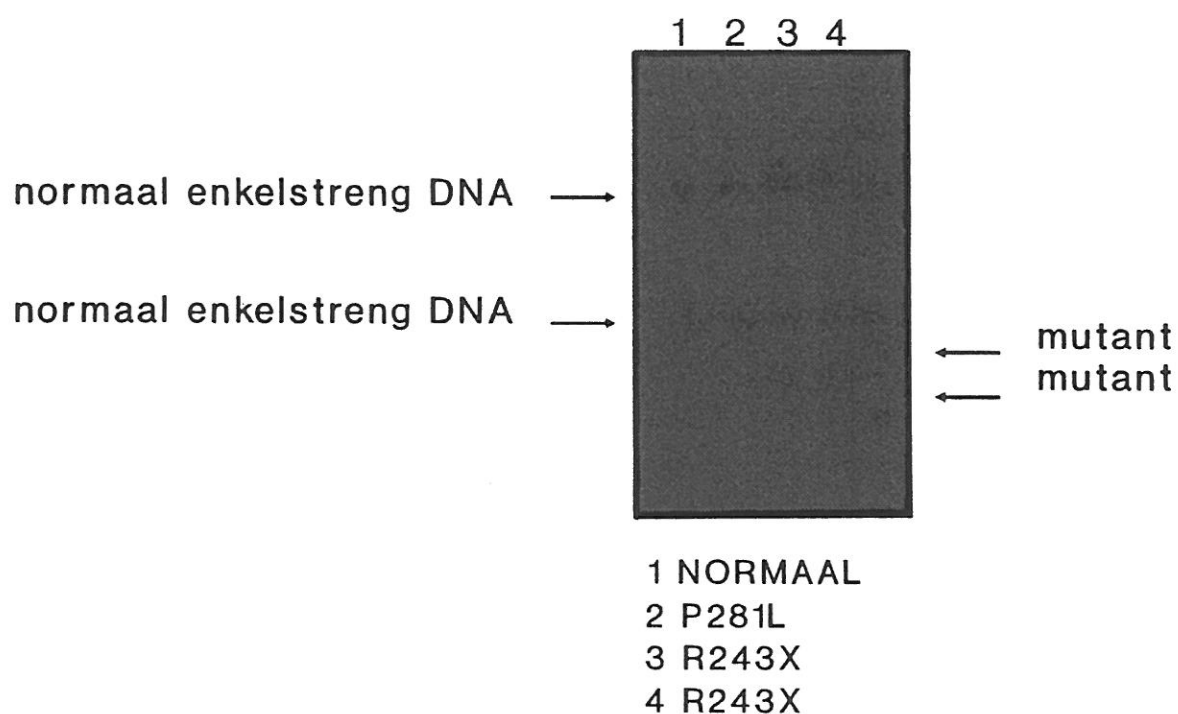


**Figuur 4.7.** : Screening voor de mutatie in codon 408 van het PAH locus in een familie met PKU



#### 4.6. Beschrijving van mutaties, die leiden tot PKU

Een eerste screening voor PKU mutaties is de opsporing van afwijkende exons via 'Single Strand Conformation Polymorphisms' analyse (§ 3.6 & figuur 4.8). Deze exons worden vervolgens in sekwentie gebracht na klonering in een M13-vektor of met behulp van magnetische korrels.



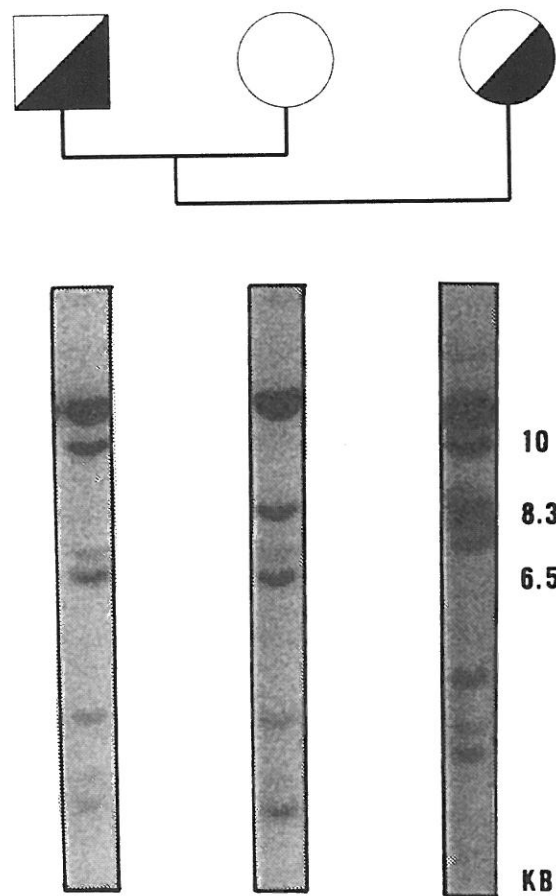
**Figuur 4.8. :** SSCP analyse van het PAH exon 7 van patiënten met fenyketonurie

##### 4.6.1. Mutaties in codon 272 en codon 273

Tijdens de analyse van de RFLP haplotypes in het PAH locus werd in 4 families een afwijkend 10 kb DNA-fragment gevonden bij de digestie van het DNA met *Bam*HI/*Eco*RI (figuur 4.9). Daarenboven segregeerde dit afwijkende fragment in al deze families met het ziekte locus en was het steeds geassocieerd met haplotype 7. Digestie van het DNA met enkel *Eco*RI wijzigde het



RFLP patroon echter niet (11 kb en 17 kb). Hierdoor groeide het vermoeden dat een mutatie de *Bam*HI-knipplaats van exon 7 aantastte. En inderdaad, bij normale individuen werd, na amplificatie van dit exon, gevolgd door digestie met *Bam*HI, het 291 bp fragment geknipt in twee fragmenten met een lengte van 169 bp en 122 bp, terwijl in de patiënten met abnormaal RFLP patroon het fragment niet geknipt kon worden. Via sekwentie van dit exon 7 werden vervolgens twee mutaties gekarakteriseerd nl een G-->T transversie in de eerste base van codon 272, wat resulteert in de substitutie van een glycine door een stopcodon (figuur 4.10) en een C-->T transitie in de tweede base van codon 273, wat leidt tot de substitutie van serine door fenylalanine (Melle e.a., 1991).



**Figuur 4.9. :** RFLP haplotypering van het PAH locus in een PKU familie met een mutatie in codon 272 (G272X). Deze mutatie vernietigt de *Bam*HI-knipplaats van exon 7, wat resulteert in een band van 10 kb.





#### 4.6.2. Mutatie in codon 245

Via sekwentie-analyse van exon 7 werd een G-->A transitie van de derde base van codon 245 gevonden (figuur 4.10.). Deze mutatie leidt echter niet tot een substitutie van een base (valine-->valine). Een snelle screening van deze mutatie was mogelijk, daar ze een *A*/*ul*-restrikțieplaats in exon 7 creëert. Deze mutatie werd steeds aangetroffen op haplotype 4, normaal én mutant, en nooit op een ander haplotype. Uit deze resultaten blijkt dat het waarschijnlijk gaat om een stille mutatie, die de PAH activiteit niet aantast, en die in de toekomst gebruikt kan worden als genetische merker in de detektie van PKU dragerschap.

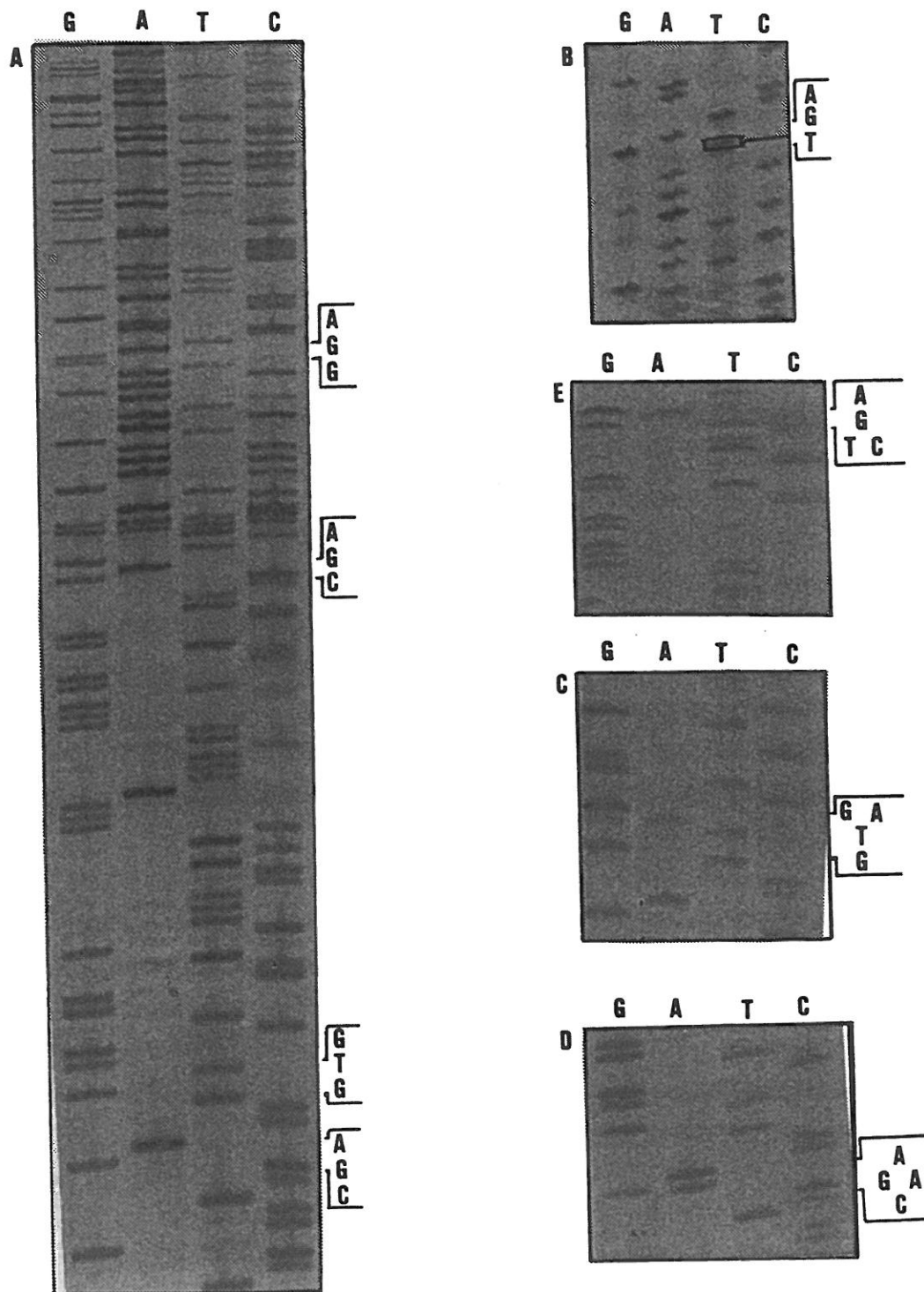
#### 4.6.3. Mutatie in codon 243

Via de sekwentie-analyse van het exon 7 van een PKU patiënt met haplotype-kombinatie 3/7 én een mutatie in intron 12 op het allel met haplotype 3 werd een transitie (G-->A) van de tweede base van codon 243 gevonden (figuur 4.10). Deze mutatie, die leidt tot de substitutie van een arginine door een glutamine, werd reeds eerder gedetekteerd in haplotype 4 allelen in de Chinese bevolking (Wang e.a., 1991). Het is echter voor het eerst dat deze mutatie ook aangetroffen wordt in Europa, zij het dan op een allel met haplotype 7.

#### 4.6.4. Mutatie in codon 261

Screening voor gendefekten in exon 7 van PKU patiënten met nog onbekende mutaties leidde tot de detektie van een C-->T transitie van de eerste base van codon 261, wat resulteert in de substitutie van een arginine door een stopcodon (figuur 4.10). Deze mutatie werd teruggevonden bij de PKU patiënten van 2 verschillende Belgische families, telkens op een allel met haplotype 4.





**Figuur 4.10 :** Sekwentie-analyse van exon 7. A=normaal exon, B=G272X, C=V245V, D=R243Q, E=R261X



#### 4.7. Mutatie 'hotspots'

Van de 35 beschreven oorzaken van PKU zijn er slechts 4 te wijten aan deleties. Alle overige mutaties zijn base-substituties, die zowel in exons als intron-exon grenzen van het PAH gen kunnen voorkomen. Daarenboven liggen ze verspreid over het gen, met weliswaar een klustering in exon 7.

Een onderzoek naar het effect van de naastliggende base op de substitutie (tabel 4.12) toonde aan dat de CpG duplex hypermuteerbaar is ( $X^2=185.40$ ,  $df=15$ ,  $P<0.001$ ). Dit is echter niet zo verrassend, vermits bij hogere vertebraten ongeveer de helft van de cytosines in het genoom gemethyleerd zijn, vooral wanneer zij deel uitmaken van een 5'CpG3' duplex. De accidentele deaminatie van deze 5-methylcytosines leidt tot de transitie van cytosine door thymine. Deze fout kan niet meer herkend worden in de DNA herstellingsprocedure en leidt aldus tot irreversibele puntmutaties (Cooper en Youssoufian, 1988). 91% van de PKU mutaties in CpG dinukleotiden zijn dan ook C $\rightarrow$ T of G $\rightarrow$ A transities (tabel 4.13). Na eliminatie van de duplexen, betrokken bij deze methylatie-gemedieerde deaminatie, is geen significant verschil in de muteerbaarheid van de andere dinukleotiden in het PAH locus waar te nemen. Ook op het niveau van de mononukleotiden gebeuren de basesubstituties, buiten de CpG dinukleotiden, random verspreid over de 4 basen, met een voorkeur voor de vorming van transities (G $\rightarrow$ A, C $\rightarrow$ T) t.o.v. transversies (G $\rightarrow$ C, C $\rightarrow$ G).

Hoewel 29% van de mutaties in het PAH gen consistent zijn met de theorie van de methylatie-gemedieerde deaminatie van 5-methylcytosine in de CpG duplex, is het spectrum van de overige puntmutaties willekeurig, zowel op het niveau van de mononukleotiden als van de dinukleotiden. De kans is dan ook klein dat één van deze mutaties verschillende malen in het PAH gen zal ontstaan.

#### 4.8. Mutaties in de Belgische bevolking

Een screening van 200 mutante chromosomen (99 families) naar 17 verschillende mutaties werd uitgevoerd. In 37 patiënten konden beide



**TABEL 4.12 :** Frekwentie van PKU mutaties in de dinukleotiden van het PAH locus (**tabel A**) mét de dinukleotiden, betrokken bij de methylatie-gemedieerde deaminatie en (**tabel B**) zonder de dinukleotiden, betrokken bij de methylatie-gemedieerde deaminatie

| dinukleotiden |       | tabel A          |      |          | tabel B      |      |          |
|---------------|-------|------------------|------|----------|--------------|------|----------|
| symbool       | f     | O                | E    | $\chi^2$ | O            | E    | $\chi^2$ |
| TT            | 0.097 | 5                | 6.01 | 0.17     | 5            | 4.07 | 0.21     |
| CT            | 0.071 | 5                | 4.40 | 0.08     | 5            | 2.98 | 1.37     |
| AT            | 0.081 | 3                | 5.02 | 0.81     | 3            | 3.40 | 0.05     |
| GT            | 0.049 | 4                | 3.04 | 0.30     | 3            | 2.06 | 0.43     |
| TC            | 0.057 | 4                | 3.53 | 0.06     | 2            | 2.39 | 0.06     |
| CC            | 0.047 | 5                | 2.91 | 1.50     | 3            | 1.97 | 0.54     |
| AC            | 0.054 | 3                | 3.35 | 0.04     | 2            | 2.27 | 0.03     |
| GC            | 0.043 | 3                | 2.67 | 0.04     | 3            | 1.81 | 0.78     |
| TA            | 0.067 | 3                | 4.15 | 0.32     | 3            | 2.81 | 0.01     |
| CA            | 0.074 | 1                | 4.59 | 2.81     | 1            | 3.11 | 1.43     |
| AA            | 0.097 | 1                | 6.01 | 4.18     | 1            | 4.07 | 2.32     |
| GA            | 0.061 | 4                | 3.78 | 0.01     | 1            | 2.56 | 0.95     |
| TG            | 0.074 | 5                | 4.59 | 0.04     | 5            | 3.11 | 1.15     |
| CG            | 0.010 | 11               | 0.62 | 173.78   | 1            | 0.42 | 0.80     |
| AG            | 0.070 | 2                | 4.34 | 1.26     | 2            | 2.94 | 0.30     |
| GG            | 0.050 | 3                | 3.10 | 0.00     | 2            | 2.10 | 0.00     |
|               | 1.000 | 62               | 62   | 185.40   | 42           | 42   | 10.43    |
|               |       | df=15 P<0.001    |      |          | df=15 P>0.25 |      |          |
|               |       | -CG df=14 P>0.25 |      |          |              |      |          |

f = frekwentie van de dinukleotiden in het menselijke genoom, volgens Setlow, 1976 ; O = geobserveerd aantal mutaties ; E = verwacht aantal mutaties ;  $\chi^2$  = 'Chi-square' analyse

**TABEL 4.13 :** Aantal puntmutaties (N) in CpG duplexen (a) en in de overige doubletten (b) van het PAH locus, die aanleiding geven tot PKU

| a | G | A | T | C |    | b | G | A | T | C |    |
|---|---|---|---|---|----|---|---|---|---|---|----|
| C | 0 | 0 | 5 | - | 5  | G | - | 3 | 1 | 0 | 4  |
| G | - | 5 | 0 | 1 | 6  | A | 4 | - | 0 | 0 | 4  |
|   |   |   |   |   |    | T | 2 | 0 | - | 4 | 6  |
|   | 0 | 5 | 5 | 1 | 11 | C | 1 | 1 | 4 | - | 6  |
|   |   |   |   |   |    |   | 7 | 4 | 5 | 4 | 20 |





mutante allelen geïdentificeerd worden en in een andere groep van 49 patiënten was de identifikatie van slechts één van beide allelen mogelijk. In totaal kon, rekening houdende met verwantschappen, de mutatie van 57.5% (115/200) van de PKU allelen gekarakteriseerd worden.

#### **4.8.1. Frekwentie van de PKU mutaties in de Belgische bevolking**

Tot op heden werden in het PAH locus 35 verschillende mutaties gekarakteriseerd, die leiden tot fenyلكetonurie. Van de 15 'Europese' mutaties werden er 14 in België gekarakteriseerd. Daarenboven werd de mutatie R243Q, die eerder in het haplotype 4 van Aziaten gekarakteriseerd werd, gevonden in een Belgische patiënt met een mutant haplotype 7. Slechts 7 hiervan komen frekwent (45.5%) voor, met als uitschieter de mutatie in intron 12 van het PAH gen (tabel 4.14). Zelfs na verwijdering van de mutante allelen, afkomstig van het Middellandse Zee-gebied en Midden-Europa, blijven deze mutaties domineren. Enkel een daling van de mutatie in codon 281, die vooral aanwezig is in het mutante haplotype 1 van Turkse patiënten, en de mutatie in codon 408, die hoofdzakelijk voorkomt in het haplotype 2 van Poolse patiënten, is waar te nemen.

Tenslotte is het interessant op te merken dat slechts 7.9% (8/101) van alle patiënten homozygoot is voor een welbepaalde mutatie, wat de enorme heterogeniteit binnen de Belgische bevolking nogmaals benadrukt.

#### **4.8.2. Korrelatie tussen mutaties en RFLP haplotypes**

In fenyلكetonurie zijn mutaties geassocieerd met bepaalde RFLP haplotypes, wat bevestigd wordt in deze studie. Een overzicht wordt gegeven in figuur 4.11. Opmerkelijk is dat de meeste haplotypes een associatie vertonen met meer dan één mutatie. Vooral de evolutief oude haplotypes 1 en 4 dragen een variëteit van mutaties (resp. ten minste 3 en 6). Anderzijds zijn de meeste mutaties preferentieel, doch niet exclusief, verbonden met een speci-



**TABEL 4.14 :** Frekwenties van de mutaties in het PAH locus bij alle onderzochte allelen in België (A) en na verwijdering van deze, afkomstig van Midden-Europa en het Middellands Zee gebied (B).

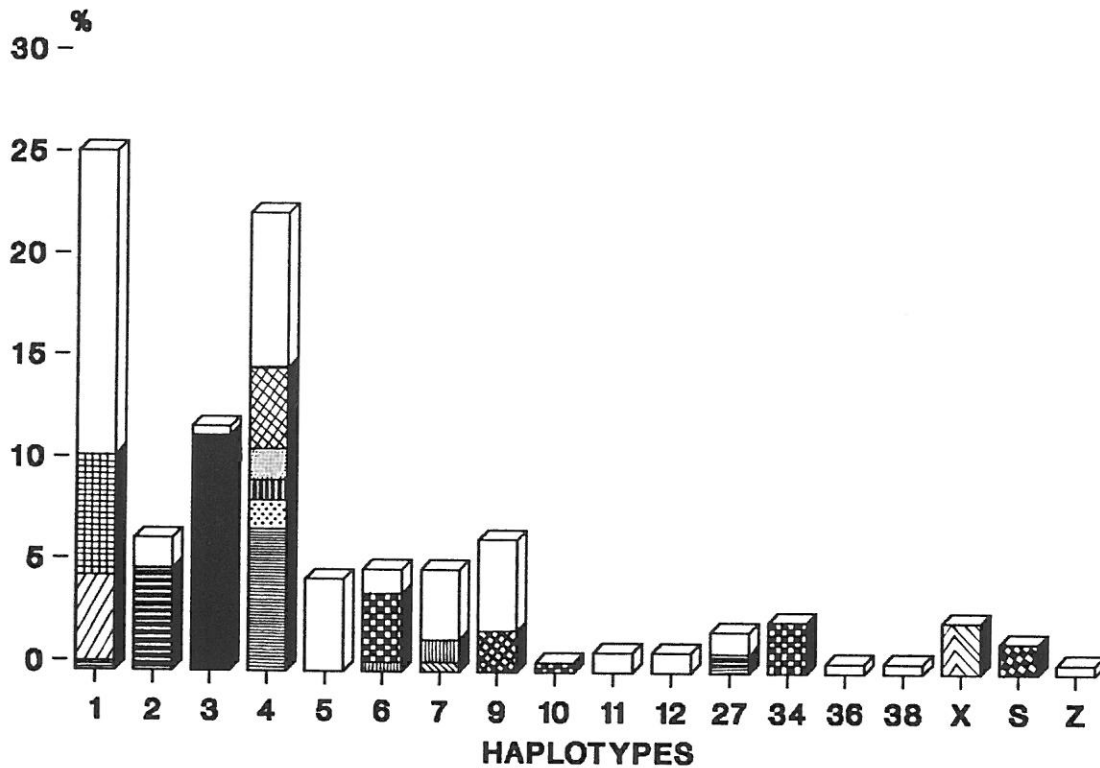
|              | tabel A        | tabel B        |
|--------------|----------------|----------------|
| mutant allel | frekwentie (%) | frekwentie (%) |
| I065T        | 2.0            | 2.0            |
| R158Q        | 8.0            | 6.5            |
| R243Q        | 0.5            | 0.5            |
| R243X        | 1.5            | 1.0            |
| R252W        | 1.5            | 1.0            |
| R261Q        | 4.0            | 4.0            |
| R261X        | 1.0            | 0.5            |
| R272X        | 1.5            | 1.5            |
| R273P        | 0.0            | 0.0            |
| E280K        | 0.0            | 0.0            |
| P281L        | 6.0            | 3.5            |
| IVS7         | 1.5            | 0.5            |
| L311P        | 2.5            | 2.5            |
| IIIS10       | 6.5            | 6.0            |
| R408W        | 5.5            | 3.5            |
| Y414C        | 4.0            | 4.0            |
| IVS12        | 11.5           | 11.5           |

fiek haplotype. In België is vooral de mutatie in codon 408 met haplotype 2 en de intron 12-mutatie met haplotype 3 geassocieerd. In dit laatste geval is de enige uitzondering hierop het haplotype 3 van een Italiaanse PKU patiënt. Dit is echter niet zo verrassend, vermits in Italië deze associatie niet voorkomt. Tenslotte kan éénzelfde mutatie geassocieerd zijn met verschillende haplotypes. Dit geldt vooral voor de mutatie in intron 10, die voorkomt op de haplotypes 6, 10 en 34. Deze haplotypes verschillen echter slechts in één of enkele naast elkaar liggende RFLP's. Het vermoeden is dan ook groot dat de mutatie zich voorgedaan heeft op één enkel haplotype, waaruit de andere haplotypes later, ten gevolge van mutatie of rekombinatie, evolueerden.

#### 4.8.3. Distributie van de mutaties over België

Uit studies is reeds gebleken dat een sterke genetische variatie binnen éénzelfde populatie eerder het gevolg is van linguïstieke en fysische barrières dan wel van geografische afstand (Barbujani en Sokal, 1991). Toch werd, als





**Figuur 4.11 :** Associatie tussen RFLP haplotypes in het PAH locus en specifieke PKU mutaties. Legend:  $\blacksquare$ : I065T ;  $\blacksquare$ : R158Q ;  $\blacksquare$ : R243X ;  $\blacksquare$ : R243Q ;  $\blacksquare$ : R252W ;  $\blacksquare$ : R261Q ;  $\blacksquare$ : R261X ;  $\blacksquare$ : G272X ;  $\blacksquare$ : P281L ;  $\blacksquare$ : IVS7 ;  $\blacksquare$ : L311P ;  $\blacksquare$ : IVS12 ;  $\blacksquare$ : R408W ;  $\blacksquare$ : Y414C ;  $\blacksquare$ : IIIIS10

gevolg van de taalgrens in België, geen significant verschil gevonden in de frekwenties van PKU mutaties en RFLP haplotypes ( $\chi^2=5.81, df=7, P>0.25$ ) tussen Wallonië en Vlaanderen. Ook de Maas is geen genetische barrière ( $\chi^2=8.58, df=6, P>0.25$ ). Daarentegen is er wel een significant verschil op te merken tussen de haplotypes van het oosten en van het westen van België ( $\chi^2=12.13, df=5, P<0.05$ ). Een statistische studie van de haplotypes toonde aan dat vooral haplotype 2 ( $P<0.10$ ) en haplotype 3 ( $P<0.025$ ) hiervoor verantwoordelijk zijn. Zo is de mutatie in codon 408, afkomstig van Oost-Europa, sterker vertegenwoordigd in het oosten van België, in tegenstelling tot de mutatie in intron 12, die vooral aanwezig is bij PKU patiënten van West-België.

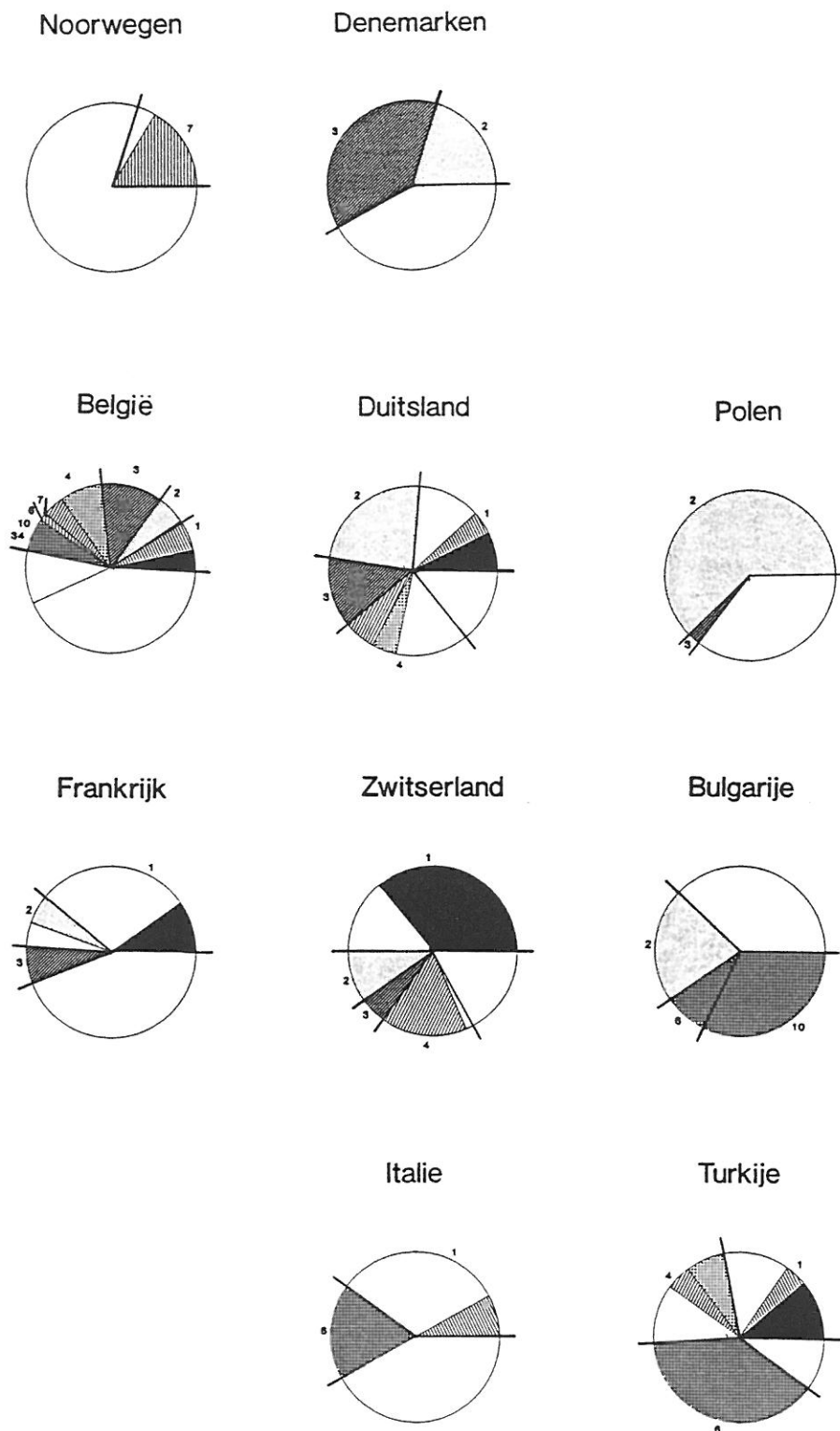


#### 4.8.4. Vergelijking van de Belgische PKU mutaties met deze van andere Europese landen

Ter vergelijking van de Belgische PKU mutaties met deze in andere Europese landen werden de meest frekwente mutaties en haplotypes in alle onderzochte populaties in kaart gebracht (figuur 4.12). Deze gegevens bevestigen de associatie tussen RFLP haplotypes en mutaties, doch de frequentie van deze mutaties verschilt sterk naargelang de onderzochte populatie. Zo wordt in Czechoslovakije 68% van de mutante allelen gekarakteriseerd door de mutatie in codon 408. De frequentie van deze mutatie, evenals zijn associatie met haplotype 2, daalt vervolgens in zuidelijke en westelijke richting (Kalaydjieva e.a., 1991b). Het is in deze laatste richting dat geleidelijk de mutatie in intron 12 de overhand neemt, om in Denemarken 38% van de mutante allelen uit te maken (DiLella e.a., 1986b). Het is dan ook niet verwonderlijk dat in België deze beide mutaties verantwoordelijk zijn voor PKU in 17% van de allelen. In Zwitserland domineert de mutatie in codon 261, geassocieerd met haplotype 1, onmiddellijk gevolgd door de mutatie in codon 158, die voorkomt op het haplotype 4. Ook de minder goed beschreven mutatie in codon 414, eveneens in het haplotype 4, werd in deze populatie gekarakteriseerd. Deze 3 mutaties representeren in België 16.0% van de mutante allelen. In het Middellandse Zeegebied, waar de haplotypes 2 en 3 eerder zeldzaam zijn, wordt PKU veroorzaakt door de haplotypes 1 en 6 met respectievelijk mutaties in codon 281 (10% in Italië) en intron 10 (39% in Turkije). Het is daarbij interessant op te merken dat in Bulgarije deze mutatie tevens voorkomt op het relatief frequent voorkomende haplotype 10. In België, waar beide mutaties 12.5% van de mutante allelen uitmaken, is de intron 10-mutatie daarenboven nog geassocieerd met haplotype 34, naast de eerder beschreven associaties met haplotype 6 en 10. Tenslotte wordt in Scandinavië hoofdzakelijk haplotype 7 met de mutatie in codon 272 onder 16.5% van de mutante allelen aangetroffen (Apold e.a., 1990). Ook deze mutatie komt in België in 2.5% van de allelen voor.







**Figuur 4.12 :** Vergelijking van de Belgische PKU mutaties met deze in andere Europese landen. R261Q : ■; P281L : ▨; R408W : ▩; IVS12 : ▤; R158Q : ▦; Y414C : ▧; G272X : ▨; IIIIS10 : ▩.



#### 4.9. Besluit

Fenylketonurie wordt veroorzaakt door mutaties in het PAH locus. Tot op heden werden er 35 gekarakteriseerd. Hoewel 9 van deze mutaties in de hypermuteerbare CpG dinukleotiden voorkomen, kan gezegd worden dat het merendeel van de mutaties willekeurig in het PAH locus ontstonden. Ze liggen dan ook verspreid over dit locus, met weliswaar een klustering in exon 7. Dit is echter niet zo verrassend, daar dit exon 6 van het totaal van 34 CpG dinukleotiden bevat. Daarenboven is dit het meest gekonserveerde gebied binnen de aromatische aminozuur hydroxylasen (Grenett e.a., 1987). Anderzijds bestaat er een associatie tussen mutaties en RFLP haplotypes in alle onderzochte populaties. Beide waarnemingen ondersteunen de hypothese dat PKU veroorzaakt werd door verschillende mutaties, die elk binnen één ethnische groep op een welbepaald haplotype ontstaan zijn en vervolgens samen met dit haplotype over Europa verspreid werden. Zo komen, in Noord-Europa, de mutaties in codon 408 en intron 12 in 60% van de mutante allelen voor. In populaties ten noorden van de Alpen draagt ongeveer 50% van de mutante allelen mutaties in codon 261, 158 en 414. In het Middellandse Zeegebied, daarentegen, overheerst de intron 10-mutatie in ongeveer 35% van de mutante allelen en de mutatie in codon 281, die in 10% van alle Italiaanse allelen voorkomt. Het is dan ook niet verwonderlijk dat in België, ten gevolge van zijn ligging in Europa, de Noord-Europese en Midden-Europese mutaties in resp. 17% en 16% van de mutante allelen voorkomen. Daarenboven werden, waarschijnlijk ten gevolge van migraties vanuit het Zuiden, Midditerraanse mutaties aangevoerd, die heden 12.5% van de mutante allelen in België uitmaken. Tenslotte werden in België nog 8 minder frekwent voorkomende mutaties gekarakteriseerd, waarvan één gekarakteriseerd werd in de Chinese bevolking, wat de heterogeniteit van fenylketonurie in België benadrukt.



## DEEL III : RELATIE FENOTYPE-GENOTYPE

Fenylalanine hydroxylase houdt de concentratie aan fenylalanine in het plasma konstant via de oxidatie van dit aminozuur tot tyrosine. Patiënten met fenyلكetonurie kunnen, ten gevolge van het enzymatische defect, dit fenylalanine gehalte niet meer op peil houden. De neonatale screening voor hyperfenylalaninemie bracht hierin echter een variëteit aan fenotypes aan het licht. Anderzijds vertonen ook dragers van het PKU gen een verminderde capaciteit om fenylalanine om te zetten tot tyrosine. Hoewel zij fenotypisch en klinisch identiek zijn aan normale homozygoten, vertonen zij slechts 14 tot 40% van de normale activiteit (Lehmann, 1989). In dit hoofdstuk zal getracht worden de verschillende fenotypes kwantitatief te omschrijven en te korreleren met de in de patiënt of de drager voorkomende PKU mutatie om aldus het effect van een mutatie op de activiteit van het enzyme te verklaren.

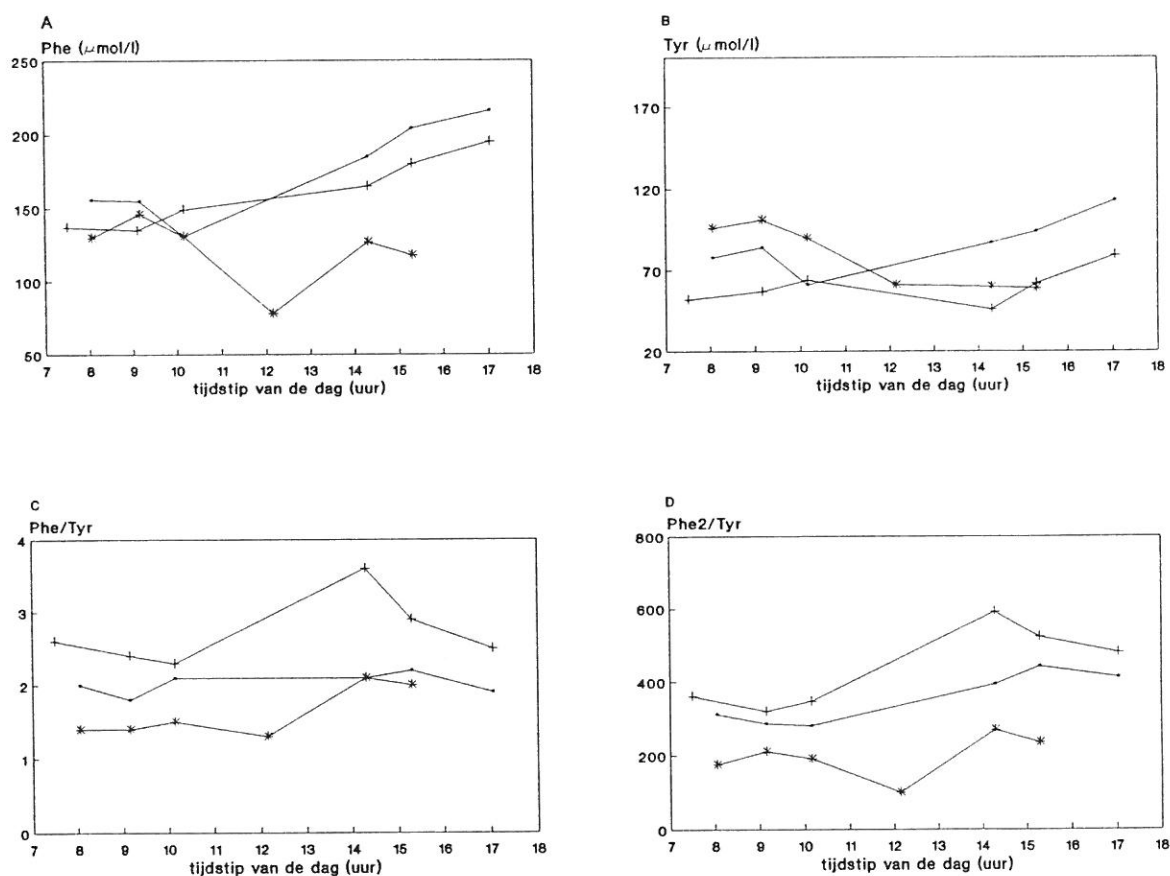
### 4.10. Heterozygote dragers van PKU

Van 174 niet-vastende verwanten van PKU patiënten werden de fenylalanine (Phe) en tyrosine (Tyr) concentraties ( $\mu\text{mol/l}$ ) in het serum gemeten met behulp van een  $\alpha+$  aminozuur analysator (LKB, Bromma, Zweden). Via de RFLP haplotypering werden 140 dragers van het PKU gen gekarakteriseerd, waarvan bij 76 onder hen de PKU mutatie geïdentificeerd werd. De overige 34 verwanten dragen geen van de haplotypes of mutaties van de PKU patiënt in hun familie en vormen de controlegroep.



#### 4.10.1. Effect van het dieet op de plasma fenylalanine en tyrosine concentratie.

Vermits enkel niet-vastende individuen onderzocht konden worden in deze studie, werd allereerst het effect van het dieet op de Phe en Tyr concentraties, evenals op de verhoudingen Phe/Tyr en  $\text{Phe}^2/\text{Tyr}$ , bestudeerd. Hiervoor werden op verschillende tijdstippen van de dag vingerprikken op guthrie-kaarten van 2 heterozygote PKU dragers en 1 normale homozygoot, die allen gelijke maaltijden op gelijke tijdstippen ontvingen, verzameld. De metingen van de aminozuren in deze bloedvlekken toonden aan dat alle variabelen sterk schommelen gedurende de dag met uitzondering van de verhouding Phe/Tyr (figuur 4.13).



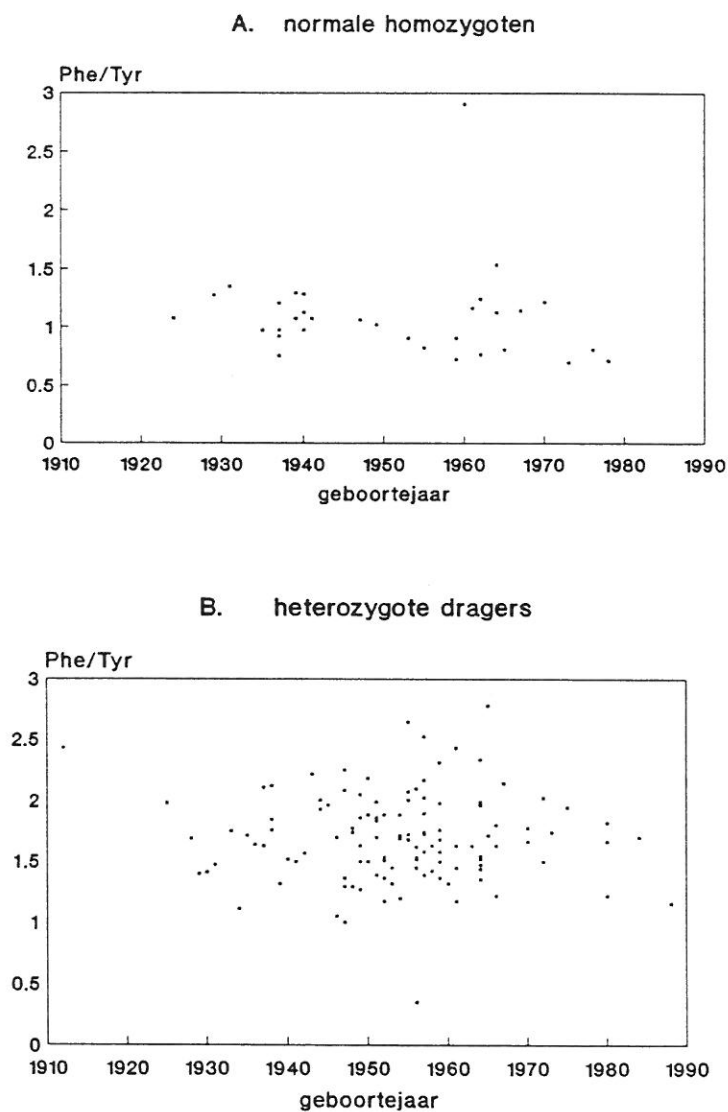
**Figuur 4.13. :** Variatie van de fenylalanine (Phe) concentratie (A), de tyrosine (Tyr) concentratie (B), de verhoudingen Phe/Tyr (C) en  $\text{Phe}^2/\text{Tyr}$  (D) gedurende één dag bij 2 heterozygote dragers van het PKU gen (+) en 1 normale homozygoot (\*).





#### 4.10.2. Variatie van de fenylalanine en tyrosine concentraties met de leeftijd

Vermits deze studie individuen van alle leeftijdsklassen omvat, werd tevens de variatie van de verhouding Phe/Tyr als gevolg van de leeftijd bestudeerd bij 120 heterozygote dragers van het PKU gen en 30 normale homozygoten, doch geen enkele korrelatie kon gevonden worden tussen deze parameters (figuur 4.14).



**Figuur 4.14 :** Variatie van de verhouding Phe/Tyr als gevolg van de leeftijd bij heterozygote dragers van het PKU gen (A) en bij normale homozygoten (B).



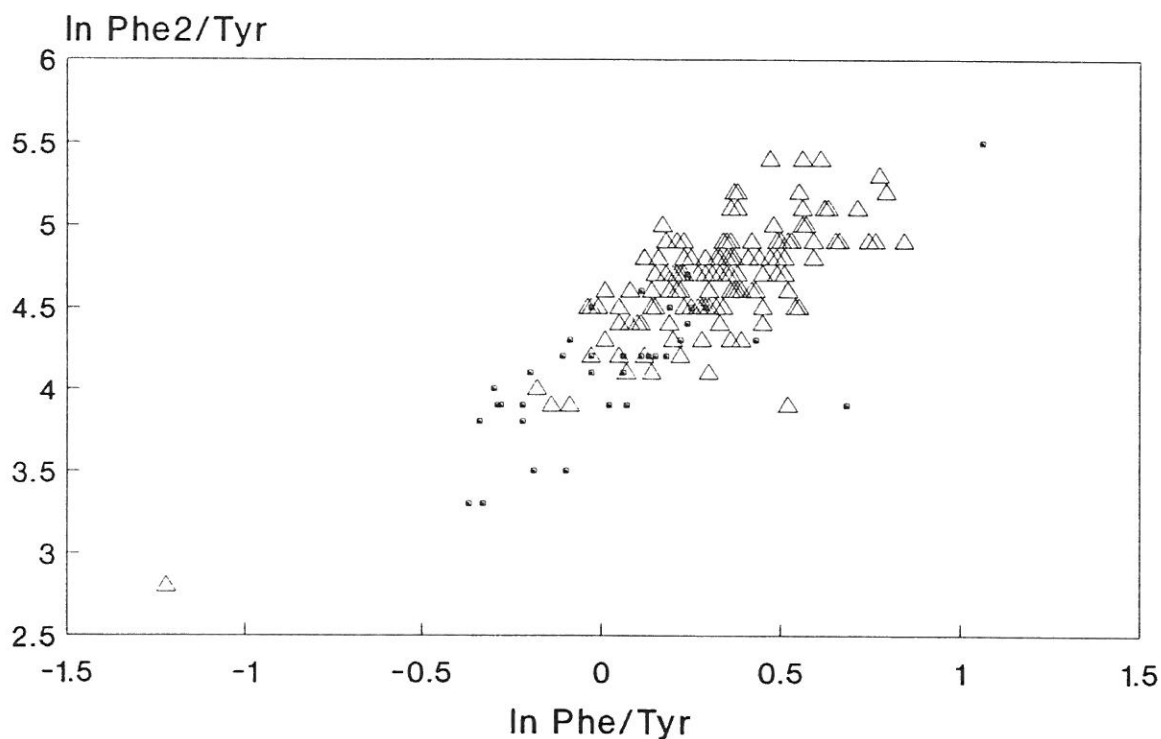
#### 4.10.3. Fenylalanine en tyrosine concentraties in plasma van niet-vastende dragers en niet-dragers van het PKU gen.

Berekening van de gemiddelde concentraties aan fenylalanine (Phe) en tyrosine (Tyr), evenals het gemiddelde van de verhoudingen Phe/Tyr en  $\text{Phe}^2/\text{Tyr}$ , wijzen op een significant verschil tussen de dragers van het PKU gen en de normale homozygoten voor alle variabelen, uitgezonderd de tyrosine concentraties (tabel 4.15). Wanneer echter  $\text{Phe}^2/\text{Tyr}$  gekorreleerd wordt met Phe/Tyr is een opmerkelijk overlap tussen de heterozygoten en de controlegroep waar te nemen (figuur 4.15), zelfs na transformatie van de waarden naar hun logaritmen, wat nodig is om de normaliteit van de distributie te verhogen. Vermits het hier gaat om een complexe biochemische transformatie, is één verklaring niet voldoende voor dit overlapsgebied. Zo zou enerzijds een normale Phe/Tyr verhouding bij heterozygoten kunnen wijzen op een belangrijke residuele activiteit van het mutant enzyme. Anderzijds kan een verhoogde verhouding bij normale homozygoten te wijten zijn aan andere factoren, zoals bijvoorbeeld medikatie, of kan deze slechts van tijdelijke aard zijn. Daarenboven moet benadrukt worden dat nog steeds een risico bestaat dat een derde PKU gen, dat niet in de PKU patiënt gevonden werd, kan circuleren in dezelfde familie. Dit zou betekenen dat de controle individuen met sterk verhoogde Phe/Tyr verhoudingen inderdaad dragers van het PKU gen zijn.

**TABEL 4.15 :** Gemiddelden, Standaard Deviaties (SD) en variantie-analysen (anova) voor Phe, Tyr, Phe/Tyr and  $\text{Phe}^2/\text{Tyr}$  bij heterozygote dragers van het PKU gen en normale homozygoten.

| genotype                     | n   | Phe<br>$\mu\text{mol/l}$ | Tyr<br>$\mu\text{mol/l}$ | Phe/Tyr      | $\text{Phe}^2/\text{Tyr}$ |
|------------------------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------|---------------------------|
| kontrole<br>SD<br>range      | 34  | 62.29<br>14.69<br>38-93  | 61.21<br>17.79<br>30-96  | 1.08<br>0.38 | 68.92<br>38.24            |
| heterozygoten<br>SD<br>range | 140 | 80.06<br>18.73<br>32-138 | 59.81<br>20.38<br>19-187 | 1.41<br>0.30 | 112.89<br>36.29           |
| anova                        |     | <0.001                   | >0.700                   | <0.001       | <0.001                    |





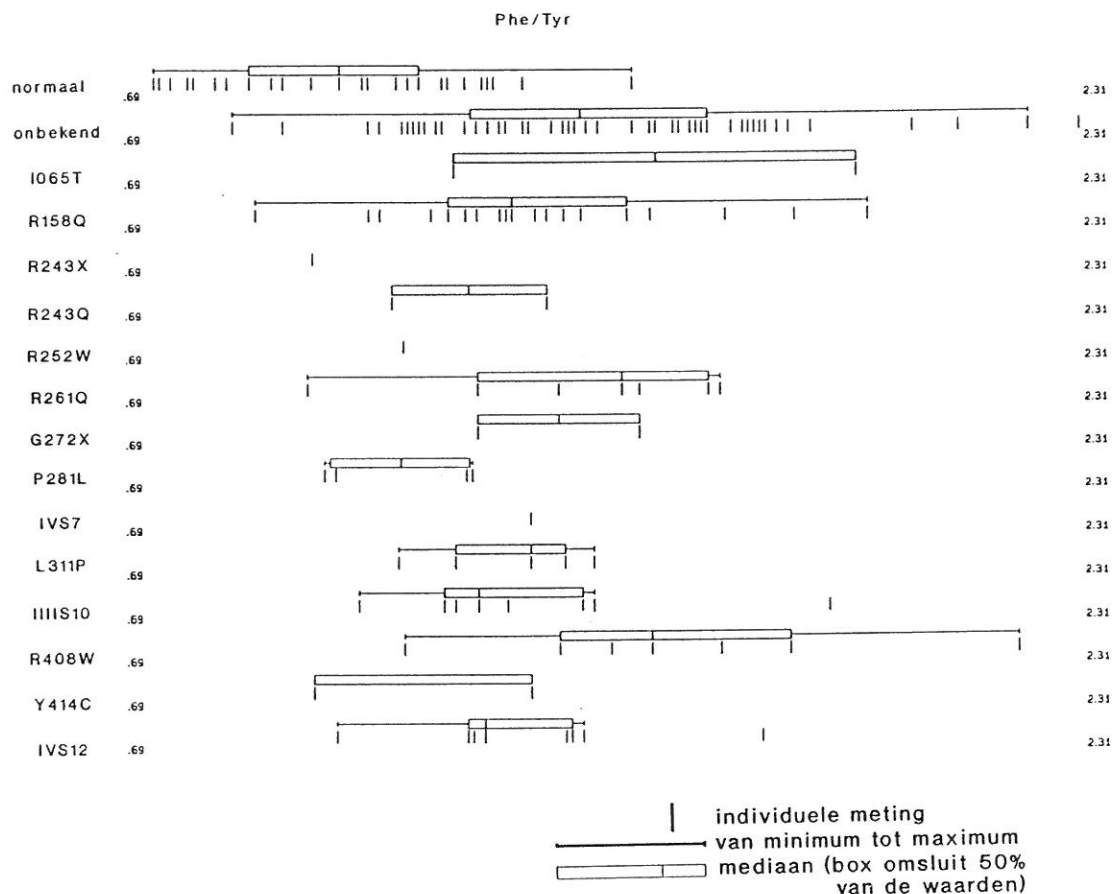
**Figuur 4.15 :** Korrelatie van  $\ln \text{Phe}/\text{Tyr}$  en  $\ln \text{Phe}^2/\text{Tyr}$ . ■ = niet-vastende normale homozygoot ; △ = niet-vastende heterozygote PKU drager.

#### 4.10.4. Fenylalanine en tyrosine concentratie in plasma van niet-vastende dragers van het PKU gen met verschillende genotype.

In een heterozygoot zal de ernstigheid van de mutatie gereflekteerd worden in de residuele activiteit van het fenylalanine hydroxylase. Daarom werden de Phe/Tyr verhoudingen bij groepen van heterozygoten met verschillende mutaties vergeleken (tabel 4.16), doch geen enkel van de verschillen bleek significant te zijn.



**TABEL 4.16 :** *Analyse van verschillende groepen heterozygote dragers van het PKU gen met verschillende mutaties.*



#### 4.11. Patiënten met PKU.

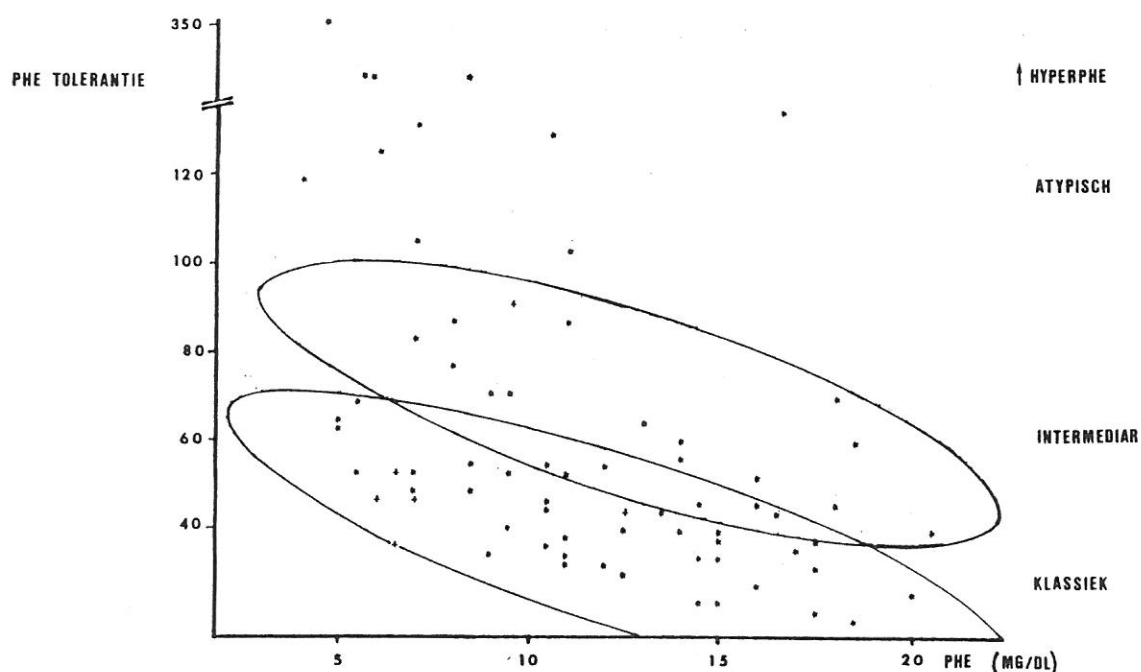
Neonatale screening voor hyperfenylalaninemie leidde tot de ontdekking van een breed spectrum aan fenotypes. In de praktijk wordt het fenotype van een patiënt voorspeld via de correlatie van de serum fenylalanine concentratie (mg/dl) met de dagelijkse fenylalanine-inname (mg/dag). Beide waarden zijn beschikbaar voor 72 patiënten, die momenteel klinisch gevolgd worden op het Dr.L.Willems-Instituut. Onder deze patiënten werden vervolgens 3 leeftijdsklassen onderscheiden, namelijk < 4 jaar (periode voor het instellen van het dieet), tussen 4 en 12 jaar en > 12 jaar (puberteit). Tenslotte is van 45 patiënten de serum fenylalanine-concentratie bij diagnose, gemeten tussen 5 en 40 dagen na de geboorte, gekend.





#### 4.11.1. Plasma fenylalanine concentraties en dagelijkse fenylalanine inname bij verschillende PKU fenotypes

Voor iedere patiënt werd de fenylalanine tolerantie index, zijnde de gemiddelde Phe inname over 3 opeenvolgende levensjaren gedeeld door de gemiddelde Phe concentratie voor dezelfde periode, berekend. Na bespreking met de behandelende geneesheer bleek deze index inderdaad een duidelijk weerspiegeling van het fenotype van de patiënt te zijn. Via correlatie van de plasma Phe concentratie met de Phe tolerantie index kunnen 3 fenotypische groepen in de tweede en derde leeftijdsklasse onderscheiden worden, namelijk hyperfenylalaninemie, atypische PKU en klassieke PKU. Tussen beide laatste groepen zou daarenboven nog een intermediaire vorm gedetekteerd kunnen worden (figuur 4.16). In de leeftijdsklasse < 4 jaar is dit onderscheid moeilijk te maken, wat waarschijnlijk te wijten is aan de enorme fluktuaties in Phe concentraties en innames ten einde de instelling van een optimaal dieet voor de patiënt te bereiken.



**Figuur 4.16 :** Korrelatie van de plasma Phe concentratie met de Phe tolerantie index bij PKU patiënten ouder dan 4 jaar. De fenotypes voor klassieke PKU en intermediaire PKU worden weergegeven door de 95% konfidentielimieten.



#### 4.11.2. Verband tussen het genotype en de enzymatische activiteit van PAH bij de patiënt

Uitgaande van de biochemische data van 9 mutante enzymen (Okano e.a., 1991a), werd voor iedere patiënt de voorspelde PAH activiteit berekend als het gemiddelde van de relatieve PAH activiteiten van elk mutant enzyme in een expressie-analyse, welke uitgedrukt worden als een percentage van de normale activiteit (tabel 4.17). Vervolgens werden deze waarden gekorreleerd met de fenylalanine tolerantie voor 16 patiënten waarvan de mutaties op beide chromosomen geïdentificeerd werden (figuur 4.17A) en voor 29 patiënten met slechts één gekarakteriseerde mutatie (figuur 4.17B). In dit laatste geval wordt aangenomen dat de PAH activiteit van het onbekende allel ergens tussen 0% en 50% gelegen is. En, hoewel patiënten met een lage Phe tolerantie index ook vaak een lage PAH activiteit vertonen, werd geen correlatie tussen beide parameters gevonden. Hierbij dient opgemerkt te worden dat, in tegenstelling met eerdere studies (Okano e.a., 1991a), gebruik gemaakt werd van een variabele index als een schatting voor de fenylalanine tolerantie van de

**TABEL 4.17 :** De voorspelde PAH activiteit (= % van de normale activiteit), volgens de mutante PAH allelen van de PKU patiënt.

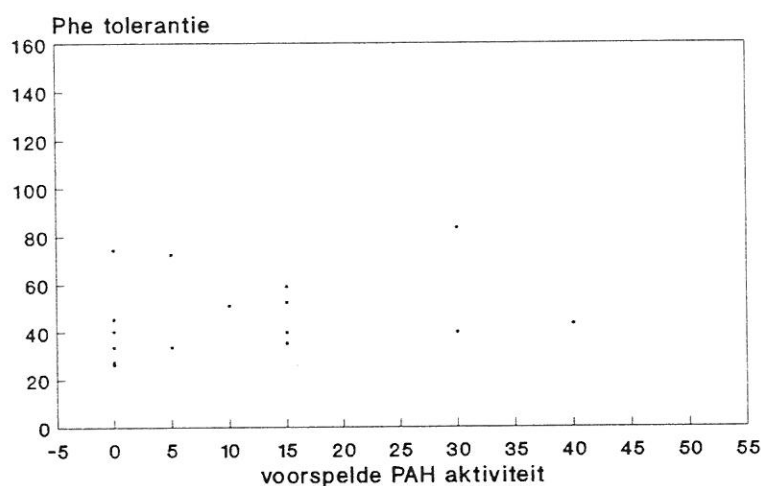
| mutant<br>allel                            | R243X<br>P281L<br>R408W<br>IIIS10<br>IVS12 | E280K | R158Q | R261Q | Y414C |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| mutant<br>allel                            |                                            |       |       |       |       |
| R243X<br>P281L<br>R408W<br>IIIS10<br>IVS12 | 0                                          | 1.5   | 5.0   | 15.0  | 25.0  |
| E280K                                      | -                                          | 3.0   | 6.5   | 16.5  | 26.5  |
| R158Q                                      | -                                          | -     | 10.0  | 20.0  | 30.0  |
| R261Q                                      | -                                          | -     | -     | 30.0  | 40.0  |
| Y414C                                      | -                                          | -     | -     | -     | 50.0  |



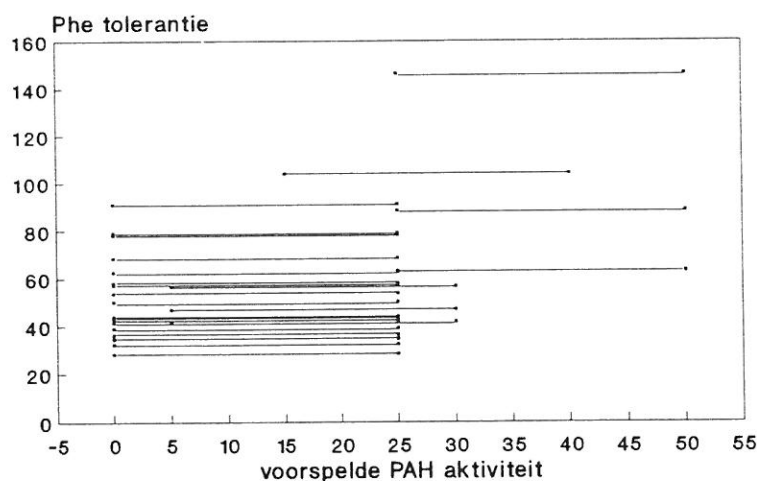
patiënt. Deze index benadrukt de moeilijkheid voor het handhaven van een konstante fenylalanine concentratie in dieet-behandelde patiënten.

Anderzijds werd getracht de voorspelde PAH activiteit van 11 patiënten met 2 gekarakteriseerde mutaties en 17 patiënten met slechts één geïdentificeerde mutatie te korreleren met de serum fenylalanine concentratie bij

#### A. 2 geïdentificeerde allelen



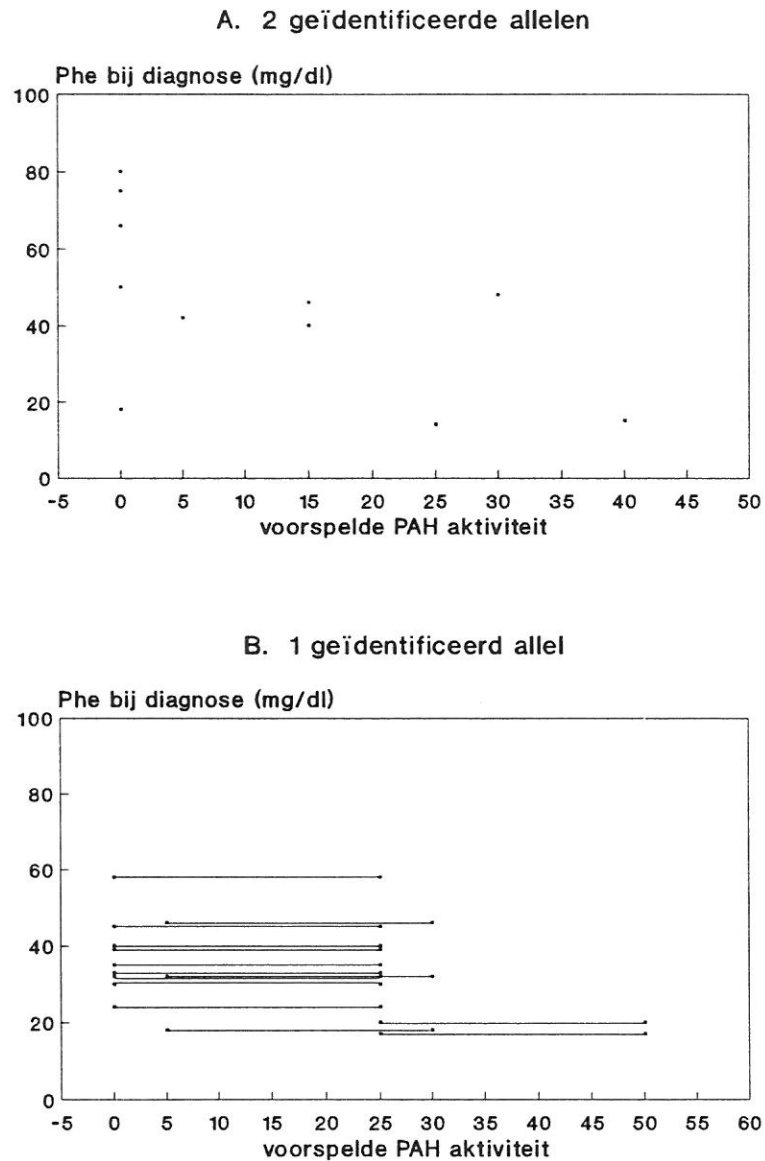
#### B. 1 geïdentificeerd allel



**Figuur 4.17 :** De geschatte Phe tolerantie in relatie tot de voorspelde PAH activiteit in PKU patiënten met twee gekarakteriseerde allelen (A) en met slechts één gekende mutatie (B), waarbij de residuele activiteit van het ongekende mutante enzyme tussen 0% (←) en 50% (→) gelegen is



diagnose (figuur 4.18). Ook in dit geval bestaat een tendens waarbij hoge fenylalanine concentraties bij diagnose samengaan met een lage PAH activiteit van het mutante enzyme, doch geen correlatie tussen deze beide parameters kan gevonden worden.



**Figuur 4.18 :** De Phe concentratie bij diagnose in relatie tot de voorspelde PAH activiteit in PKU patiënten met twee gekarakteriseerde allelen (A) en met slechts één gekende mutatie (B), waarbij de residuele activiteit van het ongekende mutante enzyme tussen 0% (←) en 50% (→) gelegen is.





#### 4.12. Besluit

Vermits PAH fenylalanine omzet tot tyrosine, werden de plasma concentraties van deze aminozuren gebruikt voor de omschrijving van het fenotype van heterozygote dragers van het PKU gen. En, hoewel zij biochemisch en klinisch identiek zijn aan normale homozygoten, vertonen zij een verminderde transformatie capaciteit. Dit uit zich in een significant verschil van de Phe/Tyr verhouding tussen de normale homozygoten en de heterozygoten. Toch is een belangrijke overlap van deze verhouding tussen beide groepen waar te nemen. Daarom is het aangeraden deze techniek uiterst voorzichtig aan te wenden voor de detektie van heterozygoten. Daarenboven leverde de studie van groepen heterozygoten met verschillend genotype geen enkel significant verschil op. Binnen één groep PKU dragers is immers een variëteit aan Phe/Tyr verhoudingen waar te nemen. Metingen van de concentraties van deze aminozuren in het plasma geven aldus geen enkel idee over het onderliggende genotype van het individu.

Drie parameters (de dagelijkse fenylalanine inname, de plasma fenylalanine concentratie en de fenylalanine concentratie bij diagnose), die klinisch aangehouden worden voor de bepaling van het fenotype van de PKU patiënt, werden bekeken in functie van het genotype. Anderzijds werd, uitgaande van de mutaties in het PAH locus van de patiënt, de residuele PAH activiteit geschat. Toch werd nooit een correlatie gevonden tussen één van de variabelen en de voorspelde PAH activiteit. Hieruit kan besloten worden dat fenylketonurie inderdaad veroorzaakt wordt door moleculaire defekten, maar dat andere, nog onbekende, factoren het fenotype van de patiënt beïnvloeden. Om deze reden zal de voorspelling van het klinische en biochemische fenotype op basis van het genotype zeer voorzichtig moeten gebeuren in patiënten met fenylketonurie.



## **HOOFDSTUK 5 : BESPREKING VAN DE BEKOMEN RESULTATEN**

### **5.1. Gebruikte technologie**

Naast de bepaling van RFLP haplotypes van PKU patiënten en hun familieleden, was een snelle screening van reeds beschreven mutaties, evenals een snelle opsporing van nieuwe mutaties, in het PAH locus vereist. Via de PCR-reaktie werd het mogelijk gemaakt een selektieve amplificatie van het DNA fragment, waarin de mutatie zich voorgedaan had, uit te voeren. Steunende op de basistechnieken van de rekombinant-DNA technologie was de opsporing van de gekende mutatie in dit geamplificeerde fragment met behulp van allel-specifieke oligonukleotiden dan ook voor de hand liggend. Doch deze techniek leidde tot een groot aantal vals positieven. Gelukkig veranderden sommige mutaties de herkenningssекwentie van restriktie-enzymen, wat een snelle en goedkope screening mogelijk maakte. Daarom werd gedacht aan het creeëren van nieuwe restriktie-plaatsen om mutaties op te sporen, die niet in dergelijke sekwenties voorkomen. Dit leidde tot de introductie van de 'misparende' PCR, maar deze techniek is niet zonder nadelen. Zo is, als gevolg van de manipulatie van het 3' uiteinde van het oligonukleotide, de PCR-reaktie vaak zwak of aspecifiek. Voor iedere mutatie moet aldus een goede selektie van het gebruikte 'misparende' oligonukleotide gebeuren.

De PCR-reaktie elimineerde ook de konstruktie van een genomische bank van iedere patiënt voor de opsporing van onbekende mutaties in het PAH locus. Verschillende exonen werden na amplificatie onmiddellijk gekloneerd in de M13-vektor voor sekwentie-analyse. Maar, de 'blunt end' klonering van PCR-fragmenten bleek weinig efficiënt te zijn. Direkte se-



kwentie van het geamplificeerde exon zou dan wel sneller zijn, maar praktisch moeilijk uitvoerbaar. Dankzij de koppeling van biotine aan één van de PCR-primers kon het PCR-fragment met behulp van streptavidine, gebonden aan magnetische korrels, opgezuiverd worden en onmiddellijk, met succes, in sekwentie gebracht worden.

Vermits het hier gaat om algemene technieken, kan de know-how, die tijdens deze studie opgebouwd werd, ook zeer efficiënt toegepast worden voor de screening van andere erfelijke aandoeningen.

## 5.2. Evolutie van fenyلكetonurie.

De studie van de normale en mutante RFLP haplotypes in het PAH locus toonde aan dat de verdeling van de normale haplotypes quasi identiek is in heel Europa, inclusief in België. In elke onderzochte populatie komen de haplotypes 1 en 4 het meest frequent voor. Er wordt dan ook gedacht dat deze haplotypes evolutief de oudste zijn, waaruit alle andere allelen ten gevolge van mutaties en/of rekombinaties zouden kunnen ontstaan zijn (Konecki en Lichter-Konecki, 1991). De verdeling van de PKU haplotypes en de mutaties in België verschilt echter significant van deze in andere Europese landen, uitgezonderd Schotland. Ongeveer 90% van de PKU allelen behoort in Noord-Europese landen tot de haplotypes 1, 2, 3 en 4, terwijl in België deze haplotypes slechts 64% van de mutante allelen uitmaken.

Vermits geen mutatie 'hotspot' gevonden kon worden in het PAH locus, met uitzondering van de CpG duplexen (Abadie e.a., 1989 ; § 4.7) en een sterke associatie tussen haplotypes en mutaties geobserveerd werd, kan gesuggereerd worden dat elk van de mutaties, die aanleiding geven tot fenyلكetonurie, ontstaan is binnen één ethnische groep in een allel met een specifiek haplotype, welke vervolgens over de rest van Europa verspreid werd via het 'founder' effect. Zo wordt in Noord-Europeanen 60% van de mutante allelen gekarakteriseerd door de mutaties IVS12 en R408W, terwijl in bevolkingsgroepen ten noorden van de Alpen de mutaties R158Q, R261Q en Y414C in 50% van de mutante allelen voorkomen. In het Middellandse zeegebied overheerst de mutatie in intron 10 in 35% van de mutante allelen



en 10% van de Italiaanse allelen dragen de mutatie P281L. In België werd een breed spectrum aan 'Europese' mutaties gekarakteriseerd. Daarenboven werd de R243Q mutatie, reeds eerder beschreven in de allelen met haplotype 4 in de Chinese bevolking, in één PKU patiënt met haplotype 7 gevonden. In totaal identificeren 15 mutaties 56.5% van de PKU allelen in België, waarvan 11% voor de rekening van de intron 12 mutatie. Daarenboven bestaat in België een sterke associatie tussen de R408W mutatie en haplotype 2 en de IVS12 mutatie en haplotype 3, met uitzondering van 2 Mediterraanse families. In alle andere haplotypes, vooral de evolutief oude haplotypes 1 en 4, zijn meerdere mutaties verantwoordelijk voor de reductie of de afwezigheid van de enzymatische PAH activiteit. Anderzijds kunnen verschillende haplotypes éénzelfde mutatie dragen, zoals de intron 10 mutatie, die voorkomt in allelen met de haplotypes 6, 10 en 34. Daar deze haplotypes slechts in één of enkele naast elkaar gelegen RFLP verschillen van elkaar, wordt vermoed dat deze haplotypes ontstonden uit één gemeenschappelijk mutant allel. Vermits België, als gevolg van zijn centrale geografische ligging, vaak het toneel was van oorlogen met naburige landen en aldus frekwent belegerd werd door naastliggende landen, is het niet verrassend dat de Noord en Midden-Europese mutaties respectievelijk 17% en 16% van de mutante allelen in België uitmaken. Daarenboven draagt 12.5% van de Belgische mutante allelen één van de Mediterraanse mutaties. Maar, deze schijnbare niet willekeurige distributie verschilt opmerkelijk van de Noord-West Zuid-Oost gradiënt van de 2 meest frekwent voorkomende erfelijke ziekten, namelijk 'mucoviscidose' en MCAD deficiëntie (Gregersen e.a., 1991 ; EWGCFG, 1990). De geografische gradiënt van deze beide ziekten is immers tegengesteld aan de meer oudere Zuid-Oost Noord-West gradient, die het resultaat is van de neolithische migraties van het nabije oosten naar Europa (Menozzi e.a., 1978). Uit deze observaties blijkt dat waarschijnlijk andere mechanismen een belangrijke rol speelden in de verspreiding van PKU. Eén van de mogelijkheden is dat de mutaties, die fenylketonurie veroorzaken, evolutief recenter zouden zijn en dat hun verspreiding over Europa het resultaat is van meer recentere migraties dan deze van mucoviscidose en MCAD deficiëntie.

Maar indien de migraties inderdaad een belangrijke rol speelden in de verspreiding van PKU mutaties, wordt verwacht dat de genetische variabiliteit





eerder het gevolg is van een fysische barriere, zoals een taalgrens of een belangrijke rivier, dan dat het een gevolg zou zijn van de geografische afstand (Barbujani en Sokal, 1991). Vermits België een Vlaamse en Waalse gemeenschap heeft, werd een studie van de distributie van haplotypes en mutaties in het PAH locus aangevat. Toch werd geen significant verschil tussen de beide landsgedeelten gevonden. Wel bestaat er een verschil tussen het oosten en het westen van het land. Dit is echter niet zo verrassend vermits gedurende de Middeleeuwen het Vlaamse landsgedeelte behoorde tot het Franse Rijk, terwijl het Waalse gedeelte belangrijke economische kontakten onderhield met het Germaanse Rijk. Daarom wordt een verdere daling van de R408W mutatie in Oost-West richting, die overheerst in geheel Europa, in België waargenomen. De intron 10 mutatie, daarentegen, zou reeds door het Romeinse leger in België geïntroduceerd zijn. Later werden dan de IVS12 en R408W mutaties aangevoerd, respectievelijk door de Vikingen van overzee en door de Germanen vanuit het Oosten. De P281L mutatie werd waarschijnlijk veel recenter geïntroduceerd in België via de migraties van de jaren '60 vanuit het Zuiden, vermits ze vooral op allelen van eerste en tweede generatie migrantenkinderen voorkomt.

### 5.3. Verband tussen genotype en fenotype

Hoewel heterozygoten dragers van het PKU gen biochemisch en klinisch identiek zijn aan normale homozygoten, bezitten zij slechts 14% tot 40% van de normale PAH activiteit (Lehmann, 1989). Dit uit zich in een significant verschil van de verhouding Phe/Tyr tussen beide groepen, weliswaar met een belangrijke overlapping. De normale Phe/Tyr verhouding van PKU heterozygoten uit het overlappend gebied zou te verklaren zijn door een belangrijke residuele activiteit van het enzyme, dat gekodeerd wordt door het mutante gen. Nochtans werd er, na de studie van de groepen heterozygoten met verschillend genotype, geen significant verschil gevonden. Binnen één groep PKU dragers met hetzelfde genotype is immers een variëteit aan Phe/Tyr verhoudingen waar te nemen. Deze verhouding is dus geen goede indikator voor een specifieke mutatie in de heterozygoot. Verder kan men



stellen dat de metingen van de Phe en Tyr concentraties in plasma om heterozygoten op te sporen in de Belgische bevolking uiterst voorzichtig moeten geïnterpreteerd worden.

Ook bij de PKU patiënten werd geen korrelatie gevonden tussen het fenotype en het genotype. In deze studie werd gebruik gemaakt van een variabele index om de fenylalanine tolerantie in te schatten. Deze index benadrukt de moeilijkheid om een konstante fenylalanine concentratie in een dieet-behandelde patiënt te handhaven. Deze plasma fenylalanine concentratie reflecteert daarenboven het evenwicht tussen 2 metabole fluxen ; enerzijds de verwerking van fenylalanine via verschillende enzymatische routes en anderzijds de input van fenylalanine via het dieet. Verwacht kan worden dat de hydroxylatie verhoogt naarmate de fenylalanine concentratie stijgt (Scriver e.a., 1989). Nochtans hebben recente in vivo studies bij PKU patiënten aangetoond dat zij fenylalanine substantieel kunnen omzetten tot tyrosine. Deze observaties suggereren dat de mechanismen, die betrokken zijn bij de controle van de plasma Phe concentratie, complex zijn en afhangen van verschillende andere factoren dan de fenylalanine concentratie alleen (Thomson en Halliday, 1990). Dit betekent dat, ondanks specifieke moleculaire defekten in het PAH locus van PKU patiënten, andere factoren een rol spelen in de bepaling van het fenotype. Een voorspelling van dit fenotype op basis van het genotype moet dan ook voorzichtig gebeuren in patiënten met fenylketonurie.

#### 5.4. Richtlijnen voor de toekomst

Teneinde het fenotype van dragers van het PKU gen, heterozygoot en homozygoot, te verklaren, is een intensieve biochemische studie van PKU patiënten en dragers noodzakelijk. Dit kan enerzijds door middel van expressie-experimenten, waarbij beide mutante genen in een cel ingebracht worden, zodat het effect van verschillende subeenheden in het multimere enzyme onderzocht kan worden. Naast deze in vitro studie is een in vivo studie nodig om de overeenkomst van de in vitro testen met de in vivo realiteit na te gaan. Dit zou kunnen leiden tot een betere kennis van de biochemische



transformatie van fenylalanine tot tyrosine, waardoor de objectieven van deze studie, in verband met de optimalisatie van het dieet en de preventie van maternale PKU, beter benaderd zullen kunnen worden.



## HOOFDSTUK 6 : SAMENVATTING

Fenylketonurie (PKU) is een autosomaal recessief overerfbare afwijking, die veroorzaakt wordt door een deficiëntie van het enzyme fenylalanine hydroxylase (PAH), dat de omzetting van fenylalanine tot tyrosine katalyseert. Dankzij het neonataal screeningsprogramma en de klinische evaluatie van meer dan 200 PKU patiënten in het Dr.L.Willems-Instituut kon een belangrijke heterogeniteit van het PKU fenotype in de Belgische bevolking vastgesteld worden. Een gelijkaardige heterogeniteit werd ook teruggevonden in het genotype van de patiënten. Hiervoor werd in eerste instantie het haplotype, een combinatie van 8 RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) in het PAH gen, van de PKU patiënt en beide ouders bepaald. Door PKU te associëren met de haplotypes van het PKU kind, kan de overdracht van de ziekte in de familie gevolgd worden.

De RFLP haplotypes van 102 ouders uit 57 families (204 parentale allelen, waarvan 196 gedetermineerde haplotypes = 98 mutante en 98 normale haplotypes) en 100 PKU patiënten uit 99 families (200 mutante allelen) werden bepaald. Hoewel theoretische 384 haplotypes in het PAH locus bestaan, werden er slechts 12 teruggevonden bij de normale allelen. Het merendeel van deze allelen (73.4%) is daarenboven geassocieerd met de haplotypes 1, 4, 5 en 7. Bij de mutante allelen wordt een totaal van 16 verschillende haplotypes aangetroffen en 58.1% behoort tot de haplotypes 1, 3 en 4.

Moleculaire studies van mutante allelen toonden aan dat tot op heden een totaal van 15 puntmutaties verantwoordelijk is voor PKU in België. Hier van werden er reeds 12 beschreven in andere Europese populaties. Daarenboven werd de R243Q mutatie, die eerder in allelen met haplotype 4 in de Chinese bevolking gekarakteriseerd werd, in een Belgische PKU patiënt met mutant haplotype 7 gevonden. Via de sequentie bepaling van geamplificeerde



| ORIGINAL ARTICLES                                     | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             | SYMPOSIUM                                             |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer | The Role of the Physician in the Prevention of Cancer |

exonen van mutante PAH genen werden ook 2 nieuwe mutaties gekarakteriseerd, nl. 272Gly-->Stop en 261Arg-->Stop, en een stille mutatie, 245Val-->Val, werd gevonden in het exon 7 van alle individuen met haplotype 4. Via een screening voor al deze mutaties kon de oorzaak van PKU voor 56.5% van de mutante allelen aangetoond worden en een associatie tussen een mutatie en een welbepaald haplotype kon worden vastgesteld.

Ondanks de grote verspreiding van PKU over heel Europa zijn er toch zeer belangrijke verschillen in de frequenties van de haplotypes en mutaties tussen de verschillende populaties. De verdeling van de normale haplotypes is quasis identiek in heel Europa, inclusief in België. De haplotypes 1 en 4, gevolgd door de haplotypes 5 en 7, komen het meest voor in alle onderzochte populaties, terwijl de haplotypes 2, 3 en 6 eerder zeldzaam zijn. Dit patroon suggereert dat de haplotypes 1 en 4 evolutief de oudste zijn, waaruit alle andere allelen ten gevolge van mutaties en/of rekombinaties ontstonden. De verdeling van de Belgische mutaties en hun haplotypes, daarentegen, verschilt sterk met deze in andere Europese populaties. In verschillende delen van Europa overheersen immers verschillende mutaties, geassocieerd met andere mutante haplotypes. Hierdoor wordt verondersteld dat PKU veroorzaakt wordt door meerdere mutaties, die elk in één ethnische groep op een welbepaald haplotype ontstaan zijn en van daaruit verspreid werden over de rest van Europa. Zo zou PKU met de R408W mutatie op een allel met haplotype 2 een Balto-Slavische oorsprong hebben. De intron 12 mutatie, daarentegen, zou ontstaan zijn in Denemarken op een haplotype 3. In bevolkingsgroepen ten noorden van de Alpen overheersen dan weer de R158Q, R261Q en Y414C mutaties. Naar analogie zou in het Middellandse Zee gebied PKU ontstaan zijn door de intron 10 mutatie in het PAH locus met haplotype 6 of door de P281L mutatie in het locus met haplotype 1. Vermits België, als gevolg van zijn geografische centrale ligging, vaak het toneel is geweest van oorlogen met naburige landen, is een heterogeniteit aan mutaties en haplotypes waar te nemen. Zowel Noord en Midden-Europese als Middellandse Zee mutaties werden in respectievelijk 17%, 16% en 12.5% van de mutante allelen in België teruggevonden. Waarschijnlijk werd de mutatie in intron 10 reeds geïntroduceerd door het Romeinse leger. Later werden dan de intron 12 mutatie en de R408W mutaties aangevoerd, respectievelijk van overzee door de Vikingen en vanuit het oosten door de Germanen. Sterker, een verdere



daling van deze laatste mutatie van oost naar west, die geobserveerd kan worden over heel Europa, doet zich voor in België, terwijl een fysische barriere, zoals de taalgrens of een belangrijke rivier, geen invloed heeft op de genetische variabiliteit binnen België.

Het gevonden genotype werd eveneens vergeleken met de klinische gegevens van PKU patiënten. Hiervoor werd, uitgaande van de in de patiënt voorkomende mutaties, de residuele PAH aktiviteit, gebaseerd op deze gemeten in expressie-experimenten, geschat. En, hoewel patiënten met een lage of geen PAH aktiviteit meestal een lage fenylalanine tolerantie hebben, kan geen korrelatie tussen deze beide parameters gevonden worden. Anderzijds hebben ook dragers van het PKU gen een verminderde PAH aktiviteit. In deze studie zijn de normaalwaarden (normale individuen) familieleden, waarvan de aanwezigheid van mutante allelen definitief uitgesloten kon worden op basis van de haplotypering of de mutatie-screening. De molaire verhouding tussen fenylalanine en tyrosine toonde een verminderde tolerantie voor fenylalanine bij de dragers van PKU aan, maar er kon echter geen korrelatie tussen deze Phe/Tyr waarde en de mutatie in de drager gevonden worden.

Hieruit kan besloten worden dat fenylketonurie inderdaad door moleculaire defekten in het gen, dat kodeert voor het fenylalanine hydroxylase, veroorzaakt wordt, maar dat andere, nog onbekende, factoren een belangrijke rol spelen in het tot uiting komen van het PKU fenotype. Daarom kunnen enkel intensieve biochemische testen klaarheid brengen in deze uiterst complexe transformatie van fenylalanine tot tyrosine en zijn deficiëntie in patiënten met fenylketonurie.



## APPENDIX

| mutatie           | exon | Restr | HT | oorsprong               | referentie                                       |
|-------------------|------|-------|----|-------------------------|--------------------------------------------------|
| M1V<br>ATG-GTG    | 1    |       | 2  | Frans-Canada            | John e.a., 1989                                  |
| deletie           | 1-2  |       |    | Schotland               | Sullivan e.a., 1989                              |
| F39L<br>TTC-TTG   | 2    |       |    | Australië               | Forrest e.a., 1989                               |
| L48S<br>TTG-TCG   | 2    |       | 4  | Turkije                 | Lichter-Konecki e.a., 1990<br>Konecki e.a., 1991 |
| I065T<br>ATT-ACT  | 3    |       | 9  | Frans-Canada            | John e.a., 1990                                  |
| deletie<br>exon 3 | 3    |       |    | Yeminieten              | Avigad e.a., 1990                                |
| dl 94<br>dCTA     | 3    |       | 2  | Portugal                | Caillaud e.a., 1990                              |
| R111X<br>CGA-TGA  | 3    |       | 4  | Orienteel               | Wang e.a., 1989a                                 |
| R158Q<br>CGG-CAG  | 5    |       | 4  | Germanen<br>Zwitserland | Dworniczak e.a., 1989<br>Okano e.a., 1990a en b  |
| Y204C<br>TAT-TGT  | 6    |       | 4  | China                   | Wang e.a., 1989b                                 |
| E221G<br>GAA-GGA  | 6    |       | 3  | Turkije                 | Lichter-Konecki e.a., 1990<br>Konecki e.a., 1991 |



|                  |    |       |      |                             |                                         |
|------------------|----|-------|------|-----------------------------|-----------------------------------------|
| R243X<br>CGA-TGA | 7  |       | 4    | Hongarije                   | Wang e.a., 1990a                        |
| R243Q<br>CGA-CAA | 7  |       | 4    | China                       | Wang e.a., 1991                         |
| L249F<br>CTT-TTT | 7  |       | 1    | Kaukasiërs                  | Okano e.a., 1990b                       |
| R252W<br>CGG-TGG | 7  | Aval  | 1-7  | Frankrijk<br>Italië         | Abadie e.a., 1989<br>Okano e.a., 1991b  |
| L255S<br>TTG-TCG | 7  | MspI  | 37   | Zwart- Amerika              | Hofman e.a., 1991                       |
| A259V<br>GCC-GTC | 7  |       | 42   | Frankrijk                   | Labrunet e.a., 1991                     |
| R261Q<br>CGA-CAA | 7  | HinfI | 1-2  | Frankrijk                   | Abadie e.a., 1989<br>Okano e.a., 1990a  |
| R261X<br>CGA-TGA | 7  | Ddel  | 4    | België                      |                                         |
| G272X<br>CGA-TGA | 7  | BamHI | 7    | Zweden<br>Frankrijk+ België | Svensson e.a., 1990<br>Melle e.a., 1991 |
| S273F<br>TCC-TTC | 7  | BamHI | 7    | Frankrijk                   | Melle e.a., 1991                        |
| Y277D<br>TAT-GAT | 7  |       |      | Frankrijk                   | Labrunet e.a., 1991                     |
| E280K<br>GAA-AAA | 7  |       | 38-1 | Arabieren                   | Lyonnet e.a., 1989                      |
| P281L<br>CCT-CTT | 7  |       | 1-4  | Kaukasiërs                  | Okano e.a., 1989, 1991b                 |
| IVS7             | 7  |       | 4    | Italië                      | Dianzini e.a., 1991                     |
| F299C<br>TTT-TGT | 8  |       |      | Kaukasiërs                  | Okano e.a., 1989                        |
| L311P<br>CTG-CCG | 9  | MspI  | 11   | Germanen                    | Lichter-Konecki e.a., 1988a             |
| W326X<br>TGG-TAG | 10 |       |      | Oriëntaals                  | Wang e.a., 1990b                        |





|                  |    |         |      |              |                         |
|------------------|----|---------|------|--------------|-------------------------|
| IIIS10           | 10 | Ddel    | 6-10 | Mediterraans | Kalaydjieva e.a., 1991a |
| Y356X<br>TAC-TAA | 11 |         |      | Orienteels   | Wang e.a., 1990b        |
| dL 364<br>d CTT  | 11 | HinDIII |      | Zweden       | Svensson e.a., 1990     |
| R408W<br>CGG-TGG | 12 |         | 2    | Denemarken   | DiLella e.a., 1987      |
| R413P<br>CGC-CCC | 12 |         | 4    | China        | Wang e.a., 1989b        |
| Y414C<br>TAC-TGC | 12 |         | 4    | Kaukasiërs   | Okano e.a., 1990b       |
| IVS12            | 12 |         | 3    | Denemarken   | DiLella e.a., 1986b     |



## REFERENTIES

- Abadie, V., Lyonnet, S., Maurin, N., Berthelon, M., Caillaud, C., Giraud, F., Mattei, J.F., Rey, J., Rey, F., Munnich, A.** (1989) CpG dinucleotides are mutation hot spots in phenylketonuria. *Genomics* 5 : 936
- Acosta, P.B., Stepnick-Gropper, S., Clarke-Sheehan, N., Wenz, E., Cheng, M., et al.** (1987) Trace element status of PKU children ingesting an elemental diet. *J.Parenter.Enterl Nutr.* 11 : 287
- Apold, J., Eiken, H.G., Odland, D., Fredriksen, A., Bakken, A., Lorens, J.B., Boman, H.** (1990) A termination prevalent in Norwegian haplotype no 7 PKU genes. *Am.J.Hum.Genet.* 47 : 1002.
- Aulehla-Scholz, C., Vorgerd, M., Sautter, E., Leupold, D., Mahlmann, R., Ullrich, K., Olek, K., Horst, J.** (1988) Phenylketonuria : distribution of DNA diagnostic patterns in German families. *Hum.Genet.* 78 : 353
- Avigad, S., Cohen, B.E., Bauer, S., Schwartz, G., Frydman, M., Woo, S.L.C., Niny, Y., Shiloh, Y.** (1990) A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. *Nature* 344 : 168
- Barbuyani, G., Sokal, R.R.** (1991) Genetic population structure of Italy. II. Physical and cultural barriers to gene flow. *Am.J.Hum.Genet.* 48 : 398



- Bessman, S.P.** (1972) Genetic failure of fetal amino acid 'justification' : a common basis for many forms of metabolic, nutritional and 'nonspecific' mental retardation. *J.Pediatr.* 81 : 834
- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M.** (1954) The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behavior of a phenylketonuria child. *Acta Paediat.Scan.* 43 : 64
- Bourget, L., Chang, T.M.S.** (1985) Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in semipermeable microcapsules for enzyme replacement in phenylketonuria. *FEBS Lett.* 180 : 5
- Bourget, L., Chang, T.M.S.** (1986) Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in microcapsules for the depletion of phenylalanine in plasma in phenylketonuric rat model. *Biochim.Biophys.Acta* 883 : 432
- Caillaud, C., Lyonnet, S., Melle, D., Rey, F., Berthelon, M., Vilarinho, L., Vaz Osorio, R., Rey, J., Munnich, A.** (1990) Molecular heterogeneity of mutant haplotype 2 alleles in phenylketonuria. *Am.J.Hum.Genet.* 47 : A152
- Centerwall, W.R.** (1957) Phenylketonuria. *J.Am.Med.Ass.* 165 : 392
- Chakraborty, R., Lidsky, A.S., Daiger, S.P., Güttler, F., Sullivan, S., DiLella, A.G., Woo, S.L.C.** (1987) Polymorphic DNA haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase locus and their relationship with phenylketonuria. *Hum.Genet.* 76 : 40
- Chen, S.H., Hsiao, K.J., Lin, L.H., Liu, T.T., Tang, R.B., Su, T.S.** (1989) Study of restriction fragment length polymorphisms at the human phenylalanine hydroxylase locus and evaluation of its potential application in prenatal diagnosis of phenylketonuria in Chinese. *Hum.Genet.* 81 : 226



**Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156

**Choo, K.H., Filby, R.G., Jennings, I.G., Peterson, G., Fowler, K.** (1986) Vectors for expression and amplification of cDNA in mammalian cells : expression of rat phenyl-alanine hydroxylase. *DNA* 5 : 529

**Cohen, B.E., Weiss, R., Hadar, R., Normand, M., Shiloh, S., Elhanati, D.** (1988) Group work with adolescent PKU girls and their mothers. *J.Inher.Metab.Dis.* 11 : 199

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

**Cotton, R.G.H., Danks, D.M.** (1976) Purification of inactive phenylalanine hydroxylase protein from liver in classical phenylketonuria. *Nature* 260 : 63

**Coulondre, C., Miller, J.H., Farabangh, P.J., Gilbert, W.** (1978) Molecular basis of base substitution hot spots in *Escherichia coli*. *Nature* 274 : 775

**De Cespedes, C., Thoene, J.G., Lowler, K., Christensen, H.N.** (1989) Evidence for inhibition of exodus of small neutral amino acids from non-brain tissues in hyperphenyl-alaninemic rats. *J.Inherited Metab.Dis.* 12 : 166

**Dianzini, I., Farinasso, L., Fortina, P., Camaschella, C., Ponzzone, R., Dahl, H.H.M., Cotton, R.G.H., Ponzzone, A.** (1989) RFLP of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in the Italian population. *J.Inher.Metab.Dis.* 12 : 162





- Dianzini, I., Forrest, S.M., Camaschella, C., Saglio, G., Ponzzone, A., Cotton, R.G.H.** (1991) Screening for mutations in the phenylalanine hydroxylase gene from Italian patients with phenylketonuria by using the chemical cleavage method : a new splice mutation. *Am.J.Hum.Genet.* 48 : 631
- DiLella, A.G., Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., Marvit, J., Woo, S.L.C.** (1986a) Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 25 : 743
- DiLella, A.G., Marvit, J., Lidsky, A.S., Güttler, F., Woo, S.L.C.** (1986b) Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature* 322 : 799
- DiLella, A.G., Marvit, J., Brayton, K., Woo, S.L.C.** (1987) An amino-substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* 327 : 333
- Drummond, K.N., Michael, A.F., Good, R.A.** (1966) Tryptophan metabolism in a patient with phenylketonuria and scleroderma : a proposed explanation of the indole defect in phenylketonuria. *Canad.Med.Ass.J.* 94 :834
- Dworniczak, B., Aulehla-Scholz, C., Horst, J.** (1989) Phenylketonuria : detection of a frequent haplotype 4 allele mutation. *Hum.Genet.* 84 : 95
- Dworniczak, B., Grudde, K., Stümper, J., Bartholomé, K., Aulehla-Scholz, C., Horst, J.** (1991) Phenylalanine hydroxylase gene : novel missense mutation in exon 7 causing severe phenylketonuria. *Genomics* 9 : 193
- Efron, M.L., Kang, E.S., Visakorpi, J., Fellers, X.F.** (1969) Effect of elevated plasma phenylalanine levels on other amino acids in phenylketonuria and normal subjects. *J.Pediatr.* 74 : 399



**European Working Group on CF Genetics (EWGCFG)** (1990) Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum.Genet.* 85 : 436

**Feinberg, A.P., Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137 : 6

**Fisher, D.B., Kaufman, S.** (1972) Stimulation of rat liver phenylalanine hydroxylase by phospholipids. *J.Biol.Chem.* 247 : 2250

**Fisher, D.B., Kirkwood, R., Kaufman, S.** (1972) Rat liver phenylalanine hydroxylase, an iron enzyme. *J.Biol.Chem.* 247 : 5161

**Fölling, A.** (1943) Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Ztschr.Physiol.Chem.* 227 : 169

**Forrest, S.M., Howells, D.W., Dahl, H.H., Cotton, R.G.H.** (1989) Use of chemical cleavage method to detect mutations causing phenylketonuria and dihydropteridine reductase deficiency. *Am.J.Hum.Genet.* 48 : A188

**Giovannini, M., Vasasina, R., Longhi, R., Cezura, A.M., Galva, M.D., Riva, E., Bondiolotti, G.P., Picotti, G.B.** (1988) Serotonine and noradrenaline concentrations and serotonine uptake in platelets from hyperphenylalaninaemic patients. *J.Inherited Metab.Dis.* 11 : 285

**Gregersen, N., Winter, V., Kolvraa, S., Andresen, B., Bross, P., Blakemore, A., Curis, D., Petersen, B.N., Bolund, L.** (1991) Molecular analysis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Europe. 2nd Int.Symposium on fatty acids oxidation, Philadelphia.



**Grenett H.E., Ledley, F.D., Reed, L.L., Woo, S.L.C.** (1987) Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase : Functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84 : 5530

**Gubler, U., Hoffman, B.J.** (1983) A simple and very efficient method for generation cDNA libraries. *Gene* 25 : 263

**Guthrie , R.** (1980) Organization of a regional newborn screening laboratory. In : Bickel, H., Guthrie, R., Hammersen, G. (eds) Neonatal screening for inborn errors of metabolism. Springer, Berlin Heidelberg New York, 259

**Guthrie, R., Susi, A.** (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32 : 338

**Güttler, F., Ledley, F.D., Lidsky, A.S., DiLella, A.G., Sullivan, S.E., Woo, S.L.C.** (1987) Correlation between polymorphic DNA haplotypes at phenylalanine hydroxylase locus and clinical phenotypes of phenylketonuria. *J.Pediatr.* 110 : 68

**Güttler, F., Hansen, G.** (1977) Different phenotypes for phenylalanine hydroxylase deficiency. *Ann Clin Biochem* 14 : 124

**Güttler, F., Wamberg, E.** (1977) Persistent hyperphenyl-alaninemia. *Acta Pediat.Scand.* 66 : 339

**Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Med.Biol.* 166 : 57

**Hertzberg, M., Jahromi, K., Ferfuson, V., Dahl, H.H.M., Mercer, J., Mickleson, K.N.P., Trent, R.J.** (1989) Phenylalanine hydroxylase gene haplotypes in Polynesians evolutionary origins and absence of alleles associated with severe phenylketonuria. *Am.J.Hum.Genet.* 44 : 382



- Hilton, M.A., Sharpe, J.N., Hicks, L.G., Andrews, B.F.** (1986) A simple method for detection of heterozygous carriers of the gene for classic phenylketonuria. *J.Pediatr.* 109 : 601
- Hofman, K.J., Steel, G., Kazazian, H.H., Valle, D.** (1991) Phenylketonuria in U.S. Blacks : Molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Am.J.Hum.Genet.* 48 : 791
- Hoskins, J.A., Holliday, S.B., Greenway, A.M.** (1984) The metabolism of cinnamic acid by healthy and phenylketonuria adults : a kinetic study. *Biomed. Mass Spectrom.* 11 : 296
- Huang, C., Max, E.E., Kaufman, S.** (1973) Purification and characterization of phenylalanine hydroxylase stimulating protein from rat liver. *J.Biol.Chem.* 248 : 4235
- Hyanek, J., Viletova, H., Soukup, J., Kobilkova, J., Kubik, M., Kunova, V.** (1988) Changes in phenylalanine tolerance while monitoring the dietetic treatment. *J.Inher.Metab.Dis.* 11 : 427
- Jervis, G.A.** (1947) Studies on phenylpyruvic oligophrenia. The position of the metabolic error. *J.Biol.Chem.* 169 : 651
- Jervis, G.A.** (1953) Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 82 : 514
- John, S.W.M., Rozen, R., Laframboise, R., Laberge, C., Scriver, C.R.** (1988) RFLP haplotypes associated with hyperphenylalaninemia alleles at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in French Canadians. *Am.J.Hum.Genet.* 43 : abstract 860.





**John, S.W.M., Rozen, R., Laframboise, R., Laberge, C., Scriver, C.R.** (1989) Novel PKU mutation on haplotype 2 in French-Canadians.

*Am.J.Hum.Genet.* 45 : 905

**John, S.W.M., Rozen, R., Laframboise, R., Laberge, C., Scriver, C.R.** (1990) The phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in French-Canadians contains novel and conventional mutations and unusual haplotype associations. 5th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Asilomar, abstract

**Jordon, M.K., Brunner, R.L., Hunt, H.M., Berry, H.K.** (1985) Preliminary support for the oral administration of valine, isoleucine and leucine for phenylketonuria. *Dev.Med.Child Neurol.* 27 : 33

**Kalaydjieva, L., Dworniczak, B., Auleiha-Scholz, C., Devoto, M., Romeo, G., Stuhmann, M., Horst, J.** (1991a) Phenylketonuria mutations in Southern Europeans. *Lancet* 337 : 865

**Kalaydjieva, L., Dworniczak, B., Kucinskas, V., Yurgeliavicius, V., Kuner, E., Horst, J.** (1991b) Geographical distribution gradient of the major PKU mutations and the linked haplotypes. *Hum.Genet.* 86 : 411

**Kaufman, S.** (1957) The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J.Biol.Chem.* 226 : 511

**Kaufman, S.** (1959) Studies on the mechanism of the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J.Biol.Chem.* 234 : 2677

**Kaufman, S.** (1986) Regulation of the activity of hepatic phenylalanine hydroxylase. *Adv.Enzyme Regul.* 25 : 37

**Kaufman, S.** (1989) An evaluation of the possible neuro-toxicity of metabolites of phenylalanine. *J.Pediatr.* 114 : 895



**Kaufman, S., Fisher, D.B.** (1970) Purification and some physical properties of phenylalanine hydroxylase. *J.Biol.Chem.* 245 : 4745

**Kleinman, D.S.** (1964) Phenylketonuria : a review of some deficits in our information. *Pediatrics* 33 : 123

**Knox, W.E.** (1972) Phenylketonuria. In : Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Frederickson, D.S. (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3rd ed. McGraw-Hill Book Comp, New York London Sydney Toronto, 266

**Konecki, D.S., Schlotter, M., Trefz, F.K., Lichter-Konecki, U.** (1991) The identification of two mis-sense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria. *Hum.Genet.* 87 : 389

**Konecki, D.S., Lichter-Konecki, U.** (1991) The phenylketonuria locus : current knowledge about alleles and mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in various populations. *Hum.Genet.* 87 : 337

**Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., DiLella, A.G., Robson, K.J.H., Woo, S.L.C.** (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24 : 556

**Labrune, P., Melle, D., Rey, F., Berthelon, M., Caillaud, C., Rey, J., Munnich, A., Lyonnet, S.** (1991) Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria. *Am.J.Hum.Genet.* 48 : 1115

**Ledley, F.D., DiLella, A.G., Woo, S.L.C.** (1985a) Molecular biology of phenylalanine hydroxylase and phenylketonuria. *TIG* 11 : 309



- Ledley, F.D., DiLella, A.G., Kwok, S.C.M., Woo, S.L.C.** (1985b) Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry* 24 : 3389
- Ledley, F.D., Grenett, H.E., DiLella, A.G., Kwok, S.C.M., Woo, S.L.C.** (1985c) Gene transfer and gene expression of human phenylalanine hydroxylase. *Science* 228 : 77
- Ledley, F.D., Grenett, H.E., McGinnis-Shelnutt, M., Woo, S.L.C.** (1986) Retroviral-mediated gene transfer of human phenylalanine hydroxylase into NIH 3T3 and hepatoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83 : 409
- Ledley, F.D., Ledbetter, S.A., Ledbetter, D.H., Woo, S.L.C.** (1988) Localization of mouse phenylalanine hydroxylase (Pah) on chromosome 10. *Cytogenet.Cell Genet.* 47 : 125
- Lehmann, W.D.** (1989) Progress in the identification of heterozygote in phenylketonurie. *J.Pediat.* 114 : 915.
- Lenke, R.R., Levy, H.L.** (1980) Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of untreated pregnancies. *N.Engl.J.Med.* 303 : 1202
- Lichter-Konecki, U., Konecki, D.S., DiLella, A.G., Brayton, K., Marvit, J., Hahn, T.M., Trefz, K.F., Woo, S.L.C.** (1988a) Phenylalanine hydroxylase deficiency caused by a single base substitution in an exon of the human phenylalanine hydroxylase gen. *Biochemistry* 27 : 2881
- Lichter-Konecki, U., Schlotter, M., Konecki, D.S., Labeit, S., Woo, S.L.C., Trefz, K.** (1988b) Linkage disequilibrium between mutation and RFLP haplotype at the phenylalanine hydroxylase locus in the German population. *Hum.Genet.* 78 : 347



- Lichter-Konecki, U., Schlotter, M., Yaylak, C., Oztgüc, M., Coskun, T., Ozalp, I., Wendel, U., Batzler, U., Trefz, F.K., Konecki, D.** (1989) DNA haplotype analysis at the Turkish phenylalanine hydroxylase locus. *Hum.Genet.* 81 : 373
- Lichter-Konecki, U., Schlotter, M., Trefz, F.K., Konecki, D.S.** (1990) Identification of new mutations at the phenylalanine hydroxylase gene locus. 5th international Congress of Inborn Errors of Metabolism, Asilomar, abstract W4.4.
- Lidsky, A.S., Law, M.L., Morse, H.G., Kao, F.T., Rabin, M. et al.** (1985a) Regional mapping of the human phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus on chromosome 12. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82 : 6221
- Lidsky, A.S., Ledley, F.D., DiLella, A.G., Kwok, S.C.M., Daiger, S.P., Robson, K.J.H., Woo, S.L.C.** (1985b) Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Am.J.Hum.Genet.* 37 : 619
- Liu, S.R., Zuo, Q.H.** (1986) Newborn screening for phenylketonuria in eleven districts. *Chin.Med.J.Engl.* 99 : 113
- Lynch, B.C., Pitt, D.B., Maddison, T.G., Wraith, J.E., Danks, D.M.** (1988) Maternal phenylketonuria: successful outcome in four pregnancies treated prior to conception. *Eur.J.Pediatr.* 148 : 72
- Lyonnet, S., Caillaud, C., Rey, F., Berthelon, M., Frézal, J., rey, J., Munnich, A.** (1989) Molecular genetics of phenylketonuria in Mediterranean countries : a mutation associated with partial phenylalanine hydroxylase deficiency. *Am.J.Hum.Genet.* 44 : 511
- Mandel, M., Higa, A.** (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol.* 53 : 154





**Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1982) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Uitg. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, VS.

**Marvit J., DiLella, A.G., Brayton, K., Ledley, F.D., Robson, K.J.H., Woo, S.L.C.** (1987) GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucl.acid.res.* 15 : 5613

**Matsuo, K., Hommes, F.A.** (1987) Regional distribution of the phenylalanine-sensitive ATP-sulphurylase in brain. *J.Inherited Metab.Dis.* 10 : 62

**McCabe, E.R.B., Huang, S.Z., Seltzer, W.K., Law, M.L.** (1987) DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters : potential applications to newborn screening. *Hum. Genet.* 75 : 213

**Menzio, P., Piazza, A., Cavalli-Sforza, C.S.** (1978) Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science* 201 : 786

**Melchior, W.B., Von Hippel, P.H.** (1973) Alteration of the relative stability of dA.dT and dG.dC base pairs in DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 70 : 298

**Melle, D., Verelst, P., Rey, F., Berthelon, M., Francois, B., Munnich, A., Lyonnet, S.** (1991) Two distinct mutations at a single BamHI site in phenylketonuria. *J.Med.Genet.* 28 : 38

**Messing, J.** (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101 : 20

**Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F.** (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 : 1215

**Mitoma, C.** (1956) Studies on partially purified phenylalanine hydroxylase. *Arch.Biochem.Biophys.* 60 : 476



- Mullenbach, R., Lagoda, P.L.J., Welter, C.** (1989) An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *TIG* 5 : 391
- Okano, Y., Wang, T., Eisensmith, R.C., Woo, S.L.C.** (1989) PKU mutations among Caucasians. *Am.J.Hum.Genet.* 45 : A221
- Okano, Y., Wang, T., Eisensmith, R.C., Steinmann, B., Gitzelmann, R., Woo, S.L.C.** (1990a) Missense mutations associated with RFLP haplotypes 1 and 4 of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Am.J.Hum.Genet.* 46 : 18
- Okano, Y., Güttler, F., Wang, T., Eisensmith, R.C., Dasovich, M.B., Woo, S.L.C.** (1990b) Correlation of PKU mutant genotypes and clinical phenotypes in Caucasians. *Am.J.Hum.Genet.* 47 : A164
- Okano, Y., Eisensmith, R.C., Güttler, F., Lichter-Konecki, U., Konecki, D.S., Trefz, F.K., Dasovich, M., Wang, T., Hendriksen, K., Lou, H., Woo, S.L.C.** (1991a) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N.Engl.J.Med.* 324 : 1232
- Okano, Y., Wang, T., Eisensmith, R.C., Longhi, R., Riva, E., Giovannini, M., Cerone, R., Romano, C., Woo, S.L.C.** (1991b) Phenylketonuria missense mutations in the mediterranean. *Genomics* 9 : 96
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T.** (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86 : 2766
- Orkin, S.H., Kazazian, H.H.** (1984) The mutation and polymorphism of the human  $\beta$ -globin gene and its surrounding DNA. *Annu.Rev.Genet.* 18 : 131
- Pare, C.M., Sandler, M., Stacey, R.S.** (1957) 5-Hydroxy-tryptamine deficiency in phenylketonuria. *Lancet* (i) : 551



- Pare, C.M., Sandler, M., Stacey, R.S.** (1958) Decreased 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in phenylketo-nuria. *Lancet* (ii) : 1099
- Pare, C.M., Sandler, M., Stacey, R.S.** (1959) The relationship between decrease 5-hydroxyindole metabolism and mental defect in phenylketonuria. *Arch.Dis.Child.* 34 : 422
- Pingoud, A.** (1985) Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* 147 : 105
- Rey, F., Berthelon, M., Caillaud, C., Lyonnet, S., Abadie, V., Blandin-Savoja, F., Feingold, J., Saudubray, J., Frézal, J., Munnich, A., Rey, J.** (1988) Clinical and molecular heterogeneity of phenylalanine hydroxylase deficiencies in France. *Am.J.Hum.Genet.* 43 : 914
- Reiss, O., Michel, A., Speer, A., Meiske, W., Cobet, G., Coutelle, C.** (1988) Linkage disequilibrium between RFLP haplotype 2 and the affected PAH allele in PKU families from the Berlin area of the German Democratic Republic. *Hum.Genet.* 78 : 343
- Robson K.J.H., Chandra, T., MacGillvray, R.T.A., Woo, S.L.C.** (1982) Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79 : 4701
- Romeo, G., Menozzi, P., Ferlini, A., Prosperi, L., Cerone, R., Scalisi, S., Romano, C., Antonozzi, I., Riva, E., Piceni-Sereni, L., e.a.** (1983) Incidence of classic PKU in Italy estimated from consanguineous marriages and from neonatal screening. *Clin.Genet.* 24 : 339
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.** (1976) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J.Mol.Biol.* 113 : 237



- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74 : 5463
- Sartorio, R., Greco, L., carrozzo, R., Budillon, C., Andria, G.** (1988) A simplified test to detect PKU heterozygotes by discriminant analysis in mentally retarded children and their mothers. *Clin Genet.* 33 : 241
- Saugstad, L.F.** (1975) Frequency of phenylketonuria in Norway. *Clin.Genet.* 7 : 40
- Scriver, C.R., Kaufman, S., Woo, S.L.C.** (1988) The hyperphenylalaninemias. In : Scriver C.R., Beaudet, A., Sly, W., Valle, D. (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill Book Comp, New York.
- Seibel, P., Degoul, F., Romero, N., Marsac, C., Kadenbach, B.** (1990) Identification of point mutations by misparing PCR as exemplified in MERRF disease. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 173 : 561
- Setlow, P.** (1976) Nearest neighbour frequencies in deoxyribonucleic acids. In: Fasman, G.D. (ed) *Handbook of biochemistry and molecular biology*, vol 2 : *Nucleic Acids*, 3rd edn. CRC Press, Cleveland, 312.





**Smith, I., Beasley, M.G., Wolff, O.H., Ades, A.E.** (1988) Behaviour disturbance in 8-year-old children with early treated phenylketonurie. *J.Pediatr.* 112 : 403

**Smith, S.C., Kemp, B.E., McAdam, W.J., Mercer, J.F.B., Cotton R.G.H.** (1984) Two apparent molecular weight forms of human and monkey phenylalanine hydroxylase are due to phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 259 : 11284

**Smith, S.C., McAdam, W., cotton, R.G.H., Mercer, J.F.B.** (1985) A novel two-dimensional polyacrylamide-gel pattern, which may be due to allelic genes of phenylalanine hydroxylase in monkeys. *Bioch.J.* 231 : 197

**Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98 : 503

**Speer, A., Dahl, H.H., Reiss, O., Cobet, G., Hanke, R., Cotton, R.G.H., Coutelle, Ch.** (1986) Typing of families with classical phenylketonuria using three alleles of the HindIII linked restriction fragment polymorphism, detectable with a phenylalanine hydroxylase cDNA probe. Family typing for PKU by linked HindIII RFLP. *Clin.Genet.* 29 : 491

**Stuhrmann, M., Reiss, O., Mönch, E., Kurdoglu, G.** (1989) Haplotype analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in Turkish phenylketonuria. *Clin.Genet.* 36 : 117

**Sullivan, S.E., Moore, S.D., Conner, J.M., King, M., Cockburn, F., Steinmann, B., Gitzelmann, R., Daiger, S.P., Woo, S.L.C.** (1989) Haplotype distribution of the human phenylalanine hydroxylase locus in Scotland and Switzerland. *Am.J.Hum.Genet.* 44 : 652



- Sullivan, S.E., Lidsky, A.S., Brayton, K., DiLella, A.G., King, M., Connor, F., Woo, S.L.C.** (1985) Phenylalanine hydroxylase deletion mutant from a patient with classical PKU. *Am.J.Hum.Genet.* 37 : A177
- Svensson, E., Andersson, B., Hagenfeldt, L.** (1990) Two mutations within the coding sequence of the phenylalanine hydroxylase gene. *Hum.Genet.* 85 : 300
- Szabo, L., Somogyi, C., Mate, M.** (1985) Experience based on 800,000 newborn screening tests of the Budapest phenylketonuria Centre. *Acta.Paediatr.Hung.* 26 : 113
- Thalhammer O.** (1975) A collaborative study. Frequency of inborn errors of metabolism especially in PKU, in some representative newborn screening centres around the world. *Humangenetik* 30 : 273
- Thomson, G.N., Halliday, D.** (1990) Significant phenylalanine hydroxylation in vivo in patients with classical phenylketonuria. *J.Clin.Invest.* 86 : 317
- Tourian, A., Goddard, J., Puck, T.T.** (1969) Phenylalanine hydroxylase activity in mammalian cells. *J.Cell.Physiol.* 73 : 159
- Underfriend, S., Cooper, J.R.** (1952) The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. *J.Biol.Chem.* 194 : 503
- Volckaert, G.** (1988) A systematic approach to chemical DNA sequencing by subcloning in pGV451 and derived vectors. *Methods Enzymol.* 155 : 231
- Waisbren, S.E., Doherty, L.B., Bailey, I.V., Rohr, F.J., Levy, H.L.** (1988) The New England Maternal PKU Project : identification of at-risk women. *Am.J.Public Health* 78 : 789



- Walker, V., Clayton, B.E., Ersser, R.S., Francis, D.E., Lilly, P., Seakins, F.W., Smith, J., Whiteman, P.D.** (1981) Hyperphenylalaninemia of various types among three quarters of a million neonates tested in a screening programme. *Arch.Dis.Child* 56 : 759
- Wang, RY.H., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., Huang, L.H., Ehrich, M.** (1982) Heat and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. *Biochim.Biophys.Acta* 697 : 371
- Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R., Huang, S.Z., Zeng, Y.T., Lo, W.H.Y., Woo, S.L.C.** (1989a) Molecular genetics of phenylketonuria in orientals : linkage disequilibrium between a termination mutation and haplotype 4 of the phenylalanine hydroxylase gene. *Am.J.Hum.Genet.* 45 : 675
- Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R.C., Zeng, Y.T., Huang, S.Z., Lo, W.H.Y., Woo, S.L.C.** (1989b) Molecular genetics of PKU in orientals. *Am.J.Hum.Genet.* 45 : A898
- Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R.C., Fekete, G., Schuler, D., Berencsi, G., Nasz, I., Woo, S.L.C.** (1990a) Molecular genetics of PKU in eastern Europe : a nonsense mutation associated with haplotype 4 of the phenylalanine hydroxylase gene. *Somat.Cell.Mol.Genet.* 16 : 85
- Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R.C., Lo, W.H.Y., Zeng, Y.T., Huang, S.Z., Woo, S.L.C.** (1990b) Molecular basis and population genetics of PKU in the Orient. *Am.J.Hum.Genet.* 47 : A241
- Wang, T., Okano, Y., Eisensmith, R.C., Harvey, M.L., Lo, W.H.Y., Huang, S.Z., Zeng, Y.T., Yuan, L.F., Furuyama, J.I., Oura, T., Sommer, S.S., Woo, S.L.C.** (1991) Founder effect of a prevalent phenylketonuria mutation in the Oriental population. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88 : 2146.



- 
- Woo, S.L.C.** (1988) Collation of RFLP haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am.J.Hum.Genet.* 43 : 781
- Woo, S.L.C., Gillam, S.S., Woolf, L.I.** (1974) The isolation and properties of phenylalanine hydroxylase from human liver. *Biochem.J.* 139 : 741
- Wood, W.I., Gitshier, J., Lasky, L.A., Lawn, R.M.** (1985) Base composition-independent hybridisation in tetramethyl-ammonium chloride : a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82 : 1585
- Woolf, L.I.** (1975) The heterozygote advantage in phenylketonuria. *Am.J.Hum.Genet.* 38 : 773
- Yarbro, M.T., Anderson, J.A.** (1966) L-tryptofaan metabolism in phenylketonuria. *J.Pediat.* 68 : 895





- Verelst, P., Denis, C., Rossius, M., Allaer, D., François, B., Martial, J., Raus, J. Restriction Fragment Length Polymorphisms in the phenylalanine hydroxylase locus in the Belgian population. 26th Annual Meeting SSIEM, Glasgow, September 1988.

- Verelst, P., François, B., Dahl, H., Raus, J. Haplotypes versus point mutations or phenylketonuria variants in the Belgian population. 27th Annual Meeting SSIEM, München, September 1989.

- Verelst, P., François, B., Raus, J. Etude de l'hétérogénéité du phénotype de la phénylcétonurie. 18e jaarlijkse vergadering van de Belgische vereniging voor Kindergeneeskunde, Luik, Maart 1990.

- Verelst, P., François, B., Vangeneugden, T., Pauwels, E., Raus, J. Detection of heterozygous carriers of phenylketonuria (PKU). 28th Annual Meeting SSIEM, September 1990.

- François, B., Verelst, P., Raus, J. Heterogeneity of phenylketonuria in Belgian population. PKU Workshop, Parijs, November 1990.

- Verelst, P., François, B., Raus, J. Phenylketonuria in three Belgian patients caused by a single base substitution in exon 7 of the phenylalanine hydroxylase gene. 146ste bijeenkomst van de Belgische Biochemische Vereniging, Diepenbeek, December 1990.

- Melle, D., Verelst, P., Rey, F., Berthelon, M. François, B., Munnich, A., Lyonnet, S. (1991) Two distinct mutations at a single BamHI site in phenylketonuria. J.Med.Genet. 28 : 38-40.

- Verelst, P., François, B., Raus, J. Mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus and phenotypic heterogeneity in patients with phenylketonuria. 29th Annual Meeting SSIEM, September 1991.

- 1er Prix de la Société Francophone de Recherche en Pédiatrie (S.F.R.P.), Bruxelles, 1990  
onderwerp : L'hétérogénéité de phénylcétonurie en Belgique





