



Università di Foggia

Dottorato di Ricerca in
“Medicina Traslazionale e Management dei Sistemi Sanitari”
XXXV ciclo

Tesi in Genetica Medica

FENILCHETONURIA: CORRELAZIONE TRA GENOTIPO E FENOTIPO CLINICO
E RISPOSTA ALLE STRATEGIE TERAPEUTICHE.

Tutor

Prof. Maurizio Margaglione

Prof.ssa Rosa Santacroce

Dottoranda

Dott.ssa Maria Francesca D'Ambrosio

Coordinatore

Prof.ssa Teresa Santantonio

INDICE

ABSTRACT.....	3
ABBREVIAZIONI.....	5
PREFAZIONE	6
1. LA FENILCHETONURIA	7
1.1 Patofisiologia ed effetti biochimici del deficit di PAH.....	8
1.2 Meccanismi di neuro patofisiologia e metabolismo cerebrale.....	10
1.3 La Fenilalanina Idrossilasi	13
1.4 Classificazioni della PKU.....	16
1.4.1 PKU Materna	16
1.5 Eziologia genetica	17
1.6 Screening	19
1.7 La dietoterapia.....	20
1.7.1 Fenilchetonuria e allattamento	23
1.8 Terapie farmacologiche	24
1.8.1 Nuove Frontiere terapeutiche	25
2. SCOPO DEL PROGETTO	28
3. MATERIALI E METODI.....	30
3.1 Screening neonatale e reclutamento pazienti.....	30
3.2 Estrazione del DNA	31
3.2.1 Protocollo da sangue intero	31

3.2.2	Protocollo da tampone buccale	33
3.3	Quantificazione DNA	35
3.4	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	36
3.4.1	Controllo della reazione di PCR: elettroforesi su gel di agarosio.....	40
3.4.2	Purifica dei prodotti di PCR	40
3.5	Sequenziamento diretto	41
3.5.1	Reazione di marcatura.....	42
3.5.2	Sequenziamento.....	43
3.6	Elaborazione dati.....	44
3.7	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®).....	45
3.8	Test da carico con la tetraidrobiopterina (BH4)	47
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	48
4.1	Rapporto fenotipo clinico e responsività al test.....	60
4.2	Rapporto genotipo e responsività al test	61
4.3	Report di casi di particolare attenzione: studio di ulteriori geni su due pazienti portatori e case report di un mosaicismo per mutazione de novo	67
5.	CONCLUSIONI.....	70
6.	BIBLIOGRAFIA.....	73

ABSTRACT

La fenilchetonuria (PKU) è una malattia metabolica congenita autosomica recessiva derivante da una carenza di fenilalanina idrossilasi, un enzima che catalizza l'idrossilazione della fenilalanina in tirosina, in presenza di un cofattore, la tetraidrobiopterina (BH4), di ossigeno e di ferro, compromettendo la velocità nel catabolismo della fenilalanina e di conseguenza lo sviluppo cognitivo postnatale. La PKU viene identificata precocemente grazie a programmi di screening neonatali e può essere classificata, in base ai livelli ematici di Phe pretrattamento, come: PKU classica ($>1200\mu\text{mol/L}$), PKU moderata ($900\text{--}1200\mu\text{mol/L}$) e PKU mild ($600\text{--}900\mu\text{mol/L}$), HPA lieve o HPA non PKU ($<600\mu\text{mol/L}$), in aggiunta, PKU reattiva a BH4. Ad oggi si descrivono le forme responsive alla BH4 e non responsive in seguito a test da carico per la BH4. La Dieta-terapia a basso contenuto di fenilalanina è ad oggi il trattamento più utilizzato e più efficace. Viene utilizzata anche la terapia a base di tetraidrobiopterina (BH4), un cofattore essenziale della fenilalanina idrossilasi.

L'intento di questo studio è effettuare l'analisi molecolare del gene PAH, evidenziare possibili correlazioni tra genotipo e fenotipo e prevedere la responsività alla BH4 in un gruppo di pazienti affetti da iperfenilalaninemia in follow-up presso alcuni centri di terapia. Sono stati selezionati e arruolati 290 pazienti sottoposti a sequenziamento Sanger per il gene della PAH. Di questi: 230 Eterozigoti Compositi, 35 Eterozigoti (portatori) e 25 omozigoti. La mutazione c.1208C>T p.A403V risulta essere la più frequente (82 pazienti su 290). Le mutazioni maggiormente frequenti sono state analizzate sul database BioPku per stabilirne la predizione fenotipica e di responsività alla BH4. La forma più severa (PKU Classica) risulta essere associata al genotipo c.1066-8G>C IVS10-11 G/T in omozigosi a cui consegue una scarsa responsività alla BH4. Mentre la forma più lieve è associata ad

una buona responsività alla BH4 è la condizione di omozigosi per p.A403V. È stata valutata la responsività reale al test di 28 pazienti che, in cura presso l'ospedale pediatrico Giovanni XXIII di Bari, si sono sottoposti al test. La maggior parte dei pazienti responsivi (11 pazienti) hanno un fenotipo mHPA quindi molto lieve. Tuttavia, vi sono pazienti in forma mPKU (4 pazienti) e in forma più grave mPKU (8 pazienti) con una responsività positiva. Sono stati messi in relazione i genotipi dei pazienti sottoposti al test con i risultati al test e le previsioni di responsività previste sul sito e software di predizione BioPku. Le responsività si sono rivelate concordi con quelle attese in 18 pazienti, 3 erano non concordi con quelle attese e in 7 genotipi la predizione è assente su BioPku. Lo studio si è rivelato concorde per il più del 60% dei casi rispetto a quello atteso sul database. Lo studio mette in luce la possibilità in base al genotipo di predire la buona responsività e quindi la compliance al farmaco. Sono stati studiati tre casi particolari: i primi due erano pazienti portatori di una sola mutazione ma a cui era stata diagnosticata una iperfenilalaninemia. È stata, quindi, svolta l'analisi in due geni coinvolti nella sintesi della BH4 (QDPR Diidrobiopterina reduttasi e SPR Sepiapterina reduttasi) presso l'Università degli studi di Malta, ma non sono emerse ulteriori mutazioni. L'ultimo è un caso di mosaicismismo in cui l'analisi dell'MLPA da tampone buccale ha rivelato la presenza di una duplicazione de novo nell'esone 11 del gene PAH in una paziente di 4 anni con HPA, duplicazione assente nell'analisi svolta su DNA estratto da sangue ed assente nei genitori. Il mosaicismismo spiega il quadro clinico della paziente.

ABBREVIAZIONI

AAAH: Amminoacido Aromatico Idrossilasi

AAVs: Adeno-Associated Viruses

BH4: Tetraidrobiopterina

cPKU: Classic PKU

DBS: Dried Blood Spot

FMA: Microdosaggio Fluorimetrico

GMP: Glicomacropetidi

HDR: Homology-directed repair

HPA: Iperfenilalaninemia

mHPA: Mild HPA

mPKU: Mild PKU

PAH: Fenilalanina Idrossilasi

PKU: Fenilchetonuria

qBH2: Diidrobiopterina

SD: Sapropterina diiclorato

SR: Sapropterina Reduttasi

TMS: Spettrometria di Massa Tandem

Tyr: Tirosina

PREFAZIONE

Il mondo di un individuo affetto da una malattia genetica è un mondo complesso, fatto di difficoltà che coinvolgono non solo il paziente in prima persona ma tutta la famiglia e le persone che lo circondano. Si parla di malattie scoperte in età neonatale se non pre-natale che cambiano radicalmente la quotidianità e la qualità della vita di un individuo e ne caratterizzano il futuro. Spaventa ciò che non si comprende, ciò che si percepisce come diverso, come non canonico; dimentichiamo però che la bellezza della vita è proprio la sua diversità e sua complessità di comprensione. Il ruolo del ricercatore è una figura chiave in questa complessità: rendere noto ciò che può risultare ostico e sconosciuto riduce i timori, le differenze, accorcia le distanze.

In malattie come quella di cui parlerò dove i pazienti sono sottoposti a diete rigidamente controllate per la vita, la grande sfida per la ricerca è quella di migliorarne la qualità della vita con la continua ricerca di alternative valide e costrutti proteici che migliorino la compliance della dieta. In questo scenario risulta fondamentale la sinergia tra diverse branche scientifiche come medicina, biologia, genetica, farmacia, bioinformatica, ecc.; per una migliore comprensione della malattia e la messa appunto delle nuove strategie terapeutiche future.

La fenilchetonuria è stata tra le primissime malattie genetiche ad essere scoperte ma i progressi scientifico-tecnologici moderni rendono la comprensione di questa malattia ancora oggi un campo di ricerca interessante. Lo studio tratterà la relazione tra fenotipo-genotipo di una coorte di pazienti con lo scopo di individuare le mutazioni più frequenti e il loro impatto sul decorso della malattia.

1. LA FENILCHETONURIA

La fenilchetonuria (PKU) è stata descritta per la prima volta in due fratelli norvegesi nel 1934 dal medico norvegese Ivar Asbjørn Følling che analizzando attentamente l'urina dei fratelli che mostravano importanti disabilità mentali notò un particolare odore di muffa nelle urine. Følling capì che c'era una correlazione tra le due condizioni che gli studi successivi hanno chiarito trattarsi di Iperfenilalaninemia. (1)

La fenilchetonuria (PKU) è un disturbo autosomico recessivo del metabolismo della fenilalanina derivante da mutazioni sul gene della fenilalanina idrossilasi (PAH; 612349), un enzima che catalizza l'idrossilazione della fenilalanina in tirosina in una reazione che richiede il co-substrato tetraidrobiopterina (BH₄), compromettendo la velocità nel catabolismo della fenilalanina e causandone concentrazioni particolarmente elevate nel sangue (2). Se non trattata tempestivamente l'eccesso di fenilalanina nel sangue comporta la formazione di corpi fenilchetonici che vengono escreti nelle urine. Inoltre, una diminuzione delle concentrazioni di tirosina si traduce in una ridotta produzione di melanina e di importanti neurotrasmettitori cerebrali quali dopamina e serotonina. La fenilalanina attraversa la barriera emato-encefalica tramite un trasportatore di amminoacidi neutri (LAT1), e ha un effetto neurotossico a livello cerebrale che si manifesta con ritardo progressivo dello sviluppo psicomotorio associato ad altre numerose manifestazioni quali eruzioni cutanee, autismo, convulsioni, difetti motori, disturbi comportamentali e turbe psichiatriche, oltre a una pigmentazione chiara di pelle, occhi e capelli, eczema e odore di muffa nelle urine. (3)

In condizioni normali le concentrazioni di Phe nel sangue non superano i 35-120 $\mu\text{mol/l}$. Le iperfenilalaninemia vengono classificate in base alla concentrazione di Phe nel sangue in assenza di trattamento.

La prevalenza della PKU varia tra le etnie e tra le diverse regioni geografiche del mondo, è generalmente più alta nei soggetti bianchi o nelle popolazioni dell'Asia orientale (~1: 10.000-15.000

nati vivi) (4). Tuttavia, la prevalenza in alcuni Paesi o regioni del Medio Oriente è paragonabile o addirittura superiore a quella delle popolazioni bianche o dell'Asia orientale. Ad esempio, in Turchia (5) e in alcune province dell'Iran (6) la prevalenza è rispettivamente di circa 1: 4.370 e 1: 4.698 neonati vivi. Questa prevalenza estremamente elevata potrebbe essere spiegata dalla maggiore frequenza di matrimoni consanguinei. Al contrario la prevalenza della PKU è bassa in alcune popolazioni asiatiche, come in Thailandia (1: 212.535) (7).

e in Giappone (1:120.000) (8). In Europa la prevalenza può variare notevolmente in base ai paesi. In Italia è di 1:2.700 neonati vivi e il paese europeo che registra la prevalenza più bassa è la Finlandia con un'incidenza inferiore a 1:100.000 nati vivi (9).

1.1 Patofisiologia ed effetti biochimici del deficit di PAH

La PAH è un enzima tetramerico monossigenasi contenente ferro che catalizza la reazione di idrossilazione della Phe in Tyr (10). La reazione necessita della tetraidrobiopterina BH₄ in quanto co-fattore ed ossigeno e molecolare come substrati. Questa reazione avviene prevalentemente nel fegato e in minor quantità nei tubuli renali (Fig. 1)

Il co-fattore BH₄ viene ossidato in Diidrobipterina (qBH₂) e nel corso della reazione per supportare l'idrossilazione della Phe viene continuamente riconvertito il BH₄. Negli individui con PKU l'attività enzimatica della PAH è del tutto assente o sostanzialmente ridotta, provocando un significativo accumulo di Phe nell'organismo e una ridotta concentrazione di Tyr. La carenza di Tyr nel sangue in questi pazienti viene compensata dall'assunzione dell'amminoacido con l'alimentazione o integratori. La Phe in eccesso viene continuamente deamminata in fenilpiruvato e altri fenilchetonici che vengono escreti nelle urine, dando origine al caratteristico odore di muffa nelle urine nei pazienti con fenilchetonuria.

Si stima che nei soggetti normali circa il 10-20% della Phe assunta con la dieta venga utilizzata nel fabbisogno giornaliero per il turnover proteico, il resto viene convertito il Tyr e di conseguenza nei vari destini metabolici come la produzione di dopamina, adrenalina e noradrenalina, nella tiroide

convertita in tiroxina e nei melanociti in melanina. Nel completo catabolismo la Tyr viene convertita in acetato e fumarato (11).

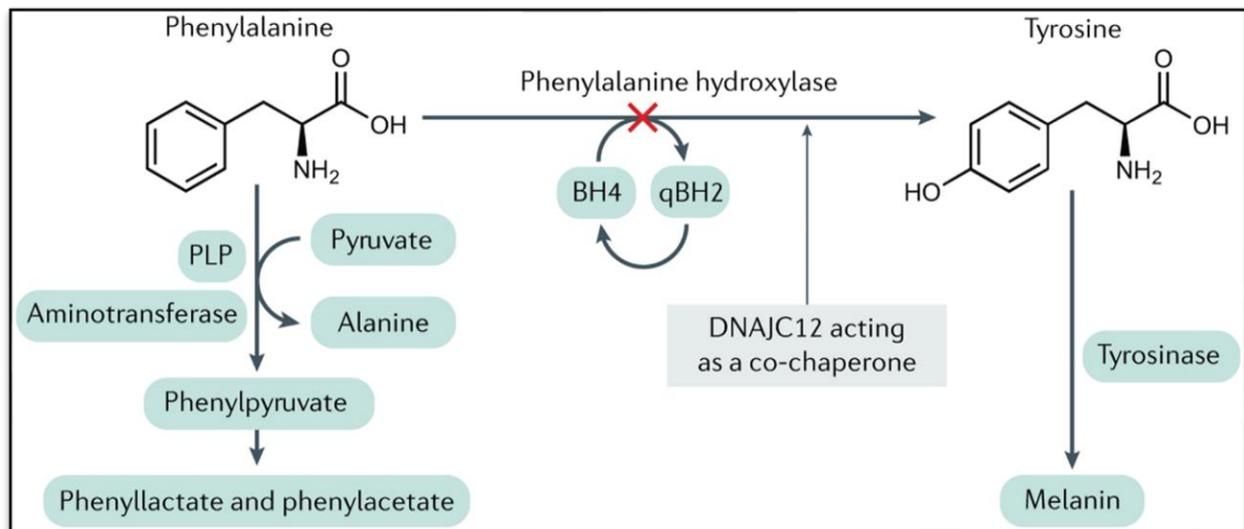


Fig 1: *Metabolismo della fenilalanina.*

van Spronsen et al. Phenylketonuria. Nat Rev Dis Primers. 2021 (ref.11)

Alla luce delle vie metaboliche descritte, gli effetti biochimici della carenza di PAH in soggetti con PKU sono sostanzialmente tre: L'iperfenilalaninemia, l'accumulo di fenilpiruvato e metaboliti correlati e l'ipotirossinemia. Gli acidi organici come il fenilpiruvato sono escreti nelle urine e le concentrazioni rimangono troppo basse per avere conseguenze cliniche anche in individui non trattati. (12). La carenza di L-Tyr, in linea teorica, può avere effetto sull'equilibrio amminoacidico cerebrale e nella carenza di neurotrasmettitori. Nei soggetti con PKU i livelli di Tyr sono mediamente più bassi rispetto alla popolazione ma comunque non al di sotto dei range di normalità, poiché la L-Tyr viene ingerita con le normali proteine presenti nella dieta quotidiana. Tuttavia, la sola integrazione di Tyr nella dieta non basta a prevenire gli effetti di disabilità cognitiva nei soggetti con PKU, legati principalmente all'effetto neurotossico della Phe in eccesso (13). L'effetto non neurologico dell'ipotirossinemia è legato all'ipopigmentazione nella pelle dovuta alla conseguente ipoproduzione di melanina (Fig 2).

1.2 Meccanismi di neuro patofisiologia e metabolismo cerebrale

Le manifestazioni cliniche più importanti del deficit di PAH si verificano a livello cerebrale e sono mediate dall'eccessiva concentrazione di Phe (Fig 2)

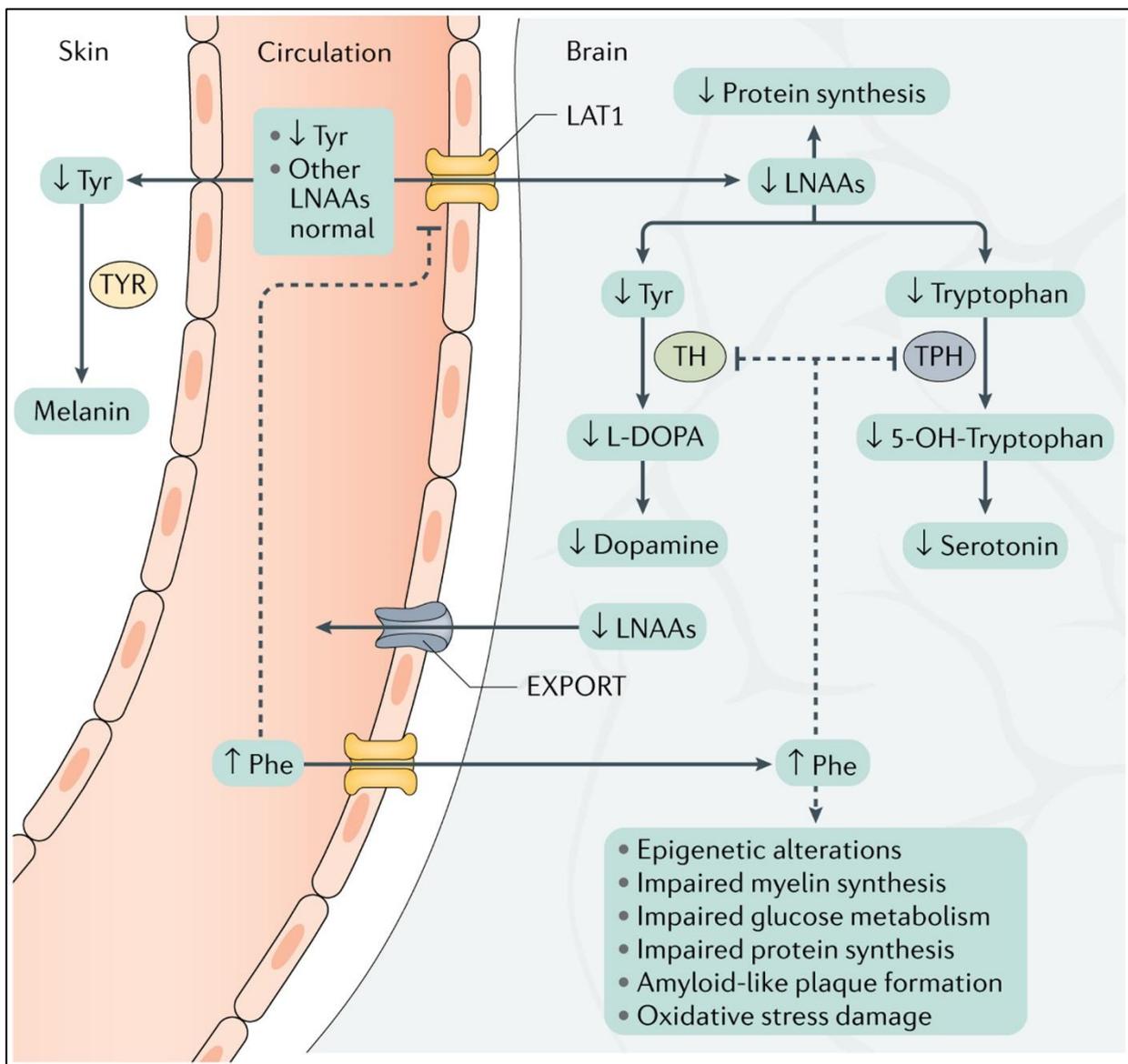


Fig 2: Manifestazioni patologiche in PKU.

van Spronsen et al. Phenylketonuria. Nat Rev Dis Primers. 2021 (ref.11)

I grandi amminoacidi neutri (L-NAA), tra cui Phe, tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), attraversano la barriera ematoencefalica grazie al trasportatore LAT1 (anche conosciuto come SL CA7A5) che è un membro della famiglia delle proteine di trasporto transmembrana (11) ed è espresso sia sulla membrana luminale che su quella albuminale delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali. L'affinità di LAT1 per tutti gli LNAA è elevata. La fenilalanina ematica ha un effetto inibitorio di tipo competitivo sul trasporto degli altri amminoacidi, ne consegue un maggior afflusso nel cervello di Phe rispetto agli altri amminoacidi neutri riducendone le concentrazioni cerebrali. Le basse concentrazioni di amminoacidi neutri cerebrali causano una ridotta sintesi proteica generale e una riduzione delle produzioni di neurotrasmettitori monoaminici (carenza di dopamina dovuta alla carenza di tirosina e carenza di serotonina dovuta a carenza di triptofano). Gli esportatori di amminoacidi neutri (EXPORT) hanno un grande ruolo compensatorio mitigando lo squilibrio amminoacidico e ripristinando l'omeostasi.

Una volta attraversata la barriera ematoencefalica la Phe ha un ruolo inibitorio di tipo competitivo sulle attività della Tyr idrossilasi (TH) e del triptofano idrossilasi (TH) con conseguente carenza di dopamina e serotonina. La carenza di questi due importanti neurotrasmettitori sono la causa maggiore dei disturbi di ansia e disturbi dell'umore nei pazienti PKU. L'alto apporto di Phe nel cervello ha mostrato anche effetti su:

- alterazioni epigenetiche, è stato infatti dimostrato che alte concentrazioni di Phe alterano il modello di metilazione di un gruppo di geni, compresi diversi microRNA regolatori nel tessuto cerebrale e nei leucociti dei pazienti con PKU (14)
- metabolismo del glucosio, che si tramuta in un mancato apporto di energia e di conseguenza ai gravi deficit cognitivi e comportamentali. Il meccanismo potrebbe essere legato all'inibizione mediata dal Phe del piruvato chinasi (15) o di altri enzimi della glicolisi o della fosforilazione ossidativa.

- formazione di fibrille molto simili a placche amiloidi, la fenilalanina si auto-assembla in fibrille con morfologia simile alle amiloidi associate alla malattia di Alzheimer. Questi gruppi sono specificamente riconosciuti dagli anticorpi e mostrano citotossicità che può essere neutralizzata dagli anticorpi, si ipotizza abbiano un ruolo patogenetico nei deficit cognitivi associati alla PKU (16);
- compromissione della sintesi della mielina; l'HPA causa disturbi della crescita dendritica nei neuroni e della connettività sinaptica. Ciò è stato descritto sia in esperimenti in vitro che in modelli animali (17) (18). Disturbi della mielinizzazione nei pazienti con PKU furono originariamente riportati negli anni '50 (19). Anche se è stato suggerito che l'HPA alteri il fenotipo degli oligodendrociti da mielinizzanti a non mielinizzanti, studi successivi su oligodendrociti di ratto mostrano capacità di deporre guaine mieliniche normali le condizioni di iperfenilalaninemia. (20). Le anomalie della sostanza bianca osservata nei pazienti con PKU sono diffuse in tutto il cervello e progredisce con l'età. Queste anomalie, si ipotizza possano essere originate da meccanismi generali, che possono avvenire in combinazione come ad esempio: una diminuzione dell'attività degli enzimi coinvolti nella biosintesi del colesterolo e di altri precursori della mielina, un tasso ridotto di sintesi proteica cerebrale, alterazioni epigenetiche e danno citotossico, tuttavia i precisi meccanismi alla base dei disturbi della materia bianca (e grigia) associati ad alte concentrazioni di Phe nel cervello rimangono sconosciuti. (11)(21).

Riassumendo quelli che sono gli aspetti patologici cerebrali dell'HPA si può affermare che tre diversi meccanismi contribuiscono alla genesi delle carenze di neurotrasmettitori: in primo luogo, la carenza cerebrale di Tyr e Trp (i substrati per la sintesi di dopamina e serotonina, rispettivamente) nel cervello a causa della competizione per il trasporto degli amminoacidi; in secondo luogo, la diminuzione dell'espressione della Tyr idrossilasi (TH) e della triptofano idrossilasi 2 (TPH 2), che catalizzano le fasi della sintesi della dopamina e della serotonina ; e terzo, inibizione di tipo competitivo delle

attività di TH e TPH 2 mediata dalla Phe. I difetti del metabolismo cerebrale causati da alti livelli di Phe sono ancora un campo di studio in espansione, questo è dovuto al probabile coinvolgimento di più meccanismi, lo stadio di sviluppo del cervello e il momento in cui inizia il trattamento (precoce o tardivo) (11).

1.3 La Fenilalanina Idrossilasi

La fenilalanina idrossilasi (PAH ; EC 1.14.16.1) è l'enzima che catalizza l'idrossilazione della fenilalanina in tirosina. La reazione dipende dalla tetraidrobiopterina (BH4), come cofattore, dall'ossigeno molecolare e dal ferro.

La proteina è codificata dal gene della fenilalanina idrossilasi (PAH) localizzato sul cromosoma 12q23.2. La sequenza genomica e le sue regioni fiancheggianti si estendono per circa 171 kb e contiene 13 esoni (22). L'UTR 5' copre circa 27 kb e la sequenza di 3' UTR a valle del sito poli(A) nell'esone 13 copre circa 65 kb (Fig 3).

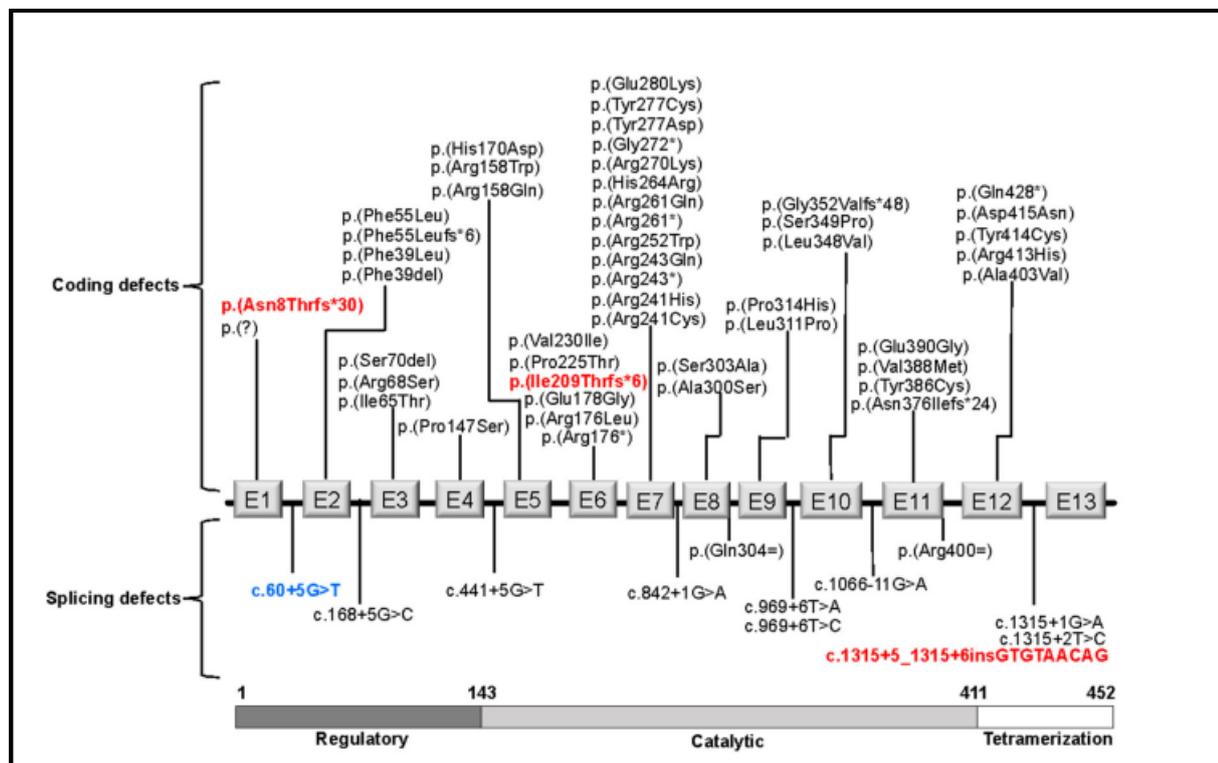


Fig 3: *Struttura del gene PAH e relative mutazioni più frequenti introniche ed esoniche.*

Vela-Amieva M, Alcántara-Ortigoza MA, Ibarra-González I, et al. An Updated PAH Mutational Spectrum of Phenylketonuria in Mexican Patients Attending a Single Center: Biochemical, Clinical-Genotyping Correlations. Genes (Basel). 2021;12(11):1676. Published 2021 Oct 23.

La fenilalanina idrossilasi è una proteina citoplasmatica presente principalmente negli epatociti, dove svolge la sua attività enzimatica. Il fegato è il principale responsabile della metabolizzazione della fenilalanina ottenuta da fonti alimentari e sebbene la fenilalanina idrossilasi si trovi prevalentemente nelle cellule del fegato, bassi livelli di questo enzima possono essere rilevati anche in altri tessuti dell'organismo; tra questi, le cellule renali (23). La PAH del rene umano può svolgere un ruolo significativo nell'omeostasi della fenilalanina nell'organismo, poiché è stata osservata una ridotta idrossilazione della fenilalanina nell'insufficienza renale (24). Tuttavia, l'esatto significato fisiologico della fenilalanina idrossilasi in tessuti extraepatici rimane meno conosciuto.

La PAH è un membro della famiglia degli enzimi dell'amminoacido aromatico idrossilasi (AAAH). Gli AAAH sono caratterizzati dalla presenza di un ferro ferroso non eme catalitico e necessitano di un cofattore come BH₄ e ossigeno molecolare come substrato aggiuntivo. I geni che codificano la fenilalanina idrossilasi (PAH) nei mammiferi, tirosina idrossilasi (TH) e due triptofani idrossilasi (TPH1 e TPH2), prendono il nome dai loro specifici substrati amminoacidici. La PAH dei mammiferi è un enzima omotetramerico di subunità da 50 kDa. Ciascuna subunità PAH è composta da un dominio regolatorio N-terminale (residui 1–110), un dominio catalitico centrale (residui 111–410) e un dominio di oligomerizzazione C-terminale (residui 411–452) (Fig.3). Il dominio regolatorio N-terminale è classificato come dominio ACT, un modulo regolatorio presente in diverse proteine, che spesso dimerizza e lega gli amminoacidi. Questo dominio è agganciato in modo flessibile al dominio catalitico tramite una regione a cerniera (Arg111-Thr117), ma stabilisce ampi contatti con il dominio catalitico della subunità adiacente all'interno del dimero. Il dominio regolatorio è necessario per l'attivazione da parte di L-Phe. Il dominio catalitico contiene i siti di legame per ferro, cofattore e

substrato. Nel sito attivo il ferro si lega a due istidine (His285 e His290 in hPAH) e a un glutammato (Glu330 in hPAH).

Il dominio di oligomerizzazione inizia con un foglio antiparallelo (residui 411–414 e 421–424), responsabile della dimerizzazione, seguito da un'elica lunga 40 Å (residui 428–452) che media la tetramerizzazione attraverso la formazione di bobine antiparallele con gli altri monomeri.

Diversi meccanismi agiscono insieme per controllare l'attività di PAH nei mammiferi, e l'attivazione dell'enzima è regolata dalla quantità di L -Phe, dal cofattore naturale BH₄, e dalla fosforilazione in Ser16 da parte delle proteine chinasi cAMP-dipendenti (25).

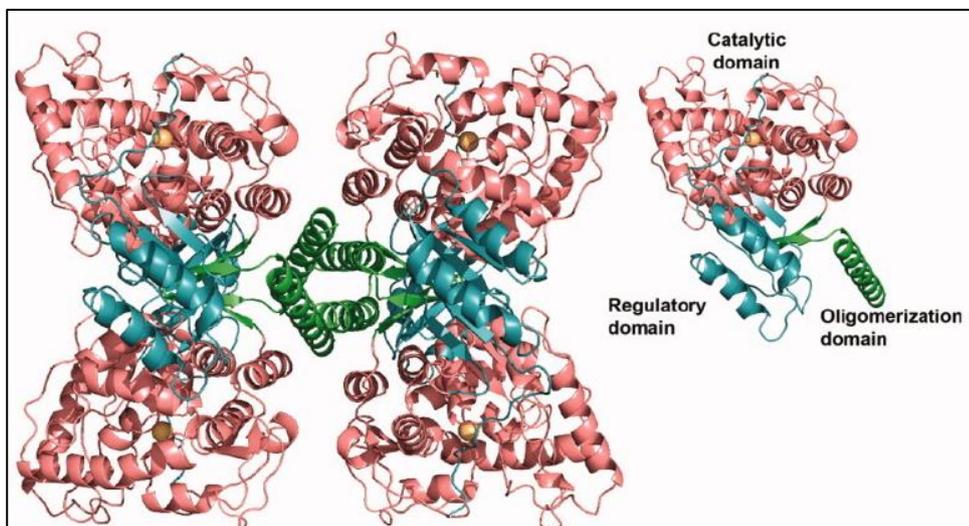


Fig.4: *Struttura della PAH e domini : catalitico, regolatorio e di oligomerizzazione*
Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. IUBMB Life. 2013 (ref.25)

Alcune delle mutazioni più frequenti sono localizzate nell'interfaccia dei domini catalitico e di tetramerizzazione. Sono ancora in discussione i loro effetti sulla stabilità strutturale e cellulare dell'enzima (26).

1.4 Classificazioni della PKU

Prima del 1953, data del primo trattamento dietetico della fenilchetonuria, i pazienti affetti da questa patologia non venivano trattati con dietoterapia; pertanto, la classificazione si è basata per decenni sulle concentrazioni di Phe nel sangue in condizioni di non trattamento. Veniva classificata in :

- PKU Classica ($>1200 \mu\text{mol/L}$)
- PKU Moderata ($900\text{--}1200 \mu\text{mol/L}$)
- PKU Lieve ($600\text{--}900 \mu\text{mol/L}$)
- HPA lieve o benigna ($120\text{--}600 \mu\text{mol/L}$) (27).

Oggi essendo una malattia riconosciuta precocemente grazie agli screening neonatali questa patologia viene trattata altrettanto tempestivamente, pertanto questa classificazione pretrattamento non è più valida (28). Le nuove classificazioni delle linee guida europee prevedono una classificazione basata sulla tolleranza alla Phe, classificando le forme di PKU in:

- HPA lieve ($120\text{--}360 \mu\text{mol/L}$), che non ha bisogno di alcun trattamento
- PKU ($>360 \mu\text{mol/L}$) che viene classificata ulteriormente come;
 - Responsiva alla BH4
 - Non responsiva alla BH4
 - PKU Materna, in donne in gravidanza che mostrano valori oltre i $360 \mu\text{mol/L}$ (29).

1.4.1 PKU Materna

Nelle donne in gravidanza affette da PKU, alti livelli di Phe nel sangue possono compromettere lo sviluppo fetale. Questa condizione è chiamata PKU materna poiché un feto, geneticamente sano, può presentare anomalie derivanti dalle alte concentrazioni di Phe nel sangue materno durante la gravidanza. I bambini hanno un aumentato rischio di sviluppare microcefalia, ritardo mentale e difetti cardiaci congeniti (30). In queste donne è importante far rientrare i livelli di Phe al di sotto dei $360 \mu\text{mol/l}$ con la dieta iniziando il trattamento ben prima dell'inizio della gravidanza (31). Il rischio può

ridursi a livelli accettabili anche con concentrazioni inferiori ai 600 $\mu\text{mol/l}$ nelle prime 10 settimane di età gestazionale (32). Rimane comunque opportuno abbassare i livelli di Phe non oltre i 360 $\mu\text{mol/l}$ considerando periodo a rischio non solo l'intera gravidanza ma anche il periodo antecedente al concepimento. Anche per la PKU materna la dietoterapia rimane il metodo più efficace per controllare le concentrazioni ematiche di Phe. Tuttavia l'uso di Sapropterina dicloridrato (SD) durante la gravidanza risulta efficace in termini di controllo metabolico e tolleranza alla Phe, nelle madri Bh4 responsive, con conseguente diminuzione del rischio di sviluppare anomalie fetali (33). Resta comunque importante mantenere un controllo bilanciato dei livelli di Phe che non devono scendere oltre i 120 $\mu\text{mol/L}$, poiché una condizione di ipofenilalaninemia è associata ad un ritardo della crescita intrauterina. Infatti, a partire dalla 16-22 settimana di gestazione la crescita della placenta e del feto è così rapida da aumentare in fabbisogno proteico e quindi anche di Phe. (34). Nella gestione della Pku materna si tiene conto anche di altri fattori come proteine totali, iperemesi gravidica, i livelli bassi di Tyr e la concentrazione di acido folico. Pertanto, nella dieta e nell'assunzione di integratori vengono considerati tutti questi fattori e il loro bilanciamento al fine di non avere problemi legati allo sviluppo fetale e non necessitare di procedure aggiuntive durante l'assistenza prenatale o perinatale.

1.5 Eziologia genetica

L'HPA è più comunemente causata da varianti patogenetiche, ereditate in modo autosomico recessivo, nel gene PAH situato sul cromosoma 12, (Fig. 5) che portano alla produzione di monomeri PAH con attività ridotta o nulla o alla completa assenza di proteina PAH.



Fig.5: cromosoma 12 e localizzazione della PAH. (Ensembl.org)

Più raramente, la carenza funzionale di PAH è causata da un deficit di BH4 dovuto a difetti ereditari nella sintesi della biopterina (carenza di GTP ciclo idrolasi 1 (GTPC H) o di 6-piruvoil-

tetraidropterina sintasi (PTPS)) o nel riciclo di BH4 (carenza di diidropteridina reduttasi (DHPR) o di pterin-4a-carbinolamina deidratasi (PC D)).

La prima mutazione PKU identificata nel gene PAH è stata una singola variazione di base (G>A) nel sito donatore canonico di giunzione 5' dell'introne 12 (IVS 11-10nt G>A). Chiaramente la mutazione del sito donatore del sito di splicing provoca un'anomala maturazione dell'mRNA nell'HPA e una perdita dell'attività della proteina stessa (35)

Le prime ricerche genetiche sul gene hanno rivelato molte delle mutazioni, per lo più di tipo missenso, che tutt'oggi vengono riscontrate in maniera più frequente nei pazienti con PKU (36).

Ad oggi si conoscono più di 1.000 varianti di PAH catalogate in individui con PKU provenienti da tutto il mondo. Molti pazienti sono eterozigoti composti per due diverse varianti di PAH, il che porta a più di 2.600 genotipi noti che causano PKU. La maggior parte delle varianti PAH sono sostituzioni amminoacidiche missenso (58,3%), mentre le varianti frameshift (13,9%), le varianti di splicing (13,1%), le varianti nonsense (6,9%) e le sostituzioni sinonime (4,9%) sono meno comuni (37). Il 17,9% delle varianti patogenetiche si verifica nelle regioni introniche o non tradotte del gene PAH. Essendo la maggior parte dei pazienti eterozigoti composti la coespressione di due diversi alleli varianti può alterare la stabilità e l'attività della PAH rispetto all'attività prevista da uno dei due singoli alleli; sono noti esempi di complementazione inter-allelica sia positiva che negativa (38). Aggiungendo quindi una notevole complessità alla predizione genotipo-fenotipo (39). I genotipi che producono una certa attività residua di PAH possono essere associati a un fenotipo BH 4-responsivo, in cui la supplementazione orale di BH4 porta alla stabilizzazione del tetramero PAH (40), con conseguente aumento dell'attività epatica di PAH e della tolleranza al PHE nella dieta (41). È interessante notare che la forma autosomica dominante di carenza di GTPC H e di sapropterina reduttasi (SR) diminuisce l'attività della PAH, ma non abbastanza da determinare l'HPA (42). Una causa aggiuntiva di HPA è l'assenza del chaperone DNA JC 12, descritta di recente con una grande

rilevanza clinica, che compromette il ripiegamento e l'assemblaggio dei monomeri funzionali di PAH (43).

1.6 Screening

Oggi si effettua lo screening neonatale per la PKU nella maggior parte dei Paesi/regioni del mondo, ciò ha portato alla diagnosi precoce in periodo neonatale. In Italia lo screening è obbligatorio dal 1992, e prevede anche il test per l'ipotiroidismo congenito e la fibrosi cistica. Lo screening prevede la raccolta di una goccia di sangue mediante una puntura del tallone del neonato. Il momento migliore per il prelievo di sangue è tra le 24 e le 72 ore dopo la nascita ma questa tempistica può variare di paese in paese. Si raccoglie una goccia di sangue su carta da filtro (cartoncino Guthrie) in modo che i cerchi segnati sul cartoncino siano completamente saturi. La fase analitica del processo di screening consiste nell'analisi biochimica e nel rinvio del neonato per i test di conferma. Esistono diverse metodologie di screening di laboratorio per la valutazione delle concentrazioni di Phe nel sangue:

- Il test di inibizione batterica (BIA) - test di Guthrie, è stato il primo metodo utilizzato per valutare le concentrazioni di Phe nel sangue. Il sangue viene raccolto su un pezzo di carta filtro, Dried Blood Spot (DBS) e posto su una piastra con il terreno di coltura (un gel di agar), incubato con una specie batterica chiamata *Bacillus Subtilis* e la β -2-tienialanina, antagonista della fenilalanina. Il risultato è letto confrontando il diametro del campione di ogni disco di colonia alle colonie di una serie di dischi di riferimento con il contenuto di fenilalanina standard. Quando la coltura batterica non può crescere, il test è negativo (44). Questo test è semplice, poco costoso e adatto allo screening di un gran numero di singoli campioni; tuttavia, è un metodo semiquantitativo con una sensibilità limitata (ad esempio, la presenza di antibiotici può causare risultati falsi negativi).
- Microdosaggio Fluorimetrico (FMA), il metodo prevede una separazione cromatografica seguita da derivatizzazione e rilevazione fluorimetrica.

- Spettrometria di massa (TMS), che consente di misurare più aminoacidi. Infatti, sia la BIA che la FMA rilevano solo un singolo amminoacido, come il Phe, limite superato dall'avvento della TMS. Con la TMS si possono misurare contemporaneamente i livelli di fenilalanina, tirosina ed il loro rapporto (Phe/Tyr), consentendo inoltre di identificare contemporaneamente numerosi altri marker per ulteriori errori congeniti del metabolismo (45)

Mentre in passato la concentrazione di Phe di 240 $\mu\text{mol/l}$ (4 mg/dl) era un cut-off comunemente utilizzato per un risultato di screening positivo per la PKU, il TMS ha fornito un rilevamento più sensibile, con una concentrazione di cut-off di Phe di 120 $\mu\text{mol/l}$ (2 mg/dl) in combinazione con un rapporto Phe-Tyr >1,5 che dà un risultato di screening positivo per PKU (46).

1.7 La dietoterapia

Le più recenti linee guida sia statunitensi che europee per il controllo di tutti gli aspetti del deficit di PAH sono abbastanza coerenti tra loro. Entrambe le linee guida raccomandano di iniziare il trattamento quando le concentrazioni di Phe superano i 360 $\mu\text{mol/l}$, in quanto nei pazienti con PKU trattati è stato chiaramente dimostrato che concentrazioni più elevate di Phe determinano esiti non ottimali e non si ha ancora una certezza della buona riuscita della terapia solo quando i livelli di Phe superano i 600 $\mu\text{mol/l}$. Entrambe le linee guida raccomandano di mantenere le concentrazioni di Phe al di sotto di 360 $\mu\text{mol/l}$ nei bambini e nelle donne che desiderano avere figli. L'unica vera differenza tra queste linee guida è che quelle statunitensi raccomandano di mantenere la concentrazione di Phe nel sangue al di sotto di 360 $\mu\text{mol/l}$ sia negli adolescenti che negli adulti, mentre le linee guida europee raccomandano di mantenere le concentrazioni di Phe inferiori ai 600 $\mu\text{mol/l}$ nei soggetti di età superiore ai 12 anni. Altra differenza è che, mentre le linee guida statunitensi si basano sull'idea che più le concentrazioni di Phe si avvicinano a quelle fisiologiche, migliori sono i risultati, e che i nuovi trattamenti come la pegvaliase e la terapia genica, consentiranno ai pazienti di ottenere queste

concentrazioni di Phe (47). Le linee guida europee non forniscono dati certi sull'influenza delle concentrazioni di Phe tra 360-600 $\mu\text{mol/l}$ sul trattamento con pegvaliase.

La Phe è considerato un amminoacido essenziale, non essendo sintetizzato nell'organismo le sue concentrazioni nel sangue dipendono sostanzialmente dall'assunzione di Phe con la dieta. Questo principio rende il trattamento dietetico a basso contenuto di Phe il trattamento più efficace. Sebbene l'efficacia della dietoterapia sia stata ampiamente dimostrata come trattamento della PKU, essa non soddisfa appieno le esigenze nutrizionali di un'alimentazione normale. Ad esempio, è stato dimostrato come bambini sottoposti a dietoterapia presentino con maggior incidenza disturbi dell'attenzione e dell'apprendimento rispetto a bambini senza PKU (48).

Eppure, la mancanza di un controllo metabolico durante l'adolescenza e l'età adulta comporta la comparsa di effetti negativi sull'attenzione, umore, memoria e funzioni esecutive (49).

Il trattamento dietetico comprende tre aspetti:

- Restrizione di proteine naturali
- Integrazione con una miscela di amminoacidi priva di Phe
- Consumo di prodotti alimentari a basso contenuto proteico

L'entità della restrizione dell'apporto delle proteine naturali si basa su diversi fattori che tengono conto della quantità di Phe necessaria alla sintesi proteica netta (ad esempio, crescita in funzione dell'età, equilibrio tra anabolismo e catabolismo nei periodi di malattia) e al grado di gravità di PKU. Limitando l'apporto di proteine naturali nella dieta non solo si riduce la quantità di Phe assimilata ma anche di tutti gli altri amminoacidi e componenti delle proteine naturali (Vitamine, minerali, carnitina ecc..). Pertanto, è necessario abbinare alla dieta l'assunzione di un sostituto proteico, ovvero un integratore alimentare che contenga una miscela di amminoacidi priva di Phe e arricchita di Tyr (che nei soggetti sani viene prodotta a partire da Phe), e gli altri micronutrienti presenti generalmente nelle proteine naturali. L'alimentazione di questi pazienti è costituita in

gran parte da prodotti alimentari a basso contenuto proteico, consistono in carboidrati e grassi che sostituiscono pane e pasta consentendo ai pazienti di avere un profilo alimentare che in qualche modo imiti una normale abitudine alimentare (50)

È bene che i pazienti siano sottoposti a dietoterapia il più precocemente possibile per prevenire i danni da HPA o per avere miglioramenti laddove il danno si sia già verificato (51). Il trattamento viene personalizzato e migliorato in base alle esigenze del paziente, poiché la carenza di proteine e Phe ha notevoli effetti negativi tra cui: blocco della crescita, alopecia, anoressia ed eruzione eczematose (52).

Lo screening neonatale non è ancora in vigore in tutti i paesi del mondo, per cui a molte persone viene diagnosticata la PKU quando questa si è già manifestata con gravi disturbi neuro cerebrali. Un principio importante per l'introduzione dei sostituti proteici è il "*gently and slowly*", data la difficoltà e l'impegno dell'abitudine ai sostituti proteici, è importante che l'introduzione sia condotta con grande delicatezza e gradualmente. Il comportamento del paziente può migliorare anche dopo 6-12 mesi dall'inizio dell'introduzione della nuova dieta e potrebbe essere possibile anche un aumento della funzione neuro cognitiva (53). La grande sfida per i sostituti proteici è quella di cercare di migliorarne la completezza, l'assenza di Phe, il gusto e la facilità d'uso. Ad oggi vengono utilizzati dei glicomacropetidi (GMP), una componente del siero di latte priva di Phe. L'uso di questi GMP rappresenta un miglioramento rispetto ai classici sostituti proteici nel gusto e nel senso di sazietà, oltre che mostrare un ruolo negli aspetti immunologici riducendo l'infiammazione (54). Tuttavia, le proteine residue contenenti Phe non sono facilmente separabili, questo comporta una leggera presenza di Phe (1-2%), nonché una necessità di arricchimento di LNAA, come Tyr, che compromettono il gusto (55). Recentemente è stata sviluppata una formulazione in cui al sostituto proteico è stato aggiunto un rivestimento. La formulazione prevede un rivestimento costituito da etilcellulosa e alginati che racchiudono granuli di

amminoacidi (senza Phe), in questo modo il rilascio degli amminoacidi nel sangue è nettamente migliore, agevolando di conseguenza sintesi proteica e produzione di energia.

1.7.1 Fenilchetonuria e allattamento

Per molto tempo l'allattamento, subito dopo la nascita di bambini con PKU, è stato considerato impossibile data la scarsa conoscenza delle reali quantità di latte materno consumate dal neonato e di conseguenza il rischio di assunzioni di quantità incontrollate di Phe (56). Ad oggi, invece, il latte umano è decisamente raccomandato anche se in modalità ben precise. La prima consiste nel somministrare ai neonati il latte materno tramite biberon in modo da monitorare le esatte quantità di latte consumato. Questo approccio però ha implicazioni sociali non indifferenti impedendo l'allattamento diretto al seno alle neomamme. Altro approccio utilizzato meno restrittivo è quello di somministrare al neonato delle miscele di amminoacidi basate su concentrazioni target di Phe che vanno a compensare la quantità maggiore o minore di proteine totali assunte con il consumo di latte. Ad esempio, un bambino che assume una quantità maggiore di latte consumerà una quantità minore dell'integratore di amminoacidi prima dell'allattamento, in questo modo l'apporto di proteine totali rimane invariato (57). Nel caso contrario, una madre affetta da PKU può tranquillamente allattare il suo bambino indipendentemente dal fatto che sia affetto da PKU o meno, purché essa abbia una giusta adesione alla dietoterapia. Nel primo caso le concentrazioni di Phe del neonato affetto andranno comunque monitorate.

Lo svezzamento dei bambini affetti non è diverso da quello dei bambini sani anche se decisamente più povero di alimenti ad alto contenuto di proteine naturali. (11)

1.8 Terapie farmacologiche

In questo momento sono disponibili due farmaci per ridurre le concentrazioni di Phe nel sangue che possono fungere da supporto al controllo dietetico o sostituirsi completamente alla dieta nei casi più lievi. Il primo è la sapropterina dicloridrato (Kuvan®, BioMarin), una preparazione sintetica della tetraidrobiopterina (BH4), il cofattore naturale della PAH. Agisce come chaperone farmacologico, riducendo la concentrazione di Phe nel sangue e aumentando la tolleranza di Phe nella dieta nei pazienti responsivi alla BH4 con deficit di PAH. Per stabilire la responsività alla BH4 si effettua un test da carico di BH4 a 24 e 48h e valutarne la diminuzione di Phe. Gli esperti raccomandano il test di risposta alla sapropterina dicloridrato nei pazienti (non trattati) con concentrazioni di Phe nel sangue pari a 360-2000 $\mu\text{mol/L}$, tranne in quelli con due mutazioni nulle. Per i neonati, si raccomanda un test di carico con sapropterina dicloridrato per 24 ore; la responsività è definita come una diminuzione della Phe ematica $\geq 30\%$. L'endpoint principale per uno studio da 48 ore a 7 giorni è una diminuzione della Phe nel sangue, mentre l'endpoint da valutare durante uno studio più lungo è il miglioramento della tolleranza alla Phe. Un test di risposta a 48 ore dovrebbe essere preso in considerazione anche nelle pazienti in gravidanza che non riescono a raggiungere una Phe ematica $\leq 360 \mu\text{mol/L}$ con una dieta povera di Phe (58). Per quanto concerne l'allattamento, non sono stati segnalati problemi di sicurezza nei neonati di madri che allattavano durante il trattamento con sapropterina. Le linee guida statunitensi ed europee affermano che l'integrazione di sapropterina dicloridrato non è controindicata nelle donne che allattano e che rispondono al BH4, in aggiunta alla terapia dietetica (59).

Il secondo farmaco in commercio è la Phe-ammoniaca-liasi pegilata (pegvaliase; PALYNZIQ®, BioMarin), un farmaco iniettabile approvato dalla FDA nel 2018. La pegvaliase converte Phe in acido trans-cinnamico e ammoniaca, abbassando quindi radicalmente le concentrazioni di Phe nel sangue (60).

Il pegvaliase ha presentato alcuni inconvenienti, tra cui eventi avversi di gravità variabile da reazioni cutanee locali a reazioni più generali, artralgie e, molto raramente, risposte anafilattiche. Questi eventi si basano sullo sviluppo dell'inflammazione con anticorpi anti-PEG che causano gli eventi più gravi, e gli anticorpi anti pegvaliase che persistono e causano danni minori. Sulla base di queste controindicazioni è importante l'aderenza alla posologia in base alle linee guida per superare la risposta anticorpale e aumentare l'efficienza del farmaco (61). Dal 2019 è stato approvato anche in Europa da parte dell'EMA European Medicin Agency (EMA/161737/2019) in pazienti con età superiore ai 12 anni e con livelli di Phe superiori a 600 µmol/L

1.8.1 Nuove Frontiere terapeutiche

La grande sfida per le nuove terapie è quella di ripristinare completamente l'attività della PAH nel fegato. Sono in fase di sperimentazione alcune delle possibili terapie geniche che sfruttano metodiche differenti :

- *Editing genomico basato su CRISPR-Cas*; questi sistemi consentono la conversione delle coppie di basi C·G in T·A e viceversa, indipendentemente dalla formazione di rotture del dsDNA e dalla HDR (*homology-directed repair*). Si osserva nei topi una ripresa >20% dell'attività enzimatica (62).
- *Adeno-Associated Viruses (AAVs)*: lo studio si basa sulla somministrazione di un vettore virale contenente una forma ottimizzata del cDNA della fenilalanina idrossilasi umana come singola dose endovenosa nei topi mantenuti con una dieta normale. I risultati sono stati una sostenuta riduzione della fenilalanina sierica e livelli di tirosina normali. Tuttavia il DNA inserito non sembra integrarsi e quindi l'espressione dei geni inseriti può essere mantenuta solo per brevi periodi (63) ;

- *Vettori lentivirali*: L'utilizzo di questi vettori consentirebbe l'integrazione del gene in maniera stabile nel genoma ma che potrebbe comportare delle mutagenesi inserzionali pertanto le sperimentazioni sono ancora lontane dalle fasi cliniche (64);
- *mRNA PAH*; l'mRNA viene racchiuso in nanoparticelle lipidiche che vengono successivamente assorbite nel fegato comportando un ripristino dell'attività enzimatica negli epatociti escludendo una risposta anticorpale come avviene nell'utilizzo di vettori virali. L'mRNA dovrebbe essere somministrato periodicamente. Non sono ancora disponibili dati sull'uomo e sull'efficacia essendo una tecnica sperimentata per altre malattie metaboliche come Fabry (65) , galattosemia (66), acidemia metilmalonica (67) ed altri (11).

Altri approcci di terapie in fase di sperimentazione mirano a sostituire l'attività enzimatica. La terapia di sostituzione enzimatica al momento approvata è l'utilizzo della pegvaliase (PAL), quest'ultima tuttavia, può comportare delle forti reazioni di ipersensibilità. Per fronteggiare questo problema un processo sperimentale consente di produrre l'enzima nei globuli rossi di un donatore universale, che carichi di PAL vengono poi trasfusi in pazienti con PKU. Il globulo rosso protegge la PAL esogena dal sistema immunitario e contemporaneamente lo trasporta nel fegato consentendone l'attività negli epatociti. Sperimentazioni in modelli murini hanno ottenuto ottimi risultati riducendo la concentrazione ematica di Phe e prevenendo la disabilità nei topi. (68)(69).

In fase sperimentale sono anche nuove terapie orali che andrebbero a sostituire l'attuale sapropterina. Uno studio ha dimostrato come la sepiapterina (precursore della BH4) abbia maggiore capacità di entrare nelle cellule rispetto alla terapia attuale. Inoltre, le concentrazioni plasmatiche di BH4 erano nettamente superiori in volontari sani che hanno assunto sepiapterina rispetto ai volontari che hanno assunto sapropterina. La sepiapterina sembrerebbe raddoppiare anche le concentrazioni di BH4 nel liquido cerebrospinale (70).

Esistono anche studi che lavorano alla formulazione di sostituti o modifiche della pegvaliase. Un ceppo probiotico di *Escherichia coli Nissle* è stato ingegnerizzato per sovra esprimere PAL e colpire

direttamente la Phe intestinale (71). La somministrazione di questo probiotico a volontari sani e a soggetti affetti da PKU ha confermato la produzione di acido trans-cinnamico, ma non è stata riscontrata alcuna riduzione delle concentrazioni di Phe (72). Mentre le concentrazioni di Phe riflettono chiaramente il controllo metabolico nella PKU, gli effetti dei cambiamenti metabolici sulla funzione esecutiva, sul QI e sull'umore negli adulti con PKU sono più difficili da valutare. Pertanto, è necessario un continuo monitoraggio e una valutazione attenta di queste terapie su tutti gli aspetti a lungo termine della malattia.

2. SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo di questo studio è effettuare l'analisi molecolare del gene PAH, evidenziare possibili correlazioni tra genotipo e fenotipo e prevedere la responsività alla BH4 in un gruppo di pazienti affetti da iperfenilalaninemia in follow-up presso l'ospedale pediatrico di Bari. La genotipizzazione del gene PAH nei pazienti PKU è utile per caratterizzare il fenotipo in relazione al grado di severità della patologia, per classificare i pazienti come responsivi o no alla BH4 e per guidare nelle scelte riproduttive. Questo ci consentirebbe in futuro di poter formulare una dieta personalizzata in base alle esigenze di ogni singolo paziente integrata con la somministrazione di BH4; questa associazione, o la sola BH4 in monoterapia, potrebbe evitare i rischi nutrizionali e gli inconvenienti socioeconomici e psicologici conseguenti alle dieto-terapie.

Durante il primo anno del corso di dottorato sono stati analizzati i dati di pazienti affetti da Iperfenilalaninemia già studiati nel corso degli anni e presenti nei database del servizio di Genetica Medica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Riuniti Di Foggia, e nuovi pazienti reclutati nel corso dell'anno, in cui è stata effettuata la genotipizzazione del gene PAH, catalogate le mutazioni riscontrate, e studiata la predizione fenotipica e alla responsività alla BH4 grazie al database BIOPKU (www.biopku.org). Lo step successivo è stato quello di confrontare i fenotipi predetti dal sito BioPku e i relativi genotipi dei pazienti, e stabilire le mutazioni più frequenti tra omozigoti e eterozigoti composti. In conclusione, è stato confrontato l'esito del test da carico della tetraidrobiopterina su 28 pazienti con gli esiti previsti dal sito BioPku e i relativi fenotipi. Tutti i dati sono stati aggiornati man mano che ulteriori casi giungevano alla nostra attenzione nel corso dei tre anni di dottorato. È stato svolto un periodo di 3 mesi presso l'Università degli studi di Malta per effettuare ulteriori analisi su possibili geni coinvolti in pazienti che mostravano il fenotipo clinico ma che sono risultati negativi al test genetico. In particolare, sono stati sequenziati: il gene QDPR responsabile dell'espressione della Diidrobiopterina Reduttasi e il gene SPR che codifica

l'espressione della sepiapterina riduttasi. Auspichiamo che il confronto tra la predizione di responsività e la reale responsività al farmaco sui pazienti che seguono la terapia con sapropterina, validerà il software BioPku come importante strumento di predizione. L'analisi dei genotipi confrontati alla responsività e al fenotipo ci aiutano a capire l'andamento della malattia e studiare in che modo le compromissioni strutturali della PAH ne influenzino il decorso.

3. MATERIALI E METODI

Nella prima fase sono stati selezionati e arruolati pazienti previa consulenza genetica e firma del consenso informato. I pazienti a cui è stata diagnosticata la Fenilchetonuria durante il test di screening neonatale effettuato nel Centro Malattie Metaboliche e Genetiche dell'Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII di Bari e dall'Azienda Ospedaliera Policlinico Riuniti di Foggia, sono stati sottoposti successivamente a consulenza genetica ed è stata effettuata l'analisi genetica presso il nostro laboratorio per confermare la presenza della malattia.

3.1 Screening neonatale e reclutamento pazienti

La Fenilchetonuria viene identificata grazie all'utilizzo di programmi di screening neonatali nazionali, entrati in vigore in Italia dall'anno 1992, Il campione di sangue è di solito ottenuto pungendo il tallone del neonato nel secondo o terzo giorno di vita. Il sangue viene raccolto su un pezzo di carta filtro, Dried Blood spot (DBS). Ad oggi viene utilizzata la TSM (*Tandem Mass Spectrometry*), una tecnica che sfrutta la spettrometria di massa per misurare contemporaneamente i livelli di fenilalanina, tirosina ed il loro rapporto (Phe/Tyr).

Il risultato di un test di screening non costituisce però ancora una diagnosi definitiva: se il risultato è positivo indica il sospetto della malattia e, in questo caso, il centro di screening segnala il paziente al centro di cura, il quale provvederà ad eseguire ulteriori analisi biochimiche e molecolari a conferma o meno della patologia.

I livelli di Fenilalanina pretrattamento nel sangue vengono espressi in $\mu\text{mol/L}$. In base ai livelli di Phe i fenotipi vengono classificati come descritti in precedenza nel paragrafo 1.4.

Anche se ad oggi questa classificazione è obsoleta poiché si monitorano i livelli di Phe nel sangue durante il trattamento se maggiore di $360 \mu\text{mol/L}$, ai fini del mio studio ho mantenuto questa classificazione per distinguere i vari fenotipi in condizioni pre-trattamento. Dopo i programmi di

screening i pazienti vengono richiamati per esami più approfonditi e possono essere sottoposti a consulenza genetica per indagare sulla familiarità della malattia.

Dopodiché i campioni provenienti dal centro di riferimento regionale “Centro Malattie Metaboliche e Genetiche Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII di Bari” giungono al nostro laboratorio per essere genotipizzati.

3.2 Estrazione del DNA

Il DNA dei pazienti è stato estratto da campioni di sangue o tamponi buccali utilizzando un metodo automatizzato per estrattore MagCore® HF16 Plus. Il sangue periferico viene prelevato in provetta con anticoagulante, contenente sodio citrato 3.8%. Questo tipo di anticoagulante non interferisce né con i kit a disposizione per la fase di purificazione degli acidi nucleici né con la successiva procedura di amplificazione e con l'attività di alcuni enzimi di restrizione. Per i tamponi buccali, invece vengono utilizzati o tamponi semplici FLOQSwab® o FLOQSwab® hDNA Free.

3.2.1 Protocollo da sangue intero

- Pipettare 200/400 µl di campione di sangue intero equilibrato nella provetta MagCore®Sample;
- Allestire il T-Reck per l'estrazione automatica in macchina;
- Eseguire il programma Code 101 su MagCore®.

Se è richiesto DNA genomico privo di RNA, eseguire questi passaggi facoltativi:

- Aggiungere 4 µl di RNasi A (50 mg/ml; non fornito) nel lisato del campione;
- Incubare il campione a temperatura ambiente per 20 minuti.

Viene suggerito di selezionare 150 ~ 200µl di tampone di eluizione, poiché è possibile ottenere una migliore efficienza di eluizione in entrambi questi metodi (protocollo da sangue intero e Protocollo di modifica Buffy coat). Normalmente la concentrazione è superiore a 150 ng/µl sotto tale volume di eluizione.

- Il campione di DNA estratto viene conservato a 4°.

La Cartuccia che viene utilizzata ha Codice 101 (Fig.6).

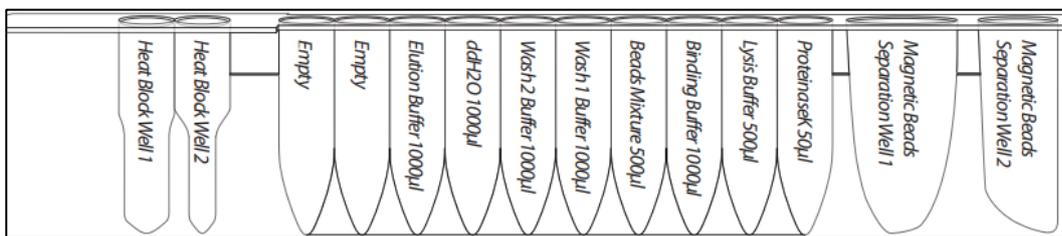


Fig 6: *contenuto cartuccia (lettura da sinistra a destra)*. 1. Pozzetto per blocco termico 1; 2. Pozzetto per blocco termico 2; 3. Vuoto; 4. Vuoto; 5. Buffer di eluizione 1000µl; 6. ddH₂O 1000µl, 7. Buffer di lavaggio 2 1000µl; 8. Buffer di lavaggio 1 1000µl; 9. Miscela di biglie 500µl; 10. Buffer di legame 1000µl; 11. Buffer di lisi 500µl; 12. Proteinasi K 50µl; 13. Pozzetto di separazione 1 biglie magnetiche; 14. Pozzetto di separazione 2 biglie magnetiche.

DESCRIZIONE

MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit è progettato per la purificazione del DNA totale (incluso DNA genomico, mitocondriale e virale) da sangue intero, plasma e siero utilizzando lo strumento di estrazione automatica MagCore®. Il metodo utilizza una cartuccia pre-riempita che contiene proteinasi K e sale caotropico per lisare le cellule e degradare le proteine. Il DNA si legherà alle biglie magnetiche rivestite di cellulosa. Dopo aver lavato via i contaminanti, il DNA purificato viene eluito mediante tampone di eluizione a basso contenuto di sale. Il DNA purificato, di circa 20-30 kb di lunghezza, è adatto per la PCR o altre reazioni enzimatiche.

3.2.2 Protocollo da tampone buccale

La raccolta dei campioni buccali di DNA viene effettuata con FLOQSwabs® o FLOQSwabs® hDNA Free in provetta con agente essiccante attivo. FLOQSwabs® hDNA Free è una linea di tamponi brevettati Copan specificatamente dedicata alla raccolta dei tamponi buccali per i Test Genetici, privi di DNA umano amplificabile e privi di DNasi e RNasi rilevabili.

ESECUZIONE DEL TAMPONE

Viene raccomandato al paziente di non mangiare, bere (eccetto acqua) e fumare.

Il tampone è incluso in una bustina sigillata. Quindi:

- Inumidire il tampone appoggiando la punta sulla lingua. Chiudere la bocca e mantenere la posizione del tampone a bocca chiusa per 10 secondi;
- Aprire leggermente la bocca, mettere il tampone in bocca e strofinare con decisione contro l'interno della guancia e le gengive inferiori per 10 secondi.

Dopo la raccolta, riposizionare il tampone nel tubo di plastica originale.

ESTRAZIONE DEL DNA DA TAMPONE BUCCALE

- Separare il tampone dal bastoncino e posizionare il tampone in una provetta per microcentrifuga da 2 ml,
- Aggiungere 500 µl o più di GT Buffer e vortexare per qualche secondo
- Aggiungere 20 µl Proteinasi K (10 mg/ml).
- Incubare il campione a 55°C per 30 minuti.
- Se nella provetta sono presenti residui insolubili, si trasferisce il surnatante nella colonna filtrante e centrifugare a piena velocità per 5 minuti per eliminarli.
- Pipettare 400µl di soluzione tissutale trasparente nella provetta di campionamento MagCore®.
- Allestire il T-rack dello strumento con il posizionamento dei campioni e puntali in maniera corretta, come indicato da manuale,

- Eseguire il programma Code 401 su MagCore®.
- Il campione di DNA estratto viene conservato a 4°.

Tale Kit è utilizzato per l'estrazione di DNA genomico da una varietà a tessuti animali, tessuti inclusi in paraffina, tamponi, macchie di sangue, campioni forensi e colture di lievito.

La Cartuccia utilizzata ha Codice 401 (fig.7).

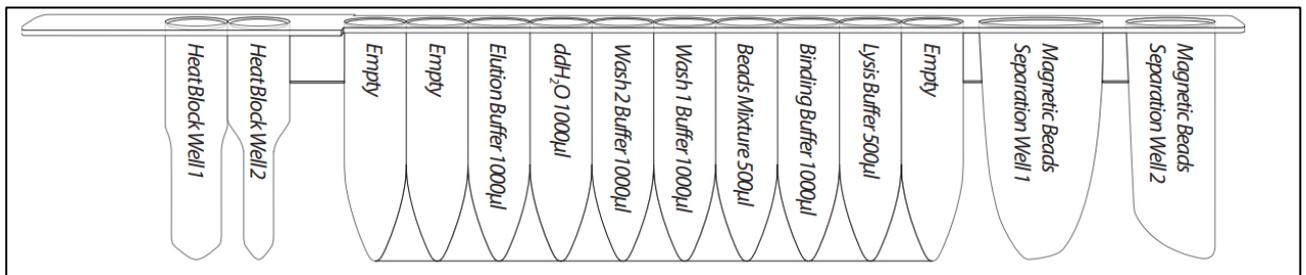


Fig 7: contenuto cartuccia (lettura da sinistra a destra). 1. Pozzetto per blocco termico 1; 2. Pozzetto per blocco termico 2; 3. Vuoto; 4. Vuoto; 5. Buffer di eluizione 1000µl; 6. ddH₂O 1000µl, 7. Buffer di lavaggio 2 1000µl; 8. Buffer di lavaggio 1 1000µl; 9. Miscela di biglie 500µl; 10. Buffer di legame 1000µl; 11. Buffer di lisi 500µl; 12. Vuoto; 13. Pozzetto di separazione 1 biglie magnetiche; 14. Pozzetto di separazione 2 biglie magnetiche.

DESCRIZIONE

MagCore® Genomic DNA Tissue Kit è progettato per la purificazione del DNA totale (incluso quello genomico, mitocondriale e virale) da una varietà di tessuti o cellule animali utilizzando lo strumento automatico MagCore®. Il metodo utilizza una cartuccia pre-riempita che contiene un sale caotropico per lisare le cellule e degradare le proteine. La proteinasi K viene aggiunta nelle prime fasi di incubazione a differenza della cartuccia utilizzata nell'estrazione da sangue intero dove è contenuta all'interno.

Il passaggi automatici di purifica del DNA tramite biglie è lo stesso che per la cartuccia 101 da sangue intero. Il kit di estrazione deve essere conservato a temperatura ambiente, la proteinasi K deve essere conservata a 2-8 °C all'arrivo e presenta un periodo di validità di 18 mesi.

3.3 Quantificazione DNA

Per quantificare il DNA genomico è stato utilizzato un metodo fluorimetrico con lo strumento Invitrogen Qubit® 2.0 Fluorometer by life technologies, un fluorimetro da banco altamente sensibile e accurato che permette di ottenere saggi di quantificazione Qubit™ basati sulla fluorescenza utilizzando dei coloranti specifici per dsDNA o, se necessari, coloranti per RNA e proteine. Consente di ottenere la massima sensibilità con elevati livelli di accuratezza anche usando solo di 1 µL di campione o campioni molto diluiti.

CALIBRAZIONE QUBIT® 2.0 FLUOROMETER

Prima di iniziare la quantificazione dei campioni, è necessario calibrare lo strumento utilizzando degli Standard forniti dal kit.

1. Scegliere il tipo di campione che si vuole analizzare (DNA, RNA, proteine).
1. Inserire lo Standard 1 nella camera dei campioni e premere Read.
2. La lettura dura circa 3 secondi.
3. Inserire lo Standard 2 e premere Read.
4. La calibrazione è completa dopo la lettura dello Standard n. 2
5. Si ottiene un grafico di riferimento Fluorescenza/Concentrazione degli standard con 2 punti rappresentanti gli Standard collegati da una retta.

Il principio del metodo è quello di rilevare la fluorescenza dei campioni, previa preparazione con colorante specifico, e per interpolazione sulla retta fluorescenza/concentrazione disegnata in base agli standard, calcolarne la concentrazione.

Dopo aver completato la calibrazione di Qubit® 2.0 Fluorometro utilizzando gli standard appropriati per il test, lo strumento è pronto per leggere i campioni.

Prima di essere quantificati, i campioni devono essere incubati con una

working solution (2 minuti per Qubit™ test del DNA)

1. Sulla schermata iniziale, scegliere il campione che si vuole utilizzare (in questo caso DNA).
2. Inserire un campione nella camera dei campioni e premere Read, la misurazione dura circa 3 secondi.
3. Al termine della misurazione, il risultato è visualizzato sullo schermo.
4. Il numero visualizzato è la concentrazione dell'acido nucleico o della proteina nella provetta che lo strumento ha calcolato per interpolazione con la retta del grafico Fluorescenza/Concentrazione ottenuto con gli Standard.
5. Per leggere il campione successivo, rimuovere il campione dalla camera, inserire il campione successivo e premere Read.
6. Ripetere questo procedimento fino a quando non sono stati letti tutti i campioni.
7. Le unità di misura possono essere opportunamente cambiate impostando correttamente lo strumento. In questo caso il dosaggio è stato espresso in ng/μl

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

È stato effettuato il sequenziamento diretto del gene PAH, amplificato mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) e sequenziato con metodo Sanger. Gli esoni e le sequenze introniche fiancheggianti gli esoni del gene PAH sono stati amplificati con protocollo standard di PCR. I primer utilizzati sono stati disegnati grazie ad appositi software come Primer3web version 4.1.0.

Esone	PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	Tm Annealing
1	P1fw	CTGGTGCTTCCTGGTTTCAT	56°
	P1rw	ATGAAACCAGGAAGCACCAG	
2	P2fw	CTTGCTTTGTCCATGGAGGT	56°

	P2rw	ACCTCCATGGACAAAGCAAG	
3	P3fw	GCCTGCGTTAGTTCCAGTGA	58°
	P3rw	AGTCACTGGAACAAACGCAGGC	
4	P4fw	TCCCCACTTCTGATCTCAGGCA	58°
	P4rw	TGCCTGAGATCAGAAGTGGGGA	
5	P5fw	TGTGTGGGGGTGTGTTTAAA	54°
	P5rw	TTTAAACACACCCCCACACA	
6	P6fw	CTAACCTGCGTTCTGCTGTG	56°
	P6rw	CACAGCAGAACGCAGGTTAG	
7	P7fw	CCATCTTTTCCTGCTGCAAGA	56°
	P7rw	TCTTGCAGCAGGAAAAGATGG	
8	P8fw	ACTGAGTCTGGCTTGGCTTAAA	58°
	P8rw	TTTAAGCCAAGCCAGACTCAGT	
9	P9fw	CAGGGTCTATGTGGGCTGTT	58°
	P9rw	AACAGCCCACATAGACCCTG	
10	P10fw	CCCTCCAGAAACACCCTCAT	56°
	P10rw	ATGAGGGTGTTCCTGGAGGG	
11	P11fw	GATGCAGCAGGGAATACTGATC	58°
	P11rw	GATCAGTATTCCCTGCTGCATC	
12	P12fw	CTCCAAATGGTGCCCTTCA	54°
	P12rw	TGAAGGGCACCATTGGAG	
13	P13fw	GCCCCACTTATCCCCTAGTGC	58°
	P13rw	GCACTAGGGGATAAGTGGGGC	

Tab1: Sequenze dei primer per ogni esone e temperatura di annealing utilizzata per l'amplificazione.

In due pazienti è stata svolta l'analisi anche sui geni QDPR e SPR coinvolti nella sintesi di BH4. I primer e le condizioni utilizzati sono descritti alla tabella 2 e tabella 3, anche in questo caso i primer sono stati disegnati con il software Primer3web version 4.1.0. (Tab2 e 3)

Esone	PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	Tm Annealing
1	QD1fw	CATTCGGAGCTGCGGGAG	55°
	QD1rw	CACCTTCCTCTAGACTGCC	
2	QD2fw	CCTCAAGAGATCCTCCCACA	55°
	QD2rw	GTGGTCACCTCTCCCCAG	
3	QD3fw	TCCGTAAAGATGCTAGCCTGT	56°
	QD3rw	CACCTAGTGCAAACCCAATCC	
4	QD4fw	ACCTGTGTCTCTGACCACTG	55°
	QD4rw	CATCCCATGAAAGTGCCCAG	
5	QD5fw	CCTCTTTCTCGTGGCTCTCT	56°
	QD5rw	GCTACAGTCAGACAAACGGT	
6	QD6fw	CCAGAGGCTCTAGGTTGTCC	56°
	QD6rw	ATGCATCCTCAGAGTCCCAG	
7	QD7fw	ACAAGCCGTCCTGTGAAG	57°
	QD7rw	AAACACAAGGCTGGACAAGG	

Tab2: Primer e condizioni per esoni del gene QDPR

Esone	PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	Tm Annealing
1	SPR1fw	GTTTGACTTCCGCCACCAG	54°
	SPR1rw	GCCCTTAAATTCCCCAGCG	

2	SRP2fw	GGTCTGCATGGGAAGAGGAT	56°
	SRP2rw	CTGTGGGTTGTTTCCTGGAG	

Tab3: *Primer e condizioni per esoni del gene SPR*

La PCR gene-specifica è stata condotta in un volume finale di 50 µl con il kit AB TAQ POLIMERASI (AB ANALITICA). (Tab4)

PREPARAZIONE DELLA MIX DI PCR			
REAGENTI	CI	CF	VI
Buffer	10X	1X	5 µl
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	2.5 µl
dNTP	5 mM	0.2 Mm	2 µl
Primer FW	100 µM	0.3 µM	0.15 µl
Primer RW	100 µM	0.3 µM	0.15 µl
Taq	5 U/µl	0.025 U/µl	0.25µl
DNA	12 µg	0.7 µg	3 µl
H ₂ O			36.95 µl

Tab4: *Preparazione della mix di PCR per singolo campione dal kit AB Analitica.*

I termal cycler sono stati impostati seguendo le condizioni standard di PCR descritti in tabella 5 (Tab5). Le temperature di annealing sono state calcolate per ogni esone come in tabella 1, 2 e 3.

Tm Iniziale	Tm Denaturazione	Tm Annealing	Tm Estensione	Tm Finale
95°	95°	...	72°	72°
3 min	30 sec	30 sec	45 sec	3 min

	x 34 cicli	
--	------------	--

Tab5: Cicli e Temperature al termal cycler

Terminata la reazione di PCR i prodotti possono essere conservati a 4° overnight.

3.4.1 Controllo della reazione di PCR: elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti delle varie reazioni di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio, precedentemente preparato in laboratorio sotto cappa chimica con TAE (Tris Acetato EDTA) 1X, Agarosio 2% ed intercalante SYBR Safe DNA gel Stain (diluito 1:10.000). Al termine della corsa le bande di DNA sono visualizzate posizionando il gel su di un trans illuminatore a raggi UV. Il confronto tra l'altezza delle bande relative ai campioni amplificati e l'altezza delle bande del marker, permette di valutare:

- la corretta riuscita della reazione di amplificazione;
- l'assenza di amplificazione aspecifica mediante il confronto del peso molecolare dell'amplificato ottenuto con quello atteso;
- l'assenza di bande nella corsia del controllo negativo che esclude la presenza di DNA estraneo contaminante.

3.4.2 Purifica dei prodotti di PCR

Prima di procedere alla reazione di sequenziamento, i prodotti di PCR sono stati purificati con piastre Plates MultiScreen PCR μ 96 (Millipore) utilizzando il sistema sottovuoto (EMD Millipore) su piastre che presentano sul fondo dei pozzetti una membrana in gel di silice in grado di trattenere il DNA e di far passare gli altri contaminanti di dimensioni minori. L'apparato di purificazione è composto da una pompa da vuoto, da una valvola di controllo della pressione, dal supporto per le piastre, dai tubi di collegamento e da una beuta di raccolta delle impurità.

Le fasi del protocollo di prima purificazione da noi utilizzato in laboratorio sono le seguenti:

- Portare il volume di PCR a 100 μ l con H₂O milliQ;
- Pipettare il campione all'interno del pozzetto della piastra;
- Aspirare il volume applicando una depressione di 20atm fino a completa disidratazione (~8'') per permettere il passaggio attraverso le maglie del gel di primer, basi, sali, buffer e dimeri di primer mentre il prodotto di PCR resta nel pozzetto avendo dimensioni maggiori;
- Far adsorbire su carta l'eventuale condensa creatasi sulla base della piastra;
- Aggiungere 25 μ l di H₂O milliQ all'interno del pozzetto;
- Mettere la piastra ad agitare per 10' a 250 Revs/min sull'apposito Orbital shaker;
- Aspirare il prodotto e conservare in una provetta da 0,2 μ l.

3.5 Sequenziamento diretto

Il metodo di sequenziamento diretto si basa sulla tecnica del sequenziamento enzimatico di Sanger messa a punto nel 1977, che prevede l'uso di uno stampo di DNA a singola elica, un solo primer (Fw o Rw), una DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) e dideossinucleotidi (ddNTP). La doppia elica di DNA è denaturata per consentire al primer di ibridarsi alla regione da sequenziare.

La polimerasi utilizzando il primer come innesco della reazione incorpora i dNTP o i ddNTP complementari, secondo un principio di competizione. Ogni qualvolta l'enzima inserisce il ddNTP, essendo questo privo del gruppo 3' OH, provoca uno stop della reazione di polimerizzazione. Il rapporto di concentrazione di ddNTP e dNTP è tale che l'enzima al termine della reazione produce una serie di frammenti che differiscono, uno dall'altro, di un solo nucleotide in 3' e tutti contengono il primer all'estremità 5'. I ddNTP sono marcati mediante un fluoroforo (particolari gruppi cromofori, in grado di generare colorazione fluorescente o fosforescente in determinate condizioni), la rodamina. Questa molecola produce uno spettro di emissione caratteristico per ogni ddNTP cui è legato ed ha la

caratteristica di produrre un segnale omogeneo e con bassissimo rumore di fondo. La DNA polimerasi usata nella reazione di sequenziamento è la T7 DNA polimerasi ed è caratterizzata da:

- elevata processività, che riduce il distacco precoce della polimerasi dal filamento stampo;
- attività esonucleasica 3'→5' bassa o nulla, necessaria per ridurre la capacità di discriminazione tra il dNTP e i suoi analoghi ddNTP;
- attività esonucleasica 5'→3' bassa o nulla, che evita l'inserimento di nucleotidi all'estremità 5' che deve restare invariata (73);

3.5.1 Reazione di marcatura

Il processo di sequenziamento mediante dideossinucleotidi è stato svolto utilizzando il kit BigDie Terminator v3.1 Cycle sequencing RR-100, i primer utilizzati sono stati preventivamente diluiti dall'aliquota di partenza a concentrazione 1 ng con un fattore di diluizione 1:100.

Le condizioni sono riassunte nella tabella 6.

Reagenti per il sequenziamento	Volume
Buffer 5X	2µl
Primer FW o RW	1,6µl
MIX 3.1	1µl
DNA (PCR Purificata)	1,5µl
H ₂ O	3,9µl
Volume finale	10µl

Tab.6: *Mix e condizioni di Marcatura.*

Nella MIX 3.1 del kit sono già presenti sia la polimerasi che i deossinucleotidi marcati.

Al termine del processo di sequenziamento mediante dideossinucleotidi, il prodotto ottenuto è sottoposto ad un'ulteriore purificazione. Per questa seconda purificazione abbiamo utilizzato il BigDye® X-Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) che, a differenza di altri metodi di purificazione, richiede solo l'aggiunta di 2 reagenti che possono essere dispensati assieme in una unica mix di purificazione o sequenzialmente per ogni singolo campione. La purificazione si basa su un sistema di biglie e buffer che consentono di far rimanere in sospensione solo i prodotti di marcatura da sequenziare. La purificazione è stata eseguita in conformità al protocollo fornito dal produttore utilizzando i seguenti reagenti:

- XTerminator™ Solution per l'eliminazione dei dideossinucleotidi non incorporati e sali liberi;
- SAM™ Solution – per aumentare l'efficienza di purificazione. (74)

3.5.2 Sequenziamento

I prodotti della reazione di marcatura in seguito a seconda purificazione con BigDye® X-Terminator™ Purification Kit, sono stati caricati su piastre da 96 pozzetti e preparati per essere caricati in macchina.

La piastra viene fatta agitare per 30 min a 18.000 rpm e successivamente centrifugata per 3 minuti a 18.000 rpm.

Sono stati utilizzati i sequenziatori: ABI 3130xl, 3500 e SeqStudio (Applied Biosystems). I file di sequenziamento sono stati elaborati utilizzando il software Sequence Analysis (Applied Biosystems), assemblati e analizzati utilizzando il software Sequencer 4.7.

3.6 Elaborazione dati

Successivamente i dati sono stati catalogati con strumenti Office e GraphPadPrism per la costruzione di grafici, tabelle e dati statistici. Sono state effettuate le comparazioni tra i genotipi e i fenotipi che saranno spiegate nel successivo capitolo 4.

Le varianti note sono state studiate in database bioinformatici quali HGMD (The Human Gene Mutation Database), Ensembl, ClinVar e Varsome. Nei database è possibile verificare la variante riscontrata come patogenetica o benigna e confrontarla con i dati presenti in letteratura. Inoltre, la sequenza dell'intero gene su Ensembl è fondamentale per monitorare la lettura della sequenza durante l'analisi dell'elettroferogramma con il software Sequencer. Grazie all'utilizzo del database bioinformatico BIOPKU (www.biopku.org) è stato possibile confrontare i genotipi ottenuti con la predizione di responsività alla BH4 e predizione fenotipica. Il sito confronta i dati presenti in letteratura sulle attività enzimatiche ridotte associate alle varie mutazioni e ne predice il fenotipo clinico cPKU, mPKU, mHPA. In base ai dati raccolti dal database in automatico inserendo le varianti per due alleli ne predice anche la responsività alla BH4. Il sito fornisce in percentuale quante casistiche rileva per ogni fenotipo associato al determinato genotipo e quante casistiche sono associate ad una responsività positiva (riduzione della Phe ematica del 30% dopo 24h dall'assunzione del cofattore), responsività negativa (riduzione inferiore al 20%), responsività bassa (riduzione tra il 20 - 30 %)

3.7 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®)

La Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) è una tecnica gold-standard semiquantitativa, non automatizzata che viene utilizzata per determinare il numero di copie relative in una singola reazione basata su PCR multiplex. Il principio si basa sull'ibridazione di sonde sequenza-specifiche rispetto ad una sequenza di riferimento, alla loro ligazione e conseguente amplificazione. Ogni mix è disponibile in diversi formati: 25, 50 e 100 reazioni. Nel nostro caso è stata utilizzata una mix per 50 reazioni.

Il protocollo MRC-HOLLAND prevede l'utilizzo di sonde specifiche Probemix p055-d1 per lo studio del gene PHA.

Come da protocollo i campioni sono stati prima dosati e in seguito sottoposti alle fasi di denaturazione, ibridazione, ligazione e PCR (tab 7)

Tm	Tempo	Cicli	Mix
DNA Denaturazione			
98°	5 min	1	I campioni sono diluiti e portati ad una concentrazione di 40 ng/μL per un volume finale di 5μL
25°	pausa	1	
Ibridazione			
95°	1 minuto	1	1.5 μl MLPA Buffer + 1.5 μl Probemix aggiunti per ogni campione
60°	16- 20 ore	1	
Ligazione			
54°	Pausa	1	viene preparata una master mix con : 25 μl di H2O ultrapure + 3 μl ligase buffer A + 3 μl ligase buffer B + 1 μl
54°	15 min	1	

98°	5 min	1	di ligase-65 enzime. Durante lo step una alla pausa di 54° vengono aggiunti 32 in ogni pozzetto per campione con i campioni ancora nel termal. Terminata la procedura la corsa può riprendere con la temperatura successiva.
20°	pausa	1	
PCR			
95°	30 sec	35	si prepara una mix contenente: 7.5 µl H ₂ O ultrapure + 2 µl SALSA PCR Primer +0.5 µl SALSA Polimerase. 10 µl vengono dispensati nei pozzetti
60°	30 sec		
72°	60 sec		
72°	20 min	1	terminata la reazione di ligazione, fuori dal termal a temperatura ambiente
15°	pausa	1	

Tab7: *Protocollo e condizioni per MLPA*

Prima di procedere alla separazione elettroforetica capillare dei frammenti si procede con una Mix contenente 0.3 µl di LIZ GS 500 Standard + 9 µl di Formalmide, a cui si aggiungerà 0.7 µl di PCR reaction per ogni campione per un volume finale di 10 µl in ogni pozzetto. I prodotti vengono incubati 3 min a 86° + 2 min a 4°. Terminata l'incubazione con lo standard si procede al caricamento trasferendo i prodotti in piastra e caricati nello strumento.

La separazione e quantificazione dei frammenti è stata effettuata tramite ABI 3130xl (Applied Biosystems) (75). La successiva analisi dei dati è stata effettuata tramite software Coffalyser.

3.8 Test da carico con la tetraidrobiopterina (BH4)

Per discriminare le forme di iperfenilalaninemia (PKU da deficit di cofattore) e per valutare la responsività dei pazienti alla BH4 viene utilizzato il test da carico con tetraidrobiopterina (BH4). Il test prevede la somministrazione di BH4 (20 mg/Kg) e successiva quantificazione di Phe nel sangue rispettivamente dopo 4, 8, 24 e 48 ore. Una riduzione del 30% di Phe nel sangue dopo 24h dalla somministrazione viene valutata come responsività positiva (76). Il test viene eseguito nell'ospedale pediatrico Giovanni XXIII di Bari, di cui ci sono state inoltrate solo le responsività positive o negative dei pazienti che hanno deciso di sottoporre al Test.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati analizzati i genotipi di 290 pazienti in totale. Di questi alcuni già analizzati e presenti nei nostri database negli ultimi 10 anni, altri giunti all'attenzione e studiati ex-novo durante il corso degli anni di dottorato. In particolare, 203 pazienti già presenti sui nostri database e studiati dal 2015 al 2019, di cui sono stati raccolti i dati e le informazioni sulle mutazioni, il fenotipo e la risposta al test da carico della BH4; e 87 pazienti studiati ex novo e sequenziati dal 2019 in poi nel corso del dottorato. I pazienti provengono da diverse zone d'Italia e reclutati dall'Ospedale Pediatrico "Giovanni XXIII" di Bari e dal Policlinico - Riuniti di Foggia. Alcuni giunti all'attenzione in seguito a screening neonatale, altri giunti per conferma della presenza di mutazioni in fase adulta o adolescenziale. Di questi sono risultati:

- 230 Eterozigoti Compositi
- 35 Eterozigoti (portatori)
- 25 Omozigoti

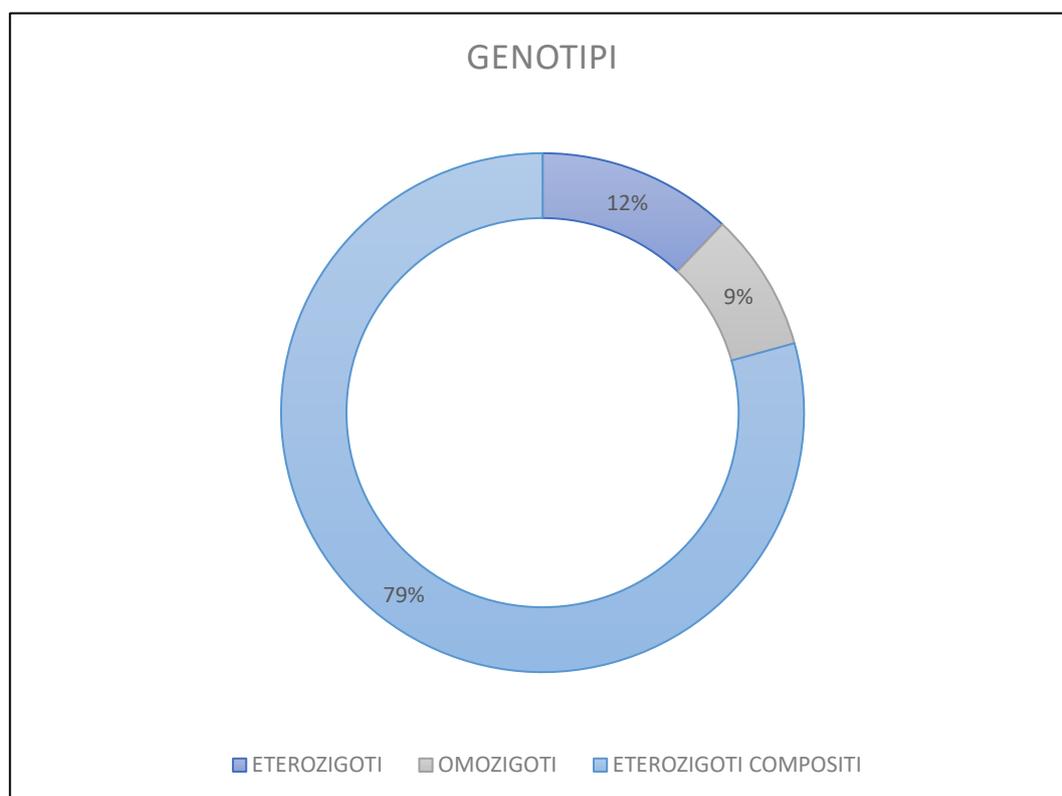


Fig 8: *Genotipi riscontrati*. Si intende, in percentuale, la frequenza di eterozigoti compositi, omozigoti, ed eterozigoti (portatori).

Questo dato è in linea con la caratteristica tendenza della malattia ad avere una maggiore frequenza di eterozigosi composti rispetto agli omozigoti.

Dei 35 Portatori quasi la totalità sono giunti alla nostra attenzione solo per studi familiari e per individuale la stessa mutazione di un eventuale parente affetto oppure pazienti i cui valori di Phe nel sangue erano borderline per cui è stato necessario escludere la presenza genetica della malattia. Essendo la fenilchetonuria una patologia autosomica recessiva solo i pazienti omozigoti o eterozigoti composti sono affetti. In tabella 8 sono raccolte tutte le mutazioni riscontrate, in totale sono state studiate 80 mutazioni e calcolata la frequenza allelica sulla popolazione presa in esame (Tab8).

Mutazione		N. Alleli	Tipo di Mutazione	Frequenza allelica
c.47_48del	p.Ser16Ter	4	Delezione	0,7%
c.116_118del	p.Phe39del	10	Delezione	1,7%
c.164_165del	p.Phe55Ter	3	Delezione	0,5%
c.146 G>A	p.Gly46Ser (p.G46S)	1	Missenso	0,2%
c.143T>C	p.Leu48Ser (p.L48S)	28	Missenso	4,8%
c.158G>A	p.Arg53His (p.R53H)	2	Missenso	0,3%
c.284_286del	p.Ile95del	4	Delezione	0,7%
c.193A>G	p.Ile65Val (p.I65V)	6	Missenso	1,0%
c.204A>C	p.Arg68Ser (p.R68S)	1	Missenso	0,2%
c.226G>T	p.Glu76Ter (p.E76*)	1	Nonsense	0,2%
c.231T>A	p.Tyr77Ter (p.Y77*)	1	Nonsense	0,2%
c.275C>T	p.Thr92Ile (p.T92I)	4	Missenso	0,7%
c.311C>A	p.Ala104Asp (p.A104D)	4	Missenso	0,7%
c.441+5 G>T	IVS4 + 5 G>T	17	Splicing	2,9%
c.441+1 G>A	IVS4 + 1 G>A	5	Splicing	0,9%
c.400C>T	p.Gln134Ter (Q134*)	3	Nonsense	0,5%
c.361T>C	p.Phe121Leu (p.F121L)	1	Missenso	0,2%

c.442-5C>G	IVS4 -5 C>G	2	Splicing	0,3%
c.464G>A	p.Arg155His (p.R155H)	2	Missenso	0,3%
c.473G>A	p.Arg158Gln (p.R158Q)	17	Missenso	2,9%
c.493G>C	p.Ala165Pro (p.A165P)	1	Missenso	0,2%
c.501C>A	p.Asn167Lys (p.N167K)	2	Missenso	0,3%
c.506G>A	p.Arg169His (p.R169H)	2	Missenso	0,3%
c.503del	p.Tyr168SerfsTer27	2	Delezione	0,3%
c.592_613del	p.Tyr198SerfsTer136	13	Delezione	2,2%
c.520A>G	p.Ile174Val (p.I174V)	1	Missenso	0,2%
c.526C>T	p.Arg176Ter (p.R176*)	2	Nonsense	0,3%
c.527G>T	p.Arg176Leu (p.R176L)	1	Missenso	0,2%
c.527G>A	p.Arg176Gln (p.R176Q)	2	Missenso	0,3%
c.529G>C	p.Val177Leu (p.V177L)	4	Missenso	0,7%
c.529G>A	p.Val177Met (p.V177M)	2	Missenso	0,3%
c.533A>G	p.Glu178Gly (p.E178G)	3	Missenso	0,5%
c.545A>G	p.Glu182Gly (p.E182G)	1	Missenso	0,2%
c.587 C>A	p.Ser196Tyr (p.S196Y)	1	Missenso	0,2%
c.601 C>T	p.His201Tyr (p.H201Y)	2	Missenso	0,3%
c.649T>G	p.Cys217Gly (p.C217G)	2	Missenso	0,3%
c.653G>T	p.Gly218Val (p.G218V)	1	Missenso	0,2%
c.688G>A	p.Val230Ile (p.V230I)	6	Missenso	1,0%
c.510-2A>G	IVS6 -2 A>C	2	Splicing	0,3%
c.715G>A	p.Gly239Ser (p.G239S)	3	Missenso	0,5%
c.721C>T	p.Arg241Cys (p.R241C)	5	Missenso	0,9%
c.722G>A	p.Arg241His (p.R241H)	3	Missenso	0,5%
c.727C>T	p.Arg243Ter (p.R243*)	10	Nonsense	1,7%

c.734T>C	p.Val245Ala (p.V245A)	11	Missenso	1,9%
c.754C>T	p.Arg252Trp (p.R252W)	4	Missenso	0,7%
c.781C>T	p.Arg261Ter (p.R261*)	15	Nonsense	2,6%
c.782G>A	p.Arg261Gln (p.R261Q)	35	Missenso	6,0%
c.800A>G	p.Gln267Arg (p.Q267R)	1	Missenso	0,2%
c.841C>T	p.Pro281Leu (p.P281L)	13	Missenso	2,2%
c.842+1G>A	IVS7 +1 G>A	1	Splicing	0,2%
c.842+3G>C	IVS7 +3 G>C	1	Splicing	0,2%
c.898G>T	p.Ala300Ser (p.A300S)	49	Missenso	8,4%
c.853C>T	p.His285Arg (p.H285R)	1	Missenso	0,2%
c.859C>A	p.Leu287Val (p.L287V)	6	Missenso	1,0%
c.870T>A	p.His290Gln (p.H290Q)	1	Missenso	0,2%
c.898-7A>G	IVS8 -7 A>G	3	Splicing	0,5%
c.916A>G	p.Ile306Val (p.I306V)	2	Missenso	0,3%
c.926C>T	p.Ala309Val (p.A309V)	1	Missenso	0,2%
c.965C>G	p.Ala322Gly (p.A322G)	2	Missenso	0,3%
c.970A>G	p.Ile324Val (p.I324V)	1	Missenso	0,2%
c.1012G>T	p.Asp338Tyr (p.D338Y)	1	Missenso	0,2%
c.1028A>G	p.Tyr343Cys (p.Y343C)	3	Missenso	0,5%
c.1056del	p.Glu353AsnfsTer47	2	Delezione	0,3%
c.1066-8G>C	IVS10-11 G>A	54	Splicing	9,3%
c.602_603del	p.His201ArgfsTer4	2	Delezione	0,3%
c.1074A>C	p.Leu358Phe (p.L358F)	1	Missenso	0,2%
c.1097C>A	p.Pro366His (p.P366H)	1	Missenso	0,2%
c.1130A>G	p.Tyr377Cys (p.Y377C)	1	Missenso	0,2%
c.1139C>T	p.Thr380Met (p.T380M)	7	Missenso	1,2%
c.1157A>G	p.Tyr386Cys (p.Y386C)	1	Missenso	0,2%

c.1162G>A	p.Val388Met (p.V388M)	1	Missenso	0,2%
c.1169A>G	p.Glu390Gly (p.E390G)	11	Missenso	1,9%
c.1208C>T	p.Ala403Val (p.A403V)	93	Missenso	16,0%
c.1220C>T	p.Pro407Leu (p.P407L)	2	Missenso	0,3%
c.1223G>A	p.Arg408Gln (p.R408Q)	1	Missenso	0,2%
c.1222C>T	p.Arg408Trp (p.R408W)	16	Missenso	2,8%
c.1241A>G	p.Tyr414Cys (p.Y414C)	5	Missenso	0,9%
c.1243G>A	p.Asp415Asn (p.D415N)	4	Missenso	0,7%
c.1315+1G>A	IVS12 +1 G>A	3	Splicing	0,5%
c.1315+2T>C	IVS12 +2 T>C	2	Splicing	0,3%

Tab.8: *Mutazioni riscontrate nei 290 pazienti*. Il totale degli alleli è il doppio dei pazienti omozigoti presi in esame, più 35 portatori in cui è riscontrata solo una mutazione, per cui viene preso in considerazione solo l'allele riportante la mutazione e non quello wild type. Le percentuali sono calcolate in base al doppio degli alleli secondo la formula : $f(A) = (2 \times n^\circ \text{ di omozigoti AA} + n^\circ \text{ di eterozigoti Aa}) / (2 \times n^\circ \text{ totale di individui})$

La mutazione p.Ala403Val risulta essere tra le più frequenti riscontrate: 83 casi su 290 della coorte di pazienti risultano avere questa mutazione in omozigosi (10 pz) o eterozigosi (i portatori con questa mutazione sono stati 3 pz, i restanti 70 pz sono eterozigoti composti di questa mutazione in associazione con altre). Questa variante colpisce il dominio catalitico della PAH compromettendone la funzionalità. È tra le varianti più diffuse e associate alla malattia, già descritta e riportata in diversi studi di associazione condotti in Italia e nel resto del mondo (77). La variante consiste nella sostituzione di una Citosina con una Timina al nucleotide 1208 (c.1208 C>T), che si traduce in un cambio del codone (GCT/GTT), portando alla sostituzione di un'alanina con una valina in posizione amminoacidica 403. In studi sulla funzionalità enzimatica in vitro questa mutazione in eterozigoti composti in associazione con altre mutazioni missenso sembrerebbe ridurre la funzionalità enzimatica ma non abbastanza da manifestare un fenotipo grave (78).

Sono state riportate in totale:

- 56 mutazioni missenso

- 10 mutazioni di splicing
- 8 delezioni
- 6 mutazioni nonsense (Fig. 9)

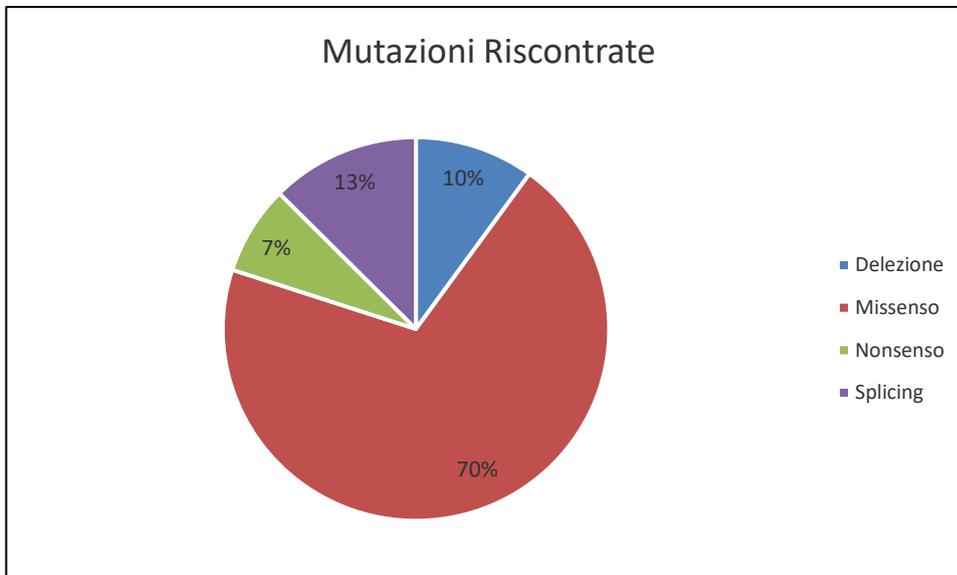


Fig 9: *Tipi di mutazione riscontrate rapportate tra loro.* Le mutazioni missenso risultano il 70%, per cui più della maggioranza dei casi.

La maggior parte delle mutazioni riscontrate è costituito da varie mutazioni missenso, 56 mutazioni che rappresentano il 70% delle mutazioni totali. Seguito da 10 mutazioni di splicing (13%) che compromettono sia siti donatori che siti accettori. Di quest'ultime la mutazione IVS10 -11 G>A è stata la più frequente, 52 pazienti hanno presentato questa mutazione di cui 2 in omozigosi con una frequenza allelica di 9,3%. Questo tipo di mutazione è molto frequente in Bulgaria, Italia e Turchia, ed è tra le più frequenti cause di fenilchetonuria classica in questa parte d'Europa. La mutazione è un cambiamento nucleotidico di una guanina con un'adenina nella posizione 546 nell'introne 10 del gene PAH, 11 bp a monte dell'esone 11. Attiva un sito di giunzione criptico e determina un inserimento in-frame di 9 nucleotidi tra l'esone 10 e l'esone 11 dell'mRNA. In uno studio del 1991 (79) si è visto come in pazienti omozigoti per la mutazione IVS10-11 G>A la quantità di PAH espressa sia normale ma con attività enzimatica compromessa. Questa perdita di attività enzimatica è probabilmente

causata da cambiamenti conformazionali derivanti dall'inserimento di tre amminoacidi aggiuntivi (Gly-Leu-Gln) tra le normali sequenze codificate dell'esone 10 e dell'esone 11 (79). Delle 8 delezioni quella più frequente è stata riscontrata in 10 pazienti ed è una delezione di 2 nucleotidi in posizione c.116_118del, questa delezione causa una delezione in frameshift p.Phe39del. Frequente anch'essa nella popolazione europea (80). La mutazione p.Arg261Ter (p.A261*) è la mutazione nonsense più frequente con 14 pazienti che mostravano la mutazione di cui 1 omozigote ed una frequenza allelica del 6%. La sequenza del codone corrispondente cambia da CGA a TGA nel codone 261 dell'esone 7 trasformando l'Arg261 in un codone di stop. Nello stesso punto si è riscontrata la mutazione p.Arg261Gln (p.A261Q con codone che cambia da CGA a CAA) in 35 alleli. Questo il secondo difetto rilevato nel codone 261 del gene della fenilalanina idrossilasi indica questo codone come punto sensibile per la mutazione (81).

Lo studio dei genotipi è proseguito sui pazienti omozigoti ed eterozigoti composti, quindi individui affetti da PKU. Gli eterozigoti portatori sono stati trascurati poiché individui non affetti, saranno descritti più avanti dei casi particolari di portatori che presentavano il fenotipo clinico (paragrafo 4.3).

I genotipi dei 25 omozigoti sono riassunti in tabella 9. Sono in relazione le mutazioni in base alla frequenza in relazione al totale dei pazienti e al totale degli omozigoti.

Mutazione	N. Pazienti	%l Totale di Pazienti	% Totale di Omozigosi
p.A300S	2	0,7%	8 %
p.A403V	10	3,4%	40%
p.IVS 10-11 G/T	2	0,7%	8%
p.R261Q	4	1,4%	16%
p.D415N	1	0,3%	4%
p.I65V	1	0,3%	4%
IVS4+5 G>T	1	0,3%	4%

p.L48S	1	0,3%	4%
p.Q134*	1	0,3%	4%
p.Q261*	1	0,3%	4%
p.R408W	1	0,3%	4%
Tot	25		

Tab.9: *frequenza dei genotipi degli omozigoti in relazione ai pazienti totali e al totale degli omozigoti. Le percentuali si riferiscono al numero dei pazienti con una determinata mutazione in omozigosi sul totale di pazienti e sul totale degli omozigosi*

Come per il totale dei pazienti la mutazione più frequente risulta essere la p.A403V c.1208 C>T. I pazienti con questa mutazione in omozigosi sono stati 10 (3,4% del totale e 40% degli omozigoti). La seconda mutazione più frequente è stata p.R261Q c.782 G>A, 4 pazienti su 25 presentavano questa mutazione (1,4% del totale e 16% degli omozigoti). Questa mutazione risulta essere abbastanza frequente nella popolazione con PKU in Europa (82). Il residuo 261 rientra nella porzione del dominio catalitico della proteina; tuttavia, questa mutazione è associata ad un fenotipo mPKU. Seppure in minore frequenza (soltanto un caso per ognuno) ci sono stati casi di omozigosità per mutazioni nonsense (p.R261* e p.Q134*) che risultano in proteine tronche. La prima mutazione p.R261* c.400C>T è molto frequente nella popolazione nord caucasica (83), mentre la mutazione p.Q134* c.400 C>T è stata già riportata in altri studi di associazione svolti su popolazioni del sud Italia (84). Ci sono stati anche 3 casi di omozigosità con mutazioni di splicing: 2 pazienti con mutazione IVS10-11 G>T e un paziente con mutazione IVS4+5 G>T.

Le mutazioni sono state studiate nel database BioPku che confronta diverse casistiche dando una predizione fenotipica e di responsività alla BH4 in formulazione farmacologica.

Mutazione	N. Casi	Predizione Fenotipica	Predizione Responsività
		BioPku	BH4 BioPku
p.A300S	2	HPA	Si 60% Bassa 40%
p.A403V	10	HPA	Si 100%
IVS 10-11 G/T	2	cPKU 98.36% mPKU 1.64%	No 93.86% Bassa 6.14%
p.R261Q	4	cPKU 27.24% mPKU 72.76%	Si 74% No 22% Bassa 4%
p.D415N	1	HPA	IGNOTA
p.I65V	1	IGNOTA	IGNOTA
IVS4+5 G>T	1	cPKU 93.33% mPKU 6.67%	No 100%
p.L48S	1	cPKU 32.26% mPKU 66.67% HPA 1.08%	Yes 73.68% No 17.54% Bassa 8.77%
p.Q134*	1	IGNOTA	IGNOTA
p.R261*	1	cPKU	No 80% Bassa 20%
p.R408W	1	cPKU 99.3% mPKU 0.7%	Yes 2.04% No 96.94% Bassa 1.02%
Tot	25		

Tab.10: Omozigoti in relazione alla predizione fenotipica e predizione di responsività alla BH4 calcolata su BioPKU. BioPku predice la responsività in base all'attività enzimatica residua associata alla mutazione. Si indentifica come responsività positiva una riduzione della phe ematica del 30%, negativa inferiore al 30%, bassa se compresa tra il 20-30%.

La forma più severa (PKU Classica) risulta essere associata al genotipo p.R261* in omozigosi a cui consegue una scarsa responsività alla BH4. Mentre la forma più lieve è associata ad una buona responsività alla BH4 è la condizione di omozigosi per p.A403V. Per quanto la p.A403V comprometta il sito catalitico in questi pazienti la somministrazione del cofattore in formula farmacologica, secondo la predizione BioPku, potrebbe compensare il difetto enzimatico. È comunque interessante notare come anche altre mutazioni missenso in omozigosi che colpiscono il sito catalitico (p.A300S, p.R261Q), siano associate ad una buona risposta alla BH4; eccezione fatta per la mutazione p.R408W, anch'essa nel dominio catalitico ma con una previsione negativa di risposta alla BH4 del 96,94%. Le due mutazioni di splicing (IVS10-11 G>T, IVS4+5 G>T) sono associate entrambe a fenotipi gravi (cPKU) e con una risposta negativa alla BH4 del 93,86% per la IVS10-11 G>T e del 100% nel caso della IVS4+5 G>T. Le mutazioni nonsense (p.Q134* e p.R261*) danno origine ad una proteina del tutto tronca, essendo gli amminoacidi Glutamina (p.134) e Arginina (p.261) convertiti in un codone di stop in entrambi i casi, la prima di 134 a.a. e l'altra di 261 a.a. Non ci sono dati sulla predizione fenotipica e sulla predizione di responsività per la condizioni di omozigosi per p.Q134*, ma per la condizione di omozigosi per p.R261* si presuppone una forma grave di PKU e una bassissima probabilità di risposta alla BH4. Lo studio è proseguito mettendo in relazione le mutazioni riscontrate negli omozigoti con altri tipi di mutazioni negli eterozigoti compositi.

Le stesse mutazioni sono state studiate in combinazioni diverse negli eterozigoti compositi, sono state prese in considerazione le varianti maggiormente riscontrate negli omozigoti (p.A403V, p.A300S, IVS10-11 G>A, p.R261Q) in combinazione tra loro, a queste ho voluto aggiungere le mutazioni nonsense riscontrate negli omozigoti in combinazione con le 4 mutazioni principali sopradescritte (Tab10). I restanti eterozigoti compositi hanno genotipi con combinazioni di mutazioni note ma meno frequenti (181 pazienti).

Per ogni combinazione è stata studiata la predizione fenotipica e di responsività alla BH4 sul database BioPku. Il sito sfrutta la predizione in base all'attività enzimatica prevista per un determinato tipo di mutazione, laddove sono presenti due mutazioni che prevedono una riduzione dell'attività enzimatica in vitro del 15%, il genotipo viene associato ad un fenotipo grave; al contrario un'attività superiore del 15% viene associata ad un fenotipo *mild* o lieve.

Mutazioni	N.Casi	%Totale dei pazienti	% Totale dei pazienti eterozigoti composti	Predisposizione fenotipica	Predisposizione responsività
p.A300S + p.A403V	14	4,83	6,09	HPA	Si 100%
p.R261Q + p.A300S	3	1,03	1,30	HPA	Si 100%
p.A300S + IVS10-11 G>A	4	1,38	1,74	mPKU 2.04% HPA 97.96%	Si 100%
IVS 10-11 G>A + p.A403V	10	3,45	4,35	mPKU 18.6% HPA 81.4%	Si 93.75% No 6.25%
p.R261Q + p. A403V	4	1,38	1,74	HPA	Si 100%
p.R261Q + IVS10-11 G>A	3	1,03	1,30	cPKU 75.24% mPKU 24.76%	Si 7.55% No 86.79% Bassa 5.66%
p.R261* + p.Tyr198CysfsTer136	2	0,69	0,87	cPKU 100 %	IGNOTA
p.R261*+ p.A403V	1	0,34	0,43	mPKU 14.29% HPA 85.71 %	Si 100%
p.R261* +IVS10-11 G>A	1	0,34	0,43	cPKU 100 %	No 100%
p.Q134*+p.A403V	1	0,34	0,43	IGNOTA	IGNOTA
IVS4+5 G>T + IVS10-11 G>A	4	1,38	1,74	mPKU 100 %	No 100%

IVS4+5G>T +p.A403V	2	0,69	0,87	HPA 100 %	IGNOTA
ALTRO	181	62,41	78,70		
Tot	230				

Tab.11: *Studio di predizione su BioPku per casi in eterozigosi composito.* Sono riportate le percentuali in relazione ai pazienti totali e a quelli eterozigoti compositi. Nelle ultime due colonne vengono riportate le percentuali relative alla predizione fenotipica e alla predizione di responsività indicate sul sito Biopku

Come si può notare confrontando la tabella 10 e 11 è possibile vedere come la condizione di omozigosità al genotipo IVS 10-11 G>A si traduca in un fenotipo grave con forma PKU Classica, la stessa mutazione associata a mutazioni che si traducono in fenotipi lievi come p.A300S e p.A403V risulta come effetto fenotipico la variante più lieve. Questo fenomeno è tipico del comportamento delle malattie genetiche autosomiche recessive nei casi di eterozigosità composita (85) (86). Questa mutazione di splicing in associazione con un'altra mutazione di splicing IVS4+5G>T risulta in una predizione fenotipica mPKU con una negativa risposta al cofattore. Anche questa mutazione di splicing, però, in associazione con p.A403V sembrerebbe avere una maggiore probabilità di dare origine ad un fenotipo lieve esattamente come l'associazione IVS10-11 G>A con p.A403V. Il genotipo omozigote per la mutazione p.R261Q si traduce nella maggior parte dei casi nella forma PKU Mild più grave della forma HPA ma più lieve della forma classica, la stessa mutazione in eterozigosi composita con IVS10-11 G>T si traduce in un fenotipo PKU Classica. In entrambi i casi la responsività alla BH4 risulta negativa. Quando la stessa mutazione è in associazione con genotipi p.A300S e p.A400V la manifestazione della forma HPA è più probabile. La mutazione nonsense p.R261Q in associazione con una delezione come p.Tyr198CysfsTer136 o con una mutazione di splicing IVS10-11 G>A dà origine ad un fenotipo grave, mentre in associazione con p.A403V dà origine ad un fenotipo mild con una buona risposta al cofattore. Non ci sono previsioni sull'altra mutazione nonsense presa in considerazione p.Q134* in combinazione con p.A403V. Le combinazioni delle associazioni tra mutazioni missenso prese in considerazione (p.A300S +

p.A403V, p.R261Q + p.A300S, p.R261Q + p. A403V) hanno tutte una predizione fenotipica lieve e una risposta positiva alla BH4

Una buona responsività alla BH4 sembra essere legata solo alle forme lievi. Tuttavia, basse percentuali di positività possono essere legate anche a fenotipi più gravi.

4.1 Rapporto fenotipo clinico e responsività al test

Sono stati presi in considerazione 28 pazienti in cura presso l'ospedale pediatrico Giovanni XIII di Bari sottoposti al test da carico della tetraidrobiopterina per valutare la responsività alla BH4. L'esame consiste in un test da carico con BH4 e valutando la riduzione del 30% di Phe nel sangue dopo 24h. I 28 pazienti sono stati sottoposti a questo test poiché con diagnosi di HPA o mPKU. Il test è stato eseguito presso l'ospedale pediatrico Giovanni XIII di Bari.

La figura 10 riassume il numero di pazienti che hanno risposto positivamente e negativamente in relazione al loro fenotipo clinico. Per risposta positiva al test s'intende una riduzione del 30% della Phe ematica dopo 24h.

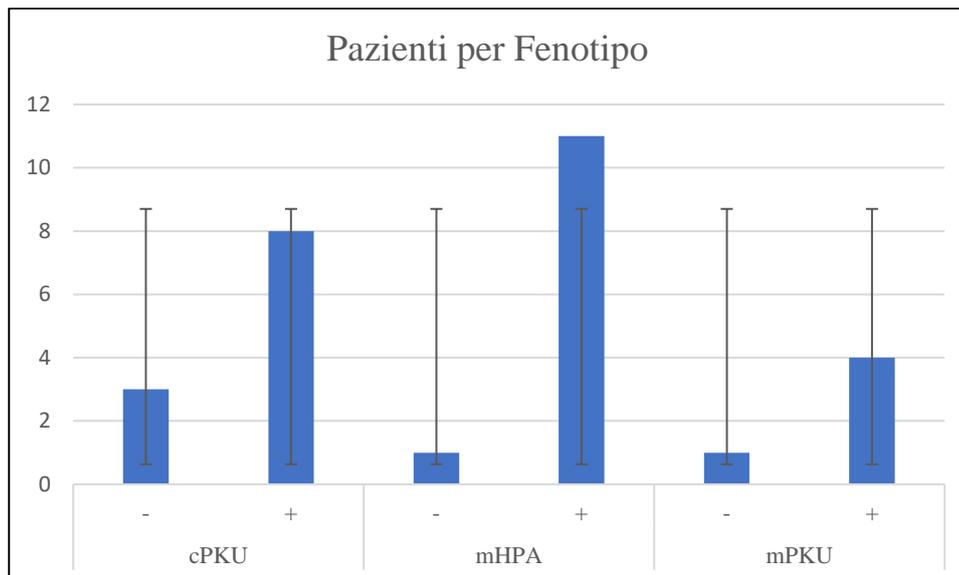


Fig. 10 : *Correlazione responsività e Fenotipo clinico*. Dal grafico si evince come effettivamente i pazienti maggior responsivi abbiano una forma lieve di HPA.

La maggior parte dei pazienti responsivi (11 pazienti) hanno un fenotipo mHPA quindi molto lieve. Tuttavia vi sono pazienti in forma mPKU (4 pazienti) e in forma più grave cPKU (8 pazienti) con una responsività positiva. Anche nei precedenti studi di predizione di responsività i fenotipi lievi presentavano un'altissima probabilità di risposta positiva al cofattore. Tuttavia, ben 8 casi di cPKU, quindi fenotipi gravi alla nascita, hanno riscontrato una responsività reale al test positiva. Un dato da non trascurare essendo 8 pazienti, su 11 totali in forma classica, ad aver mostrato una buona risposta al test; indice che anche pazienti con forme gravi possono avere una significativa compliance al farmaco e non soltanto i fenotipi più lievi. Dal grafico si evince comunque come i fenotipi in forma lieve HPA siano più predisposti ad avere una risposta positiva al test da carico (11 pazienti su 12 totali mHPA).

4.2 Rapporto genotipo e responsività al test

Lo studio è proseguito mettendo in relazione il genotipo con la responsività al test di responsività alla BH4.

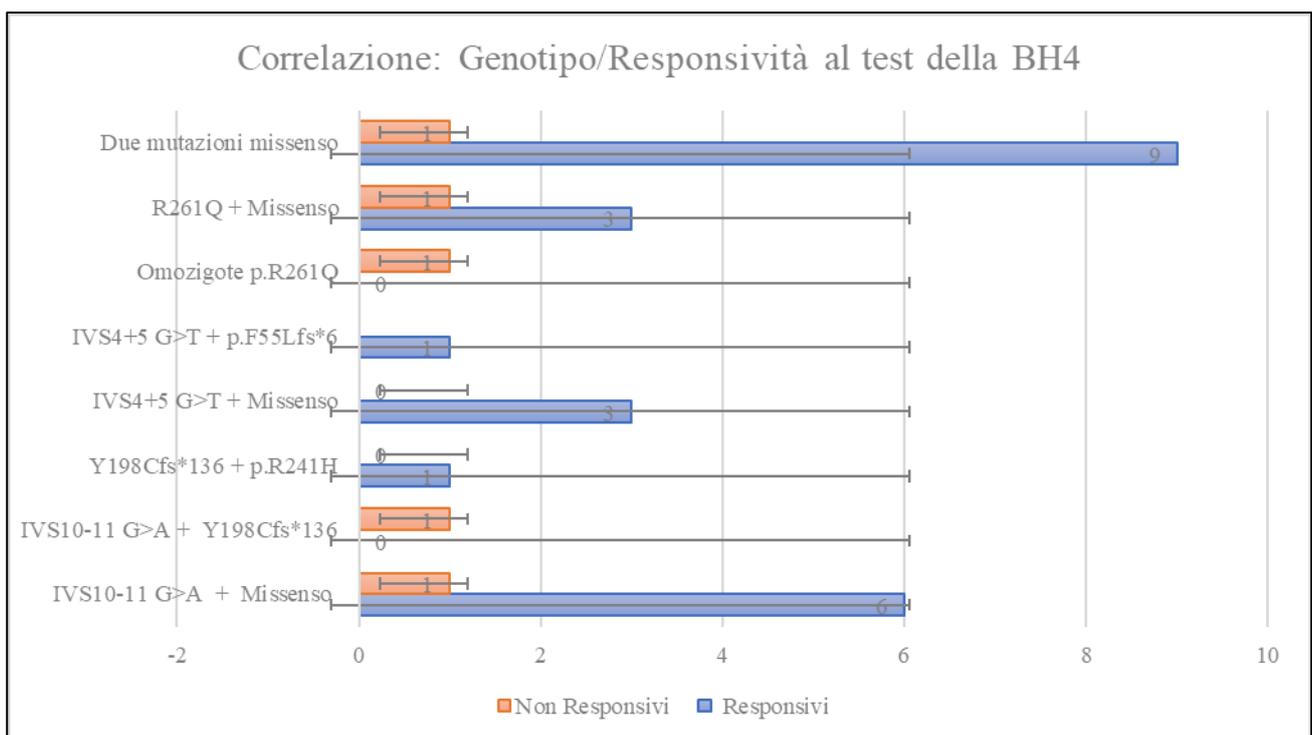


Figura 11: *Correlazione Genotipo/Responsività al test della BH4*. Le mutazioni sono state raggruppate per tipo e messe in relazione con quelle riscontrate maggiormente

La mutazione IVS10-11 G>A è la più frequente nella coorte di pazienti (8 pz su 28), come si evince dalla figura 12.

Questa mutazione in associazione a un'altra mutazione missenso (p.Y414C, p.L48S, p.A300S, p.A309V, p.G46S, p.A403V, p.P281L) in sei casi ha dato un responso positivo; solo in associazione con p.A309V ha dato un responso negativo al test. La stessa mutazione IVS10-11 G/A in associazione con una delezione Y198Cfs*136 da un responso negativo. Questa delezione però in associazione con la mutazione missenso p.R241H ha dato un responso positivo. Si è pensato quindi di valutare la responsività nei pazienti eterozigoti composti con una mutazione di splicing diversa dalla IVS 10-11 G>A. Pazienti con la mutazione IVS4+5 G>T in associazione con altre mutazioni: nel caso di mutazioni missenso tutti e 4 i pazienti sono stati responsivi, 3 associati ad una mutazione missenso e uno in associazione con la delezione p. F55Lfs*6.

Un unico paziente, tra quelli sottoposti al test, risultava omozigote per la mutazione p.R261Q e non è stato responsivo. La stessa mutazione è stata messa in relazione con altre mutazioni missenso e pazienti eterozigoti composti con p.R261Q associata con 3 mutazioni missenso diverse (p.L48S, p.P281L, p.A300S) risultano tutti responsivi; solo in associazione con p.R248W il paziente è risultato negativo al test. 10 pazienti eterozigoti composti per 10 diverse combinazioni di mutazioni missenso sono stati messi in relazione per la responsività, di questi 9 rispondono positivamente al test e soltanto il paziente con il genotipo p.I65V + p.G239S non ha risposto positivamente.

A questo punto è stato interessante, mettere in relazione le responsività reali dei pazienti al test con le previsioni di responsività corrispondenti su BioPku (Tab 12).

Paziente	Allele 1	Allele 2	Responsività al test	Responsività prevista su BioPku	Fenotipo	Concordanza tra responsività prevista e reale
1	IVS10-11 G>A	p.Y414C	+	Si 73.53% No 14.71% Bassa 11.76%	mPKU	Concorde
2	p.L48S	IVS10-11 G/A	+	Si 30.77% No 38.46% Bassa 30.77%	cPKU	Concorde
3	p.L48S	p.D415N	+	Si 100%	mHPA	Concorde
4	p.R252W	p.E390G	+	Si 100%	mHPA	Concorde
5	p.A104D	p.R158Q	+	Si 66.67% No 33.33%	cPKU	Concorde
6	p.A300S	IVS10-11G/A	+	Si 100%	mHPA	Concorde
7	p.A300S	p.R408W	+	Si 87.5% No 12.5%	mPKU	Concorde
8	p.A309 V	IVS 10 nt-11 G/A	-	IGNOTA	mPKU	IGNOTA
9	p.Y198Cfs*136	IVS10-11 G>A	-	IGNOTA	cPKU	IGNOTA
10	p.Y198Cfs*136	p.R241H	+	IGNOTA	mHPA	IGNOTA
11	p.F55Lfs*6	IVS4+5 G>T	+	No 100%	mHPA	Non concorde
12	p.G46S	IVS10-11G/A	+	IGNOTA	cPKU	IGNOTA
13	p.I65T	p.R158Q	+	Si 50% No 50%	cPKU	Concorde
14	p.I65V	p.G239S	-	IGNOTA	mHPA	IGNOTA
15	IVS10-11 G>A	p.A403V	+	Si 93.75% No 6.25%	mHPA	Concorde
16	IVS4+5 G>T	p.P281L	+	No 100%	cPKU	Non concorde
17	IVS4+5 G>T	p.E390G	+	Si 100%	mPKU	Concorde
18	p.L48S	p.P281L	+	Si 50% No 44.44% Bassa 5.56%	mHPA	Concorde
19	p.L48S	p.R261Q	+	Si 75.76% No 18.18% Bassa 6.06%	mPKU	Concorde
20	p.L48S	IVS4-5 C>G	+	Si 50% No 0% Bassa 50%	mHPA	Concorde
21	p.L48S	p.R408W	+	Si 18.18% No 75.76% Bassa 6.06%	cPKU	Concorde
22	p.L48S	p.V177L	+	IGNOTA	mHPA	IGNOTA
23	p.P281L	p.R261Q	+	Si 29.41% No 41.18% Bassa 29.41%	cPKU	Concorde
24	p.P281L	IVS10-11G/A	+	No 100%	cPKU	Non concorde
25	p.R261Q	p.A300S	+	Si 100%	mHPA	Concorde
26	p.R261Q	p.R408W	-	Si 9.09% No 84.09% Bassa 6.82%	cPKU	Concorde
27	p.R261Q	p.R261Q	-	Si 74% No 22% Bassa 4%	cPKU	Concorde
28	p.T92I	p.R243*	+	IGNOTA	mHPA	IGNOTA

Tab 12: *Correlazione tra responsività al test e predizione di responsività*. La comparazione tra la responsività attesa e quella reale viene definita come “concorde” se la responsività calcolata da BioPku rispecchia quella reale, al contrario viene definita come “non concorde”. I casi borderline dove la responsività attesa non rispecchia totalmente quella reale, ma che comunque il sito calcola in una casistica minore, viene definita concorde in quanto comunque prevista in una casistica minore e non avendo più di due genotipi associati alla stessa risposta reale da poter comparare. I simboli “+” e “-“ indicano la responsività positiva o negativa ottenuta dal test.

Tutti i 28 pazienti sottoposti a test di responsività per la BH4 mostrano combinazioni differenti di mutazioni e non risultano più di due pazienti con le stesse mutazioni su entrambi gli alleli. Le predizioni di responsività rispecchiano la responsività reale al test da carico sia in maniera totalmente concorde (13 pazienti) che in maniera semi concorde (5 pazienti, ossia pazienti in cui la responsività che si è ottenuta dal test reale viene prevista in percentuali minori anche nel sito). Si può stabilire quindi che più del 60% dei pazienti siano concordi con la responsività attesa. 7 genotipi hanno una predizione di responsività su BioPku ignota e soltanto 3 risultano avere una responsività opposta a quella predetta (figura 12). Il primo genotipo è l’associazione della mutazione F55Lfs*6 con IVS4+5 G>T la cui predizione dovrebbe essere negativa invece nel test reale la responsività è stata positiva, il paziente ha una condizione mHPA. I pazienti con forme lievi risultano essere meglio responsivi al farmaco come si evince dalla figura 10, tuttavia la predizione su BioPku è negativa. L’altro genotipo è l’associazione di IVS4+5 G>T con p.P281L laddove la responsività reale è risultata positiva e quella predetta negativa, in un paziente con cPKU. Nel terzo caso abbiamo la mutazione p.P281L associata ad un’altra mutazione intronica IVS10-11G>A, anche in questo caso la responsività reale è stata positiva a differenza di quella negativa predetta e il fenotipo del paziente risulta in forma grave cPKU. In entrambi i casi si tratta della stessa mutazione in associazione con due diverse mutazioni di splicing. Ultimo caso merito di attenzione è l’unico omozigote sottoposto al test, omozigote per la mutazione p.R261Q (paziente n.27) in cui la predizione sul database risulta positiva per il 74%, responsività negativa 22% e una probabilità di responsività bassa per il 4%, anche se il paziente presenta una forma grave cPKU. Essendo tutti i genotipi casi unici, anche in quest’ultimo caso il test è concorde al sito poiché si colloca nel 22% di responsività positiva predetta.

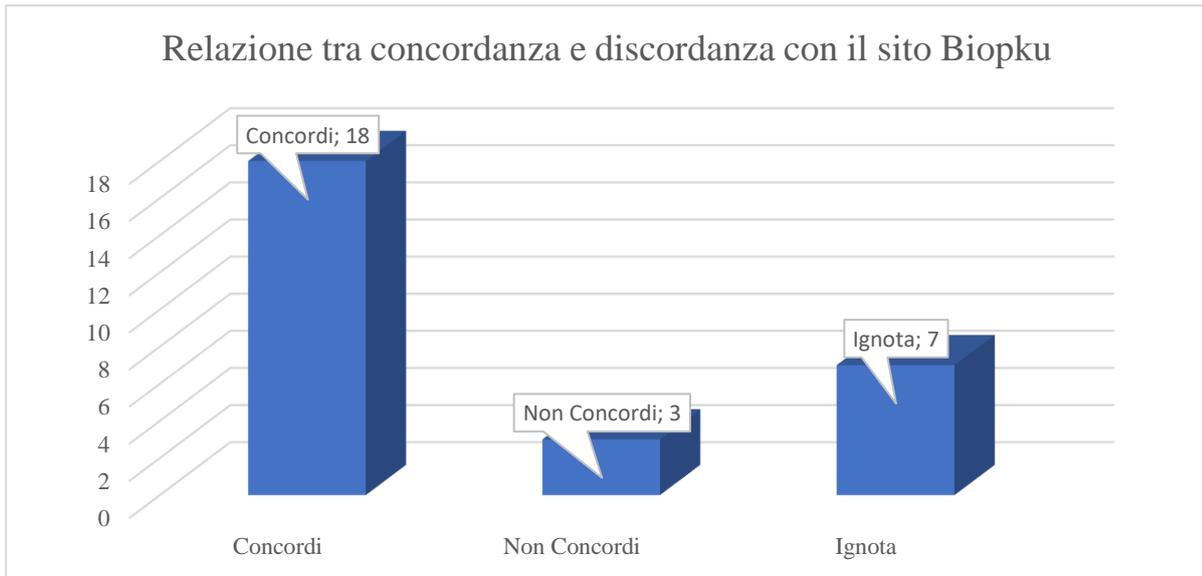


Figura12: *Relazione tra test risultati concordi con il sito Biopku, quelli non concordi e quelli con esito ignoto.* concordi con il test: n.18 (64%), non concordi: 3 (11%), ignoti 7 (25%).

I pazienti concordi con la predizione di responsività calcolata su BioPku sono stati 18 su 28 pazienti totali con una percentuale del 64%, i non concordi 3 con una percentuale dell'11% e quelli ignoti, ovvero coloro per i quali il sito non riportava alcuna predizione corrispondente al genotipo sono stati 7 con una percentuale del 25%. La maggioranza dei casi, quindi, è stata concorde alle aspettative riportate. Sul campione di riferimento, anche se piccolo in proporzione ai dati del database poiché per ogni singolo genotipo abbiamo a disposizione un solo paziente da poter confrontare, possiamo stabilire una correlazione tra i dati ottenuti e quelli previsti sul sito BioPku del 64%. Grande peso hanno il numero delle previsioni ignote che rappresentano l'11% e che potrebbero essere ridotte dagli aggiornamenti continui del database aumentando le casistiche di dati registrati che a questo punto risultano necessarie per aumentarne l'attendibilità.

	Attesi	Osservati	Attesi %	Osservati %	95% CI degli Osservati%
Concordi	28	18	100	64,29	45,83 di 79,29
Non concordi	0	10	0	35,71	20,71 di 54,17
TOTALI	28	28	100	100	

Tab.13: *Associazione tra i casi concordi osservati e quelli attesi.* Assumendo una percentuale attesa del 100% di concordanza con il sito Biopku, quella osservata è del 64,29% mentre i non concordi (in cui sono stati inclusi gli ignoti) risultano il 14,29%. Il chi-test per i concordi $x^2= 1,08$.

Nella tabella 13 viene riportata la percentuale dei casi concordi con il sito osservati (64,29%) e quella dei casi non concordi (35,71%). Essendoci 7 casi con predizione ignota su BioPku, il totale dei non concordi è calcolato comprendendo questo dato poiché non in linea con i risultati attesi. Il chi-test è stato calcolato secondo la formula: *(osservati concordi - valore soglia calcolata come media tra gli attesi e gli osservati concordi)² / valore soglia calcolata come media tra gli attesi e gli osservati concordi*. Questo test è necessario per confrontare che le frequenze dei valori osservati abbiano correlazione con quelle attese, supponendo una correlazione perfetta con i dati forniti da BioPku al 100% abbiamo ipotizzato la totalità dei pazienti come concordi 28 messa in relazione con i 18 osservati e fatta una media al fine del calcolo del chi-test. Con grado di libertà $df=1$ e la probabilità $\alpha=0,05$ dalla tabella di distribuzione del chi-quadro il valore del chi-quadro teorico è di 3,84, pertanto il valore del x^2 non dovrà superare quest'ultimo per stabilire una correlazione tra i concordi e le media del totale e gli attesi. Il x^2 è pari a 1,08 indicando, quindi, che possiamo accettare l'ipotesi che i concordi con il sito e gli attesi siano correlati. Non avendo più di due pazienti con lo stesso genotipo che abbiano fatto il test da carico per la BH4 stabilire quanti effettivamente abbiano rispecchiato le previsioni del sito con una buona attendibilità rimane molto difficile. La coorte di pazienti, anche se molto piccola, rivela comunque una concordanza con i dati previsti dell'64,29%, considerando che 7 sono ignoti questi dati rafforzano l'ipotesi che un supporto dei database informatici di questo tipo con maggiori casistiche sia necessario per rendere lo strumento informatico maggiormente attendibile.

4.3 Report di casi di particolare attenzione: studio di ulteriori geni su due pazienti portatori e case report di un mosaicismo per mutazione de novo

Due casi, in particolare, hanno richiesto maggiori approfondimenti, poiché pazienti con elevati livelli di fenilalanina ma in cui è stata riscontrata una sola mutazione. Nello specifico una bambina sottoposta prima a screening neonatale a cui è stata diagnosticata la PKU Classica in cui è stata riscontrata una sola mutazione (p.Gly218Val); ed un secondo paziente giunto in consulenza all'età di 32 anni a cui era stata diagnosticata PKU alla nascita tramite dosaggio della Phe ma che necessitava la conferma genetica. Anche in esso è stata riscontrata soltanto una mutazione (p.Val177Leu). Ho avuto modo di poter studiare questi due casi durante il periodo all'estero previsto dal corso di studi presso il laboratorio di Genetica Medica di Malta con la collaborazione del Prof. Alex Felice. In un loro precedente studio hanno riscontrato mutazioni a carico dei geni QDPR e SPR coinvolti nel corretto metabolismo della Fenilalanina, in pazienti con iperfenilalaninemia non PKU (87). Abbiamo pensato quindi di studiare entrambi i geni in questi pazienti verificando o escludendo la presenza di eventuali mutazioni che potevano associarsi al fenotipo e individuare casi in cui le due mutazioni erano dislocate in due geni diversi. Durante questo periodo ho svolto lo screening sia del gene QDPR responsabile dell'espressione della Diidrobiopterina Reduttasi che catalizza la conversione della Diidrobiopterina Chinonoide in Tetraidrobiopterina (BH4) (88), sia del gene SPR la cui proteina espressa è coinvolta nella corretta sintesi del cofattore BH4 (89). Non sono state riscontrate mutazioni su entrambi i geni.

Altro caso particolare è stata una bambina con quadro clinico di mHPA in cui non sono state riscontrate mutazioni a carico del gene PAH in fase di sequenziamento estraendo il DNA da sangue intero. È stata eseguita, a quel punto, anche la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) per individuare eventuali delezioni o duplicazioni. Anche l'MLPA su DNA estratto da

sangue è risultata negativo. Si è pensato quindi di svolgere l'analisi di sequenziamento e MLPA su altro tipo di campione estraendo il DNA da saliva con l'utilizzo di un tampone buccale. In questo caso, analizzando il DNA proveniente da tampone buccale tramite MLPA è stata riscontrata la duplicazione dell'esone 11 in omozigosi, mutazione assente in entrambi i genitori, per cui ipotizzata nella bambina in forma de novo. Il quadro genetico spiega il fenotipo clinico che quindi poteva essere trattato con dietoterapia ma essendo un caso di mosaicismo la diagnosi genetica ha consentito di escludere la trasmissione genetica alla generazione successiva.

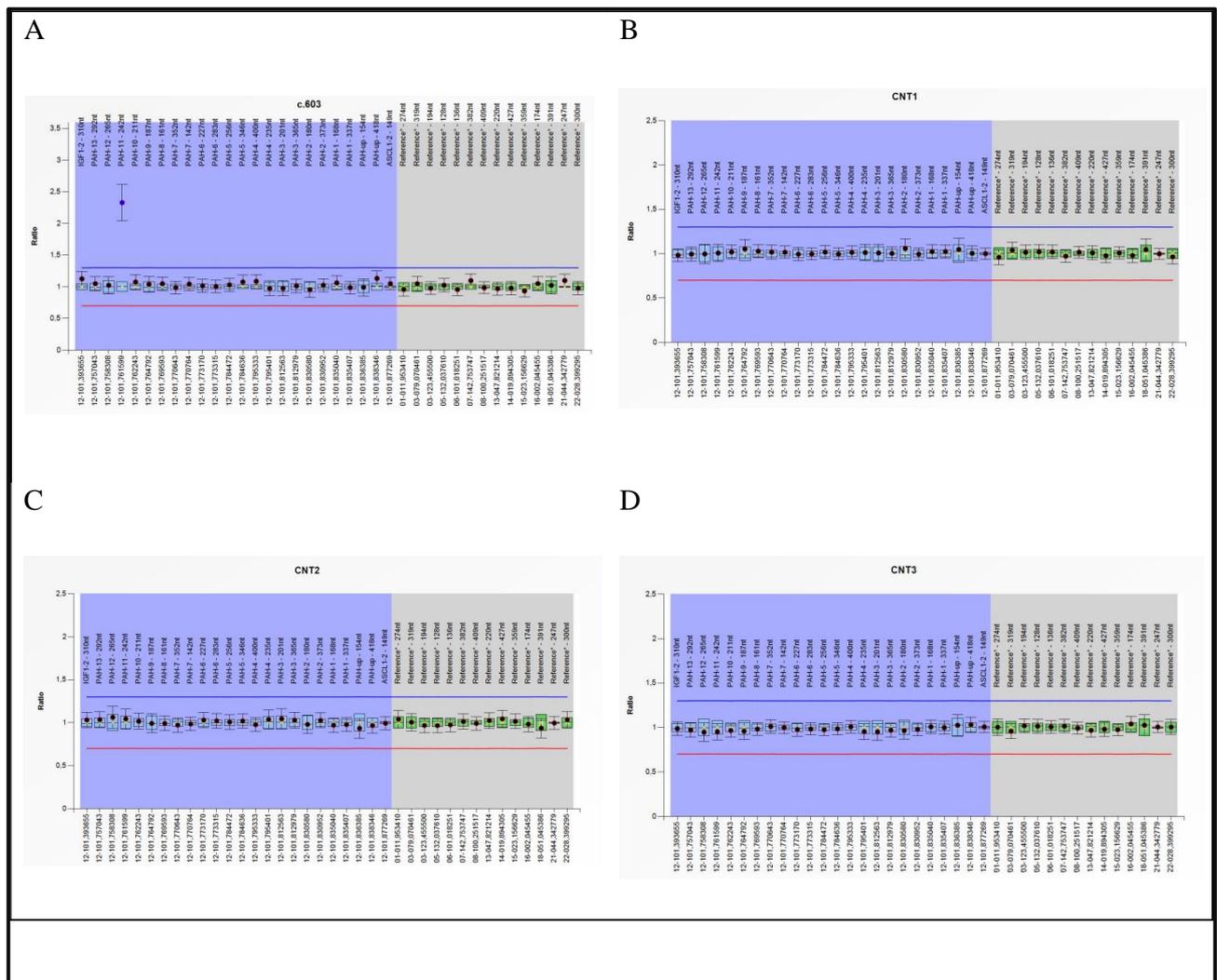


Fig. 13 : I grafici mostrano i valori dei rapporti del quoziente di dosaggio per ciascuna sonda la cui localizzazione è presente sull'ascissa e le descrizioni nella parte superiore del grafico. La figura 1.A. mostra il rapporto di dosaggio del paziente (c.603) per la sonda dell'esone 11 a livello 2,5. Le figure 1.B, 1.C, 1.D mostrano i rapporti dei controlli tutti a livelli normali intorno a 1. I rapporti con valori superiori a 2 indicano la presenza di una duplicazione in omozigosi.

In figura 13 sono mostrate le ratio della paziente a confronto con i controlli in fase di MLPA, la sonda che ibrida l'esone 11 ha una ratio di 2,5 indicando la delezione. L'MLPA condotta sui genitori non ha mostrato la presenza della mutazione come si evince dalla figura 14.

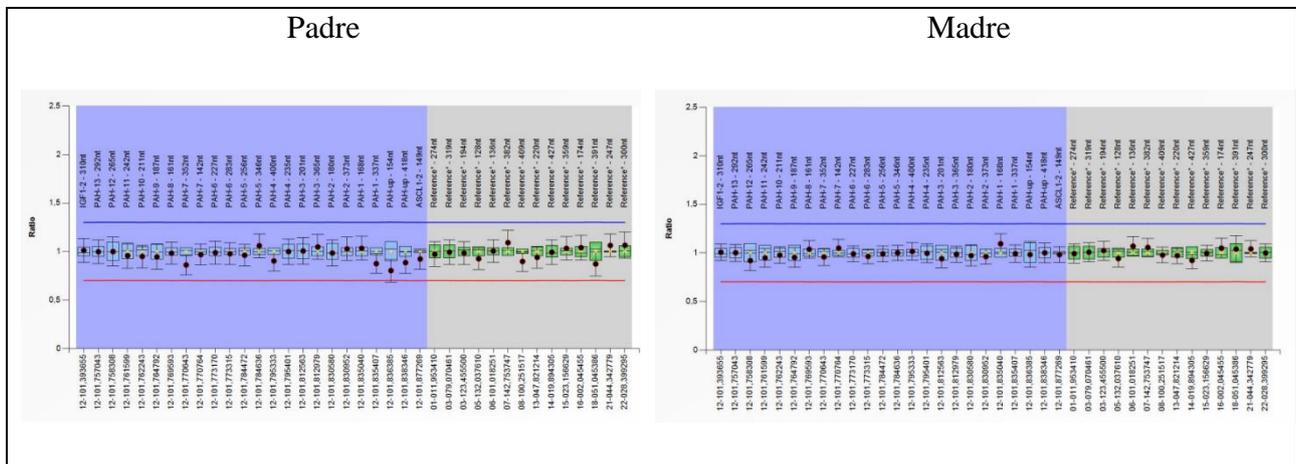


Fig.14 : Ratio del quoziente di dosaggio normale per tutte le sonde dei campioni dei genitori della paziente. Le ratio sono con valori intorno ad 1 per tutte le sonde

5. CONCLUSIONI

Per malattie metaboliche rare come la Fenilchetonuria la dietoterapia rimane un punto fondamentale per una buona prognosi e contenimento del deficit. Tuttavia, i limiti associati ad essa rimangono molteplici, la possibilità di studiare nuove forme di terapia e studiarne i meccanismi di responsività al Kuvan, unico farmaco ad ora in uso in Italia, sembra essere una possibilità per superare i limiti dovuti alla dietoterapia, aumentarne l'efficacia e migliorare lo stile di vita dei pazienti.

Dai primi dati di questo studio emergono le mutazioni principalmente più comuni, la mutazione p.Ala403Val risulta essere tra le più frequenti riscontrate: 83 casi su 290 pazienti. La maggior parte delle mutazioni riscontrate è costituito da varie mutazioni missenso, la più frequente tra le mutazioni di splicing risulta essere la IVS 10-11 G>T riscontrata in 52 pazienti, mentre la più frequente tra le mutazioni nonsense è stata la p.Arg261Ter, in 14 pazienti. In studi di predizione fenotipica: in omozigosi il genotipo p.A403V è associato a una predizione di una buona responsività alla BH4 e a un fenotipo lieve, il genotipo omozigote IVS 10-11 G>C risulta associato alla forma più grave (PKU Classica) e ad una responsività negativa alla BH4. In associazione queste due mutazioni negli eterozigoti composti il fenotipo predetto da BioPku è una forma lieve di iperfenilalaninemia. Anche per le altre associazioni in eterozigoti composti il fenotipo manifestato è quello della mutazione meno grave. In linea con il comportamento tipico della malattia.

Per quello che riguarda la misurazione reale al test della responsività alla BH4 il genotipo eterozigote composto con c.1066-8G>C IVS10-11 G>C associato con una mutazione missenso è quello più frequentemente associato a una responsività positiva. La mutazione p.P281L in associazione con due diverse mutazioni di splicing sembrerebbe associarsi ad effetti positivi empiricamente e discordanti da quelli predetti sul database BioPku. Il genotipo in omozigosi per p.R261Q seppur in forma di PKU Classica presenta una predizione in gran parte positiva ma il paziente è risultato negativo al test. I dati sono relativamente concordi in più del 60% dei casi, c'è da considerare la coorte di pazienti molto

piccola e che sul database mancano le informazioni per 7 genotipi dei 28 analizzati. In conclusione, possiamo dire che i dati si avvicinano ad una concordanza con il sito e che con maggior supporto di casistiche inserite nello stesso e con l'ampliamento della coorte di pazienti potremmo arrivare a supportare questo strumento come test predittivo; ad oggi, però, la sola previsione di responsività calcolata su BioPku non basta per stabilire un decorso certo della malattia, ma è un ottimo strumento di supporto nelle scelte terapeutiche che può avere maggior valenza predittiva in seguito ai continui aggiornamenti.

Sono stati presentati anche tre casi rilevanti: i primi due erano due pazienti, un uomo di 32 anni e una neonata di pochi giorni di vita, portatori di una sola mutazione ma a cui era stata diagnosticata una iperfenilalaninemia. Dall'analisi svolta su due geni coinvolti nella sintesi della BH4 (QDPR e SPR) non sono emerse ulteriori mutazioni. Nell'ultimo caso si trattava di una paziente di 4 anni con HPA in cui il sequenziamento e l'MLPA del gene PAH su DNA proveniente da sangue è stato negativo, mentre l'MLPA svolta su DNA proveniente da tampone buccale ha rivelato una duplicazione dell'esone 11 de novo; duplicazione assente nei genitori. Questo caso di mosaicismo spiega il quadro clinico della paziente.

Lo studio mette in luce, comunque, l'importanza dell'indagine genetica come indicatore su quale potrà essere il decorso della malattia. In un momento in cui è sempre più difficile sottoporre pazienti in età pediatrica a diete molto rigide l'utilizzo di farmaci come il Kuvan consentono una qualità della vita normale e di assumere una dieta libera senza essere sottoposti ai rischi della iperfenilalaninemia, dallo studio emerge la possibilità in base al genotipo di predire la buona responsività e quindi la compliance al farmaco. Questo tipo di studi vanno anche ad accrescere statisticamente le predizioni di responsività già presenti nei database rafforzandone il significato predittivo. Anche nei casi di eterozigosi l'indagine genetica resta un punto focale per la programmazione delle gravidanze, soprattutto nelle donne, per poter affrontare al meglio i casi di PKU materna, per individuare i

portatori e predire la trasmissione della malattia alle generazioni successive previa consulenza genetica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Jason Gonzalez, Monte S. Willis, Ivar Asbjörn Følling: Discovered Phenylketonuria (PKU), *Laboratory Medicine*, Volume 41, Issue 2, February 2010, Pages 118–119
2. Blau, N., van Spronsen, F. J., Levy, H. L. Phenylketonuria. *Lancet* 376: 1417-1427, 2010.
3. R. Surtees, N. Blau “Neurochemistry of phenylketonuria” *Eur J Pediatr* 2000; 159:109-13.
4. Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat.* 2007 Sep;28(9):831-45.
5. Ozalp I, Coskun T, Tokol S, Demircin G & Mönch E Inherited metabolic disorders in Turkey. *J. Inherit. Metab. Dis* 1990; 13, 732–738.
6. Senemar S, Ganjekarimi A, Senemar S, Tarami B & Bazrgar M The prevalence and clinical study of galactosemia disease in a pilot screening program of neonates, southern Iran. *Iran. J. Public. Health* 2011; 40, 99–104.
7. Sutivijit Y, Banpavichit A & Wiwanitkit V Prevalence of neonatal hypothyroidism and phenylketonuria in Southern Thailand: a 10-year report. *Indian. J. Endocrinol. Metab* 2011; 15, 115–117.
8. Okano Y, Kudo S, Nishi Y, Sakaguchi T & Aso K Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Japan. *J. Hum. Genet* 2011;56, 306–312.
9. Hillert, A., Anikster, Y., Belanger-Quintana, A., Burlina, A., Burton, B. K., Carducci, C., Chiesa, A. E., Christodoulou, J., Đorđević, M., Desviat, L. R., Eliyahu, A., Evers, R. A. F., Fajkusova, L., Feillet, F., Bonfim-Freitas, P. E., Giżewska, M., Gundorova, P., Karall, D., Kneller, K., Kutsev, S. I., Blau, N. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. *American journal of human genetics*, 2020; 107(2), 234–250.
10. Kaufman S The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol* 1971; 35, 245–319.
11. van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N, Bosch AM. Phenylketonuria. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 May 20;7(1):36.
12. JERVIS G. A. Studies on phenylpyruvic oligophrenia; phenylpyruvic acid content on blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 1925; 81(3), 715–720.
13. Batshaw, M. L., Valle, D., & Bessman, S. P. Unsuccessful treatment of phenylketonuria with tyrosine. *The Journal of pediatrics*, 1981; 99(1), 159–160.
14. Dobrowolski SF et al. Altered DNA methylation in PAH deficient phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab* 115, 2015; 72–77.
15. Miller AL, Hawkins RA, Veech RL. Phenylketonuria: phenylalanine inhibits brain pyruvate kinase in vivo. *Science.* Mar, 1973; 2;179(4076):904-6.

16. Adler-Abramovich L, Vaks L, Carny O, Trudler D, Magno A, Caflisch A, Frenkel D, Gazit E. Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria. *Nat Chem Biol* Aug 2012;;8(8):701-6.
17. Hartwig C et al. Elevated phenylalanine levels interfere with neurite outgrowth stimulated by the neuronal cell adhesion molecule L1 in vitro. *FEBS Lett.* 2006; 580, 3489–3492.
18. Schlegel G, Scholz R, Ullrich K, Santer R & Rune GM Phenylketonuria: direct and indirect effect of phenylalanine. *Exp. Neurol* 2016; 281, 28–36.
19. Ellsworth C. Alvord, Jr., M.D. and others, Neuropathological Findings in Phenyl-Pyruvic Oligophrenia (Phenyl-Ketonuria), *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 9, Issue 3, July 1950, Pages 298–310.
20. Schoemans R et al. Oligodendrocyte development and myelinogenesis are not impaired by high concentrations of phenylalanine or its metabolites. *J. Inherit. Metab. Dis* 33, 2010; 113–120.
21. Ferreira BK, Rodrigues MT, Streck EL, Ferreira GC, Schuck PF. White matter disturbances in phenylketonuria: Possible underlying mechanisms. *Jan; 2021; 99(1):349-360 J Neurosci Res.*
22. Scriver, C. R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum. Mutat.* 2007; 28: 831-845,.
23. Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS. Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab.* Aug 1999 ;67(4):308-16.
24. Spencer AM, Sack J, Hong SK. Relationship between PAH transport and Na-K-ATPase activity in the rabbit kidney. *Am J Physiol.* 1979; 236(2):F126-F130.
25. Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life.* Apr 2013;65(4):341-9.
26. Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):16962-7.
27. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010 Oct 23;376(9750):1417-27.
28. van Spronsen FJ, van Rijn M, Dorgelo B, Hoeksma M, Bosch AM, Mulder MF, de Klerk JB, de Koning T, Rubio-Gozalbo ME, de Vries M, Verkerk PH. Phenylalanine tolerance can already reliably be assessed at the age of 2 years in patients with PKU. *J Inherit Metab Dis.* 2009 Feb;32(1):27-31.
29. van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Mailliot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162.
30. Matalon R, Michals K. Phenylketonuria: screening, treatment and maternal PKU. *Clin Biochem.* 1991 Aug;24(4):337-42.
31. Mailliot F, Lilburn M, Baudin J, Morley DW & Lee PJ Factors influencing outcomes in the offspring of mothers with phenylketonuria during pregnancy: the importance of variation in maternal blood phenylalanine. *Am. J. Clin. Nutr* 88, 2008; 700–705.

32. Koch, R., Hanley, W., Levy, H., Matalon, K., Matalon, R., Rouse, B., Trefz, F., Güttler, F., Azen, C., Platt, L., Waisbren, S., Widaman, K., Ning, J., Friedman, E. G., & de la Cruz, F. (2003). The Maternal Phenylketonuria International Study: 1984-2002. *Pediatrics*, 112(6 Pt 2), 1523–1529.
33. Feillet, F., Muntau, A. C., Debray, F. G., Lotz-Havla, A. S., Puchwein-Schwepecke, A., Fofou-Caillierez, M. B., van Spronsen, F., & Trefz, F. F. (2014). Use of sapropterin dihydrochloride in maternal phenylketonuria. A European experience of eight cases. *Journal of inherited metabolic disease*, 37(5), 753–762.
34. Teissier R, Nowak E, Assoun M, Mention K, Cano A, Fouilhoux A, Feillet F, Ogier H, Oger E, de Parscau L; AFDPHE (Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant). Maternal phenylketonuria: low phenylalaninemia might increase the risk of intra uterine growth retardation. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Nov;35(6):993-9.
35. DiLella, A. G., Kwok, S. C. M., Ledley, F. D., Marvit, J., Woo, S. L. C. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 25: 743-749, 1986.
36. Eisensmith, R. C., Woo, S. L. C. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. *Hum. Mutat*. 1992; 1: 13-23,.
37. Hillert, A., Anikster, Y., Belanger-Quintana, A., Burlina, A., Burton, B. K., Carducci, C., Chiesa, A. E., Christodoulou, J., Dorđević, M., Desviat, L. R., Eliyahu, A., Evers, R. A. F., Fajkusova, L., Feillet, F., Bonfim-Freitas, P. E., Giżewska, M., Gundorova, P., Karall, D., Kneller, K., Kutsev, S. I., ... Blau, N. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. *American journal of human genetics*, (2020). 107(2), 234–250.
38. Shen, N., Heintz, C., Thiel, C., Okun, J. G., Hoffmann, G. F., & Blau, N. (2016). Co-expression of phenylalanine hydroxylase variants and effects of interallelic complementation on in vitro enzyme activity and genotype-phenotype correlation. *Molecular genetics and metabolism*, 117(3), 328–335.
39. Himmelreich, N., Shen, N., Okun, J. G., Thiel, C., Hoffmann, G. F., & Blau, N. (2018). Relationship between genotype, phenylalanine hydroxylase expression and in vitro activity and metabolic phenotype in phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism*, 125(1-2), 86–95.
40. Blau, N., & Erlandsen, H. (2004). The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 82(2), 101–111.
41. Kure, S., Hou, D. C., Ohura, T., Iwamoto, H., Suzuki, S., Sugiyama, N., Sakamoto, O., Fujii, K., Matsubara, Y., & Narisawa, K. (1999). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *The Journal of pediatrics*, 135(3), 375–378.
42. Opladen, T., Hoffmann, G. F., Kühn, A. A., & Blau, N. (2013). Pitfalls in phenylalanine loading test in the diagnosis of dopa-responsive dystonia. *Molecular genetics and metabolism*, 108(3), 195–197.
43. van Spronsen, F. J., Himmelreich, N., Rüfenacht, V., Shen, N., Vliet, D. V., Al-Owain, M., Ramzan, K., Alkhalifi, S. M., Lunsing, R. J., Heiner-Fokkema, R. M., Rassi, A., Gemperle-Britschgi, C.,

- Hoffmann, G. F., Blau, N., & Thöny, B. (2017). Heterogeneous clinical spectrum of DNAJC12-deficient hyperphenylalaninemia: from attention deficit to severe dystonia and intellectual disability. *Journal of medical genetics*, jmedgenet-2017-104875.
44. Guthrie R, Susi A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 32, 338–343..
 45. D.H.Chace, J.E.Sherwin, S.L.Hillman, F.Lorey, G.C.Cunningham. (1998). Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of aerly discharge speciements collected in the first 24 hours. *Clin.Chem.* 44; 2405-2409.
 46. van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162.
 47. van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162.
 48. Arnold, G. L., Vladutiu, C. J., Orłowski, C. C., Blakely, E. M., & DeLuca, J. (2004). Prevalence of stimulant use for attentional dysfunction in children with phenylketonuria. *Journal of inherited metabolic disease*, 27(2), 137–143.
 49. Jahja, R., van Spronsen, F. J., de Sonnevile, L. M. J., van der Meere, J. J., Bosch, A. M., Hollak, C. E. M., Rubio-Gozalbo, M. E., Brouwers, M. C. G. J., Hofstede, F. C., de Vries, M. C., Janssen, M. C. H., van der Ploeg, A. T., Langendonk, J. G., & Huijbregts, S. C. J. (2017). Long-Term Follow-Up of Cognition and Mental Health in Adult Phenylketonuria: A PKU-COBESO Study. *Behavior genetics*, 47(5), 486–497.
 50. MacDonald, A., van Wegberg, A. M. J., Ahring, K., Beblo, S., Bélanger-Quintana, A., Burlina, A., Campistol, J., Coşkun, T., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., Rocha, J. C., Romani, C., Trefz, F., & van Spronsen, F. J. (2020). PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. *Orphanet journal of rare diseases*, 15(1), 171.
 51. KNOX W. E. (1960). An evaluation of the treatment of phenylketonuria with diets low in phenylalanine. *Pediatrics*, 26, 1–11.
 52. Hanley, W. B., Linsao, L., Davidson, W., & Moes, C. A. (1970). Malnutrition with early treatment of phenylketonuria. *Pediatric research*, 4(4), 318–327.

53. Koch, R., Moseley, K., Ning, J., Romstad, A., Guldborg, P., & Guttler, F. (1999). Long-term beneficial effects of the phenylalanine-restricted diet in late-diagnosed individuals with phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism*, 67(2), 148–155.
54. Sawin, E. A., De Wolfe, T. J., Aktas, B., Stroup, B. M., Murali, S. G., Steele, J. L., & Ney, D. M. (2015). Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 309(7), G590–G601.
55. Pinto, A., Almeida, M. F., Ramos, P. C., Rocha, S., Guimas, A., Ribeiro, R., Martins, E., Bandeira, A., MacDonald, A., & Rocha, J. C. (2017). Nutritional status in patients with phenylketonuria using glycomacropeptide as their major protein source. *European journal of clinical nutrition*, 71(10), 1230–1234.
56. Oseid B. (1979). Breast-feeding and infant health. *Seminars in perinatology*, 3(3), 249–254.
57. Rocha, J. C., & MacDonald, A. (2016). Dietary intervention in the management of phenylketonuria: current perspectives. *Pediatric health, medicine and therapeutics*, 7, 155–163.
58. Muntau AC, Adams DJ, Bélanger-Quintana A, Bushueva TV, Cerone R, Chien YH, Chiesa A, Coşkun T, de Las Heras J, Feillet F, Katz R, Lagler F, Piazzon F, Rohr F, van Spronsen FJ, Vargas P, Wilcox G, Bhattacharya K. International best practice for the evaluation of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2019 May;127(1):1-11.
59. Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2006–. Sapropterin. 2020 May 11.
60. Burton, B. K., Longo, N., Vockley, J., Grange, D. K., Harding, C. O., Decker, C., Li, M., Lau, K., Rosen, O., Larimore, K., Thomas, J., & PAL-002 and PAL-004 Investigators (2020). Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: Results of the phase 2 dose-finding studies with long-term follow-up. *Molecular genetics and metabolism*, 130(4), 239–246.
61. Longo, N., Dimmock, D., Levy, H., Viau, K., Bausell, H., Bilder, D. A., Burton, B., Gross, C., Northrup, H., Rohr, F., Sacharow, S., Sanchez-Valle, A., Stuy, M., Thomas, J., Vockley, J., Zori, R., & Harding, C. O. (2019). Evidence- and consensus-based recommendations for the use of pegvaliase in adults with phenylketonuria. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 21(8), 1851–1867.
62. Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, Ringnalda F, Pogliano CB, Allegri G, Fingerhut R, Häberle J, Matos J, Robinson MD, Thöny B, Schwank G. Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat Med*. 2018 Oct;24(10):1519-1525.
63. Ahmed SS, Rubin H, Wang M, Faulkner D, Sengooba A, Dollive SN, Avila N, Ellsworth JL, Lamppu D, Lobikin M, Lotterhand J, Adamson-Small L, Wright T, Seymour A, Francone OL. Sustained Correction of a Murine Model of Phenylketonuria following a Single Intravenous Administration of AAVHSC15-PAH. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Mar 13;17:568-580.

64. Wagemaker G. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in inherited metabolic disorders. *Hum Gene Ther.* 2014 Oct;25(10):862-5.
65. Zhu, X., Yin, L., Theisen, M., Zhuo, J., Siddiqui, S., Levy, B., Presnyak, V., Frassetto, A., Milton, J., Salerno, T., Benenato, K. E., Milano, J., Lynn, A., Sabnis, S., Burke, K., Besin, G., Lukacs, C. M., Guey, L. T., Finn, P. F., & Martini, P. G. V. (2019). Systemic mRNA Therapy for the Treatment of Fabry Disease: Preclinical Studies in Wild-Type Mice, Fabry Mouse Model, and Wild-Type Non-human Primates. *American journal of human genetics*, 104(4), 625–637.
66. Balakrishnan, B., An, D., Nguyen, V., DeAntonis, C., Martini, P. G. V., & Lai, K. (2020). Novel mRNA-Based Therapy Reduces Toxic Galactose Metabolites and Overcomes Galactose Sensitivity in a Mouse Model of Classic Galactosemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(1), 304–312.
67. An, D., Schneller, J. L., Frassetto, A., Liang, S., Zhu, X., Park, J. S., Theisen, M., Hong, S. J., Zhou, J., Rajendran, R., Levy, B., Howell, R., Besin, G., Presnyak, V., Sabnis, S., Murphy-Benenato, K. E., Kumarasinghe, E. S., Salerno, T., Mihai, C., Lukacs, C. M., ... Martini, P. G. V. (2017). Systemic Messenger RNA Therapy as a Treatment for Methylmalonic Acidemia. *Cell reports*, 21(12), 3548–3558.
68. Rossi, L., Pierigè, F., Carducci, C., Gabucci, C., Pascucci, T., Canonico, B., Bell, S. M., Fitzpatrick, P. A., Leuzzi, V., & Magnani, M. (2014). Erythrocyte-mediated delivery of phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria in BTBR-Pah(enu2) mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 194, 37–44.
69. Pascucci, T., Rossi, L., Colamartino, M., Gabucci, C., Carducci, C., Valzania, A., Sasso, V., Bigini, N., Pierigè, F., Viscomi, M. T., Ventura, R., Cabib, S., Magnani, M., Puglisi-Allegra, S., & Leuzzi, V. (2018). A new therapy prevents intellectual disability in mouse with phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism*, 124(1), 39–49.
70. Smith, N., Longo, N., Levert, K., Hyland, K., & Blau, N. (2019). Phase I clinical evaluation of CNSA-001 (sepiapterin), a novel pharmacological treatment for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiencies, in healthy volunteers. *Molecular genetics and metabolism*, 126(4), 406–412.
71. sabella, V. M., Ha, B. N., Castillo, M. J., Lubkowitz, D. J., Rowe, S. E., Millet, Y. A., Anderson, C. L., Li, N., Fisher, A. B., West, K. A., Reeder, P. J., Momin, M. M., Bergeron, C. G., Guilmain, S. E., Miller, P. F., Kurtz, C. B., & Falb, D. (2018). Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria. *Nature biotechnology*, 36(9), 857–864.
72. Vockley J, Sacharow S, Searle S, Kurtz C & Querbes W A phase 1/2a oral placebo-controlled study of SYN1618 in healthy adult volunteers and subjects with phenylketonuria [abstract O-027]. *J. Inherit. Metab. Dis* 42 (Suppl. 1), 13 (2019).
73. Estrada-Rivadeneira D. Sanger sequencing. *FEBS J.* 2017 Dec;284(24):4174.
74. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, *Applied Biosystems Chemistry Guide*, 3rd edition (2016, 214 pages)

75. Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., & Gatta, V. (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3245–3276.
76. van Wegberg, A. M. J., Evers, R. A. F., van Dam, E., de Vries, M. C., Janssen, M. C. H., Heiner-Fokkema, M. R., & van Spronsen, F. J. (2020). Does the 48-hour BH4 loading test miss responsive PKU patients?. *Molecular genetics and metabolism*, 129(3), 186–192.
77. Guldberg P, Romano V, Ceratto N, Bosco P, Ciuna M, Indelicato A, Mollica F, Meli C, Giovannini M, Riva E, et al. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. *Hum Mol Genet*. 1993 Oct;2(10):1703-7.
78. Bénit P, Rey F, Blandin-Savoja F, Munnich A, Abadie V, Rey J. The mutant genotype is the main determinant of the metabolic phenotype in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 1999 Sep;68(1):43-7.
79. Dworniczak, B., Aulehla-Scholz, C., Kalaydjieva, L., Bartholomé, K., Grudda, K., & Horst, J. (1991). Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: the major cause for phenylketonuria in parts of southern Europe. *Genomics*, 11(2), 242–246.
80. Guldberg, P., Henriksen, K. F., & Güttler, F. (1993). Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*, 17(1), 141–146.
81. Dworniczak, B., Kalaydjieva, L., Aulehla-Scholz, C., Ullrich, K., Kremensky, I., Radeva, B., & Horst, J. (1991). Recurrent nonsense mutation in exon 7 of the phenylalanine hydroxylase gene. *Human genetics*, 87(6), 731–733.
82. Ferreira F, Azevedo L, Neiva R, Sousa C, Fonseca H, Marcão A, Rocha H, Carmona C, Ramos S, Bandeira A, Martins E, Campos T, Rodrigues E, Garcia P, Diogo L, Ferreira AC, Sequeira S, Silva F, Rodrigues L, Gaspar A, Janeiro P, Amorim A, Vilarinho L. Phenylketonuria in Portugal: Genotype-phenotype correlations using molecular, biochemical, and haplotypic analyses. *Mol Genet Genomic Med*. 2021 Mar;9(3):e1559.
83. Gundorova, P., Zinchenko, R. A., Kuznetsova, I. A., Bliznetz, E. A., Stepanova, A. A., & Polyakov, A. V. (2018). Molecular-genetic causes for the high frequency of phenylketonuria in the population from the North Caucasus. *PloS one*, 13(8), e0201489.
84. Daniele, A., Cardillo, G., Pennino, C., Carbone, M. T., Scognamiglio, D., Correr, A., Pignero, A., Castaldo, G., & Salvatore, F. (2007). Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Annals of human genetics*, 71(Pt 2), 185–193.
85. Guldberg, P., Rey, F., Zschocke, J., Romano, V., François, B., Michiels, L., Ullrich, K., Hoffmann, G. F., Burgard, P., Schmidt, H., Meli, C., Riva, E., Dianzani, I., Ponzzone, A., Rey, J., & Güttler, F. (1998). A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105

- mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *American journal of human genetics*, 63(1), 71–79.
86. Waters, P. J., Parniak, M. A., Nowacki, P., & Scriver, C. R. (1998). In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Human mutation*, 11(1), 4–17.
87. Farrugia R, Scerri CA, Montalto SA, Parascandolo R, Neville BG, Felice AE. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency in the Maltese population. *Mol Genet Metab*. 2007 Mar;90(3):277-83.
88. Lockyer J, Cook RG, Milstien S, Kaufman S, Woo SL, Ledley FD. Structure and expression of human dihydropteridine reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(10):3329-33.
89. Fujimoto K, Ichinose H, Nagatsu T, Nonaka T, Mitsui Y, Katoh S. Functionally important residues tyrosine-171 and serine-158 in sepiapterin reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 18;1431(2):306-14.