

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**KLASİK FENİLKETONÜRİLİ HASTALARDA GENETİK
MUTASYON ÇEŞİTLİLİĞİ**

Dr. Sevgi KUŞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**KLASİK FENİLKETONÜRİLİ HASTALARDA GENETİK
MUTASYON ÇEŞİTLİLİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sevgi KUŞ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Murat Derya ERÇAL

TEŞEKKÜR

Bilimsel yaklaşımı, tecrübelerini paylaşırken gösterdiği hoşgörü ve sabrı ile asistanı olmaktan kıvanç duyduğum, tıp etiği ve meslek sevgisi ile yol gösteren, değerli hocam Sn. Prof. Dr. Murat Derya ERÇAL'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi, deneyim ve rehberliğini esirgemeyen değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Murat DUMAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışma onuruna ve şansına eriştiğim, çocuk hekimi olma yolunda eğitimim süresince önemli katkı ve desteklerini gördüğüm, Çocuk Metabolizma Bilim Dalı'na olan ilgimin en büyük nedenlerinden biri olan Sn. Prof. Dr. Nur ARSLAN'a,

Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, birbirinden değerli, Çocuk Metabolizma Bilim Dalı Uzm. Dr. Pelin Teke KISA ve Uzm. Dr. Engin KÖSE'ye,

Asistanlık yıllarımda motivasyonu, enerjisi ve gülüyüzünü benden esirgemeyen arkadaşlarım Asist. Dr. Sena KALKAN BULUT, Asist. Dr. Zeynep ÖLMEZ, Asist. Dr. Tuğçe AK, Asist. Dr. Mahli Batuhan ÖZDOĞAR'a,

Tezimi ilerletmemde yardımlarını esirgemeyen ve bildiklerini bana öğretmekten yorulmayan Uzm. Dr. Gizem Bakır ÜSTÜNDAĞ'a,

Eğitim hayatım boyunca, tanıştığımız andan beri bana olan inancını kaybetmeyen, Asist. Dr. Ersin KUŞ'a

Hayatımın her anında olduğu gibi, asistanlık sürecinde de hoşgörü ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme;

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi KUŞ

İzmir, 2020

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Fenilalanin.....	2
2.1.1. Fenilalanin Metabolizması.....	2
2.2. Fenilketonüri.....	4
2.2.1. Fenilketonürinin Tanımı ve Tarihçesi.....	5
2.2.2. Fenilketonürinin Epidemiyolojisi.....	6
2.2.3. Fenilketonürinin Nedenleri ve Sınıflandırılması.....	6
2.2,3.1. Primer (Kalıtsal) Hiperfenilalaninemi.....	7
2.2,3.2.Sekonder Fenilketonüri.....	9
2.2.4. Fenilketonüride Klinik Bulgular.....	10
2.2.5. Fenilketonüride Tarama, Tanı ve Tedavi.....	11
2.2.5.1.Diyet.....	12
2.2.5.2.Büyük nötral amino asitler (LNAA).....	13
2.2.5.3.Sentetik Tetrahidrobyopterin preparatları.....	13
2.2.5.4.Enzim tedavisi.....	13
2.2.5.5.Gen tedavisi.....	14
2.2.6. Fenilketonüride İzlem.....	14
2.2.7. Fenilketonüri ve Genetik.....	14
2.2.7.1. Fenilketonüride Genotip-Fenotip ilişkisi.....	19
2.2.7.2. Fenilalanin Hidroksilaz ve Diğer Enzimler.....	23
2.2.8. Tek Gen Hastalıklarında Tanı.....	24
2.2.8.1.Yeni Mutasyonların Saptanması.....	25
2.2.8.2.Yeni Nesil Dizileme ve Mendelian Kalıtılan Hastalıklar.....	25

3.MATERYAL VE METOD.....	26
4.BULGULAR.....	30
4.1. Cinsiyet.....	30
4.2. Başvuru yaşı.....	30
4.3. Coğrafik dağılım.....	31
4.4. Akrabalık ilişkisi.....	32
4.5. Ortanca kan fenilalanin düzeyleri.....	33
4.6. Tedavi tipleri.....	34
4.7. Komorbidite / büyüme ve nöromotor gelişim problemleri.....	35
4.8. Genotip.....	36
4.8.1. Ortanca kan fenilalanin düzeyleri ile genotip Karşılaştırması.....	46
4.8.2. Genotip ile tedavi tipleri karşılaştırması.....	52
5.TARTIŞMA.....	61
6.SONUÇLAR.....	84
7.KISITLILIKLAR.....	88
8.KAYNAKLAR.....	89
9.EKLER.....	100

TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 1. Populasyona göre FKÜ sıklığı.....	6
Tablo 2. Hiperfenilalanineminin geçici veya kalıtsal nednelere bağlı olarak sınıflandırılması.....	7
Tablo 3. Hiperfenilalaninemilerin tetrahydrobiopterin yanıtına göre sınıflandırılması.....	8
Tablo 4. Fenilketonürlü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri	11
Tablo 5. PAH geninde meydana gelen mutasyonların saptanması	
Tablo 6. PAH geninde sık görülen haplotiplerin bazı Avrupa ülkelerindeki sıklığı.....	19
Tablo 7. Tetrahydrobiopterinin olduğu metabolik yoldaki diğer enzimler ve neden oldukları hastalıklar.....	24
Tablo 8. Mutasyon analizi yapılan hastaların cinsiyete göre dağılımı.....	30
Tablo 9. PAH gen analizi yapılan hastaların polikliniğe başvurdukları yaş aralığının dağılımı.....	31
Tablo 10. Çalışmaya alınan hastaların güncel yaş aralıkları.....	31
Tablo 11. Hastaların kayıtlı oldukları bölgelere göre dağılımı.....	32
Tablo 12. Hastaların ebeveynlerinin akrabalık ilişkisinin Dağılımı.....	32
Tablo 13. Yaş gruplarına gruplarına göre klasik FKÜ’li bireylerin dosya kayıtlarından elde edilen kan FA düzeyi ölçüm sayılarının ortalama ve alt, üst değerleri.....	33
Tablo 14. Ortanca kan fenilalanin düzeylerine (kontrol tiplerine) göre hasta dağılımı.....	34
Tablo 15. Ortanca kan fenilalanin düzeylerine göre hasta Dağılımı.....	34
Tablo 16. Hastaların aldıkları tedavilere göre dağılımı.....	35
Tablo 17. Hastalara eşlik eden hastalıklarının olması ile	

hastaların kan FA ortanca düzeylerinin seyri.....	36
Tablo 18. Mutasyon analizi sonucu saptanan allel frekansları, nükleotid ve protein değişimlerine göre adlandırmaları.....	37
Tablo 19. Nükleotid değişimi ve bulunduğu gen bölgesi, mutasyon çeşidi, allelik fenotip değeri, etkilediği enzim alt bölgesi ve enzimatik aktivite yüzdesi (%).	39
Tablo 20. Klasik fku hastalarında genotip dağılımı, APV değeri, klasik FKÜ ile ilişki yüzdesi, BH4 yükleme testine verdikleri olumlu/olumsuz/yavaş yanıt yüzdeleri.....	41
Tablo 21. PAH geni genotipleri mutasyon sınıflaması.....	44
Tablo 22. Allelik mutasyon sınıflaması.....	44
Tablo 23. Bileşik heterozigot mutasyonları sınıflaması.....	45
Tablo 24. FA ortanca düzeyi 4 mg/dL'nin altında seyreden hastaların allel sıklığı.....	46
Tablo 25. FA ortanca düzeyleri 4 mg/dL'nin altında seyreden hastaların genotipleri.....	46
Tablo 26. FA ortanca düzeyleri 4-6 mg/dL aralığında seyreden hastaların allel sıklığı.....	47
Tablo 27. FA ortanca düzeyleri 4-6 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri.....	48
Tablo 28. Allelik mutasyon çeşitleri ile ortanca FA düzeyi Karşılaştırılması.....	49
Tablo 29. FA ortanca düzeyleri 6-10 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri.....	49
Tablo 30. FA ortanca düzeyleri 10-20 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri.....	50
Tablo 31. FA ortanca düzeyleri 20mg/dL'nin üzerinde seyreden hastaların genotip analizleri.....	51
Tablo 32. Homozigot/bileşik genotip sıklığının ortanca FA düzeyi ile karşılaştırılması.....	51

Tablo 33. Fenilalaninden kısıtlı diyet alan hastalarda allelık frekans yüzdeleri.....	52
Tablo 34. Fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisi alan hastaların genotip dağılımları.....	53
Tablo 35. Fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisi alan hastaların genotip dağılımları.....	55
Tablo 36. Fenilalaninden kısıtlı diyet ve LNAA tedavisi alan hastaların genotip dağılımları.....	55
Tablo 37. BH4 tedavisi alan hastaların allel sıklıkları.....	56
Tablo 38. BH4 tedavisi alan hastaların genotiplerinin veritabanına göre BH4'e yanıt alınma yüzdeleri ve genotip sıklıkları.....	57
Tablo 39. Allelik mutasyon ve aldıkları tedavi karşılaştırması.....	58
Tablo 40. Allelerin BH4 tedavisine yanıtlarının karşılaştırılması.....	59
Tablo 41. BH4 tedavisi denenmiş ancak yanıt alınamamış Genotipler.....	60
Tablo 42. Tedavi tiplerine göre genotip değerlendirmesinde ortak bulunan 3 genotip dağılımı.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 1: Fenilalaninin kimyasal yapısı.....	2
Şekil 2: Fenilalanin hidroksilaz tepkimesinde tetrahidrobiopterinin rolü.....	3
Şekil 3: Fenilalanin hidroksilasyon sistemi Pterin ve diğer pterin bağımlı enzimlerin rejenerasyon ve sentezi.....	4
Şekil 4: İnsan fenilalanin hidroksilaz enziminin monomer yapısı.....	15
Şekil 5: 12. Kromozom üzerinde PAH geni lokalizasyonu.....	15
Şekil 6: PAH geninde tanımlanan mutasyonlar ve polimorfik bölgelerin Gen içindeki dağılımları.....	16
Şekil 7: Avrupa ve Asya kökenli populasyonlarda PAH mutasyonları ve dağılımı.....	17
Şekil 8: Wettstein ve ark. yaptığı çalışmada fenotip ve enzimatik alt bölge karşılaştırması grafiği	23
Şekil 9: Poliklinik takibinde olan hastaların sayısı ve incelenen Özellikleri.....	26
Şekil 10: Avrupada'ki yaygın mutasyonlar. Mutasyonların bölgesel dağılımı ve muhtemel kökenleri ile göç yolları rotası.....	67

KISALTMALAR

ASO	: Allel spesifik oligonükleotid (Allele specific oligonucleotide)
BH2	: Dihidrobiopterin (Quinon)
BH4	: Tetrahidrobyopterin
Biopkudb	: BIOPKU database (BIOPKU veritabanı)
DGGE	: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Denatüre Gradiyent Jel Elktroforez)
DHRP	: Dihidropteridin redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOPA	: Dihidroksifenilalanin
DYT5	: Dopa-yanıtlı distoni
EC	: Enzyme Commision number (Enzim komisyon Numarası)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EEG	: Elektroensefalografi
FA	: Fenilalanin
PAH	: Fenilalanin Hidroksilaz
FAL	: Fenilalanin aminolizaz
FKÜ	: Fenilketonüri
GTP	: Guanozin trifosfat
GTPCH	: Guanozin trifosfat siklohidroksilaz
H	: Hidrojen atomu
H₂O	: Su molekülü
HFA	: Hiperfenilalaninemi
HPLC	: High performance liquid chromatography (Yüksek basınçlı sıvı Kromatografisi)
IQ	: Intellegence quoient (Zeka katsayısı)
LNAA	: Large Neutral Amino Acids (Büyük nötral aminoasitler)
NAD	: Nikotinamid adenzin dinükleotid
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz

O₂	: Oksijen atomu
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man Database
P	: Fosfat
PCD	: Pterin-4-alfa-karbinolamin dehidrataz
PCR	: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PTPS	: Piruvoyl-tetrahidrobiopterin sentaz
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon Fragman uzunluk polimorfizmi)
RNA	: Ribonükleik asit
SD	: Standart sapma
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
SR	: Sepiapterin reduktaz
SSCP	: Tek Zincir konformasyon polimorfizmi (Single Strand Conformational Polymorphism)
Trph	: Triptofan hidroksilaz
Tyrh	: Tirozin hidroksilaz
UV	: Ultraviyole
VTNR	: Variable number tandem repeats (Değişken sayılı bitişik tekrarlar)
YND	: Yeni nesil dizileme

ÖZET

Dr. Sevgi Kuş. **Klasik Fenilketonürlü Hastalarda Genetik Mutasyon Çeşitliliği.**
Dokuz Eylül Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,
Uzmanlık Tezi, İZMİR 2020.

Fenilketonüri 452 aminoasit içeren fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin sentezlenmesini sağlayan fenilalanin hidroksilaz genindeki mutasyonlar ile oluşur. Fenilketonüri otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. PAH geni 12q22-q24.1 kromozomunda bulunur ve PAH geninde meydana gelen, günümüzde tanımlanmış mutasyonlar; yanlış anlamlı mutasyonlar, splice bölge mutasyonları, anlamsız mutasyonlar ile küçük delesyonlar ve insersiyonlardır. Fenilalanin hidroksilaz allellerinin %60'ından fazlasında yanlış anlamlı mutasyonlar saptanmıştır.

Bu mutasyonların saptanması hem tanısal olarak hem de genetik danışma amaçlı, uzun dönem tedavi takibi veya klinik izlem amacıyla kullanılır. Erken evredeki mutasyon analizi, klinik prognozu değerlendirmede ve tedavi açısından tartışmalı kalınan durumlarda yol göstericidir. Mutasyonlar etnik özelliklere göre farklılık göstermektedir. Örneğin intron 10'daki bir splice bölge mutasyonu (IVS10-11G>A) Türklerde görülen tüm mutasyonların %40'ı kadarını oluşturmaktadır. Avrupa kökenli popülasyonda mutant kromozomların üçte ikisinden altı farklı mutasyon sorumludur. Asya toplumunda fenilalanin hidroksilaz mutasyonlarının %80'inden fazlasını diğer altı mutasyon oluşturmaktadır. Geriye kalan hastalık yapıcı mutasyonlar tek başlarına enderdir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda çoğu ülke için kapsamlı mutasyon verileri yayınlanmıştır. Amacımız Dokuz Eylül Üniversitesi'nde Çocuk Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen klasik fenilketonürlü hastaların genetik mutasyon çeşitliliğini saptamaktır. Bu araştırmada klasik fenilketonüri tanısı ile takip edilemekte olan 112 hastanın, sonuçları değerlendirilmiştir. Klasik fenilketonüri hastalarının verileri; başvuru yaşı, cinsiyet, coğrafik dağılım, akrabalık, ortanca kan fenilalanin düzeyi, tedavi tipi, sapropterin yanıtı, tedaviye uyumluluk ve genotip çeşitliliği yönünden istatistiksel analiz için SPSS Version 20.0 for Windows programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Veriler ki-kare testi ve Mann Whitney-U testi ile analiz edilmiş olup bağımsız parametreler arasındaki korelasyonun

değerlendirilmesi için Pearson korelasyon analizi kullanılmış, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Mutasyon analizi yapılan 112 hastanın 66'sında (%58,9) fenilalanin hidroksilaz geninde homozigot mutasyon bulunurken, 44 (%39,2) vakada birleşik heterozigot mutasyon bulundu. 2 (%1,7) vakada ise fenilalanin hidroksilaz gen analizinde mutasyon saptanamadı. Fenilalanin hidroksilaz geni mutasyon analizi sonucu 35 farklı allel tespit edildi. Bunlardan 3'ü daha önce literatürde tanımlanmamış mutasyonlardı. Hastalarımızda en sık görülen ilk 3 mutasyon c.1066-11G>A (%37,3), c.782G>A (%10,9), ve c.441+5G>T (%5,5) idi. Genotip analizi yapılan 112 klasik fenilketonüri hastasında 49 farklı genotip saptanmış olup, en sık olarak %31,8 oranla IVS10-11G>A/IVS10-11G>A (%31,8) genotipi, ikinci sıklıkta c.782G>A/c.782G>A (%9) genotipi ve üçüncü sıklıkta IVS4+5G>T/IVS4+5G>T (%4,5) genotipi görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: klasik fenilketonüri, genotip, fenotip, tedavi, takip

ABSTRACT

Sevgi Kuş, MD. Genetic mutation diversity in patients with classical phenylketonuria. Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Thesis of Graduation, IZMİR 2020.

Phenylketonuria is caused by mutations in the phenylalanine hydroxylase gene that enable the synthesis of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH) containing 452 amino acids. Phenylketonuria is autosomal recessive disease. PAH gene is located on chromosome 12q22-q24.1 and currently defined mutations in this gene are; missense mutations, splice region mutations, nonsense mutations, and small deletions and insertions. Missense mutations were detected in more than 60% of phenylalanine hydroxylase alleles.

Detection of these mutations is used for both diagnostic and genetic counseling, long-term treatment follow-up or clinical follow-up. Early-stage mutation analysis is a guide in evaluating clinical prognosis and in cases of controversy regarding treatment. Mutations differ according to ethnic characteristics. For example, a splice region mutation (IVS10-11G> A) in intron 10 accounts for 40% of all mutations seen in Turks. Six different mutations are responsible for two-thirds of the mutant chromosomes in the European population. More than 80% of phenylalanine hydroxylase mutations in Asian society constitute the other six mutations. The remaining disease-causing mutations alone are rare.

Extensive mutation data have been published for most countries as a result of research conducted in recent years. Our aim is to determine the genetic mutation diversity of patients with classical phenylketonuria followed by the Pediatric Genetics Department at Dokuz Eylül University. The results of 112 patients who were diagnosed at their admission to an external center or hospital and who were being followed up with the diagnosis of classical phenylketonuria were evaluated. Data of classical phenylketonuria patients; SPSS Version 20.0 for Windows program was used for statistical analysis in terms of admission age, gender, geographical distribution, kinship, median blood phenylalanine level, treatment type, sapropterin response, treatment compliance and genotype diversity. The data were analyzed with the chi-square test and Mann Whitney-U test, and Pearson correlation analysis was

used to evaluate the correlation between independent parameters, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

While a homozygous mutation was found in the phenylalanine hydroxylase gene in 66 (58,9%) of 112 patients whose mutation analysis was performed, a combined heterozygous mutation was found in 44 (39,2%) cases. In 2 (1,7%) cases, no mutation was detected in phenylalanine hydroxylase gene analysis. As a result of the phenylalanine hydroxylase gene mutation analysis, 35 different alleles were detected. Three of these were mutations that were not previously described in the literature. The most common 3 mutations in our patients were c.1066-11G> A (37,3%), c.782G> A (10,9%), and c.441 + 5G> T (5,5%). 49 different genotypes were detected in 112 classical phenylketonuria patients. The most common was IVS10-11G> A / IVS10-11G> A (31,8%) genotype, the second most common being c.782G> A / c. Genotype 782G> A (9%) and IVS4 + 5G> T / IVS4 + 5G> T (4,5%) genotype were observed in the third order.

Keywords: classical phenylketonuria, genotype, phenotype, treatment, follow-up

1.GİRİŞ VE AMAÇ

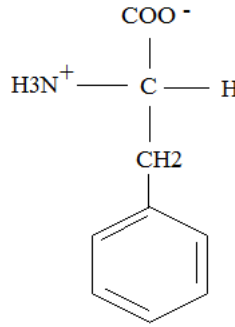
Fenilketonüri 452 aminoasit içeren fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin sentezlenmesini sağlayan fenilalanin hidroksilaz genindeki mutasyonlar sonucu oluşur. Fenilketonüri otozomal resesif olarak kalıtılır. PAH geni 12q22-q24.1 kromozomunda bulunur ve bu gende meydana gelen günümüzde tanımlanmış mutasyonlar; yanlış anlamlı, kırılma ve anlamsız mutasyonlar ile küçük delesyonlar ve insersiyonlardır (1,2). Fenilalanin hidroksilaz allellerinin %60'ından fazlasında yanlış anlamlı mutasyonlar saptanmıştır (3). Erken evredeki mutasyon analizi, klinik prognozu değerlendirmede ve tedavi açısından tartışmalı kalınan durumlarda yol gösterici olabilmektedir (4). Mutasyonlar etnik özelliklere göre farklılık göstermektedir. İntron 10'daki bir kesilme mutasyonu (IVS10-11G>A) Türklerde görülen tüm mutasyonların %40 kadarını oluşturmaktadır. Avrupa kökenli populasyonda mutant kromozomların üçte ikisinden altı farklı mutasyon sorumludur. Asya toplumunda fenilalanin hidroksilaz mutasyonlarının %80'inden fazlasını diğer altı mutasyon oluşturmaktadır. Geriye kalan hastalık yapıcı mutasyonlar tek başlarına ender olarak görülür (5).

Fenilalanin hidroksilaz eksikliği, sık görülen kalıtsal bir hastalık olduğundan, hastalığın nüfus genetiği araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Amacımız Dokuz Eylül Üniversitesi'nde Çocuk Metabolizma Bilim Dalı ve Çocuk Genetik Bilim Dalı tarafından takip edilen klasik fenilketonüri hastaların genetik mutasyon çeşitliliğini saptamak ve prognoz ile ilişkisini araştırmaktır. Bu hastaların başvuru yaşı, cinsiyet, coğrafik dağılım, akrabalık, ortanca kan fenilalanin düzeyleri, tedavi tipleri, sapropterin yanıtı, tedaviye uyumluluk ve genotip çeşitliliği yönünden değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Fenilalanin

Fenilalanin (FA), proteinlerin aminoasit içeriklerinin %4-6 kadarını oluşturan diyet ile alınan esansiyel bir aminoasittir (6). (Şekil 1)



Şekil 1. Fenilalaninin kimyasal yapısı

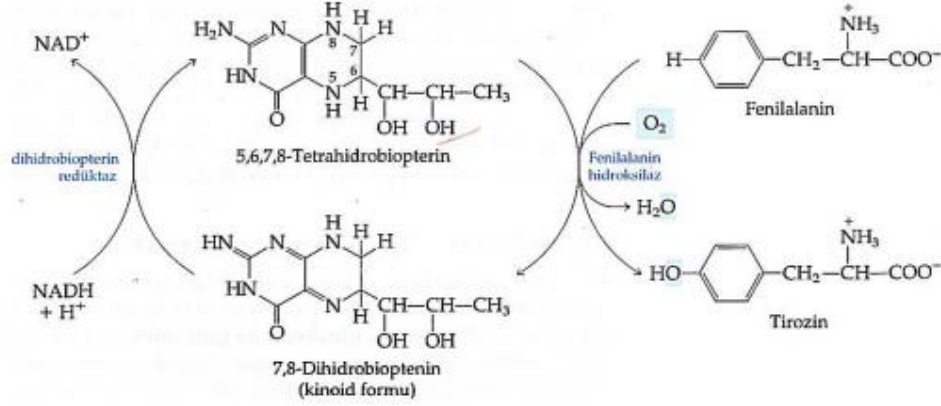
2.1.1 Fenilalanin Metabolizması

Fenilalanin vücutta tirozine dönüştürülerek epinefrinin, dopaminin, norepinefrinin, adrenalinin ve tiroid hormonunun yapımının yanı sıra önemli nöropeptidlerin, somatostatinin, vazopressinin, melanotropinin, adrenokortikotropik hormonun, substans P'nin, enkefalinin, vazoaktif intestinal peptidin, anjiyotensin II'nin ve kolesistokinin üretiminde de rol alır (7).

Plazmadaki fenilalanin dengesi, diyetle alınan fenilalanin ve proteolizise karşılık fenilalaninin protein sentezinde kullanılması, tirozine hidroksilasyonu ve minör metabolitlere dönüşümü ile sağlanır. Bu bileşenlerin herhangi birinde farklılık olması durumunda fenilalanin homeostazı bozulmaktadır. Fenilalanin metabolizmasının çoğunluğu (%75) hidroksilasyon reaksiyonu yönündedir (8).

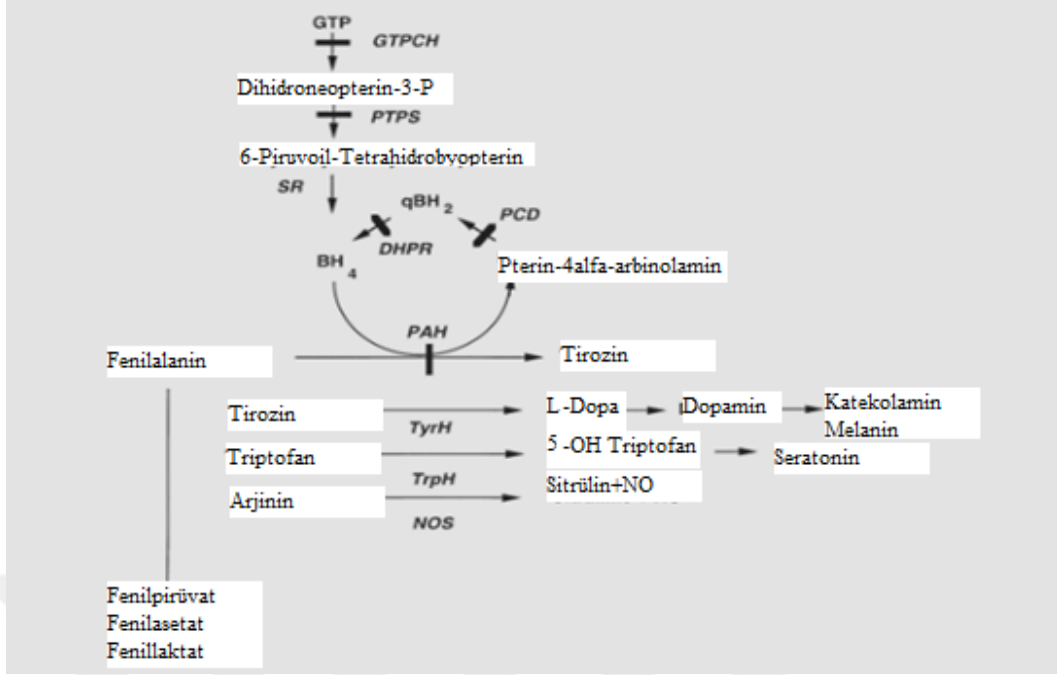
Fenilalanin hidroksilaz, karışık işlevli oksidazlar olarak adlandırılan genel bir grup enzimden biridir ve bunların tümü bir oksijen atomuyla bir substratın hidroksillenmesini ve diğer oksijen atomunun su molekülüne indirgenmesini eş zamanlı katalizler. Fenilalanin hidroksilaz (PAH) tetrahidrobiopterin (BH₄)

kofaktörünü gerektirir, bu yapı, süreç içinde elektronları nikotinamid adenzin dinükleotidden oksijen atomuna taşır ve dihidrobiopterine oksitlenir (9). (Şekil 2)



Şekil 2. Fenilalanin hidroksilaz tepkimesinde tetrahydrobiopterinin rolü. (NAD^+ : Nikotinamid adenzin dinükleotid, H^+ : Hidrojen atomu, O_2 : Oksijen atomu, H_2O : Su molekülü)

Katekolamin sentezi, fenilalanin ve triptofan hidroksilaz gibi BH_4 'e bağlı olan tirozin hidroksilaz ile başlar. Üçü de biyopterin eksikliğinden veya dihidrobiyoperin redüktazdaki bir kusurdan etkilenir. Tirozin hidroksilaz, DOPA, dioksofenilalanin olarak da bilinen dihidroksifenilalanin üretir. Kofaktör olarak piridoksal fosfat içeren DOPA dekarboksilaz, DOPA'dan aktif nörotransmitter olan dopamin oluşturur. Bu enzim, substantia nigra ve beynin diğer bazı kısımlarında bu yoldaki son enzimdir. Adrenal medulla, dopamini norepinefrin ve epinefrine dönüştürür. Deri ve saçın siyah pigmenti melanin de tirozinden sentezlenmektedir (10). (Şekil 3)



Şekil 3. Fenilalanin hidroksilasyon sistemi Pterin ve diğer pterin bağımlı enzimlerin rejenerasyon ve sentezi (BH₂: dihidrobiopterin (quinon), BH₄: tetrahidrobiopterin, DHPD: dihidropteridin redüktaz, GTP: guanozin trifosfat, GTPCH: guanozin trifosfat siklohidroksilaz, NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentetaz, P: fosfat, PAH: Fenilalanin hidroksilaz, PCD: pterin-4-alfa-karbinolamin dehidrataz, PTPS: piruvoil-tetrahidrobiopterin sentaz, SR: sepiapterin reduktaz, TrpH: Tryptofan hidroksilaz, TyrH: Tirozin hidroksilaz)

Fenilalanin katabolizmasında daha az kullanılan transaminasyon yolu ile fenilpirüvat ve sonra fenilaktat veya fenilasetat oluşur. Fenilasetat da insanda glutamin ile birleşerek idrar ile atılan fenilasetilglutamini oluşturur. Fenilalanin yıkımı, bu yoldaki enzimlerin genetik hataları, çeşitli kalıtsal insan hastalıklarına yol açtığından önemlidir (9).

2.2. Fenilketonüri

‘Doğumsal metabolik hastalık’ tanımı ilk kez 100 yıl kadar önce Archibald Garrod tarafından alkaptonüri için kullanılmıştır (11). Günümüze kadar 1000’den fazla doğumsal metabolik hastalık tanımlanmıştır (12). Bireysel olarak nadir olmalarına rağmen, bir hastalık grubu olarak göreceli daha sık rastlanmaktadır ve toplam insidansı 1:800-1:2500 doğumdur (13).

Bir kaç istisna dışında metabolik hastalıkların büyük çoğunluğu otozomal resesif kalıtım göstermektedir. Ülkemizde akraba evliliği oranının yüksek olması

metabolik hastalık olasılığını artırmaktadır. Dünyada en sık görülen kalıtsal aminoasit metabolizma hastalığı ise fenilketonüridir (10).

2.2.1. Fenilketonürinin Tanımı ve Tarihçesi

İlk kez 1934 yılında Abjörn Fölling tarafından tanımlanan fenilketonüri (PKU OMIM 261600), karaciğerde fenilalanini tirozine çeviren fenilalanin hidroksilaz enziminin (EC 1.14.16.1) eksikliği nedeni ile fenilalaninin vücut sıvıları ve beyinde birikmesi ile ortaya çıkan, otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır (8,14).

1934'te Asbjørn Følling, belirli bir tür zihinsel engelliliğin vücut sıvılarındaki yüksek fenilalanin seviyelerinden kaynaklandığını fark etti. İdrarda spesifik koku ve eşlik eden bulguların olması nedeni ile bakılan idrarda fenilpirüvikasit olduğunu keşfetmesi ile ilk olarak 'imbecillitas phenylpyrouvica' adı ile tanımlanmıştır. Sonrasında 1937 yılında İngiliz genetikçi Lionel Penrose, daha kısa bir isim önermiş ve hastalık böylece fenilketonüri (FKÜ) olarak tanımlanmıştır (15). Lionel Penrose, FKÜ'nun insan popülasyonlarında rastgele dağılmadığını ve tedavi edilebileceği fikrini öne sürmüştür. 1950'lerin ortalarında, FKÜ'lü bireylerin hepatik sitozolik fenilalanin hidroksilaz enzim aktivitesinin eksik olduğu gösterilmiştir. Daha sonra, etkilenen bireylerin, temel besin fenilalaninin diyetten kısıtlanmasına yanıt verdiği gösterilmiştir. 1960'larda, erken tanı ve başarılı tedaviye erişim sağlayarak yenidoğanların kitle taraması için Guthrie mikrobiyal inhibisyon deneyi uygulamaya konulmuştur. Yüksek fenilalanin için yenidoğan taraması, 1960'ların ortalarından beri ve 1970'lerin başından beri diğer birçok gelişmiş ülkede Kuzey Amerika ve Birleşik Krallık'ta rutin olmuştur. Erken tedavi edilen PAH eksikliği olan çocuklar için mükemmel prognoz ve tedavi edilmeyen çocuklar için ciddi ve geri döndürülemez beyin hasarı riski nedeniyle test rutin hale gelmiştir. 1970'lerde, yüksek fenilalanin seviyelerinin hepsinin fenilketonüriden kaynaklanmadığı keşfedilmiştir. Bazı formlar, fenilalanin hidroksilasyon reaksiyonunda yer alan kofaktörün sentezi ve geri dönüşümü bozukluklarından kaynaklandığı belirtilmiştir (16). 1983'de fenilalanin hidroksilaz cDNA'sında RFLP (restriction fragment length polymorphism) polimorfik belirleyicilerin varlığı gösterilmiş (17). Dahl ve arkadaşları 1984'de PAH cDNA'sı kullanılarak PAH lokusunun 12. kromozomunun uzun kolunda (12q22) lokalize olduğunu göstermişlerdir (18,19). 1985 yılında PAH

geninin 100 kb, mRNA'nın ise 2.4 kb'lık olduğu gösterilmiştir. 1992'de PAH aktivitesi ile hastalık fenotipi arasında belirli bir bağlantının olduğu gösterilmiştir. Eiken 1996'da PAH genindeki mutasyonların saptanması için DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analizi kullanmıştır (20). 2002 yılında FKÜ'nin tedavisi için gen tedavisi ve enzim replasman tedavileri için çalışmalar başlamıştır (21).

2.2.2. Fenilketonürinin Epidemiyolojisi

FKÜ'nün tüm dünyada, taranmış nüfusta sıklığı 1/12.000'dir. Tahmini taşıyıcı frekansı 1/55'tir(9). Dünyadaki verilerle karşılaştırıldığında ülkemiz, FKÜ hastalığının İrlanda (22) ve Yemen kökenli Yahudilerle (23) birlikte en sık görüldüğü ülkedir.(Tablo 1) Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın 2017 tarihli "Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları Kontrol Programı 2018-2021"e göre fenilketonüri insidansı 1/4500 ve FKÜ taşıyıcılık sıklığı %4 olarak rapor edilmiştir. 1990'da yapılan bir çalışmada ülkemizde total FKÜ sıklığı 1/4370 ve hafif hiperfenilalaninemi (HFA) görülme sıklığı 1/8971 olarak rapor edilmiştir (24). Sağlık Bakanlığı'nın en son verilerine göre ülkemizde fenilketonüri sıklığı 1/5200 olarak kabul edilmektedir.

Tablo 1. Populasyona göre FKÜ sıklığı

Bölge	Ülke	FKÜsıklığı
Asyalı popülasyonlar	Çin	1:17000
	Japonya	1:125000
	Türkiye	1:5049
	Yemen Yahudileri (İsrail)	1:5300
	İskoçya	1:5300
	Çekoslovakya	1:7000
	Macaristan	1:11000
	Danimarka	1:12000
	Fransa	1:13500
	Norveç	1:14500
Avrupalı popülasyonlar	İngiltere	1:14300
	İtalya	1:17000
	Kanada	1:22000
	Finlandiya	1:200000
	İrlanda	1:6110
	Arap popülasyonları	1:6000 'e kadar
	Okyanusya	Avustralya 1:10000

2.2.3. Fenilketonürinin Nedenleri ve Sınıflandırılması

Fenilalanin aminoasidinin tirozine dönüşümünü sağlayan PAH veya bu enzimin kofaktörü olan BH4 sentez ve rejenerasyonundan sorumlu olan diğer

enzimlerdeki bozukluğa bağılı olarak ortaya çıkan heterojen hastalık grubu hiperfenilalaninemi (HFA) olarak adlandırılmaktadır (8).

Çocuklarda normal kan fenilalanin aralığı (ortalama 8 yaşında iken) $1,03 \pm 0,3$ mg/dL, ergenlerde (ortalama 16 yaşında iken) $1 \pm 0,21$ mg/dL, erişkinlerde normal kan fenilalanin düzeyleri ise $0,96 \pm 0,25$ mg/dL'dir. Ergen erkeklerin kan fenilalanin düzeyleri kızlarınkinden biraz daha yüksek izlenmektedir. Yenidoğan ve daha büyük çocuklarda normal kan fenilalanin düzeyleri erişkinlerdeki ile aynı düzeydedir (6).

HFA, plazma fenilalanin değerinin 2 mg/dL üzerinde olmasıdır. Hiperfenilalaninemisinin ciddiyeti genotip veya enzim eksikliğinin düzeyine göre yüksek fenilalanin konsantrasyonlarından hafif artışlara kadar değişkenlik gösteren formlardadır (14).

HFA'lar kalıtsal (primer) veya geçici (sekonder) nedenlere bağılı olarak meydana gelebilir. Primer HFA'lar kalıtsal nedenlere bağılyken sekonder HFA'lar geçici nedenlere bağılı olarak oluşmaktadır (25). (Tablo 2)

Tablo 2. Hiperfenilalaninemisinin geçici veya kalıtsal nednelere bağılı olarak sınıflandırılması

Primer (kalıtsal)	Sekonder (edinsel)
Fenilalanin hidroksilaz eksikliği	-Maternal FKÜ
-Ağır(klasik FKÜ)	-Tirozinemi
-Orta ağırlıkta HFA	-Geçici neonatal HFA
-Hafif HFA	-İlaça bağılı (metotreksat,trimethoprim)
Biopterin metabolizması bozuklukları	-Ağır enflamatuvar yanıt
-Guanozin trifosfat siklohidrolaz eksikliği	-Renal hastalık
-6-piruvoyl-tetrahidropterin sentaz eksikliği	-Karaciğer hastalığı
-Dihidropteridin redüktaz eksikliği	
-Pterin karbinolamin dehidrataz eksikliği	

2.2.3.1. Primer (Kalıtsal) Hiperfenilalaninemi

Fenilalaninin tirozine dönüşümünü sağlayan PAH enzimindeki veya enzimin kofaktörü olan BH4 metabolizmasındaki bozukluklar kalıtsal HFA' lara neden olmaktadır (24). HFA'lar; fenilalanin hidroksilaz eksikliğinin hastada var olan enzim

aktivitesine, tedavi öncesi kan fenilalanin düzeyine, hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarına göre sınıflandırılmaktadırlar (26,27).

1.Fenilketonüri

a)Klasik fenilketonüri: PAH enziminin tam ya da tama yakın (%1'den az) eksikliği sonucu gelişen, plazma fenilalanin düzeyinin 20 mg/dL'den fazla olduğu, erken dönemde tedavinin başlatılmadığı çocuklarda geri dönüşümsüz bir zeka geriliğine yol açan bir hastalıktır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20 mg/kg'dır (28).

b) Orta derecede 'moderate' fenilketonüri: Enzim aktivitesi %1'in üzerinde, kan fenilalanin düzeyi 15-20 mg/dL arasındadır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20-25 mg/kg'dır.

c) Hafif 'mild' fenilketonüri: Enzim aktivitesi %5'in üzerinde, kan fenilalanin düzeyi 10-15 mg/dL arasındadır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 25-50 mg/kg'dır.

2. Hafif 'mild' hiperfenilalaninemi (fenilketonüri olmayan hiperfenilalaninemi): Enzim aktivitesi %30'un üzerinde, kan fenilalanin düzeyi 10 mg/dL'nin altındadır. Hastalara kontrol altında serbest diyet tedavisi uygulanmaktadır.

3. Tetrahidrobiopterin metabolizması bozuklukları: BH4 sentezini ya da BH4'ün rejenerasyonunu etkileyen Dihidropteridin redüktaz, GTP siklohidrolaz I, pterin-4-8-karbinolamin dehidrataz, 6-pürivoyil- tetrahidropterin sentaz aktivitesindeki bozuklukları ile oluşan hiperfenilalaninemilerdir (29). Tedaviye yönelik yapılan çalışmaların sonuçları ve hastaların oral BH4 tedavisine çok iyi yanıt vermesi, BH4 yanıtına göre hastalığın yeniden sınıflandırılmasını gerektirmektedir (30). (Tablo 3)

Tablo 3. Hiperfenilalaninemilerin tetrahidrobyopterine yanıtına göre sınıflandırılması

Tetrahidrobyopterine yanıt vermeyen hiperfenilalaninemiler	Tetrahidrobyopterine yanıt veren hiperfenilalaninemiler
	Tetrahidrobyopterine yanıt veren fenilalanin hidroksilaz enzimi eksikliği
	Tetrahidrobyopterine yanıt veren fenilalanin hidroksilaz enzimi eksikliği

Kan ve vücut sıvılarında fenilalanin konsantrasyonu ve fenilalanin/tirozin oranı artar. Normalde 0,6-1,5 olan fenilalanin/tirozin oranı primer HFA'larda 3 ve üstü, heterozigot taşıyıcılarda ise 1,2-2,5 arası değerlerindedir (31). Ayrıca bu hastaların idrarlarında fenilketonlar ve fenilaminler gibi fenilalanin metabolitleri de bulunur. FKÜ'lü bireylerde fenilalanin metabolizmasının normalde az kullanılan ikinci bir yolu olaya katılır; bunda fenilalanin transaminasyon geçirerek, piruvatla fenilpiruvata dönüşür. Fenilalanin indirgenerek kanda ve dokularda birikir ve idrarla atılır; bu nedenle adı "fenilketonüri"dir. Bu şekilde atılandan çok daha fazla olan piruvat ya dekarboksilenmeyle fenilasetata veya indirgenerek fenillaktata dönüşür. Fenilasetat idrara karakteristik bir koku verir ve bunu doktorlar bebeklerde alışlagelmiş FKÜ tanısında kullanır (9).

2.2.3.2. Sekonder Fenilketonüri

Sekonder FKÜ'ler geçici nedenlere bağlı oluşmaktadırlar. Böbrek hastalıkları, ağır inflamatuvar yanıt, metotreksat gibi ilaçlarla galaktozemi ve tirozinemi, sekonder yani geçici HFA'ların oluşmasına neden olmaktadır (25). Maternal FKÜ'ler de sekonder hiperfenilalaninemiler grubundadır.

Maternal Fenilketonüri: Fetusta aminoasit düzeyi, sistein dışında, anneden fetusa aktif transport nedeniyle annedekinden yüksektir. Maternal HFA'da, fetal/maternal fenilalanin oranı erken gebelik döneminden itibaren yüksektir. Plasental transportta fenilalanin diğer nötral amino asitlerle yarışa girer, fetusun büyümesini yavaşlatır, organların normal gelişimini engeller. Hiperfenilalaninemik annelerden doğan çocukların %80'inden fazlasında düşük doğum tartısı, mikrosefali, dismorfik yüz görünümü, gelişme geriliği, kalp ve büyük damarları ilgilendiren doğuştan malformasyonlar gibi bulgular mevcuttur. Özofagus atrezisi, trakeoözofageal fistül, bağırsak malrotasyonu, mesane ekstrofisi ve diğer ürogenital anomaliler, kolobom, katarakt, yarım damak-dudak gibi anomaliler daha nadirdir. Palpebral fissürlerde kısalık, epikantal kıvrım, filtrum kısalığı, yokluğu, alt dudak inceliği gibi dismorfik bulgular fetal alkol sendromuna benzemektedir. Fetusta anomali sıklığı, anne kan fenilalanin düzeyi ile ilişkilidir.(31) Maternal FKÜ'de, meydana gelebilecek anomalilerin önlenmesi için FKÜ'lü anne adayları gebe kalmadan önce veya gebelik meydana gelmişse mümkün olduğunca erken düşük protein ve fenilalaninli sıkı diyetle dönmelidir (6).

2.2.4. Fenilketonürde Klinik Bulgular:

Doğumda normal olan bebeklerin bazılarında beslenmenin de başlamasıyla plazma fenilalanin düzeyinde artış ile semptomlar ortaya çıkmaktadır. İlk bulgu olarak 1-2 ay içinde karşılaşılan kusmalar pilor stenozu ile karışabilmektedir. En erken karşılaşılan nörolojik bulgular başını dik tutamama ve göz teması olmamasıdır.

Tedavisiz hastaların yaklaşık % 60'ının entelektüel zekasının 35'in, % 88-90'ının ise 65'in altında olduğu bilinmektedir. Tedavi alamayan hastaların sadece yüzde 2-5'i normal zekaya sahiptir. Mental motor retardasyon, gelişme geriliği mikrosefali, derin tendon reflekslerinde artış, ekstremitte spastisitesi, hipertonsite, istemsiz kol hareketleri ve bacak hareketleri, ritmik sallanma ve atetozu içeren otistik davranışlar, hiperaktivite, tremor, konvulziyon, (yaklaşık %25) agresyon, self mutilasyon atakları, anksiyete, sosyal gerilik sıklıkla saptanmaktadır. %50'sinden fazlasında EEG (elektroensefalografi) bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Tedavisiz olgularda Parkinson benzeri bulgulara rastlanabilmektedir (14,31).

Artan fenilalaninin, tirozinazı inhibe etmesiyle tirozin ve melanin sentezinin azalmasına bağlı olarak, ebeveyn ve hastalıktan etkilenmemiş kardeşlere kıyasla bu çocuklarda giderek saç, deri ve gözlerde pigmentasyonda azalma dikkati çeker. Bu çocuklar sarışın, ince saçlı ve mavi gözlü olurlar. Tedavi edilmeyen çocuklarda maksiller prominensi, geniş ve ayrık dişler, diş mine hipoplazisi, büyüme geriliği sık görülen bulgulardandır. Genellikle hafif olan ve çocuk büyüdükçe kaybolan seboreik ve egzematöz döküntüler, skleroderma benzeri deri lezyonları olabilir (8).

Plazma fenilalanin düzeyi normalin 20-30 katı kadardır. Serebral protein sentezi baskılanmakta, dendritik proliferasyonun erken dönemi etkilenerek myelin sentezi azalmakta, adenosin trifosfat (ATP) sülfirilaz inhibe olarak miyelin katabolizması yönünde artmaktadır. Tirozin ve triptofan hidroksilasyonun yarışmalı inhibisyonu sonucu serotonin, dopamin ve norepinefrin nörotransmitterlerinin üretimi azaltılmaktadır. İntraserebral fenilalanin yüksekliğinin yol açtığı hasarın mekanizması henüz net olarak ortaya konulmamıştır ancak fenilalanin ve metabolitlerinin beyinde nörotoksin rolü oynadığı bilinmektedir. Yüksek kan fenilalanin düzeylerinin kan-beyin bariyeri boyunca transport sistemini bozarak tirozin ve triptofan gibi diğer büyük nötral aminoasitlerin beyine taşınmasını inhibe ettiği ve FKÜ'lü bireylerde tirozin metabolizmasındaki sorun nedeni ile sinaptik

iletimin bozulduğu bilinmektedir. FKÜ'lü hastalarda ana nörolojik bulgular; korpus kallosum, striatum ve kortikal bölgede değişiklikler ve hipomyelinizasyon ile entellektüel bozulma ve nörodejenerasyondur (32). Tirozin replasmanı ile fenilketonüri hastalarında; dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, depersyon semptomlarında iyileşme olduğu gösterilmiştir (33). (Tablo 4)

Tablo 4. Fenilketonürlü hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri

Nörolojik	Mental retardasyon, amaçsız stereotipik hareketler, konvulsiyon, miyelin oluşumunda bozukluk
Baş	Mikrosefali
Deri	Açık renk, kuruluk, egzema, scleroderma benzeri lezyonlar
Saçlar	Açık renk
Gastrointestinal	Yenidoğan döneminde kusam
Gözler	Açık renk gözler, bazı vakalarda katarakt
Diğer	İdrarda küf kokusu
Radyolojik	Beyinde kalsifikasyon
Laboratuvar	Fenilalanin hidroksilaz eksikliği, hiperfenilalaninemi, fenilpirüvik asidemi, idrarda hidroksifenilasetikasit, fenilpirüvik asit, fenilasetik asit ve fenilasetilglutamin atılımında artma

2.2.5. Fenilketonüride Tarama, Tanı ve Tedavi

Fenilketonürinin ülkemizde görülme sıklığının yüksek olması ve erken tespit edildiğinde tedavi edilebilirliği ve tedaviye yanıtı açısından günümüzde taranması önerilen hastalıkların başında yer alır (34). Tarama; subklinik dönemde asemptomatik hastalarda tanı amacıyla fizik muayene, laboratuvar ve radyolojik inceleme işlemlerinin yapılmasıdır. Taramada kullanılan testlerle, tanı amaçlı testler arasındaki farkı ayırt etmek önemlidir. Tarama testi sağlıkla ilgili bir sorun olabileceği konusunda uyarır. Tek başına kesin olarak hastalık olduğunu belirtmez. Şüphe edilen sağlık sorununun olup olmadığının anlaşılabilmesi için kesin tanı koydurucu testlerin uygulanması gerektiğini belirtir. Bu nedenle sadece tarama testi

sonuçlarına dayanarak ailelere genetik danışma verilmemeli, konvansiyonel laboratuvar testleri ile tanının doğrulanmasının beklenmesi gerektiği bilinmelidir (34).

Alınan kan örneklerinin değerlendirilmesinde ve yüksek fenilalanin düzeylerinin saptanmasında kullanılan laboratuvar uygulamaları; Guthrie testi, kromatografik inceleme, fluorometrik inceleme, enzimatik inceleme ve ardışık kütle spektrometrisi günümüz için geçerlidir (35).

Türkiye’de ise yenidoğan dönemi taraması 1983’te Prof. Dr. İmran Özalp’in öncülüğünde başlamıştır. Hacettepe Üniversitesi tarafından 1986 yılında FKÜ açısından yenidoğan tarama programına başlanmıştır. Yenidoğan taraması 1992’de İzmir ve İstanbul’u, 1993’te ise tüm Türkiye’yi kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Yenidoğan taraması 2006 yılından itibaren T. C. Sağlık Bakanlığı tarafından üstlenilerek devam etmektedir (36).

Ulusal yenidoğan tarama programı kapsamında alınan topuk testi ile fenilalanin yüksekliği saptanıp erken tanı ile yaşamın ilk üç haftası içerisinde diyet tedavisine başlanabilmektedir. Yapılan tarama programı ile yılda 300-400 yeni fenilketonürlü bebek tedaviye alınmaktadır (37,38).

Kanda artmış FA seviyesinin yanı sıra plazma tirozin düzeyinin normal veya düşük olması, normalde 0,6-1,5 olan fenilalanin/tirozin oranının 3’ün zerinde olması anlamlıdır ve yanlış pozitif sonuçların sayısını azaltmaktadır (14).

Tedavide esas amacımız fenilalanin seviyesini düşürerek nörotoksisitenin sebep olacağı mental retardasyonun engellenmesidir. Tedaviye mümkün olan en erken sürede başlanmalıdır. Serum fenilalanin düzeyi 6mg/dL’nin üstündeyse, hasta mutlaka tedavi programına alınmalıdır. Tedavi seçeneklerinin arasında düşük fenilalanin içeren proteinden kısıtlı diyet, büyük nötral aminoasitlerin (LNAA) proteinden kısıtlı diyetle eklenmesi, BH4 yanıtına göre kofaktör kullanımı, erişkin dönemdeki hastalarda kullanımı başlanan fenilalanin amonyum liyaz enzim tedavisi ve henüz araştırma aşamasında olan gen tedavisi sayılabilir.

2.2.5.1.Diyet:

Günümüzde düşük fenilalanin içeren diyet tedavisi en geçerli tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Diyet tedavisinde temel yaklaşım hastanın doğal gıdalardan aldığı fenilalanin miktarı azaltmak ve diğer aminoasit eksikliklerinin

gelişmemesi için fenilalanin içermeyen özel diyet ürünlerinin hastanın diyetine eklenmesine dayalıdır. Fenilalanin kısıtlı diyetin içeriği; düşük fenilalanin içeren doğal besinlerden, orta düzey fenilalanin içeren ve protein içeriğine göre değiştirilebilecek ürünlerden ve fenilalanin içermeyen aminoasit ürünlerinden oluşmaktadır. Yüksek fenilalanin içeren ürünlerin alımı kısıtlanmıştır (39). Hayat boyu düşük fenilalanin diyetine uyum sağlanması zor olmasına rağmen, günümüzde en geçerli tedavi yöntemi halen etkin diyet devamlılığı olarak kabul edilmektedir (10). Diyet tedavisi kesilirse hastaların algılama fonksiyonlarında bozulma meydana gelir, konsantrasyon süresi kısalmır, unutkanlık, depresyon, anksiyete ve ani nörolojik tablolar gelişir. Çocukların serum fenilalanin düzeyi ile entelektüel zekası düzeyi arasında belirgin bir korelasyon gözlenmektedir (40).

2.2.5.2.Büyük nötral aminoasitler (LNAA):

Hastalara fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisi verilmesi ile birlikte LNAA'ların (tirozin, tiptofan, arjinin, lösin, izolösin, valin, metionin, histidin, lizin, treonin) dışarıdan verilmesinin diyet tedavisinin güvenilirliğini ve etkinliğini arttırdığı öne sürülmüştür (41). Uzun dönemde 0,5-1 gram/kg/gün dozunda LNAA tedavisinin serum fenilalanin düzeyinde %39 oranında düşüşe neden olduğu gösterilmiştir.

2.2.5.3.Sentetik BH4 preparatları:

Sentetik BH4 preparatları ile tedavi (6-R-erythro-5, 6, 7 tetrahydrobiopterin) BH4 yükleme testine cevap veren hastalarda tek başında ya da fenilalaninden kısıtlı diyet ile birlikte uygulanabilmektedir. Bu tedaviyle rezidüel PAH enzim aktivitesini artırarak tüketilebilir fenilalanin miktarının yükseltilmesi hedeflenmektedir (42). Sapropterin dihidroklorür tedavi dozu sıklıkla 20 mg/kg/gün olarak kullanılması literatürde önerilmektedir.

2.2.5.4.Enzim tedavisi:

FKÜ hastalığının tedavisine yönelik enzim tedavisi çalışmaları hala devam etmektedir. Rekombinant olarak üretilen fenilalanin amonyum liyaz (FAL) enzimi, herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymadan kandaki fenilalanini yıkarak nörotoksik etkisinin düşük olduğu bir metabolite dönüştürmektedir (43).

2.2.5.5.Gen tedavisi:

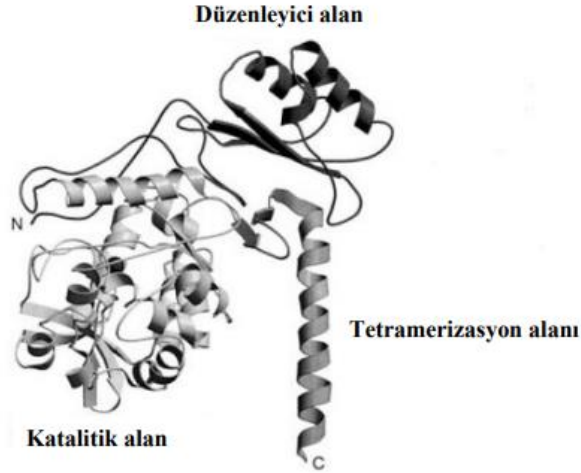
Gen transferi için aracı olarak rekombinant adenovirus kullanılarak PAH oluşturmamayan fare karaciğerine yapılan transferin başarısı tam, ancak geçici süreliğine olmuştur (44). Taşıyıcı rekombinan adenovirus, nötralizan antikorlar tarafından yok edilmiştir (45,46). Gen tedavi yöntemlerinin ortak amacı PAH'ın ekspresyon seviyesini normal düzeye çıkartmaktır. Farklı metodlar kullanılarak PAH genini içeren çeşitli vektörlerin hepatik hücrelere veya dokulara gönderilmesi ile azalmış olan gen ekspresyonunun tersine döndürülmesi hedeflenmiştir. Ancak gen tedavi çalışmaları genelde başarısızlıkla sonuçlanmıştır (47,48).

2.2.6. Fenilketonüride İzlem:

FKÜ hastalarının tedavi izleminde serum fenilalanin düzeyleri bebeklik döneminden itibaren yakından izlenmelidir. Kontrol aralıkları serum fenilalanin düzeyinin optimal aralıkta olması halinde, yaşla birlikte esnetilebilir. Takip aralığı olarak ilk bir yıl içinde haftalık, 1-12 yaş arasında iki haftada bir ve 12 yaş sonrasında dört haftada bir kez kan fenilalanin düzey kontrolü önerilmektedir (49). Fenilketonürlü hastalarda hedeflenen serum fenilalanin düzeyi tüm yaş gruplarında 2-6 mg/dL olarak önerilmektedir. Son dönemde, bilişsel etkilenme ve dikkat eksikliğinin engellenmesi açısından fenilalanin üst sınırının 4mg/dL'ye düşürülmesini öneren çalışmalar da mevcuttur (36).

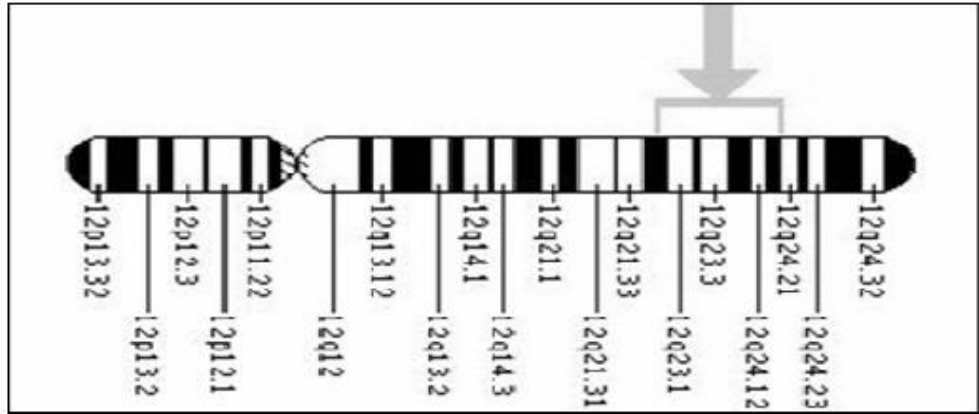
2.2.7. Fenilketonüri ve Genetik

İnsan PAH enzimi; düzenleyici, katalitik ve tetramerizasyon olmak üzere farklı fonksiyonlara sahip üç ayrı alandan oluşur (50). (Şekil 4)



Şekil 4. İnsan fenilalanin hidroksilaz enziminin monomer yapısı

452 aminoasit içeren PAH enziminin sentezlenmesini sağlayan PAH genidir. 13 ekzon ve bunların intronları (12 adet) mevcuttur (51). Ekzonlar 90 kb'dır ve 2,5 kb'luk mRNA'yı kodlar (8). FKÜ otozomal resesif olarak kalıtılır. FKÜ'ye 12q22-q24.1 kromozomunda bulunan PAH genindeki mutasyonlar neden olur (50). (Şekil 5)



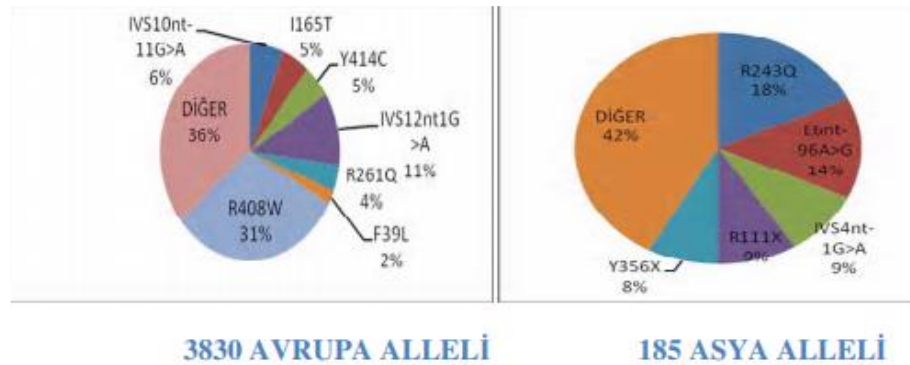
Şekil 5. 12. Kromozom üzerinde PAH geni lokalizasyonu

BIOPKU veritabanında 7400'den fazla hastanın genotipi bulunmaktadır. McGill Üniversitesi tarafından oluşturulan PAH lokus veritabanında bildirilen 567 fenilalanin hidroksilaz mutasyonu vardır. (Şekil 6)

Tablo 5. PAH geninde meydana gelen mutasyonların saptanması

Mutasyon görülme yüzdesi	Genetik mekanizma
%62	Yanlış anlamlı (missense)
%13	Delesyon (özellikle küçük delesyonlar)
%11	Splice (kırılma)
%6	Sessiz (silent)
%5	Anlamsız (nonsense)
%2	İnsersiyon

PAH geni mutasyonları etnik özelliklere göre farklılık göstermektedir. Örneğin c.1222C>T (R408W) mutasyonu, Doğu Avrupa ülkelerinde bu hastalığa ilişkin tüm mutasyonların dörtte üçünü oluştururken İskoçya’da %24 dolaylarındadır. İntron 10’daki bir kesilme mutasyonu (IVS10) ise Türklerde görülen tüm mutasyonların %40 kadarını oluşturmaktadır. Avrupa kökenli popülasyonda mutant kromozomların üçte ikisinden altı farklı mutasyon sorumludur. Asya toplumunda PAH mutasyonlarının %80’inden biraz fazlasını diğer altı mutasyon oluşturmaktadır. Geriye kalan hastalık yapıcı mutasyonlar tek başına enderdir (54). (Şekil 7)



Şekil 7. Avrupa ve Asya kökenli popülasyonlarda PAH mutasyonları ve dağılımı

Fenilalanin hidroksilaz geni içinde kesim bölgesi bulunan 7 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanarak, gen, 9 farklı polimorfik bölge halinde incelenebilmektedir (55). Bu çalışmalar ile fenilketonüri için yaklaşık 40 haplotip elde edilmiştir. Çeşitli popülasyonlarda görülen haplotipler arasında farklılık bulunmaktadır. Enzimin aktivitesine bağlı olarak, hastaların serum fenilalanin düzeylerine göre uygulanan diyet tedavisi farklı olmaktadır. Bu nedenle popülasyondaki mutasyonların ve frekanslarının bulunması önemlidir. Popülasyonlar fenilalanin hidroksilaz geninde bulunan mutasyonlar açısından incelendiğinde, haplotiplerde olduğu gibi mutasyonların da popülasyondan popülasyona farklılık gösterdiği ve bazı mutasyonların belirli haplotipler ile birlikte görüldüğü saptanmıştır. Örneğin; Haplotip 1: c.782G>A, Haplotip 2: c.1222C>T, Haplotip 3: IVS12+1G>C, Haplotip 4: c.473G>A ve Haplotip 6: IVS10-11G>A mutasyonları ile birlikte görülmektedir. Kuzey Avrupa’da RFLP haplotiplerinin %80’inden fazlası PAH geni çevresinde odaklansa da, temel mutant allelerden üçü büyük ölçüde spesifik haplotiplere sınırlıdır. Türkiye’deki FKÜ mutasyonlarının büyük çoğunluğu (%40) haplotip 6 ile ilişkilidir ve bu haplotip Kuzey Avrupa ülkelerinde çok seyrek rastlanır. Ayrıca RFLP ile yapılan çalışmalar PAH geninin büyük bölümünün 1-4 haplotipleriyle ilişkili olduğunu da göstermektedir (56). (Tablo 6)

Tablo 6. PAH geninde sık görülen haplotiplerin bazı Avrupa ülkelerindeki sıklığı

HAPLOTİPLER						
ÜLKE	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Kuzey Avrupa						
Danimarka	% 18	% 20	% 38	% 13	% 0	% 6
Norveç	% 21	% 11	% 17	% 9	% 6	% 0
Batı Avrupa						
İskoçya	% 30	% 9	% 18	% 6	% 3	% 0
İsviçre	% 50	% 11	% 5	% 18	% 0	% 5
Doğu Avrupa						
Çekoslovakya	% 0	% 68	% 0	% 23	% 0	% 0
Polonya	% 9	% 57	% 2	% 11	% 2	% 5
Güney Avrupa						
İtalya	% 40	% 6	% 3	% 9	% 4	% 20
Türkiye	% 25	% 1	% 1	% 17	% 4	% 40

2.2.7.1. Fenilketonürde Genotip-Fenotip ilişkisi

Klinik heterojenite: PAH aktivitesi yokluğu (kontrollere göre aktivite %1 ‘in altında) FKÜ’ye neden olurken, PAH enziminde bir miktar rezidüel aktivite ile birlikte olan mutasyonlar şiddeti daha az non-FKÜ hiperfenilalaninemi ve varyant FKÜ denilen hastalıklara yol açmaktadır. Non-FKÜ hastalardaki normal fenotip, klasik fenilketonürlü vakaların tedavisinde aşılması gereken ‘emin’ kan fenilalanin düzeylerini belirlemede en iyi göstergedir. Varyant FKÜ ise klasik FKÜ ile non-FKÜ hiperfenilalaninemi arasında fenilalanin toleransı olan bir kategoridir, hastalar diyetlerinde fenilalanin kısıtlaması gerektirirler fakat bu kısıtlama klasik FKÜ’de olduğu gibi sıkı değildir. Bu üç fenotip ile PAH geni mutasyonları arasındaki ilişki klinik heterojenitenin açık bir örneğini oluşturmaktadır (57).

Lokustaki yüksek allelik heterojenite (bir lokusta birden fazla allel bulunması) nedeni ile toplumların çoğunda FKÜ’lü hastalar genetik birleşiktir

(compound) (%76) ve PAH bozukluklarında görülen enzimatik ve klinik bulgular fenotipik farklılıklarla uyumlu bir bulgudur (57) ancak bu durum genotip - fenotip korelasyonunun gözlenmesini zorlaştırır (58). Başlangıçta PAH genotipini bilmenin fenotipi güvenilir bir şekilde tahmin edebilmeye olanak vereceği düşünülmüşse de bu beklentiler gerçekleşmemiştir. Böylece henüz aydınlatılamamış biyolojik değişkenlerin PAH lokusunda genotipik benzerlik olsa dahi FKÜ’de fenotipik farklılıklar yarattığı açıktır (57). Bu bilgiler bize HFA fenotipinin başka genetik ve çevresel faktörlerden de etkilenen kompleks bir özelliğe sahip olduğunu, HFA’nın multifaktöriyel bir hastalık olduğunu göstermektedir(59).

Her ne kadar PAH eksikliğinde fenotipi etkileyen birçok faktör olsa da birçok vakada PAH genotipi, metabolik fenotipin en önemli belirleyicisidir. Metabolik fenotipteki bu varyasyonlar öncelikle PAH genindeki mutasyonlar nedeniyle olmaktadır. Genotip, biyokimyasal fenotipin tahmininde yeterli olabilirken klinik fenotip tahmininde yeterli olmamaktadır. Tüm bu sebeplerle FKÜ artık “sadece bir tek genin neden olduğu bir hastalıktır” kavramı geçerliliğini yitirmektedir. Kognitif fenotip, beyin dokusunda biriken fenilalaninin, beyin gelişimi ve fonksiyonu üstüne olumsuz etkilere sebep olmasıdır. Bu nedenle tedavi edilmemiş HFA hastalarında mental retardasyon görülmektedir. Aynı genotipe sahip olan HFA hastalarında farklı entelektüel zeka değerleri görülebilmektedir. Kan-beyin bariyeri ve bireyler arası metabolizma farklılıklarından dolayı fenilalaninin beyine alınımı ile ilişkili olarak bu durum gözlenmektedir(60). Metabolik Fenotip ise; birçok hasta birey aynı mutant PAH genotipine sahip olsalar da, kan fenilalanin seviyesi ve tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarlarının farklılık göstermesidir. Bu durumun en önemli nedeni diyetle alınan fenilalaninin ince bağırsak yoluyla absorpsiyonunda ve karaciğer ile alınımında bireyler arası metabolik farklılıkların olmasıdır. Bunun yanı sıra fenilalanin metabolizması basamaklarından hidroksilasyon, transaminasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarının kişiden kişiye değişiklik göstermektedir (61). Örneğin, hepatik genlerin ekspresyonundan sorumlu hepatik nükleer faktör 1 (HNF1) ve bu gen lokusunda meydana gelebilecek bir değişim de fenilalanin hidroksilasyon seviyesini etkileyebilmektedir (58). Enzimatik Fenotip; metabolik ve kognitif fenotipte olduğu gibi aynı mutant PAH genotipine sahip olan hasta bireylerde fenilalaninin hidroksilasyon seviyelerinde farklılıkların gözlenmesidir. Bu bireylerin

farklı enzimatik aktiviteye sahip olabileceklerini göstermektedir. Ayrıca bu durum kişinin genetik altyapısına bağlı olarak sahip olduğu şaperonların ve proteazların özellikleri ile ilişkilidir (58). Beyne FA transportunu, FA havuzunun büyüklüğünü ve metabolik kontrolü düzenleyen henüz tanımlanmamış genlerin de var olduğu düşünülmektedir. Tüm bunların doğrultusunda aslında genotipin yanında epigenetik faktörlerin komorbidite üzerinde ne kadar etkili olduğu görülmektedir.

APV (Allelik fenotip değeri-Allelic Phenotype Value); yaklaşık 10,500 hiperfenilalaninemili hastanın 800'den fazla FAH varyantı barındırdığı toplulukta tüm varyantlar rapor edildiğinde, 0'dan 10'a kadar hiperfenilalaninemi fenotip hastalık ilişkisini ağırdan hafife doğru sıraladığımızda, bu varyantlar, fenotiplerle karşılaştırıldığında, APV=10 klinik olarak en hafif hiperfenilalaninemi, APV=0 ise klinik olarak en ağır hiperfenilalaninemiye denk gelmektedir. 0-2,7 klasik fenilketonuri ile ilişkili, 2,8-6,6 hafif fenilketonüri, 6,7-10 arası ise hafif hiperfenilalaninemi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

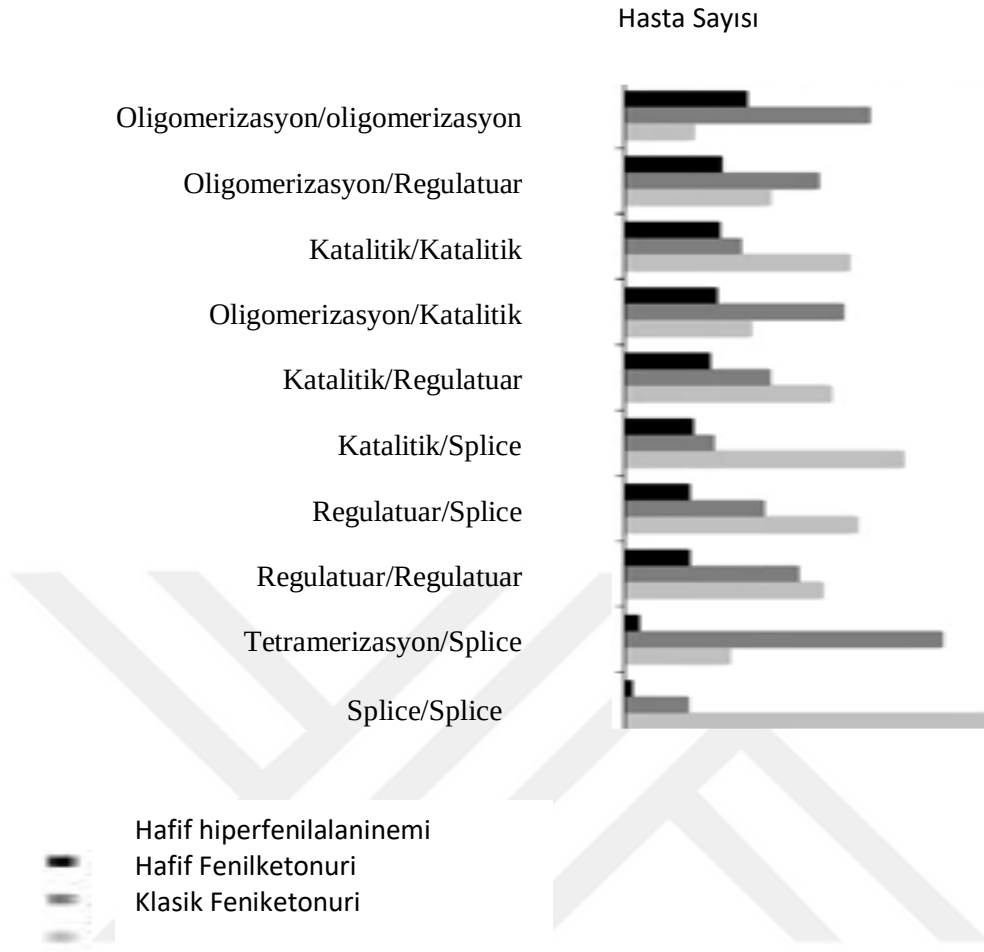
Allelik fenotip değeri (APV), hastaların fenotipinin açık ara en iyi genel belirleyicisidir. Genel olarak, APV'nin yüksek prediktif değeri, kan FA konsantrasyonlarını en yakından yansıtır. Üç faktör potansiyel olarak öngörmeyi sınırlar: bileşik heterozigotlarda negatif allelik komplementasyon, homozigotlarda gen dozajı ve genotip dışı faktörler (örneğin gen modifiyeciler).

PAH% 'si ise, null genotiplerde sürekli olarak %'3'ün altındadır ve enzim aktivitesi olan genotipler için de olmayanlar için de genel olarak APV'den sonra etkili orta bir fenotip belirleyicisidir. Rölatif rezidüel PAH aktivitesi ise, ökaryotik hücrelerde rekombinant olarak eksprese edilen mutant proteinler kullanılarak in vitro deneylerden sağlanan verilerden hesaplanır. PAH aktivitesi, her iki allelin aktivite toplamının ortalamasıdır ve doğal tip (wild-type) enzimin yüzdesi olarak ifade edilir. Ancak hesaplanan in vitro 'PAH aktivitesi' büyük olasılıkla in vivo enzim aktivitesinden farklıdır. Yukarıda belirtilen tüm genotip / fenotip ilişkisini tahmin edilebilirlikten uzaklaştıran bireysel faktörler burada da geçerli olmaktadır. Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre %PAH, APV ile güçlü bir korelasyon göstermektedir ve klasik / hafif FKÜ ile klasik FKÜ / hafif HFA arasında ayırım yapmamızı sağlamaktadır ancak ortalama %PAH, hafif FKÜ ve hafif HFA arasında önemli bir farklılık göstermemiştir ve bu da diğer faktörlerin bu aralıktaki fenotipi

daha fazla etkileyebileceğini göstermiştir (62). Ayrıca yine bu çalışmada %13'ün altında rezidüel PAH aktivitesine sahip hastaların hepsinin klasik fenilketonuri ile uyumlu olduğu saptanmıştır.

Heteroallelilik durumunda, genotipi içeren her mutasyon için monoallelilik in vitro PAH enzim aktivitelerinin ortalamasından hesaplandığı üzere, gözlemlenen metabolik fenotip ile "öngörülen rezidüel aktivite" (PRA) arasında tutarsızlıklar mevcuttur. Bu hastalarda, birbirleriyle veya diğer mutasyonlarla ilişkili c.194T>C, c.872G>A ve c.1162G>A mutasyonlarının varlığı, PRA'nın öngördüğünden daha şiddetli fenotipler oluşturmaya neden olduğu saptandı. Bu fenomen, Kaufman ve Max'in gözlemlediği, FKÜ hastalarının ebeveynlerinde belirlenen PAH aktivitesindeki orantılılıktan sapma olduğu 1975'ten beri zaten biliniyordu. Bu yazarlar, multimerik PAH enziminin alt birimleri arasında meydana gelen protein-protein etkileşimlerini göstermek için negatif allelik komplementasyon terimini ortaya koymuştur. Tespit edilen enzimatik aktiviteler, birlikte eksprese edildiğinde üretilen mutant enzimlerin, mutant alt birimlerinin tek tek ekspresyonunun öngördüğünden daha düşük katalitik aktiviteler sunduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, negatif allelik komplementasyon fenomeni ile tam uyumlu idi. Örneğin allelerin ürettiği mutant proteinlerin rezidüel enzimatik aktivitelerinin karşılaştırıldığı c.1162G>A/c.194T>C, c.1162G>A /c.782G>A ve c.194T>C/ c.782G>A için, enzimatik aktivitenin beklenenden düşük bulunmasında benzer bir etki gözlenmiştir. (Hesaplanan rezidüel aktiviteden sırasıyla, %38, 35 ve 28 kadar daha düşük hesaplanmıştır.) c.809G>A ve c.1162G>A alellerinin birlikte eksprese edilmesiyle üretilen proteinler, daha yüksek aktivite düşüşü (%88) gösterirken, c.809G>A/c.194T>C birlikte üretilen protein, öngörülen rezidüel aktiviteden %52 daha düşük bir deneysel etkinlik göstermiştir. Bir heterozigot durumu taklit eden hPAHdoğal tip/c.1162G>A proteini de öngörülen rezidüel aktiviteden (%63,5) daha düşük bir rezidüel aktivite (%38,5) sunmuştur (63).

Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise etkilenen enzimatik bölge ile fenotip arasında ilişki bulunduğu sonucu çıkmıştır. Örneğin hafif hiperfenilalaninemiye sahip hastaların özellikle oligomerizasyon bölgesini etkileyen mutasyonlar olduğu, splice bölge-splice bölge mutasyonlarının daha çok klasik fenilketonüri ile ilişkili olduğu (%84,3) anlamlı bulunmuştur (62).



Şekil 8. Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fenotip ve enzimatik alt bölge karşılaştırması grafiği (62)

2.2.7.2. Fenilalanin Hidroksilaz ve Metabolik Yolaktaki Diğer Enzimler

Otozomal resesif ya da otozomal dominant olarak da kalıtılabilen GTPCH defektindeki DYT5 (dopa-yanıtlı distoni) mutasyonu ile SR defektinde sadece santral sinir sistemi etkilenir. Klinik tabloya fenilalanin yüksekliği eşlik etmez (64). PTPS eksikliğinin bazı periferik formlarında ise santral sinir sistemindeki nörotransmitter metabolizması etkilenmez. PCD defektinde ise erken yaşta fenilalanin yüksekliği olmakla birlikte, santral sinir sisteminde minimal düzeyde serotonin ve katekolamin metabolizması bozukluğu vardır. BH4 metabolizması bozukluğuna bağlı nörotransmitter bozukluklarının belirtileri hayatın ilk aylarında ortaya çıkar. Distonik ekstremit hareketleri, aksiyal hipotoni, hipokinezi görülür. Otonomik fonksiyon bozuklukları, beslenme ve yutma güçlüğü, epilepsi ve gelişme

geriliği tabloya eşlik edebilir. Semptomlar genellikle ilerleyicidir. Diurnal ritm göstermektedir. Prognoz, tanı ve tedavi yaşına bağlı olmakla birlikte, mutasyon ve enzim defektine göre de değişiklik göstermektedir (65,66). (Tablo 7)

Tablo 7. Tetrahydrobiopterinin oluştuğu metabolik yoldaki diğer enzimler ve neden oldukları hastalıklar

HASTALIK	EKSPRESE OLDUĞU DOKULAR	KROMOZOMAL YERLEŞİM
Hiperfenilalaninemi ile birlikte giden hastalıklar		
Güanozin trifosfat siklohidrolaz I (GTPCH) eksikliği	Karaciğer, böbrek beyin, lenfosit	14q22.1-22.2
6-pürivoyl-tetrahydrobiopterin sentaz (PTPS) eksikliği	Karaciğer, böbrek beyin, lenfosit, eritrosit, fibroblast	11q22.3-23.23
Dihidropteridin redüktaz (DHPR) eksikliği	Tüm dokularda	4p15.3
Pterin 4 α karbinolamin dehidrataz (PCD) eksikliği	İnce bağırsak, karaciğer, beyin	10q22
Hiperfenilalaninemi ile birlikte gitmeyen hastalıklar		
Dopaya cevap veren distoni (DRD)	Karaciğer, böbrek beyin, lenfosit	14q22.1-22.2
Seplapterin redüktaz eksikliği	Tüm dokularda	2p14-p12

2.2.8. Tek Gen Hastalıklarında Tanı:

Tek gen hastalıkları genellikle belirgin ve karakteristik bir aile ağacına sahiptir. Bu bozuklukların çoğu nadir olsalar da, sıklıkları bazen 1:500 kadar olabilmekle birlikte çoğunlukla bundan azdır. Her ne kadar tek tek nadir olsalar da bir grup olarak tek gen hastalıkları hastalık ve ölümlerin önemli bir kısmından sorumludur. Toplumu bir bütün olarak ele aldığımızda tek gen hastalıkları bütün hayat süresi boyunca toplumun %2 kadarını etkilemektedir. Bir milyondan fazla canlı doğumda yapılan bir çalışmada ciddi tek gen hastalıklarının sıklığı çocukluk yaş grubunda %0,36 olup, hastaneye yatan çocukların % 6-8 inde tek gen hastalığı olması söz konusudur. Bu hastalıkların çoğunda herhangi bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu hastalıkların önlenebilmeleri toplumda taşıyıcıların tespiti genetik danışma ve doğum öncesi tanı metodları ile hastalığın bir sonraki kuşaklara aktarılmasının engellenebilmesi ile gerçekleştirilebilmektedir (57).

2.2.8.1.Yeni Mutasyonların Saptanması

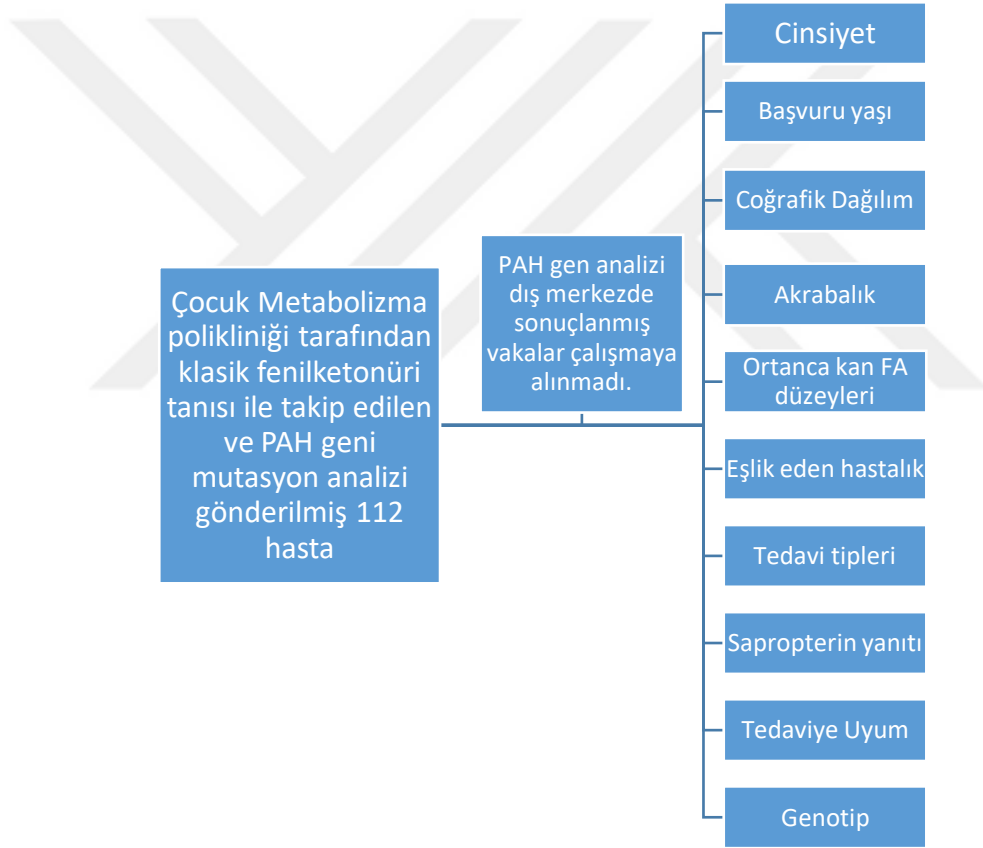
Mutasyon tarama yöntemlerinin herbirinin avantajları ve dezavantajları vardır. Ancak en önemli sorun bu alanda ideal bir yöntemin henüz bulunamamış olmasıdır. Bu durumda yapılması gereken mevcut bütçeye, deneyime ve ilgilendiğimiz gene göre uygun yöntemi belirlemek olmaktadır. Ayrıca tarama yöntemleri ile yeri belirlenen muhtemel mutasyonların hangi bazlarda olduğunun mutlaka DNA dizi analizi ile gösterilmesi veya mutasyonun hangi bazda olduğunun belirlendiği yöntemlerde bunun yine DNA dizi analizi ile doğrulanması gerekmektedir.

2.2.8.2.Yeni Nesil Dizileme ve Mendelian Kalıtılan Hastalıklar

Mendelian kalıtım bozuklukları çoğunlukla Mendel kalıtım modeline uyan kalıtım paternine sahip monogenik ve nadir görülen hastalıklardır (67). Her nadir bozukluk bireysel olarak az sayıda insanı etkilese de, yenidoğanların % 4'ünden fazlasının bir tür Mendelian kalıtım bozukluğundan etkilendiği bildirilmiştir. OMIM kataloğundaki 3000'den fazla bozukluğun moleküler temelleri ile ilgili raporları vardır (68). Bununla birlikte, genetik kökenleri hakkında herhangi bir bilginin olmadığı hala 3500'den fazla bozukluk vardır. Son yıllarda Mendel bozuklukları ile ilişkili genleri ve mutasyonları keşfetmek için büyük çaba sarf edilmiştir. Yeni nesil dizilemeden önce, aday genler kümesini daraltmak için geleneksel yöntemler kullanıldı (69). Bu aday genler daha sonra hastalığa neden olan mutasyonu bulmak için Sanger sekanslaması kullanılarak tek tek dizildi. Bu tip genetik çalışmalar, ancak yeterli sayıda etkilenen örnek mevcutsa mümkündür ancak de novo mutasyonları keşfetmek mümkün değildir. Yeni nesil dizileme (YND) yöntemlerinin nadir hastalık çalışmalarına dahil edilmesi, aday mutasyonların ve genlerin bulunuşunda devrim yaratmıştır. Otozomal resesif hastalıklar için, aynı aileden 4 veya 5 örnek mevcutsa, aday mutasyonlarının sayısı 10 veya daha azına indirilebilir. Soruna sebep olan mutasyonu tek bir hastanın akraba dışı ailelerden gelen tüm ekzon verisinden saptamak bile mümkündür (70,71).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamıza; Dokuz Eylül Üniversitesi Nevvar Salih İşgören Çocuk Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Metabolizma ve Beslenme polikliniğinde klasik fenilketonüri tanısıyla takipli olan ve Genetik Tanı Merkezi'nde PAH geni mutasyon analizi yapılmış toplam 112 hasta alındı. Mutasyon taraması yapılan klasik FKÜ hastalarında allellerin dağılımı, mutasyon analizi sonucu saptanan allel frekansları, genotip dağılımı, tedavi tipleri, ortalama FA düzeyleri, sapropterin tedavisine yanıt ilişkisi karşılaştırması yapılmış ve BH4 tedavisine direnç geliştiren genotiplerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. (Şekil 9)



Şekil 9. Poliklinik takibinde olan hastaların sayısı ve incelenen özellikleri

Çalışmamızda klasik fenilketonüri tanısı ile takip edilen, mutasyon analizi yapılmış hastalar; başvuru yaşı, cinsiyeti, geldikleri bölge, ebeveynler arasındaki akrabalık öyküsü, izlem sırasındaki ortalama FA düzeyleri, aldığı tedavi ve takip sırasındaki metabolik kontrol durumları mutasyon sonuçları ile birlikte genotip ilişkisi açısından değerlendirildi. Gen mutasyonlarına bakılan 112 hastanın, yapılan

değerlendirme ve bilgilerine retrospektif olarak hastane elektronik ve arşiv kayıt sistemindeki dosyalarından ulaşıldı.

Hastaların kan fenilalanin düzeyleri, kanların etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içerikli tüplere alınarak Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvarı'nda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) yöntemi ile ölçüldü.

Hastaların mutasyon tarama çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'nde yapıldı.

Fenilketonüri Yeni Nesil Dizileme Paneli Laboratuvar Aşamaları

Olguların yeni nesil dizileme yöntemiyle PAH (ENST00000553106) geni dizilemesi için NEXTflex™ Fenilketonüri Amplikon Panel (Bioo Scientific, Perkin Elmer, ABD) kiti kullanıldı. Bu kit iki miks halinde toplamda 20 primer çifti ile PAH geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının amplifikasyonunu ve sekanslanmasını sağlamaktadır. Laboratuvar aşamalarının öncesinde DNA kalitesi ve yeterliliği Qubit Florometre (ThermoFisher Scientific, ABD) ile kontrol edildi. Yaklaşık 20-100 ng total genomik DNA teyit edildikten sonra ıslak laboratuvar aşamalarına geçildi. Bunlar sırasıyla; PCR I Amplifikasyonu, Pürifikasyon, Adaptör Ligasyonu, Pürifikasyon, PCR II Amplifikasyonu, Pürifikasyon ve kütüphane validasyonu aşamalarını içermektedir. Tüm aşamalarda üretici protokolleri uygulanmıştır.

PCR I Amplifikasyonu: İki farklı reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir reaksiyon için 10-50 ng genomik DNA, nükleaz içermeyen su, kit içerisinde temin edilen Primer Mix 1, PCR Enhancer 1, PCR Master Mix'leri toplam 50 µl hacimde birleştirilerek hazırlandı. PCR Primer Mix 2 için de aynı ölçülerle ayrı bir reaksiyonu karışımı hazırlandı. Thermocycler cihazında kit protokolünde belirtilen sıcaklıklarda polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi.

PCR I Sonrası Pürifikasyon: Pürifikasyon işlemi manyetik boncuklar (Magnetik bead) ile yapıldı. Manyetik boncuk çözeltisi kullanımdan önce 30 dakika oda sıcaklığına bekletildi. PCR I ürünleri üzerinde dağıtılarak homojenize edildi ve manyetik standda oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Süpernatant; şeffaf olduğunda, pellet bozulmadan yeni bir kuyucuğa aktarıldı. Süpernatant içerisine 30 µl 'Cleanup Bead' eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süpernatant şeffaf olduğunda

pellet bozulmadan atıldı. Her iki bead'in üzerine %80 etanol çözeltisi eklenerek iki kez yıkama işlemi yapıldı. 30 sn inkübasyon sonrası etanol pipetlenerek uzaklaştırıldı. Plate manyetik standdan alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Her iki bead üzerine 16 µl resüpsansiyon buffer eklendi ve karıştırılarak pipetaj ile homojenize hale getirildi. 3 dk oda sıcaklığında sonra 5 dk manyetik stand üzerinde bekletildi. 14 µl pürifiye edilmiş süpernatant yeni kuyucuğa aktarıldı.

Adaptör Ligasyonu: Önceki aşamada pürifiye edilmiş 14 µl PCR I reaksiyon 1 ürünü ve PCR I reaksiyon 2 ürünü ile kit içerisinde temin edilen adaptör solüsyonu ve ligasyon miksi karıştırılarak homjenize edildi. Plate thermocycler cihazında 22 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı.

Pürifikasyon: Pürifikasyon işlemi tekrarlandı.

PCR II Amplifikasyonu: Önceki işlemde pürifiye edilen adaptör bağlanmış DNA ile PCR II barkodlanmış primer miksi ve PCR II master miksi karıştırılarak homjenize edildi. Thermocycler cihazında kit protokolünde belirtilen sıcaklıklarda polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi.

Pürifikasyon: Pürifikasyon işlemi tekrarlandı.

Kütüphane Validasyonu ve Dizileme: Qubit cihazında hazırlanan kütüphanenin konsantrasyonu ölçülerek yeterliliği kontrol edildi. Hazırlanan kütüphaneler Nextseq Dizileme Platformunda (Illumina, USA) dizilenmek üzere kartuşa yüklenir. Reaksiyon kartuşu ve akış hücresi ('flow cell') cihaza yerleştirildi. Cihazdan elde edilen data, "FASTQ" formatında alındı. Kalite değerlendirmesi, haritalama ve referans genom Hg19'a hizalama, varyant çağırma ve anotasyon dahil olmak üzere çıktı verilerinin biyoinformatik adımları, SEQ yazılımı v6.2.1 (Genomize, Türkiye) ile gerçekleştirildi. Saptanan varyantlar güncel kılavuzlara göre klinik olarak sınıflandırıldı.

Hastaların çalışmaya dâhil edilme ve çalışmadan dışlanma kriterleri

Çocuk Metabolizma Bilim Dalı tarafından klasik fenilketonüri tanısı ile takip ediliyor olması, dış merkez ya da hastanemizde ilk tanı anında bakılan fenilalanin düzeyinin 20 mg/dL'nin üzerinde olması ve klasik fenilketonüriye yönelik tedavi alıyor olması, Çocuk Genetik Bilim Dalı tarafından PAH mutasyon analizi için örnek alınmış olması, mutasyon analizi sonuçlarının tanımlanmış olması, dosya bilgilerine

ulaşılabilir olması ve dosya bilgilerinin eksik olmaması olarak belirlendi. Genetik mutasyonu dış merkezde çalışılmış hastalar ve klasik fenilketonüri fenotipinde olmayan hiperfenilalaninemiler çalışmadan dışlanma kriterleri olarak belirlendi.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda verilerin istatistiksel değerlendirmesi Statistical Package for Social Sciences (SPSS v20) (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programında yapıldı. Grupların dağılımlarının normal olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edildi. Normal dağılım gösteren grupların verileri ortalama standart sapma, normal dağılım göstermeyen grupların verileri ortanca [interquartile range: 25-75 persentiller] olarak ifade edildi. Grup oranları ise sayı (%) olarak ifade edildi. Numerik olarak ifade edilen gruplar arasındaki farklılık student t-testi (gruplar normal dağılıyorsa) ve Mann-Whitney U-testi (gruplar normal dağılmıyorsa) ile analiz edildi. Grup oranlarının karşılaştırılmasında Ki-kare testi, gözlerde beklenen değer 5'in altında ise Fisher'in kesin testi kullanıldı. Bağımsız parametreler arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi için Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Sürekli değişkenler arasındaki korelasyon, korelasyon katsayısına göre düşük (korelasyon katsayısı: 0,1-0,29 arasında) orta (0,3-0,49 arasında) ve yüksek korelasyon (<0,5) olarak sınıflandırıldı. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İzlem kan fenilalanin hesaplanması için hastaların ortanca fenilalanin değerleri kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmamızda; klasik fenilketonüri tanısı ile takip edilen ve fenilalanin hidroksilaz (PAH) geninde mutasyon analizi yapılan 112 hasta değerlendirildi. Ayrıca çalışma kriterlerini sağlıyor olup PAH geninde mutasyon sonucu saptanamayan 2 klasik fenilketonürlü hasta genotip hariç diğer parametreler yönünden değerlendirme kapsamına alındı. (Şekil 9)

4.1. Cinsiyet

Dokuz Eylül üniversitesi çocuk genetik bilim dalı tarafından klasik fenilketonüri ön tanısı ile PAH mutasyon analizi gönderilen 112 hastanın 58'i (%51,8) kız, 54'ü (%48,2) ise erkekti. (Tablo 8)

Tablo 8. Mutasyon analizi yapılan hastaların cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Hasta sayısı (%)
Kız	58 (%51,8)
Erkek	54 (%48,2)
Toplam	112 (%100)

4.2. Başvuru Yaşı

Çalışmamızda mutasyon analizi yapılan 112 hastanın 30'u (%26,7) dış merkezde tanı almış olup sonrasında Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Metabolizma Bilim Dalı tarafınca takip edilen hastalardı. 112 hastanın 91'inin (%81,3) yenidoğan döneminde (0. gün-28. gün), 13'ünün (%11,6) süt çocuğu döneminde (28. Gün-2 yaş), 7'sinin (%6,3) çocukluk yaş döneminde (2 yaş-12 yaş) ve 1'inin (%0,9) adölesan dönemde (12 yaş-18 yaş) dış merkeze ya da hastanemiz polikliniğine başvurduğu gözlemlendi. Erişkin dönemde tanı alan hastamız yoktu. (Tablo 9)

Tablo 9. PAH gen analizi yapılan hastaların polikliniğe başvurdıkları yaş aralığının dağılımı

Yaş Aralığı	Hasta Sayısı	(%)
Yenidoğan (0-28. gün)	91	81,3
Süt çocuğu (28 gün-2y)	13	11,6
Çocukluk dönemi (2y-12y)	7	6,3
Adölesan dönem (12y-18y)	1	0,9
Erişkin	0	0
Total	112	100

Hastalarımızın başvuru yaşlarının ortalama değeri 28,5 gün, güncel yaşlarının ortalama değeri ise 14 yıl 4 ay olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya alınan hastaların güncel yaş aralığı aşağıda verilen tablodaki gibidir. (Tablo 10)

Tablo 10. Çalışmaya alınan hastaların güncel yaş aralıkları

Yaş Aralığı	Hasta Sayısı	(%)
0-6 yaş	16	14,3
6-12 yaş	33	29,5
12-18 yaş	29	25,9
18 yaş üstü	34	30,4
Total	112	100

4.3.Coğrafik Dağılım

Hastalar kayıtlı oldukları illere göre değerlendirildiğinde kayıtlarına ulaşılan 112 hastadan 62'sinin (%55,4) Ege Bölgesi'nden, 17'sinin (%15,2) Doğu Anadolu Bölgesi'nden, 3'ünün (%2,7) Karadeniz Bölgesi'nden, 2'sinin (%1,8) Marmara Bölgesinden, 4'ünün (%3,6) Akdeniz bölgesinden, 10'unun (%8,9) Güneydoğu Anadolu bölgesinden, 8'inin (%7,1) İç Anadolu bölgesinden, 6'sının (%5,4) yurtdışından geldiği öğrenildi. (Tablo 11)

Tablo 11.Hastaların kayıtlı oldukları bölgelere göre dağılımı

Bölge	Hasta Sayısı	(%)
Akdeniz	4	3,6
Marmara	2	1,8
Karadeniz	3	2,7
İç Anadolu	8	7,1
Ege	62	55,4
Doğu Anadolu	17	15,2
Güneydoğu Anadolu	10	8,9
Yurtdışı	6	5,4
Total	112	100

4.4.Akrabalık İlişkisi

Kayıtlardan 112 vakanın 54'ünde (%48,2) ebeveynler arasında akrabalık olmadığı saptandı. 112 hastanın 58'inde (%52,8) ise ebeveynleri arasında akrabalık ilişkisinin olduğu saptandı. Vakalarımızın ebeveynlerindeki akrabalık ilişkisi Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Hastaların ebeveynlerinin akrabalık ilişkisinin dağılımı

Akrabalık ilişkisi	Hasta sayısı	(%)
Akrabalık yok	54	48,2
1. derece kuzen evliliği	37	33,0
2. derece kuzen evliliği	16	14,3
3. derece kuzen evliliği	3	2,7
Uzak akraba	2	1,8
Total	112	100

4.5.Ortanca Kan Fenilalanin Düzeyleri

Mutasyon çalışması yapılan 112 hastanın başvuru anındaki ve izlem sürecindeki kan FA düzeyleri değerlendirmeye alındı. Hastaların başvuru anındaki FA ortanca değeri 22,8 mg/dL olarak değerlendirildi.

Bireylerin son 3 yıl içindeki ölçülen kan FA düzeyleri dosyalarından öğrenilmiş, toplam 1622 ölçüm sonucu toplanmış, küçük yaş grubundaki bireyler (<3 yaş) için ise doğumdan çalışmanın yapıldığı sürece kadar olan kan FA düzeyleri ölçüm değerleri değerlendirilmiştir.

FKÜ'lu bireylerin ölçülen son kan FA düzeyi (0,1-37 mg/dL) ile son üç yılda ölçülmüş (0,1-35 mg/dL) kan FA medyan değerleri arasında doğrusal yönde güçlü ve istatistiksel açıdan önemli bir ilişki ($p<0,05$) olduğu için, bu çalışmada metabolik kontrolün göstergesi olarak bireylerin son üç yılki kan FA ölçümlerinin medyan değerleri kullanılmıştır. Yaş gruplarına göre FKÜ'lu bireylerin dosya kayıtlarından elde edilen kan FA düzeyi ölçüm sayılarının alt, üst ve ortalama değerleri Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Yaş gruplarına göre klasik FKÜ'lu bireylerin dosya kayıtlarından elde edilen kan FA düzeyi ölçüm sayılarının ortalama ve alt, üst değerleri

Yaş grubu (Yıl)	Hasta sayısı	Kan FA düzeyi (mg/dL)	Alt-üst değer (mg/dL)
<1	4	4,95	0,1-15
1-6,9	19	7,6	0,2-24
7-12,9	29	11,9	2-28
13-18,9	34	13,4	1-32
≥ 19	26	16	2-35

Hastaların izleminde kan FA düzeylerinin ortanca değerleri (median) hesaplanarak, hastalar; ortanca kan FA düzeylerine göre, kötü kontrol (ortanca kan FA >6 mg/dL), iyi kontrol (ortanca kan FA düzeyi < 4 mg/dL) ve riskli bölge (ortanca kan FA düzeyi 4-6 mg/dL) olarak sınıflandırıldı. (Tablo 14)

Hastaların tedaviye uyumu ise; kan FA ortanca değerlerinin 2-6 mg/dL arasında olan hastalar diyetle uyumlu, kan FA ortanca düzeyi 6 mg/dL'nin üzerinde olanlar ise diyetle uyumsuz şeklinde iki gruba ayrılarak değerlendirildi.

Tablo 14. Ortanca kan fenilalanin düzeylerine (kontrol tiplerine) göre hasta dağılımı

Takip fenilalanin düzeyleri	Hasta sayısı	(%)
<4 mg/dL (iyi kontrollü)	6	5,4
4-6 mg/dL (orta kontrollü)	19	17,0
>6 mg/dL (kötü kontrollü)	87	77,7
Toplam	112	100

Vakalarımızın yaklaşık 3/4'ünün (87 vaka, %77) izleminde, ortalama kan FA değeri 6 mg/dL üstünde bulunarak kötü metabolik kontrolde oldukları belirlendi. (Tablo 15)

Hastaların izlemdeki FA ortanca değerlerinin ortancası 12,5 mg/dL olarak bulundu. Ortanca kan FA değerlerinin %77 gibi büyük bir oranının >6 mg/dL olması nedeni ile ortanca FA değerleri; <4 mg/dL, 4-6 mg/dL, 6-10 mg/dL, 10-15 mg/dL, 15-20 mg/dL ve >20 mg/dL aralıklarına bölünerek incelendiğinde elde edilen ortanca FA aralığı tablosu Tablo 15'teki gibidir.

Tablo 15. Ortanca kan fenilalanin düzeylerine göre hasta dağılımı

Takip FA ortanca değer aralığı	Hasta sayısı	(%)
<4 mg/dL	6	5,3
4-6 mg/dL	19	16,9
6-10 mg/dL	25	22,3
10-15 mg/dL	22	19,6
15-20 mg/dL	21	18,7
>20 mg/dL	19	16,9
Total	112	100,0

4.6.Tedavi Tipleri

Çalışmamızda 112 hastanın tedavi tipleri değerlendirildi. 112 hastadan 73'ü (%65,2) sadece FA'den kısıtlı diyet tedavisi almaktaydı. 22 vaka (%19,6) FA'den

kısıtlı diyet tedavisi ile birlikte nötral aminoasit (LNAA) tedavisi alıyordu, 17 vaka (%15,2) diyet tedavisine ek olarak BH4 tedavisi almaktaydı. Hastaların aldıkları tedaviye göre dağılımları Tablo 16’da verilmiştir

Tablo 16. Hastaların aldıkları tedavilere göre dağılımı

Tedavi çeşidi	Hasta sayısı	(%)
Fenilalanin kısıtlı diyet	73	65,2
Fenilalanin kısıtlı diyet + LNAA	22	19,6
Fenilalanin kısıtlı diyet + BH4	17	15,2
Total	112	100

4.7. Komorbidite / Büyüme Ve Nöromotor Gelişim Problemleri

Değerlendirilen 112 hastanın 55’inde (%49,1) özellikle nörolojik ve endokrinolojik başta olmak üzere eşlik eden klinik bulguların ve hastalıkların olduğu görüldü. Bu hastalardan 22’sinde (%19,6) eşlik eden nörolojik semptomlar mevcuttu, 11’i (%10) yenidoğan sonrası dönemde tanı almış olup hastaların izlemelerindeki fenilalanin ortanca değerleri kötü kontrollü bölgede seyretmekteydi. Bir hastada fenilketonüri hastalığına ek olarak talasemi ve boy kısalığı vardı.

Bir hasta 6 aylıkken tanı almıştı. Mikrosefali ve yarık damak bulgularının eşlik etmesi, nöromotor gelişim geriliği ve sendromik yüz görünüm olması nedeni ile izlenmekteydi. Diğer 9 hasta da fenilketonüriye eşlik eden obezite, hipertansiyon, hepatosteatoz, hiperlipidemi, diyabet, boy kısalığı nedeni ile ilgili bölümlerce takip edilmekteydi.

Hastaların vücut kitle indekslerinin ortanca değeri 20,5 olarak değerlendirildi. 112 hastanın 31’inde (%27,6) obezite saptandı.

Hastalara eşlik eden semptomların ya da hastalığın olması durumunda izlemdeki ortanca FA değerleri karşılaştırıldığında, hastaların FA ortanca düzeylerinin 6 mg/dL’nin üstünde seyrettiği yönünde anlamlı fark gözlemlendi (p=0,03). (Tablo 17)

Tablo 17. Hastalara eşlik eden hastalıklarının olması ile hastaların kan FA ortalama düzeylerinin seyri

Komorbidite/Hastalık	<6 mg/dL	>6 mg/dL
Var	5	50
Yok	20	37
Toplam	25	87

4.8.Genotip

Mutasyon analizi yapılan 112 hastadan mutasyon sonucu çıkanların 66'sında (%60) PAH geninde homozigot mutasyon bulunurken, 44 (%40) vakada birleşik heterozigot mutasyon bulundu.

PAH geni mutasyon analizi sonucu 35 farklı allel tespit edildi. Bunlardan 3'ü daha önce literatürde tanımlanmamış mutasyonlardı.

Hastalarımızda en sık görülen ilk 3 mutasyon c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) (%37,3), c.782G>A (R261Q) (%10,9) ve c.441+5G>T (IVS4+5G>T) (%5.5) idi. (Tablo 18).

c.1155_1159delCATTinsGATTC, c.30A>T, c.1155_1157delCTAinsGTG saptanan novel mutasyonlardır.

Hastalarda gözlenen allellerin frekansları Tablo 18'de verilmiştir. Gözlenen mutasyonlar; gen bölgesi, mutasyon çeşidi, protein değişimi, allelik fenotip değeri, rezidüel enzimatik aktivitesi ve etkilediği enzim alt bölgesi yönünden değerlendirilmiştir. (Tablo 19-20)

Tablo 18. Mutasyon analizi sonucu saptanan allel frekansları, nükleotid ve protein değişimlerine göre adlandırmaları

Nükleotid Değişimi	Protein değişimi /Allelik variant	Allelik frekans
c.1066-11G>A	IVS10-11G>A	82 (%37,3)
c.782G>A	p.Arg261Gln / p.R261Q	24 (%10,9)
c.441+5G>T	IVS4+5G>T	12(%5,5)
c.842C>T	p.Pro281Leu / p.P281L	11(%5)
c.638T>C	p.Leu213Pro p.L213P	6(%2,7)
c.727C>T	p.Arg243Stop p.R243L	10(%4,5)
c.168+5G>C	IVS2+5G>C	4(%1,8)
c.169-13T>G	IVS2-13T>G	4(%1,8)
c.331C>T	p.Arg111Stop p.R111	7(%3,2)
c.143T>C	p.Leu48Ser p.L48S	8(%3,6)
c.754C>T	p.Arg252Trp p.R252W	2(%0,9)
c.728G>A	p.Arg243Gln p.R243Q	2(%0,9)
c.1223G>A	p.Arg408Gln R408Q	2(%0,9)
c.1066-3C>T	IVS10-3C>T	2(%0,9)
c.47_48delCT	p.Ser16Xfs	5(%2,3)
c.1222C>T	p.Arg408Trp p.R408W	7(%3,2)

c.781C>T	p.Arg261Stop p.R261T	6(%2,7)
c.441+1G>C	IVS4+1G>C	3(%1,4)
c.1114A>T	p.Thr372Ser p.T372S	1(%0,5)
c.592_613del	p.Tyr198fs	1(%0,5)
c.722G>A	p.Arg241His p.R241H	1(%0,5)
c.1301C>A	p.Ala434Asp p.A434D	1(%0,5)
c.721C>T	p.Arg241Cys p.R241C	1(%0,5)
c842+6T>C	IVS7+6T>C	1(%0,5)
c.1089delG	p.Lys363fs	1(%0,5)
c.1162G>A	p.Val388Met p.V388M	1(%0,5)
c.362T>C	p.Phe121Ser p.F121S	1(%0,5)
c.1028A>G	p.Tyr343Cys p.Y343C	1(%0,5)
c.838G>A	p.Glu280Lys p.E280K	1(%0,5)
c.664_665delGA	p.Asp222Ter	1(%0,5)
c.473G>A	p.Arg158Gln p.R158Q	4(%1,8)
c.707-2A>G	IVS6-2A>G	2(%0,9)

c.1155_1157delCT AinsGTG*		2 (%1,2)
c.30A>T*	c.30A>T	2(%0,9)
c.1155_1159delCA TTinsGATTC*		1(%0,5)

* PAH geninde novel mutasyon olarak bulunan alleller

**Terminoloji: Tablo 18’de hem protein değişimini hem de nükleotid değişimini belirterek iki şekilde de adlandırılmıştır. Terminolojiye göre; anlamsız mutasyonlarda nükleotid değişiminin meydana getirdiği protein değişimine göre bu mutasyonu adlandırırken, isimlendirmede gelen ilk harf, referans amino asittir. Sonrasında gelen sayı PAH kodonudur ve ikinci harf, kayıp mutasyona denk gelen amino asidi gösterir. “X” anlamsız mutasyonu belirtir; "del" silinme mutasyonu anlamına gelir; ve "fs" ise çerçeve kayması mutasyonunu belirtir. Ekleme mutasyonları intron ve bölgeye göre adlandırılır; Pozitif sayılar intronun 5’ ucunda bir nükleotid değişimini gösterir ve negatif sayılar 3’ ucunda böyle bir değişiklik olduğunu gösterir. Veriler www.biopku.org sitesinde, biopku veritabanından elde edilmiştir. Tabloda belirtilmemiş olan değerler henüz veritabanında tanımlanmamış değerlerdir.

Tablo 19. Nükleotid değişimi ve bulunduğu gen bölgesi, mutasyon çeşidi, allelik fenotip değeri, etkilediği enzim alt bölgesi ve enzimatik aktivite yüzdesi (%)

Nükleotid Değişimi	Gen	Mutasyon	APV	Enzimatik Bölge	Enzimatik Aktivite
c.1066-11G>A	Intron 10	Splice Bölge	0		<1
c.782G>A	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	1,6	Katalitik	44
c.441+5G>T	Intron 4	Splice Bölge	0		<1
c.842C>T	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	2
c.638T>C	Ekzon 6	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	
c.727C>T	Ekzon 7	Anlamsız	0	Katalitik	<1
c.168+5G>C	Intron 2	Splice Bölge	0		
c.169-13T>G	Intron 2	Splice Bölge	0		6,7
c.331C>T	Ekzon 3	Anlamsız	0	Regulatuar	<1

c.143T>C	Ekzon 2	Yanlış Anlamlı	2	Regulatuar	39
c754C>T	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	15
c.728G>A	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	14
c.1223G>A	Ekzon 12	Yanlış Anlamlı	5,2	Katalitik	41
c.1066-3C>T	İntron 10	Splice Bölge	0,3		
c.47_48delCT	Ekzon 1	Çerçeve Kayması	0	Regulatuar	
c.1222C>T	Ekzon 12	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	2
c.781C>T	Ekzon 7	Anlamsız	0	Katalitik	<1
c.441+1G>C	Intron 4	Splice Bölge	0		
c.1114A>T	Ekzon 11	Yanlış Anlamlı	8,5	Katalitik	
c.592_613del	Ekzon 6	Çerçeve Kayması	0	Katalitik	
c.722G>A	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	5,2	Katalitik	23
c.1301C>A	Ekzon 12	Yanlış Anlamlı	3	Tetramerizasyon	9
c.721C>T	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	5,5	Katalitik	57
c842+6T>C	Intron 7	Splice Bölge			
c.1089delG	Ekzon 11	Çerçeve Kayması	0	Katalitik	
c.1162G>A	Ekzon 11	Yanlış Anlamlı	1,8	Katalitik	28
c.362T>C	Ekzon 4	Yanlış Anlamlı		Regulatuar	

c.1028A>G	Ekzon 10	Yanlış Anlamlı	4	Katalitik	
c.838G>A	Ekzon 7	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	11
c.664_665delGA	Ekzon 6	Delesyon	0	Katalitik	
c.473G>A	Ekzon 5	Yanlış Anlamlı	0	Katalitik	10
c.1155_1157delC TAinsGTG*	Ekzon 11	Delesyon/ Inserisyon			
c.30A>T*	5' UTR	Yanlış Anlamlı			
c.707-2A>G	Intron 6	Splice Bölge	0		
c.1155_1159delC ATTinsGATTC*	Ekzon 11	Delesyon/ Inserisyon			

* PAH geninde novel mutasyon olarak bulunan alleller

Tablo 20. Klasik fkü hastalarında genotip dağılımı, APV değeri, klasik FKÜ ile ilişki yüzdesi, BH4 yükleme testine verdikleri olumlu/olumsuz/yavaş yanıt yüzdeleri

GENOTİP	110 (%100)	APV	Klasik FKÜ ile ilişkisi	BH4 YANIT (%)		
				YOK	VAR	Yavaş
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	34(%31)	0	%98	93	0	6,1
c.782G>A/c.782G>A	10(%9)		%27,2	22	74	4
IVS4+5G>T/IVS4+5G>T	5(%4,5)	0	%93,3	100		
c.331C>T/c.727C>T	3(%2,7)		100			
c.47_48delCT/c.842C>T	3(%2,7)		100			
c.331C>T/c.781C>T	2(%1,8)		100			
c.638T>C/c.638T>C	2(%1,8)		83	100		
IVS2-13T>G/IVS2-13T>G	2(%1,8)	0	100			

c.842C>T/c.842C>T	2(%1,8)		99,2	100		
c.727C>T/c.727C>T	2(%1,8)		100	100		
IVS10-11G>A/c.842C>T	2(%1,8)		100	100		
IVS10-11G>A/c.473G>A	2(%1,8)		100	100		
IVS6-2A>G/c.30A>T	2(%1,8)					
IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C	2(%1,8)					
c.1155_1157delCTAinsG TG/c.638T>C	2(%1,8)					
IVS4+5G>T/c.143T>C	1(%0,9)	2	87,5	100		
IVS4+1G>C/c.722G>A	1(%0,9)					
c754C>T/c754C>T	1(%0,9)		98,5	100		
IVS10-11G>A/c.143T>C	1(%0,9)		44,1	40	30	30
c.727C>T/c.1222C>T	1(%0,9)		98	100		
c.781C>T/IVS4+5G>T	1(%0,9)	1,6	81,8	100		
c.727C>T/IVS7+6T>C	1(%0,9)					
c.143T>C/c.1222C>T	1(%0,9)		68	75	18	6
IVS10- 11G>A/IVS2+5G>C	1(%0,9)	0	100			
c.727C>T/c.782G>A	1(%0,9)		52,6	55	11	33
c.1222C>T/c.1222C>T	1(%0,9)		99,3	96,9	2	1
c.842C>T/c.781C>T	1(%0,9)		100	100		
IVS10-11G>A/c.838G>A	1(%0,9)		100	100		
c.1222C>T/c.664_665del GA	1(%0,9)					
IVS2+5G>C/c.781C>T	1(%0,9)					
c.1223G>A/c.1223G>A	1(%0,9)		0	100		
c.143T>C/c.1155_1159del CATTinsGTATC	1(%0,9)					
c.781C>T/c.781C>T	1(%0,9)		100	80		20

c.47_48delCT/c.47_48delCT	1(%0,9)		100	100		
IVS2+5G>C/IVS2+5G>C	1(%0,9)	0	98	100		
c.143T>C/c.1301C>A	1(%0,9)					
IVS10-11G>A/c.721C>T	1(%0,9)		0			
c.331C>T/c.331C>T	1(%0,9)					
c.592_613del/c.1162G>A	1(%0,9)					
c.1222C>T/c.362T>C	1(%0,9)					
c.728G>A/c.728G>A	1(%0,9)		99	92		8
c.842C>T/c.1222C>T	1(%0,9)		100	100		
c.473G>A/c.782G>A	1(%0,9)		41	30	61	7
c.782G>A/IVS10-11G>A	1(%0,9)		75	86	7	5
IVS10-3C>T/IVS10-3C>T	1(%0,9)	0,3	100		50	50
c.143T>C/c.143T>C	1(%0,9)		32	17	73	8
c.143T>C/c.1089delG	1(%0,9)					
IVS2+5G>C/c.473G>A	1(%0,9)		100			
c.782G>A/c.1028A>G	1(%0,9)		0		100	
c.1114A>T/IVS10-11G>A	1(0,9)		0		100	

Hastaların homozigot genotiplerde mutasyon sınıflaması Tablo 21'deki gibidir. En sık gözlenen mutasyon %39,1 oranında splice bölge mutasyonu olmuştur.

Tablo 21. PAH geni genotipleri mutasyon sınıflaması

Homozigot allelerde mutasyon tipi	Hasta Sayısı	(%)
Yanlış anlamlı	18	27
Anlamsız	4	6
Çerçeve Kayması	1	1,5
Splice bölge mutasyonu	43	65
Total	66	100,0

Bileşik heterozigotlarında allelik mutasyonları ile birlikte değerlendirildiğinde tüm allellerdeki mutasyon değişimleri tablo 22'deki gibidir.

Tablo 22. Allelik mutasyon sınıflaması

Allelerde mutasyon tipi	Allel Sayısı	(%)
Yanlış anlamlı	74	33,6
Anlamsız	23	10,5
Çerçeve Kayması	3	1,4
Splice bölge mutasyonu	110	50
5'UTR	2	0,9
Delesyon	8	3,6
Total	220	100,0

Bileşik heterozigotlar kendi aralarında mutasyon çeşitlerine göre sınıflandırılacak olursa 14 hasta ile en sık yanlış anlamlı/splice bölge mutasyonu genotipi görülmektedir (%31,8). (Tablo 23)

Tablo 23. Bileşik heterozigot mutasyonları sınıflaması

Bileşik Heterozigot	Hasta Sayısı	(%)
Yanlış anlamlı / splice bölge mutasyonu	14	31,8
Yanlış anlamlı / çerçeve kayması	5	11,3
Yanlış anlamlı / delesyon/insersiyon	3	6,8
Yanlış anlamlı / delesyon	1	2,7
Yanlış anlamlı / yanlış anlamlı	6	13,6
Yanlış anlamlı / anlamsız	3	6,8
Anlamsız / Anlamsız	5	11,3
Splice bölge mutasyonu/ Splice bölge mutasyonu	3	6,8
Anlamsız/Splice bölge mutasyonu	2	4,5
Splice bölge mutasyonu/ 5' UTR mutasyonu	2	4,5

4.8.1. Ortanca Kan FA Düzeyleri ile Genotip Karşılaştırması

FA ortalanca düzeyi 4 mg/dL'nin altında seyreden hastaların allel sıklığı Tablo 24'te belirtilmiştir.

Tablo 24. FA ortalanca düzeyi 4 mg/dL'nin altında seyreden hastaların allel sıklığı

Allel	Allel Sayısı	(%)
c.143T>C	3	30
IVS4+1G>C	2	20
c.782G>A	4	20
c.722G>A	1	10
c.1089delG	1	10
IVS10-11G>A	1	10
Toplam	12	100

FA ortalanca düzeyi <4 mg/dL'nin altında seyreden hastaların allel sıklığı Tablo 25'te belirtilmiştir.

Tablo 25. FA ortalanca düzeyleri 4 mg/dL'nin altında seyreden hastaların genotipleri

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
IVS4+1G>C/c.722G>A	1	20,0
c.143T>C/c.1089delG	1	20,0
c.143T>C/c.143T>C	1	20,0
c.782G>A/c.782G>A	2	20,0
IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C	1	20,0
Total	6	100,0

FA ortalanca düzeyleri 4-6 mg/dL aralığında seyreden hastaların allel sıklığı Tablo 26'daki gibidir.

Tablo 26. FA ortalanca düzeyleri 4-6 mg/dL aralığında seyreden hastaların allel sıklığı

Allel	Allel Sayısı	(%)
IVS10-11G>A	12	26,4
c.782G>A	7	23,5
c.1223G>A	2	5,8
c.47_48delCT	2	5,8
c.638T>C	2	5,8
IVS7+6T>C	2	5,8
IVS10-3C>T	2	5,8
c.1222C>T	1	2,9
c.362T>C	1	2,9
c.473G>A	2	2,9
c.727C>T	1	2,9
c.1028A>G	1	2,9
c.721C>T	1	2,9
IVS4+1G>C	1	2,9
c.842C>T	2	5,8
Toplam	38	100

FA ortalanca düzeyleri 4-6 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. (Tablo 27)

Tablo 27. FA ortalanca düzeyleri 4-6 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
c.782G>A/c.782G>A	2	17,6
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	4	17,6
c.1222C>T/c.362T>C	1	5,9
c.1223G>A/c.1223G>A	1	5,9
c.47_48delCT/c.47_48delCT	1	5,9
c.473G>A/c.782G>A	1	5,9
c.638T>C/c.638T>C	1	5,9
c.727C>T/IVS7+6T>C	1	5,9
c.782G>A/c.1028A>G	1	5,9
c.782G>A/IVS10-11G>A	1	5,9
IVS10-11G>A/c.721C>T	1	5,9
IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C	1	5,9
IVS10-3C>T/IVS10-3C>T	1	5,9
IVS10-11G>A/ c.473G>A	1	5,9
c.842C>T/ c.842C>T	1	5,9
Total	19	100,0

Eğer hastaların kan FA ortalanca düzeylerini iyi kontrollü (<6 mg/dL) ve kötü kontrollü (>6 mg/dL) olacak şekilde ikiye ayırıp bu bölgede izlenen allelik mutasyonları inceleyecek olursak; delesyon, çerçeve kayması ve 5' UTR mutasyonlarının frekanslarının düşük olması nedeni ile bu mutasyonları dışlayıp, yanlış anlamlı mutasyonlar, anlamsız mutasyonlar ve splice bölge mutasyonlarını kendi içinde karşılaştırsak, yanlış anlamlı mutasyona sahip allelerin, 6 mg/dL'nin altındaki hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve anlamsız mutasyonlar ile

splice bölge mutasyonlarının ise 6 mg/dL'nin üzerindeki hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. (p=0,016) (Tablo 28)

Tablo 28. Allelik mutasyon çeşitleri ile ortalama FA düzeyi karşılaştırılması

Allelik mutasyon	<6 mg/dL	>6 mg/dL	Toplam
Yanlış anlamlı	27 (%57,4)	47 (%29,4)	74 (%35,7)
Anlamsız	1(%12,1)	22 (%13,8)	23 (%11,1)
Splice bölge mutasyonu	19 (%40,4)	91 (%56,9)	110 (%53,1)
Toplam	47	160	(%100)

FA ortalama düzeyleri 6-10 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri tablo 29'da verilmiştir.

Tablo 29. FA ortalama düzeyleri 6-10 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	9	39
IVS4+5G>T/IVS4+5G>T	2	8
c.143T>C/c.1155_1159delCATTinsGTATC	1	4
c.143T>C/c.1222C>T	1	4
c.143T>C/c.1301C>A	1	4
c.47_48delCT/c.842C>T	1	4
c.592_613del/c.1162G>A	1	4
c.727C>T/c.727C>T	1	4
c.781C>T/IVS4+5G>T	1	4
c.782G>A/c.782G>A	1	4
IVS10-11G>A/c.143T>C	1	4
IVS10-11G>A/IVS2+5G>C	1	4
IVS6-2A>G/c.30A>T	1	4
IVS4+5G>T/ c.143T>C	1	4
Total	23	100,0

FA ortalanca düzeyleri 10-20 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri Tablo 30’da verilmiştir.

Tablo 30. FA ortalanca düzeyleri 10-20 mg/dL aralığında seyreden hastaların genotip analizleri

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	10	4,3
c.782G>A/c.782G>A	4	21,7
IVS4+5G>T/IVS4+5G>T	3	13,0
c.331C>T/c.727C>T	3	9,5
IVS2-13T>G/IVS2-13T>G	2	4,3
IVS6-2A>G/c.30A>T	1	4,3
IVS4+5G>T/c.143T>C	1	4,3
IVS2+5G>C/IVS2+5G>C	1	4,3
IVS2+5G>C/ c.473G>A	1	4,3
IVS10-11G>A/c.842C>T	1	4,3
IVS10-11G>A/c.838G>A	1	4,8
IVS10-11G>A/c.473G>A	1	4,8
c754C>T/c754C>T	1	4,8
c.842C>T/c.842C>T	1	4,3
c.842C>T/c.781C>T	1	4,8
c.781C>T/c.781C>T	1	4,3
c.728G>A/c.728G>A	1	4,3
c.727C>T/c.782G>A	1	4,3
c.727C>T/c.727C>T	1	4,8
c.727C>T/c.1222C>T	1	4,3
c.638T>C/c.638T>C	1	4,8
c.331C>T/c.781C>T	1	4,8
c.1222C>T/c.664_665delGA 1	1	4,8

c.1222C>T/c.1222C>T	1	4,3
c.1155_1157delCTAinsGTG/c.638T>C	1	4,8
c.1114A>T/IVS10-11G>A	1	4,3
Total	43	100,0

FA ortalanca düzeyleri 20mg/dL'nin üzerinde seyreden hastaların genotip analizleri Tablo 31'de verilmiştir.

Tablo 31. FA ortalanca düzeyleri 20mg/dL'nin üzerinde seyreden hastaların genotip analizleri

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	11	57,9
c.47_48delCT/c.842C>T	2	10,5
c.1155_1157delCTAinsGTG/c.638T>C	1	5,3
c.331C>T/c.331C>T	1	5,3
c.331C>T/c.781C>T	1	5,3
c.782G>A/IVS10-11G>A	1	5,3
c.842C>T/c.1222C>T	1	5,3
IVS10-11G>A/c.842C>T	1	5,3
Total	19	100,0

Genotipler kendi aralarında birleşik heterozigot ve homozigot mutasyonlar yönünden iki grupta incelendiğinde hastaların ortalanca kan FA karşılaştırılması Tablo 32'deki gibidir.

Tablo 32. Homozigot/bileşik genotip sıklığının ortalanca FA düzeyi ile karşılaştırılması

Mutasyon çeşidi	<6 mg/dL	>6 mg/dL
Bileşik heterozigot	11	33
Homozigot mutasyon	14	52
Toplam	25	85

4.8.2. Genotip ile Tedavi Tipleri Karşılaştırması

Fenilalanin kısıtlı diyet alan hastaların allelik frekans yüzdeleri Tablo 33'deki gibidir.

Tablo 33. Fenilalanin kısıtlı diyet alan hastalarda allelik frekans yüzdeleri

Allel	Allel Sayısı	(%)
IVS10-11G>A	56	39,4
c.782G>A	13	9,1
IVS4+5G>T	10	7
c.727C>T	8	5,6
c.143T>C	7	4,9
c.638T>C	6	4,2
c.842C>T	6	4,2
c.781C>T	4	2,8
IVS2-13T>G	4	2,8
c.1222C>T	4	2,8
c.473G>A	3	2,1
IVS4+1G>C	2	1,4
c.1155_1157delCTAinsGTG	2	1,4
c.1223G>A	2	1,4
c.331C>T	2	1,4
c.47_48delCT	2	1,4
c.1028A>G	1	0,7
c.1114A>T	1	0,7
c.1155_1159delCATTinsGTATC	1	0,7
c.1301C>A	1	0,7
c.30A>T	1	0,7
c.362T>C	1	0,7

c.721C>T	1	0,7
c.838G>A	1	0,7
IVS2+5G>C	1	0,7
IVS6-2A>G	1	0,7
IVS7+6T>C	1	0,7
Total	142	100,0

Allel sıklıkları belirtilen ve diyet tedavisi alan hastaların genotip dağılımı aşağıdaki tablodaki gibidir. (Tablo 34)

Tablo 34. Fenilalaniniden kısıtlı diyet tedavisi alan hastaların genotip dağılımları

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	23	32,5
c.782G>A/c.782G>A	5	7
IVS4+5G>T/IVS4+5G>T	4	5,6
c.1155_1157delCTAinsGTG/c.638T>C	2	2,8
c.331C>T/c.727C>T	2	2,8
c.47_48delCT/c.842C>T	2	2,8
c.638T>C/c.638T>C	2	2,8
c.727C>T/c.727C>T	2	2,8
IVS2-13T>G/IVS2-13T>G	2	2,8
IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C	1	1,4
c.1114A>T/IVS10-11G>A	1	1,4
c.1222C>T/c.1222C>T	1	1,4
c.1222C>T/c.362T>C	1	1,4
c.1223G>A/c.1223G>A	1	1,4
c.143T>C/c.1155_1159delCATinsGTATC	1	1,4
c.143T>C/c.122C>T	1	1,4
c.143T>C/c.1301C>A	1	1,4

c.143T>C/c.143T>C	1	1,4
c.473G>A/c.782G>A	1	1,4
c.727C>T/c.782G>A	1	1,4
c.727C>T/IVS7+6T>C	1	1,4
c.781C>T/c.781C>T	1	1,4
c.781C>T/IVS4+5G>T	1	1,4
c.782G>A/c.1028A>G	1	1,4
c.782G>A/IVS10-11G>A	1	1,4
c.842C>T/c.781C>T	1	1,4
c.842C>T/c.842C>T	1	1,4
IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C	1	1,4
IVS10-11G>A/c.143T>C	1	1,4
IVS10-11G>A/c.473G>A	1	1,4
IVS10-11G>A/c.721C>T	1	1,4
IVS10-11G>A/c.838G>A	1	1,4
IVS10-11G>A/c.842C>T	1	1,4
IVS2+5G>C/c.781C>T	1	1,4
IVS4+5G>T/c.143T>C	1	1,4
IVS6-2A>G/c.30A>T	1	1,4
Total	71	100,0

LNAA tedavisi alan 22 hastadan allel sıklığı yönünden en fazla seyreden yine IVS10-11G>A geni değişimiydi. (Tablo 35)

Tablo 35. Fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisi alan hastaların genotip dağılımları

Genotip	Allel Sayısı	(%)
IVS10-11G>A	19	43,2
c.331C>T	5	11,4
c.782G>A	5	11,4
c.842C>T	5	11,4
c.1222C>T	2	4,5
c.781C>T	2	4,5
c754C>T	2	4,5
c.47_48delCT	1	2,3
c.473G>A	1	2,3
c.664_665delGA	1	2,3
c.727C>T	1	2,3
Total	44	100,0

Allel sıklıkları belirtilen ve diyet tedavisi ile beraber LNAA tedavisi alan hastaların genotip dağılımı aşağıdaki tablodaki gibidir. (Tablo 36)

Tablo 36. Fenilalaninden kısıtlı diyet ve LNAA tedavisi alan hastaların genotip dağılımları

Genotip	Hasta Sayısı	(%)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	8	36,3
c.331C>T/c.781C>T	2	9,1
c.782G>A/c.782G>A	2	9,1
c.1222C>T/c.664_665delGA	1	4,5
c.331C>T/c.331C>T	1	4,5

c.331C>T/c.727C>T	1	4,5
c.47_48delCT/c.842C>T	1	4,5
c.782G>A/IVS10-11G>A	1	4,5
c.842C>T/c.1222C>T	1	4,5
c.842C>T/c.842C>T	1	4,5
c754C>T/c754C>T	1	4,5
IVS10-11G>A/c.473G>A	1	4,5
IVS10-11G>A/c.842C>T	1	4,5
Total	22	100,0

BH4 tedavisi alan hastaların allel sıklıkları aşağıdaki tablodaki gibidir.
(Tablo 37)

Tablo 37. BH4 tedavisi alan hastaların allel sıklıkları

Genotip	Allel Sayısı	(%)
IVS10-11G>A	7	20,6
c.782G>A	6	17,6
IVS2+5G>C	3	8,8
c.47_48delCT	2	5,9
c.728G>A	2	5,9
IVS10-3C>T	2	5,9
IVS4+5G>T	2	5,9
c.1089delG	1	2,9
c.1162G>A	1	2,9
c.1222C>T	1	2,9
c.143T>C	1	2,9
c.30A>T	1	2,9
c.592_613del	1	2,9
c.722G>A	1	2,9

c.727C>T	1	2,9
IVS4+1G>C	1	2,9
IVS6-2A>G	1	2,9
Total	34	100,0

Allel sıklıkları belirtilen ve diyet tedavisi ile BH4 tedavisi alan hastaların veritabanına göre BH4'e yanıt alınma yüzdelerinin karşılaştırması ve genotip dağılımı aşağıdaki tablodaki gibidir. (Tablo 38)

Tablo 38. BH4 tedavisi alan hastaların genotiplerinin veritabanına göre BH4'e yanıt alınma yüzdeleri ve genotip sıklıkları

Genotip	Hasta Sasyısı	(%)	BH4 YANIT (%)		
			YOK	VAR	Yavaş
c.782G>A/c.782G>A	3	17,7	22	74	4
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	3	17,6	93	0	6,1
c.47_48delCT/c.47_48delCT	1	5,9	100		
c.592_613del/c.1162G>A	1	5,9			
c.727C>T/c.1222C>T	1	5,9	100		
c.728G>A/c.728G>A	1	5,9	92		8
IVS10-11G>A/IVS2+5G>C	1	5,9			
IVS10-3C>T/IVS10-3C>T	1	5,9		50	50
IVS2+5G>C/IVS2+5G>C	1	5,9	100		
IVS4+5G>T/IVS4+5G>T	1	5,9	100		
IVS6-2A>G/c.30A>T	1	5,9			
Total	17	100,0			

Allelik mutasyon ve aldıkları tedavi karşılaştırması aşağıdaki tablodaki gibidir. (Tablo 39)

Tablo 39. Allelik mutasyon ve aldıkları tedavi karşılaştırması

Homozigot mutasyonlar	Fenilalanin kısıtlı diyet (n)	Fenilalanin kısıtlı diyet + LNAA (n)	BH4 (n)
Splice	30	8	6
Yanlış anlamlı	9	4	4
Anlamsız	3	1	0
Çerçeve kayması	0	0	1
Bileşik Heterozigot			
Yanlış anlamlı / splice bölge	10	3	1
Yanlış anlamlı / Yanlış anlamlı	5	1	0
Yanlış anlamlı / Anlamsız	2	0	1
Anlamsız / splice bölge	2	0	0
Anlamsız /delesyon	5	2	2
Splice bölge / splice bölge	2	0	1
Anlamsız / Anlamsız	2	3	0
Splice bölge / 3'utr	1	0	1

Allellerin BH4 yanıtlarının karşılaştırılması aşağıdaki tablodaki gibidir. (Tablo 40)

Tablo 40. Allellerin BH4 tedavisine yanıtlarının karşılaştırılması

Allel	Yanıt alınamayan allel sayısı	Yanıt alınan allel sayısı	Toplam
IVS10-3C>T	0	2	2
c.1089delG	0	1	1
c.1162G>A	0	1	1
c.143T>C	0	1	1
c.30A>T	1	1	2
c.47_48delCT	1	2	3
c.592_613del	0	1	1
c.638T>C	4	0	0
c.722G>A	0	1	1
c.727C>T	3	0	3
c.728G>A	0	2	2
c.781C>T	1	0	1
c.782G>A	0	4	4
c.842C>T	7	0	7
IVS10-11G>A	15	7	22
IVS4+5G>T	0	2	2
IVS6-2A>G	1	1	2
IVS7+6T>C	1	0	1

BH4 tedavisi denenmiş ve yanıt alınamamış olan genotipler aşağıdaki tabloda belirtildiği gibidir. Sıklığı en fazla görülen genotip IVS10-11G>A/IVS10-11G>A olmuştur. (Tablo 41)

Tablo 41. BH4 tedavisi denenmiş ancak yanıt alınamamış genotipler

Genotip	Hasta Sayısı	(%)	BH4 YANIT (%)		
			YOK	VAR	Yavaş
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	8	%38	93	0	6,1
IVS10-11G>A/c.842C>T	1	%4,7	100		
c.842C>T/c.842C>T	2	%9,5	100		
IVS2+5G>C/c.781C>T	1	%4,7	100		
c.727C>T/c.727C>T	1	%4,7	100		
c.842C>T/c.781C>T	1	%4,7	100		
IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C	2	%9,5			
IVS6-2A>G/c.30A>T	1	%4,7			
c.727C>T/IVS7+6T>C	1	%4,7			
c.47_48delCT/c.842C>T	1	%4,7			
c.638T>C/c.638T>C	2	%9,5	100		

Hem BH4 tedavisi hem de diğer tedavilerden alan 3 genotip bulundu.
(Tablo 42)

Tablo 42. Tedavi tiplerine göre genotip değerlendirmesinde ortak bulunan 3 genotip dağılımı

Genotip	Fenilalanin kısıtlı diyet (n)	Fenilalanin kısıtlı diyet+ LNAA (n)	BH4 (n)
IVS4+5G>T/IVS4+5G>T	4	0	1
c.782G>A/c.782G>A	5	2	2
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	20	7	3

5. TARTIŞMA

İlk tanımlanan ve en yaygın metabolik hastalıklardan olan fenilketonüri hakkında günümüze kadar pek çok çalışma mevcuttur. Bu yapılan çalışmalarda FKÜ hastalarının genotip karşılaştırmaları, demografik özellikleri, fenotipik çeşitlilikleri, aldıkları tedaviler ve takip durumları değerlendirilmiştir. Kalıtsal metabolik hastalıkların moleküler patolojilerinin aydınlatılmasındaki esas amaç hastalıklara özgü klinik öngörünün sağlanması ve bu bilgi doğrultusunda hastanın tanı, tedavi ve izlem ile ilgili haritanın en güvenilir biçimde belirlenmesidir. Bununla beraber otozomal resesif hastalıklar için tek gen-tek hastalık kavramı görüşü değişmiştir. Hücre içi proteinlerin rol aldığı yollar arası karmaşık ilişkiler ve birçok epigenetik faktörler aynı genotipe sahip hastaların farklı klinik prezentasyonlara sahip olmasının nedeni olarak ileri sürülmektedir. Büyük popülasyonlu çalışmalar ile hastaların genotip ile demografik ve ayrıntılı fenotipik özelliklerinin bir arada değerlendirilmesi, bu hastaların tanı, tedavi ve izleminde yol gösterici olacak ortak protokollerin belirlenmesine katkıda bulunmaktadır.

Hastalarımızın yarısından fazlasının yenidoğan döneminde başvurduğu (%81,3), bunu %11,6 ile süt çocukluğu döneminin izlediği görüldü. Sadece 1 vaka (%0,9) çocukluk yaş döneminde başvurmuştu.(Tablo 9) Buna göre vakalarımızın 21'i (%18,7) yenidoğan döneminden sonra tanı alan vakalar olup ciddi olarak fenilketonüri komplikasyonları açısından risk grubu oluşturuyorlardı. Geriye dönük dosya incelemesi yapıldığında hastaların başvuru yaşlarının neden ileri dönemde olduğu değerlendirilmesinde, 19 hastanın Ulusal Tarama Programının yaygınlaştırılmasından önce doğduğu belirlendi. Kalan diğer iki hastadan birinin, topuk kanında fenilalanin yüksekliği saptanmasına rağmen 6. ayda metabolizma polikliniğine başvuruyor, diğer hastanın ise topuk kanında fenilalanin yüksekliği saptanmasına rağmen 1,5 yaşında İzmir'e taşındıklarında ilk kez bir metabolizma polikliniğine başvuruyor olduğu gözlemlendi. Topuk kanında yükseklik saptanan ancak metabolizma polikliniğine başvurusu geciken iki fenilketonüri hastasının dışında, diğer 19 hasta, nöromotor gelişim geriliğinin olması (yürüyememe, göz temasının olmaması, konuşamama vb...), nöbet öyküsünün olması, cildinde geçmeyen

kızarıklık ve kaşıntılarının olması nedeni ile poliklinik başvurusu sonrası tanısı konularak metabolizma polikliniğine yönlendirilmiş hastalardır.

Kayıtlardan akrabalık bilgisine ulaşılan 112 vakanın akrabalık derecesine bakılmaksızın yaklaşık yarısında (%51,8) ebeveynler arasında akrabalık olduğu belirlendi.(Tablo 12) Çalışmamızda 1. derece akrabalık oranı ise %33 bulunmuştur. Otozomal resesif hastalıklarda 1. derece akrabalık oranı esas risk faktörü olarak alınmaktadır. Ozalp ve arkadaşlarının 1990 yılında yapılan bir çalışmada aminoasit metabolizma bozukluğuna sahip hastalardaki toplam akrabalık oranı %72 olarak rapor edilmiştir. Fenilketonüri hastalarında ise %45 olarak değerlendirilmiştir (24). 2001 yılında yine Ozalp ve arkadaşlarının Hacettepe Üniversitesi'nde yaptığı bir çalışmada fenilketonüri hastalarında 1. derece kuzen evlilik oranı %45 olarak verilmiştir (72). Buna göre toplam akrabalık oranlarında 1991 yılından sonra çok belirgin düşüklük olmasa da 1. derece akrabalık oranlarında belirgin azalma görülmektedir.

Çalışmamızda 112 hastanın %77'sinde ortalama kan FA düzeyleri 6mg/dL üstünde (kötü kontrollü grup), %23'ünde ise ortalama kan FA düzeyi 6mg/dL altındaydı.(Tablo 14) Fenilketonüri tedavisinde izlemde ideal kan FA düzeyi 6mg/dL kabul edilirken, son yayınlarda bu düzeyin 4mg/dL'ye çekilmesi gerektiği belirtilmiş ve 4-6 mg/dL arasında değişen kan FA düzeylerinin bilişsel fonksiyonları olumsuz etkileme açısından riskli grupta olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmamızda daha rafine bir değerlendirme yapabilmek için ortalama değeri 4-6 mg/dL arası bölge orta riskli bölge kabul edilerek ayrı bir tartışma grubu olarak ele alındı. FA ortalama değeri 4-6 mg/dL aralığında seyreden ise 19 hasta (%17) bulunmaktaydı. Almanya'da yapılan bir çalışmada 10 yaşına kadar değerlendirilen hastaların % 60'ında, İngiltere-Avustralya çalışmasında ise 10 yaşından sonrasında değerlendirilen hastaların %50-80'inde kan FA düzeylerinin istenilen aralıktan yüksek olduğu (>6mg/dL) saptanmıştır (73,74). ABD'de erişkin FKÜ hastalarının %70'ten fazlasının sosyoekonomik düzey düşüklüğünden dolayı tedaviye ulaşımında güçlük yaşadığı görülmüştür (75). Bu verilere göre hastalarımızdaki FA takibinin Batı toplumuna göre tedaviye uyumun daha kötü olduğu değerlendirilmektedir.

Buna göre fenilalaninden kısıtlı diyet verdiğimiz hastalarımızın yarısından fazlasında başarılı olunamadığı görülmektedir (%50,9). Bunun sebebi olarak da

hastaların fenilketonüri uyumu ile ilgili diyet tedavisinin değerlendirilmesinde Dokuz Eylül Üniversitesi'nden hastaların da değerlendirilmiş olduğu Hacettepe Üniversitesi'nin 2013'te yaptığı tez çalışmasında; Pediatrik metabolizma ve beslenme merkezlerinden diğer çalışmaya katılan üniversiteler içerisinde, sadece Dokuz Eylül, tıbbi beslenme tedavisinin temel bileşeni FA'siz aminoasit karışımının temini konusunda ailelerin sorun yaşadıkları belirtilmiş, sorun olarak da ailelerin sosyal güvencelerinin olmaması nedeni ile alamamaları gösterilmiştir. Mamaların tatlarının kötü olması, okul çağı döneminde bireyler, okul, arkadaş, çevre baskısı, mama algısı nedenleri ile FA'siz aminoasit karışımlarının tüketiminde ve FKÜ'de tıbbi beslenme tedavisinin bileşeni olan besin değişimlerine uyum konusunda birey ve ailelerin sorun yaşadıkları belirtilmiştir (76).

Kız hastaların %72,4'ünün kan FA ortanca değerleri özellikle kötü kontrollü grupta bulunduğu gözlenmiştir. Maternal fenilketonüri açısından gebelik boyunca kan FA düzeylerinin 4mg/dL'nin üstünde olması risk olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda 58 kız hastanın 53'ünün (%91,3) ortanca FA düzeyleri 4mg/dL üstünde seyrettiği için ileriki dönemlerde hamilelik söz konusu olduğunda, maternal FKÜ açısından potansiyel riskli grup olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda BH4 yükleme testine 17 vakanın yanıtı olduğu belirlendi. 19'unda (%17,9) sapropterin testine yanıt gözlenmediği için diyet tedavisine geri dönüldü. BH4 yükleme testi ile ilgili literatürde birkaç protokol önerilmiştir. Bunlardan en çok kullanılanı yüksek doz BH4 (genelde 20mg/kg) verildikten 48 saat sonra kan FA düzeyi ile yanıtın değerlendirilmesidir. Bu yöntemin hastalarda uzun süreli BH4 yanıtının değerlendirilmesinde yeterli olduğu rapor edilmiştir (77).

Çalışmamızda FA'den kısıtlı diyet ve BH4 alan hastalar arasında ek klinik bulguların veya hastalıkların eşlik ettiği 38 hasta tespit edilmiştir. Hastalara eşlik eden semptomların ya da hastalıkların olması ile izlemdeki ortanca FA değerlerinin tedaviye uyum yönünden karşılaştırılmasında anlamlı farklılık gözlenmiştir.(p=0,03)(Tablo 17) Bu demektir ki hastanın klasik fenilketonüri hastalığına eşlik eden herhangi bir klinik bulgusunun olması durumu hastanın tedaviye uyumunu zorlaştırmaktadır. Tam tersi de düşünülebilir; hastaların uyumu zorlaştığında hastalarda ek klinik semptomlar ortaya çıkmaktadır. Ek hastalıklar

yönünden ilgili birimlerin takibi klasik fenilketonüri hastalarında uyumun sağlanabilmesi yönünden önemlidir.

Fenilketonüride fenilalanin düzeyi artışının nörokognitif fonksiyonları kötüleştirdiği bilinmektedir. Bu hastalarda 1.7mg/dL'lik artışla zeka puanında 1,3-3,9 arasında azalma olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (78). Zeka puanını ölçen testler açısından 0-6 yaş grubundaki hasta popülasyonuna Denver Gelişimsel Tarama Testi; 6 yaşından büyük popülasyonda ise WISC-R (Wechsler Intelligence Scale for Children – Revised/Wechsler Çocuklar için Zekâ Ölçeği Geliştirilmiş Formu) ile psikometrik değerlendirme yapılmaktadır. Çalışmamızda hastalar takiplerine uygun olarak Çocuk Psikiyatri Anabilim Dalı'na yönlendirilmiş ancak hastaların takip ve tedaviye uyumsuz olmaları nedeni ile, yapılan dosya taramasında sonuçlar eksik olduğu için değerlendirilememiştir. Eksik bilgiler nedeni ile hastaların zeka ölçeği değerleri ile genotip ilişkisi kurulamamıştır. Rasmus ve arkadaşları fenilketonüri mutasyon değerlendirmesi ve zeka ilişkisi için homozigot mutasyona sahip aile değerlendirmesinde üç kardeşten ikisi sadece hafif zeka geriliğine sahipken, diğerinde orta derecede zihinsel gerilik saptamıştır. Bu beklenenden çok daha az şiddetlidir ve PAH genotipi dışındaki faktörlerin zihinsel fenotipi etkilediğini düşündürmektedir. Entelektüel fenotip ve genotip arasında bir korelasyon varsa, aynı genotipli deneklerin aynı fenotipe sahip olması beklenir. Değerlendirilen aile gruplarından c.782G>A/ IVS2+5G>C genotipine sahip olup ancak, oldukça farklı entelektüel fenotiplere sahip oldukları değerlendirilmiştir. Aynı genotipe sahip ilişkisiz üç denekten ikisinde derin zihinsel gerilik görülürken, diğeri sadece orta derecede geriliği vardır olarak değerlendirilmiştir. Entelektüel fenotipin tedavi almamış hastalarda beklenen genotip aktivite ile korele olmadığı görülmüştür (79).

Geriye yönelik dosya taramasında bir hastada fenilketonüri ve diabetes mellitus birlikteliği gözlemlendi. Couce ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yüksek kalorik alımın karbonhidratlardan sağlanması nedeni ile FKÜ'lu çocuklarda ortalama HOMA-IR düzeyinin (ortalama $\pm$ SD: $2,23 \pm 1,51$; medyan: 1,78) genel pediatrik popülasyon için bildirilen değerlerden <7,5 yaş için 0,6 birim, >7,5 için 1,1 birim ve ergenlik çağındakiler içinse 1,4 birim daha yüksek seyrettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle bu hastalarda kan şekeri düzeyleri ve gelişebilecek diabetes mellitus komplikasyonları yönünden takip ve diyet yönetimi çok önemlidir. Yapılan son çalışmalarda, tıbbi

beslenme tedavisinde şeker, nişasta ve yağın serbest olarak tüketilmesi ve düşük proteinli özel tıbbi ürünlerin yüksek enerji içerikleri nedeni ile FKÜ'lu bireylerde artan obezite riskine dikkat çekilmektedir. Bizim hastalarımızda da BMI indeks ortalaması 21 olarak değerlendirildi. 31 hastada (%27,7) obezite tespit edildi (80).

Bir diğer hasta ise talasemi nedeni ile eritrosit transfüzyonu almakta olan 15 yaşında bir çocuktur. Taval ve arkadaşlarının doğumsal metabolik hastalığa sahip hastalarda yaptığı bir çalışmada, kronik hastalık anemisi ve nutrisyonel anemilerinin bu popülasyonda en sık gözlemlendiği görülmüş ancak metabolik bozuklukların kalıtsal sfersitoz veya talasemi ve otoimmun hemolitik anemiler gibi çeşitli konjenital veya edinilmiş anemiler ile ilişkili olabileceğini de göz ardı edilmemesi gerektiğini vurgulamışlardır (81). Özellikle ergenlik ve çocukluk döneminde nutrisyonel anemilerin varlığı, uygun diyet almayan hastaların yakından izlenmesinin önemini gösterir. Literatürde talasemi ve fenilketonüri hastalıklarının birlikte seyrettiği tek vaka bulundu. Karami ve arkadaşlarının vakasında, hasta ilgili bölümlerce takip edilmektedir ve hastaya genetik danışmanlık verilmektedir. Bu tip hastalarda akraba evlilikleri, otozomal resesif ve multifaktöriyel hastalıklar, kromozom kırıkları, poligenik hastalıkların görülme olasılığını arttıracığı için bu hastalarda ileri genetik inceleme yapmak gerekmektedir (82).

Takip edilen hastalar arasında 18 yaş üstünde olup da doğum ile sonlanan gebeliğe sahip hasta mevcut değildir. Çalışmamızda yer alan 12 yaşındaki erkek hasta 6 aylıkken tanı almış olup mikrosefali, yarı damak bulguları ve nöromotor gelişim geriliği izlenmektedir. Bu hastanın klinik bulguları daha çok maternal fenilketonüri tablosunu hatırlatmaktadır fakat retrospektif dosya taramasında annenin geçmişine dair herhangi bir veriye ulaşamamıştır.

Çalışmamızda PAH geni mutasyon analizi sonucu 35 farklı allel tespit edilmiştir. Hastalarımızda en sık görülen ilk 3 mutasyon c.1066-11G>A, (IVS10-11G>A) (%37,3), c.782G>A (R261Q) (%10,9) , ve c.441+5G>T (IVS4+5G>T) (%5,5) idi. (Tablo 18) Saptanan c.1155_1159delCATTinsGATTC, c.30A>T, c.1155_1157delCTAinsGTG çalışmamızda bulunmuş novel mutasyonlardır.

En sık rastlanan genotip IVS10-11G>A/IVS10-11G>A (%31)'tir. İkinci sıklıkta bunu c.782G>A/c.782G>A (%9) genotipi izlemiştir.

FKÜ'ya neden olan en yaygın PAH mutasyonu, özellikle sıklığının FKÜ allellerinin %30'undan fazlasının Türkiye'de bulunduğu IVS10-11G>A'dır. Ayrıca Almanya'da yaşayan Türk kökenli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, benzer bir frekans (%38) elde edilmiştir (83). IVS10-11G>A'nın çeşitli ülkelerde en yaygın FKÜ mutasyonu olduğu da tespit edilmiştir; Güney İtalya'da (% 12,1) (84), Sicilya'da (% 15) (85), İspanya'da (% 13,8) (86) ve Portekiz'de (% 14,6) (87) gibi yüksek bir oranda saptandığı çalışmalarca belirtilmiştir.

Lüleyap ve arkadaşlarının Çukurova Bölgesi'nde yaptığı bir çalışmada 27 hastanın %58,7'sinde yine IVS10-11G>A mutasyonu tespit edilmiştir. Bu tespit edilen allel sıklığının fazlalığı; farklı etnik grupların çokluğu ve göç alınan bölgelerdeki akraba evliliğinin sıklığı nedeniyle açıklanmıştır (88).

IVS10-11G>A mutasyon sıklığının çalışmamızda %37 gibi yüksek bir değere sahip olması hem Türkiye'de en sık görülen mutasyon olması ile hem de İzmir'in İstanbul'dan sonra 2. en sık göç edilen bölge olması (89) nedeni ile açıklanabilir. Çalışmamızda da hastaların %55,4'ünün Ege Bölgesi'nden olup kalan %44,6'sının diğer bölgelerden olması bu durumu desteklemektedir. (Tablo 11)

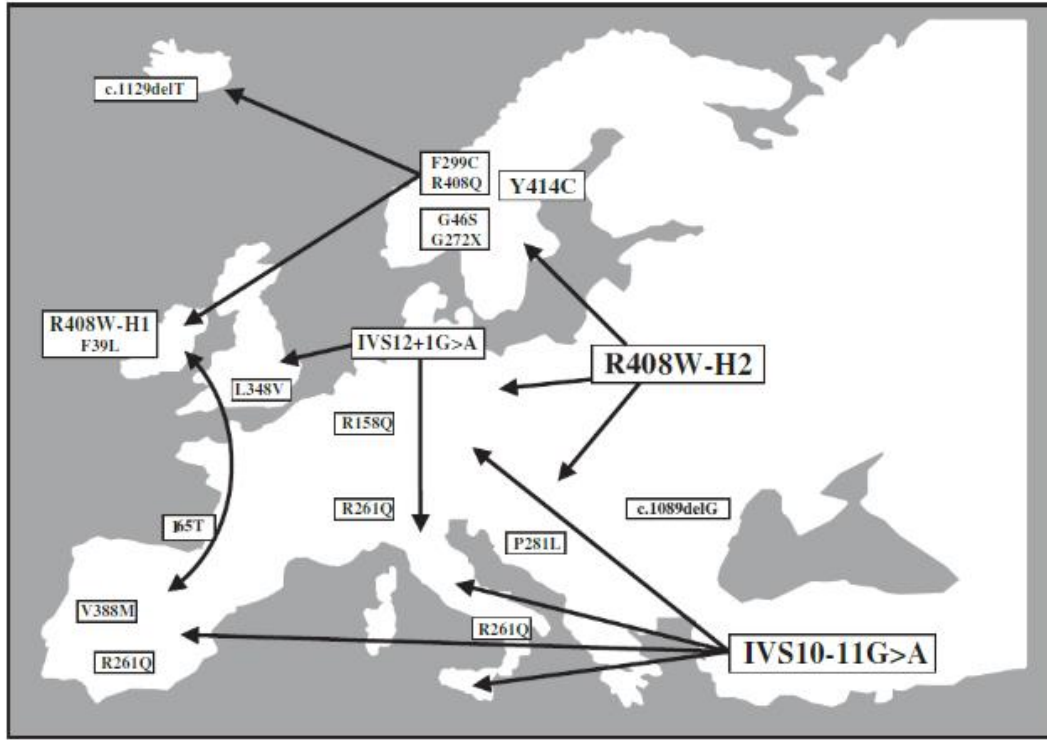
IVS10-11G>A mutasyonu muhtemelen son buzul çağının bitiminden çok önce ortaya çıkan ve farklı alellere ayrılan ve daha sonra erken tarihte Akdeniz'de Neolitik çiftçilerle (MÖ 8.000 tarafından Orta Doğu'da) yayılan eski bir mutasyondur. Ozguc ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PAH geninin heterozigot formu gen mutasyonunun frekansı, daha önceki frekans kayıtlarına bakıldığında %7 gibi bir değere sahip iken(90), çalışmamızda %11 gibi önceki kayıtlardan daha yüksek bulunduğundan bu mutasyonun frekansı artmaya devam ediyor gibi görünmektedir.

İkinci en sık mutasyon olarak c.782G>A (R261Q) mutasyonu bulgumuz, Türk araştırmacılar tarafından ve Alman araştırmacılar tarafından tespit edildiği üzere Almanya'da yaşayan Türk göçmenler arasında Türkiye'de bulunan allelik frekans ile uyumludur. Avrupa nüfusunda %13'lük bir sıklıkta gözlenen bu önemli mutasyon, başka bir ilgi alanıdır (91).

c.782G>A mutasyonu PAH enziminin katalitik alt biriminde meydana gelen bir yanlış anlamlı mutasyondur. Tüm Akdeniz ülkelerinde yaygın mutasyonlar arasında yer alan bu mutasyon ülkemizde de ikinci yaygın mutasyondur. Lüleyap ve

arkadaşlarının Çukurova bölgesinden seçilen 23 hasta ile yaptığı bir çalışmada ikinci en yaygın mutasyon olan c.782G>A mutasyonunun görülme sıklığı % 15,2 olarak bulunmuştur (88). Hacettepe üniversitesi'nde 2019 yılında yapılan bir tez çalışmasında ise %9,5 sıklığa sahip yaygın mutasyonlardan biridir (92). İtalya'da Daniele A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en yaygın mutasyon (%20,2) bulunmuştur (93). Brezilyanın farklı bölgelerinden seçilen hastalarla yapılan çalışmada sıklık %4-16 arasında değişmektedir (94). Ayrıca Portekiz'de % 10, (95) Mısır'da %11,5 (96), Küba'da %15,8 (97) , İspanya'da %10.3 (98), Sırbistan'da %6 (99), Almanya'da yapılan bir çalışmada mutasyonunun Alman hastalarda görülme sıklığının %5,8, Almanya'da yaşayan Türk hastalarda ise %7,7 olduğu bildirilmiştir (34). Çalışmamızda bu mutasyon 10 hastada homozigot, dört hastada heterozigot genotipte gözlenmiştir ve allel sıklığı %10,9'dur.

CpG adacıkları, genel kromozom yapısında alışlagelmemiş yüksek konsantrasyonda 5'- CG-3' dinükleotidi bulundurur. PAH geninin 7. ekzonu da sitozin ve guanin bazlarından zengin olup mutasyona açık bir bölgedir ve bu mutasyonlar tekrarlayan mutasyonlardır. Lüleyap ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada c.782G>A, c.1222C> gibi mutasyonlarının meydana geldiği ekzon 7 ve 12 bölgelerindeki değişikliklerin %68,4'ünü oluşturan arginin aminoasidinin, Çukurova bölgesinde FKÜ hastalarında PAH genindeki aminoasit değişiklikleri için önemli olduğu düşünülmektedir (34). Bu sonuç pahdb internet sitesinde sunulan Türk nüfusu için etnik/köken bölge bulguları ile uyumludur. Çalışmamızda da arginini %58,9 ile en sık görülen aminoasit değişimi olarak ortaya koymaktadır. (66/112) Bulgular Çukurova bölgesi çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur. Türkiye'deki c.782G>A mutasyon sıklığı Avrupa popülasyonlarındakinden daha düşük olmakla birlikte, Türk ve Avrupa popülasyonlarındaki c.782G>A mutasyonu frekans benzerliği coğrafi alandaki gen akışı ile açıklanabilir. (Şekil 10)



Şekil 10. Avrupada'ki yaygın mutasyonlar. Mutasyonların bölgesel dağılımı ve muhtemel kökenleri ile göç yolları rotası(22)

Mutasyon analizi yapılan hastalarda %58,9 PAH geninde homozigot mutasyon bulunurken, %39,2 vakada birleşik heterozigot mutasyon bulundu, 2 vakada ise PAH gen analizinde mutasyon saptanmadı.

Türk popülasyonundaki PAH mutasyonlarının spektrumu diğer ülkelere göre nispeten çeşitlidir. Avrupa'daki FKÜ'nün sistematik bir incelemesi, Avrupa popülasyonlarında yaygın olarak kabul edilebilecek mutasyonları tanımlamıştır, ancak Türkiye'de FKÜ'nün moleküler temeli hakkında çok az rapor bulunmaktadır. Scriver ve arkadaşlarının lokus spesifik veritabanı oluşturmadaki bilginin bize ne yarar sağlayacağını anlattığı bir araştırmada, bileşik heterozigotluk oranı yurtdışı verilerine göre %75 olarak bildirilmiştir (100). Kayaalp ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Türkiye nüfusunda ortalama PAH homozigot genotip prevalansını %25 olarak bulmuşlardır (25).

Dobrowolski ve arkadaşlarının 588 hiperfenilalaninemili Türk popülasyonunda yaptığı bir çalışmada da homozigotluk oranı %48 olarak bulunmuştur ancak çalışmada belirtilen hastaların akrabalık oranı %46'dır (101). Çalışmamızda homozigotluk oranı diğer çalışmalara oranla daha yüksek bulunmuştur

ancak bunun sebebi bizde akraba olan ebeveyn oranının diğer çalışmalara göre daha fazla görülmesi nedeniyle olduğu düşünülebilir. Ayrıca Dobrowolski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada klasik fenilketonüri hastaların yanında tüm fenotipler çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamızda sadece klasik fenilketonürilerdeki genetik çeşitlilik ele alındığı için homozigotluk oranının yüksek bulunması aslında homozigot allelerin daha ciddi klinik fenotipe neden olduğunu gösterebilir. Bileşik heterozigotluk oranının klasik fenilketonüride diğer çalışmalara göre daha az olması ise aslında klinik olarak bileşik heterozigot allelin kuvvetli mutant allelin aktivitesini hafifletebileceğini düşündürür (25).

İsveç'te 1965-2014 arası yenidoğan FKÜ taraması yapılmış hastaların genotip-fenotip karşılaştırılması ile ilgili bir çalışmada hafif fenotiplerin sıklığının giderek arttığı görülmüştür.(102) Ayrıca yenidoğan tarama testleri sayesinde hastaların erken dönemde düşük kan FA düzeylerinde yakalanabilme şansının artması yanında hastaların geçmiş yıllara göre akraba evliliği oranlarının azalması da birleşik heterozigot genotipe sahip vakaların artmasının ve daha hafif vakaların sıklığının artmasının sebebini açıklayabileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan bir incelemede Blau ve arkadaşları, "Çoğu PAH hastasının bileşik heterozigot PAH gen varyantlarına sahip olduğu ve bir mutasyon geçirmiş allelin, ikinci mutasyona uğramış allelin aktivitesini önemli ölçüde etkileyebileceğini ve bunun da biyolojik olarak aktif heterotetramerik formun aktivitesini olumlu veya olumsuz etkileyebileceğini belirtmektedir (103).

Örneğin c.727C>T (R243L) ve c.782G>A (R261Q) mutasyonlarını ele alacak olursak; yapılan çalışmalarda c.727C>T ve c.782G>A mutasyonlarını her iki allelinde taşıyan bireylerin klasik FKÜ fenotipine sahip olduğu görülmüştür. Brezilya'da yapılan diğer bir çalışmada c.782G>A için homozigot olan hastalarda klasik FKÜ fenotipleri ağırlıkta bulunmuştur (104,105,106). Birleşik heterozigot hastalarında ise daha çok hafif FKÜ fenotipi gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumun en önemli sebebi c.782G>A mutasyonunun ve c.727C>T mutasyonunun tek allelde yarattığı olumsuz etkiyi diğer allelde telafi etmesi olarak düşünülmüştür. Çünkü bu hastalıkta allelik heterojenite söz konusudur. Allelik heterojenitenin en önemli sebebi ise fenilalanin hidroksilaz enziminin tetramer olarak işlev görmesidir. Böylece farklı allellerden sentezlenen monomerler enzimin aktivitesine tek başlarına bir etkide

bulunamazlar. Bu nedenle enzim tetramer formuna yani aktif olduğu forma geçtiğinde aktivitesinde fazla bir düşüş gözlenmemektedir.

Her toplumda PAH mutant popülasyonunda önemli ölçüde genetik heterojenite vardır. HFA fenotipi her zaman karşılık gelen PAH genotipiyle tutarlı değildir (24). Örneğin yukarıda bahsettiğimiz c.727C>T (R243L) ve c.782G>A (R261Q) mutasyonlarını heterozigot biçimde taşıyan hastalarda daha hafif bir klinik beklerken çalışmamızda klasik fenilketonüri nedeni ile takip edilmekte olan bir hasta bulunmaktadır. Ayrıca çalışmamızda olup da veritabanına göre klasik fenilketonüri fenotipi ile uyumlu olmayan genotiplerden olan c.1114A>T/IVS10-11G>A, IVS10-11G>A/c.721C>T, c.782G>A/c.1028A>G bileşik heterozigot mutasyonları mevcuttur.

Aslında FKÜ'dan etkilenen bireylerin çoğu, her iki alel üzerinde farklı mutasyonlar taşıyan bileşik heterozigotlardır. Mutasyonların fonksiyonel etkileri hakkında bilgi, olası kalıntı enzim fonksiyonunun tahmin edilmesine izin verir, ancak fenotipi etkileyen hala bilinmeyen faktörler vardır. Birçok çalışma, genotip / fenotip korelasyonlarında tutarsızlıklar olduğunu bildirmiştir. Başlangıçta PAH genotipinin bilinmesinin HFA fenotipini güvenilir bir şekilde tahmin edileceğini ortaya çıkarırken (104,105) şimdi en azından dört nedenden dolayı bunun her zaman böyle olmayacağı görülmektedir. İlk olarak, hem PAH lokusunda mevcut büyük allelik heterojenite kanıtı hem de toplumun heteroallelik olma olasılığının yüksek olması ve bu nedenle fenilalanin hidrosilaz üzerine mutant PAH-enzim alt birimleri arasındaki değişken etkileşimler için karşılık gelen bilinmedik bir potansiyel ve buna karşılık gelen bir etkinin olmasıdır. İkincisi, HFA fenotiplerinde aile içi tutarsızlık olduğuna dair kanıtlar vardır. Örneğin klasik fenilketonüriye sahip bir çocuğun kardeşinde hafif fenilketonüri kliniğinin saptanmasıdır (106,107). Üçüncüsü, biyolojik bireysellik; örneğin bağırsak emiliminde bireyler arası varyasyonlar, diyet fenilalaninin hepatik alımı, sahip oldukları şaperonların ve proteazların aktiviteleri, karaciğerdeki dekarboksilasyon seviyesi, fenilalaninin kan-beyin bariyerinden geçiş hızı, bazal metabolizma hızı nedenleri ile birbirinden farklı olabileceğinden genotipte her ne kadar ciddi bir enzim aktivitesi kaybı yaratan bir mutasyona sahip olsalar da, farklı fenotipik özellikler göstermektedirler (108). Dördüncüsü, bir mutant PAH aleli üzerinde cis (allelik olmayan iki mutasyonun aynı kromozom üzerinde bulunması)

içinde ikinci bir mutasyonun birleştirilmesinin fenotip üzerinde bir etkisi olabildiği yapılan çalışmalarca savunulmuştur (107). Birçok durumda PAH eksikliği olan hastalar, PAH genindeki her iki ebeveynden gelen mutasyonlar ile tanımlanmıştır. Bu gibi durumlarda aile katılımı alınabildiği zaman, mutasyonlar arasındaki cis / trans ilişkisini belirlemek için soyağacı çalışmalarının gerçekleştirilmesi adına ebeveynlerden ve diğer birinci derece akrabalarından kan örnekleri alınması gerekmektedir. Türk FKÜ hastalarının benzersiz bir genotipik özelliği cis bileşiği mutasyonlarının sayısıdır. Türk hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada c.464G>A mutasyonu, birkaç hastada c.898G>T cis'te tanımlandı. Daha önce bildirilmiş bir hastanın yeniden değerlendirilmesinden sonra c.464G>A 'nin c.428A>G ile cis içinde olduğu bulundu. Daha önce c.464G>A'nın PAH enziminin özellikleri üzerinde minimum etkisi olan hafif bir mutasyon olduğu belirlenmişti; ancak çalışmanın sonucu olarak, aynı polipeptit zincirindeki iki missense değişikliğinin birleşik etkisi, enzimi her iki mutasyondan da ayrı ayrı daha fazla etkileyebildiğini ortaya koymuştur (100).

Enzimatik aktivitesi %3'ün altında olan mutasyonlar, delesyon mutasyonları ve anlamsız mutasyonlar; null mutasyonlar olarak tanımlanmıştır. Splice bölge mutasyonları da null mutasyonlar olarak tanımlansa da bazen az da olsa doğal tip enzimatik aktiviteye sahip olabilirler bu nedenle bunlar varsayılan null olarak da sınıflandırılabilirler (62). Çalışmamızda ise IVS10-11G>A, IVS4+5G>T, c.842C>T, c.331C>T, c.754C>T, c.1222C>T, c.781C>T, IVS6-2A>G, c.727C>T, c.664_665delGA, c.1089delG, c.592_613del, c.47_48delCT, IVS6-2A>G IVS7+6T>C IVS4+1G>C IVS2-13T>G IVS2+5G>C allelleri null olarak değerlendirmeye alınmıştır. Bunların oluşturduğu genotipler kendi içinde değerlendirildiğinde hastaların %80'inde null/null mutasyonların bulunduğu gözlenmiştir. Geriye kalan mutasyonlar ise null/null olmayan ya da null olmayan/null olmayan mutasyonlar oluşturmaktadır. Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada spesifik verilerin girdisi ile elde ettikleri veritabanında bu hastanın hangi fenotipte olduğunu gösterecek bir yazılım oluşturmuşlardır. Bunun sonucuna göre ise en tahmin edilebilir olanı %89 oranına sahip olan null/null mutasyonu olmuştur (62). Bu mutasyonların büyük oranda klasik fenilketonuri ile uyumlu olduğu ortaya

çıkıştır. Çalışmamızda da görüldüğü üzere %80 gibi benzer bir oranla bu çalışmayı desteklemektedir.

Allelik mutasyonlar kendi içinde değerlendirildiğinde splice bölge mutasyonları oranı %50 oranında en sık gözlenen mutasyon çeşidi olarak değerlendirildi (Tablo 22). Bileşik heterozigotlar kendi aralarında mutasyon çeşitlerine göre sınıflandırılacak olursa 14 hasta ile en sık yanlış anlamlı/splice bölge mutasyonu kombinasyonu görülmektedir (%31,8). Sonrasında 9 hasta ile yanlış anlamlı/delesyon genotipi kombinasyonu görülmektedir. (Tablo 23)

Fenilalanin hidroksilaz allellerinin %60'ından fazlasında yanlış anlamlı mutasyonlar saptanmıştır. Yurtdışı verilerinin aksine Türk toplumunda ve tabii ki çalışmamızda splice bölge mutasyonlarının yanlış anlamlı mutasyonlardan daha sık görülmesinin sebebi IVS10-11G>A mutasyon sıklığının fazla olması nedeni ile olduğu düşünülebilir.

Mutasyonun doğası ya da mutasyonun PAH geni üzerinde oluşturabileceği etkileri bilmek bazı vakalarda enzim aktivitesini öngörmeye kolaylık sağlamaktadır. Anlamsız mutasyonlar, büyük delesyonlar, splice bölge mutasyonları, PAH'ın regülatuar veya oligomerizasyon alanlarındaki mutasyonlardan daha ciddi fenotiplere neden olduğu savunulmaktadır (62).

Hacettepe Üniversitesi'nde 2019'da yapılan bir tez çalışmasında klasik FKÜ olan hastaların mutasyon profillerinde delesyonlar en büyük grubu oluşturuyordu (92). Buna karşılık tedavi gerektirmeyen serbest diyet alan ya da hafif HFA fenotipinde olan hastaların tamamına yakınında yanlış anlamlı mutasyonlar bulunmaktaydı. (sırasıyla %98,4 ve %94,6) Genotip olarak anlamsız homozigot ve anlamsız/delesyon genotiplerinin tamamı kan FA düzeyi 15mg/dL üzerinde olan gruplarda (orta ve klasik FKÜ) bulunuyordu, buna karşın yanlış anlamlı mutasyon içeren birleşik heterozigot genotipler daha hafif fenotiplerde daha sık görülüyordu. Buna göre delesyon veya anlamsız mutasyonların fenotipi kötüleştirdiği, yanlış anlamlı mutasyonların ise daha hafif fenotipe yol açtığı öngörülebilir şeklinde yorumlanmıştır. İran'da 2018'de yapılan bir çalışmada, benzer şekilde delesyon ve anlamsız mutasyonları olan hastaların başvuru kan FA düzeylerinin yanlış anlamlı mutasyonu olan hastalardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu

verilere göre yanlış anlamlı mutasyonların ağır klinikleri daha hafif hale getirdiği de söylenebilir (109).

Genotip-fenotip ilişkilerini ve tutarsızlıklarını anlamının anahtarı FKÜ hastalık mekanizmalarının anlaşılmasıdır: katalitik alan içindeki gen varyantları PAH enzim fonksiyonunu doğrudan ortadan kaldırabilirken, splice bölge varyantları fonksiyonel olmayan kesilmiş bir proteine neden olabilir. Yanlış anlamlı varyantların esas olarak protein stabilitesini ve oligomer bağlanmasını bozan proteinin yanlış katlanması ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Yanlış katlanmış proteinlerin prokaryot konakçılarda biriktiği ve azalmış PAH aktivitesine yol açan hücresel modellerde bozulduğu gözlemlendi. Metabolik ve klinik fenotipi tahmin etmek için mutant PAH protein katlanması, stabilitesi ve fonksiyonunu analiz eden çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir.

Bu 35 farklı allelik mutasyondan 19 tanesi katalitik alt bölgeyi (n=83, %37), 4 tanesi regulatuar bölgeyi (n=21, %9,5), 1 tanesi de oligomerizasyon bölgesini (n=1, %1,8) etkiler. Geriye kalanlar ise 11 farklı allelik mutasyon olan splice bölge mutasyonlarıydı. (n=110, %52).

Genotipler kendi içinde değerlendirildiğinde ise etkiledikleri enzimatik bölgeye göre; splice/splice (n=45, %40), katalitik/katalitik (n=29, %26), katalitik/splice (n=14, %12,5), katalitik/regulatuar (n=11, %9,8), regulatuar/regulatuar (n=3, %2,7), splice/regulatuar (n=2, %1,8), regulatuar/tetramerizasyon (n=1, %0,9) olarak ayrılmaktadır.

Splice/splice bölge mutasyonlarının ya da katalitik/katalitik bölge mutasyonlarının oranının diğer mutasyonlara göre yüksek saptanmış olması (%40, %26) Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir. Özellikle bu enzim alt bölge mutasyonları klasik fenilketonüri fenotipinde olan hastalarda daha yüksek oranlarda saptanmaktadır. Bu da bize FKÜ mutasyon mekanizmasını anlamamızın, fenotipi öngörmedeki önemini vurgulamaktadır (62).

Çalışmamızda dış merkez tarafından tanı almış olup sonrasında bize yönlendirilen hastalar olduğundan dolayı çoğu hastanın ilk fenilalanin düzeyi bilgisi dosyalarda bulunmamaktadır. Özellikle tanı anındaki fenilalanin düzeylerinin PAH enzim aktivitesi ile ilişkili olarak negatif korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından birisi de aslında bireysel faktörlerin eşitlenememesi ve

bu faktörlerin de kan fenilalanin düzeyleri üzerinde en az genotip kadar etkili olduğudur. Ancak izlemdeki kan fenilalanin ortanca düzeyleri bize bu hastaların; enzimatik aktivitesi, metabolik kontrol düzeyleri, genotipin ciddiyeti ve tüm bunlardan yola çıkarak ileride denenecek BH4 yanıtı üzerinde fikir edinmemizi biraz da olsa sağlayabilmektedir.

Hastaların izleminde kan FA düzeylerinin ortanca değerleri (median) hesaplanarak, hastalar; ortanca kan FA düzeylerine göre, kötü kontrol (ortanca kan FA >6mg/dL), iyi kontrol (ortanca kan FA düzeyi < 4mg/dL) ve riskli bölge (ortanca kan FA düzeyi 4-6mg/dL) olarak sınıflandırıldı.(Tablo 14) Hastaların tedaviye uyumu ise; kan FA ortanca değerleri 2-6 mg/dL arasında olan hastalar diyetle uyumlu, kan FA ortanca düzeyi 6 mg/dL'nin üzerinde olanlar ise diyetle uyumsuz şeklinde iki gruba ayrılarak değerlendirildi. İyi kontrollü grupta (ortanca FA<4mg/dL) olan 6 hastada tespit edilen genotipler arasında sıklığı en fazla bulunan alleller c.782G>A ve c.143T>C olarak tespit edilmiştir. Bu mutasyonların enzim aktivitelerinin %40'ın üzerinde olması tedaviye uyumun olması halinde bu hastaların seyrinin olumlu yönde olacağının göstergesidir. IVS4+1G>C alleleline sahip hastaların hepsinin ortanca FA değeri 6 mg/dL'nin altında izlenmiştir. Çoğu splice bölge mutasyonları null mutasyon olmasına rağmen bir kısmı hala doğal tip enzim üretimine az da olsa devam etmektedir. Bu tip mutasyonlara varsayılan null mutasyonlar denilebilir. Bu hastaların göreceli olarak FA düzeylerinin daha ılımlı seyretmesi olasıdır.

c.782G>A/c.782G>A homozigot genotipinin kan fenilalanin ortanca düzeyi <4 mg/dL altında olan bölgede yer alması ama bu bölgede hiç bileşik heterozigot mutasyona sahip genotipin bulunmaması daha önceden de açıklanan negatif allelik komplementasyon ile açıklanabilir. Tek başına c.782G>A enzimatik aktivitesi %40 iken bileşik heterozigot durumunda diğer allelin enzimatik aktivitesini baskılamaktadır.

Bu grupta sadece bir hastanın genotipi IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C (splice/splice) olarak değerlendirilmiştir ama diğer hastaların genotiplerini oluşturan allellerden en az bir tanesinin enzimatik aktivitesi %3'ün üzerindedir. IVS10-11G>A/ IVS4+1G>C genotipini taşıyan iki kardeşin de kan fenilalanin ortanca değerleri 6 mg/dL'nin altında seyretmekteydi ancak bu durum bu hastaların

enzimatik aktiviteye sahip olması gerektiği anlamı taşımamalıdır. Örneğin bu iki kardeşe de BH4 denenmiş ancak yanıt alınamamıştır. Çünkü iyi bir diyet ve tedaviye uyum ile hastaların fenilalanin düzeyleri enzimatik aktiviteye sahip olmasalar bile kontrol altına alınabilir demektir.

Örneğin c.638T>C/c.638T>C genotipine sahip hastalardan birinin kan ortanca FA değeri 15-20 mg/dL aralığında seyrederken diğerinin 4-6mg/dL aralığında izlenmiştir. Hastalardan kan FA ortanca düzeyi düşük seyredeninin tedavi takiplerine düzgün olarak geldiği ve diyetinde kaçak yapmadığı gözlemlenmişken, diğer hastanın ise diyetinde kaçaklar yaptığı ve takip günlerine istenilen vakitlerde gelmediği tespit edildi. Aslında genetik faktörlerin yanında hastanın tedaviye uyumunu belirlemede çevresel faktörlerin de bu hastalarda tedavi ve takipte ne kadar belirleyici olduğunu söylemek mümkündür.

c.727C>T alleli de genel popülasyonda sık görülmesine rağmen iyi kontrollü seyreden grupta, ortanca FA düzeyi 4-6 mg/dL aralığında seyreden bölgede sadece 1 allel örneği saptanmıştır. Geriye kalan alleller kötü kontrollü grupta seyreden hastalarda rastlanmıştır.

19 hastadan 8'ini bileşik heterozigot mutasyona sahip genotipler oluşturmaktaydı. Homozigot mutasyonların sıklığı ise bu grupta daha fazla izlenmektedir (%58,8). Allel sıklıkları incelenen hastaların, özellikle mutasyon çeşitleri açısından dikkate alındığında, splice bölge mutasyon sıklığı genel popülasyonda daha fazla olmasına rağmen ortanca FA düzeylerinin 4-6 mg/dL aralığında seyrettiği hastalarda; missense mutasyona sahip alleller bu grubun %50 sini oluşturmaktaydı.

Ortanca FA düzeyi 6 mg/dL'nin altında olan hastaların genotiplendirmesinde sadece bir allelde anlamsız mutasyon saptandı.

Veritabanında klasik fenilketonüri fenotipi ile uyumlu görülmeyen c.1223G>A/c.1223G>A ve IVS10- 11G>A/c.721C>T, c.782G>A/c.1028A>G genotiplerinin ortanca FA düzeyi iyi kontrollü grupta seyretmektedir. Bu hastaların göreceli olarak enzim aktivitelerinin diğer allellerden yüksek olması sebebi ile bu grupta seyrettiği kabul edilebilir.

6 mg/dL'nin altında seyreden hastaların genotipleri incelendiğinde, c.1223G>A, c.721C>T, c.722G>A enzimatik aktivite yüzdesi, diğer mutasyonlara

göre yüksek olan nükleotid değişimleridir. Bu hastaların ortanca FA değerleri düşük seyreden genotiplere sahip olmaları dikkat çekmektedir.

FA ortanca düzeyleri 6-10 mg/dL aralığında seyreden hastaların allel sıklıkları analiz edildiğinde özellikle enzimatik aktivitesi yüksek olan c.143T>C mutasyonunun enzimatik aktivitesi neredeyse hiç olmayan c.1222C>T ya da IVS10-11G>A mutasyonları ile bileşik heterozigot mutasyonu sonucu oluşan genotiplerin kötü kontrollü bölgede seyretmesi klinik anlamda dikkat çekmektedir.

Türk toplumunda en sık gözlenen allel olan IVS10-11G>A allelinin ortanca FA düzeyinin 10 mg/dL'nin üzerinde seyreden grupta, çalışmamızdaki IVS10-11G>A allel sayısının %59,8'i gibi en büyük kısmını oluşturmaktadır. Bunu c.782G>A 2. sırada takip etmektedir. Bu alleller ortanca kan FA düzeylerine göre ayrılan her grupta da görülmesine rağmen, kötü kontrol olan gruplardaki görülme oranlarının diğer gruplara göre belirgin şekilde yüksek olduğu görülmüştür. 6 mg/dL 'nin üzerinde seyreden değerlerde santral sinir sistemi etkilenimi gibi önemli komplikasyonların meydana geldiği klasik fenilketonüride bu oranda sık görülen allellerin 10 mg/dL'nin üzerinde seyreden ortanca FA seviyesine sahip olması popülasyonun büyük bir kısmı için risk oluşturmaktadır.

c.331C>T anlamsız mutasyonuna sahip hastaların en düşük kan FA ortanca düzeyine sahip olduğu aralık 10-20 mg/dL aralığıdır.

c.638T>C/c.638T>C genotipine sahip hastalardan birinin kan ortanca FA değeri 15-20 mg/dL aralığında seyrederken diğerinin 4-6mg dl aralığında izlenmiştir. Hastalardan kan FA ortanca düzeyi düşük seyredeninin tedavi takiplerine düzgün olarak geldiği ve diyetinde kaçak yapmadığı gözlemlenmişken, diğer hastanın ise diyetinde kaçaklar yaptığı ve takip günlerine istenilen vakitlerde gelmediği tespit edildi. Aslında genetik faktörlerin yanında hastanın tedaviye uyumunu belirlemede çevresel faktörlerin de bu hastalarda tedavi ve takipte ne kadar belirleyici olduğunu söylemek mümkündür.

Veritabanında fenotipi klasik fenilketonüri ile uyumlu görülmeyen c.1114A>T/IVS10-11G>A genotipinin kan FA ortanca düzeyi 20 mg/dL'nin üzerinde seyretmektedir. c.331C>T alleleline sahip hastaların sıklığı en fazla bu grupta izlenmiştir. Bu allele sahip olan hastaların kan FA ortanca değeri bir önceki grupta belirttiğimiz gibi yüksek seyretmektedir.

Genotipler kendi aralarında birleşik heterozigot ve homozigot mutasyonlar yönünden iki grupta incelendiğinde hastaların ortanca kan FA düzeylerinin iyi kontrollü ya da kötü kontrollü gruptaki sıklıkları yönünden her iki grupta da homozigot mutasyonların sıklığı daha fazla saptanmıştır ancak istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,05$)(Tablo 31)

Eğer hastaların kan FA ortanca düzeylerini iyi kontrollü (<6 mg/dL) ve kötü kontrollü (>6 mg/dL) olacak şekilde ikiye ayırıp bu bölgede izlenen allelik mutasyonları inceleyecek olursak; delesyon, çerçeve kayması ve 5' UTR mutasyonlarının frekanslarının düşük olması nedeni ile bu mutasyonları dışlayıp, yanlış anlamlı mutasyonlar, anlamsız mutasyonlar ve splice bölge mutasyonlarını kendi içinde karşılaştırsak, yanlış anlamlı mutasyona sahip allelerin, 6 mg/dL'nin altındaki hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve anlamsız mutasyonlar ile splice bölge mutasyonlarının ise 6 mg/dL'nin üzerindeki hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. ($p=0,016$) Buna göre splice bölge mutasyonlarının veya anlamsız mutasyonların kliniğe yansımalarının daha ağır olduğu, yanlış anlamlı mutasyonların ise daha hafif kliniklere yol açtığı ile ilgili yapılan çalışmaları destekler nitelikte olduğumuzu söyleyebiliriz.(Tablo 28)

Çalışmamızda 112 hastanın tedavi tipleri değerlendirildi. 112 hastadan 73'ü (%65,2) sadece FA'den kısıtlı diyet tedavisi almaktaydı. 22 vaka (%19,6) FA'den kısıtlı diyet tedavisi ile birlikte LNAA tedavisi alıyordu, 17 vaka (%15,2) diyet tedavisine ek olarak BH4 tedavisi almaktaydı. (Tablo 16)

Fenilalaninden kısıtlı diyet alan hastaların allelleri incelendiğinde en fazla sayıda IVS10-11G>A (%32,4) olduğu görüldü. Bu alleli %9,1 oranla c.782G>A allelinin izlediği saptandı. c.727C>T, c.143T>C, c.638T>C, c.842C>T, sıklığı diğer tedavilere oranla fenilalaninden kısıtlı diyet alanlarda daha fazla görülmüştür. Bu hastalardan BH4 yükleme testi sonrası yanıt alınamadığından sadece fenilalanin kısıtlı diyet ile takip edilememektedir. (Tablo 33)

c.30a>t novel mutasyonuna sahip kardeşlerden, tedavi ve takiplerine uyumu olmayan hasta fenilalaninden kısıtlı diyet almaktaydı. Tedaviye uyumu olan kardeşin BH4 tedavisine yanıtı var iken, uyumu olmayan hastanın ortanca FA değerlerinin yüksek seyretmesi nedeni ile kendisine BH4 testi yapılamadı.

Diyet tedavisi alan hastalarda en sık görülen genotip dağılımı IVS10-11G>A/IVS10-11G>A olmuştur. (%32,5) Diyet tedavisi ile beraber LNAA tedavisi alan hastalarda . IVS10-11G>A/IVS10-11G>A en sık görülen genotip dağılımıdır. (%36,3) BH4 tedavisi alan hastalar incelendiğinde c.782G>A/ c.782G>A en sık görülen genotip dağılımlarındandı. Bu mutasyonu oluşturan allellerin tek başına enzimatik aktivitesi %44'tür. IVS10-11G>A/IVS10-11G>A allelinin enzimatik aktivitesi düşük olmasına rağmen bu grupta da allel sıklığının yüksek olması dikkat çekmektedir.

Hem BH4 tedavisi hem de diğer tedavilerden alan 3 genotip bulundu. Bu genotipler IVS4+5G>T/IVS4+5G>T, c.782G>A/c.782G>A, IVS10-11G>A/IVS10-11G>A olarak görüldü. (Tablo 42)

Hastalar almakta oldukları tedavi tipleri ile mutasyon tiplerine göre karşılaştırıldığında fenilalaninden kısıtlı diyet ile izlenen grupta splice bölge mutasyonlarının çoğunlukta olduğu görüldü.

Fenilalaninden kısıtlı diyet alan hastalar ile BH4 yanıtı hastaların genotipleri karşılaştırıldığında BH4 tedavisi alan hastaların allelik frekanslarının düşük olması nedeni ile ortak genotipler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$); ancak ortak olmayan genotipler açısından sayısal olarak yorumda bulunmak mümkün olmuştur.

Fenilalanin kısıtlı diyet tedavisi almakta olanlarda splice bölge mutasyonları olduğu kadar ($n=13$) yanlış anlamlı mutasyonlar ($n=12$) da aynı oranda mevcuttur. BH4 tedavisi alan hastalardan sadece bir tane yanlış anlamlı/anlamsız mutasyona sahip hasta bu grupta izlenmiştir. Onun haricinde hiç anlamsız mutasyona rastlanmamıştır. (Tablo 39)

Fenilalaninden kısıtlı diyet alan hastalar ile BH4 kullanan hastaların allelleri arasında yapılan karşılaştırmada 5 ortak allel saptanmıştır. (IVS4+1G>C, c.47_48delCT, IVS10-11G>A, IVS6-2A>G, c.30A>T) Allellerin sıklık yönünden karşılaştırılmasında, BH4 yanıtı olan hastalarda en sık c.782G>A alleleline saptanmıştır. Bu mutasyonda BH4 denenmiş olup da yanıt alınamayan bulunmamaktadır.

Toplamda 5 tane delesyon mutasyonu saptanan allellerde BH4 yanıtı açısından karşılaştırıldığında sadece 1 hastada yanıt alınamamıştır.

En sık rastlanan IVS10-11G>A mutasyonunda BH4 yanıtı 15 allel bulunurken BH4 yanıtı 7 allel bulunmaktadır. Bunlar heterozigotluk ya da homozigotluk açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Yani IVS10-11G>A tek başına ya da başka mutasyonlarla birlikte BH4 yanıtına etkiyi artırmada ya da azaltmada etkili olduğu yönünden anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Hastaları allelik mutasyonların etkiledikleri enzimatik alt bölge ve tedavi tiplerine göre ayıracak olursak özellikle katalitik/katalitik alt bölge (n=7, %41,2) BH4 tedavisi alanların en büyük kısmını oluşturmaktaydı. Bunu splice/splice bölge mutasyonları 2. sırada izlemekteydi (n=6, %35,5) Splice/splice bölge mutasyonları fenilalanin kısıtlı diyet/ fenilalanin kısıtlı diyet + LNAA tedavisi alanların ise büyük kısmını oluşturmaktaydı (n=39, %80). BH4 tedavisi denenip de yanıt alınamayan genotiplerden etkilediği enzimatik alt bölgeye göre değerlendirecek olursak hastaların %40'ının (n=8) splice/splice bölge mutasyonu olduğu izlendi. %30'unu (n=6) ise katalitik/katalitik bölge mutasyonları oluşturmaktaydı.

Sadece FA'den kısıtlı diyet tedavisi alan 73 hasta içinde 3 vakaya BH4 testi denenmek istenmiş ancak tedaviye uyumları olmamıştır, kendi istekleri ile fenilalanin kısıtlı diyetle devam etmek istediklerini söylemişlerdir. Çalışmada BH4 yükleme testi ile 112 hastadan 17 (%15,2) vakada BH4 yanıtı görülmüştür. Vakaların 19'unda (%17,9) BH4 denenmiş ancak yanıt gözlenmediği için diyet tedavisine geri dönmüştür.

BH4 tedavisi alan hastaların genotip dağılımında c.782G>A/c.782G>A sıklığı en fazla gözlenen genotiplerden birisidir. Allelerin sıklık yönünden karşılaştırılmasında da, BH4 yanıtı olan hastalarda en sık c.782G>A alleleline rastlanmıştır. Bu mutasyonda BH4 denenmiş olup da yanıt alınamayan bulunmamaktadır. (n=6) Bu allelik mutasyon tek başına değerlendirildiğinde enzimatik aktivitesi %44'tür. Türkiye'de yapılan bir çalışmada bu mutasyona sahip bireylerde kısmi BH4 yanıtı olduğu bildirilmiştir (110). Ancak dikkat çekmesi gereken bir konu da bu hastalardaki BH4 yanıtının öngörülebilirliğini etkileyen negatif allelik komplementasyondur. Heterozigot olma durumunda yanındaki allelin enzimatik aktivitesini düşürdüğü bilinen c.782G>A mutasyonu çoğu çalışmaya bu nedenle konu olmuştur. Çalışmamızda ise BH4 tedavisi alan ya da BH4 tedavisi

denenmiş ancak yanıt alınamamış heterozigot mutasyona sahip ve c.782G>A allelini içeren bir genotip bulunmamaktadır. Ancak Blau N'nin yaptığı bir çalışmada c.782G>A homozigot mutasyonu için BH4 yanıtı %100'e yakın bulunmuşken, c.194T>C ile birlikte olması durumunda BH4 yanıtı yaklaşık %30'lara kadar düşmüş olarak gözlenmiştir. Negatif allelik komplementasyona örnek olabilecek bir diğer mutasyon ise c.1162G>A olduğu bilinilmektedir. Çalışmamızda bir hasta bu mutasyona sahiptir ve bu hastada BH4 yanıtı denendiğinde hastadan tedaviye yanıt alınmıştır. Bu durum daha çok Wettstein ve arkadaşlarının da belirttiği gibi aslında BH4 yanıtınlığını öngörmemizi ve belli bir kurallar çerçevesine sığdırmaya çalışmamızı sınırlamaktadır.

IVS10-11G>A/IVS10-11G>A mutasyonu da BH4 tedavisi alanlarda en sık gözlenen genotiplerden birisiydi. Genotipi null/null mutasyon oluşturuyor olmasına rağmen bu grupta da allel sıklığının yüksek olması dikkat çekmektedir. Bizim çalışmamızın aksine Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan bir tez çalışmasında (92) fenilalaninden kısıtlı diyet ile BH4 tedavisi alan hastaları genotip yönünden incelediğinde IVS10-11G>A/IVS10-11G>A genotipi sadece fenilalaninde kısıtlı diyet alan hastalarda bulunmuştur. Akdeniz ülkelerinde sık görülen ağır bir mutasyon olup zayıf BH4 yanıtı saptanmış allel olarak Türkiye'deki en sık rastlanan FKÜ mutasyonlarından olan bu genotipin (111,112) homozigot olması durumunda protein kısıtlı diyetle bağımlı bir tabloya yol açabileceğini öngörmüşlerdir. Çalışmamızda ayrıca IVS10-11G>A allelik mutasyonunun bulunduğu birleşik heterozigot genotiplerinden bazılarının BH4 yanıtı hastalarda da gözlemlendiği bulunmuştur ve sık rastlanan IVS10-11G>A mutasyonunda BH4 yanıtı 15 allel bulunurken BH4 yanıtı 7 allel görülmektedir. Bunlar heterozigotluk ya da homozigotluk açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yani IVS10-11G>A'nın tek başına ya da başka mutasyonlarla birlikte BH4 yanıtına etkiyi artırmada ya da azaltmada etkili olduğu yönünden bir farklılık gözlenmemiştir. Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IVS10-11G>A mutasyonuna sahip genotipi olan hastaları çalışma dışına çıkardıklarında, BH4 yanıtının öngörülebilirlik yüzdesinin doğruluk payının arttığı görülmüştür. Bu da sık görülen bir null mutasyon olması ve yanındaki allelin enzimatik aktivitesine göre yanıt yüzdelерinin değişebileceği şeklinde yorumlanabilir (62).

Türkiye’de yapılmış en kapsamlı BH4 yanıt çalışması tüm fenotipleri içeren 462 kişilik hasta grubunda gerçekleştirilmiştir. Allelik veriler, hastaların %62,7’sinin BH4 tedavisine potansiyel yanıt verdiğini belirtmiştir (101). Özellikle Türkiye’de yaygın görülen 10 mutasyon üzerinden yola çıkarak BH4 yanıtılık tablosu oluşturmak amaçlanmıştır. Elde edilen verilere göre daha önceki bazı çalışmaların aksine (114), bu çalışmada % 20 PAH aktivitesi olan bazı mutasyonların (örn. c.473G>A) BH4’e duyarlı olarak sınıflandırılmaması gerektiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da bu alleli taşıyan bir hastada BH4 yanıtı alınamamıştır. Alternatif olarak, bazı splice bölge varyantları, özellikle IVS10-3C>T, BH4’e yanıt ile açıkça ilişkili olarak değerlendirilmiştir. BH4’e yanıt veren mutasyonun tamamen enzim aktivitesini sonlandırmaması ve genin, bazı doğal tip PAH-mRNA mesajı dahil olmak üzere birden fazla mRNA üretmesi mümkündür. Bu hipotez, Dobrowolski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da olduğu gibi bizim kohortumuzdaki bir hastada da IVS10-3C>T için homozigot olan BH4 yanıt verebilirliğini açıklayacaktır.

588 Türk HFA’lı hasta ile yapılan çalışmanın haricinde, 20 Türk PKU hastası (4 hafif HPA, 16 hafif ila orta PKU, klasik PKU yok) arasında BH4 tedavisi üzerine yanıt veren hastaların prevalansının % 45 olduğunu tahmin eden tek bir rapor bulunmaktadır (101). Yazarlar, küçük bir örneklem popülasyonu ve bileşik heterozigot genotipler nedeniyle BH4 yanıtının sadece genotipe dayalı olarak tahmin edilmesinin zor olduğu sonucuna varmıştır. Bizde de tek bir fenotip çeşidi için BH4 yanıtı takip edilen 19 hasta bulunmaktadır. Genel popülasyondaki farklı fenotiplerin de çalışmaya dahil edilmesi ve daha büyük bir çalışma grubundan toplum yansıması elde etmek ile daha iyi sonuçlar elde etmek mümkündür.

Ayrıca etkilediği enzimatik bölge yönünden değerlendirildiğinde ise splice/splice bölge mutasyonları (n=39, %34) fenilalaninden kısıtlı diyet alanlarda ve LNAA alanlarda en sık görülmüştür. Katalitik/katalitik alt bölge mutasyonları ise BH4 yanıtı olan hastalarda en fazla görülen mutasyonlardır (n=7, %6,3). Yapılan çalışmalarda klinik olarak klasik fenilketonüri ile uyumlu fenotip yönünden, BH4 yanıtı en düşük tespit edilen mutasyonlar splice/splice, katalitik/splice bölge mutasyonları olmuştur. Tetramerizasyon bölgesi ve regülatuar bölge mutasyonlarının fenotipik olarak daha hafif seyretmesinin yanında bu hastalarda BH4 yanıtı diğerlerine göre daha yüksek izlenmiştir. Hatta içinde tetramerizasyon bölge

mutasyonları barındıran tipler en ılımlısı olarak kabul edilmiştir. Ancak çalışmamızda bir hastada tetramerizasyon bölge mutasyonu bulunmaktadır ve hasta fenilalanin kısıtlı diyet almaktadır çünkü bu hastaya BH4 tedavisi denenmek istenmiştir ama hastada uyum sağlanmamıştır.

Fenotipi belirlemede olduğu gibi BH4'e yanıtı öngörmede de en iyi belirteçlerin APV ve% PAH olduğu belirtilmiştir. Wettstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hastaların %71'inde BH4 yanıtı doğru tahmin edilmiştir (62).

Bazı yanlış bilgiler ise hala klinik öngörülerini engellemektedir. Örneğin bazı missense mutasyonlarının aslında splice bölge mutasyonları olduğu fark edilmiş ve daha kötü fenotipleri indüklediğinin farkında varılmıştır. Varsayılan yanlış anlamalı p.Y204C mutasyonunun gerçekte bir splice bölge mutasyonu olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur ve buna göre adlandırılması değiştirilmiştir (113). Bu gerçek, bazı hastalarda gözlenen eksik genotip-fenotip korelasyonunun bazılarını açıklayabilir ve çok sayıda hastalığa neden olan mutasyonun yeniden incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca klasik fenilketonüri nedeni ile takip edilen PAH geni mutasyon analizi sonuçlanamamış iki hastada mutasyonların tespit edilememesinin sebebi; yeni nesil sekanslama cihazının muhtemel büyük delesyonları/duplikasyonları gösterememesi ya da alınan materyaldeki düşük okuma kalitesi nedeni ile olabileceği yönünde değerlendirilmiştir. Ciddi mutasyona sahip hastaların teknik problemler nedeni ile mutasyon tiplerinin belirlenemiyor olması da hastaların klinik öngörüsünü engellemektedir.

Genotip-fenotip ilişkisinin, BH4 yanıtlılığını ölçmenin ve yanlış öngörülerini engellemenin birincil kaynağı, FKÜ hastalarında karaciğer iğne biyopsisi artık geçerli olmadığından, mutant PAH proteinlerinin in vitro değerlendirilmesi, rezidüel enzim aktivitesidir. Rezidüel 'PAH aktivitesi' olmayan genotipler BH4'e yanıt vermeyecek şekilde düşünülebilir ve bu da klinik BH4 mücadelesine olan ihtiyacı ortadan kaldırır. İn vitro deneylerden elde edilen bilgilerden rezidüel "PAH aktivitesinin" hesaplanması, BH4 terapisi için potansiyel adayların tahmini ve / veya hariç tutulması için faydalı olabilir. Bu yöntem, yalnızca tek bir mutasyona dayalı hesaplamalardan açıkça daha güçlüdür.

Ancak her hastanede enzim aktivitesi ölçümü yapılabilmesi mümkün değildir. Bazı klinkler tüm hastalara belli bir yaşa gelindiğinde BH4 yükleme testi

yapmaktadır. Bazı klinikler ise genetik mutasyon sonucuna göre yanıt alınıp alınamayacağını analiz ederek denemektedirler. Bunun hakkında şu an için herhangi bir ortak karar bulunmamaktadır fakat BH4 yükleme testi sonrasında yanıt alınamayan hastalarda yükselmiş kan FA düzeyi göz önüne alındığında, bu hastaların gerek santral sinir sisteminin etkilenmesi gerekse maternal fenilketonüri açısından tamamının büyük risk altında olduğu görülmektedir. Bu nedenle BH4 tedavisine başlanmadan önce vakaların %15'ten fazlasında direnç gelişebileceği bunun daha sonra tedaviye uyum açısından büyük risk taşıdığı aileye anlatılmalıdır.

Bu nedenle, hasta genotipine göre daha kişiselleştirilmiş tarama yükleme testleri tasarlamamıza olanak tanıyan yeni kazanılan bilgilerden yararlanabilir. Bu yaklaşımlar, BH4 duyarlılığının daha güvenli ve doğru bir şekilde değerlendirilmesine olanak vererek yanlış olumsuz yanıtlardan kaçınmamızı sağlayacaktır. Sonuç olarak, FKÜ'lu hastalarının önemli bir kısmının, daha az katı bir diyetle kombine edilen BH4 tedavisinden yararlanma olasılığı, beslenme eksikliklerini azaltmaya ve nörolojik ve psikolojik işlev bozukluklarını en aza indirmeye katkıda bulunabilir. Ek olarak ve ayrıca önemlisi, bu hastaların daha iyi bir yaşam kalitesine katkıda bulunabilir.

6.SONUÇLAR

1. Dokuz Eylül üniversitesi Çocuk Metabolizma ve Çocuk Genetik Bilim Dalı'nda klasik fenilketonüri tanısı ile izlenen PAH mutasyon analizi yapılan 112 hastanın 58'i (%51,8) kız, 54'ü (%48,2) ise erkekti.
2. Mutasyon analizi yapılan 112 hastanın 30'u (%26,7) dış merkezde tanı almıştı ve 91'inin (%81,3) yenidoğan döneminde (0.gün-28.gün), 13'ünün (%11,6) süt çocuğu döneminde (28. Gün-2 yaş), 7'sinin (%6,3) çocukluk yaş döneminde (2 yaş - 12 yaş) ve 1'inin (%0,9) adölesan dönemde (12 yaş-18 yaş) dış merkeze ya da hastanemiz polikliniğine başvurduğu gözlemlendi. Yenidoğan döneminde başvuran hastaların tümü tarama programından gönderilen vakaları oluşturuyordu. Buna göre vakalarımızın 21'i (%18,7) yenidoğan döneminden sonra tanı alan vakalar olup ciddi olarak fenilketonüri komplikasyonları açısından risk grubu oluşturuyorlardı.
3. Hastalarımızın başvuru yaşlarının ortanca değeri 28,5 gündü. Güncel yaşlarının ortanca değeri ise 14 yıl 4 ay idi.
4. Ebeveynleri arasında akrabalık ilişkisi %51,8'inde vardı. 1. derece kuzen evliliği 37 hastada görüldü. (%33)
5. Hastaların başvuru anındaki FA ortanca değeri 22,8 mg/dL idi.
6. Vakalarımızın yaklaşık 3/4'ünün (87 vaka) (%77) izleminde, ortalama kan FA değeri 6mg/dL üstünde bulunarak kötü metabolik kontrolde oldukları belirlendi.
7. Çalışmamızda 112 hastanın tedavi tipleri değerlendirildi. 112 hastadan 73'ü (%65,2) sadece FA'den kısıtlı diyet tedavisi almaktaydı. 22 vaka (%19,6) FA'den kısıtlı diyet tedavisi ile birlikte nötral aminoasit (LNAA) tedavisi alıyordu, 17 vaka (%15,2) diyet tedavisine ek olarak BH4 tedavisi almaktaydı.
8. Değerlendirilen 112 hastanın %49,1'inde özellikle nörolojik ve endokrinolojik başta olmak üzere eşlik eden klinik bulguların ve hastalıkların olduğu görüldü.
9. Hastalara eşlik eden semptomların ya da hastalığın olması durumunda izlemdaki ortanca FA değerleri karşılaştırıldığında, hastaların FA ortanca

düzeylerinin 6 mg/dL'nin üstünde seyrettiği yönünde anlamlı fark gözlenmiştir.(p=0,03)

10. Mutasyon analizi yapılan 112 hastanın %60'ında PAH geninde homozigot mutasyon vardı. %40'ında birleşik heterozigot mutasyon görüldü.
11. PAH geni mutasyon analizi sonucu 35 farklı allel tespit edildi. Bunlardan 3'ü daha önce literatürde tanımlanmamış mutasyonlardı. Hastalarımızda en sık görülen ilk 3 mutasyon c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) (%37,3), c.782G>A (R261Q) (%10,9) , ve c.441+5G>T (IVS4+5G>T) (%5,5) idi. c.1155_1159delCATTinsGATTC, c.30A>T, c.1155_1157delCTAinsGTG saptanan novel mutasyonlardır.
12. 35 farklı allelik mutasyondan 19 tanesi katalitik alt bölgeyi (%37), 4 tanesi regulatuar bölgeyi (%9,5), 1 tanesi de oligomerizasyon bölgesini (%1,8) etkiler. Geriye kalanlar ise 11 farklı allelik mutasyon splice bölge mutasyonlarıdır (%52).
13. Genotip analizi yapılan 110 klasik fenilketonüri hastasında 49 farklı genotip saptanmış olup, en sık olarak %31 oranla IVS10-11G>A/IVS10-11G>A genotipi, ikinci sıklıkta c.782G>A/c.782G>A (%9) genotipi ve üçüncü sıklıkta IVS4+5G>T/IVS4+5G>T (%4,5) genotipi görüldü.
14. Genotipler kendi içinde etkiledikleri enzimatik bölgeye göre; splice/splice (%40), katalitik/katalitik (%26), katalitik/splice (%12,5), katalitik/regulatuar (%9,8), regulatuar/regulatuar (%2,7), splice/regulatuar (%1,8), regulatuar/tetramerizasyon (%0,9) olarak ayrılmaktaydı.
15. Homozigot allelerde en sık görülen mutasyon tipi %39,1 oranında splice bölge mutasyonları iken yanlış anlamlı mutasyonlar %16,4'lik dilimi oluşturmaktaydı. Anlamsız mutasyon %3,6 saptanmışken, çerçeve kayması mutasyon çeşidi %0,9 saptanmıştır. Allelik mutasyon değerlendirmesinde en sık gözlenen mutasyon çeşidi %50 oranında splice bölge mutasyonlarıydı.
16. Bileşik heterozigot mutasyonlar içinde en sık yanlış anlamlı/splice bölge mutasyonu görülmekteydi.(%31,8)
17. Hastalar kan FA ortanca düzeyleri ile iyi kontrollü (<6 mg/dL) ve kötü kontrollü olacak şekilde ikiye ayrıldığında; yanlış anlamlı mutasyonlar, anlamsız mutasyonlar ve splice bölge mutasyonlarını kendi içinde

karşılaştırdığımızda, yanlış anlamlı mutasyona sahip allelerin, 6 mg/dL'nin altındaki hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve anlamsız mutasyonlar ile splice bölge mutasyonlarının ise 6 mg/dL'nin üzerindeki hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. (p=0,016)

18. Türk toplumunda en sık gözlenen allel olan IVS10-11G>A alleli, ortalanca FA düzeyinin 10 mg/dL'nin üzerinde seyreden grupta, %59.8'i gibi en büyük kısmını oluşturmaktaydı. Bunu c.782G>A allelik mutasyonu ise 2. sırada takip etmektedir. Bu alleller ortalanca kan FA düzeylerine göre ayrılan her grupta da görülmesine rağmen, kötü kontrol olan gruplardaki görülme oranları diğer gruplara göre belirgin şekilde yüksek saptandı. 6 mg/dL 'nin üzerinde seyreden değerlerde santral sinir sistemi etkilenimi gibi önemli komplikasyonların meydana geldiği klasik fenilketonüride bu oranda sık görülen allellerin 10 mg/dL'nin üzerinde seyreden ortalanca FA seviyesine sahip olması popülasyonun büyük bir kısmı için risk oluşturduğu düşünülmektedir.
19. Birleşik heterozigot ve homozigot mutasyonlar incelendiğinde, hastaların ortalanca kan FA düzeylerinin iyi kontrollü ya da kötü kontrollü gruptaki sıklıkları yönünden her iki grupta da homozigot mutasyonların sıklığı daha fazla saptanmıştır. Homozigot mutasyonların daha ciddi fenotiplere neden olması sebebi ile klasik fenilketonüri popülasyonunda homozigot mutasyonların her iki grupta da fazla gözlenmesi literatür ile uyumlu bulunmuştur.
20. Fenilalaninden kısıtlı diyet alan hastaların allelleri incelendiğinde en fazla sayıda IVS10-11G>A (%39,4) olduğu görüldü. Bu alleli %9,1 oranla c.782G>A allelinin izlediği saptandı.
21. BH4 tedavisi alan hastalar incelendiğinde c.782G>A/ c.782G>A en sık görülen genotip dağılımlarındandı. IVS10-11G>A/IVS10-11G>A allelinin enzimatik aktivitesi düşük olmasına rağmen bu grupta da allel sıklığı yüksek bulunmuştur.
22. BH4 yanıtı olan hastalarda en sık c.782G>A allele saptanmıştır. Bu mutasyonda BH4 denenmiş olup da yanıt alınamayan bulunmamıştır.

23. IVS10-11G>A tek başına ya da başka mutasyonlarla birlikte BH4 yanıtına etkiyi artırmada ya da azaltmada etkili olduğu gözlenmemiştir.
24. Hastaları allelik mutasyonların etkiledikleri enzimatik alt bölge ve tedavi tiplerine göre ayıracak olursak özellikle katalitik/katalitik alt bölge (%41,2) BH4 tedavisi alanların en büyük kısmını oluşturmaktaydı. Bunu splice/splice bölge mutasyonları 2. sırada izlemekteydi (%35,5) Splice/splice bölge mutasyonları fenilalanin kısıtlı diyet/ fenilalanin kısıtlı diyet + LNAA tedavisi alanların ise büyük kısmını oluşturmaktaydı. (%80).
25. Klasik fenilketonürlü hastalarda genotip değerlendirilmesi ile BH4 tedavisi uygunluğu geçerli bir yöntemdir ancak çalışmamızda BH4 tedavisi alan hastaların frekansı veri değerlendirmesinde yeterli sayıda olmamıştır. Hastanemizde rezidüel enzim aktivitesi bakılamadığından hastalara BH4 tedavisi başlayabilmemizdeki en büyük veri, hasta genotipidir. Poliklinikte takip edilen hastaların hepsinden genotip analizi gönderildiği takdirde hastalara BH4 tedavisi denemesi sıklığı artacaktır.

7.KISITLILIKLAR

1. Retrospektif bir çalışma olduğundan, dosyalarda eksik veri olduğunda hastaların çalışma evreninden çıkartılmış olmasıdır. Böylece birden çok alanda daha yüksek bir popülasyonda çalışılamamasıdır.
2. Fenilketonüri hastalığındaki genotip çeşitliliği ve heterozigot mutasyona sahip birçok hastanın olması nedeni ile genotiplerin kendi arasında karşılaştırılamaması ve çoğu karşılaştırmada sadece sıklık yönünden belirtilebilmesi bu çalışmanın bir diğer kısıtlılığıdır.
3. Hastaların kan FA alım zamanları, tedavi ve takibe uyumu kişisel faktörlere bağlı olarak belli bir düzene konulamayacağından ve dış merkezden tarafımıza yönlendirilen hastaların ilk başvuru anındaki fenilalanin düzeyi bilinemediğinden, hastaların ortanca kan FA düzeyini standardize etmek mümkün olamamıştır.
4. Genetik faktörlerin yanında hastaların klinik prezentasyonunda epigenetik faktörlerin ve metabolik faktörlerin de bir o kadar önemli olması nedeni ile hastalarda kişisel faktörlerin standardize edilememesi çalışmanın diğer bir kısıtlılığıdır.
5. Diğer fenotiplerin de araştırılacağı büyük bir popülasyona sahip çalışma evreninde hastalık profili adına daha aydınlatıcı bilgiler elde etmek mümkün olabilir.

8.KAYNAKLAR:

1. Pronina N, Giannattasio S, Lattanzio P, Lugovska R, Vevere P, Kornejeva A. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4):398-9.
2. Marvit J, DiLella AG, Brayton K. GT to AT transition of a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5613-5628.
3. Levy HL, Waisbren SE, Lobbregt D, et al. Maternal mild hyperphenylalaninaemia: an international survey of offspring outcome. *Lancet* 1994; 344:1589.
4. Vockley J, Andersson HC, Antshel KM et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med.* 2014 Feb;16(2):188-200.
5. Robert L. Nussbaum, MD et al. Thompson And Thompson Genetics In Medicine (Çeviri) Coşkun T. Öncü Basım Evi 6: 207-208.
6. Coşkun T. Aminoasit metabolizması bozuklukları Ankara, Alp ofset ve matbaacılık, 2003;182-236.
7. Devlin TM. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Wiley-Liss, New York, 1992: 16-300.
8. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (8th ed), Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walle D (eds). New York, 2001:1667-1724.
9. David L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger principles of biochemistry. (3rd ed) New York Worth Publishers 2005:623-673.
10. Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH. Inborn Metabolic Diseases: diagnoses and treatment. 5th ed. Heidelberg: Springer, 2012;252-258
11. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *The Lancet.* 1902;160:1616-20.
12. Mak CM, Lee HH, Chan AY, Lam C. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50:142-62.

13. Brunetti-Pierri N, Parenti G, Andria G. Inborn errors of metabolism. Neonatology: A Practical Approach to Neonatal Diseases. Italia: Springer. 2012:949-66.
14. Blau N, Van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. Lancet 2010;376:1417-1427.
15. Shawn E. Asbjörn Fölling and the Discovery of Phenylketonuria, Journal of the History of the Neurosciences, 12:1, 44-54
16. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. Historical Perspective Hyperphenylalaninemia. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. GeneReviews. University of Washington, Seattle; 1993-2019.
17. Eisensmith RC, Woo SL. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. Hum Mutat 1992; 1: 13-23.
18. Dahl HH, Mercer JF. Isolation and sequence of a cDNA clone which contains the complete coding region of rat phenylalanine hydroxylase: Structural homology with tyrosine hydroxylase, glucocorticoid regulation and use of alternate polyadenylation sites. Biol Chem 1986; 261: 4148- 4153
19. Lidsky AS, Robson KJH, Thirumalachary C, et al. The PKU locus in man is on chromosome 12. Am Hum Genet 1984; 36: 527-533
20. Eiken HG, Knappskog PM, Guldborg P, et al. DGGE analysis as supplement to SSCP analysis of the phenylalanine hydroxylase gene: detection of eight (one de novo, seven inherited) of nine remaining Norwegian PKU mutations. Hum Mutat 1996; 8: 19-22
21. Liu J, Jia X, Zhang J, et al. Study on a novel strategy to treatment of phenylketonuria. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2002;30: 243-57
22. Scriver C.R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. Hum Mutat 2007; 28; 831-845.
23. Avigad S, Cohen BE, Bauer S, et al. A single origin of phenylketonuria in Yemenite Jews. Nature 1990; 344; 168-170
24. Ozalp I, Coskun T, Tokol S, Demircin G, Monch E. Inherited metabolic disorders in Turkey. Journal of Inherited Metabolic Disease 1990;13(5):732–738.

25. Kayaalp E, Treacy E, Wters PJ, et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotypephenotype correlations. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1309-1317
26. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiencies. *Mol genet metab* 2011;104:2-9
27. Guldborg P, Zschocke J, Romano V, Franc B, et al. European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype based. *Am hum genet* 1998;63:71-79
28. Dobrowolski SF, Pey Al, Koch R, Levy H, et al. Biochemical characterization of mutant phenylalanine hydroxylase enzymes and correlation with clinical presentation in nhyperphenylalaninaemic patients. *Inherit metab dis* 2009;32(1):10-21
29. Smith I, Lee P. The hyperphenylalaninemias. In: *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* (2nd ed), J. Fernandes, J.M. Saudubray, G. Van Den Berghe (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York 2000; p 171-184
30. Ponzzone A, Spada M, Ferraris S, et al. Dihydropteridine reductase deficiency in man: from biology to treatment, *Med Res Reviews* 2004; 24: 127-150
31. Neyzi O, Ertuğrul T. *Pediatric. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2002.
32. Dyer Ca. Comments on the neuropathology of phenylketonuria. *Eur j pediatr* 2000;159:107-108.
33. Posner J, Gorman D, Nagel BJ. Tyrosine supplements for adhd sympoms with comorbid phenylketonuria. *Neuropsychiatry clin neurosci* 2009;21:288-230
34. Lüleyap HÜ, Alptekin D, Pazarbaşı A, Kasap A, Kasap H, et al. The importance of arginine mutation for the evolutionary structure and function of phenyalalanine hydroxylase gene. *Mutation Research/Fundamental and 42 Molecular Mechanisms of Mutagenesis Volume 601, Issues 1-2, 10 October 2006; Pages 39-45*
35. Özalp İ. Fenilketonürlü Hastanın Tedavi ve İzlemi. *Katkı Pediatri Dergisi*, 1985: 409-421
36. Sivri S. Cognitive and Behavioural Impairment in Mild Hyperphenylalaninemia. *Turk J Pediatr* 2018; 60: 617-624.

37. Özalp İ, Coşkun T, Tokatlı A, Tokol S, et al. Neonatal screening in Turkey: 7 years experience in a developing countr. *Screening* 1995;4:139-147.
38. Hendriksz Cj, Walter Jh. Update on phenylketonuria. *Current pediatrics* 2004;14:400-406.
39. Van Calcar SC, Ney DM. Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino Acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. *J Acad Nutr Diet.* 2012 Aug;112(8):1201-10.
40. Lindegren ML, Krishnaswami S, Fonnesebeck C et al. Adjuvant Treatment for Phenylketonuria (PKU). Comparative Effectiveness Review No. 56. (Prepared by the Vanderbilt Evidence-based Practice Center under Contract No. HHSA 290-2007-10065-I.) AHRQ Publication No. 12- EHC035-EF. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; February 2012.
41. Channon S, Goodman G, Zlotowitz S, Mockler C, Lee PJ. Effects of dietary management of phenylketonuria on long-term cognitive outcome. *Arch Dis Child.* 2007;92(3):213–8.
42. Muntau AC, Röschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med.* 2002;347(26):2120.
43. Thomas J, Levy H, Amato S, Vockley J, Zori R, Dimmock D, Harding CO, Bilder DA, Weng HH, Olbertz J, Merilainen M, Jiang J, Larimore K, Gupta S, Gu Z, Northrup H; PRISM investigators. Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: Results of a long-term phase 3 clinical trial program (PRISM). *Mol Genet Metab.* 2018 May;124(1):27-38.
44. Asplin D, Brenton D, Davidson DC, et al. Management of PKU (2nd ed). National Society for Phenylketonuria, Londra 1999; 17: 14-16
45. Stemerink BA, Kalverboer AF, Meere JJ, et al. Behaviour and school achievement in patients with early and continuously treated phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis,* 2000, 23: 548-550.
46. Thompson S. Protocol for the use of XP analog in the dietary management of Phenylketonuria, The new Children's Hospital, Sydney, 1996.

47. Tokatlı A. Metabolik hastalıklarda beslenme. *Katkı Pediatri Dergisi* 1996; 2: 356-360.
48. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J*, 1995: 311; 353-366.
49. Thony B, Auerbach GB. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 2000: 347; 1-16.
50. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000. *Pediatrics*. 2001;108(4):972.
51. Woo SL, Lidsky AS, Guttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature* 1983; 306:151–155.
52. Marvit J, DiLella AG, Brayton K. GT to AT transition of a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5613-5628.
53. Mitchell JJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency . Funded by the NIH. Developed at the University of Washington, Seattle, 2007
54. Robert L. Nussbaum, MD, et al. Thompson And Thompson Genetics In Medicine (Çeviri) Coşkun T. Öncü Basım Evi 6: 207-208.
55. Eisensmith RC. and Woo SLC. Update listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 1445-1448, 1992.
56. Konecki DS. and Konecki UL. The phenylketonuria locus: current knowledge about alleles and mutations of the PAH gene in various populations. *Hum. Genet.* 87:377-388, 1991.
57. Robert L. Nussbaum, MD, et al. Thompson And Thompson Genetics In Medicine (Çeviri) Coşkun T. Öncü Basım Evi 6: 208-209.
58. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999; 15: 267-272.
59. Scriver C.R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* 2007; 28; 831-845.

60. Trefz FK, Burgard P, König T, et al. Genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 1993; 217: 15-21.
61. Rouse B, Matalon R, Koch R. Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly and developmental outcome. *J Pediatr* 2000; 36: 57–61.
62. Wettstein S, Underhaug J, Perez B, Marsden BD, Yue WW, Martinez A, Blau N. Linking genotypes database with locus-specific database and genotype–phenotype correlation in phenylketonuria *European Journal of Human Genetics* : EJHG, 18 Jun 2014, 23(3):302-309.
63. P Leandro P, I Rivera I, M C Lechner M.C, Almeida I.T, Konecki D. The V388M Mutation Results in a Kinetic Variant Form of Phenylalanine Hydroxylase. *Mol Genet Metab.* 2000 Mar;69(3):204-12.
64. Pey AL, Desviat LR, Ga'mez A, Ugarte M, Pe'rez B. Phenylketonuria: Genotype–Phenotype Correlations Based on Expression Analysis of Structural and Functional Mutations in PAH. *Human Mutation* 2003; 21:370-378.
65. Rouse B, Matalon R, Koch R. Maternal phenylketonuria syndrome: congenital heart defects, microcephaly and developmental outcome. *J Pediatr* 2000; 36: 57–61.
66. Thony B, Auerbach GB. Tetrahydrobiopiterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 2000: 347; 1-16.
67. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet*; 1988;42: 677–693.
68. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res. academic.oup.com*; 2005;33: D514–7.
69. Robinson PN, Krawitz P, Mundlos S. Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clin Genet. Wiley Online Library*; 2011;80: 127–132.
70. Lalonde E, Albrecht S, Ha K, Jacob K. Unexpected allelic heterogeneity and spectrum of mutations in Fowler syndrome revealed by next-generation exome sequencing. *Mutat Res. Wiley Online Library*; 2010.

71. Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*; 2010;42: 790–793.
72. Ozalp I, Coşkun T, Tokatli A, Kalkanoğlu HS, Dursun A, Tokol S, Köksal G, Özgüç M, Köse R. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk J Pediatr* 2001;43(2):97-101.
73. Burgard P, Schmidt E, Rupp A, Schneider W, Bremer HJ. Intellectual development of the patients of the German Collaborative Study of children treated for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155(Suppl1):S33-38
74. Walter JH, White FJ, Hall SK, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, Francis DE, Shortland GJ, Schmidt M, Vail A. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* 2002;360(9326):55-57
75. Berry SA, Brown C, Grant M, Greene CL, Jurecki E, Koch J, Moseley K, Suter R, van Calcar SC, Wiles J, Cederbaum S. Newborn screening 50 years later: access issues faced by adults with PKU. *Genet Med* 2013;15(8):591-599
76. Tuğba Küçükassap, Türkiye’de fenilketonüri hastalığında tanı, tedavi, izlem ve uygulamaların saptanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara 2013
77. Anjema K, Hofstede FC, Bosch AM, Rubio-Gozalbo ME, de Vries MC, Boelen CC, van Rijn M, van Spronsen FJ. The neonatal tetrahydrobiopterin loading test in phenylketonuria: what is the predictive value? *Orphanet J Rare Dis* 2016;29(11):10
78. Waisbren SE, Noel K, Fahrback K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, et al. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab*.2007;92(1–2):63–70.
79. Rasmus SJ, Forrest SM, Pitt DD, Cottan RGH. Genotype and intellectual phenotype in untreated phenylketonuria patients. *Pediatr Res*. 1999;45: 474–481
80. Couce M.L. , Pintos P.S., Vitoria I, Castro M.J, Echevarría L.A, Correcher P, Marmiesse A.F, Roca I, Hermida A, Olmos M.M, Leis R. Carbohydrate status in patients with phenylketonuria. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2018) 13:103
81. Tavil, B., Sivri, H. S. K., Coskun, T., Gurgey, A., Ozyurek, E., Dursun, A., Gumruk, F. (2006). Haematological findings in children with inborn errors of

- metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(5), 607–611. doi:10.1007/s10545-006-0379-8
- 82.** Karami H, Kosaryan M, Aliasgharian A, Abbaskhanian A, Sharifian R, Taghipour M. Co-existence of Phenylketonuria (PKU) and beta-Thalassemia Major in a 16 Years Old Girl: A Case Report. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 6(3):42-45.
 - 83.** Zschocke J, Hoffmann GF. Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet*. 1999;104:390-8
 - 84.** Trunzo R, Santacroce R, D'Andrea G, Longo V, De Girolamo G, Dimatteo C et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency in south Italy: Genotypephenotype correlations, identification of a novel mutant PAH allele and prediction of BH4 responsiveness. *Clin Chim Acta*. 2015;450:51-5.
 - 85.** Guldberg P, Romano V, Ceratto N, Bosco P, Ciuna M, Indelicato A et al. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe. *Hum Mol Genet*. 1993;2:1703-7.
 - 86.** Couce ML, Boveda MD, Fernandez-Marmiesse A, Miras A, Perez B, Desviat LR et al. Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain. *Gene*. 2013;521:100-4.
 - 87.** Rivera I, Mendes D, Afonso A, Barroso M, Ramos R, Janeiro P et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol Genet Metab*. 2011;104:86-92
 - 88.** Lüleypap Ü, Pazarcı P, Cömertpay G, Önenli H, Pazarbaşı A, Alptekin D, Kasap H, Froster U et al. The analysis of the phenylalanine hydroxylase gene mutations by sequencing and ARMS techniques in Turkish patients. *Cukurova Med J* 2016;41(4):702-708
 - 89.** Özyakaşır D, An Approach To Migration Phenomenon In Terms Ethnic Identity: The Case Of Kars. *The Journal of International Social Research* 2017;10(52):1130-1138

90. Ozguc M, Ozalp I, Coskun T, Yilmaz E, Erdem H, Ayter S. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *J Med Genet.* 1993;30:129- 30.
91. Zschocke J, Hoffmann GF. Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet.* 1999;104:390-7.
92. Akal C. Fenilketonüri Hastalarında Genotip Fenotip İlişkisi. Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi. Ankara 2019.
93. Daniele A, Cardillo G, Pennino C, et al. Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Ann Hum Genet.* 2007; 71: 185-93.
94. Daniele A, Cardillo G, Pennino C, et al. Molecular epidemiology of phenylalaninehydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Ann Hum Genet.* 2007; 71: 185-93.
95. Luciana S, Myrian CM, Adriana OR, et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C and IVS 12nt1 in Minas Gerais. *Brazil Genet Mol Res* 2006; 5: 16-23.
96. Leandro P, Rivera I, Ribeiro V, et al. Mutation analysis of phenylketonuria in south and central Portugal: prevalence of V388M mutation. *Hum Mutat* 1995; 6: 192–194.
97. Effat L, Kuzmin A, Kasem N, et al. Haplotypes and mutations of the PAH locus in Egyptian families with FKÜ. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 259-62.
98. Desviat LR, Pérez B, Gámez A, et al. Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain. Molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 386-392.
99. Pavlovic S, Stojiljkovic M. Molecular diagnosis of phenylketonuria: From defective protein to disease-causing gene mutation. *JMB* 2009; 28: 262-267.
100. Scriver C.R., Hurtubise, M.,Konecki D, Prevost L, Erlandsen H, Stevens R, Waters P, Ryan S, McDonald D, Sarkissian C. Pahdb 2003; What a locus spesific knowledgebase can do. *Human mutation*, 21(4), 333-344.
101. Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, Ellingson C, Ellingson C, Ozer I, Gökçay G, Baykal T, Thöny B, Demirkol M, Blau N. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin

- responsiveness in Turkish PKU population. *Molecular Genetics and Metabolism*, 18 Nov 2010, 102(2):116-121.
102. Olsson A, Bruhn H, Nordenström A, Zetterström RH, Wedell A, and von Döbeln U. The Spectrum of PAH Mutations and Increase of Milder Forms of Phenylketonuria in Sweden During 1965–2014. *JIMD Rep* 2017;34: 19–26.
 103. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat.* 2016;37:508-15.
 104. Okano Y, Eisensmith RC, Guttler F, Lighter-Konecki U, Konecki DS, Trefz FK, Dasovich M, et al (1991a) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 324:1232-1238.
 105. Wright S, Steiner R. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening. *J Perinat Neonat Nurs* 2004; 18: 41-58. 58
 106. Keklioglu M. Amino Asit Metabolizması Anormallikleri (Çeviri) Artan S. The Merk Manual of Diagnosis and Therapy, İstanbul 2002; 40: 371-7.
 107. Clarke JTR. A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases (2nd Ed). Cambridge University Press, 2002, UK.
 108. Kayaalp E, Treacy E, Paula J et al. Human Phenylalanine Hydroxylase Mutations and Hyperphenylalaninemia Phenotypes: A Metanalysis of Genotype-Phenotype Correlations. *Am J Hum Genet.* 1997 Dec;61(6):1309-17.
 109. Shirzadeh T, Saeidian AH, Bagherian H, Salehpour S et al. Additional individual contributors. Molecular genetics of a cohort of 635 cases of phenylketonuria in a consanguineous population. *J Inherit Metab Dis* 2018;41(6):1159-1167.
 110. S. Yildirim, A. Tokatli, E. Yilmaz, T. Coskun, Assessment of tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish hyperphenylalaninemic patients, *Turk J Pediatr* 49 (2007) 1–6.
 111. Gundorova P, Stepanova AA, Kuznetsova IA, Kutsev SI, Polyakov AV. Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia. *PLoS One* 2019;14(1):e0211048.
 112. Bonyadi M, Omrani O, Moghanjoghi SM, Shiva S. Mutations of the phenylalanine 127 hydroxylase gene in Iranian Azeri Turkish patients with phenylketonuria. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14(2):233-235.

- 113.** Ellingsen S, Knappskog P.M., Eiken H.G., Phenylketonuria splice mutation (EXON6nt-96Ag) masquerading as missense mutation (Y204C). Human Mutation 1997; 9,1 s88-89.



EK 1 - ETİK KURUL ONAYI**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

Sayın Prof.Dr.Murat Derya Erçal
Araştırmaya ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	5694-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Klasik Fenilketonüri Hastalarda Genetik Mutasyon Çeşitliliği
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Murat Derya Erçal Çocuk Genetik A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☒

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

EK 2 – ETİK KURUL ONAYI

Karar No:2020/26-70		Tarih:26.10.2020			
KARAR BİLGİLERİ		Prof.Dr.Murat Derya Erçal'ın sonunhası olduğu "Klasik Fenilketonüri Hastalarında Genetik Mutasyon Çeşitliliği" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI		Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Ada/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐ H ☒	Katılamadı
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyostatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐ H ☒	Katılamadı
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	