

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Harms

**Optimierung der Effizienz molekulargenetischer Analysen  
angeborener Stoffwechselkrankheiten am Beispiel der  
Phenylketonurie**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Gödde, Daniel  
aus Meschede

2007



Dekan: Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T.J. Filler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Harms

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T.J. Filler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Koch

### **Zusammenfassung**

## **Optimierung der Effizienz molekulargenetischer Analysen angeborener Stoffwechselkrankheiten am Beispiel der Phenylketonurie**

Daniel Gödde

Durch die fortschreitende molekulargenetische Forschung etablieren sich im klinischen Alltag zunehmend genetische Parameter, die unmittelbar in die Diagnostik und Therapie einfließen. Ein Beispiel hierfür ist die Phenylketonurie, deren Behandlung von der Genotyp-Phänotyp Korrelation der verursachenden genetischen Veränderungen beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit werden die zur Identifikation der Mutationen angewandten molekulargenetischen Untersuchungsmethoden, die auf unterschiedlichen Verfahrensweisen basieren, im Hinblick auf ihre Effizienz und Wirtschaftlichkeit untersucht. Im Focus stehen hierbei ein genetisches Vorscreening durch SSCP-Analyse mit nachfolgender DNA-Sequenzierung des auffälligen Genabschnitts, das mit einer direkten Sequenzierung aller kodierender Exone des Gens der Phenylalanin-Hydroxylase bei Patienten mit Phenylketonurie verglichen wird. Die Untersuchungen wurden an einem Kollektiv von 23 Patienten mit Phenylketonurie durchgeführt. Hierbei konnte in allen Fällen die krankheitsinduzierenden Mutationen identifiziert werden. Die Gesamtkosten der Analyse eines Patienten wurden für die Strategie mit Vorscreening durch SSCP und nachfolgender DNA-Sequenzierung mit € 2.248,73 ermittelt, wohingegen die Kosten einer Einzelanalyse bei direkter Sequenzierung aller Exone mit € 1.935,73 betragen. Im Vergleich der eingebrachten Arbeitszeit, der anfallenden Kosten und der Validität der Verfahren zeigte sich eine Abhängigkeit der Verfahren von der zu untersuchenden Anzahl an Patienten. Bei einem kleinen Patientenpool mit weniger als 30 Probanden ist eine direkte DNA-Sequenzuntersuchung zu bevorzugen, während ab einem Pool mit 30 Probanden die SSCP-Analyse zum Screening auf Mutationen mit einer darauf ausgerichteten gezielten DNA-Sequenzierung einen Kostenvorteil erwirtschaftet. Darüber hinaus werden weitere Vorschläge für eine Optimierung von etablierten Verfahren gegeben, zum Beispiel eine höchst mögliche Auslastung der Geräte durch eine Zentralisierung der Untersuchungen oder eine Optimierung der Verfahrensabläufe durch Ausarbeiten von Netzwerkplänen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Genotypisierung angeborener Stoffwechselkrankheiten bei Berücksichtigung aller Kostenfaktoren mit erheblichen Kosten verbunden ist, so dass die Indikation für jede einzelne Untersuchung kritisch gestellt werden muss und eine zentralisierte Untersuchung nicht nur unter Aspekten der Qualitätssicherung sondern auch der Betriebswirtschaft zu empfehlen ist. Die hier entwickelten Netzwerkpläne sind für die Entwicklung von Untersuchungsstrategien anderer Erkrankungen adaptierbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2007

Meinen Eltern

**Inhaltsverzeichnis:**

1	Einführung .....	14
1.1	Die historische Einbindung oder der Weg zur Beschreibung von Stoffwechseldefekten .....	14
1.1.1	Enzymatische Cofaktoren des Aminosäurekatabolismus.....	15
1.2	Phenylalanin .....	16
1.2.1	Struktur, Eigenschaften und Vorkommen .....	16
1.2.2	Stoffwechselwege des Phenylalanins im menschlichen Organismus ....	16
1.3	Phenylalaninhydroxylase (PAH) .....	17
1.3.1	Das Phenylalaninhydroxylase-Gen des Menschen.....	17
1.3.2	Proteinstruktur .....	17
1.4	Phenylketonurie (PKU) .....	18
1.4.1	Genetik und Vererbung der Hyperphenylalaninämien.....	18
1.4.2	Populationsgenetik, Evolution und Genkartographie.....	19
1.4.3	Diagnostik [134].....	19
1.4.4	Molekulargenetik.....	20
1.4.4.1	Einteilung der Hyperphenylalaninämien.....	21
1.4.4.1.1	Einteilung nach dem Phänotyp.....	21
1.4.4.1.2	Einteilung nach dem Genotyp .....	22
1.4.4.2	Genotyp-Phänotyp Korrelationen der Mutationen der PAH.....	23
1.4.4.3	Mutationen des PAH-Gens mit BH <sub>4</sub> -Sensitivität .....	24
1.4.5	Klinik.....	24
1.4.6	Therapie.....	25
1.5	Kosten-Nutzenrechnung .....	26
1.5.1	Vorsorge und Kosten-Nutzen Rechnung für die PKU .....	26
1.5.2	Der Kostenbegriff [41] .....	27
1.6	Methoden.....	28
1.6.1	Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) .....	28
1.6.2	DNA-Sequenzanalyseverfahren .....	29
1.6.2.1	Die DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L [15, 74, 98-100, 107].....	30
1.6.2.2	Die kapillare DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700.....	30

2	Fragestellung .....	31
3	Material und Methoden .....	32
3.1	Probensammlung und Probenaufbereitung.....	32
3.1.1	Patientenkollektiv .....	32
3.1.2	Blutproben für eine DNA-Bibliothek.....	32
3.1.3	Isolierung von genomischer DNA.....	32
3.2	Untersuchungen zur Genotypisierung .....	33
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
3.2.1.1	PCR – Amplifikation von genomischer DNA.....	33
3.2.1.2	Geräte .....	33
3.2.1.3	Oligonukleotide .....	33
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
3.2.3	Reinigung von Nukleinsäuren .....	35
3.2.4	DNA-Sequenzanalyseverfahren .....	36
3.2.4.1	Polymerase-Ketten-Reaktion / DNA-Sequenzreaktion mit markierten Primern .....	36
3.2.4.2	DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L .....	37
3.2.4.3	DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700 .....	37
3.2.5	Single-Strand Conformation Polymorphism .....	38
3.2.5.1	Materialien und Geräte .....	38
3.2.5.2	Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse.....	39
3.2.5.3	Silberfärbung .....	39
4	Ergebnisse .....	40
4.1	Molekulargenetische Analysen .....	40
4.1.1	Aufbau und Vorgehen .....	40
4.1.2	Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchungen.....	41
4.1.3	Ergebnisse der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse ...	45
4.2	Arbeitsabläufe.....	47
4.2.1	DNA-Sequenzuntersuchungen .....	48
4.2.1.1	DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L mit Single Laser System	48

4.2.1.2	DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 mit Dual Laser System	54
4.2.2	Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	58
4.3	Kostenrechnung .....	62
4.3.1	Kosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchungen.....	63
4.3.1.1	Kosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L .....	63
4.3.1.1.1	Materialkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI- COR 4000L .....	64
4.3.1.1.2	Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI- COR 4000L .....	64
4.3.1.1.3	Personalkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI- COR 4000L .....	66
4.3.1.1.4	Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI- COR 4000L .....	66
4.3.1.2	Kosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700 .....	67
4.3.1.2.1	Materialkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700.....	67
4.3.1.2.2	Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700.....	68
4.3.1.2.3	Personalkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700.....	69
4.3.1.2.4	Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700.....	70
4.3.1.3	Kosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung .....	70
4.3.1.3.1	Eigenkosten je Probe der kommerziellen DNA- Sequenzuntersuchung .....	70
4.3.1.3.2	Honorarkosten je Probe der kommerziellen DNA- Sequenzuntersuchung .....	71
4.3.1.3.3	Gesamtkosten je Probe der kommerziellen DNA- Sequenzuntersuchung .....	71
4.3.2	Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	72



4.3.2.1	Materialkosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	72
4.3.2.2	Gerätekosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse.....	73
4.3.2.3	Personalkosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	74
4.3.2.4	Gesamtkosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	74
4.3.2.5	Kosten je Probe für DNA-Sequenzuntersuchungen bei der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse.....	74
4.4	Gegenüberstellung der Analyseverfahren .....	74
4.4.1	Gegenüberstellung der Kosten je Probe .....	75
4.4.2	Gegenüberstellung der Kosten einer Versuchsreihe.....	75
4.4.2.1	DNA-Sequenzanalyseverfahren .....	75
4.4.2.1.1	Kosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L .....	77
4.4.2.1.2	Kosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 .....	78
4.4.2.1.3	Kosten einer Versuchsreihe mit der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung .....	78
4.4.2.2	Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	79
4.4.2.3	Kosten einer Versuchsreihe mit Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse .....	81
4.4.2.4	Gegenüberstellung der Kosten einer Versuchsreihe.....	81
4.4.3	Kostenkalkulation.....	82
5	Diskussion.....	83
6	Literaturverzeichnis.....	88
7	Anhang.....	97

**Tabellen- und Abbildungsverzeichnis:**

Tabelle 1: Zusammenwirken der PAH-Mutation und resultierender metabolischer Phänotyp [38] .....	22
Tabelle 2: Oligonukleotide zur Amplifikation der PAH-Exone [129]; Am 5'-Ende jeweils angefügt die Taq-Polymerase-Bindungssequenz (sense: tgt aaa acg acg gcc agt, antisense: cag gaa aca gct atg acc).....	34
Tabelle 3: Standard-Protokoll Silberfärbung der SSCP-Analyse.....	40
Tabelle 4: Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchung: Allel 1 .....	42
Tabelle 5: Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchung: Allel 2 .....	43
Tabelle 6: Verteilung der identifizierten PAH-Mutationen.....	44
Tabelle 7: Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchung: Polymorphismen.....	44
Tabelle 8: Genotyp-Phänotyp Korrelation und Einteilung nach klinischem Schweregrad. ....	45
Tabelle 9: Ergebnisse der SSCP-Analyse: Polymorphismen .....	46
Tabelle 10: Arbeitsschritte der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L .....	51
Tabelle 11: Arbeitsschritte der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700.....	56
Tabelle 12: Arbeitsschritte der SSCP-Analyse; <sup>1</sup> ohne Trocknen des Gels .....	60
Tabelle 13: Materialkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L .....	64
Tabelle 14: Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L .....	66
Tabelle 15: Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L .....	66
Tabelle 16: Materialkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700 .....	67
Tabelle 17: Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prims 3700 .....	69
Tabelle 18: Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700 .....	70
Tabelle 19: Gesamtkosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung...	72
Tabelle 20: Materialkosten je Probe der SSCP-Analyse .....	73
Tabelle 21: Gerätekosten je Probe der SSCP-Analyse.....	73

Tabelle 22: Gesamtkosten der SSCP-Analyse je Probe .....	74
Tabelle 23: Vergleich der Kosten je Probe der DNA-Sequenzanalyseverfahren; <sup>1</sup> Honorarkosten .....	75
Tabelle 24: Aufbau der Versuchsreihe mit DNA-Sequenzuntersuchungen; Ermittlung der Anzahl der untersuchten Proben.....	76
Tabelle 25: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI- COR 4000L .....	77
Tabelle 26: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700.....	78
Tabelle 27: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit der kommerziellen DNA- Sequenzuntersuchung .....	78
Tabelle 28: Aufbau der Versuchsreihe mit SSCP-Analyse; Ermittlung der Anzahl der untersuchten Proben; <sup>1</sup> durch DNA-Sequenzuntersuchung.....	80
Tabelle 29: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit der SSCP-Analyse; <sup>1</sup> Untersuchungen mittels des DNA-Sequenzanalysegerätes ABI Prism 3700 .....	81
Tabelle 30: Kosten einer Versuchsreihe im Vergleich; <sup>1</sup> Honorarkosten; <sup>2</sup> Untersuchungen mittels des DNA-Sequenzanalysegerätes ABI Prism 3700.....	81
Tabelle 31: Kostenkalkulation für 30 Patienten .....	82
Abbildung 1: Beispiel eines Kontroll-Agarosegels, hier Exon 12 des PAH-Gens .....	35
Abbildung 2: Netzwerkplan DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L: Tag 1.....	52
Abbildung 3: Netzwerkplan DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L: Tag 2.....	53
Abbildung 4: Netzwerkplan ABI Prism 3700 .....	57
Abbildung 5: Netzwerkplanung SSCP-Analyse.....	61

**Abkürzungsverzeichnis:**

APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HCL	Salzsäure
kb	Kilobasen
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
l	Liter
M	Mol pro Liter
MDE	Mutation Detection Enhanced (engl.)
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
Mut.	Mutation
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAH	Phenylalaninhydroxylase
Pat.	Patient
PCR	polymerase chain reaction (engl.)
PKU	Phenylketonurie
RNA	Ribonucleinsäure
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
U	Unit (engl.)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
°C	Grad Celsius
€	Euro
£	Pfund (engl.)

## **1 Einführung**

### **1.1 Die historische Einbindung oder der Weg zur Beschreibung von Stoffwechseldefekten**

Enzyme sind für tierische und pflanzliche Zellen unverzichtbare Katalysatoren biochemischer Reaktionen. Sie sind in der Lage, Reaktionen auszulösen und zu beschleunigen, Substanzen in ihrer Zusammensetzung zu verändern und komplexe Stoffe ab- oder aufzubauen. Auf der Basis der Vererbung ist es der Zelle möglich, die Informationen zum Aufbau von Enzymen aus Aminosäuren von Zellgeneration zu Zellgeneration weiterzugeben [100].

Mathias Schleiden und Theodor Schwann formulieren 1838 erstmals ihre „Zelltheorie“, in der sie Zellen aufgebaut aus Kern, Zellmembran und Vakuolen, als Elementarteil von Geweben beschreiben [26, 109]. Das Konzept des Metabolismus wird von dem Gießener Chemiker Justus von Liebig 1842 in die Physiologie eingeführt. Er gliedert die Nahrungsstoffe in Proteine, Fette und Kohlenhydrate, die er zudem in stickstofffreie Respirationsmittel und stickstoffhaltige Nährstoffe einteilt [26, 109]. Einzelne Stoffwechselfvorgänge werden allerdings erst in den zwanziger und dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts eingehender untersucht. Ein Vorreiter ist der deutsche Biochemiker Otto Heinrich Warburg, der die Eisenoxxygenase als Bestandteil des Hämins nachweist [100, 109]. Mit seiner Hypothese „Omnis cellula e cellula“ stellt Rudolf Virchow 1858 erstmals die Zelle „in den Mittelpunkt der vitalen Erscheinung“ und charakterisiert sie als den Ausgangspunkt des Lebensprozesses und der Krankheitsentstehung gleichermaßen [109]. Nur einige Jahre später entdeckt der österreichische Augustinermönch Gregor Mendel anhand von Versuchen mit Pflanzenhybriden die Grundlagen der modernen Vererbungslehre; diese werden um 1900 als die „Mendelschen Vererbungsregeln“ von Carl Erich Correns wiederentdeckt und formuliert [26, 109].

Archibald Edward Garrod veröffentlicht 1909 seine Schrift über „Inborn errors of metabolism“, in der er das Fehlen eines Enzyms als Auslöser von Erkrankungen postuliert. Insbesondere interessiert sich der britische Genetiker für den Albinismus, die Alkaptonurie, die Cystinurie und die Pentosurie. Er bemerkt, dass an Alkaptonurie

erkrankte Kinder häufig blutsverwandte Eltern haben [100, 109]. In „Die stofflichen Grundlagen der Vererbung“ beschreibt Thomas H. Morgan 1919 seine anhand von Züchtungsexperimenten mit *Drosophila melanogaster* gewonnenen Erkenntnisse der Chromosomenvererbung. Die Kopplung von Genen, der Austausch von Chromosomen als Quelle einer Neukombination und die Feinstrukturen der Chromosomen bestätigen die Vorstellung vom Gen als Untereinheit des Chromosoms [109]. Mit der Entdeckung der DNA-Doppelhelix 1953 durch Francis Crick und James Watson kann die Replikation und Vererbung der Gene auf molekularer Ebene letztendlich erklärt werden. Man ist nun in der Lage, Erbkrankheiten, die in Chromosomenstörungen oder der Weitergabe von Mutationen begründet sind, zu bestimmen und zu charakterisieren [100].

### **1.1.1 Enzymatische Cofaktoren des Aminosäurekatabolismus**

Für den Katabolismus der Aminosäuren werden neben den eingesetzten Enzymen weitere Enzym-Cofaktoren benötigt. Der häufigste Reaktionstyp beim Aminosäurekatabolismus ist die Übertragung eines Kohlenstoffatoms ( $C_1$ -Übertragung) [79]. Hierbei werden als Cofaktoren Biotin, Tetrahydrofolat oder S-Adenosylmethionin eingesetzt, um die  $C_1$ -Gruppe in verschiedenen Oxidationsstufen zu übertragen.  $CO_2$ , mit Kohlenstoff in der höchsten Oxidationsstufe, wird von Biotin übertragen [71]. Tetrahydrofolat ist im Allgemeinen an der Übertragung von  $C_1$ -Gruppen in mittleren Oxidationsstufen beteiligt, während S-Adenosylmethionin Methylgruppen liefert, in denen Kohlenstoff in der niedrigsten Oxidationsstufe vorliegt [71, 79].

Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) ist ein weiterer Cofaktor, der an biologischen Oxidationsreaktionen beteiligt ist und zur Gruppe der Pterine gehört. Als Cofaktor der Phenylalaninhydroxylase (PAH) überträgt Tetrahydrobiopterin bei der Hydroxylierung von Phenylalanin Elektronen von NADH auf  $O_2$ . Während der Hydroxylierungsreaktion wird das Coenzym selbst zu Dihydrobiopterin oxidiert und anschließend durch eine NADH-abhängige Reaktion wieder zu Tetrahydrobiopterin reduziert [79].

## **1.2 Phenylalanin**

### **1.2.1 Struktur, Eigenschaften und Vorkommen**

Phenylalanin ist als Aminosäure ein Baustein für Proteine, Neurotransmitter und Peptidhormone. Durch die aromatische Seitenkette verhält sich Phenylalanin hydrophob und kann in geringem Maße bei 280 nm ultraviolettes Licht absorbieren [79].

Als essentielle Aminosäure ist der menschliche Organismus darauf angewiesen, Phenylalanin mit der Nahrung aufzunehmen [71]. Phenylalanin wird in Pflanzen und Mikroorganismen über die Zwischenstufen Shikimat, Chorismat und Prephenat gebildet, wobei es sich bei dem letzten Schritt um eine Transaminierung mit Glutamat als Aminogruppendonator handelt [79].

### **1.2.2 Stoffwechselwege des Phenylalanins im menschlichen Organismus**

Die Elimination von Phenylalanin aus den Körperflüssigkeiten erfolgt in erster Linie durch den Verbrauch bei der körpereigenen Eiweißsynthese, wobei der menschliche Organismus in der Lage ist, altersabhängig 15 – 60 mg/kgKG Phenylalanin pro Tag umzusetzen. Eine alternative Elimination durch Eröffnung neuer Stoffwechselwege oder durch Ausscheidung im Urin ist dagegen quantitativ unbedeutend [79]. Neugeborene mit Phenylketonurie (PKU) weisen einen annähernd normalen Phenylalanin-Blutspiegel auf, da bis zur Geburt die Plazenta wesentlich für Zufuhr und Abfuhr von Aminosäuren verantwortlich ist. Erst nach der Geburt steigt der Phenylalaninwert in den Körperflüssigkeiten nach Eiweißzufuhr mit der Nahrung an [129].

Weiterhin kann Phenylalanin im menschlichen Organismus in seine Derivate abgebaut und in verschiedene Stoffwechselwege eingeschleust werden. Phenylalanin wird hierbei in sechs Schritten zu Acetoacetat und Fumarat abgebaut, welche an verschiedenen Stellen in den Citronensäure-Zyklus eintreten können [79]. Das erste Abbauzwischenprodukt ist Tyrosin, das durch Hydroxylierung unter Verbrauch von O<sub>2</sub>,



NADH+H<sup>+</sup> und Tetrahydrobiopterin aus Phenylalanin entsteht. Katalysierendes Enzym hierbei ist die Phenylalaninhydroxylase [79].

### **1.3 Phenylalaninhydroxylase (PAH)**

Die Phenylalaninhydroxylase ist eine von drei bekannten aromatischen Hydroxylasen des menschlichen Stoffwechsels [79]. Die aromatischen Hydroxylasen werden im katabolen Aminosäurestoffwechsel oder bei der Synthese von Neurotransmittern eingesetzt. Alle drei Hydroxylasen sind auf den Cofaktor Tetrahydrobiopterin angewiesen [32, 79]. Die Phenylalaninhydroxylase katalysiert die erste und zugleich limitierende Reaktion des katabolischen Stoffwechselweges für Phenylalanin. In dieser gemischt-funktionellen Oxidation, in der ca. 75 % des mit der Nahrung aufgenommenen Phenylalanins umgesetzt werden, wird Phenylalanin zu Tyrosin hydroxyliert [32, 35, 110].

#### **1.3.1 Das Phenylalaninhydroxylase-Gen des Menschen**

Die genomische Information der Phenylalaninhydroxylase des Menschen besteht aus einem etwa 90 Kilobasen langen Gen, welches auf Chromosom 12 (12q22-q24.1) lokalisiert wurde [82, 95]. Das Gen enthält 13 Exone und 12 Introns, wobei das kleinste Exon, Exon 9, nur 57 Basenpaare, das größte Exon, Exon 13, 892 Basenpaare lang ist. Die Größe der Introns ist ebenfalls sehr variabel und schwankt zwischen 1,0 und 4,5 Kilobasen am 3'-Ende bzw. zwischen 12,0 und 23,5 Kilobasen am 5'-Ende des PAH-Gens [22]. Bei der Transkription wird eine 2681 Basenpaare umfassende mRNA mit einer kodierenden Region von 1353 Basenpaaren gebildet, die in ein monomerisches Proteinmolekül aus 451 Aminosäuren translatiert wird [22, 75]. Dieses Homodimer bildet eine funktionelle Einheit der PAH [75].

#### **1.3.2 Proteinstruktur**

Eine Untereinheit der PAH setzt sich aus drei Domänen zusammen: einer N-terminalen regulatorischen Domäne, einer katalytischen und einer kurzen C-terminalen Domäne

[32, 35]. Dieses C-terminale Ende, auch „coiled-coil“ genannt, ist für die Verbindung der einzelnen Untereinheiten zu einem funktionsfähigen enzymatisch-aktiven Tetramer verantwortlich. Für die Formation eines enzymatisch aktiven PAH-Tetramers sind wenigstens zwei Kontaktpunkte je Untereinheit notwendig. Fehlt die C-terminale  $\alpha$ -Helix, wird die Enzymaktivität deutlich reduziert [58]. Das aktive Bindungszentrum mit dem proteingebundenen Eisenatom liegt in einer leicht zugänglichen Region der katalytischen Domäne. Diese baut sich, einem Korb ähnlich, aus 14  $\alpha$ -Helices und 8  $\beta$ -Strängen in Faltblattstruktur auf [32]. Bei einem Wildtyp der PAH liegen die dimerische und die tetramerische Form im Gleichgewicht vor, wobei nur das Tetramer Substrat zu binden in der Lage ist [67]. Dabei wird, je nach pH-Wert, das Gleichgewicht zwischen dimerischer und tetramerischer Form verschoben [87].

Basierend auf der Auswertung der Kristallstrukturen mehrerer verkürzter Stücke der PAH, konnte ein Modell in Gesamtlänge des Enzyms durch Montage konstruiert werden [31, 34, 68].

## **1.4 Phenylketonurie (PKU)**

Die Phenylketonurie wird 1934 durch Fölling als Stoffwechselkrankheit entdeckt und als Störung des Phenylalaninstoffwechsels erkannt. Der zugrunde liegende Defekt der Phenylketonurie besteht in einem funktionellen Ausfall der Phenylalaninhydroxylase (PAH). Die Ursachen für diese fehlerhafte Enzymaktivität sind vielfältig [4, 144]. Die Phenylketonurie wird in vielerlei Hinsicht als „genetische Modellkrankheit“ angesehen [35]: klinische und biochemische Eigenschaften sind bekannt und beschrieben, eine effektive diätetische Behandlung wurde erfolgreich eingeführt, Gen und Enzym sind gut charakterisiert, bis heute sind über 500 Mutationen aufgedeckt und beschrieben, die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp wurde etabliert und ein Tiermodell wurde ebenfalls entworfen und untersucht [80, 112].

### **1.4.1 Genetik und Vererbung der Hyperphenylalaninämien**

Der genetische Defekt der PAH folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Die Hyperphenylalaninämien gehören zu den häufigsten angeborene Stoffwechseldefekten

der kaukasischen Bevölkerung und treten in unserer Bevölkerung mit einer Inzidenz von ca. 1 : 10.000 Geburten auf [48, 110]. Bedingt durch die große Anzahl von verschiedenen Mutationen liegt bei den meisten Patienten eine komplexe Heterozygotie für Mutationen des PAH-Gens vor [150].

#### **1.4.2 Populationsgenetik, Evolution und Genkartographie**

In Europa wird das Auftreten der PKU durchschnittlich mit einer Frequenz von 1 : 10.000 Geburten beobachtet, wobei in der Verteilung regionale und ethnische Unterschiede bestehen [48]. In Irland (ca. 1 : 4.500) findet sich die höchste, in Frankreich (ca. 1 : 17.000) die niedrigste PKU-Frequenz [1]. Bei nicht-europäischen Volksgruppen wird ein selteneres Vorkommen von PKU dokumentiert als bei Europäern. So wird z. B. bei in den USA lebenden Afroamerikaner eine Inzidenz von 1 : 50.000 beobachtet [23, 56].

Durch eine Genkartographierung basierend auf Haplotypisierung und der demographischen Entwicklung in Europa können Rückschlüsse auf Herkunft und die Verbreitung einzelner Mutationen gezogen werden. Die Ausbreitung der Mutationen folgt den Regeln des Founder Effektes und der genetischen Drift [28], wohingegen das Auftreten von Neumutationen eine untergeordnete Rolle spielt [60]. Im Vergleich zu afrikanischen Volksgruppen treten in Europa 29 vorherrschenden Haplotypen auf, während in Asien die geringste Heterogenität zu finden ist [150]. Dies wird im Rahmen der menschlichen Evolution als Beleg für den Exodus der Menschheit aus Afrika aufgefasst [66].

#### **1.4.3 Diagnostik [143]**

Phenylketonurie führt unbehandelt zu schwerer geistiger Retardierung. Bei Manifestation klinischer Symptome ist eine Therapie nicht mehr effektiv. Eine frühzeitige Diagnose möglichst noch im Neugeborenenalter ist essentiell. Diese erfolgt im Rahmen eines flächendeckenden Neugeborenen Screenings, welches nach der 36. Lebensstunde erfolgt und unter anderem die Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin als Marker für eine Hyperphenylalaninämie umfasst. Bei positivem Screening folgt eine

quantitative Bestimmung von Phenylalanin und Tyrosin zur Bestätigung der Hyperphenylalaninämie im Blut. Liegt diese mit einer Plasmaphenylalanin-Konzentration von über 120  $\mu\text{mol/l}$  vor, wird im Folgenden eine Störung des Biopterinstoffwechsels als Ursache der Phenylalaninerhöhung ausgeschlossen, die in 1 – 3 % aller Fälle vorliegt. Hierzu wird ein standardisierter oraler Belastungstest mit Tetrahydrobiopterin (20 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt, die Ausscheidung von Pterinen im Urin bestimmt und eine Messung der Dihydropteridinreduktase-Aktivität im Blut vorgenommen. Zeigt sich ein normales Pterin-Muster im Urin ohne Phenylalaninabfall im Blut nach  $\text{BH}_4$ -Gabe, besteht ein Phenylalaninhydroxylase-Mangel. Mittlerweile werden auch Varianten der Phenylketonurie beschrieben, die durch Abfall des Phenylalanins unter  $\text{BH}_4$ -Gabe ( $\text{BH}_4$ -sensitive Phenylketonurie) charakterisiert sind [90].

Bestätigt sich in einer wiederholten Messung eine Plasmaphenylalanin-Konzentration von unter 600  $\mu\text{mol/l}$ , liegt eine Hyperphenylalaninämie vor. Eine phenylalaninarme Diät, die vorsorglich bei der Diagnose des Phenylalaninhydroxylase-Mangels begonnen wurde, ist jedoch nur bei der klassischen und milden PKU mit Plasmaphenylalanin-Konzentrationen von über 600  $\mu\text{mol/l}$  notwendig.

#### **1.4.4 Molekulargenetik**

Es sind derzeit über 500 unterschiedliche Mutationen des menschlichen Phenylalaninhydroxylase Gens identifiziert, die zu dem klinischen Bild einer Hyperphenylalaninämie führen [112, 113, 150]. Weiterhin sind derzeit 41 Polymorphismen bekannt [112]. Für viele dieser Mutationen ist neben den Informationen über die Haplotypisierung und die geschichtliche Entwicklung in einer Population auch der Effekt auf Aktivität und Struktur des PAH-Enzyms bekannt [45, 150]. So können schon durch Kenntnis der genetischen Veränderungen Aussagen über die Schwere und den Verlauf der Krankheit gemacht werden [45]. Neben den direkt auf die Funktion der PAH einwirkenden Effekten zeigen sich einige der Mutationen sensitiv auf die Anwesenheit des Cofaktors  $\text{BH}_4$  (vgl. 1.4.4.3).

In der Mehrheit (ca. 63 %) kommen Punktmutationen vor, die zu einem intrazellulären Abbau der Proteine durch Aggregation oder Destabilisierung führen; seltener führen sie

schon bei der Translation zu einem Verlust der Proteine oder schaffen eine neue Splice Site [113].

Durch die große Anzahl der Mutationen ergibt sich eine umfangreiche Vielfalt an zusammengesetzten Phänotypen. Dabei werden Klinik und Phänotyp von der milder verlaufenden Variante der beiden pathologischen Allele im Falle einer komplexen Heterozygotie bestimmt [45].

#### **1.4.4.1 Einteilung der Hyperphenylalaninämien**

Die Phenylketonurie gehört zu einer Gruppe von Krankheiten, den Hyperphenylalaninämien, die sich alle durch einen erhöhten Phenylalaningehalt in Geweben und Körperflüssigkeiten auszeichnen. Neben der PKU und der non-PKU Hyperphenylalaninämie, die zusammen 98 % aller Hyperphenylalaninämiefälle ausmachen, kommen noch als weitere Manifestation die transiente neonatale Hyperphenylalaninämie, der BH<sub>4</sub>-Mangel und die sekundäre Hyperphenylalaninämie (z. B. die Tyrosinämie) vor [91, 112, 113].

##### **1.4.4.1.1 Einteilung nach dem Phänotyp**

Eine Einteilung der Phenylketonurie und der non-PKU Hyperphenylalaninämien wird nach der residualen Enzymaktivität und dem hieraus resultierenden Phänotyp vorgenommen [49, 52]. Das breite Spektrum der Phänotypen, die im klinischen Alltag zu beobachten sind, wird in vier Gruppen eingeteilt. Neben der klassischen PKU werden die milderen Verlaufsformen der PKU noch zusätzlich unterteilt: moderate PKU, milde PKU und Hyperphenylalaninämie (vgl. Tabelle 1). In anderen Klassifikationen werden milde und moderate PKU zusammengefasst [50]. Bei der leichten Form der Hyperphenylalaninämie treten keine neurologischen Schäden auf, so dass keine Phenylalaninrestriktion durch Diät erforderlich ist [49, 110].

### 1.4.4.1.2 Einteilung nach dem Genotyp

Eine weitere Einordnung der PKU wird nach dem Genotyp der PAH vorgenommen. Dabei werden sowohl beide Allele isoliert als auch gemeinsam betrachtet. Das Zusammenwirken zweier unterschiedlicher Mutationen und der hieraus resultierende genotypische Effekt kann jedoch nicht exakt vorhergesagt werden, sodass eine 80 % – 95 % Einschätzung des resultierenden Phänotyps möglich ist [45, 63].

Durch die allelischen Mutationen wird entweder die Translation der mRNA gestört oder das PAH-Protein aufgrund seiner veränderten Struktur von der Zelle abgebaut [77, 78]. Durch die vielförmigen Veränderungen des PAH-Proteins weisen die veränderten Enzyme eine unterschiedliche Restaktivität auf. Diese Restaktivität beeinflussen zusätzlich weitere, z. T. noch unbekannte, Faktoren (vgl. 1.4.4.2).

Die weniger gravierende Mutation mit der höheren residualen Enzymaktivität legt die Schwere der Krankheit bei heterozygoten Patienten fest [45]. Die residuale Enzymaktivität der einzelnen Mutation wird nach dem Prinzip der funktionellen Hemizygotie ermittelt. Bei heterozygoten Patienten mit einer sogenannten Null-Mutation, d.h. einer Mutation mit totalem Ausfall der Enzymaktivität, wird die residuale Aktivität der zweiten Mutation zugeordnet [43, 45].

Mit einem einfachen Schema ist eine vorläufige Charakterisierung des resultierenden Phänotyps auf der Basis der einzelnen Mutationen möglich [45, 63].

Tabelle 1: Zusammenwirken der PAH-Mutation und resultierender metabolischer Phänotyp [45]				
	2. Mutation			
	Klassische PKU	Moderate PKU	Milde PKU	MHP
1. Mutation	Resultierender Phänotyp			
Klassische PKU	klassisch	moderat	mild	MHP
Moderate PKU		moderat / mild	mild	MHP
Milde PKU			mild / MHP	MHP
MHP				MHP

#### 1.4.4.2 Genotyp-Phänotyp Korrelationen der Mutationen der PAH

Während bei einigen Mutationen der totale Ausfall der enzymatischen Funktion offensichtlich ist (z. B. „Frameshift“ Mutationen, „Nonsense“ Mutationen oder „Splice-Site“ Mutationen), ist die Aktivität des Enzyms bei einer Substitution einer einzelnen Base nicht direkt abzuleiten [37]. Die große beobachtete interindividuelle Heterogenität von metabolischen Phänotypen bei der PKU kann nicht alleine durch das Auftreten von unterschiedlichen Genotypen der PAH erklärt werden [92]. So wurden neben eineiigen Zwillingen mit gleichem Geno- und Phänotyp [52] auch Fälle dokumentiert, die trotz identischen Genotyps deutliche Unterschiede im Phänotyp erkennen ließen [35, 45, 64, 111, 140].

Durch das Auftreten von verschiedenen Mutationen in den drei funktionell unterschiedlichen Domänen wird nur ein Teil der phänotypischen Schweregrade erklärt [29]. Obwohl die Mutationen selbst einen quantitativen Effekt auf die Aktivität des PAH-Enzyms besitzen, spielen weitere Faktoren, die alle unter einer separaten genetischen Kontrolle stehen, bei der Ausbildung des metabolischen Phänotypen eine Rolle [37, 96]. Neben den Cofaktoren sind u. a. die Regulation der Enzymsynthese und das Ausmaß des proteolytischen Abbaus von defekten Proteinen von Bedeutung [52]. In *in vitro* Expressionsstudien wird eine reduzierte Gesamtzymaktivität von veränderten aber noch enzymatisch funktionsfähigen Proteinen nachgewiesen [140]. Diese Strukturänderungen, die entweder die Stabilität des Proteins direkt oder die Faltung betreffen, provozieren einen erhöhten Abbau der veränderten Proteine auf zellulären Niveau [37, 140]. Durch *in vitro* Expressionsstudien mit rekombinanten Formen der menschlichen PAH konnten wenigstens drei Gruppen von Mutationen unterschieden werden, die sich hinsichtlich ihrer Kinetik und ihrer Stabilität *in vivo* voneinander unterscheiden: (a) Mutationen, die die enzymatische Aktivität betreffen, (b) Mutationen, die die kinetischen Eigenschaften des Enzyms verändern und (c) Mutationen, die die Aktivität und Kinetik beeinflussen [33].

#### 1.4.4.3 Mutationen des PAH-Gens mit BH<sub>4</sub>-Sensitivität

Verschiedene Mutationen des PAH-Gens zeigen sich sensitiv für eine BH<sub>4</sub>-Behandlung; dabei weisen die Träger zumeist den Phänotyp einer milden Hyperphenylalaninämie auf [74, 76, 83, 90, 93, 121, 133]. Bei einem Teil der sensitiven PAH-Mutationen, die sich alle in der katalytischen Domäne (Exon 6 bis Exon 12) der PAH finden, wurde bei der Expression in eukaryotischen Zellen eine residuale Enzymaktivität von wenigstens 25 % aufgezeigt [112]. Es wird vermutet, dass einige Mutationen des PAH-Gens in einer Km-Variante des PAH-Enzyms resultieren, die durch Behandlung mit BH<sub>4</sub> in ihrer Aktivität gesteigert werden kann [9]. Andere mögliche Mechanismen der BH<sub>4</sub>-induzierten Steigerung der Enzymaktivität sind eine gesteigerte Bindungsaffinität des BH<sub>4</sub> infolge eines Überangebots, ein BH<sub>4</sub>-vermittelte Steigerung der PAH-Expression oder die Stabilisierung des veränderten PAH-Proteins [122]. Da allerdings Patienten mit gleichem Genotyp bzw. Patienten mit gleicher Punktmutation eine unterschiedliche Sensitivität auf eine BH<sub>4</sub>-Substitution besitzen, werden weitere zur Zeit noch unbekannte Faktoren in der Regulation der PAH-Aktivität bei BH<sub>4</sub>-Gabe vermutet [76, 83].

Die bis heute bekannten Mutationen der Phenylalaninhydroxylase [114] sind zu einem überwiegenden Teil auf den Exonen lokalisiert, ein kleiner Teil ist im Bereich der Introns zu finden [112, 113].

#### 1.4.5 Klinik

Patienten mit einer unbehandelten Phenylketonurie zeigen 4 bis 6 Monate nach Geburt erste klinische Symptome [129]. Es entwickelt sich eine progrediente und irreversible mentale Retardierung mit Atrophie des Gehirns, die in einer Imbezillität bis Idiotie resultiert [59, 69, 132]. Hinzu kommen neurologische Symptome in variabler Ausprägung wie cerebrale Krampfanfälle, extrapyramidale und pyramidale Symptome. In der Regel zeichnen sich nicht behandelte Patienten durch eine hellere Haar- und Hautfarbe gegenüber den Eltern aus, die Folge einer Pigmentstörung durch eine gestörte Melaninsynthese aufgrund eines Tyrosinmangels ist. Phenylacetat verursacht den charakteristischen „mäuseartigen“ Geruch von Urin und Schweiß [91, 129]. Etwa ein



Drittel der unbehandelten Säuglinge, selten Kinder höherer Altersstufen, weisen ekzematöse Hautveränderungen auf. Des Weiteren zeigen sich Verhaltensanomalien wie Aggressivität, abnorme Ängstlichkeit, Erethismus, Autismus oder psychotische Symptome [79, 91, 129]. Ferner werden bei unbehandelten Patienten motorische Störungen beobachtet, die sich in einer eigentümlichen Sitzposition und Körperhaltung ausdrücken [99, 126].

Obwohl der biochemische Defekt der Myelinisierungsstörung bekannt ist, ist der genaue Mechanismus bzw. die toxischen Metabolite weiterhin unbekannt [90]. Die Prognose der Patienten verbessert sich durch eine früh beginnende phenylalaninarme Diät, wobei mit zunehmendem Alter die Auswirkung des erhöhten Phenylalaninspiegels auf die neuropsychologische Funktion nachlässt [7, 49]. Doch auch im höheren Kindesalter und jenseits der Pubertät kann eine ungehemmte Phenylalaninaufnahme zu intellektuellen Defiziten und zu einer herabgesetzten kognitiven Gehirnfunktion mit Schulproblemen und Lernstörungen führen [21, 142].

#### **1.4.6 Therapie**

Behandelt wird die Phenylketonurie mittels einer phenylalaninarmen Diät, die in der Stillzeit beginnen und lebenslang durchgeführt werden sollte [57]. Mit einer strikt eingehaltenen Diät wird Symptomen wie mentaler Retardierung oder neurologischen Komplikationen effektiv vorgebeugt [51]. Eiweißreiche Nahrungsmittel wie Fleisch, Fisch, Eier, Milch, Käse und Nüsse müssen durch Teigwaren, Mehl und spezielles proteinarmes Brot ersetzt werden, um den täglichen Kalorienbedarf zu decken. Zusätzlich erhalten betroffene Patienten spezielle phenylalaninfreie Aminosäuremischungen, um den Eiweißbedarf zu decken [123]. Ziel ist ein Phenylalanin-Blutspiegel von unter 240  $\mu\text{mol/l}$  bis zum 10. Lebensjahr, bis zum 16. Lebensjahr von unter 900  $\mu\text{mol/l}$  und danach von unter 1200  $\mu\text{mol/l}$  [143].

Frauen mit PKU haben bei unzureichender Therapie und hohen Plasma-Phenylalaninspiegel ein hohes Risiko für eine fetale Schädigung während einer Schwangerschaft (maternale PKU). Um bei einer maternalen PKU das Risiko eines Schadens des Kindes im Mutterleib zu senken, wird mit einer strengen phenylalaninarmen Diät der Mutter schon vor der Konzeption begonnen [11, 15, 25,

104]. Das Therapieziel der Plasmaphenylalanin-Konzentration liegt bei unter 360  $\mu\text{mol/l}$  [143]. Bei Kindern von Müttern mit maternaler PKU ohne Diät treten unter anderem mehr kongenitale Herzfehler und Gefäßstenosen als in einer Vergleichspopulation auf [11].

Eine Lebertransplantation stellt aufgrund der fehlenden Affektion der Leber bei PKU und des guten Ansprechens der Patienten auf eine Diät eine theoretische, wenngleich ungewöhnliche Therapiemaßnahme dar [136].

Die Gentherapie der PKU scheitert derzeit an fehlenden effektiven Vektoren für den Gentransfer in vivo [24, 30].

## **1.5 Kosten-Nutzenrechnung**

### **1.5.1 Vorsorge und Kosten-Nutzen Rechnung für die PKU**

Der medizinische Nutzen der Früherkennung einer Krankheit ist im Falle der Phenylketonurie eindrucksvoll zu demonstrieren. Während ein unbehandelter Patient schwerste neurologische Defizite entwickelt und sich zeitlebens nicht selbständig versorgen kann, kann durch eine früh einsetzende phenylalaninarme Diät eine normale geistige Entwicklung mit normaler Lebensperspektive erwirkt werden. Die durch eine Diät gewonnene Lebenszeit mit einer hohen Lebensqualität wird auf durchschnittlich 49 Jahre geschätzt [13].

In mehreren Kosten-Nutzen Studien aus acht verschiedenen Ländern wird ein finanzieller Vorteil des PKU-Screeningprogramms nachgewiesen. Obwohl zum Teil große Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Studien auftreten, ist die Aussage, dass der finanzielle Nutzen der PKU-Prävention die anfallenden Kosten übersteigt, einheitlich. Der Netto-Gewinn bleibt selbst unter den schlechtesten Bedingungen („worst case scenario“) positiv [2, 8, 13, 17, 20, 39, 55, 70, 124, 138, 139, 141, 145]. Auf der Basis einer retrospektiven systematischen Auswertung der Literatur und einer Modellrechnung wird für England die Vorsorge als finanziell günstiger gegenüber einer Behandlung eingeschätzt. Hierbei werden Kosten für das Screening, Kosten für die Behandlung bzw. die Diät und ein Ausfall der Produktivität des Patienten berücksichtigt

und gegenübergestellt. Es wird ein durchschnittlicher Netto-Benefit von 143.300 £ (ca. 206.400 €) pro Jahr an Behandlungs- und Screeningskosten kalkuliert, zuzüglich 153.100 £ (ca. 220.500 €), die bei einem Ausfall der Arbeitskraft entstehen [84, 130]. Für angenommene 70 PKU-Fälle pro Jahr in England, sind somit Einsparungen in Höhe von 6,5 Millionen £ (ca. 9,36 Millionen €) pro Jahr möglich [119].

### **1.5.2 Der Kostenbegriff [47]**

Die Erzeugung eines Produktes durch unterschiedliche Produktionsverfahren, z. B. der Suche einer genetischen Mutation in einem Genpool, verursacht verschieden hohe Kosten. Um diese Kosten miteinander vergleichen zu können, werden sie in einzelne Faktoren einer Produktionseinheit untergliedert, ohne die die gesamte Einheit nicht funktionsfähig wäre. Als Beispiel hierfür sei eine PCR-Reaktion angeführt, die ohne die Faktoren Maschinenarbeit, menschliche Arbeitskraft, Strom, Material-, Proben- und Chemikalieneinsatz nicht betriebsbereit ist.

Die Kosten eines Produktes setzen sich zusammen aus der Menge der eingesetzten Faktoren und den Faktorpreisen. Hierunter sind Sachgüter, Werkstoffe, Arbeitsleistungen und Dienstleistungen multipliziert mit ihren Preisen, zuzüglich Steuern und öffentlicher Abgaben zu verstehen.

Die eingesetzten Faktoren unterliegen zudem der technisch-organisatorischen Beschaffenheit der Produktionsbedingungen: Nach dem Ertragsgesetz Typ B wird eine Minimalkostenkombination dann erreicht, wenn von den Faktoren genauso viel Mengen eingesetzt werden, wie es die technischen Gegebenheiten erlauben. Die technisch-organisatorischen Beschaffenheiten unterliegen im Zeitablauf Schwankungen, die sich auf Dauer ausgleichen.

Auch sind die Proportionen der Faktoren untereinander entscheidend. Eine Produktion kann nur dann mit minimalen Kosten betrieben werden, wenn die eingesetzten Faktoren untereinander in einem optimalen Verhältnis stehen. Nur eine gleichzeitige Vermehrung oder Verminderung aller eingebundenen Faktoren unter Berücksichtigung der technischen Gegebenheiten führt zu der gewünschten produktiven Wirkung.

Ferner spielt die Qualität der Faktoren eine Rolle, die sich in der Preis-Qualität-Relation der geleisteten Arbeit widerspiegelt.

Die Kosten der Faktoren verhalten sich gegenüber Änderungen der Produktmenge nicht gleichartig. Kosten, die sich Produktmengenänderungen gegenüber indifferent verhalten, werden als konstante Kosten bezeichnet. Kosten, die mit der Produktmenge variieren, werden variable Kosten genannt.

## **1.6 Methoden**

### **1.6.1 Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

Das Prinzip der „Single-strand Conformation Polymorphism“ basiert auf der ungleichen Migrationsgeschwindigkeit von DNA- oder RNA-Einzelsträngen unterschiedlicher Sequenz in nicht denaturierenden Gelen [98, 106]. Durch intramolekulare Wechselwirkungen der benachbarten Basenpaare wird die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Nukleotidstranges gebildet, wobei derzeit kein adäquates theoretisches Modell existiert, um eine drei-dimensionale Konformation einer einsträngigen Nukleotidsequenz vorher zu sagen [54]. In einer neutralen Umgebung führen heterogene Nukleotidsequenzen, die durch Veränderungen der Basenfolge entstehen, zu unterschiedlichen Konformationen. Aufgrund dieser Unterschiede in der räumlichen Anordnung des Einzelstrangs ergibt sich ein verändertes Laufverhalten mit Abweichungen des Bandenmusters in der Elektrophorese [98].

Die Länge des DNA-Stranges hat auf die Auffindung einer Punktmutation in einer SSCP einen größeren Einfluss als die Position oder die Art des Basenaustausches [54, 118]. Die besten Ergebnisse mit einer Sensitivität von 80 % bis 100 % Detektionsrate werden mit DNA-Fragmenten in einer Länge von 100 – 300 Basenpaaren erzielt [54, 118, 135]. Für längere Fragmente von 400 – 500 Basenpaaren sind Anpassungen der Laufkonditionen der Gel-Elektrophorese notwendig, insbesondere der Verwendung eines Puffers mit niedrigen pH-Wert [62, 73]. Allerdings muss gleichzeitig eine Reduzierung der Validität des Verfahrens in Kauf genommen werden [54, 62, 118]. Weitere Einflussgrößen bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten durch eine SSCP sind die Temperatur, Salzkonzentration von Gel und Puffer sowie Zusätze zur Gelmatrix wie z. B. Glycerol oder Harnstoff. Weiterhin ist die Wahl der Gelmatrix an sich bzw. die verwendete Porengröße oder die Menge der zu trennenden Proben zu

berücksichtigen [38, 54]. Die Sensitivität der Methode kann gesteigert werden, wenn die einzelnen Analysen bei verschiedenen Konditionen wiederholt durchgeführt werden [38, 62, 135].

So zeigt sich bei Untersuchungen des Gens der zystischen Fibrose mit der SSCP-Analyse eine Sensitivität von 75 – 98 % [62, 102], des Tumorsuppressorgens p53 eine Sensitivität von 90 % [16] und des lacI-Gens eine Sensitivität von 96,3% [135]. Bei Untersuchungen von Genmutationen der Maus für Globin, p53 und Rhodopsin variiert die Sensitivität je nach untersuchter Fragmentlänge zwischen 3 % (bei 600 Basenpaaren) und 97 % (bei 155 Basenpaaren) [118]. Die SSCP-Analyse erweist sich bei Untersuchungen des PAH-Gens bis zu 93 % sensitiv [53, 137].

### **1.6.2 DNA-Sequenzanalyseverfahren**

Seit der Entdeckung der doppelsträngigen Struktur der DNA durch Watson und Crick (1953) gehört die Technologie der DNA-Sequenzuntersuchung zu den Standardverfahren der modernen Molekularbiologie. Die Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977) stellt das zur Zeit am häufigsten verwendete Verfahren dar, wobei im Rahmen der Amplifikation eines einzelsträngigen DNA-Stranges basenspezifische Abbrüche des neusynthetisierten komplementären Stranges erzeugt werden [106]. Hierfür werden neben 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten (2'dNTP) auch kleine Mengen 2',3'-Dideoxytriphosphaten-5'-triphosphats (2',3'ddNTP) der Amplifikation beigefügt, die infolge einer fehlenden OH-Gruppe an der 3'-Position der Desoxyribose zu einem Syntheseabbruch führen [101]. Als Ansatzpunkte für die Neusynthese durch eine DNA-Polymerase, gewonnen aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* [14], werden spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, verwendet [107]. Die anfangs verwendeten radioaktiven Marker wurden durch laserinduzierte Fluoreszenzmessung ersetzt, bei denen ein fluoreszierender Marker an dem 5'-Ende des synthetisierten Oligonukleotids heftet [120]. Die derzeit bei den DNA-Sequenzuntersuchungen verwendeten fluoreszierenden Stoffe weisen ein Emissionsspektrum entweder im sichtbaren Bereich von 450 – 600 nm oder nahe des Infrarots mit 650 – 860 nm auf [125]. Um zwischen einzelnen Fluorophoren unterscheiden zu können, macht man sich sowohl das Verhältnis ihrer Fluoreszenzdauer als auch die emittierte Lichtfarbe zunutze.

Mit dem Einsatz von Laserdetektoren und Computern im Arbeitsablauf und Auswertung wird die DNA-Sequenzuntersuchung vereinfacht und beschleunigt [120].

#### **1.6.2.1 Die DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L [18, 81, 106-108, 116]**

In vier getrennten Parallelansätzen werden DNA-Fragmentscharen amplifiziert, die an der A-, G-, C- oder T-Position statistisch verteilte Unterbrechungen aufweisen. Die so entstandenen DNA-Stränge unterscheiden sich in ihrer Länge vom nächst größeren Fragment teilweise nur durch eine Base. Diese werden manuell auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, wobei jeder Parallelansatz in eine eigene Bahn pipettiert wird. Durch den denaturierenden Charakter des Gels wandern die DNA-Fragmente unabhängig von ihrer Sequenz und Basenzusammensetzung durch das Polyacrylamidgel. DNA-Fragmente, die in der Länge um ca. 0,2 % variieren, ergeben separate, voneinander durch die Lauflänge getrennte, Banden. In der Zusammenschau der vier Parallelansätze einer DNA-Probe wird die Nukleotidsequenz des DNA-Stranges abgelesen.

#### **1.6.2.2 Die kapillare DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700**

Durch das Verfahren der kapillaren Elektrophorese, in welchem die DNA-Fragmente durch ein unverzweigt-kettiges Polyacrylamidgel aufgetrennt werden, ist es möglich, die DNA-Sequenzuntersuchungen 24 Stunden pro Tag ohne Unterbrechung durchzuführen [105, 128]. Der innere Durchmesser einer Kapillare beträgt dabei 0,1 mm oder weniger, wobei mehrere Kapillaren zu einer Kassette gebündelt sind. Bei dem automatischen Verfahren der elektrokinetischen Beladung wird nur eine kleine Menge an negativ geladenem Probenmaterial durch eine angelegte elektrische Spannung in eine Kapillare gezogen. Da neben kleineren Fragmenten auch Eisen oder Salze angezogen werden, ist es notwendig, maximal aufgereinigte Proben zu verwenden. Bei der Wanderung durch die Kapillaren werden die Proben aufgetrennt, und im Anschluss automatisch auf eine spezielle Vorrichtung übertragen („multi-sheath flow“). Hier werden die Proben, außerhalb der Kapillare und somit unbeeinflusst durch die Kapillarwand, mit dem Laser angeregt. Der Laser regt die unterschiedlichen Fluorophore zu einer Fluoreszenz

unterschiedlichen Lichtes an, welches durch einen 4-Farben Detektor gemessen wird. Die zweidimensionale Messung der laserinduzierten Fluoreszenz, bei der neben der Wellenlänge des reflektierten Lichtes auch die Lage der Kapillare im Raum betrachtet wird, erlaubt die Analyse mehrere Proben zugleich [65, 72].

## **2 Fragestellung**

Während in Screeninguntersuchungen die Träger eine angeborenen Stoffwechselerkrankung wie der Phenylketonurie identifiziert werden können, sind für die Bestätigungsdiagnostik durch Mutationsanalyse weitere molekulargenetische Untersuchungen notwendig. Für Screeninguntersuchungen wurden in der Vergangenheit bereits effektive Methoden etabliert und auf ihre Kosteneffizienz hin untersucht. Auch wurde der ökonomische Vorteil dieser Screenings sowie der notwendigen Präventivmaßnahmen im Vergleich zu den im Krankheitsfall folgenden Therapiekosten deutlich herausgestellt [6, 20, 36, 55, 84]. Eine betriebswirtschaftliche Analyse der molekulargenetischen Verfahren zur Mutationsbestimmung wurden bislang nur vereinzelt durchgeführt.

Bei der Mutationsanalyse stellt sich, neben der Identifizierung der krankheitsverursachenden Mutationen, die Frage nach der Kosteneffizienz. Zum einen sind die zu untersuchenden Patientenkollektive unterschiedlich groß, zum anderen zeigen sich die unterschiedliche molekulargenetische Methoden für einzelne Mutationstypen unterschiedlich sensitiv. Auch sind unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Mutationssuche mit Vorscreenings zum Auffinden des defekten Exons denkbar. Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Strategien der molekulargenetischen Charakterisierung am Beispiel der Phenylketonurie nach betriebswirtschaftlichen Kriterien unter Berücksichtigung von Sensitivität und Spezifität der einzelnen Verfahren zu vergleichen und zu bewerten. Darüber hinaus sollen operative Vorschläge für ein kosteneffektives Management und eine Optimierung der molekulargenetischer Charakterisierung von Patienten mit angeborenen Stoffwechselerkrankungen erarbeitet werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probensammlung und Probenaufbereitung**

##### **3.1.1 Patientenkollektiv**

Die Patienten wurden im Rahmen des Neugeborenen Screenings identifiziert und in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Münster charakterisiert. Das Alter der Patienten und der klinische Ausprägungsgrad der PKU wurden dabei erfasst. Das Patientenkollektiv setzt sich in dieser Studie aus insgesamt 23 Kindern zusammen, wobei 22 der Patienten aus Deutschland und ein Patient aus der Türkei stammt. Die genetischen Untersuchungen erfolgten mit dem Einverständnis der Patienten oder deren Eltern im Rahmen der klinisch relevanten Diagnostik.

##### **3.1.2 Blutproben für eine DNA-Bibliothek**

Patienten werden 1 - 5 ml venöses Vollblut entnommen und dieses durch Zusatz von EDTA ungerinnbar gemacht.

##### **3.1.3 Isolierung von genomischer DNA**

Die Präparation von genomischer DNA aus EDTA-Vollblut erfolgt nach der von Müller (1975) beschriebenen Methode [117]. Hierzu wird das EDTA-Vollblut mit Lysispuffer (Ammoniumchlorid, 155 mM; Kaliumhydrogencarbonat, 10 mM; Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1 mM; Aqua dest. ad 1 l, pH 7,4) versetzt, zentrifugiert und mit SDS-Puffer (Lauryl-Sulfat, 2 g; Aqua dest. ad 100 ml), Proteinase K (Boehringer, Deutschland) und SE-Puffer (Natriumchlorid, 75 mM; Na<sub>2</sub>EDTA, 25 mM; Aqua dest. ad 1 l, pH 8,0) über Nacht inkubiert. Nach Fällung mit Ethanol und Waschen mit 70 % Alkohol wird die genomische DNA in 500 µl TE-Puffer (Tris-HCL, 10 mM, pH 7,5; EDTA, 1 mM, pH 8,0) gelöst und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.



## **3.2 Untersuchungen zur Genotypisierung**

### **3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

#### **3.2.1.1 PCR – Amplifikation von genomischer DNA**

Für die Amplifikation der genomischen DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion nach Mullis (1987) wird die thermostabile Taq-DNA-Polymerase (QIAGEN, Hilden, Deutschland) des Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet [14, 89]. In einen Reaktionsansatz werden 2 µl Reaktionspuffer (10fach), 2 µl dNTP (2mM), jeweils 1 µl 5'- und 3'-Oligonukleotide (20 pmol/µl), 1 µg native DNA (0,2 - 0,5 µg), 0,1 µg Taq-DNA-Polymerase (0,5 U/µl) und 13 µl Aqua dest. pipettiert. Die Hybridisierungstemperaturen der einzelnen Oligonukleotide sind von dem Hersteller (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland) vorgegeben. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgt bei 4 °C.

#### **3.2.1.2 Geräte**

Es werden PCR-Geräte der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) verwendet. Bei einem Gerät ohne Deckelheizung (Omni Gene Temperature Cycler, MWG-Biotech) werden die Reaktionsansätze zusätzlich mit 15 µl Mineralöl (Sigma, Deutschland) überschichtet, um Konzentrationsänderungen durch Verdunstung während der PCR-Reaktion zu vermeiden.

#### **3.2.1.3 Oligonukleotide**

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) werden von der Firma MWG-Biotech GmbH (Ebersberg, Deutschland) nach eigenen Vorgaben hergestellt (vgl. Tabelle 2) [148]. Für die Amplifikationen werden sie in einer Endkonzentration von 20 pmol/µl verwendet.

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Amplifikation der PAH-Exone [148]			
Exon Nr.	Primer-Sequenz		Fragmentlänge
1	reverse	5'- gga tct ctt tct ctg gag gc - 3'	341
	forward	5'- agg tga cct gga gca tcc - 3'	
2	reverse	5'- gct caa att caa atc tgc ctg ttc c - 3'	320
	forward	5'- gaa aga gtt cat gct tgc ttt gtc c - 3'	
3	reverse	5'- gtc cac tca ttt aat ccc cc - 3'	463
	forward	5'- ggt ttt cct gtt ctg gtt ctg c - 3'	
4	reverse	5'- gta gag aag gta aga gga agg g - 3'	211
	forward	5'- gtt ctg cca atc tgt act cag g - 3'	
5	reverse	5'- aac tgg atg agg gca agg gag aag c - 3'	257
	forward	5'- ggg aag gag aca tgc act gtc atg g - 3'	
6	reverse	5'- cat act tgt ctt ccc ctt ccc - 3'	344
	forward	5'- cta acc tgc att ctg ctg tgc - 3'	
7	reverse	5'- caa acc tca ttc ttg cag cag g - 3'	285
	forward	5'- act acc aaa ggt ctc cta gtg c - 3'	
8	reverse	5'- ggt ggg atc ata gaa ctg tac c - 3'	259
	forward	5'- tga gtc tgg ctt ggc tta aac c - 3'	
9	reverse	5'- agt ttc aaa gac ctg agg gc - 3'	243
	forward	5'- tat gtg ggc tgt tct gaa gg - 3'	
10	reverse	5'- ccc agg ttg cat atc aaa acg g - 3'	290
	forward	5'- gta tcc ctt cat cca gtc aag g - 3'	
11	reverse	5'- ggt aca aag ttg ctg tag aca ttg gag tcc - 3'	357
	forward	5'- aag gaa tcg ggg tga gat gag aga agg ggc 3'	
12	reverse	5'- tat ttt tcc tat ggc gat gg - 3'	241
	forward	5'- cca aat ggt gcc ctt cac tca agc cc - 3'	
13	reverse	5'- ttc taa ggc agt gag agg - 3'	1086
	forward	5'- agc tcc ttg aaa gtt ggg - 3'	

Tabelle 2: Am 5'-Ende jeweils angefügt die universelle Primerbindungsstelle (sense: tgt aaa acg acg gcc agt, antisense: cag gaa aca gct atg acc)

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Nach jeder PCR wird eine Kontrolle der Amplifikate mittels einer Gelelektrophorese in einem 2 % Agarosegel durchgeführt. Jeweils 2 µl der Proben, versetzt mit 2 µl Bromphenolblau, werden gegen einen Leerwert verglichen. Hierzu werden horizontale Gelelektrophoresekammern (Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis System, Biorad, Deutschland) mit TAE-Laufpuffer (Tris 2 M; EDTA 100 mM; Eisessig 57,1 ml/l, pH 8,0) eingesetzt. Die Proben werden in 20 µl Geltaschen pipettiert, der Lauf findet bei Spannungen zwischen 100 und 180 Volt statt. Das Ergebnis der aufgetrennten DNA wird durch Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (302 nm) visualisiert. Die UV-Beleuchtung erfolgt mittels des Ultra-Violett-Transluminator (Herolab, Deutschland) und die so gewonnenen Bilder werden mit einer Digitalkamera aufgenommen und auf Thermopapier ausgedruckt bzw. digital gespeichert.

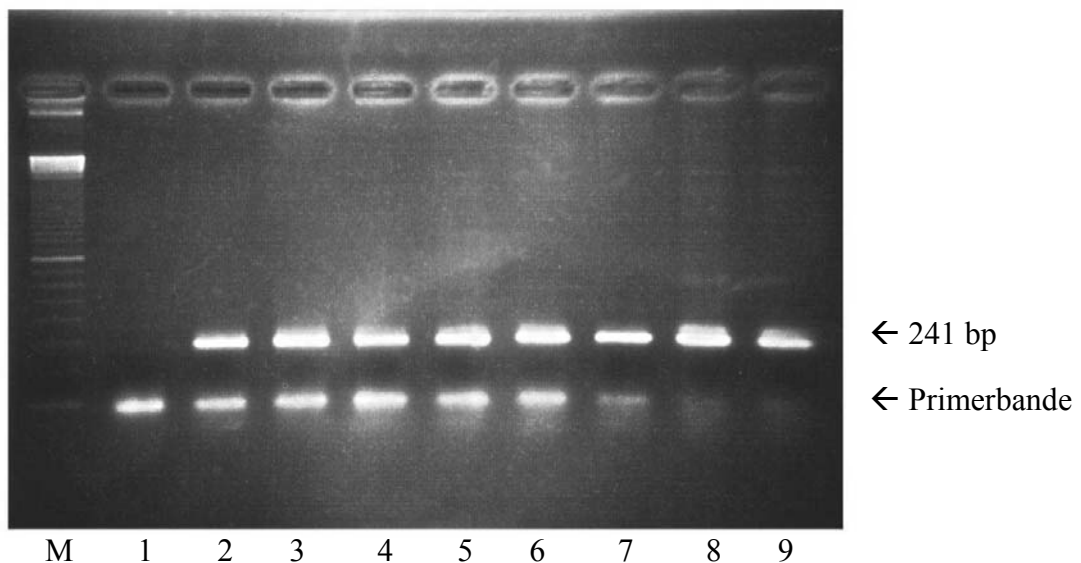


Abbildung 1: Beispiel eines Kontroll-Agarosegels, hier Exon 12 des PAH-Gens

Spur 1: Leerwert / Kontrolle, Spur 2 - 9: Patient 9 - 16, M: Längenmarker

### 3.2.3 Reinigung von Nukleinsäuren

In einer Gelelektrophorese mit einem 2 % Agarosegel werden jeweils 10 µl DNA, versetzt mit 10 µl Bromphenolblau, aufgetrennt. Nach Auftrennung wird die spezifische

DNA-Fragment-Bande aus dem Gel isoliert und mit dem „QIAquick PCR Extraction System“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt (QIAquick PCR Extraction Kit Protocol). Die gereinigte DNA wird in 25 µl Aqua bidest., erwärmt auf 50 °C, gelöst und bei 4 °C gelagert.

### **3.2.4 DNA-Sequenzanalyseverfahren**

#### **3.2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion / DNA-Sequenzreaktion mit markierten Primern**

Für diese PCR-Reaktion wird der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham, Deutschland) verwendet. Für jedes Exon werden je vier Reaktionsansätze pipettiert, bestehend aus PCR - Produkt (4 oder 6 µl, vgl. unten), DMSO (99,9 %, 1 µl), Aqua dest. (ad 25 ml) und ein mit IRD41 (Infrarot-Farbstoff) markierter Primer (M13-Universal oder M13-Reverse; 20 pmol/ml, 1 µl, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Je ein Reaktionsansatz wird mit 2 µl der „A-, „C-, „G- oder „T-Reagenz“ („Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“, Amersham, Deutschland) beladen, in welcher die Thermo-Sequenase-DNA-Polymerase bereits enthalten ist.

Die in der DNA-Sequenzreaktion eingesetzte Menge an amplifizierter DNA wird über die Leuchtintensität und Bandenstärke der Agarosegel-Kontrolle bestimmt. Bei starken Banden und somit höherer Konzentration werden 4 µl amplifizierter DNA, bei schwachen Banden mit niedriger Konzentration 6 µl für die DNA-Sequenzreaktion verwendet.

Für die PCR wird das folgende Reaktionsprogramm verwendet: Nach einem 4 Minuten langen Denaturierungsschritt bei 94 °C erfolgen 30 Zyklen von je einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden Dauer bei 94 °C, einem Annealingschritt von 30 Sekunden Dauer bei 56 °C und einem Elongationsschritt von 30 Sekunden Dauer bei 72 °C. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C im PCR-Block gekühlt.

### 3.2.4.2 DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L

Für alle DNA-Sequenzuntersuchungen wird der halbautomatische Sequenzierer LI-COR 4000L (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) mit Laser-Fluoreszenz-Detektion verwendet. Hierfür wird ein 4 % Polyacrylamidgel (Long Ranger Polyacrylamid, 4 ml; Urea 99,9 %, 21 g; TBE-Puffer 10-fach, 6 ml; APS 10 %, 335 µl; TEMED, 35 µl; Aqua bidest., ad 50 ml) in einer Länge von 44 cm und einer Dicke von 0,75 mm hergestellt. Das Auftragen der Proben auf das Gel erfolgt nach 2 – 3 Stunden Polymerisation, wofür ein Kamm mit einem Zahnabstand von 0,25 mm und 48 Geltaschen verwendet wird. 4 µl der Proben werden vorher mit 4 µl Stopper-Färbepuffer (Amersham, Deutschland) versetzt, für ca. 15 Minuten auf 70 °C erhitzt und dabei wiederholt durchmischt. 1,5 µl der Lösung werden auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wird 1 % TBE-Puffer (Tris-HCL, pH 7,5, 0,89 mM; EDTA, pH 8,0, 0,02 mM; Borsäure, 0,89 mM; Aqua bidest, ad 1000 ml) verwendet, wobei der Lauf in der Nacht erfolgt.

Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgt mit Hilfe des Programms DNAsis für Windows 2.1 (Hitachi Software).

### 3.2.4.3 DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700

Alternativ werden DNA-Sequenzuntersuchungen mit dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt, welches im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster eingesetzt wird.

Die DNA-Sequenzreaktion wird mit markierten Primern im Stoffwechsellabor der Kinderklinik des Universitätsklinikums Münster vorbereitet. Hierzu werden die zuvor amplifizierte DNA-Proben mit dem „PCR product pre-sequencing kit“ (USB Corporation, Cleveland, USA) vorgereinigt, wobei 3 µl PCR-Produkt mit 1 µl Enzym-Mix versetzt werden. Die gereinigten Proben werden in einem Standard-Reaktionsansatz zu einem 10 µl Ansatz zusammenpipettiert (Reaktionsmix, 1 µl; Sequencing Buffer, 5-fach, 1 µl; PCR-Produkt, 1 – 3 µl; Primer, 1 µM, 1,5 µl; Aqua bidest., 3,5 – 5,5 µl). Als Reaktionsmix kommt der „BigDye<sup>TM</sup> Terminator Ready Reaction Premix“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) zur Anwendung. Die Kontrolle wird mittels einer bekannten und mitgelieferten DNA-Sequenz erstellt

(Reaktionsmix, 1 µl; 5-fach Sequencing Buffer, 1 µl; DNA, 1 µl pGEM; Primer M 13, 2 µl; Aqua bidest. 5 µl). Die eingesetzte Menge an PCR-Produkt wird in Abhängigkeit der Bandenstärke und Konzentration, die mittels eines Agarosegels ermittelt wird, variiert. Für die DNA-Sequenzreaktion wird ein Standardprogramm verwendet. Nach einem einmaligen Denaturierungsschritt von 4 Minuten Dauer bei 96 °C folgen 35 Zyklen der Amplifikation: Nach einer Denaturierung für 20 Sekunden bei 96 °C schließt sich ein Annealingschritt für 10 Sekunden bei 50 °C und ein Elongationsschritt für 2 Minuten bei 60 °C an.

Der Reaktionsansatz wird nach der DNA-Sequenzreaktion durch Säulenreinigung mit „Sephadex Gel G 50“ (Millipore Corporation, Bedford, USA) mittels des „Multiscreen Assay Systems“ (Millipore Corporation, Bedford, USA) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend werden 23 Proben zusammen mit der Kontrolle in eine Analysenplatte (MicroAmp Optical Plates, Applied Biosystems) pipettiert, in das DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) eingebracht und analysiert. Die Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchungen werden mit Hilfe des Programms „DNAsis für Windows 2.1“ (Hitachi Software) ausgewertet.

### **3.2.5 Single-Strand Conformation Polymorphism**

#### **3.2.5.1 Materialien und Geräte**

Genomische DNA wird, wie für die DNA-Sequenzuntersuchung beschrieben, isoliert, amplifiziert und gereinigt. Bis zur weiteren Verwendung werden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Bei der SSCP-Analyse wird ein MDE-Gel der Firma FMC (Rockland, Maine, USA) zur Mutationsdetektion verwendet. In der verwendeten Doppelgelelektrophorese-Kammer (Vertical Slab Gel Unit SE 600, Hoefer, Deutschland) wird mittels einer angeschlossenen Kühlung (RC6, MWG-Biotech, Deutschland) eine konstante Temperatur eingehalten.

### 3.2.5.2 Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Für die SSCP-Analyse werden zwei 0,5 % MDE-Gel (2-fach MDE-Lösung, 12,5 ml; 10-fach TBE Puffer, 3 ml; APS 10 %, 200µl; TEMED, 20 µl; Aqua bidest., 34,5 ml) hergestellt mit 20 cm maximaler Lauflänge und einer Geldicke von 0,75 mm. Auf einen Zusatz von Glycerol wird verzichtet. Die Gele werden mittels einer Pipette mit Filter gegossen, mit Alkohol überschichtet und mit Parafilm abgedeckt. Jedes Gel besitzt 14 Geltaschen, jede Geltasche besitzt ein Volumen von 50 µl. Die Polymerisationszeit beträgt 2 Stunden. Die beiden Gele werden zusammen in der Doppelgelelektrophorese-Kammer eingesetzt.

Für den Lauf werden die PCR-Produkte mit 95 % Formamid im Verhältnis 1 : 3 versetzt. Das Gemisch wird für 15 Minuten auf 93 °C erhitzt und dabei alle 5 Minuten durchmischt. Jeweils 4 µl des Reaktionsansatzes wurden danach sofort auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird über 4 Stunden bei 6 Watt und konstanten 14 °C durchgeführt.

### 3.2.5.3 Silberfärbung

Für die Silberfärbung, durch Merril 1981 beschrieben, steht der „DNA Silver Staining Kit“ der Firma Pharmacia Biotech (Deutschland) zur Verfügung. Das Volumen der eingesetzten Reagenzien wird dabei der Größe und Stärke der benutzten MDE-Gele angepasst. Die manuelle Färbung der Gele wird in sechs Schritten nach Angaben des Herstellers durchgeführt (vgl. Tabelle 3). Im ersten Schritt werden die Gele mit Fixing Solution (5-fach, 12,5 ml), versetzt mit 50 ml Ethanol (24 %), gewaschen. Für die Färbung werden die Gele nacheinander in Staining Solution (5-fach, 12,5 ml; versetzt mit Aqua bidest, 50 ml), Developing Solution (Carbonat 12,5 ml; versetzt mit Natrium thiosulphat, 62,5 µl; Formaldehyd, 62,5 µl; Aqua bidest, 100 ml) und Stopping & Preserving Solution (5-fach, 12,5 ml; versetzt mit Aqua bidest, 50 ml) geschwenkt. Nach jedem Arbeitsschritt werden die Waschflüssigkeiten mittels einer Vakuumpumpe evakuiert. Die dabei eingehaltenen Inkubationszeiten entsprechen den vom Hersteller geforderten Mindestzeiten. Anschließend werden die Gele über Nacht in einer Trockenkammer getrocknet.

Tabelle 3: Standard-Protokoll Silberfärbung der SSCP-Analyse		
1	Fixierung	Gel 30 min in Fixing Solution schwenken
2	Silberimprägnation	Gel 30 min in Staining Solution schwenken
3	Waschen	Gel 1 min in Aqua bidest. spülen
4	Entwicklung	Gel 6 min in Developing Solution unter visueller Kontrolle schwenken
5	Konservierung	Gel 30 min in Stopping & Preserving Solution schwenken
6	Gel in Aqua bidest. waschen, dann Gel in Trockenkammer trocknen	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Molekulargenetische Analysen

#### 4.1.1 Aufbau und Vorgehen

Um die große Anzahl der die PKU verursachenden Mutationen zu berücksichtigen, werden die Versuche gestaffelt aufgebaut. Durch den Vergleich verschiedener europäischer Populationen aus Dänemark, Wales, Spanien, Polen, Schweden, Irland, Nordirland, den Niederlanden und Deutschland, wird ein Verteilungsmuster der Mutationen erstellt [28, 86, 94, 114, 127, 134, 137, 147-149]. Zuerst werden die Exone des Patientenkollektives untersucht, auf denen die am häufigsten auftretenden Mutationen zu finden sind. Wie in mehreren Studien nachgewiesen wurde, werden mehr als 30 verschiedene Mutationen in einer Population gefunden [40-42, 147]. Dass hierbei einige wenige Mutationen den Hauptteil ausmachen, wird dem Founder Effekt zugeschrieben [28]. In Dänemark werden zum Beispiel vier Mutationen (IVS12+1, R408W, Y414C und IVS10–11) bei 70 % der PKU-Patienten gefunden [52]. Die am häufigsten vorkommenden Mutationen für Patienten aus Deutschland werden auf den Exonen 12, 7, 5, 10 und 2 gefunden. Ferner fallen die Exone 3, 11 und 8 auf, die gehäuft Träger von Mutationen im europäischen Raum sind [5, 27, 44, 149]. Somit wurde bei den Untersuchungen mit Exon 12 begonnen. Es folgten Exon 7, Exon 5,



Exon 10 und Exon 2. Die Exone 3, 11 und 8 wurden noch vor allen anderen Exonen (1, 4, 6, 9, 13) untersucht. Die seltener auftretenden Mutationen werden zusätzlich mit einer gleich großen Verteilungswahrscheinlichkeit betrachtet. Dies bedeutet, dass diese Mutationen als gleichmäßig auf den restlichen Exone verteilt angenommen werden und jeweils mit einer gleichen Anzahl an Versuchen ermittelbar sind.

#### **4.1.2 Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchungen**

Bei den DNA-Sequenzuntersuchungen werden insgesamt 43 der gesuchten 46 Mutationen (~ 93,5 %) auf den PAH-Genloci entdeckt, wie in Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt. Bei drei Patienten wird nur eine Mutation in der codierenden Region des PAH-Gens identifiziert.

Unter den 43 gefundenen Mutationen finden sich fünf Splice-Site Mutationen. Diese Mutationen, die im Intron bzw. der Intron-Exon Grenzregion von Exon 3 und Exon 12 (IVS3–22, Patient 23 sowie IVS12+1 der Patienten 4, 8 und 16) liegen, verhindern ein korrektes Splicing der prä-mRNA. Die restlichen Mutationen setzten sich aus zwei Stop-Mutationen (Patient 1, Exon 7 sowie Patient 2, Exon 11), zwei Deletionen (Patienten 2 und 18, jeweils Exon 2) und 34 Missense-Mutationen zusammen. R408W, die in der westlichen Welt am häufigsten auftretende Missense-Mutation [52, 114, 131], wird auf insgesamt 14 Allelen (~ 32,6 %) gefunden. Zwei Patienten (Patient 11 und Patient 20) sind homozygot, zehn Patienten heterozygot für diese Mutation. Y414C, ebenfalls wie R408W auf Exon 12 lokalisiert, wird insgesamt in fünf Fällen (~ 11,6 %) identifiziert. Ein Patient ist für Y414C homozygot (Patient 17), vier heterozygot. Die beiden Mutationen IVS12+1 und R261Q werden jeweils auf vier Allelen (~ 9,3 %) nachgewiesen. Für IVS12+1, das in Nordeuropa zu den häufigsten PKU-verursachenden Mutationen gehört und einen Ausschluss von Exon 12 aus der mRNA bedingt [52], ist ein Patient (Patient 16) homozygot. R261Q tritt bei vier Patienten in heterozygoter Ausprägung auf. Die ebenfalls, wie R261Q, auf Exon 7 zu findende Mutation P281L kommt dreimal in heterozygoter Ausprägung vor. A104D wird zweimal identifiziert, wobei Patient 13 und Patient 22 jeweils heterozygot für diese Mutation sind. Patient 21, der im Gegensatz zu den anderen Patienten nicht aus Deutschland stammt, ist für die auf Exon 2 gelegene Mutation L 48 S homozygot. Alle weiteren Mutationen, S349P,

L348V, R68S und R158Q, sowie die Intron-Mutation IVS3-22 werden jeweils einmal in einer heterozygoten Verteilung festgestellt. Weiterhin werden insgesamt 17 Polymorphismen identifiziert (vgl. Tabelle 7). Ein Polymorphismus, auch als „stille Mutation“ bezeichnet, steht in keiner Verbindung zum Auftreten der PKU [52].

Tabelle 4: Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchung - Allel 1					
Pat.	Exon Nr.	systematischer Name	Trivialname	Mut. Nukleotid	Mut. Protein
1	7	c.781 c→t	R261X	c > t	R > Stop
2	2	c.165delT	F55fs	del t	Deletion
3	12	c.1241 a→g	Y414C	a > g	Y > C
4	12	c.1315+1 g→a	IVS12+1	g > a	S > N
5	7	c.782 g→a	R261Q	g > a	R > Q
6	10	c.1042 c→g	L348V	c > g	L > V
7	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
8	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
9	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
10	7	c.782 g→a	R261Q	g > a	R > Q
11	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
12	7	c.782 g→a	R261Q	g > a	R > Q
13	3	c.311 c→a	A104D	c > a	A > D
14	10	c.1045 t→c	S349P	t > c	S > P
15	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
16	12	c.1315+1 g→a	IVS12+1	g > a	S > N
17	12	c.1241 a→g	Y414C	a > g	Y > C
18	2	c.165delT	F55fs	del t	Deletion
19	7	c.842 c→t	P281L	c > t	P > L
20	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
21	2	c.143 t→c	L48S	t > c	L > S
22	3	c.311 c→a	A104D	c > a	A > D
23	3	c.353-22 c→t	IVS3-22	c > t	Intron- mutation

Tabelle 5: Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchung - Allel 2					
Pat.	Exon Nr.	systemischer Name	Trivialname	Mut. Nukleotid	Mut. Protein
1	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
2	11	c. 1068 c→g	Y356X	c > g	Y > Stop
3	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
4	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
5	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
6		nicht identifiziert			
7		nicht identifiziert			
8	12	c.1315 + 1 g→a	IVS12+1	g > a	S > N
9		nicht identifiziert			
10	7	c.842 c→t	P281L	c > t	P > L
11	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
12	7	c.842 c→t	P281L	c > t	P > L
13	7	c.782 g→a	R261Q	g > a	R > Q
14	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
15	3	c.204 a→t	R68S	a > t	R > S
16	12	c.1315+1 g→a	IVS12+1	g > a	S > N
17	12	c.1241 a→g	Y414C	a > g	Y > C
18	5	c.473 g→a	R158Q	g > a	R > Q
19	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
20	12	c.1222 c→t	R408W	c > t	R > W
21	2	c.143 t→c	L48S	t > c	L > S
22	12	c.1241 a→g	Y414C	a > g	Y > C
23	12	c.1241 a→g	Y 414 C	a > g	Y > C

Tabelle 6 : Verteilung der identifizierten PAH-Mutationen				
Trivialname	Systematischer Name	Exon / Intron	absolut	relativ
R408W	c.1222 c→t	12	14	0,3256
Y414C	c.1241 a→g	12	5	0,1163
IVS12+1	c.1315+1 g→a	Intron 12	4	0,0930
R261Q	c.782 g→a	7	4	0,0930
P281L	c.842 c→t	7	3	0,0698
L48S	c.143 t→c	2	2	0,0465
F55fs	c.165 delT	2	2	0,0465
A104D	c.311 c→a	3	2	0,0465
S349P	c.1045 t→c	10	1	0,0233
L348V	c.1042 c→g	10	1	0,0233
Y356X	c.1068 c→g	11	1	0,0233
R68S	c.204 a→t	3	1	0,0233
R158Q	c.473 g→a	5	1	0,0233
R261X	c.781 c→t	7	1	0,0233
IVS3-22	c.353-22 c→t	Intron 3	1	0,0233

Tabelle 7: Ergebnisse der DNA-Sequenzuntersuchung - Polymorphismen		
Position u. Basenaustausch	Exon	Absolute Häufigkeit
735, g→a	7	5
696, a→g	6	2
633, a→g	6	2
1266, g→a	12	1
1179, g→c	11	1
1170, g→c	11	1
378, a→g	4	1
375, t→c	4	1
300, t→c	3	1
285, c→a	3	1
51, c→t	1	1

Die gefundenen Mutationen werden nach der residualen Enzymaktivität und somit nach dem resultierenden Phänotyp in vier Gruppen eingeteilt, wie in Tabelle 8 dargestellt [37, 45, 52, 64, 85, 86, 103, 127].

Tabelle 8: Genotyp-Phänotyp Korrelation, Einteilung nach klinischem Schweregrad			
Trivialname	Systematischer Name	Exon	Schweregrad
R408W	c.1222 c→t	12	klassisch
Y414C	c.1241 a→g	12	mild
IVS12+1	c.1315 +1 g→a	12	klassisch
R261Q	c.782 g→a	7	moderat
P281L	c.842 c→t	7	klassisch
L48S	c.143 t→c	2	mild
F55fs	c.165delT	2	klassisch
A104D	c.311 c→a	3	mild
S349P	c.1045 t→c	10	klassisch
L348V	c.1042 c→g	10	moderat
Y356X	c.1068 c→g	11	klassisch
R68S	c.204 a→t	3	mild
R158Q	c.473 g→a	5	klassisch
R261X	c.781 c→t	7	klassisch

#### 4.1.3 Ergebnisse der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Die durch die SSCP-Analyse auffälligen, d.h. vom Laufmuster eines bekannten Wildtyps abweichenden Proben, werden im Anschluss weiter durch eine DNA-Sequenzuntersuchung nachuntersucht. In der SSCP-Analyse von Exon 12 werden bei 17 Proben Laufabweichungen erkannt. So zeigt Patient 11 (homozygot für R408W) ein differierendes Laufverhalten von Patient 17 (homozygot für Y414C) und den Patienten 4 und 8 (heterozygot für R408W und IVS12+1). Die drei bereits in den DNA-Sequenzuntersuchungen identifizierten Mutationen von Exon 12, R408W, Y414C und IVS12+1, werden bei allen Proben durch die SSCP-Analyse erkannt. Der bei Patient 18

gefundene Polymorphismus auf Exon 12 (c.1266, g → a) zeigt ebenfalls ein vom Wildtyp abweichendes Laufverhalten.

Bei der SSCP-Analyse von Exon 7 mit anschließender DNA-Sequenzuntersuchung werden die Mutation R261Q bei den Patienten 5, 10, 12 und 13 und die Mutation P281L bei den Patienten 10, 12 und 19 nachgewiesen. Auch wird der Polymorphismus c.735, g → a bei den Patienten 6, 18, 21, 22 und 23 durch ein verändertes Laufverhalten der Proben erkannt.

Die Mutationen S349P auf Exon 10, L48S auf Exon 2, F55fs auf Exon 2, R68S auf Exon 3 und die Stop-Mutation c.1068 c→g sowie die Polymorphismen 1179, g → c und 1170, g → c auf Exon 11 werden alle durch die SSCP-Analyse identifiziert. Ebenso wird die Mutation A104D auf Exon 3 bei den Patienten 13 und 22 und der Polymorphismus c.285 c→a bei Patient 15 nachgewiesen. Darüber hinaus kann auch, wie schon bei den DNA-Sequenzuntersuchungen, bei den Patienten 6, 7 und 9 mittels der SSCP-Analyse keine zweite Mutation des PAH-Gens ermittelt werden. Jedoch fanden sich die Polymorphismen c.696 a→g auf Exon 6 bei Patient 6 und 18, c.378 a→g auf Exon 4 bei Patient 23, c.375 t→c auf Exon 4 bei Patient 1 und c.51 c→t auf Exon 1 bei Patient 9.

Tabelle 9: Ergebnisse der SSCP-Analyse - Polymorphismen		
Position u. Basenaustausch	Exon	Absolute Häufigkeit
735, g→a	7	5
696, a→g	6	2
1266, g→a	12	1
1179, g→c	11	1
1170, g→c	11	1
378, a→g	4	1
375, t→c	4	1
285, c→a	3	1
51, c→t	1	1

Die mittels der DNA-Sequenzuntersuchung mit dem LI-COR 4000L nachgewiesene Stop-Mutation R261X des Patienten 1 auf Exon 7 bleibt dagegen unerkannt, ebenso wie die Mutationen R158Q auf Exon 5, IVS3-22 auf Exon 3 und L348V auf Exon 10.

Insgesamt werden 39 Mutationen (~ 84,8 %) sowie 14 Polymorphismen durch die SSCP-Analyse mit anschließender DNA-Sequenzuntersuchung erkannt.

## **4.2 Arbeitsabläufe**

Bei einem Vergleich der einzelnen molekulargenetischen Analyseverfahren ist der Arbeitsablauf für die eingebrachte Arbeitskraft von Bedeutung. Durch einen ineinander geschachtelten Arbeitsablauf ist es möglich, Gerätelaufzeiten als Arbeitszeit für andere Aufgaben zu nutzen und so Arbeitszeit einzusparen. Nebenschritte und Zuarbeitungen werden somit zum Teil parallel zu einem Hauptarbeitsschritt ausgeführt. Der die Geschwindigkeit bestimmende Arbeitsschritt kommt dabei dem Hauptarbeitsschritt gleich. Für alle Arbeitsschritte eines Arbeitsablaufes wird somit ein optimales Zeitmanagement erreicht.

Bei der Betrachtung des Arbeitsablaufes wird von optimierten Arbeitsbedingungen ausgegangen. Alle Arbeitsschritte werden von einer eingearbeiteten Fachkraft ausgeführt und es werden akkurat arbeitende und kalibrierte Geräte verwendet.

Für alle Methoden wird die gleiche Ausgangssituation angenommen, wobei die DNA gereinigt und bei 4 °C im Kühlschrank lagert. Sämtliche Materialien (wie Lösungen, Puffer, etc.) und Geräte (wie PCR-Blöcke, DNA-Sequenzanalysegeräte, etc.) sind in demselben Laborraum vorhanden, längere Wege zwischen einzelnen Stationen sind nicht zu berücksichtigen. Zwischen jedem Hauptarbeitsschritt wird eine Pause von jeweils einer Minute eingerechnet, um verschiedenen Bedienungsanleitungen einzelner Geräte gerecht zu werden.

Bei der Betrachtung eines Arbeitsablaufes wird die benötigte Zeit nach absoluter und relativer Arbeitszeit unterschieden. Als absolute Arbeitszeit wird dabei die Zeit charakterisiert, die für den einzelnen Arbeitsschritt in seiner vollen Länge inklusive aller Pausen und Gerätelaufzeiten benötigt wird. Allerdings fließen hier nur die zeitlimitierenden Arbeitsschritte mit ein, alle weiteren Arbeitszeiten, die während dieser Hauptarbeitsschritte erfolgen, bleiben unberücksichtigt. Die relative Arbeitszeit

hingegen beschreibt die effektiv eingesetzte Arbeitszeit, die für den einzelnen Arbeitsschritt im Rahmen des gesamten geschachtelten Arbeitsablaufes verwendet wird. Hier werden alle durchgeführten Arbeiten, egal ob Haupt- oder Nebenarbeitsschritt, mit einbezogen. Die Gesamtarbeit wird auf der Basis der absoluten Arbeitszeit berechnet.

#### **4.2.1 DNA-Sequenzuntersuchungen**

##### **4.2.1.1 DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L mit Single Laser System**

Die hier beschriebenen Arbeitsschritte sind in Tabelle 10 wiedergegeben sowie anhand der Abbildungen 2 und 3 veranschaulicht. Der Hauptarbeitsweg, d.h. die Folge der zeitlimitierenden Schritte, ist mit Hilfe durchgezogener Pfeile markiert. Alle anderen Arbeiten sind auf dem Nebenarbeitsweg durch gestrichelte Pfeile dargestellt.

Jeder DNA-Sequenzieransatz wird für 12 Exone, d.h. 12 Proben, sowie einer positiven Probe und einem Leerwert pipettiert. Nur die 12 Proben werden auf das DNA-Sequenziergel (mit 48 Spuren) geladen, die Positiv-Probe und der Leerwert dienen zur Kontrolle der PCR selbst.

Das Beladen der Reaktionsgefäße für die DNA-Amplifikation mittels PCR beansprucht für die 14 Proben durchschnittlich 8 Minuten. Die PCR von 167 Minuten Dauer ist gerätegesteuert und die verbleibende Zeit nach Beladung der Kammer wird zur Vorbereitung der Agarosegele für die Kontrolle genutzt.

Das Gießen der Gele für die Kontrolle selbst dauert durchschnittlich nur fünf Minuten. Das Überprüfen der PCR-Produkte beansprucht mit Lauf, Färbung und Auswertung der Ergebnisse 75 Minuten.

Die PCR-Produkte werden durch Gelextraktion aufgereinigt, um eine höchst mögliche Reinheit zu erzielen. Der zeitbestimmende Schritt dieser durchschnittlich 105 Minuten dauernden Prozedur ist die Gelelektrophorese; das Aufreinigen der ausgeschnittenen DNA-Fragmente selbst beansprucht nur durchschnittlich 48 Minuten.

Für die DNA-Sequenzreaktion mit den gereinigten PCR-Produkten werden 12 Minuten für das Beladen der Reaktionsgefäße und 79 Minuten für den anschließenden Lauf benötigt. Während des Laufes wird das Polyacrylamidgel für die DNA-



Sequenzuntersuchung gegossen, das für 120 Minuten polymerisiert. Im Anschluss an die DNA-Sequenzreaktion werden die Proben für den Lauf mit Stopper-Färbepuffer versetzt und vorbereitet. Dies und das Beladen des Polyacrylamidgels benötigt durchschnittlich 45 Minuten.

Der Lauf dauert ca. 400 Minuten und wird über Nacht durchgeführt, sodass diese Zeit nicht mit in die zu berechnende Arbeitszeit mit einfließt. Am nächsten Morgen während der nächsten DNA-Amplifikation für die nächsten Proben werden die Ergebnisse ausgewertet.

Die gesamte Arbeitszeit, die benötigt wird, um 12 Proben oder 48 Einzelreaktionen durch die DNA-Sequenzuntersuchung mittels LI-COR 4000L zu untersuchen, beläuft sich auf 491 Minuten absoluter Arbeitszeit. Relativ werden 249 Minuten an Arbeitszeit aufgewendet.

Tabelle 10: Arbeitsschritte der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L			
Arbeits-schritt	Beschreibung des Arbeitsschritts	Absolute Arbeitszeit	Relative Arbeitszeit
A	DNA-Amplifikation mittels PCR		
	- Beladung der Reaktionsgefäße mit Reagenzien und DNA	8 min	8 min
	- PCR laut Protokoll	167 min	2 min
	Gesamtarbeitszeit	175 min	10 min
B	Kontrolle der DNA-Amplifikation durch Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel		
	- Herstellen eines Gels	5 min	5 min
	- Polymerisation	45 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	50 min	5 min
C	DNA-Sequenzuntersuchung durch LI-COR 4000L		
	- Auswertung der Ergebnisse vom Vortag	60 min	60 min
	Gesamtarbeitszeit	60 min	60 min
Pause 1 min			
D	Kontrolle der DNA-Amplifikation durch Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel		
	- Lauf	57 min	12 min
	- Färbung	17 min	2 min
	- Auswertung der Ergebnisse	1 min	1 min
	Gesamtarbeitszeit	75 min	15 min
E	Aufreinigung der DNA-Amplifikation durch Gelextraktion		
	- Herstellen eines Gels	5 min	5 min
	- Polymerisation	45 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	50 min	5 min
Pause 1 min			

F	Aufreinigung der DNA-Amplifikation durch Gelextraktion		
	- Gelelektrophorese	57 min	12 min
	- Bearbeitung der Proben	48 min	48 min
	Gesamtarbeitszeit	105 min	60 min
G	DNA-Sequenzuntersuchung durch LI-COR 4000L		
	- Herstellen eines Gels	35 min	35 min
	- Polymerisation	120 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	155 min	35 min
Pause 1 min			
H	DNA-Sequenzreaktion der PCR-Produkte mit markierten Oligonukleotiden		
	- Beladung der Reaktionsgefäße mit Reagenzien und DNA	8 min	8 min
	- PCR laut Protokoll	79 min	2 min
	Gesamtarbeitszeit	87 min	10 min
Pause 1 min			
I	DNA-Sequenzuntersuchung durch LI-COR 4000L		
	- Vorbereitung der Proben	30 min	30 min
	- Auftragen der Proben	15 min	15 min
	- Lauf	über Nacht	0 min
	Gesamtarbeitszeit	45 min	45 min
Dauer des Arbeitsablaufs mittels LI-COR 4000L (inkl. 4 min Pause):		491 min	249 min

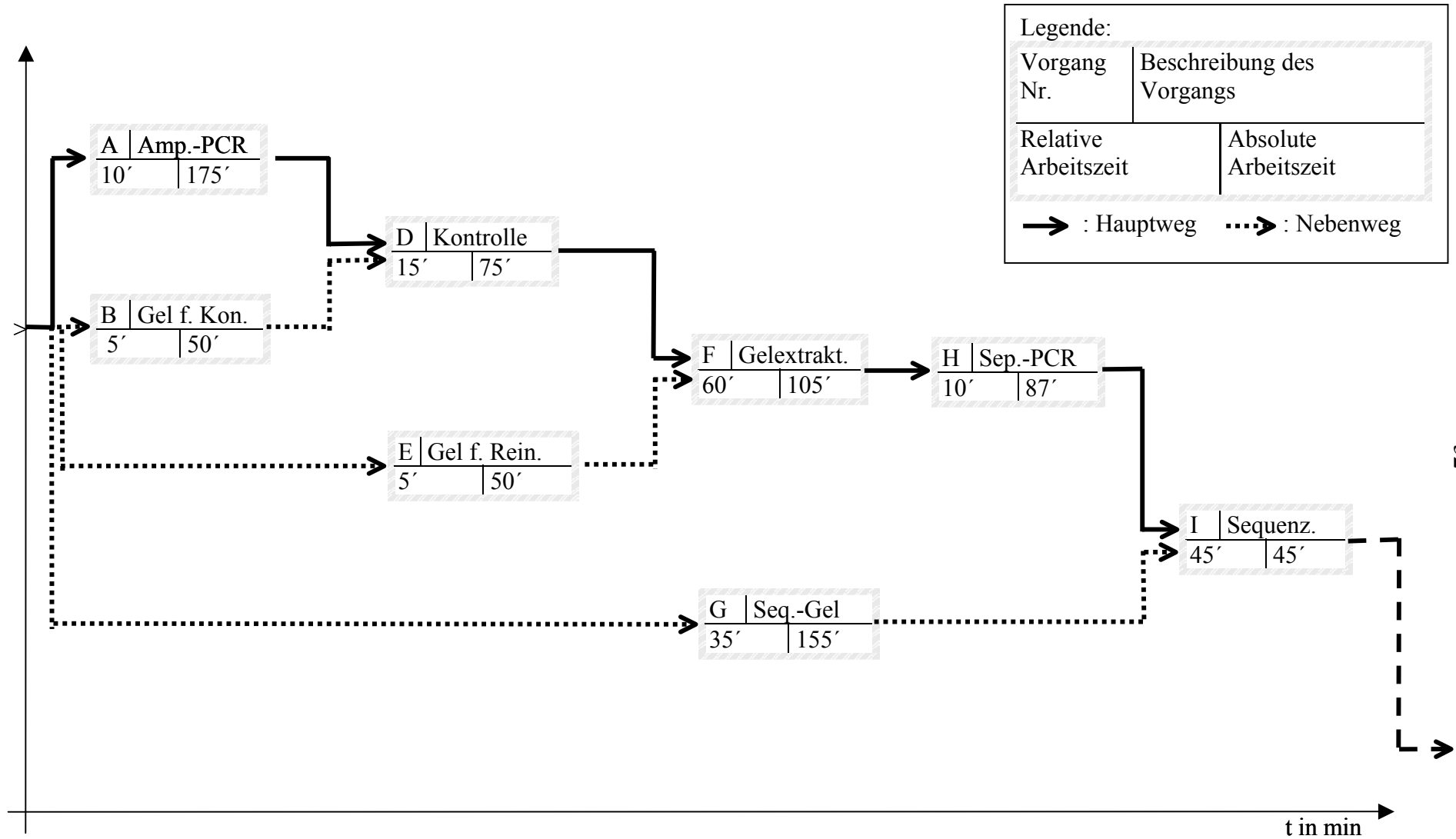


Abbildung 2: Netzwerkplan DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L: Tag 1

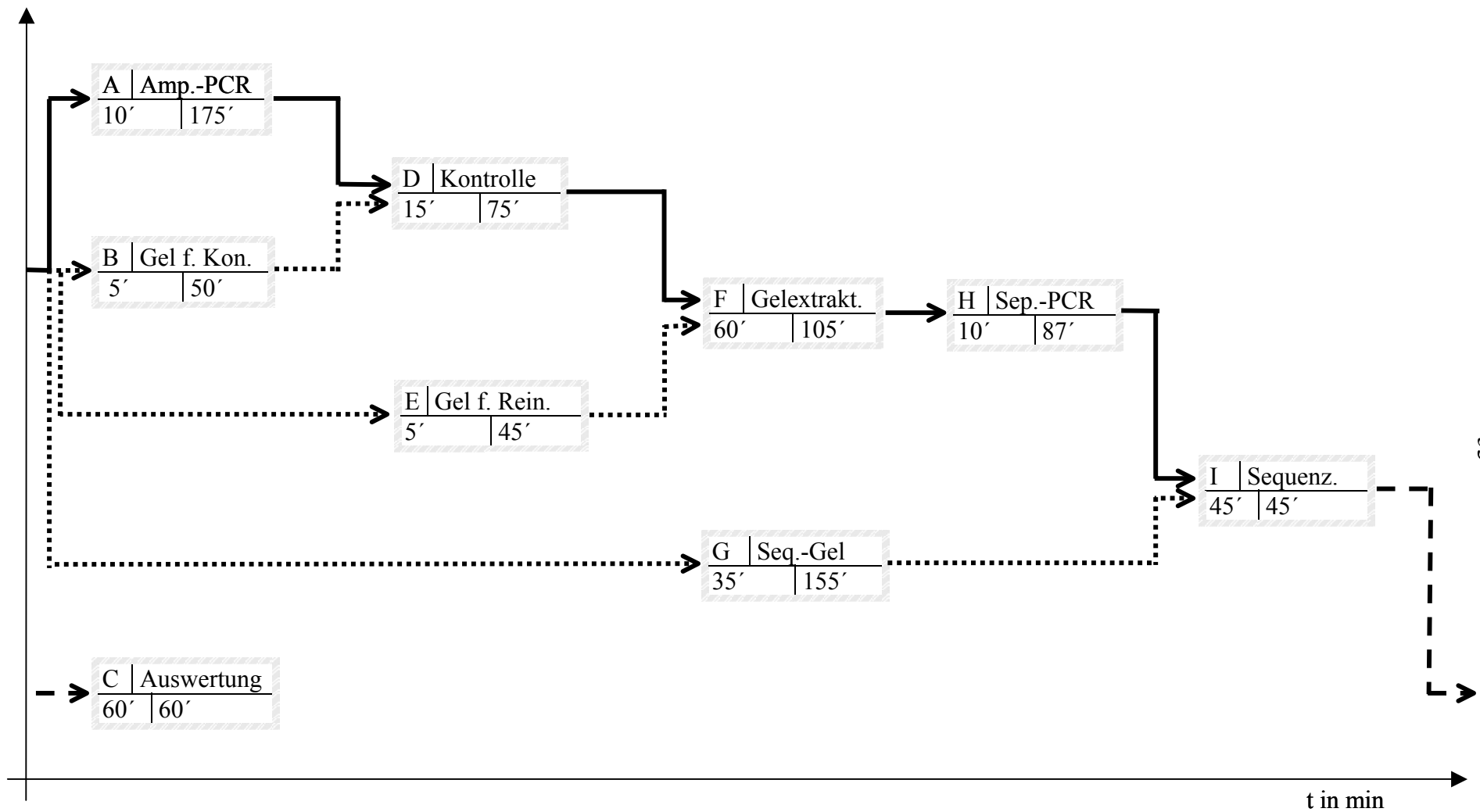


Abbildung 3: Netzwerkplan DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L: Tag 2

#### 4.2.1.2 DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 mit Dual Laser System

Die Arbeitsschritte und deren Dauer für das DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 sind in Tabelle 11 dargestellt. Darüber hinaus ist der Arbeitsablauf in der Abbildung 4 illustriert.

Der erste Schritt der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700 entspricht der DNA-Amplifikation mittels PCR, wie zuvor unter 3.2.1.1 beschrieben. Im Anschluss werden die PCR-Produkte durch Enzymverdau aufgereinigt. Dieser Zwischenschritt nimmt 3 Minuten relativer Arbeitszeit bei 33 Minuten absoluter Arbeitszeit in Anspruch.

Vor der DNA-Sequenzreaktion mit dem „BigDye™ Terminator Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, Foster City, USA), wird eine Kontrolle der Amplifikation durchgeführt. Für diese Kontrolle mittels einem 2 % Agarosegel, welches schon parallel zu der DNA-Amplifikation vorbereitet wurde, werden weitere 75 Minuten absoluter Arbeitszeit benötigt. Gleichzeitig wird in diesem Schritt die Menge des einzusetzenden PCR-Produkts für die spätere DNA-Sequenzreaktion bestimmt.

Das Beladen der Reaktionsgefäße für die DNA-Sequenzreaktion und der PCR-Lauf selbst erfolgen zusammen in 119 Minuten, der relative Arbeitsaufwand beträgt hier 8 Minuten. Als letzter Arbeitsschritt vor der DNA-Sequenzuntersuchung erfolgt die Reinigung der bei der DNA-Sequenzreaktion gewonnenen Produkte mittels des „Multiscreen Assay Systems“ (Millipore Corporation, Bedford, USA). Da das hier verwendete „Sephadex Gel“ (Millipore Corporation, Bedford, USA) drei Stunden zum Quellen benötigt, wird das Gel parallel zur DNA-Amplifikation vorbereitet. Für den eigentlichen Arbeitsschritt der Reinigung (inklusive des trocken Zentrifugierens des „Sephadex Gels“) werden 20 Minuten relativer und 70 Minuten absoluter Arbeitszeit benötigt.

Da durch die kapilläre DNA-Sequenzuntersuchung keine zusätzliche Auftrennung der Proben mittels „A-, „C-, „G-, oder „T-Reagenz“ („Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“, Amersham, Deutschland) nötig ist, wird das DNA-Sequenzanalysegerät direkt beladen. Eine Auswertung entfällt, da das DNA-Sequenzanalysegerät das Ergebnis in graphischer Form liefert. Die absolute Arbeitszeit bei der DNA-Sequenzuntersuchung mit dem ABI Prism 3700

beläuft sich auf 470 Minuten. Die relativ eingesetzte Arbeitszeit aller Arbeitsschritte beträgt 101 Minuten.

Tabelle 11: Arbeitsschritte der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700			
Arbeits-schritt	Beschreibung des Arbeitsschritts	Absolute Arbeitszeit	Relative Arbeitszeit
A'	DNA-Amplifikation mittels PCR		
	- Beladung der 14 Reaktionsgefäße mit Reagenzien und DNA	8 min	8 min
	- PCR laut Protokoll	167 min	2 min
	Gesamtarbeitszeit	175 min	10 min
B'	Kontrolle der DNA-Amplifikation durch Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel		
	- Herstellen eines Gels	5 min	5 min
	- Polymerisation	45 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	50 min	5 min
C'	Aufreinigung der Produkte der DNA-Sequenzreaktion mittels „Multiscreen assay system“		
	- Vorbereitung des Sephadex Gels	183 min	3 min
	Gesamtarbeitszeit	183 min	3 min
Pause 1 min			
D'	Enzymverdau mittels „PCR product pre-sequencing kit“	33 min	3 min
	Gesamtarbeitszeit	33 min	3 min
Pause 1 min			
E'	Kontrolle der DNA-Amplifikation durch Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel		
	- Lauf	57 min	12 min
	- Färbung	17 min	2 min
	- Auswertung der Ergebnisse	1 min	1 min
	Gesamtarbeitszeit	75 min	15 min

Pause 1 min			
F'	DNA-Sequenzreaktion mit BigDye™ Terminator Sequencing Kit		
	- Beladen der Reaktionsgefäße	8 min	8 min
	- Lauf	104 min	2 min
Gesamtarbeitszeit		112 min	10 min
Pause 1 min			
G'	Aufreinigung der Produkte der DNA-Sequenzreaktion mittels „Multiscreen assay system“		
	- Zentrifugieren	5 min	5 min
	- Bearbeitung der Proben	7 min	7 min
	- Trocknen und lösen der Proben mit Puffer sowie Denaturieren der Proben	58 min	8 min
Gesamtarbeitszeit		70 min	20 min
Pause 1 min			
H'	DNA-Sequenzuntersuchung durch ABI Prism 3700		
	- Vorbereitung der Proben	15 min	15 min
	- Auftragen der Proben	15 min	15 min
	- Lauf	über Nacht	0 min
Gesamtarbeitszeit		über Nacht	30 min
Dauer des Arbeitsablaufs mittels ABI Prism 3700 (inkl. 5 min Pause):		470 min	101 min



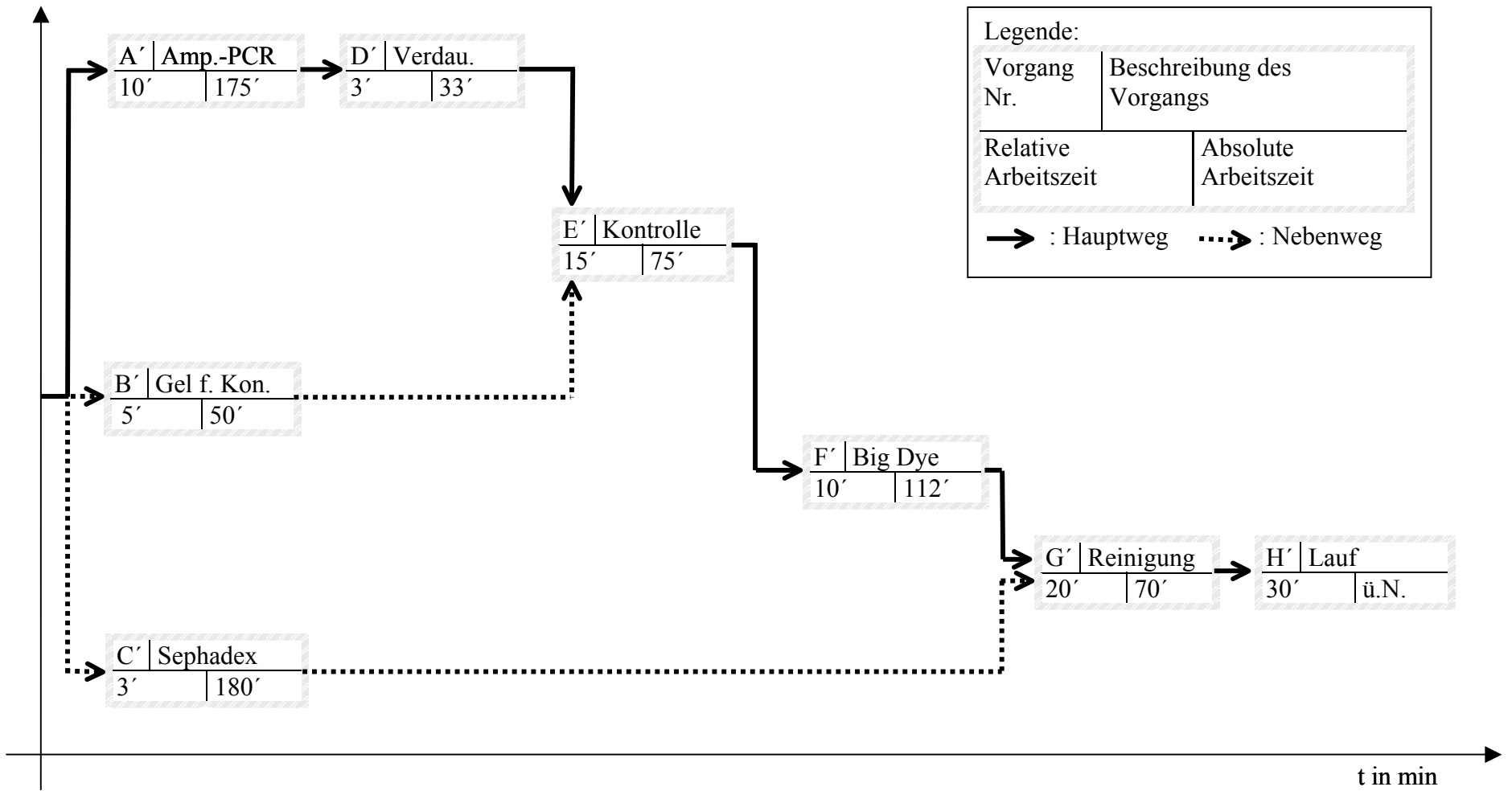


Abbildung 4: Netzwerkplan ABI Prism 3700

#### 4.2.2 Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Tabelle 12 aufgelistet und in ihrer Abfolge graphisch durch die Abbildung 5 abgebildet.

Bei der SSCP-Analyse werden pro Gel insgesamt 12 Proben mit einem bekannten Wildtyp ohne Mutation und ohne Polymorphismus verglichen. Zusätzlich wird noch ein Wasserwert mit auf das Gel aufgetragen. Da die Laufkammer immer zwei Gelen zugleich Platz bietet, können bei einem Arbeitsgang 24 Proben untersucht werden.

Die Amplifikation der DNA-Fragmente mittels PCR, deren Kontrolle und die Aufreinigung werden wie zuvor unter 3.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Vor der Aufreinigung der Proben wird das Gel für die SSCP-Analyse gegossen. Für das Vorbereiten der Proben werden durchschnittlich 23 Minuten benötigt. Das Auftragen der Proben dauert 5 Minuten, der sich anschließende Lauf 120 Minuten. Nach dem SSCP-Lauf schließt sich eine Silberfärbung von 101 Minuten Dauer sowie die Auswertung von 3 Minuten Dauer an.

Die absolute Arbeitszeit einer SSCP-Analyse, bei der immer der längste Arbeitsschritt von mehreren geschachtelten Arbeiten der zeitbestimmende ist, beläuft sich auf 506 Minuten. Relativ wird insgesamt 240 Minuten gearbeitet, wobei hier alle Arbeitsschritte mit einberechnet werden. Hierbei ist im Vergleich mit den DNA-Sequenzuntersuchungen zu beachten, dass die Zeit von 120 Minuten für den Lauf mit einberechnet wird. Die bei der SSCP-Analyse gewonnenen Ergebnisse werden nur bei einer Abweichung des Laufverhaltens vom Wildtyp noch mittels der DNA-Sequenzuntersuchung verifiziert.

Tabelle 12: Arbeitsschritte der SSCP-Analyse			
Arbeits-schritt	Beschreibung des Arbeitsschritts	Absolute Arbeitszeit	Relative Arbeitszeit
A*	DNA-Amplifikation mittels PCR		
	- Beladung der Reaktionsgefäße mit Reagenzien und DNA	8 min	8 min
	- PCR laut Protokoll	167 min	2 min
	Gesamtarbeitszeit	175 min	10 min
B*	Kontrolle der DNA-Amplifikation durch Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel		
	- Herstellen eines Gels	5 min	5 min
	- Polymerisation	45 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	50 min	5 min
C*	Aufreinigung der DNA-Amplifikation durch Gelextraktion		
	- Herstellen eines Gels	5 min	5 min
	- Polymerisation	45 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	50 min	5 min
D*	Silberfärbung des vorherigen Gels		
	- Färbung <sup>1</sup>	101 min	101 min
	- Auswertung der Ergebnisse	3 min	3 min
	Gesamtarbeitszeit	104 min	104 min
Pause 1 min			
E*	Kontrolle der Amplifikation durch Gel-Elektrophorese mit einem 2 % Agarosegel		
	- Lauf	57 min	12 min
	- Färbung	17 min	2 min
	- Auswertung der Ergebnisse	1 min	1 min
	Gesamtarbeitszeit	75 min	15 min
F*	SSCP-Analyse mit einem 0,5 % MDE-Gel		
	- Erstellen eines Gels	13 min	13 min
	- Polymerisation	120 min	0 min

	Gesamtarbeitszeit	133 min	13 min
Pause 1 min			
G*	Aufreinigung der DNA-Amplifikation durch Gelextraktion		
	- Gelelektrophorese	57 min	12 min
	- Bearbeitung der Proben	48 min	48 min
	Gesamtarbeitszeit	105 min	60 min
Pause 1 min			
H*	SSCP-Analyse mit einem 0,5 % MDE-Gel		
	- Vorbereitung der Proben	23 min	23 min
	- Auftragen der Proben	5 min	5 min
	- Lauf	120 min	0 min
	Gesamtarbeitszeit	148 min	28 min
Dauer des Arbeitsablaufs der SSCP-Analyse (inkl. 3 min Pause)		506 min	243 min

Tabelle 12: <sup>1</sup> Zeit ohne anschließendes Trocknen des Gels

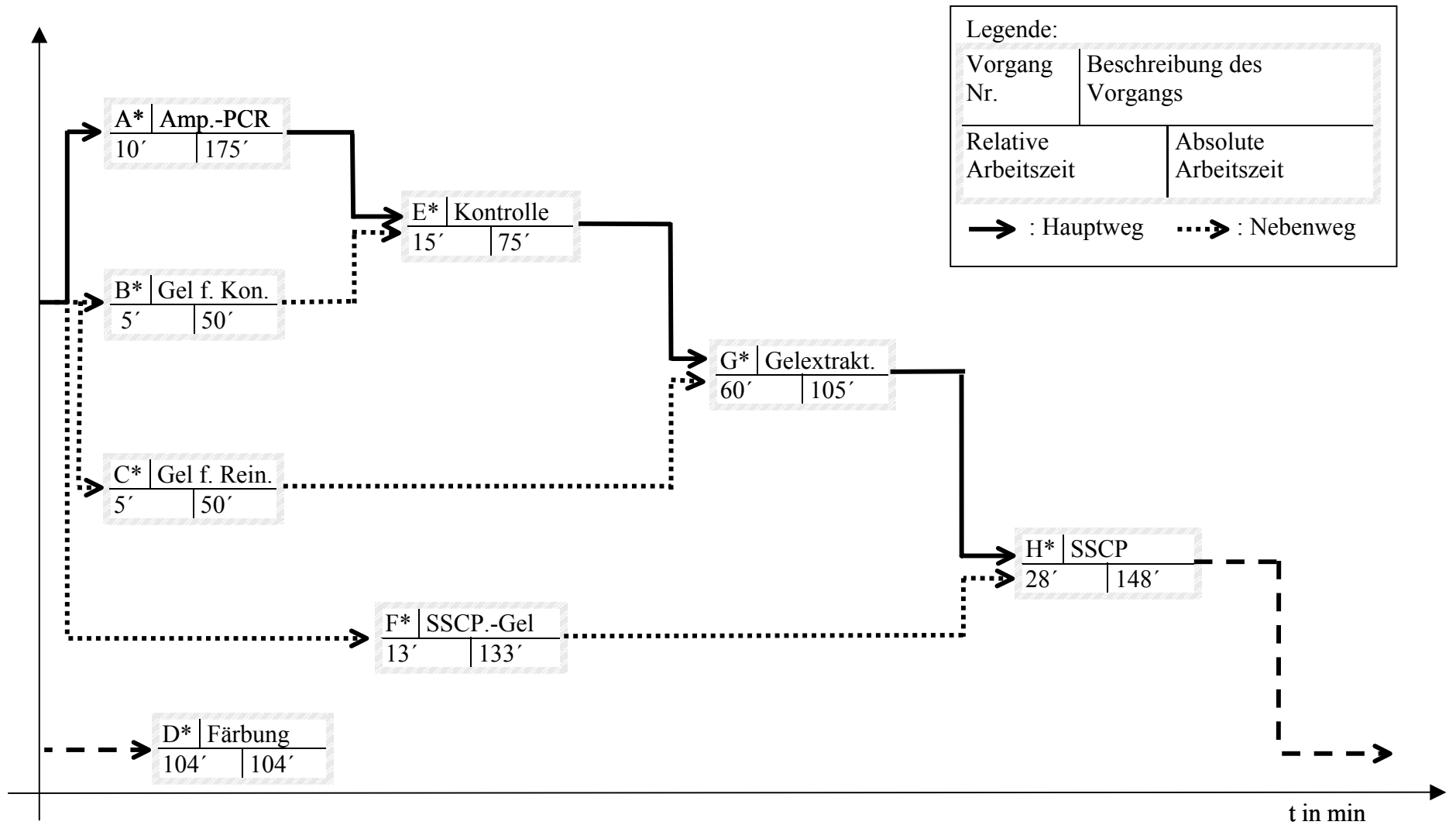


Abbildung 5: Netzwerkplanung SSCP-Analyse

### 4.3 Kostenrechnung

Um bei der Berechnung der Kosten den unterschiedlichen Konstellationen einer experimentellen Arbeit gerecht zu werden, sind vereinzelt Schätzungen für nicht quantifizierbare Arbeitsschritte herangezogen. Darüber hinaus wird von einem optimierten Arbeitsablauf mit einem eindeutigen Ergebnis ausgegangen, das durch ein etabliertes Verfahren ermittelt wird. So bleiben Wiederholungen von Arbeitsschritten oder auch negative Ergebnisse bei der Berechnung der Arbeitskosten unberücksichtigt und werden erst in der Diskussion betrachtet. Ferner wird bei der Kostenberechnung eine hohe Effizienz und vollständige Auslastung der Verfahren bzw. des Gerätes angenommen.

Als konstante Kosten sind Material-, Geräte- und Personalkosten angesehen, die bei der Arbeit in einem Labor anfallen, jedoch nicht für einen einzelnen Arbeitsschritt quantifizierbar sind. Hierunter fallen sowohl Gerätekosten für PCR-Thermocycler, Autoklaven, Pipetten, Pipettierzubehör, Kühl- und Gefrierschränke als auch die nicht aufgeführten Material- und Personalkosten bei der Bearbeitung der Proben. Da die kostenverursachenden Leistungen für die Funktion eines Labors unerlässlich sind und für alle Verfahren anfallen, sind sie hier als ein nicht definierter Fixkostenbetrag zusammengefasst, der nicht in die Berechnung mit einfließt.

Die anfallenden Materialkosten sind nach den Mengenangaben des Herstellers auf eine Probe umgerechnet. Hierbei können proportionale Kosten, d.h. Kosten für das Material, welches ausschließlich für das jeweilige Verfahren benötigt wird, von spezifisch variablen Kosten unterschieden werden. Hierunter fallen Kosten für Materialien, die ebenfalls bei anderen Arbeiten eingesetzt werden können.

Bei der Berechnung der Gerätekosten wird generell davon ausgegangen, dass mit den eingesetzten Geräten die maximale Probenanzahl bearbeitet wird. Neben den Anschaffungskosten des Gerätes, die auch als Kapitalkosten in die Aufstellung mit einfließen, entstehen weitere Kosten bei dem Betrieb des Gerätes. Dies sind gerätespezifischen Kosten wie jährliche Abschreibungen, Instandhaltungs- oder Wartungskosten.

Alle angeführten Preise für Materialien und Geräte entsprechen Listenpreisen aus dem Jahr 2003, die jeweils mit Mehrwertsteuer angegeben sind. Die berechneten Kosten werden auf die zweite Kommastelle kaufmännisch gerundet.

Die Basis bei der Berechnung der Personalkosten bildet die Anzahl der Proben, die je Arbeitsschritt und Gerät durch eine Fachkraft bewältigt werden können. Für die Berechnung werden die relativen Arbeitszeiten, d.h. die in sich geschachtelten Arbeitsabläufe, herangezogen. In die Angaben für die Personalkosten fließen neben den Gehältern auch die vom Arbeitgeber zu entrichtenden Sozialleistungen mit ein. Diese bestehen aus einem Arbeitgeberanteil in Höhe von 50 % für Renten-, Kranken-, Pflege- und Arbeitslosenversicherung und den Beiträgen für die Berufshaftpflichtversicherung. Die monatlichen Kosten für einen Medizinisch Technischen Assistenten an dem Universitätsklinikum Münster setzen sich zusammen aus Gehalt und Abgaben für Sozialleistungen. Diese belaufen sich bei einer Wochenarbeitszeit von 38,5 Stunden auf 3.689,88 €. Dies entspricht, bei einer angenommenen 5-Tage-Woche mit 7,7 Arbeitsstunden pro Tag, einem Stundensatz von 23,96 €.

#### **4.3.1 Kosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchungen**

Als Vergleichseinheit wird eine untersuchte Probe je Gerät herangezogen. In die verschiedenen Arbeitsschritten fließen Material-, Kapital- und Personalkosten ein, konstante Kosten werden nicht berücksichtigt.

##### **4.3.1.1 Kosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L**

Eine Probe, die mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L analysiert wird, wird in jeweils vier Einzelreaktionen mit „A-, „C-, „G- und „T-Reagenz“ („Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“, Amersham, Deutschland) untersucht. Da beide komplementären Stränge der DNA hierbei betrachtet werden, um Artefakte bei der Auswertung und Fehler durch die Untersuchung auszuschließen, sind insgesamt acht Einzelreaktionen nötig, um eine Probe zu untersuchen. Bezug genommen wird hier auf eine DNA-Sequenzuntersuchung mit 12 Proben bestehend aus 48 Einzelreaktionen.

#### 4.3.1.1.1 Materialkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L

Die Materialkosten für eine DNA-Sequenzuntersuchung setzen sich aus Ausgaben für das Gel, die PCR und die Vorbereitung der Proben zusammen. Davon entfallen 5,28 € als proportionale Kosten auf Materialien, die ausschließlich für die DNA-Sequenzuntersuchung benötigt werden. Neben der Gelmatrix und dem TBE-Laufpuffer sind dies die für die DNA-Sequenzreaktion benötigten Substanzen. 2,18 € stellen spezifische variable Kosten in Form der DNA-Amplifikation mittels PCR dar. Die Gesamtkosten belaufen sich insgesamt auf 7,46 € je Probe.

Proportionale Kosten	Gelmatrix	0,65 €
	Urea	0,10 €
	TBE-Puffer	1,00 €
	Loading dye	0,02 €
	Sequ. Kit	3,01 €
	Primer M13	0,50 €
	Gesamt prop. Kosten	5,28 €
Spezifisch variable Kosten	PCR-Primer	0,10 €
	Taq Polymerase	0,58 €
	Reinigung	1,40 €
	Puffer, ...	0,10 €
	Gesamt spez.-vari. Kosten	2,18 €
Materialkosten je Probe (LI-COR 4000L)		7,46 €

#### 4.3.1.1.2 Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L

Das Gerät steht fünf Werkstage jede Woche zur Verfügung entsprechend 260 Arbeitstagen ohne Feier- oder Urlaubstage. Pro Tag ist es möglich 12 Proben, bestehend



aus 48 Einzelreaktionen, zu analysieren, entsprechend einem Gesamtvolumen von 3120 Proben pro Jahr.

In die Berechnung der Gerätekosten fließen neben den Anschaffungskosten auch die Auslastung und die Nutzdauer für die verschiedenen Geräte mit ein. Der Restwert bleibt bei dieser Aufstellung unberücksichtigt, da nach einer zehnjährigen Nutzungsdauer die Geräte aufgrund der Abnutzung und des technischen und wissenschaftlichen Fortschritts nicht weiter verwendet werden [12]. Die Anschaffungskosten von 95.995,00 € werden hierbei pro Jahr als Abschreibungen in Höhe von 9.599,50 € berechnet. Somit entstehen pro Probe Kosten in Höhe von 3,08 €.

Zusätzlich werden Kapitalkosten, d.h. „kalkulatorischen Zinsen, angesetzt, um das betriebsnotwendige Kapital zu verzinsen. Sie werden zweckmäßigerweise auf der Grundlage des Durchschnittswertes ermittelt“ [97], wobei die Hälfte der Anschaffungskosten herangezogen wird. Dies erklärt sich damit, dass durch die jährlichen Abschreibungen der Anschaffungswert kontinuierlich bis zum Nullpunkt sinkt [97]. Für den Kalkulationszinssatz der Kapitalkosten wird der marktübliche Zinssatz von 6 % veranschlagt [97]. Bei Anschaffungskosten von 95.995,00 € für ein DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L fallen pro Jahr 2.879,85 € an Kapitalkosten bzw. kalkulatorischen Zinsen an. Bei 3120 möglichen Proben pro Jahr bei einer völligen Auslastung des Gerätes entstehen so Kosten von 0,92 € je Probe.

Die Instandhaltungs- und Wartungskosten sind für die gesamte Nutzungsdauer von zehn Jahren summiert und auf die einzelnen Jahre umverteilt. In den ersten 5 Jahren werden die Instandhaltungskosten durch eine Garantie des Herstellers (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) abgedeckt. Für die folgenden 5 Jahre wurde mit dem Hersteller ein 'Full Service Support Arrangement' getroffen, der für 6.200,00 € pro Jahr alle anfallenden Kosten deckt. Auf zehn Jahre berechnet betragen die Instandhaltungskosten 3.100,00 € jährlich oder 0,99 € je Probe. Dies beinhaltet neben den anfallenden Reise- und Arbeitskosten für technisches Personal auch jegliche Kosten für Ersatzteile.

Die Raumkosten sind nach einem festen Raumkostensatz des Universitätsklinikums Münster für alle Einrichtungen kalkuliert. Hierin finden sich neben der Miete für den Raum auch Kosten für die Reinigung der Labore und den Stromverbrauch der Geräte wieder. Je Quadratmeter Nutzungsfläche werden 2003 dafür 21,00 € je Monat veranschlagt. Für das DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L sowie Computer und

Monitor, für welche zusammen 2 m<sup>2</sup> Stellfläche benötigt werden, fallen im Jahr somit Raumkosten in Höhe von 504,00 € an, je Probe 0,16 €.

Zusammengerechnet entstehen Gerätekosten bei der DNA-Sequenzuntersuchung mit dem LI-COR 4000L in Höhe von 5,15 € je Probe.

Kapitalkosten	kalkulatorische Zinsen	0,92 €
gerätespezifische Kosten	Abschreibungen	3,08 €
	Instandhaltungs- und Wartungskosten	0,99 €
	Raumkosten	0,16 €
Gerätekosten je Probe (LI-COR 4000L)		5,15 €

#### 4.3.1.1.3 Personalkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L

Wird die verbrauchte Arbeitszeit auf eine Probe umgerechnet, fallen bei einer Arbeitszeit von 491 Minuten (= 8,2 Arbeitsstunden, vgl. Tabelle 10) für 12 Proben 16,37 € Personalkosten je Probe an.

#### 4.3.1.1.4 Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit LI-COR 4000L

Insgesamt fallen Kosten je Probe in Höhe von 28,98 € an, wie in Tabelle 15 aufgeführt.

Materialkosten je Probe	7,46 €
Personalkosten je Probe	16,37 €
Gerätekosten je Probe	5,15 €
Gesamtkosten je Probe (LI-COR 4000L)	28,98 €

#### 4.3.1.2 Kosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700

Bei der DNA-Sequenzuntersuchung durch den ABI Prism 3700 wird eine Probe direkt in einem Lauf untersucht. Eine getrennte Betrachtung nach Nukleotiden in vier Einzelläufen wie bei der Sequenzuntersuchung durch den LI-COR 4000L entfällt. Bei voller Auslastung können durch den ABI Prism 3700 täglich in zwei Läufen insgesamt sechs Multiscreenplatte mit je 96 Proben analysiert werden. An 260 Arbeitstage pro Jahr ist es somit möglich, maximal 149.760 Proben zu untersuchen. Bezug genommen wird hier auf eine Multiscreenplatte mit 96 Proben.

##### 4.3.1.2.1 Materialkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700

Bei der Vorbereitung der Proben fallen proportionale Kosten durch die Reinigung der Proben mittels Enzymverdau („PCR product pre-sequencing kit“, USB Corporation, Cleveland, USA) und anschließender Säulenreinigung mit „Sephadex Gel G 50“ mittels

Proportionale Kosten	Enzymverdau	0,52 €
	BigDye™ Mix	3,18 €
	Puffer	0,45 €
	Primer	0,10 €
	Sephadex / Multiscreen	0,24 €
	Gesamt prop. Kosten	4,49 €
Spezifisch variable Kosten	PCR-Primer	0,10 €
	Taq Polymerase	0,58 €
	Reinigung	1,40 €
	Puffer	0,10 €
	Gesamt spez.-vari. Kosten	2,18 €
Materialkosten je Probe (ABI Prism 3700)		6,67 €

des „Multiscreen Assay Systems“ (Millipore Corporation, Bedford, USA) an. Hinzu kommen weitere proportionale Kosten für die DNA-Sequenzreaktion mit dem „BigDye™ Terminator Sequencing Kit v. 3.0“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) und die spezifisch variablen Kosten der DNA-Amplifikation. Die Materialkosten der Vorbereitung für eine Probe belaufen insgesamt sich auf 6,67 €.

#### **4.3.1.2.2 Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700**

Durch die Anschaffung eines DNA-Sequenzanalysegerätes ABI Prism 3700 fallen Gerätekosten in Höhe von 389.410,00 € an. Im Preis enthalten sind alle weiteren für den Betrieb des Sequenzierers und für die Auswertung der Ergebnisse benötigten Geräte und Software. Bei der Aufreinigung der Proben durch das Sephadex / Multiscreen System wird für die 50 Minuten dauernde Trocknung der Filtrate ein Vakuum System (Millipore Corporation, Bedford, USA) zum Listenpreis von 699,00 € eingesetzt. Insgesamt fallen Anschaffungskosten für die benötigten Apparaturen in der Höhe von 390.109,00 € an. Die kalkulatorischen Zinsen von 6 % belaufen sich auf 11.703,27 € jährlich.

Mit dem Hersteller (Applied Biosystems, Foster City, USA) ist, für die weitere Betriebsdauer nach Ablauf der einjährigen Garantieleistung, ein 'Full service'-Wartungsvertrag in Höhe von 30.640,00 € pro Jahr abgeschlossen. Enthalten in diesem Vertrag sind eine Wartung pro Jahr, alle notwendigen Reparaturen, Ersatzteile (inkl. des Laserheads) sowie Arbeits- und Reisekosten des technischen Personales und eine kostenlose Beratung über eine Service-Hotline. Auf zehn Jahre verteilt belaufen sich die Instandhaltungskosten so auf 27.576,00 € jährlich.

Da für die Anlage, d.h. DNA-Sequenzanalysegerät, Computer und Monitor, ca. 3,5 m<sup>2</sup> Stellfläche benötigt werden, belaufen sich die Raumkosten für den ABI Prism 3700 auf 882,00 € im Jahr.

An sonstigen gerätespezifischen Kosten fallen Anschaffungen für Puffer, Polymer und Kapillararray an. Puffer wird wöchentlich ca. ein Liter verbraucht, was auf ein Jahr berechnet Kosten in Höhe von 13.130,00 € nach Listenpreis (4 Liter / 1.010,00 €) verursacht. Für das Polymer fallen jährliche Kosten in Höhe von 38.220,00 € an, bei

einem Verbrauch von 1,5 Flaschen wöchentlich (~ 315 ml) und einem Preis von 490,00 € je Flasche (~ 210 ml). Ein Kapillararray, welches jedes Jahr durchschnittlich einmal ausgetauscht wird, kostet nach Liste 7.000,00 €. Alles in allem summieren sich die gerätespezifischen Kosten pro Jahr auf 58.350,00 €.

Zusammen ergeben sich Gerätekosten in Höhe von 137.522,35 € jährlich, wobei auf ein einzelne Proben jeweils 0,92 € entfallen.

Tabelle 17: Gerätekosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700		
Kapitalkosten	kalkulatorische Zinsen	0,08 €
Gerätespezifische Kosten	Abschreibungen	0,26 €
	Instandhaltungs- und Wartungskosten	0,18 €
	Raumkosten	0,01 €
	sonstige	0,39 €
Gerätekosten je Probe (ABI Prism 3700)		0,92 €

#### 4.3.1.2.3 Personalkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700

Für die Bearbeitung der Proben werden insgesamt 470 Minuten (~ 7,8 Arbeitsstunden) aufgewendet. Die Personalkosten belaufen sich hierfür auf 1,95 € je Probe.

Neben den Kosten für die Bearbeitung der Proben fallen zusätzlich Personalkosten bei der täglichen Bedienung und Wartung (Auswechseln der Werkstoffe wie Puffer und Polymer, Reinigung, etc.) des DNA-Sequenzanalysegerätes an. Für Instandhaltungsarbeiten bei zwei Läufen mit je drei Multiscreenplatten täglich werden im Durchschnitt ca. 60 Minuten benötigt. Dies entspricht Personalkosten von 23,96 €, auf eine Probe umgerechnet von 0,04 €.

Insgesamt fallen Personalkosten in Höhe von 1,99 € je Probe an.

#### 4.3.1.2.4 Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700

Die Gesamtkosten je Probe des DNA-Sequenzanalysegerätes ABI Prism 3700 belaufen sich auf 9,58 €.

Tabelle 18: Gesamtkosten je Probe der DNA-Sequenzuntersuchung mit ABI Prism 3700	
Materialkosten je Probe	6,67 €
Gerätekosten je Probe	0,92 €
Personalkosten je Probe	1,99 €
Gesamtkosten je Probe (ABI Prism 3700)	9,58 €

#### 4.3.1.3 Kosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung

Bei der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung wird durch ein nicht angegliedertes Labor auf der Basis einer Honorarvereinbarung die Analyse der Proben vorgenommen. Die Kosten je Probe setzen sich aus der Vorbereitung der Probe sowie dem Honorar des Labors zusammen. Die Honorarforderungen variieren dabei je nach Vorbereitung der Proben. So kann sowohl native aufgereinigte DNA mit den benötigten Oligonukleotiden, DNA-Amplifikate mittels PCR, Plasmid-DNA oder Produkte der DNA-Sequenzreaktion eingesandt werden. Proben bis zu 1.000 Basenpaaren werden pauschal auf der Basis der einzelnen Probe vergütet. Größere DNA-Stücke mit mehr als 1.000 Basenpaaren werden nach der Anzahl der analysierten Basenpaare abgerechnet. Für den Vergleich der Kosten wird das Unternehmen ausgewählt, das in Verbindung mit den niedrigsten Eigenkosten das kostengünstigste Angebot unterbreitet. Die angegebenen Preise werden aus der aktuellen Preisliste des Unternehmens ermittelt.

##### 4.3.1.3.1 Eigenkosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung

Die anfallenden Kosten für die Vorbereitung der Proben setzen sich zusammen aus Personal- und Materialkosten, die Gerätekosten entfallen. Die Materialkosten reduzieren

sich auf die spezifisch variablen Kosten von 2,18 € je Probe, die zur Herstellung von DNA-Amplifikaten mittels PCR benötigt werden.

Die Arbeitszeit bei der Vorbereitung der Proben reduziert sich auf 356 Minuten Gesamtarbeitszeit (~ 4,5 Stunden), da nur noch die DNA-Amplifikation mit Kontrolle und die Reinigung der PCR-Produkte durchgeführt werden. Es ergeben sich Personalkosten von 1,47 € je Probe.

Insgesamt belaufen sich die Eigenkosten auf 3,65 € je Probe.

#### **4.3.1.3.2 Honorarkosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung**

Die Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bietet DNA-Sequenzuntersuchungen durch einen ABI Prism 3700 und ABI Prism 3730 an. Dabei wird die DNA-Sequenzreaktion durch MWG-Biotech selbst durchgeführt; einzusenden sind gereinigte DNA-Amplifikate oder Plasmid-DNA. Es ist möglich, zwischen einem „Value Read“ und einem „Comfort Read“ zu wählen, wobei beim „Comfort Read“ auch die Aufreinigung der Proben vor der DNA-Sequenzuntersuchung durch MWG-Biotech übernommen wird. Die Honorarforderungen des „Value Read“ belaufen sich, bei weniger als 48 Proben auf 11,70 € je Probe, bei mehr als 48 Proben auf 9,70 € je Probe. Beim „Comfort Read“ werden, gleich bei welcher Probenanzahl, 19,00 € Honorar gefordert.

Für die weitere Berechnung wird von der Vorbereitung der Proben für den „Value Read“ ausgegangen, da sich dies als die kostengünstigste Variante empfiehlt. Da von mehr als 48 Proben einzusenden sind, ist mit Honorarkosten in Höhe von 9,70 € je Probe zu rechnen.

#### **4.3.1.3.3 Gesamtkosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung**

Insgesamt belaufen sich die Kosten der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung auf 13,35 € je Probe (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Gesamtkosten je Probe der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung		
Eigenkosten	Materialkosten	2,18 €
	Personalkosten	1,47 €
	Gesamte Eigenkosten	3,65 €
Honorarkosten	DNA-Sequenzuntersuchung	9,70 €
Gesamtkosten je Probe (kommerziell)		13,35 €

### 4.3.2 Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Bei der SSCP-Analyse werden die anfallenden Kosten in Material-, Kapital- und Personalkosten aufgeschlüsselt. Als Bezugsgröße für die Berechnung dient die maximal mögliche Beladung eines Gels mit 12 Proben. Die Kosten für die Positiv-Probe und den Leerwert werden hierbei auf die Proben verteilt.

Da täglich zwei Gele mit je 12 Proben analysiert werden können, ergibt sich bei 260 Arbeitstagen ein maximales Probenaufkommen von 6240 Proben pro Jahr.

#### 4.3.2.1 Materialkosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Neben den Kosten für die Gelmatrix und die Silberfärbung fallen auch Kosten für die

Tabelle 20: Materialkosten je Probe der SSCP-Analyse		
Proportionale Kosten	Gelmatrix und Puffer	0,35 €
	Silberfärbung	0,18 €
	Gesamt prop. Kosten	0,53 €
Spezifisch variable Kosten	PCR-Primer	0,10 €
	Taq Polymerase	0,58 €
	Probenaufreinigung	1,40 €
	Puffer	0,10 €
	Gesamt spez.-vari. Kosten	2,18 €
Materialkosten je Probe (SSCP)		2,71 €



PCR und die Vorbereitung der Proben an. Es summieren sich 2,71 € je Probe, die sich in 2,18 € für proportionale Kosten und 0,53 € für spezifisch variable Kosten aufteilen.

#### 4.3.2.2 Gerätekosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

An Geräten für eine SSCP-Analyse wird neben einer Elektrophoresekammer und einem Spannungsgeber zusätzlich ein Kühlaggregat benötigt. Die Anschaffungskosten belaufen sich nach Katalogpreisen zusammen auf 5.210,00 €, die hierfür veranschlagten kalkulatorischen Zinsen auf 156,30 € pro Jahr. Die Nutzungsdauer wird ebenfalls für zehn Jahre veranschlagt, der Restwert mit 0,00 € angenommen.

Die für die SSCP-Analyse benötigten Apparaturen sind wenig wartungsbedürftig und störungsanfällig. Die Wartungs- und Instandhaltungskosten werden auf 500,00 € in zehn Betriebsjahren geschätzt, ein Wartungsvertrag mit dem Hersteller existiert nicht.

An Raumkosten fallen nach Raumkostensatz für 1,5 m<sup>2</sup> Stellfläche für Kühlung, Spannungsgeber und Elektrophoresekammer und für 1 m<sup>2</sup> Stellfläche für die Silberfärbung 630,00 € pro Jahr an.

Insgesamt belaufen sich die Kapitalkosten für eine SSCP-Analyse auf 1.513,60 € jährlich, wobei auf eine Probe 0,21 € entfallen.

Tabelle 21: Gerätekosten je Probe der SSCP-Analyse		
Kapitalkosten	kalkulatorische Zinsen	0,03 €
Gerätespezifische Kosten	Abschreibungen	0,08 €
	Instandhaltungs- und Wartungskosten	0,00 €
	Raumkosten	0,10 €
	sonstige	0,00 €
Gerätekosten je Probe (SSCP)		0,21 €

#### 4.3.2.3 Personalkosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Für zwei Gele mit 24 Proben werden 506 Minuten Arbeitszeit (~ 8,5 Stunden) benötigt. Es fallen somit insgesamt Personalkosten in Höhe von 203,66 € an, je Probe also 8,49 €.

#### 4.3.2.4 Gesamtkosten je Probe der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Je Probe fallen bei der SSCP-Analyse 11,41 € Kosten an, wie in Tabelle 22 aufgelistet. Hierin sind die zusätzlichen Kosten für weiterführende Untersuchungen mittels DNA-Sequenzuntersuchung nicht mit einberechnet.

Tabelle 22: Gesamtkosten der SSCP-Analyse je Probe	
Materialkosten je Probe	2,71 €
Gerätekosten je Probe	0,21 €
Personalkosten je Probe	8,49 €
Gesamtkosten je Probe (SSCP)	11,41 €

#### 4.3.2.5 Kosten je Probe für DNA-Sequenzuntersuchungen bei der Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Die in der SSCP-Analyse auffälligen Proben werden auf ihre Gensequenz untersucht. Für die Kostenberechnung wird hierzu die DNA-Sequenzuntersuchung mittels ABI Prism 3700 mit Gesamtkosten von 9,58 € pro Probe gewählt.

### 4.4 Gegenüberstellung der Analyseverfahren

Die einzelnen DNA-Sequenzanalyseverfahren können direkt in Bezug auf die Kostenentwicklung anhand einer Probe miteinander verglichen werden. Für den Vergleich zwischen den direkten DNA-Sequenzanalyseverfahren und der

Voruntersuchung mit der SSCP-Analyse wird die durchgeführte Versuchsreihe herangezogen, um den Anteil der Folgeuntersuchungen der SSCP-Analyse mit einzubeziehen. Zugleich wird das Kostenaufkommen für einen längeren Zeitraum dargestellt.

#### 4.4.1 Gegenüberstellung der Kosten je Probe

Die Kosten für eine DNA-Sequenzuntersuchung durch den LI-COR 4000L belaufen sich auf 28,98 € je Probe, bei einer Analyse mit dem ABI Prism 3700 auf 9,58 € und bei der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung auf 13,35 €.

Tabelle 23: Vergleich der Kosten je Probe der DNA-Sequenzanalyseverfahren			
Verfahren	<b>I</b> <b>LI-COR</b>	<b>II</b> <b>ABI Prism 3700</b>	<b>III</b> <b>kommerziell</b>
Materialkosten	7,46 €	6,67 €	2,18 €
Gerätekosten	5,15 €	0,92 €	-
Personalkosten	16,37 €	1,99 €	1,47 €
Sonstige Kosten	-	-	<sup>1</sup> 9,70 €
Gesamtkosten je Probe	28,98 €	9,58 €	13,35 €

Tabelle 23: <sup>1</sup> Honorarkosten

#### 4.4.2 Gegenüberstellung der Kosten einer Versuchsreihe

##### 4.4.2.1 DNA-Sequenzanalyseverfahren

Der Aufbau dieser Versuchsreihe folgt dem unter 4.1.1 beschriebenen Schema, wie in Tabelle 24 dargestellt. Bei der Untersuchung von Exon 12 werden bei 46 untersuchten Proben 23 Mutationen identifiziert. Darüber hinaus werden sieben Patienten mit zwei Mutationen ermittelt, sodass bei der folgenden Untersuchung von Exon 7 nur 16 Proben berücksichtigt werden. Hierbei werden bei 32 untersuchten Proben weitere acht Mutationen identifiziert, wobei 5 Patienten mit der zweiten identifizierten Mutation aus

Tabelle 24: Aufbau der Versuchsreihe der DNA-Sequenzuntersuchungen; Ermittlung der Anzahl der untersuchten Proben

Lauf Nr.	Exon Nr.	Anzahl der zu untersuchenden Proben	Anzahl der zu untersuchenden Proben (Forward / Reverse)	Anzahl der identifizierten Mutationen	Anzahl der Proben mit der zweiten identifizierten Mutation
1.	12	23	46	23	7
2.	7	16	32	8	5
3.	5	11	22	1	0
4.	10	11	22	2	1
5.	2	10	20	4	2
6.	3	8	16	4	4
7.	11	4	8	1	1
8.	8	3	6	0	0
9.	1	3	6	0	0
10.	4	3	6	0	0
11.	6	3	6	0	0
12.	9	3	6	0	0
13.	13	3	6	0	0
gesamt		101	202	43	20

dem noch zu untersuchenden Patientenpool ausscheiden. Die bei der Untersuchung von Exon 5 erkannte Mutation wird als erste Mutation eines Patienten entdeckt, sodass bei der Untersuchung von Exon 10 wiederum 22 Proben untersucht werden. Der zu untersuchende Patientenpool reduziert sich bei den Analysen der Exone 2, 3 und 11 auf drei Patienten, wobei hier insgesamt 44 Proben untersucht werden. Bei den verbleibenden drei Patienten kann auch bei den folgenden Untersuchungen der Exone 8, 1, 4, 6, 9 und 13 keine zweite Mutation identifiziert werden.

Insgesamt werden 101 Proben auf Mutationen analysiert. Da jeweils die beiden komplementären DNA-Stränge untersucht werden, resultiert insgesamt eine Anzahl von 202 untersuchten Proben.

#### **4.4.2.1.1 Kosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L**

Für eine Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L und 202 vorgenommenen Untersuchungen entstehen Materialkosten in Höhe von 1.506,92 €.

Bei 202 untersuchten Proben werden 17 DNA-Sequenzuntersuchungen benötigt. Da jede DNA-Sequenzuntersuchung mit dem LI-COR 4000L über Nacht andauert und die Auswertung erst am nächsten Tag erfolgt, sind 18 Arbeitstage für die Untersuchungen notwendig. Dies entspricht einer Geräteauslastung von 6,73 % pro Jahr mit Gerätekosten in Höhe von 1.040,30 €.

Zuzüglich der Personalkosten für 18 Arbeitstage in Höhe von 3.306,74 € summieren sich die Kosten einer Versuchsreihe mit 202 Proben mit DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L auf 5.853,96 €.

Tabelle 25: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L	
Materialkosten	1.506,92 €
Gerätekosten	1.040,30 €
Personalkosten	3.306,74 €
<b>Gesamtkosten einer Versuchsreihe (LI-COR 4000L)</b>	<b>5.853,96 €</b>

#### 4.4.2.1.2 Kosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700

Bei einer Versuchsreihe mit 202 Proben, die durch das DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 untersucht werden, entstehen Materialkosten in Höhe von 1.347,34 €, Gerätekosten in Höhe von 185,84 € und Personalkosten in Höhe von 401,98 €. Es fallen somit 1.935,16 € an Gesamtkosten an.

Tabelle 26: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700	
Materialkosten	1.347,34 €
Gerätekosten	185,84 €
Personalkosten	401,98 €
Gesamtkosten einer Versuchsreihe (LI-COR 4000L)	1.935,16 €

#### 4.4.2.1.3 Kosten einer Versuchsreihe mit der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung

Durch die Vorbereitung der 202 Proben entstehen 737,30 € Eigenkosten in Form von Materialkosten in Höhe von 440,36 € und von Personalkosten in Höhe von 296,94 €. Hinzu kommen Honorarkosten in Höhe von 1.959,40 €, sodass Gesamtkosten in Höhe von 2.696,70 € anfallen.

Tabelle 27: Gesamtkosten einer Versuchsreihe mit der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung	
Eigenkosten	737,30 €
Honorarkosten	1.959,40 €
Gesamtkosten einer Versuchsreihe (kommerziell)	2.696,70 €

#### 4.4.2.2 Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Die Abfolge der Untersuchung mittels SSCP-Analyse wird nach dem Schema unter 3.1.1 durchgeführt und in Tabelle 28 dargestellt. Bei Abweichungen des Laufverhaltens der Proben in der SSCP-Analyse schließt sich direkt eine DNA-Sequenzuntersuchung an. Patienten, bei denen zwei Mutationen identifiziert werden, werden nicht weiter untersucht. Insgesamt werden 39 Mutationen und 14 Polymorphismen identifiziert werden, wobei vier Polymorphismen ohne parallele Mutation auftraten.

Die Analyse von Exon 12 aller Proben zeigt bei 17 der 23 untersuchten Proben ein vom Wildtyp abweichendes Laufverhalten. Bei der anschließenden DNA-Sequenzuntersuchung dieser Proben wurden insgesamt 23 Mutationen sowie ein Polymorphismus identifiziert. Hierbei zeigen neun Patienten eine und sieben Patienten zwei Mutationen auf Exon 12. Bei der Analyse von Exon 7 werden somit 16 Patienten berücksichtigt, wobei zehn Proben auffallen mit sieben Mutationen und fünf Polymorphismen. Bei den 12 Patienten, die auf eine Mutation von Exon 5 und 10 untersucht werden, wird eine weitere Mutation auf Exon 10 in der SSCP-Analyse und der DNA-Sequenzuntersuchung gefunden. In den nachfolgenden Untersuchungen von Exon 2 werden bei 11 Patienten vier Mutationen, bei den Untersuchungen von Exon 3 bei zehn Patienten drei Mutationen sowie einen Polymorphismus identifiziert. Die SSCP-Analyse von Exon 11 zeigt drei auffällige Proben mit einer Mutation und zwei Polymorphismen. Bei Untersuchungen der Exone der verbliebenen sechs Patienten werden fünf Polymorphismen bei der nachträglich durchgeführten DNA-Sequenzuntersuchung identifiziert. Insgesamt werden 119 Proben mittels der SSCP-Analyse untersucht.

Bei 43 Proben schließt sich eine DNA-Sequenzuntersuchung aufgrund eines abweichenden Laufverhaltens in der SSCP-Analyse an. Darüber hinaus werden alle Exone von sechs Patienten zusätzlich mit der DNA-Sequenzuntersuchung nachuntersucht, da mittels der SSCP-Analyse keine oder nur eine Mutation erkannt wird. Dies erfolgt nach dem vorher angewandten Schema in weiteren 50 DNA-Sequenzuntersuchungen, wobei alleine 39 DNA-Sequenzuntersuchungen auf die drei Patienten entfallen, bei denen insgesamt nur eine Mutation identifiziert wird. Somit werden insgesamt 93 DNA-Sequenzuntersuchungen durchgeführt.

Tabelle 28: Aufbau der Versuchsreihe der SSCP-Analyse; Ermittlung der Anzahl der untersuchten Proben						
Gel Nr.	Exon Nr.	Anzahl der zu untersuchenden Proben	Anzahl der auffälligen Proben	Anzahl der identifizierten Mutationen <sup>1</sup>	Anzahl der identifizierten Polymorphismen <sup>1</sup>	Anzahl der Proben mit der zweiten identifizierten Mutation
1 + 2	12	23	17	23	1	7
3 + 4	7	16	10	7	5	4
5	5	12	0	0	0	0
6	10	12	1	1	0	1
7	2	11	3	4	0	1
8	3	10	4	3	1	3
9	11	7	3	1	2	1
9	8	6	0	0	0	0
10	1	6	1	0	1	0
10	4	6	2	0	2	0
11	6	6	2	0	2	0
11	9	6	0	0	0	0
12	13	6	0	0	0	0
gesamt		119	43	39	14	

Tabelle 28: <sup>1</sup> durch DNA-Sequenzuntersuchung



#### 4.4.2.3 Kosten einer Versuchsreihe mit Single-Strand Conformation Polymorphism Analyse

Durch die Voruntersuchung der 119 Proben mittels der SSCP-Analyse entstehen Materialkosten in Höhe von 322,49 €, Personalkosten in Höhe von 1.010,31 € und Gerätekosten in Höhe von 24,99 €. Darüber hinaus fallen Kosten durch die 93 DNA-Sequenzuntersuchungen an, die, durch das DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 durchgeführt, 890,94 € betragen. Insgesamt belaufen sich die Gesamtkosten auf 2.248,73 €.

Materialkosten	322,49 €
Gerätekosten	24,99 €
Personalkosten	1.010,31 €
Weitere Kosten <sup>1</sup>	890,94 €
Gesamtkosten einer Versuchsreihe (SSCP)	2.248,73 €

Tabelle 29: <sup>1</sup> Untersuchungen mittels des DNA-Sequenzanalysegerätes ABI Prism 3700

#### 4.4.2.4 Gegenüberstellung der Kosten einer Versuchsreihe

Die Gesamtkosten der Versuchsreihe mit 23 Patienten belaufen sich bei einer Untersuchung der Proben ausschließlich mit dem DNA-Sequenzanalysegerät LI-COR 4000L auf 5.823,96 €, mit dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 auf 1.935,16 € und durch eine

Verfahren	<b>I</b> <b>LI-COR</b>	<b>II</b> <b>ABI Prism 3700</b>	<b>III</b> <b>kommerziell</b>	<b>IV</b> <b>SSCP</b>
Materialkosten	1.506,92 €	1.347,34 €	440,36 €	322,49 €
Personalkosten	3.306,74 €	401,98 €	296,94 €	1.010,31 €
Gerätekosten	1.040,30 €	185,84 €	-	24,99 €
weitere Kosten	-	-	<sup>1</sup> 1.959,40 €	<sup>2</sup> 890,94 €
Gesamtkosten	5.853,96 €	1.935,16 €	2.696,70 €	2.248,73 €

Tabelle 30: <sup>1</sup> Honorarkosten; <sup>2</sup> Untersuchungen mittels des DNA-Sequenzanalysegerätes ABI Prism 3700

kommerzielle DNA-Sequenzuntersuchung auf 2.696,70 €. Werden die Proben durch die SSCP-Analyse vor- und die auffälligen Proben durch eine DNA-Sequenzuntersuchung nachuntersucht, fallen Kosten in Höhe von 2.248,73 € an.

#### 4.4.3 Kostenkalkulation

Die Kosten für eine willkürliche Anzahl von Patienten bei der Phenylketonurie werden für die beiden kostengünstigsten Verfahren in der durchgeführten Untersuchungsreihe kalkuliert. Die Kalkulation beruht auf der Anzahl der zu untersuchenden Proben sowie auf der Anzahl der durch ein Vorscreening mittels SSCP-Analyse anfallenden Nachuntersuchungen.

Für 23 Patienten fallen insgesamt 202 zu untersuchende Proben bei der DNA-Sequenzuntersuchung an, dies entspricht einem Faktor von 8,8. Bei 30 Patienten fallen somit ca. 270 zu untersuchende Proben mit Gesamtkosten in Höhe von 2.586,60 € an.

Bei der SSCP-Analyse werden bei 23 Patienten insgesamt 119 Proben untersucht, was einen Faktor von 5,2 entspricht. Somit müssen bei 30 Patienten ca. 155 Proben untersucht werden mit Gesamtkosten in Höhe von 2.439,15 €. Betrachtet man die hier durchgeführten Versuchsreihen, fallen drei Patienten auf, bei denen weder mit der DNA-Sequenzuntersuchung noch mit der SSCP-Analyse eine zweite Mutation identifiziert werden kann. Werden diese für die weitere Kostenkalkulation nicht berücksichtigt, reduziert sich der Anteil der Nachuntersuchung der SSCP-Analyse auf 45 %. Bei 155 untersuchten Proben müssen somit 70 Proben mittels der DNA-Sequenzuntersuchung nachträglich untersucht werden. Die hierbei anfallenden Kosten belaufen sich auf 670,60 €.

Tabelle 31: Kostenkalkulation für 30 Patienten		
Verfahren	ABI Prism 3700	SSCP
Anzahl der Untersuchungen	270	155
Materialkosten	1.800,90 €	420,05 €
Personalkosten	537,30 €	1.315,95 €
Gerätekosten	248,40 €	32,55 €
Anzahl der Nachuntersuchungen	-	70
weitere Kosten	-	670,60 €
Gesamtkosten	2.586,60 €	2.439,15 €

Im Vergleich zeigt sich aus finanzieller Sicht das Vorscreening mittels SSCP-Analyse ab einem Patientenpool von 30 oder mehr Patienten gegenüber einer DNA-Sequenzuntersuchung mit dem ABI Prism 3700 kostengünstiger.

## **5 Diskussion**

Der wirtschaftliche Vorteil des flächendeckenden Neugeborenen Screenings beispielsweise für die Phenylketonurie ist mehrfach dargestellt worden [6, 20, 36, 55, 84]. Bei den im Neugeborenen Screening auffälligen Patienten wie auch bei Patienten, die im Laufe ihres Lebens eine klinische Symptomatik entwickeln sind nachfolgend Bestätigungstests erforderlich, die meist auf biochemischen oder enzymatischen Methoden beruhen. Zunehmend finden molekulargenetische Verfahren zum Nachweis krankheitsinduzierender Mutationen im Rahmen einer Genotypisierung Verwendung. Leitlinien der zuständigen Fachgesellschaften empfehlen mehr und mehr eine Genotypisierung, wobei auf Kosten-Nutzen-Analysen in der Regel nicht eingegangen wird. Prinzipiell unterliegen genetische Untersuchungen einer strengen Indikationsstellung. Sie sollten Anwendung finden, wenn es sich um eine Methode handelt, die für einen Patienten unter Aspekten der Belastung, Zuverlässigkeit und Kosten den effektivsten Weg zu einer Diagnosestellung darstellt. Darüberhinaus kann eine genetische Diagnostik sofern erwünscht oder erforderlich Voraussetzung für Familienuntersuchungen oder eine Pränataldiagnostik bei kommenden Schwangerschaften sein. Molekulargenetische Untersuchungen lassen sich bisher aufgrund der vielfältigen in Frage kommenden Erkrankungen, der Häufigkeit der einzelnen Erkrankung, dem unterschiedlichen Stand der wissenschaftlichen Vorarbeiten sowie der komplexen methodischen Ansätze nicht standardisiert durchführen. Bisherige Untersuchungen über die Effizienz molekulargenetischer Arbeitsmethoden zur Mutationssuche haben sich bislang fast ausschließlich auf die Sensitivität und Spezifität der Methoden konzentriert. Die betriebswirtschaftliche Seite wurde nur in einzelnen Ausnahmen betrachtet [46, 115, 146]. Hierbei wurden zumeist nur spezielle Fragestellungen erörtert ohne auf eine heterogenes Patientenkollektiv einzugehen. Weiterhin wurden, wie auch in dieser Arbeit, als Grundlage die alleinige direkte Sequenzierung einer Kombination zweier Methoden mit einem Vorscreening und einer anschließenden Sequenzierung gegenübergestellt. In den hier durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen an 23

PKU-Patienten zeigt sich die direkte Sequenzierung mit dem ABI Prism 3700 als kostengünstigste Methode. Auf der Basis dieser Untersuchungsreihe wurde zudem eine Kostenkalkulation angestellt, bei der sich ab einer Anzahl von 30 PKU-Patienten ein Vorscreening gegenüber der direkten Sequenzierung rentiert.

Ein klarer Vorteil der direkten Sequenzierung ist die mit 100 % hohe Spezifität. Zugleich fallen jedoch bei dieser Untersuchungsmethode, auch bei moderneren Geräten wie dem ABI Prism 3700, infolge hoher Material- und Gerätekosten bei großen zu untersuchenden Kollektiven die meisten Kosten an. Nur für kleinere Kollektive stellt sich die direkte Sequenzierung als ökonomisch sinnvoll heraus, wobei die Gesamtgröße eines Kollektives sich aus der Anzahl der zu untersuchenden Personen multipliziert mit der Anzahl der zu untersuchenden Exone ergibt. Der Kostenvorteil des ABI Prism 3700 erklärt sich hierbei durch den Umstand, dass sämtliche Kosten auf mehr Proben je Lauf umverteilt werden können als bei einer SSCP-Analyse. Zudem fließen der Arbeitseinsatz und die Arbeitszeit direkt in die anfallenden Personalkosten ein. Schon hier ist der ABI Prism 3700 mit 401,98 € deutlich kostengünstiger als das arbeitsintensivere SSCP-Analyseverfahren einschließlich nachfolgender DNA-Sequenzuntersuchung mit 1.010,31 €. Insgesamt überwiegen die anfallenden Personalkosten der SSCP-Analyse und stellen je Probe den größten Kostenfaktor da, auch gegenüber den höheren Material- und Gerätekosten der DNA-Sequenzuntersuchung mit dem ABI Prism 3700.

Im Vergleich der DNA-Sequenzanalyseverfahren untereinander zeichnet sich der Vorteil der moderneren Geräte deutlich ab. Die Kosten für die Untersuchung eines aus 23 PKU-Patienten bestehende Kollektives unterscheiden sich bei dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 (mit € 1.935,16 ), der kommerziellen DNA-Sequenzuntersuchung mit (€ 2.696,70 ) und der DNA-Sequenzuntersuchung mit dem LI-COR 4000L (mit € 5.853,96 ) um bis zu € 3.918,80. Dieser deutliche Kostenunterschied ist durch eine größere Automatisierung und die Weiterentwicklung der technischen Geräte zu erklären. Der LI-COR 4000L spielt in den weiteren Betrachtung somit keine Rolle. Durch die stärkere Automatisierung ist es möglich, eine größere Probenanzahl pro Zeiteinheit zu untersuchen, wodurch die anfallenden Kosten auf eine größere Anzahl an Proben verteilt werden. Bei zugleich eingesparter Arbeitszeit reduzieren sich die Personalkosten je Probe von € 16,37 auf € 1,99, auch sinken durch einen erhöhten Probendurchsatz die Gerätekosten je Probe von € 5,15 auf € 0,92 . Zudem fallen

geringere Materialkosten mit € 6,67 an, sodass insgesamt ein Kostenvorteil von € 19,40 je Probe bei dem DNA-Sequenzanalysegerät ABI Prism 3700 besteht. Als weiterer Vorteil der kapillären DNA-Sequenzuntersuchung ist anzuführen, dass die Arbeit mit dem toxischen Polyacrylamid entfällt und das Gefährdungspotential für das Personal deutlich gesenkt wird.

Eine Untersuchung eines Kollektives von PKU-Patienten mittels eines SSCP-Vorscreenings empfiehlt sich erst ab 30 oder mehr Patienten bei 13 zu untersuchenden Exonen. Ein Nachteil der Methoden des Vorscreenings ist die im Vergleich zur Sequenzierung geringere Sensitivität der Verfahren. Die nicht im Vorscreening identifizierten Mutationen müssen mittels der direkten Sequenzierung und höheren Kosten nachuntersucht werden. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv zeigt die SSCP-Methode eine Sensitivität von 84,8 %. Die SSCP-Analyse wird in der Literatur mit einer Sensitivität zwischen 80 % und 100 % für die PKU beschrieben [62, 135]. Hierbei ist allerdings anzuführen, dass die Analyse zum Teil unter unterschiedlichen Bedingungen mehrfach durchgeführt wurde, um eine Sensitivität von 100 % zu erreichen [135]. Ein Grund hierfür ist, dass die SSCP-Analyse bei Genen mit 200 Basenpaaren ihr Sensitivitätsoptimum zeigt, bei größeren Genen sinkt die Sensitivität deutlich [38, 118]. Die in dieser Arbeit erreichten 84,8 % sind somit als Grundlage für weiteren Kalkulationen repräsentativ. Zugleich ist die Spezifität der SSCP-Untersuchung gemindert, da hier Polymorphismen, denen kein Krankheitswert zukommt, als falsch-positive Ergebnisse mit erfasst werden. Allerdings ist ein Polymorphismus erst nach erfolgter direkter Sequenzierung sicher als solcher zu identifizieren. Die jeweils reduzierte Spezifität und Sensitivität tragen so zu einer Erhöhung der Kosten bei, die sich erst ab einem Kollektiv von 30 oder mehr Patienten wieder ausgleichen lassen.

Darüber hinaus gibt es noch weitere in der Literatur beschriebene molekulargenetische Methoden, die sich für ein Vorscreening eignen. Diese zeigen zumeist die gleichen Vor- und Nachteile wie SSCP-Analyse. Zum einen die DGGE-Analyse (denaturing gradient gel electrophoresis), die in der Literatur mit einer Sensitivität für die Phenylketonurie bis zu 99 % beschrieben wird [19, 88]. Auch hier wird die Spezifität der Analyse durch das Auftreten von Polymorphismen gemindert. Allerdings lässt die im Vergleich zur SSCP-Analyse deutlich verbesserte Sensitivität vermuten, dass die Gesamtkosten für dieses Verfahren geringer kalkuliert werden können. Als weitere angeführte Untersuchungsmethoden finden sich die DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) und die Heteroduplex Analyse

[3, 10, 61, 115]. Die Auswahl der Vorscreeningmethode ist von den zu erwartenden Mutationen abhängig. Hierzu empfiehlt sich ein Studium der Literatur unter Berücksichtigung der ethnischen Zugehörigkeit der Patienten, da jede Population neben häufigen Defekten einzelne unterschiedliche seltene Allele und wenige uncharakteristische Mutation besitzt [46]. Die Entwicklung der molekulargenetischen Methoden wird weitergehen, so dass die gewählten Verfahren ständig optimiert werden müssen. Entsprechend werden sich die Kosten insgesamt reduzieren lassen, bedürfen aber um so mehr einer ständigen Evaluierung.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die molekulargenetischen Untersuchungen zur Mutationssuche bei der Phenylketonurie nicht vereinheitlichen lassen. Sie sind abhängig von der Anzahl der untersuchten Patienten sowie deren Herkunft. Nach betriebswirtschaftlichen Gesichtspunkten ist ein Vorscreening bei der Phenylketonurie mittels einer unspezifischeren Methode wie der SSCP oder der DGGE ab einer Kollektivgröße von 30 Personen sinnvoll. Zugleich ist die Kombination der Untersuchungsmethoden der direkten Sequenzierung in Bezug auf die Sensitivität gleichrangig. Für weniger Patienten ist die direkte Sequenzierung als der „Gold-Standard“ anzusehen. Um die ökonomische Grenze zwischen Vorscreening und direkter Sequenzierung auf andere vererbte Stoffwechselerkrankungen zu übertragen, muss die Anzahl der zu untersuchenden Exone und deren Länge mitberücksichtigt werden. Sinken Exon- oder Patientenanzahl, sinkt ebenfalls die Grenze unter 30 Patienten ab.

Weiterhin zeigt sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass die Personalkosten den höchsten Anteil an den entstehenden Gesamtkosten ausmachen. Somit ist eine Kostenreduktion durch eine maximale Auslastung der Geräte möglich. Da sich mit den modernen Apparaturen immer größere Mengen an Proben pro Untersuchung analysieren lassen, ist zudem eine Zentralisierung der Untersuchungen anzuraten. Zugleich ist es somit möglich, weitere Personalkosten in den peripheren Laboren einzusparen und durch die Abnahme größerer Materialmengen beim Einkauf weitere Gelder einzusparen. Weiterhin ist es möglich, eine Methode unter optimierten Bedingungen anzuwenden und systematische und zufällige Fehler durch eine optimierte Routine zu reduzieren. Ist es einem Labor nicht möglich, sich an einem zentral eingerichteten DNA-Sequenzanalysegerät zu beteiligen, bietet sich hier die kommerzielle DNA-Sequenzuntersuchung für kleine Patientenpools an. Für eine längerfristige routinemäßige Genomanalyse sowie bei größeren Patientenkollektiven sprechen

jedoch die höheren Kosten gegen eine kommerzielle DNA-Sequenzuntersuchung. Weiterhin sind Nachteile wie eine zeitliche Verzögerung und Risiken beim Transport der Proben zu berücksichtigen.

Infolge der ständigen Innovationen auf dem Gebiet der Molekulargenetik, deren Resultat eine Optimierung molekulargenetische Untersuchungsmethoden ist, besteht die Notwendigkeit der ständigen Neuevaluation der Betriebskosten. Zugleich müssen die Mutationsanalysen auch in Hinblick auf neue Technologien bezüglich ihrer Kostenstruktur bewerten werden. In diesem Zusammenhang soll diese Arbeit als ein Instrument dienen. Zu diesem Zeitpunkt stellen die direkte Sequenzierung bzw. die Kombination mit der SSCP-Analyse bei größeren Kollektiven betriebswirtschaftlich vorteilhaft arbeitende Methoden dar.

Insgesamt zeigen die hier durchgeführten Analysen, dass die Kosten für molekulargenetische Untersuchungen beträchtlich sind und vielfach unterschätzt werden. Bei der Empfehlung dieser Untersuchungsverfahren in Leitlinien zur Diagnostik einzelner Stoffwechselkrankheiten muss der Kosten-Nutzen-Faktor sehr kritisch beurteilt werden. Die hier entwickelten Netzwerkpläne und betriebswirtschaftlichen Analyseverfahren lassen sich auf andere molekulargenetische Strategien adaptieren und bieten die Basis für ein effektives Kostenmanagement, das sich auf die molekulargenetische Diagnostik genetischer Erkrankungen grundsätzlich anwenden lässt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, de Baulny HO, de Parscau L (2001) Neonatal screening and long-term follow-up of phenylketonuria: the French database. *Early Hum Dev* 65:149-158
2. Alm J, Larsson A, Rosenqvist U (1982) Health economic analysis of the Swedish neonatal metabolic screening programme. A method of optimizing routines. *Med Decis Making* 2:33-45
3. Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M (1999) A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat* 14:333-339
4. Auerbach VH, DiGeorge AM, Carpenter GG (eds) (1967) *Phenylalaninemia: a study of the diversity of disorders which produce elevation of blood concentrations of phenylalanine*. McGraw-Hill, New York
5. Aulela-Scholz C, Heilbronner H (2003) Mutational spectrum in German patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat Mutation in Brief #587*
6. Autti-Ramo I, Makela M, Sintonen H, Koskinen H, Laajalahti L, Halila R, Kaariainen H, Lapatto R, Nanto-Salonen K, Pulkki K, Renlund M, Salo M, Tyni T (2005) Expanding screening for rare metabolic disease in the newborn: an analysis of costs, effect and ethical consequences for decision-making in Finland. *Acta Paediatr* 94:1126-1136
7. Azen CG, Koch R, Friedman EG, Berlow S, Coldwell J, Krause W, Matalon R, McCabe E, O'Flynn M, Peterson R, et al. (1991) Intellectual development in 12-year-old children treated for phenylketonuria. *Am J Dis Child* 145:35-39
8. Barden HS, Kessel R, Schuett VE (1984) The costs and benefits of screening for PKU in Wisconsin. *Soc Biol* 31:1-17
9. Blau N, Trefz FK (2002) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: possible regulation of gene expression in a patient with the homozygous L48S mutation. *Mol Genet Metab* 75:186-187
10. Brautigam S, Kujat A, Kirst P, Seidel J, Luleyap HU, Froster UG (2003) DHPLC mutation analysis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 78:205-210
11. Brenton DP, Lilburn M (1996) Maternal phenylketonuria. A study from the United Kingdom. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1:S177-180
12. Bundesministerium dF (2001) Amtliche AfA-Tabellen (Absetzungen für Abnutzungen) von A - Z. In:
13. Bush JW, Patrick DL, Chen MM (1973) Health status index in cost effectiveness: analysis in PKU program. In: Berg (ed) *Health status index*. Hospital and Educational Trust, New York, p 172-209
14. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol Sep.*:1550 - 1557
15. Cipcic-Schmidt S, Trefz FK, Funders B, Seidlitz G, Ullrich K (1996) German Maternal Phenylketonuria Study. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1:S173-176
16. Condie A, Eeles R, Borresen A-L, Coles C, Cooper C, Prosser J (1993) Detection of point mutations in the p53 Gene: Comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. *Hum Mutat* 5:58 - 66
17. Cunningham GC (1969) Two years of PKU testing in California. The role of the laboratory. *Calif Med* 110:11-16



18. Davis LG, Dibner MD, Battey JF (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York
19. Desviat LR, Perez B, Gamez A, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Marchante C, Boveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernandez A, Cabello ML, Ugarte M (1999) Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* 7:386-392
20. Dhondt JL, Farriaux JP, Saily JC, Lebrun T (1991) Economic evaluation of cost-benefit ratio of neonatal screening procedure for phenylketonuria and hypothyroidism. *J Inher Metab Dis* 14:633-639
21. Diamond A, Ciaramitaro V, Donner E, Djali S, Robinson MB (1994) An animal model of early-treated PKU. *J Neurosci* 14:3072-3082
22. DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J, Woo SL (1986) Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 25:743-749
23. DiLella AG, Marvit J, Lidsky AS, Guttler F, Woo SL (1986) Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature* 322:799-803
24. Ding Z, Harding CO, Thony B (2004) State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab*:3 - 8
25. Drogari E, Smith I, Beasley M, Lloyd JK (1987) Timing of strict diet in relation to fetal damage in maternal phenylketonuria. An international collaborative study by the MRC/DHSS Phenylketonuria Register. *Lancet* 2:927-930
26. Duin N, Sutcliffe J (1992) *A History of Medicine*. Simon & Schuster Ltd., London
27. Dworniczak B, Kalaydjieva L, Pankoke S, Aulela-Scholz C, Allen G, Horst J (1992) Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot? *Hum Mutat* 1(2):138 - 146
28. Eiken HG, Knappskog PM, Boman H, Thune KS, Kaada G, Motzfeldt K, Apold J (1996) Relative frequency, heterogeneity and geographic clustering of PKU mutations in Norway. *Eur J Hum Genet* 4:205-213
29. Eisensmith RC, Woo SL (1992) Updated listing of haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase (PAH) locus. *Am J Hum Genet* 51:1445-1448
30. Eisensmith RC, Woo SL (1996) Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1:S16-19
31. Erlandsen H, Fusetti F, Martinez A, Hough E, Flatmark T, Stevens RC (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol* 4:995-1000
32. Erlandsen H, Stevens RC (1999) The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 68:103-125
33. Flatmark T, Knappskog PM, Martinez A (1997) Molecular characterization of disease related mutant forms of human phenylalanine hydroxylase and tyrosine hydroxylase. In: Pfeleiderer W, Rokos H (eds) *Chemistry and Biology of Pteridines and Floates*. Blackwell Science, London, p 503-508
34. Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC (1998) Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem* 273:16962-16967
35. Gamez A, Perez B, Ugarte M, Desviat LR (2000) Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem* 275:29737-29742

36. Geelhoed EA, Lewis B, Hounsoume D, O'Leary P (2005) Economic evaluation of neonatal screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism. *J Paediatr Child Health* 41:575-579
37. Gjetting T, Petersen M, Guldborg P, Guttler F (2001) In vitro expression of 34 naturally occurring mutant variants of phenylalanine hydroxylase: correlation with metabolic phenotypes and susceptibility toward protein aggregation. *Mol Genet Metab* 72:132-143
38. Glavac D, Dean M (1993) Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation* 2:404 - 414
39. Goss S (1983) Cost-benefit analysis of the detection and treatment of phenylketonuria (PKU) in newly-born babies, in Belgium. *Cahiers Economiquede Bruxelles*:459-468
40. Guldborg P, Henriksen KF, Guttler F (1993) Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 17:141 - 146
41. Guldborg P, Romano V, Ceratto N, Bosco P, Ciuna M, Indelicato A, Mollica F, Meli C, Giovannini M, Riva E, Biasucci G, Henriksen KF, Guttler F (1993) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in Southern Europe. *Hum Mol Genet* 2:1703 - 1707
42. Guldborg P, Henriksen KF, Thöny B, Blau N, Guttler F (1994) Molecular heterogeneity of nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia in 25 Danish. *Genomics* 21:453 - 455
43. Guldborg P, Mikkelsen I, Henriksen KF, Lou HC, Guttler F (1995) In vivo assessment of mutations in the phenylalanine hydroxylase gene by phenylalanine loading: characterization of seven common mutations. *Eur J Pediatr* 154:551-556
44. Guldborg P, Mallmann R, Henriksen KF, Guttler F (1996) Phenylalanine hydroxylase deficiency in a population in Germany: mutational profile and nine novel mutations. *Hum Mutat* 8:276 - 279
45. Guldborg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzzone A, Rey J, Guttler F (1998) A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 63:71-79
46. Gupta A, Agarwal S (2003) Efficiency and cost effectiveness: PAGE-SSCP versus MDE and Phast gels for the identification of unknown beta thalassaemia mutations. *Mol Pathol* 56:237-239
47. Gutenberg E (1965) *Grundlagen der Betriebswirtschaftslehre*. Springer Verlag, Berlin
48. Guthrie R, Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338-343
49. Guttler F (1980) Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl* 280:1-80
50. Guttler F, Ledley FD, Lidsky AS, DiLella AG, Sullivan SE, Woo SL (1987) Correlation between polymorphic DNA haplotypes at phenylalanine hydroxylase locus and clinical phenotypes of phenylketonuria. *J Pediatr* 110:68-71
51. Guttler F, Lou H (1990) Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In: Fernandes J, Saudubary JM, Tada K (eds) *Inborn metabolic disease: diagnosis and treatment*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 161-174

52. Güttler F, Guldborg P (1996) The influence of mutations of enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1:S6-10
53. Guzzetta V, Bonapace G, Dianzani I, Parenti G, Lecora M, Giannattasio S, Concolino D, Strisciuglio P, Sebastio G, Andria G (1997) Phenylketonuria in Italy: distinct distribution pattern of three mutations of the phenylalanine hydroxylase gene. *J Inher Metab Dis* 1997:619 - 624
54. Hayashi K, Yandell DW (1993) How Sensitive is PCR-SSCP. *Human Mutation* 2:338 - 346
55. Hisashige A (1994) Health economic analysis of the neonatal screening program in Japan. *Int J Technol Assess Health Care* 10:382-391
56. Hofman KJ, Steel G, Kazazian HH, Valle D (1991) Phenylketonuria in U.S. blacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet* 48:791-798
57. Holtzman NA, Kronmal RA, van Doorninck W, Azen C, Koch R (1986) Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *N Engl J Med* 314:593-598
58. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG (1998) Structure/function analysis of the domains required for the multimerisation of phenylalanine hydroxylase. *Biochim Biophys Acta* 1382:295-304
59. Jervis G (1963) Pathology of phenylketonuria. In: Lyman FL (ed) *Phenylketonuria*. Charles C. Thomas, Springfield, p 96-100
60. John SW, Rozen R, Scriver CR, Laframboise R, Laberge C (1990) Recurrent mutation, gene conversion, or recombination at the human phenylalanine hydroxylase locus: evidence in French-Canadians and a catalog of mutations. *Am J Hum Genet* 46:970-974
61. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC (1999) Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 45:1133-1140
62. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I (1997) SSCP analysis: A blind sensitivity trial. *Human Mutation* 10:65 - 70
63. Kasnauskiene J, Cimbalistiene L, Kucinskas V (2003) Validation of PAH genotype-based predictions of metabolic phenylalanine hydroxylase deficiency phenotype: investigation of PKU/MHP patients from Lithuania. *Med Sci Monit* 9:CR142-146
64. Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 61:1309-1317
65. Kazumichi I, Satoshi T, Masao K, Yoshinobu K (1999) Multi-capillary DNA Sequencer. *Hitachi Review* 48:107-109
66. Kidd KK, Morar B, Castiglione CM, Zhao H, Pakstis AJ, Speed WC, Bonne-Tamir B, Lu RB, Goldman D, Lee C, Nam YS, Grandy DK, Jenkins T, Kidd JR (1998) A global survey of haplotype frequencies and linkage disequilibrium at the DRD2 locus. *Hum Genet* 103:211-227
67. Knappskog PM, Flatmark T, Aarden JM, Haavik J, Martinez A (1996) Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. *Eur J Biochem* 242:813-821

68. Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, Stevens RC, Cotton RG, Kemp BE (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol* 6:442-448
69. Koch R, Fischler K, Azen C, Guldberg P, Güttler F (1997) The Relationship of Genotype to Phenotype in Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Biochemical and molecular medicine* 60:92 - 101
70. Komrower GM, Sardharwalla IB, Fowler B, Bridge C (1979) The Manchester regional screening programme: a 10-year exercise in patient and family care. *Br Med J* 2:635-638
71. Koolman J, Röhm KH (1994) Taschenatlas der Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart / New York
72. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S (1993) Capillary Electrophoresis Principles and Practice. Springer Verlag, Heidelberg
73. Kukita Y, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K (1997) SSCP analysis of long DNA fragments in low pH Gel. *Human Mutation* 10:400 - 407
74. Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K (1999) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 135:375-378
75. Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, Robson KJ, Woo SL (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24:556-561
76. Lassker U, Zschocke J, Blau N, Santer R (2002) Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. Two new cases and a review of molecular genetic findings. *J Inher Metab Dis* 25:65-70
77. Ledley FD, Levy HL, Woo SL (1986) Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia in families with both disorders. *N Engl J Med* 314:1276-1280
78. Ledley FD, Koch R, Jew K, Beaudet A, O'Brien WE, Bartos DP, Woo SL (1988) Phenylalanine hydroxylase expression in liver of a fetus with phenylketonuria. *J Pediatr* 113:463-468
79. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., New York
80. Levy HL (1999) Phenylketonuria: old disease, new approach to treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1811-1813
81. Lewin B (1991) Gene - Lehrbuch der molekularen Genetik. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
82. Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, Woo SL (1985) Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6221-6225
83. Lindner M, Haas D, Mayatepek E, Zschocke J, Burgard P (2001) Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. *Mol Genet Metab* 73:104-106
84. Lord J, Thomason MJ, Littlejohns P, Chalmers RA, Bain MD, Addison GM, Wilcox AH, Seymour CA (1999) Secondary analysis of economic data: a review of cost-benefit studies of neonatal screening for phenylketonuria. *J Epidemiol Community Health* 53:179-186
85. Mallolas J, Milà M, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J, Vilaseca MA (1999) Biochemical phenotype and its relationship with genotype in hyperphenylalaninemia heterozygotes. *Mol Genet Metab* 67:156 - 161

86. Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X, Montserrat M (1999) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation. *Hum Genet* 105:468 - 473
87. Martinez A, Knappskog PM, Olafsdottir S, Doskeland AP, Eiken HG, Svebak RM, Bozzini M, Apold J, Flatmark T (1995) Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J* 306 ( Pt 2):589-597
88. Michiels L, Francois B, Raus J, Vandevyver C (1996) Rapid identification of PKU-associated mutations by multiplex DGGE analysis of the PAH gene. *J Inherit Metab Dis* 19:735-738
89. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51:263 - 273
90. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA (2002) Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* 347:2122-2132
91. Niessen (1999) Pädiatrie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
92. Nowacki PM, Byck S, Prevost L, Scriver CR (1998) PAH Mutation Analysis Consortium Database: 1997. Prototype for relational locus-specific mutation databases. *Nucleic Acids Res* 26:220-225
93. Nuoffer JM, Thöny B, Romstad A, Blau N (2001) A patient with phenylketonuria successfully treated with tetrahydrobiopterin. *J Inherit Metab Dis* 24:29
94. O'Neill CA, Eisensmith RC, Croke DT, Naughten ER, Cahalane SF, Woo SLC (1994) Molecular analysis of PKU in Ireland. *Acta Paediatr Suppl* 407:43 - 44
95. O'Connell P, Lathrop GM, Law M, Leppert M, Nakamura Y, Hoff M, Kumlin E, Thomas W, Elsner T, Ballard L, et al. (1987) A primary genetic linkage map for human chromosome 12. *Genomics* 1:93-102
96. Okano Y, Eisensmith RC, Guttler F, Lichter-Konecki U, Konecki DS, Trefz FK, Dasovich M, Wang T, Henriksen K, Lou H, et al. (1991) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 324:1232-1238
97. Olfert K (1992) Kompendium der praktischen Betriebswirtschaft. Friedrich Kiehl Verlag GmbH, Ludwigshafen
98. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874 - 879
99. Paine RS (1957) The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics*:290 - 302
100. Passarge E (1994) Taschenatlas der Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart / New York
101. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*:336 - 341
102. Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M (1994) Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Human Molecular Genetics* 3:801 - 807
103. Rivera I, Cabral A, Almeida M, Leandro P, Carmona C, Eusébio F, Tasso T, Vilarinho L, Martins E, Lechner MC, Almeida ITd, Konecki D, Lichter-Konecki U (2000) The

- correlation of genotype and phenotype in Portuguese hyperphenylalaninemic patients. *Mol Genet Metab* 69:195 - 203
104. Rohr FJ, Doherty LB, Waisbren SE, Bailey IV, Ampola MG, Benacerraf B, Levy HL (1987) New England Maternal PKU Project: prospective study of untreated and treated pregnancies and their outcomes. *J Pediatr* 110:391-398
  105. Ruiz-Martinez MC, Berka J, Belenkii A, Foret F, Miller AW, Karger BL (1993) DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 65:2851-2858
  106. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
  107. Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94:441-448
  108. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
  109. Schott H, Müller IW, Roelcke V, Wolf-Braun B, Schadewaldt H (1997) *Die Chronik der Medizin*. Bertelsmann-Lexikon Verlag GmbH, Gütersloh / München
  110. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC (1995) The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, p 1015 - 1075
  111. Scriver CR, Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 15:267-272
  112. Scriver CR, Waters PJ, Sarkissian C, Ryan S, Prevost L, Cote D, Novak J, Teebi S, Nowacki PM (2000) PAHdb: a locus-specific knowledgebase. *Hum Mutat* 15:99-104
  113. Scriver CR, Hurtubise M, Konecki D, Phommarinh M, Prevost L, Erlandsen H, Stevens R, Waters PJ, Ryan S, McDonald D, Sarkissian C (2003) PAHdb 2003: What a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat* 21:333-344
  114. Scriver CR, Prevost L, Hurtubise M, Konecki D (2004) PAH Locus Knowledgebase. In: McGill University, Montreal, Quebec, Kanada
  115. Sevilla C, Moatti JP, Julian-Reynier C, Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets B, Sobol H (2002) Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Hum Genet* 10:599-606
  116. Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach K-F (1998) *Seyffert - Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
  117. Shaw JL, Blanco J, Mueller GC (1975) Simple procedure for isolation of DNA, RNA and protein fractions from cultured animal cells. *Anal Biochem*. 12:125 - 131
  118. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstorm DW, Stone EM (1993) The sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 6:325 - 332
  119. Smith I, Cook B, Beasley M (1991) Review of neonatal screening programme for phenylketonuria. *Bmj* 303:333-335
  120. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674-679
  121. Spaapen LJ, Bakker JA, Velter C, Loots W, Rubio-Gozalbo ME, Forget PP, Dorland L, De Koning TJ, Poll-The BT, Ploos van Amstel HK, Bekhof J, Blau N, Duran M, Rubio-Gonzalbo ME (2001) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in Dutch neonates. *J Inherit Metab Dis* 24:352-358

122. Spaapen LJ, Estela Rubio-Gozalbo M (2003) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab* 78:93-99
123. Start K (1998) Treating phenylketonuria by a phenylalanine-free diet. *Prof Care Mother Child* 8:109-110
124. Steiner KC, Smith HA (1973) Application of cost-benefit analysis to a PKU screening program. *Inquiry* 10:34-40
125. Strekowski L, Mokrosz JL, Wilson WD, Mokrosz MJ, Strekowski A (1992) Stereoelectronic factors in the interaction with DNA of small aromatic molecules substituted with a short cationic chain: importance of the polarity of the aromatic system of the molecule. *Biochemistry* Nov 10:10802 - 10808
126. Surtees R, Blau N (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 2:S109-113
127. Svensson E, Döbeln Uv, Eisensmith RC, Hagenfeldt L, Woo SLC (1993) Relation between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninemia patients. *Eur J Pediatr* 152:132 - 139
128. Swerdlow H, Gesteland R (1990) Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 18:1415-1419
129. Thieme H (1999) *Thiemes Innere Medizin*. Stuttgart
130. Thomason MJ, Lord J, Bain MD, Chalmers RA, Littlejohns P, Addison GM, Wilcox AH, Seymour CA (1998) A systematic review of evidence for the appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism. *J Public Health Med* 20:331-343
131. Tighe O, Dunican D, O'Neill C, Bertorelle G, Beattie D, Graham C, Zschocke J, Cali F, Romano V, Hrabincova E, Kozak L, Nechyporenko M, Livshits L, Guldberg P, Jurkowska M, Zekanowski C, Perez B, Desviat LR, Ugarte M, Kucinskis V, Knappskog P, Treacy E, Naughten E, Tyfield L, Byck S, Scriver CR, Mayne PD, Croke DT (2003) Genetic diversity within the R408W phenylketonuria mutation lineages in Europe. *Hum Mutat* 21:387-393
132. Trefz FK, Cipcic-Schmidt S, Koch R (2000) Final intelligence in late treated patients with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159 [Suppl 2]:145 - 148
133. Trefz FK, Aulela-Scholz C, Blau N (2001) Successful treatment of phenylketonuria with tetrahydrobiopterin. *Eur J Pediatr* 160:315
134. Tyfield LA, Stephenson A, Cockburn F, Harvie A, Bidwell JL, Wood NAP, Pilz DT, Harper P, Smith I (1997) Sequence Variation at the Phenylalanine Hydroxylase Gene in the British Isles. *Am J Hum Genet* 60:388 - 396
135. Ushijima T, Hosoya Y, Suzuki T, Sofuni T, Sugimra T, Nagao M (1995) A rapid method for detection of mutations in the *lacI* gene using PCR-single strand conformation polymorphism analysis: demonstration of its high sensitivity. *Mutation Research* 334:283 - 292
136. Vajro P, Strisciuglio P, Houssin D, Huault G, Laurent J, Alvarez F, Bernard O (1993) Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N Engl J Med* 329:363
137. van der Sijs-Bos CJ, Diepstraten CM, Juyn JA, Plaisier M, Giltay JC, van Spronsen FJ, Smit GP, Berger R, Smeitink JA, Poll-The BT, Ploos van Amstel JK (1996) Phenylketonuria in the Netherlands: 93 % of the mutations are detected by single-strand conformation analysis. *Hum Hered.* 46(4):185 - 190
138. van Pelt A, Levy H (1974) Cost-benefit analysis of newborn screening for metabolic disorders. *N Engl J Med* 291:1414-1416

139. Veale AMO (1980) Screening for hereditary metabolic disorders. Screening for Phenylketonuria. In: Bickle H, Guthrie R, Hammersen G (eds) Neonatal screening for inborn errors of metabolism. Springer Verlag, New York, p 7-18
140. Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab* 69:101-110
141. Webb JF (1973) PKU screening, is it worth? *Can Med Assoc J* 108:328-329
142. Welsh MC, Pennington BF, Ozonoff S, Rouse B, McCabe ER (1990) Neuropsychology of early-treated phenylketonuria: specific executive function deficits. *Child Dev* 61:1697-1713
143. Wendel U, Weglage J (2000) Leitlinien kindlicher Stoffwechselkrankheiten 2000 - 2005. In: Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
144. Woolf LI, Goodwin BL, Cranston WI, Wade DN, Woolf F, Hudson FP, McBean MS (1968) A third allele at the phenylalanine-hydroxylase locus in mild phenylketonuria (hyperphenylalaninaemia). *Lancet* 1:114-117
145. Wright M (1990) An evaluation of the cost benefit analysis approach. A case study: a CBA of screening and treatment of PKU. In: University of Strathclyde, Glasgow
146. Yuan B, Thomas JP, von Kodolitsch Y, Pyeritz RE (1999) Comparison of heteroduplex analysis, direct sequencing, and enzyme mismatch cleavage for detecting mutations in a large gene, FBN1. *Hum Mutat* 14:440-446
147. Zschocke J, Graham CA, Stewart FJ, Carson DJ, Nevin NC (1994) Automated sequencing detects all mutations in Northern Irish patients with phenylketonuria and non-PKU HPA. *Acta Paediatr Suppl* 407:37 - 38
148. Zschocke J, Graham CA, Carson DJ, Nevin NC (1995) Phenylketonuria mutation analysis in Northern Ireland: A rapid stepwise approach. *Am J Hum Genet* 57:1311 - 1317
149. Zschocke J, Hoffmann GF (1999) Phenylketonuria mutations in Germany. *Hum Genet* 104:390 - 398
150. Zschocke J (2003) Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* 21:345-356



## **7 Anhang**

### **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hans Georg Koch, danke ich für die Überlassung des faszinierenden und komplexen Themas und die großzügig gewährte Freiheit bei dessen Ausgestaltung. Weiterhin möchte ich mich für die umsichtige Betreuung und Unterstützung bedanken, die auch noch nach meiner aktiven Arbeit im Stoffwechsellabor des Universitätsklinikums Münster anhielt.

Herrn Dr. med. Boris Rapp danke ich für die kompetente Einarbeitung in die Labortechniken und die kritische Stellungnahme bei Diskussionen und Fragen meinerseits.

Herrn Dr. med. Michael Linnebank, Herrn Dr. med. Holger Willenbrink und Herrn PD Dr. med. Johannes Häberle möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen, da sie mir als kritische Diskussionspartner und umsichtige Ratgeber zur Seite standen.

Frau Ingrid Duchenne möchte ich für die freundliche Unterstützung während meiner Arbeit danken.

### **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis aufgeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlicher Auskunft beruhen als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Leistungen als solche kenntlich gemacht.

**Lebenslauf**

Daniel Gödde

Geburtsdatum	12.12.1974 in Meschede
Familienstand	verheiratet
Konfession	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch
Berufliche Tätigkeit	Heinrich-Heine Universität Düsseldorf Assistenzarzt für Pathologie seit Mai 2003
Studium	Westfälische-Wilhelms Universität Münster Biologie 1994 - 1997 Mathematik 1994 - 1996 Humanmedizin 1996 – 2002
Schulbildung	Gymnasium der Stadt Meschede 1985 – 1994

Hilden, 03.04.2007