

Seminarski rad:
Fenilketonurija

Sadržaj:

Sažetak	1
1. Uvod	2
2. Genetička osnova za nastanak bolesti	3
3. Molekularna osnova nastanka bolesti	3
4. Kliničke manifestacije fenilketonurije	4
5. Maternalna fenilketonurija	4
6. Screening testovi i dijagnoza fenilketonurije	5
6.1. Guthrie mikrobiološki semikvantitativni test	5
6.2. Enzimska kolorimetrijska metoda	6
6.3. Jonoizmjenjivačka tečna hromatografija	6
6.4. Prenatalna dijagnoza bolesti	6
7. Liječenje	7
7.1. Dijetetski režim	7
7.1.1. Mogući nedostaci nutrijenata kod fenilketonurije	7
7.1.2. Fenilalanin i biosinteza holesterola	8
7.2. Terapija BH4	8
7.3. Terapija enzimima	8
8. Reparacija gena za fenilalanin hidrosilazu korištenjem CRISPR/Cas9 tehnologije	9
9. Zaključak	10
10. Prilozi	11
Reference	13

Sažetak-Fenilketonurija je najčešća i najvažnija nasljedna metabolička bolest, nastala kao posljedica nedostatka jetrenog enzima fenilalanin hidroksilaze. Fenilalanin hidroksilaza konvertuje fenilalanin u tirozin. Za ovaj proces takođe su neophodni tetrahidrobiopteridin, gvožđe i molekularni kiseonik. Deficijencija fenilalanin hidroksilaze dovodi do akumulacije fenilalanina u tijelu bolesnika, uključujući i mozak. Ako se ne liječi ili kasno otkrije dovodi do ozbiljnih neuroloških i neurofizioloških poremećaja uključujući mentalnu zaostalost, napade i probleme sa ponašanjem. U ovom radu opisana je genetička i molekularna osnova za nastanak bolesti, kliničke manifestacije bolesti, screening testovi za rano otkrivanje, liječenje kao i pregled najnovije metode za liječenje fenilketonurije, korištenjem CRISPR/Cas9 tehnologije.

1. Uvod

Fenilketonurija (PKU) i njen blaži oblik hiperfenilalaninemija su genetički poremećaji koji se karakterišu nedostatkom fenilalanin hidrosilaze, enzima neophodnog za konverziju aminokiseline fenilalanina u tirozin. Na osnovu koncentracije fenilalanina u krvi, nedostatak fenilalanin hidrosilaze se može klasifikovati u sljedeće grupe: fenilketonurija (koncentracija fenilalanina u krvi je veća od 1200 $\mu\text{mol/L}$), blaži oblik fenilketonurije (koncentracija fenilalanina u krvi od 600-1200 $\mu\text{mol/L}$) i blaga hiperfenilalaninemija (u kojoj je koncentracija fenilalanina izvan referentnih granica ali je niža od 600 $\mu\text{mol/L}$) [1].

To je autozomno recesivno oboljenje u kojem se fenilalanin nakuplja u krvi i gotovo uvijek dovodi do ozbiljne mentalne retardacije. Prvi put je ovu bolest opisao norveški ljekar, Asbjørn Følling. 1934. godine majka dvoje intelektualno zaostale djece mu se obratila jer je htjela da sazna da li je čudan miris urina njene djece povezan sa njihovom mentalnom zaostalošću [2]. Analizirao je njihov urin koristeći rastvor feri-hlorida, očekujući da će dobiti crveno-braon boju karakterističnu za ketone. Umjesto toga, uočio je tamno zelenu boju, za koju se sada zna da potiče od fenilpiruvata, metabolita fenilalanina [3].

Prošlo je 19 godina od kako je opisana biohemijska osnova ove bolesti, da bi se došlo do zaključka da ishrana sa ograničenim unosom fenilalanina može da spriječi mentalnu zaostalost, prije nego što se i simptomi bolesti pojave. Još 10 narednih godina je prošlo prije nego što je ovo znanje primijenjeno, testiranjem krvi novorođenčadi korišćenjem rastvora feri-hlorida, da bi se detektovao nepogrešivi znak ovog stanja, raspadni proizvodi povišenog fenilalanina u urinu [2].

Godinama prije nego što je terapija pronađena, bolest je bila ozbiljna pa je trudnoća kod žena sa fenilketonurijom bila jako rijetka. Dijeta je obnovila plodnost ali su trudnoće često imale nepovoljne ishode. Djeca koja nijesu imala fenilketonuriju su bila mentalno zaostala zbog fetotoksičnog efekta fenilalanina porijeklom od majke, ali bez vidljivih kongenitalnih anomalija. Ovo se uskoro promijenilo kada je kod djece takvih žena zabilježena mikrocefalija i višestruke bolesti srca [3].

2. Genetička osnova za nastanak bolesti

Humani gen za fenilalanin hidroksilazu (Slika 1) je lociran na hromozomu 12q.23.2, sa 171kb i sadrži 13 egzona. Ukupna dužina cDNA je 2.4kb i kodira polipeptid od 452 aminokiseline sekvence slične humanom proteinu fenilalanin hidroksilaze, koji podliježe posttranslacionim modifikacijama. Hiperfenilalaninemija može biti izazvana ili mutacijama u lokusu za fenilalanin hidroksilazu, što rezultira fenilketonurijom ili mutacijama u broju lokusa koji utiču na sintezu i regeneraciju BH4 što rezultira u nefenilketonurijskoj hiperfenilalaninemiji [4].

3. Molekularna osnova nastanka bolesti

Biohemijski defekt kod fenilketonurije je najčešće funkcionalni nedostatak jetrenog enzima fenilalanin hidroksilaze, koji katalizuje parahidroksilaciju fenilalanina u tirozin (Slika 2). Za hidroksilaciju je neophodno i učešće kofaktora, tetrahidrobiopterina (BH4) [5]. Nastali tirozin se zatim kroz pet enzimskih reakcija razlaže do fumarata i acetoacetata [2]. Kod osoba sa urođenim nedostatkom fenilalanin hidroksilaze ili enzima koji učestvuje u stvaranju i regeneraciji kofaktora, katabolizam fenilalanina je blokiran, pa se povećava njegova koncentracija u krvi. Zbog nagomilavanja fenilalanina, kod pacijenata sa fenilketonurijom, aktivira se alternativni put katabolizma ove aminokiseline i nastaju karakteristični metaboliti (fenilpiruvat, fenilsirćetna kiselina, fenilaktatna kiselina, 2-fenoksifenilsirćetna kiselina, i feniletilamin) koji se ekskretuju putem urina. Fenilsirćetna kiselina je odgovorna za neprijatan miris povezan sa neliječenom ili slabo kontrolisanom fenilketonurijom [6]. Iako skoro sve fenilketonurije nastaju kao posljedice nedostatka fenilalanin hidroksilaze, fenilalanin se može nakupljati u organizmu kao posljedica nedostatka BH4, ili enzima neophodnog za njegovu sintezu- dihidrobiopteridin sintetaze odnosno enzima neophodnog za njegovo obnavljanje dihidrobiopteridin reduktaze [7].

4. Kliničke manifestacije fenilketonurije

Klinički simptomi bolesti zavise od dužine trajanja poremećaja i koncentracije fenilalanina u krvi. Djeca se rađaju bez kliničkih simptoma bolesti koji se manifestuju tek tokom prvih mjeseci života [8]. Neliječena fenilketonurija je povezana sa abnormalnim fenotipom uključujući zaostajanje u rastu, napade, mikrocefaliju i mentalnu zaostalost izazvanim nakupljanjem toksičnih metabolita fenilalanina. Štaviše, smanjenje ili odsustvo aktivnosti fenilalanin hidrosilaze, može da dovede do nedostatka tirozina i proizvoda koji od njega nastaju, uključujući melanin, L-tiroksin i kateholaminske neurotransmitere [9].

Mentalna retardacija je glavna klinička manifestacija fenilketonurije a koeficijent inteligencije kod oboljelih može biti i niži od 35 [9]. Može se registrovati već u prvih nekoliko mjeseci života djeteta, gubitkom stečenih neuroloških funkcija. Najveći broj pacijenata je hiperaktivan i ima mikrocefaliju. S obzirom na to da neurološke promjene nijesu reverzibilne, od krucijalnog je značaja da se bolest na vrijeme otkrije i odredi odgovarajući tretman [10].

Epilepsija je takođe jedna od kliničkih manifestacija ove bolesti i javlja se kod četvrtine oboljelih. Bolest može biti praćena i naglim i jakim povraćanjem. Mogu se uočiti promjene na koži u vidu ekcema i seboroičnog dermatitisa [9]. Ekskrecija fenilalanina i njegovih metabolita putem urina i znoja dovodi do neprijatnog mirisa na „miševinu“. Kod jednog broja oboljelih javlja se i osteopenija kao i deficit vitamina B12, čiji nedostatak je najvjerovatnije povezan sa hipoproteinskom dijetom [10].

5. Maternalna fenilketonurija

Maternalna fenilketonurija je dobro poznata komplikacija fenilketonurije i jedan od najpotentnijih teratogenih sindroma u trudnoći. Čitavo potomstvo neliječenih trudnoća kod žena sa klasičnom fenilketonurijom ima mentalnu zaostalost i mikrocefaliju. Kongenitalna bolest srca i intrauterine zastoje u rastu se javljaju mnogo češće nego što bi se očekivalo u cjelokupnoj populaciji [11]. Koncentracija fenilalanina u krvi fetusa je 1.5 do 2 puta veća od

koncentracije u krvi trudnice. Zbog toga treba težiti što nižim koncentracijama fenilalanina tokom trudnoće, oko 120 $\mu\text{mol/l}$ pa i niže [12].

6. Screening testovi i dijagnoza fenilketonurije

Biohemijski testovi koji se koriste za određivanje koncentracije fenilalanina u krvi su Guthrie semikvantitativni test, enzimska kolorimetrijska metoda i jonoizmjenjivačka tečna hromatografija.

6.1. Guthrie mikrobiološki semikvantitativni test

Od kasnih 1960-ih dijagnoza fenilketonurije se postavljala na osnovu Guthrie mikrobiološkog semikvantitativnog testa. Test se zasniva na analizi osušene kapi krvi uzete iz pete novorođenčeta. Metoda je jako jednostavna, jeftina i dokazano je da ima malu grešku mjerenja. Test se zasniva na praćenju rasta bakterija na agaroznoj ploči ukoliko su povišene koncentracije fenilpiruvata, fenilalanina i fenilacetata. Da bi se inhibirao rast *Bacillus subtilis* bakterije dodaje se B-2-tienalanin. Na agaroznu ploču se stavi mali krug filter papira sa osušenom kapi krvi i ukoliko je povećana koncentracija fenilalanina doći će do rasta bakterija. To se može odrediti vizuelno, posmatranjem, jer će doći do rasta prečnika kruga [8,13].

U skorije vrijeme, masena spektrometrija se koristi kao rutinska metoda za screening testove kod novorođenčadi. Smanjeni troškovi ovim načinom analize su omogućili da se poveća broj bolesti na koje se vrši testiranje sa 4 (fenilketonurija, kongenitalni hipotireoidizam, galaktozemija i cistična fibroza) na preko 20 [14].

Pozitivni rezultati screening testa otkrivaju fenilketonuriju kod djece, ali je moguće da je povećana koncentracija fenilalanina prolazna, izazvana nekim drugim bolestima (npr. prolazni nedostatak 4α -karbinolamino dehidrataze) ili rezultat maternale hiperfenilalaninemije. Kod djece sa stalnom hiperfenilalaninemijom, u 98% slučajeva stanje je izazvano mutacijom u lokusu za fenilalanin hidroksilazu. Dijagnoza se postavlja na osnovu povećanih vrijednosti fenilalanina u ponovljenom uzorku. Gornji referentni nivo za

fenilalanin u ukupnoj krvi ili plazmi je $<150 \mu\text{mol/L}$ kod novorođene djece ili $<120 \mu\text{mol/L}$ kod starije djece. Određivanje metabolita fenilalanina u urinu nije prihvaćeno kao screening test jer ekskrecija zavisi od aktivnosti transaminaze (koja može biti niža kod novorođene djece) a takođe postoje velike razlike između koncentracije fenilalanina u krvi i metabolita u urinu [1].

6.2. Enzimska kolorimetrijska metoda

Enzimska kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije fenilalanina u uzorku kapilarne krvi zasniva se na enzimskoj reakciji koju katalizuje enzim L-fenilalanin-dehidrogenaza. U ovoj reakciji oksidativne deaminacije L-fenilalanin prelazi u pirogroždanu kiselinu i istovremeno dolazi do redukcije koenzima NAD^+ u NADH. Koncentracija nastalog NADH je proporcionalna koncentraciji fenilalanina u uzorku kapilarne krvi a određuje se kolorimetrijski [8].

6.3. Jonoizmjenjivačka tečna hromatografija

Još jedna metoda za određivanje fenilalanina u fiziološkom uzorku plazme je jonoizmjenjivačka tečna hromatografija. Nakon razdvajanja na koloni, aminokiselina reaguje sa ninhidrinom a proizvod ove reakcije se određuje fotometrijski [8,14].

6.4. Prenatalna dijagnoza bolesti

Kao što je prethodno rečeno, konvencionalna dijagnoza fenilketonurije je zasnovana na aberantnom metaboličkom fenotipu, bolesti izazvanoj mutacijama i određeni polimorfni haplotipi mogu biti analizirani u lokusu za fenilalanin hidrosilazu. Analiza mutacija za fenilalanin hidrosilazu je posebno važna za prenatalnu dijagnozu. Veliki broj molekularnih i genetičkih tehnika se koriste u ove svrhe, kao što su Southern blotting, digestija sa restrikcionim enzimima, detekcija mutacija sekvencioniranjem i metodom višestruke amplifikacije [1].

7. Liječenje

Liječenje fenilketonurije počinje već od 3. nedjelje života i to dijetom sa niskim sadržajem fenilalanina, koja će smanjenjem ili normalizovanjem koncentracije fenilalanina, spriječiti razvoj fizioloških i neuroloških bolesti. S obzirom na to da se neurološke promjene mogu uočiti već prvog mjeseca od rođenja, preporučuje se da se sa dijetom otpočne veoma rano i da se nastavi u djetinjstvu kada je neurološki razvoj maksimalan. Smatra se da se sa ovakvim režimom ishrane treba nastaviti tokom čitavog života [15].

7.1. Dijetetski režim

Dijeta sa niskim sadržajem fenilalanina se koristi kao tretman koji prvobitno počinje sa malim količinama fenilalanina iz mlijeka majke ili gotove hrane za bebe prema potrebnom dnevnom unosu za bebe. Kod malo starije djece, dnevni unos se računa svakodnevno, shodno koncentracijama fenilalanina u krvi. Hrana kao što su jaja, mlijeko, sir, meso, živina, riba, pasulj i mahunarke koja je bogata proteinima je isključena iz dijete. Ovaj režim ishrane naravno neće obezbijediti potrebnu količinu proteina neophodnih za razvoj i zbog toga se svakoga dana moraju uzimati komercijalno dostupni suplementi esencijalnih aminokiselina, koji ne sadrže fenilalanin. Djeca takođe redovno provjeravaju koncentraciju fenilalanina u krvi i shodno potrebama ljekar pravi plan ishrane. Poseban problem koji se javlja kod dijete jeste aspartam, vještački zaslađivač, koji tokom metabolizma oslobađa fenilalanin, asparaginsku kiselinu i metanol [1,16].

7.1.1. Mogući nedostaci nutrijenata kod fenilketonurije

Ova rigorozna dijeta sa polusintetičkim suplementima nije bez rizika. Pacijenti sa fenilketonurijom na dijetetskom režimu ishrane mogu da imaju nisku koncentraciju mikroelemenata i holesterola, kao i promjene u metabolizmu folata i iskrivljen profil masnih kiselina. Kako god, ostaje nepoznato da li se ovi imbalansi pojavljuju zbog nedovoljnog unosa ili endogenih smetnji u biosintezi esencijalnih konstituenata [1].

7.1.2. Fenilalanin i biosinteza holesterola

Istraživanja na životinjama su potvrdila da razna fenolna jedinjenja inhibiraju sintezu sterola. Pokazalo se da dijetetski suplemeti fenilalanina inhibiraju određeni enzim uključen u biosintezu holesterola, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktazu u jetri i mozgu, kao i smanjenje koncentracije mevalonske kiseline. Smanjena koncentracija koenzima Q₁₀ je takođe izmjerena u plazmi i limfocitima pacijenata sa fenilketonurijom. CoQ₁₀ ima sličan biosintetski put (mevalonski put) kao holesterol. Pored toga što je kofaktor u lancu za transport elektrona u mitohondrijama, redukovana forma CoQ₁₀ ima važnu funkciju kao antioksidans u mitohondrijama i lipidnim membranama kao i u prevenciji oksidacije LDL [1,17].

7.2. Terapija BH4

Klinička ispitivanja su pokazala da je jedna grupa pacijenata sa hiperfenilalaninemijom razvila neurološke komplikacije iako je bila na dijetetskom režimu. Ispostavilo se da ova grupa pacijenata ima mutacije koje uzrokuju defekte u sintezi ili recikliranju BH₄. Sintetska jedinjenja biopteridina su postala dostupna od 1970-ih. Saproterin dihidrohlorid (Kuvan, Biomarin Pharma) je oralno aktivni sintetski oblik BH₄, koji je dobio status Orphan lijeka. II i III faza kliničkih ispitivanja su pokazala da je ovaj lijek bezbijedan i efikasan za ovu grupu pacijenata [18].

7.3. Terapija enzimima

Nažalost, pacijenti sa mnogo ozbiljnijom formom klasične fenilketonurije i nekim drugim hiperfenilalaninemijama i ne odgovaraju na terapiju BH₄, vjerovatno zbog toga što kod ovih pacijenata nema dovoljno neophodne aktivnosti fenilalanin hidroksilaze. Za takve pacijente je najbolji vid terapije enzimsko terapija. Za razliku od BH₄ terapije, terapija enzimima ne zavisi od genotipa fenilalanin hidroksilaze. Alternativna terapija enzimima za fenilketonuriju se ispituje i uključuje zamjenu fenilalanin hidroksilaze sa fenilalanin

amonilazom nezavisnom od kofaktora. To je biljni protein uključen u razgradnju fenilalanina. Ovaj tretman se do sada pokazao efektivnim u ispitivanju na miševima [19].

8. Reparacija gena za fenilalanin hidroksilazu korištenjem CRISPR/Cas9 tehnologije

CRISPR tehnologija je zasnovana na prirodnom mehanizmu koji koriste bakterije da bi se odbranile od virusa. Kada bakterija otkrije prisustvo virusne DNK, proizvodi dva tipa kratkih lanaca RNK od kojih jedan sadrži sekvencu koja je komplementarna virusnoj. Ova dva molekula RNK formiraju kompleks sa proteinom Cas9. Cas9 je nukleaza, tip enzima koji ima sposobnost isijecanja DNK. Kada odgovarajuća sekvenca poznata kao vodeća RNK nađe svoje mjesto u okviru virusnog genoma, Cas9 siječe DNK, onesposobljavajući time virus (Slika 3). Tokom nekoliko prethodnih godina naučnici su proučavajući ovaj sistem shvatili da može biti dizajniran ne samo da isijeca virusnu DNK već i DNK sekvence na precizno izabranim mjestima pomoću specifičnih vodećih RNK. Ovo je moguće u epruveti ali i u jedru živih ćelija. Kada se nađe u jedru, stvoreni kompleks će se vezati za kratku sekvencu-PAM(Protospacer adjacent motif), razdvojiti lance DNK i vezati ih za molekule RNK. Kada se vezivanje završi, Cas9 će koristiti dvoje malih molekulskih makaza da isiječe DNK. Nakon toga ćelija pokušava da izvrši reparaciju ali ovaj proces je sklon greškama koje vode mutacijama. Naučnici moraju biti precizniji, npr. prilikom zamjene mutiranog gena zdravom kopijom. Ovo može biti odrađeno ako dodajemo drugi dio DNK koji nosi željenu sekvencu. Kada jednom CRISPR sistem isiječe DNK, dodate sekvence mogu da se spare sa isiječenim krajevima [20].

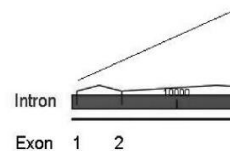
Pan *i sar.* su koristili CRISPR/FokI-dCas9 sistem za reparaciju gena odgovornog za formiranje fenilalanin hidroksilaze. Ispitivanje je vršeno na COS-7 tipu ćelija- in vitro modelu za fenilalanin hidroksilazu. Sangerovo sekvencioniranje korišteno je za određivanje redosljeda aminokiselina. Među 30 nasumično izabranih kolonija, koje predstavljaju DNK 30 COS-7 ćelija, kod 26.7% ćelija je došlo do ispravljanja grešaka (Slika 4).

Ova studija ukazuje da *FokI*-dCas9 sistem je pogodna, specifična i efikasna genomska tehnika za ispravljanje velikog broja grešaka u genu za fenilalanin hidroksilazu, koje uzrokuju fenilketonuriju [21].

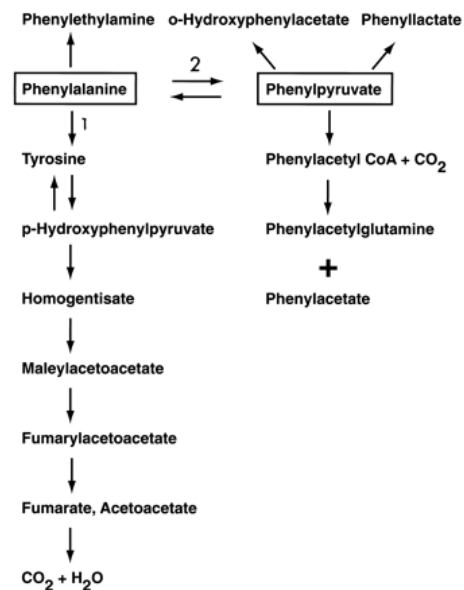
9. Zaključak

Fenilketonurija je nasljedno oboljenje metabolizma. Otkrivena je prije oko 70 godina i naučna istraživanja su postavila vezu između metaboličke bolesti i mentalne zaostalosti. Kako god, uprkos intenzivnim studijama, mehanizam po kojem pogrešni metabolizam fenilalanina dovodi do mentalne zaostalosti još uvijek nije utvrđen. Za uspješne priče liječenja fenilketonurije zaslužni su zdravstveni profesionalci koji postavljaju dijagnozu kroz neonatalne screening programe, pedijatri, dijetetičari i osobe koje nadgledaju tretman liječenja fenilketonurije. Bolje razumijevanje biohemijske, genetičke i molekularne osnove fenilketonurije, kao i potrebe za unapređenjem liječenja su dovele do razvoja novih strategija u liječenju kao što je CRISPR/Cas9 tehnologija. Ovo ukazuje na povećan potrebu za precizan tretman ne samo fenilketonurije već i drugih nasljednih metaboličkih bolesti.

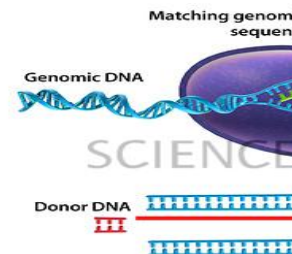
10. Prilozi



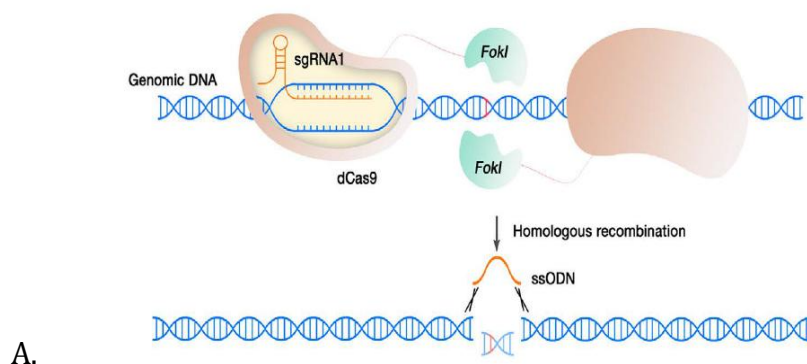
Slika 1. Osnovna struktura humanog gena za fenilalanin hidroksilazu. Gen se nalazi na dugačkom kraku hromozoma 12 (12q23.2) i sadrži 13 egzona koji kodiraju polipeptid od 452 aminokiseline. Slika je preuzeta iz članka: Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism, Clin Biochem Rev. 2008 Feb; 29(3): 31-41



Slika 2. Metabolizam fenilalanina. Reakcija 1. je katalizovana fenilalanin hidroksilazom dok je reakcija 2. katalizovana fenilalanin transaminazom. Slika je preuzeta sa <http://www.pnas.org/content/96/6/3160/F1.expansion.html> (29.10.2017.godine)

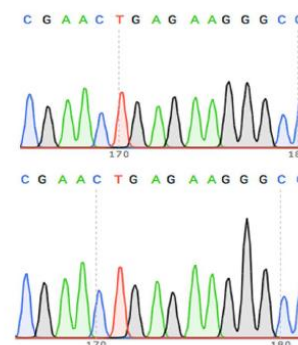


Slika 3. CRISPR/Cas9 tehnologija. Cas9 (ljubičasto) je nukleaza, tip enzima koji ima sposobnost isijecanja DNK. Kada odgovarajuća sekvenca poznata kao vodeća RNK (zeleno) nađe svoje mjesto u okviru virusnog genoma(PAM) Cas9 siječe DNK, onesposobljavajući time virus. *Slika je preuzeta sa <http://www.sciencephoto.com/media/725066/view> (09.11.2017. godine)*



A.

B.



Slika 4. Reparacija gena za PAH_c.1222C u COS-7 ćelijama. (A) Šema procesa: jedan dimer FokI-dCas9 kompleksa se vezuje za genom sa određenom sekvencom (PAM) (B) Prikazana je jedna od 30 sekvenci u kojoj je izvršena reparacija *Slika je preuzeta iz članka: Pan Y, Shen N, Jung-Klawitter S, Betzen C, Hoffmann GF, Hoheisel JD, Blau N. CRISPR RNA-guided FokI nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. Scientific Reports. 2016; 6:35794 | DOI: 10.1038/srep35794*

Reference

1. Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *Clin Biochem Rev.* 2008 Feb; 29(3): 31-41
2. Ekvall WS, Ekvall KV. Pediatric and adult nutrition in chronic diseases, developmental disabilities, and hereditary metabolic disorders. 3 ed. New York, New York: Oxford University Press; 2017
3. Katler H. Mortality and Maldevelopment. 1 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer;2000
4. Scriver CR. The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift. *Human Mutation* 2007; 28(9):831-845
5. Zschocke J. Molecular basis of phenylketonuria: from genotype to clinical management. *Ann Nestle* 2010; 68:48-52.
6. Leonard BGD. Molecular Pathology in Clinical Practice. 2 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer;2016
7. Porta F, Spada M, Ponzzone A. Early Screening for Tetrahydrobiopterin Responsiveness in Phenylketonuria. *Pediatrics* 2017; 140(2):73-79
8. Đorđević Maja. Korelacija između genotipa i fenotipa bolesnika sa hiperfenilalaninemijom na teritoriji Srbije [disertacija na internetu]. Beograd: Medicinski fakultet; 2013[citirano dana 28.10.2017.] Dostupno na sajtu: <http://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/2434?locale-attribute=en>
9. Brumm VL, Bilder D, Waisbren SE. Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria. *Mol. Genet. and Metab.* 2010; 99:S59-S63
10. Walter JH. Vitamin B12 deficiency and phenylketonuria. *Mol. Genet. and Metab.* 2011; 104:S52-4

11. Didycz B, Domagala L, Pietrzyk JJ. The maternal phenylketonuria syndrome-still current problem. *Przegl Lek.* 2009; 66(1-2):4-10
12. Waisbren SE, Rohr F, Anastasoae V, Brown M, Harris D, Ozonoff A, Petrides S, Wessel A, Levy HL. Maternal Phenylketonuria: Long-term Outcomes in Offspring and Post-pregnancy Maternal Characteristics. *JIMD Rep.* 2015; 21:23-33
13. Pitt JJ. Newborn Screening. *Clin Biochem Rev.* 2010; 31: 57-68
14. Stroup BM, Held PK, Williams P, Clayton MK, Murali SG, Rice GM, Ney DM. Clinical relevance of the discrepancy in phenylalanine concentrations analyzed using tandem mass spectrometry compared with ion-exchange chromatography in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2016; 6:21-6.
15. Van Spronsen FJ, Enns GM. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2010;99 Suppl 1:S90-5
16. Hafid NA, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Translational Pediatrics.* 2015; 4(4):304-317
17. Schuck PF, Malgarin F, Cararo JH, Cardoso F, Streck EL, Ferreira GC. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging and Disease.*2016; 6(5):1-10
18. Burnett JR. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/Phenoptin), an orally active synthetic form of BH₄ for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs* 2007;10:805-13.
19. Bell SM, Wendt DJ, Zhang Y, Taylor TW, Long S, Tsuruda L, Zhao B, Laipis P, Fitzpatrick PA. Formulation and PEGylation optimization of the therapeutic PEGylated phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *PLoS One.* 2017; 12(3):1-17
20. Barrangou R, Van der Oost J. *CRISPR/Cas9 Systems; RNA- Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea.* 1 ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer;2013
21. Pan Y, Shen N, Jung-Klawitter S, Betzen C, Hoffmann GF, Hoheisel JD, Blau N. CRISPR RNA-guided *FokI* nucleases repair a PAH variant in a phenylketonuria model. *Scientific Reports.* 2016; 6:35794 | DOI: 10.1038/srep35794