

# Biochemická genetika

## - *dědičné poruchy metabolismu (DPM)*

**prof. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., DABCC**

- Katedra laboratorních metod LF,
- Ústav laboratorní medicíny FN Brno,
- Farmakologický ústav LF

# DPM - synonyma v literatuře

- Hereditary metabolic disorders
  - „Inborn errors of metabolism“
    - významné osoby:
      - J. G. Mendel: zákony dědičnosti
      - A. Garrod: pojem: chemický fenotyp
      - Beadle, Tatum: jeden gen = jeden enzym
      - Watson, Crick: struktura DNA

Jak definujeme DPM ?

- jde o genetické poruchy s vyjádřeným **biochemickým fenotypem**

- ...příklady:

- enzym (Gal-1-P,UDP transferasa = galaktosémie)
- regulační protein (BTK = imunodeficience, maturace B-lymfocytů)
- transportní protein (CFTR = cystická fibrosa)
- strukturní protein (spectrin alfa nebo beta = eliptocytosy)

DPM - některé společné rysy  
těchto chorob

# Incidence

- Incidence je individuálně vzácná, ale kolektivně poměrně vysoká
  - odhady jsou až 1:1000 jedinců
  - až několik tisíc indexuje tzv McKusickův katalog ([dnes www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim))

# Incidence dále závisí na:

- způsobu dědičnosti
- frekvenci nových mutací
- etnickém původu jedince
- teritoriálních variacích

# Způsob dědičnosti

- ...většinou jde o monogenní choroby

- autosomálně recesivní (a´a´)
- autosomálně dominantní (A´a)
- X-linked dominantní (X´x)
- X-linked recesivní (Xx´)

- ..POZOR na fenomén „lyonizace“ tj. náhodnou inaktivaci X-chromosomu u jedinců ženského pohlaví

- ...Lyon Hypothesis became Lyon Law on July 22, 2011 at the EMBO 50-years of X-inactivation conference in Oxford U.K.



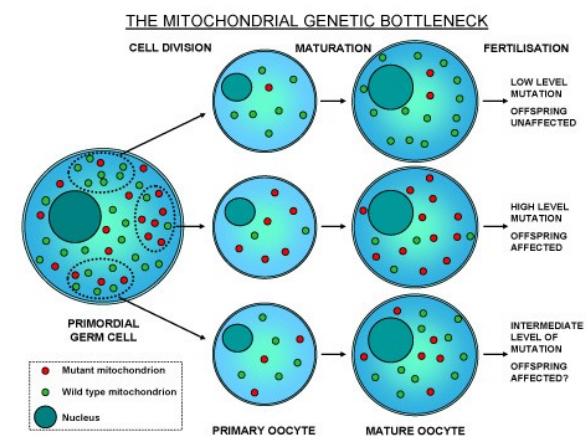


- multifaktoriální dědičnost
  - ...má se za to, že jde o výsledek souhry faktorů genetických a environmentálních (pravd. Alzheimer, některé typy nádorů, diabetes typu II, hypertenze, apod.

- mitochondriální dědičnost (kvantitativní, „populační“, nemendelovská dědičnost)

- 2-10 kopií DNA/mitochondrii a cca 200 000 - 300 000 kopií DNA v oocytu

- > tzn. přenos je maternální, vertikální
- > heteroplasmie: stav koexistence mit' a mit<sup>wt</sup>



# ...frekvence nových mutací a výjimky z pravidel dědičnosti

- Odhad je asi  $1.1 \times 10^{-8}$ /gen/generaci, *Roach JC, Glusman G, Smit AF, et al. (April 2010). "Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing". Science 328 (5978): 636–9. doi:10.1126/science.1186802. PMC 3037280.PMID 20220176)*
  - významný vliv má věk otce
    - ve starých zárodečných buňkách otců je vyšší frekvence bodových C->T transicí...

# ...frekvence nových mutací a výjimky z pravidel dědičnosti

- výjimky
  - nestabilní mutace (expandující triplet)
  - uniparentální disomie a „loss of imprinting“

# Etnický původ jedince

- bělošská populace (příklady):
  - cystická fibrosa
  - adrenogenitální syndrom,
  - fenylketonurie
  - deficit dehydrogenasy o středně dlouhých řetězcích (MCAD)

# Etnický původ jedince

- černošská populace:
  - hypercholesterolémie
  - sickle cell disease (paradoxní ochrana proti plasmodiové infekci, ...Hb-S, Hb-C)

# ...teritoriální variace

- jde o frekvenci příbuzenských sňatků (inbreeding)
  - Québec - tyrosinémie typ I
  - Finsko - aspartylglukosaminurie

# **DPM - klinická manifestace**



# DPM - klinická manifestace

- je nespecifická, resp. zejména nespecifická v průběhu vývoje choroby
  - ...potřebuje INTERDISCIPLINÁRNÍ spolupráci genetiky (klinické, laboratorní), neurologů, ARO, dětských internistů apod.

# Nejčastější formy klinické prezentace

- *...pozn. jde o schematické dělení pro didaktické účely !, nikoli o „science-based“ kategorizaci*
- *tato viz jinde (OMIM, MMBID8 a předchozí vydání)*

# A) akutní epizody v novorozeneckém období

- obvyklý projev:
  - ...typicky zralý novorozenec, zhorší se během 24-48 hod po porodu
  - klinická prezentace: respirační selhání, RDS, protrahovaná žloutenka, sepse, křeče, DIC,
- příklady:
  - poruchy ureagenese (OTC), galaktosemie, organické acidémie (propionová, methylmalonová, isovalerová), nonketotická hyperglycinemie

# B) subakutní formy projevující se v průběhu prvního roku života

- příznaky:
  - neprospívání, intolerance specifických potravin, psychomotorická retardace, křeče
    - subakutní formy výše uvedených chorob
    - stádavé choroby (glykogenosy, MPS, gangliosidosy)
    - mitochondriální poruchy
    - peroxisomální poruchy
    - poruch purinů a pyrimidinů

# C) Formy s pozdním nástupem

- Kombinace výše uvedených chorob
- přibývá více
  - mitochondriálních chorob,
  - střádavých chorob,
  - peroxisomálních poruch (VLCFA), apod.

# skupina takto nezařaditelných chorob s akutní toxickou prezentací

- ...vcelku zdravý jedinec, (dítě až mladý dospělý)
  - febrilní infekt, následuje
  - >>> náhlý nástup hyperamonemicko-hypoglykemického bezvědomí
    - Reye-like syndromy, (MCAD, SCAD, OTC, fruktosa 1,6 bisfosfatasa, apod.)

# DPM - časté laboratorní nálezy

- Je důležité si uvědomit, že tyto choroby mají (nebo mohou mít) určitou reflexi v běžných laboratorních testech
  - => to má význam při interpretaci nálezu

O jaké testy jde ?

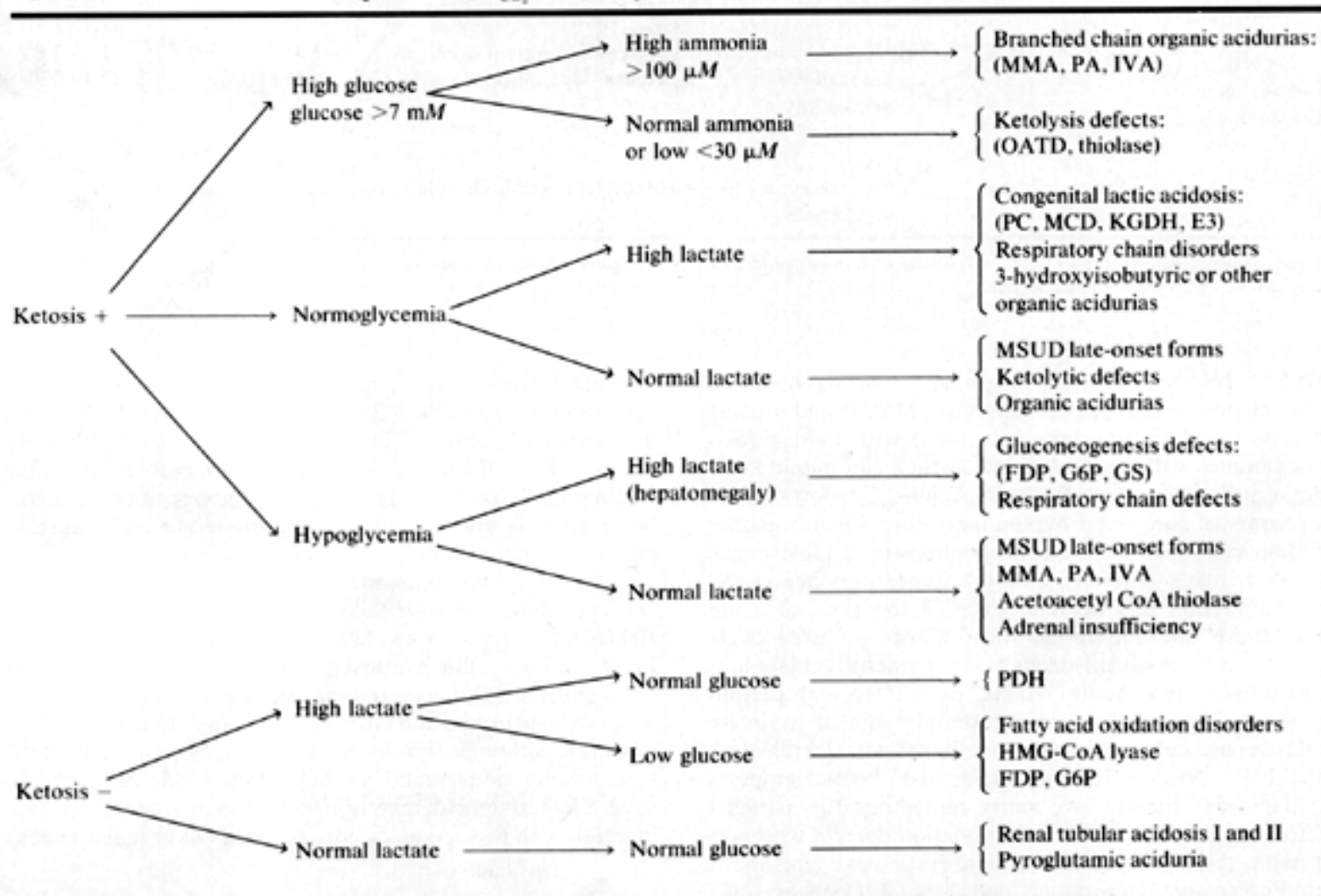


# Informace o acidobasi:

pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> anion gap

- náleží acidózy:
  - snížené pH, zvýšený anion gap přítomností dalšího aniontu např. organické kyseliny (methylnalonátu, propionátu, laktátu)

**Table 5-7 Metabolic Acidosis (pH <7.30, P<sub>CO<sub>2</sub></sub> <30, CO<sub>3</sub>H <15)**



E3 = Lipoamide oxidoreductase; FDP = fructose diphosphatase; GA I = glutaric aciduria type I; GS = glycogen synthase;  
 IVA = isovaleric acidemia; KGDH = ketoglutarate dehydrogenase; MCD = multiple carboxylase deficiency; MMA = methylmalonic acidemia;  
 OATD = oxoacid CoA thiolase deficiency; OTC = ornithine transcarbamylase; PA = propionic acidemia; PC = pyruvate carboxylase.

- Nález acidosisy s hyperlaktacidémií:
  - pozorujeme kupř. při deficitu PDH (komplex pyruvátdehydrogenasy, poruch oxidativních fosforylací)

- Nález alkalosy:

- velmi důležité, diagnostické pro **defienci OTC v novorozeneckém období**
- obecně v iniciální fázi jaterního selhání z důvodů neschopnosti odstranit **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** konjugací s **NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**

# Informace o krevní glukose

- zajímá nás hlavně hypoglykémie, navíc bez ketosy
  - poruchy glukoneogenese
    - (Fru1,6,bisfosfatasa, glykogenosy)
    - Reye-like syndromy

**Table 5-11 Hypoglycemia: General Approach**

With permanent hepatomegaly	Severe liver failure Hepatic necrosis (see this symptom)	Permanent short-fast hypoglycemia	Neonatal to early in infancy	Galactosemia Fructosemia Tyrosinosis type I Neonatal hemochromatosis Other severe hepatic failure (respiratory chain disorders)
	Cirrhosis	Postprandial hypoglycemia (triggered by fructose) Vomiting	Neonatal to early infancy	Fructose intolerance Glycerol intolerance
		Mental retardation Hypermethioninemia Hepatic failure induced by methionine	Early in infancy	Glycogenosis type IV SAH hydrolase deficiency
	Isolated hepatomegaly	Fasting hypoglycemia and lactic acidosis Ketosis	Infancy	G6P FDP PEPCK
	Protuberant abdomen Fasting hypoglycemia and ketosis Postprandial hyperlactacidemia	Infancy	Glycogenosis type III Glycogen synthetase	
Without permanent hepatomegaly	With ketoacidosis	Recurrent attacks Hyperlactacidemia	Infancy to childhood	Organic acidurias Late-onset MSUD Ketolysis defects Glycerol kinase FDP
		Dehydration Collapse Hyponatremia	Neonatal to childhood	Adrenal insufficiency
	Acidosis without ketosis	Moderate hyperlactacidemia Reye syndrome ( $\pm$ muscle/cardiac symptoms)	Neonatal to infancy	HMG-CoA lyase (frequent) FAO disorders (rare) Idiopathic Reye syndrome
	Ketosis without acidosis	Fasting hypoglycemia Low lactate levels Small for date Macrocephaly	1-6 years	Recurrent hyperketotic hypoglycemia Adrenal insufficiency (central or peripheral)
	Without ketosis	Unpredictable and postprandial hypoglycemia reactive to glucagon	Neonatal to childhood	Hyperinsulinism Cortisol deficiency
		Short stature Short-fast hypoglycemia Variable response to glucagon	Infancy	Growth hormone deficiency and related disorders
Long-fast hypoglycemia Reye syndrome Acute moderate hepatomegaly Transient cytolytic and slight hepatic insufficiency		Neonatal to infancy	FAO disorders (frequent) (see Fig. 5-1) HMG-CoA lyase (rare) FDP (rare)	

FAO = fatty acid oxidation; FDP = fructose diphosphatase; PEPCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase; SAH = S-adenosyl homocysteine hydrolase.

# Informace o hladině močoviny

- Snížená hodnota močoviny v séru je konsistentní s poruchou odstraňování amoniaku a  $\text{HCO}_3^-$
- ...jde o pozdní příznak

# Amoniak v plasmě

- ! Zásadní vliv **preanalytické fáze** na kvalitu a správnost výsledku
- sama hodnota amoniaku je často diagnostická pro řadu DPM projevujících se **hyperamonémií**



# Ketolátky plasma/moč

- ...vždy brát v úvahu, co detekujeme natrium nitroprussidem !!
  - hypoketosa (s hypoglykemií) je suspektní z poruchy beta oxidace (MCAD např)
  - hyperketosa může indikovat
    - některé organické acidémie, von Gierkeho chorobu apod.

# Kyselina močová

- Hypo- i hyperurikémie
  - **přímo** indikují možnost výskytu poruchy metabolismu purinů
  - **nepřímo** ...provázejí poruchy beta-oxidace, von Gierkeho chorobu, ale také **malignity (!)** apod.

# Cholesterol

- Hypercholesterolémie a související stavy CAD a další
- hypocholesterolémie
  - deficit mevalonátkinasy
  - deficit 7-dehydrocholesterol reductasy, tzv Smith-Lemli-Opitzův syndrom

# Triglyceridy

- Falešná „hypertriglyceridémie“ z nadbytku volného glycerolu v séru
  - deficit glycerolkinasy

# Hematologické testy

- anemie
  - poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů
- neutropenie, trombocytopenie
  - některé organické acidémie
- poruchy koagulace
  - poruchy metabolismu homocysteinu

# DPM - jak je hledáme a diagnostikujeme

- Postupujeme od testů s širokou kapacitou ke specifickým
- ideálně:
  - vysoká sensitivita (vyhledávací proces)
  - vysoká specificita (konfirmační proces)

# DPM - jak je hledáme a diagnostikujeme

- **sensitivita** (schopnost testu zachytit nemocného)

- $TP/(TP + FN) * 100$  (v %)

- **specificita** (schopnost testu zachytit zdravého)

- $TN/(TN + FP) * 100$  (v %)

# DPM - jaké používáme techniky v biochemické diagnostice ?

- Chromatografické techniky
  - planární (sacharidy, MPS)
  - kapalinové (aminokyseliny, puriny)
  - plynové (organické kyseliny)
  - kapilární elektroforéza (orotová kyselina)
- kombinace chromatografických technik s hmotnostní spektrometrií
  - GC-MS (dnes již méně)
- tandemová hmotnostní spektrometrie
  - LC-MS/MS (jde o state of the art technologii)



# Prakticky:

- A) na základě exkrece, resp. tvorby metabolitu nebo skupiny metabolitů tvořících tzv „disease pattern“, který je pro danou chorobu více méně charakteristický
  - např. MMA, IVA, GAG, GM1, apod.
  - ...je víceméně přítomen vždy

- B) exkrece metabolitu po zátěži

- toto má zásadní důležitost:

- PKU po zátěži mlékem, galaktosemie také, hereditární intolerance fruktosy
    - ...rescreening, apod.

- *!! pozn. je třeba mít na paměti, že subexpoze pacienta substrátem enzymového defektu může vést k vymizení patologického markeru, který sledujeme !!*

- Příklady kategorie sub b)

- je-li vzorek odebrán velmi nemocnému pacientovi, marker tam sice je, ale může být maskován např. přítomností katabolitů nebo nejčastěji metabolitů léků

- C) na základě snížené aktivity enzymu v postižené tkáni nebo buněčné kultuře
  - výhody:
    - v podstatě definitivní funkční diagnostika
  - nevýhody:
    - musíte vědět, co tam hledat, řada nevýhod technických

- D) na základě specifických změn v DNA kódující příslušný protein (mutace, VNTR, apod)
  - výhody:
    - technická proveditelnost, možnost sledování rodin
  - nevýhody:
    - nejde o funkční diagnostiku, bez znalosti korelace genotyp/fenotyp je interpretace často neinformativní

# Co se myslí tzv. screeningem DPM

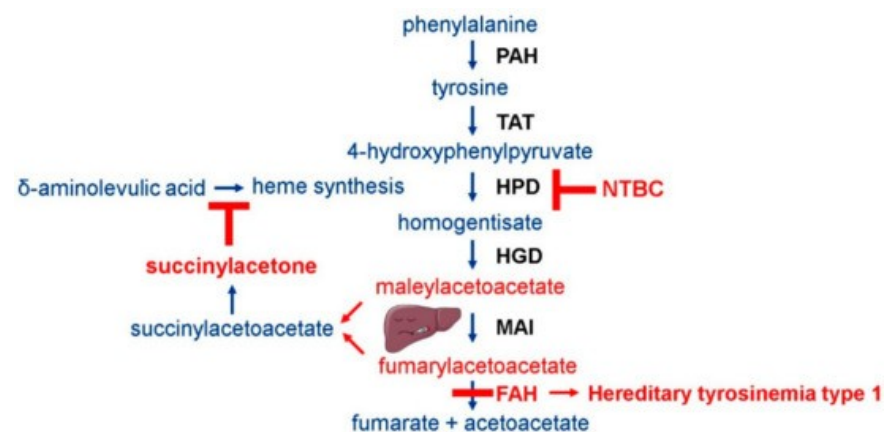
- A) screening primární:
  - nalézt poruchu v celé populaci (PKU, hypothyreosa, někde galaktosemie, někde MCAD, u nás [www.novorozeneckyscreening.cz](http://www.novorozeneckyscreening.cz), 18 chorob, viz metabolická příručka ÚDMP Praha)
- B) screening diagnostický (selektivní):
  - tj snaha diagnostikovat DPM u preselektovaného pacienta komplexním iterativním testováním nejen laboratorním

# DPM - časná diagnosa je potrebná kvôli:

- A) léčbě, kde možno
- B) prenatální diagnostice a genetickému poradenství

# DPM - léčba

- Klasická: dietní - eliminace noxy,
- Suportivní: obecná podpora (vitaminy, hepatoprotektiva)
- U některých specifická: APRT+allopurinol, tyrosinémie typ I a NTBC





# Nové trendy

- Enzyme replacement therapy (Gaucher, ADA)
- gene therapy (ADA, CF, Glybera u deficitu lipoproteinové lipázy)
- orgánové transplantace vč. transplantace kostní dřeně (tyrosinemie, AAT, Wilson, primární hyperoxalurie)
- kombinace: např. transplantace genově upravených kmenových buněk

# Významné odkazy

- [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)
- <https://www.vfn.cz/wp-content/uploads/2022/12/KPDPM-metabolicka-prirucka-v11.pdf>