

PATOBIOCHEMIE



Trendlink. [online]. [cit. 2014-08-18]. Dostupné z: <http://www.trendlink.com/aktien/Biochemie>

Ústav molekulární biologie a
farmaceutické biotechnologie

Mgr. Marie Brázdová, Ph.D.

brazdovam@vfu.cz



Biofyzikální ústav AV ČR. [online]. [cit. 2014-08-18]. Dostupné z: <http://www.ibp.cz/cs/o-instituci/zakladni-infomace/>

Biofyzikální ústav, Akademie věd České
republiky, v.v.i.
Královopolská 135
612 65 Brno

Patobiochemie

Patobiochemie se zabývá poruchami biochemických dějů v organismu, biochemickými změnami v průběhu chorobných stavů a snaží se o jejich vysvětlení na molekulární úrovni.

Přednášející:

Mgr. Marie BRÁZDOVÁ, Ph.D. ,

RNDr. Jiří Jelínek, Ph.D., Mgr. Soldanová, Mgr. Pařilová, Mgr. M. Petr,

Dr.Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký

Po: 45-135 7:15-8:45

Cvičící:

Mgr. Marie BRÁZDOVÁ, Ph.D., Mgr. Soldanová,

Mgr. R. Helma, Mgr. M. Petr, Dr.Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký, Mgr.
Pařilová

pracovníci centrálních laboratoří

(laboratoř 45-221, 324,325, centrální laboratoře)

Sylabus Patobiochemie 2019/2020 (přednášky 45-135 posluchárna, po 7:15-8:45)

- 1. Úvod do předmětu, význam studia patobiochemie. Rozsah a požadavky k úspěšnému ukončení předmětu zkouškou, doporučená literatura. **Příčiny a druhy poruch. Dědičné metabolické poruchy. (17.2.MB)**
- 2. **Principy regulací metabolismu.** Receptory. Biochemické komunikace. Enzymy, regulace metabolismu. Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plasmě. Klinicky významné enzymy. **(24.2.MB)**
- 3. Metabolismus aminokyselin a jeho poruchy. Druhy nemocí, terapie. **(2.3.MB)**
- 4. Sacharidy, metabolismus glukosy a jeho poruchy. Regulace glykemie, poruchy. Patobiochemie diabetu mellitu, druhy DM. Poruchy metabolismu glykogenu, glykogenosy. **(9.3.MB)**
- 5. Poruchy metabolismu lipidů. Cholesterol, lipoproteiny. Lipidosy, dyslipoproteinemie. **(16.3.MB)**
- 6. **Patobiochemie arteriosklerózy.** Ischemická porucha srdeční - srdeční markery. **(23.3.CL)**
- 7. **Krev, proteiny krevní plasmy.** Srážení krve, koagulopatie. Dysproteinemie. Porfyriny. Biosyntéza, poruchy metabolismu. Porfyrie, hemoglobinopatie. **(30.3. CL)**
- 8. Nukleové kyseliny poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů. Hyperurikemie, orotacidurie, terapie. **(6.4.MB)**
- 9. **Xenobiotika** a jejich účinky na organismus. Detoxikace, mechanismus. Biologické oxidace. Účinky volných radikálů na organismy. Lipoperoxidace, antioxidanty. **(20.4.MB)**
- 10. **Tumor, tumorové markery.** Základní charakteristika nádorové buňky. Strategie laboratorních vyšetření. Požadavky na ideální nádorový marker. Používané tumorové markery. **(27.4.MB)**
- 11. **Vztah patobiochemie a klinické biochemie.** Klinicko-biochemická analytika a její specifické rysy. Terminologie klinické biochemie. Analyzovaný materiál. Odběr materiálu. **(4.5.CL)**
- 12. Mechanizace a automatizace v klinické biochemii. **Analyzátořy**, jejich rozdělení z různých hledisek. Diagnostické soupravy. Organizace práce v klinicko-biochemické laboratoři, laboratorní a nemocniční informační systémy. **(11.5.CL)**
- 13. **Analýza moče** a močového sedimentu. Imunochemické metody. **(18.5.CL)**

SYLABUS PRAKTICKÝCH CVIČENÍ:

(ut 7-9:15, 9:15-11:30, 11:30-13:45)

1. Cvičení: **STANOVENÍ KONCENTRACE CELKOVÝCH BÍLKOVIN VE VZORKU SÉRA POMOCÍ AUTOMATIZOVANÉHO FOTOMETRICKÉHO ANALYZÁTORU BS 200 (45-221, Laboratoře centrální, 324, šatna 3.patro, ZB, RN)**
2. Cvičení: **Analýza onkogenů pomoci imunodetekce na membráně. (ZB) (Laboratoře 324, šatna 3.patro)**
3. Cvičení: Základní biochemická vyšetření. Seznámení s biochemickým analyzátořem Dimension. **(centrální laboratoře, šatna suterén)**
4. Cvičení: Imunochemické metody. Chemiluminiscenční metody. Využití imunoanalyzátořu Immulite. **(centrální laboratoře, šatna suterén)**
5. Cvičení: Hematologické metody. Využití automatických hematologických analyzátořů v klinické praxi. Koagulační metody **(seminář, učebna)**. Cvičení: Zápočtový test

Studijní literatura:

moodle- patobiochemie 2020, patobiochemie2015, patobiochemie

- G.F.Hoffmann et al. *Dědičné metabolické poruchy*. Grada,, 2006.
- J.Koolman, K.H.Rohm. *Barevný atlas biochemie*. Grada, 2012.
- Ledvina a kol. *Biochemie pro studující medicíny - I. a II.díl*. Karolinum, 2005.
- Murray et al. *Harper's Illustrated Biochemistry. 29th Edition*. Lange, 2012.
- KARLSON, P.; GEROK, W.; GROSS, W. *Pathobiochemie*. Academia, Praha, 1987.
- *Laboratorní diagnostika*. Edited by Tomáš Zima. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. ISBN 80-7262-201-3.
- *Clinical biochemistry :metabolic and clinical aspects*. Edited by S. K. Bangert - William J. Marshall. New York: Churchill Livingstone, 1995. ISBN 0-443-04341-8.
- MASOPUST, Jaroslav. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. část I. a část II. ISBN 80-7184-649-3.
- *Clinical guide to laboratory tests*. Edited by Norbert W. Tietz. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. ISBN 0-7216-5035-X.
- RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- Slabý, O.: *Molekulární medicína*, Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6
- Masopust, J: *Patobiochemie buňky*, 2003, ISBN: 80-239-1011-0

Požadavky ke zkoušce z patobiochemie

Zkouška se skládá z části písemné části

Test: min 60% (E),90-95% (A)

Ke zkoušce se mohou přihlásit pouze ti studenti, kterým byl udělen **zápočet** z praktického cvičení.

Praktická cvičení:

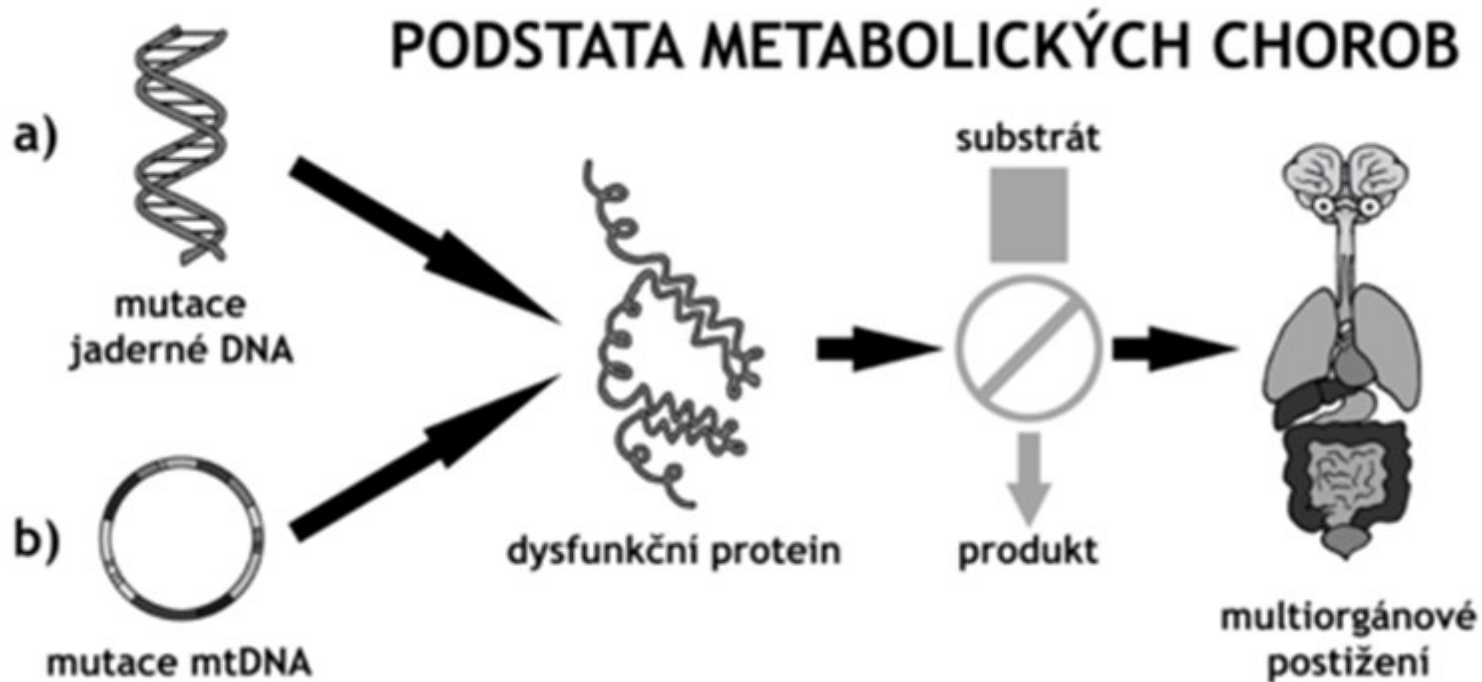
1) účast 100%, **2)** protokoly, **3)** zápočtový test 80%,

4) vypracovanou ppt prezentaci (1 list) na jednu metabolickou chorobu, seznam na moodle

zasílat: helmar@vfu.cz

1. Dědičné metabolické poruchy

Příčiny a druhy poruch. Dědičné metabolické poruchy (DMP). Diagnostika. Léčba



2.1. Příčiny a druhy poruch. Dědičné metabolické poruchy (DMP).

Dědičné metabolické poruchy (DMP) tvoří různorodou skupinu **700–1000 onemocnění**, která jsou způsobena **enzymovým deficitem**, hyperaktivitou, dysfunkcí transportního proteinu či poruchou jiného proteinu souvisejícího s některou **metabolickou dráhou**.

Typická je pro ně autozomálně recesivní, gonozomálně recesivní i dominantní, ale také mitochondriální dědičnost.

K nedostatečné tvorbě enzymu či potřebného proteinu dochází následkem mutací jaderné či mitochondriální DNA.

Konzervativní odhady kumulativní incidence všech dědičných metabolických poruch jsou uváděny kolem 1:500 (frekvence heterozygotů 1:15); je velmi pravděpodobné, že DMP jsou v současné době poddiagnostikovány.

Každý praktický lékař má ve svém obvodu nejméně dva a více pacientů s DMP a že každý specialista se ve své praxi s těmito pacienty setkává.

Skupina dědičných metabolických poruch je značně **heterogenní** společné rysy.

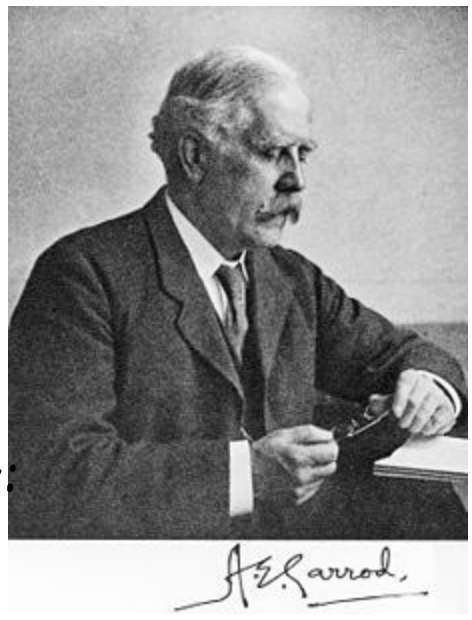
- 1) Již z jejich podstaty vyplývá, že u pacientů budou detekovatelné **biochemické a enzymatické odchylky**.
- 2) Dále vzhledem k tomu, že většina metabolických drah je společná pro řadu buněk v organismu, bývá časté **multiorgánové postižení** (např. *postižení CNS, svalů, ledvin a jater u mitochondriálních onemocnění*).
- 3) Klinické projevy DMP bývají velmi často **nespecifické** (neprospívání, nechutenství, porucha růstu, porucha psychomotorického vývoje, poruchy vědomí),
- 4) jen poměrně vzácně se vyskytují **specifické** známky svědčící s vysokou pravděpodobností pro některé DMP (např. zápach zpocených nohou u pacientů s izovalerovou acidurií nebo typická faciální dysmorfie u pacientů s mukopolysacharidózami či generalizovanými peroxizomálními onemocněními).
- 5) Postihují pacienty **jakéhokoliv věku** od prenatálního období až do stáří.

• **Historie**

• Počátky objevování dědičných metabolických poruch jsou spojeny se jménem **Archibalda Garroda**, který jako první poukázal na **souvislost lidských nemocí a Mendelových zákonů dědičnosti** a formuloval **koncept dědičných metabolických poruch**

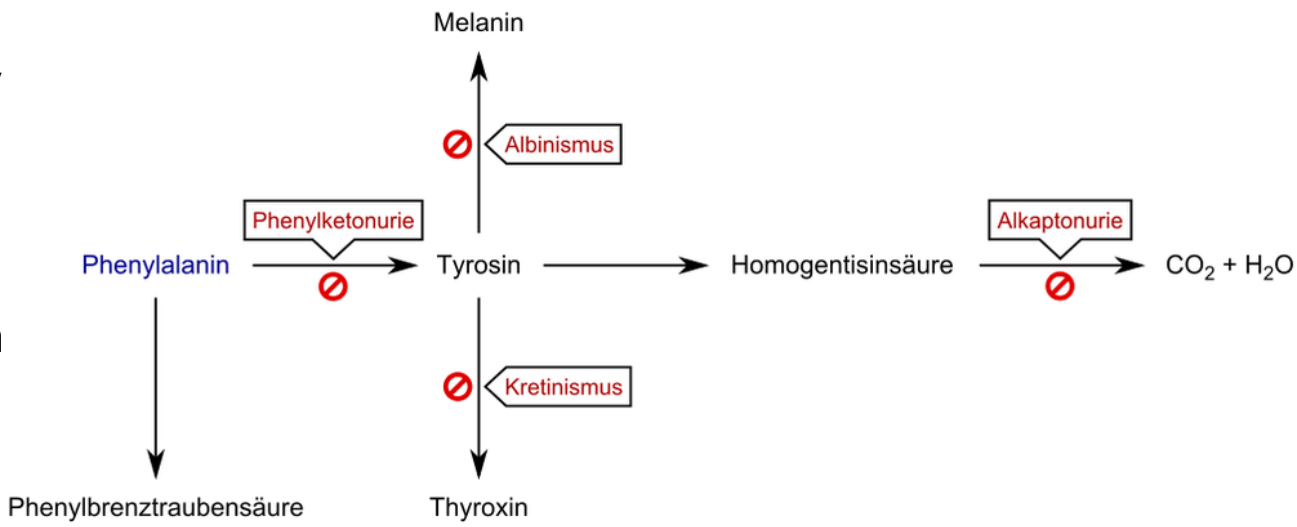
(inborn errors of metabolism).

• Garrod se zabýval studiem **alkaptonurie** a v roce 1902 publikoval knihu *The Incidence of Alkaptonuria: a Study in Chemical Individuality*, která je **prvním záznamem případu recesivní dědičnosti** u lidí.

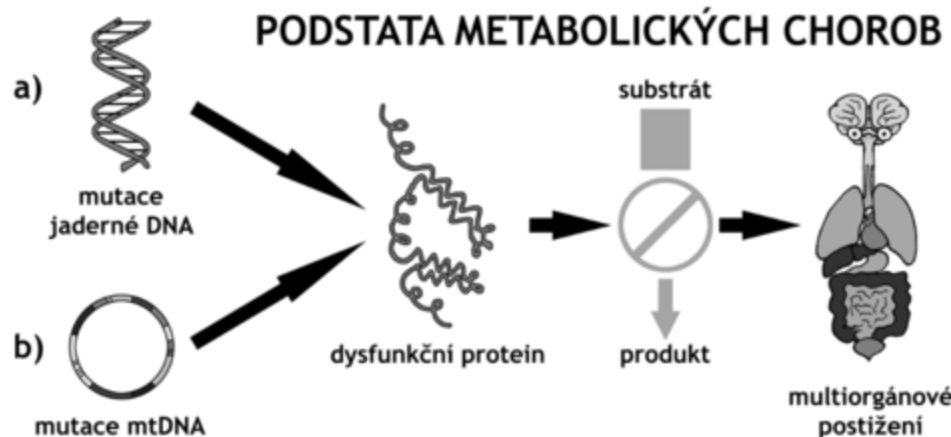


Sir Archibald Edward Garrod,

V roce 1923 vyšla další jeho kniha s názvem *Inborn Errors of Metabolism*, v níž publikoval své studie o **alkaptonurii**, **cystinurii**, **pentosurii** a **albinismu**. Právě překladem termínu inborn errors of metabolism vznikl u nás dlouho používaný nepřesný název vrozené metabolické poruchy (vrozené metabolické vady)

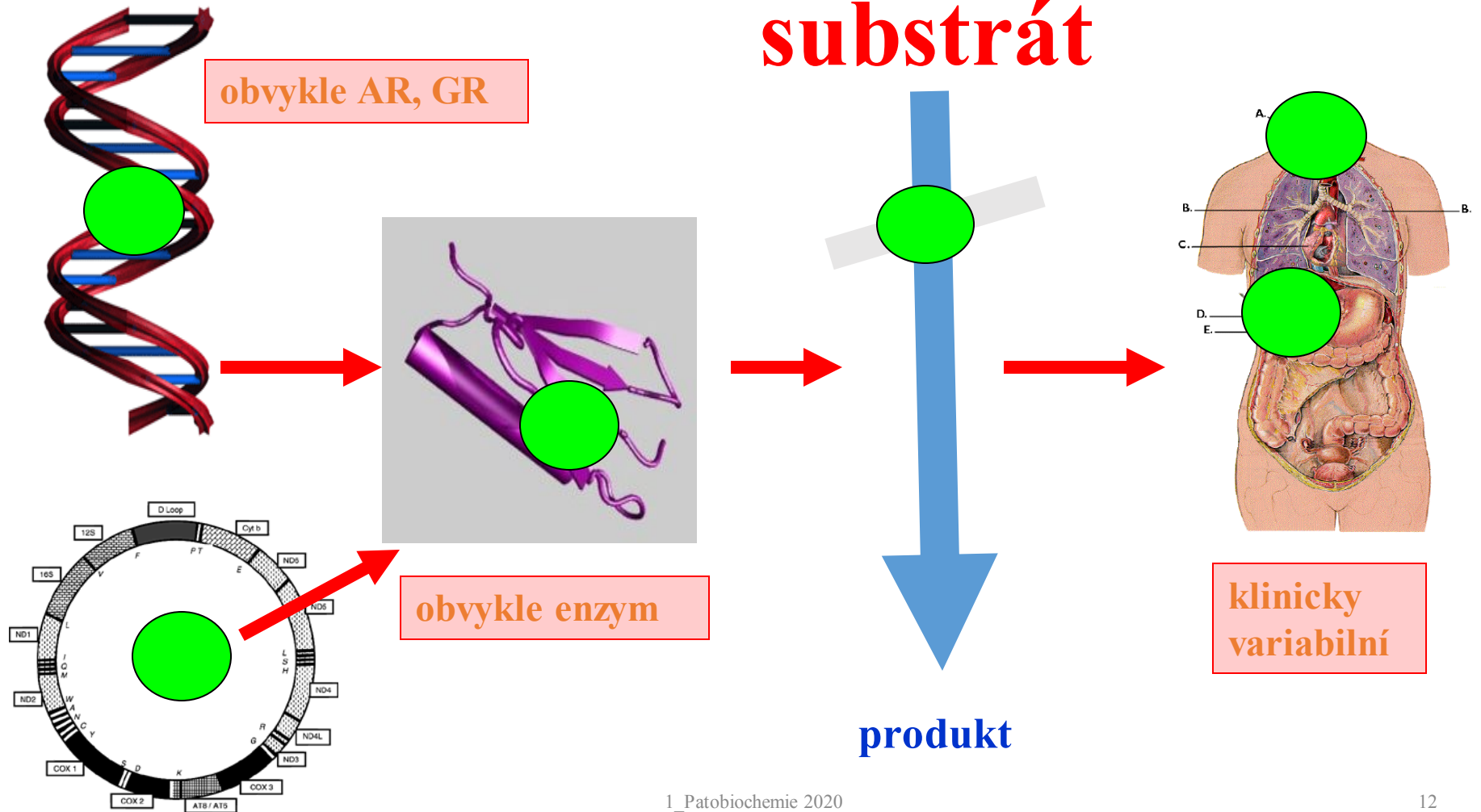


Příčiny dědičných metabolických poruch



- Nejčastější příčinou dědičných metabolických poruch jsou **mutace nukleární DNA** v zárodečných buňkách (a tím i následně v somatických buňkách) s typickou monogenní mendelovskou dědičností – běžně **autozomálně recesivní**, gonozomálně recesivní i dominantní.
- Méně častou příčinou DMP jsou **mutace mitochondriální DNA**, které se přenášejí maternálním typem dědičnosti.
- **Fenotypové projevy** u dvou jedinců se stejným genotypem se mohou lišit v důsledku **dalších faktorů** jako je vliv prostředí (dieta, životní styl u nemocí malých molekul) či jako jsou např. epigenetické změny, epistáze (interakce s alelickými variantami v jiných genech), inaktivace X-chromozomu (lyonizace).
- **Mutace** mohou být typu **bodových mutací** (missense, nonsense, synonymní mutace), **delecí a inzercí** (s nebo bez posunu čtecího rámce), přičemž z typu mutace a její lokalizace nelze často přímo určit stupeň postižení funkce příslušného proteinu.
- Následek: defektní transkripce (úroveň mRNA) a translace, sestřih,....

Dědičné metabolické poruchy



Důsledky mutace

- **změněné množství translatovaného proteinu** (obvykle snižené či vzácně zvýšené)
- **změněné vlastnosti proteinů** (změnou izolované funkce jedné domény, nebo globální změnou všech funkcí např. při misfoldingu).
- mutace mohou vést i ke změnám funkce **neproteinových genových produktů** jako jsou například **miRNA** či **siRNA**, které regulují expresi řady cílových genů.

Postižený protein:

a) většinou **enzym (ENZYMOPATIE)** některé metabolické dráhy, jež potom vážne a nevzniká její produkt, který může **chybět**, neodčerpává se substrát, který se může **hromadit**, případně metabolizovat na **vedlejší produkt**. Od toho se pak odvíjí postižení různých orgánů do různé míry (př. Alkaptonurie).

b) **krevní bílkoviny neenzymové povahy**: plazmatická bílkovina či hemoglobin (srpkovitá anémie)

c) **strukturní bílkoviny plazmatické membrány**: změna tvaru buňky (např. sférocytoza)

d) **receptory, součásti iontových kanálů, regulační proteiny** (př. nádorový supresor)

Důsledky mutací

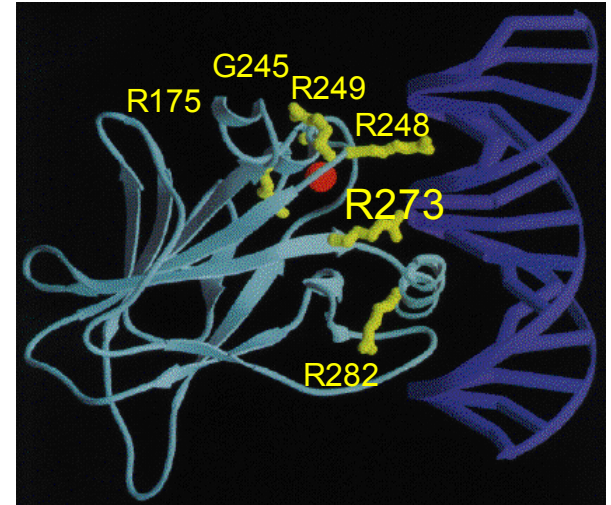
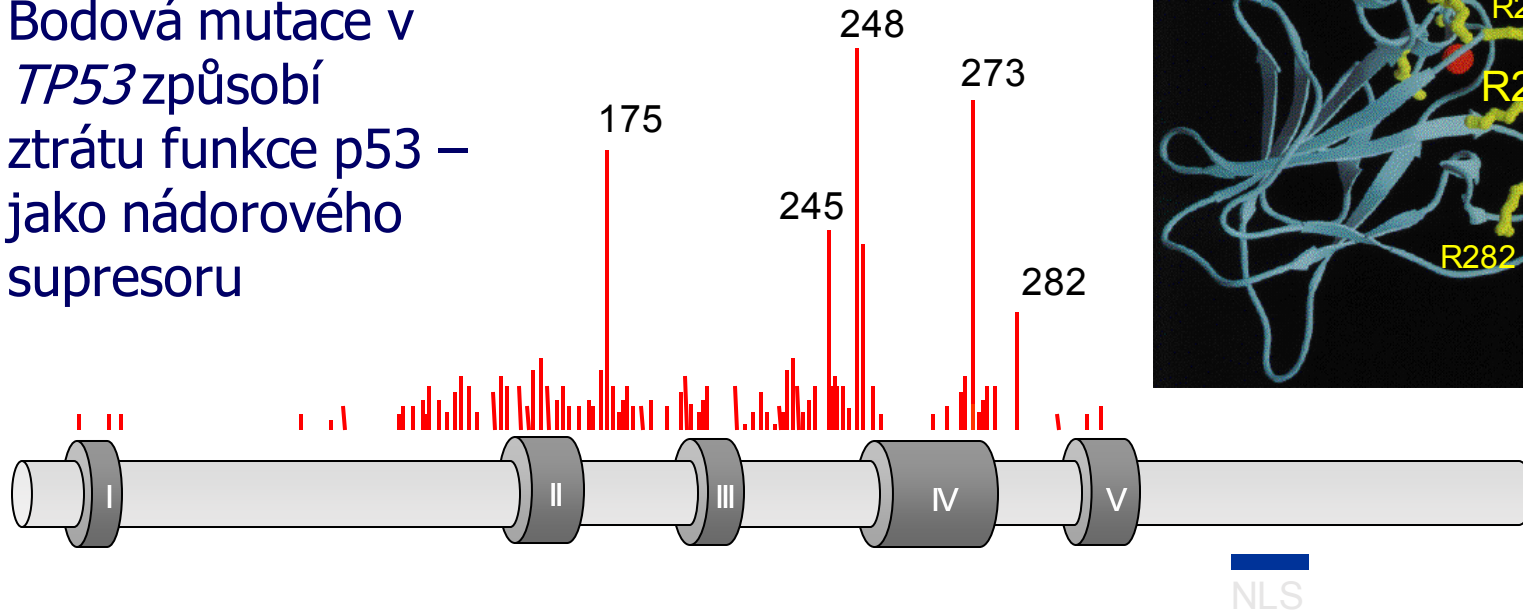
- **hromadění substrátu** (malé molekuly-př. fenylalanin jsou difusně rozptýlené v tělesných tekutinách, přestup přes filtr. bariéru ledvin, exkrece močí. Velké molekuly -př. mukopolysachyridy hromadění v místě vzniku).

Př = PKU - mutace genu pro PAH (*phenylalaninhydroxylasu*), aktivita enzymu < 1% (postiž. 2 alely). Nízké procento PKU je způsobeno mutací 1 alely nebo v genu pro kofaktor PAH - tetrahydrobiopterin (lehčí forma PKU).

- **chybění produktu**
- **hromadění defektního enzymu**
- **tvorba nesprávného produktu - blok metabolické dráhy**
- **ztráta mnohočetných enzymových aktivit**

Mutace *TP53*

Bodová mutace v *TP53* způsobí ztrátu funkce p53 – jako nádorového supresoru



Cho et al. 1994

Transactivation

Sequence-specific DNA binding

Oligomerization

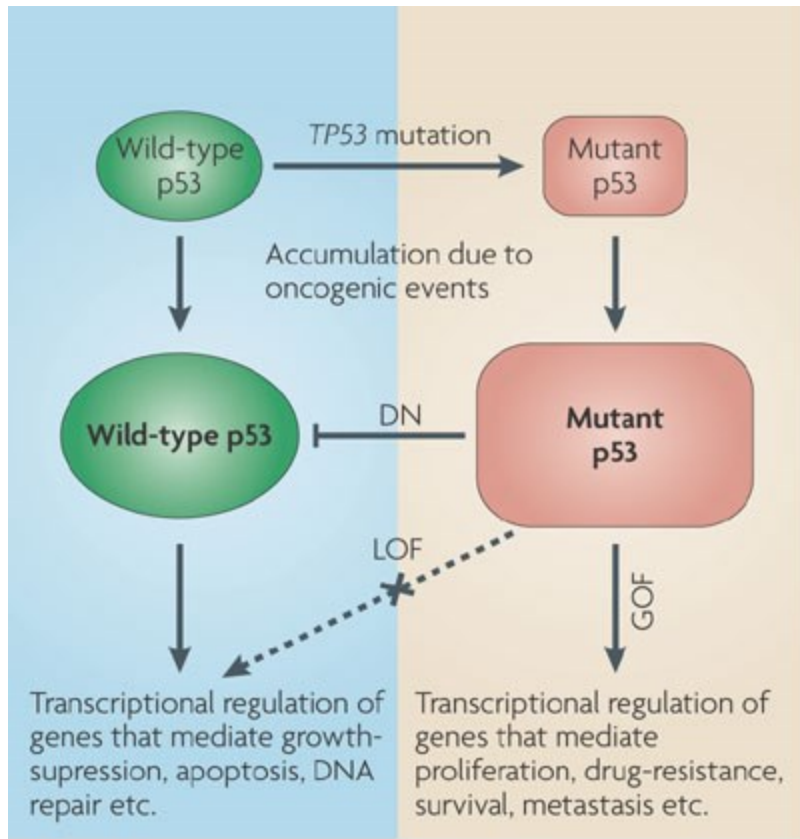
C-terminal DNA binding

• Důsledky mutace pro funkce proteinu

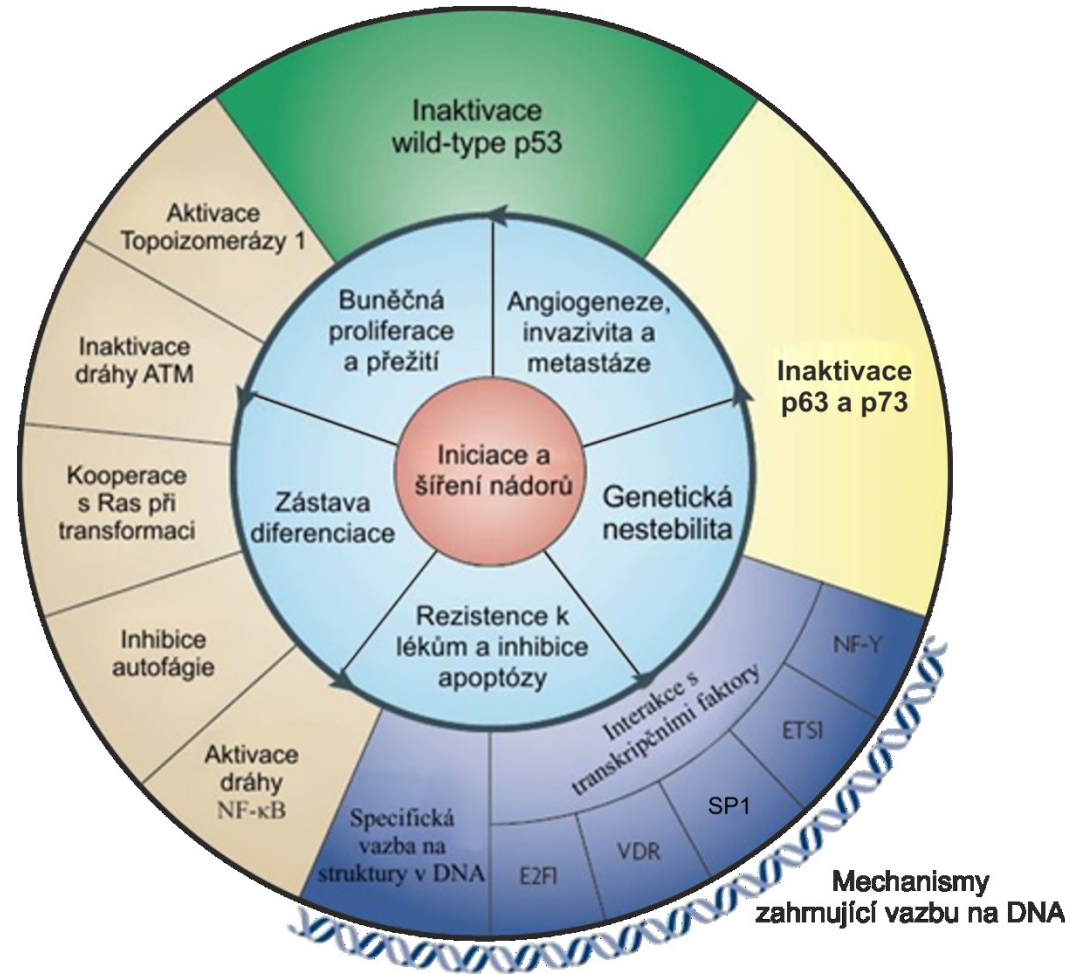
- ztráta funkce
- zesílení funkce – mutací zesílí některá z funkcí proteinu nebo intenzitu produkce proteinu /hromadění)
- získání nové funkce
- nesprávná exprese proteinu (v místě a čase)

PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy

Funkční dopad mutací *TP53* a mechanismy GOF



Nature Reviews | Cancer



p53- nádorová supresor, antionkgen, transkripční faktor, protein vázající se na DNA
mutantní p53- onkogen

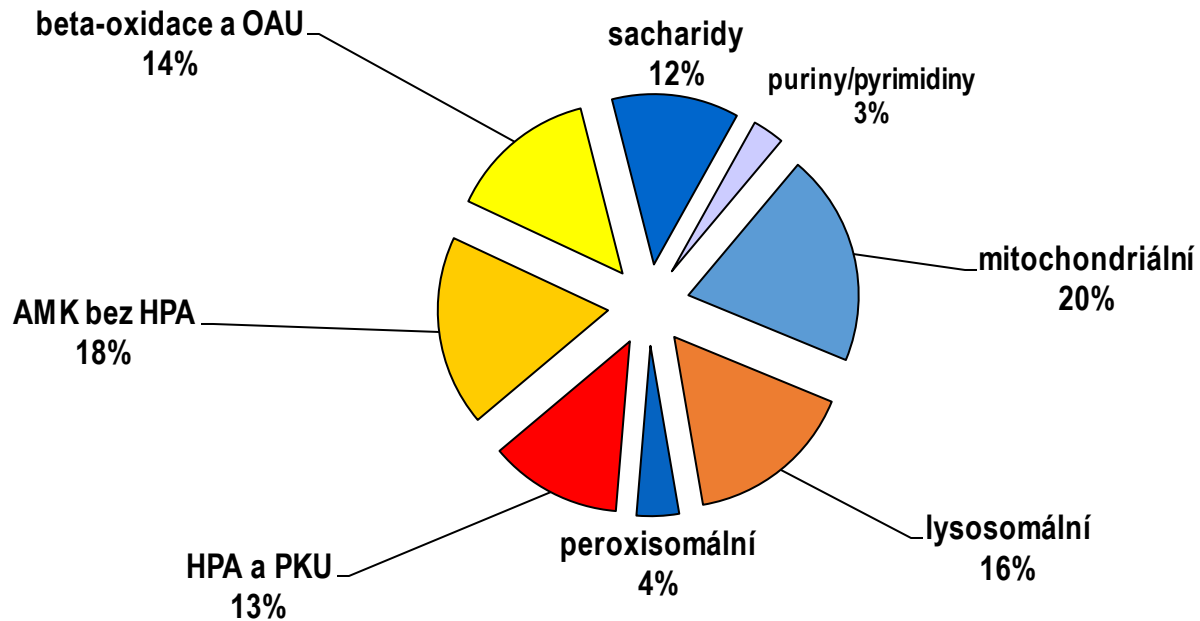
Incidence (výskyt) DMP

- DMP patří do skupiny tzv. vzácných onemocnění (rare diseases). Incidence jednotlivých diagnostikovaných DMP je nízká, 1:10³ až 1:10⁶ i nižší, ale celková incidence všech DMP je relativně vysoká (udává se 1:1000 až 1:600). Skutečná incidence je pravděpodobně ještě vyšší a řada pacientů tak diagnóze DMP uniká. Incidence DMP je v různých populacích odlišná.
- Individuální výskyt poměrně vzácný (1:15 000 - 200 000)
- Kolektivní výskyt vysoký (1: 1000), incidence pravděpodobně i vyšší (kolem 1:500)
- novorozenecký screening 1:1000-1:4000
- selektivní screening nejméně 1:500-1:1000
- frekvence heterozygotů pro DMP nejméně 1:15
- zastoupení se liší podle populací
 - vyšší výskyt v imbredních populacích (PKU Turecko, organické acidurie Blízký Východ)
 - tyrosinemie I.typu Quebec, aspartylglykosaminurie Finsko, lysosomální nemoci Izrael

Konzervativní odhady kumulativní incidence všech dědičných metabolických poruch jsou uváděny kolem 1:500 (frekvence heterozygotů 1:15); je velmi pravděpodobné, že DMP jsou v současné době poddiagnostikovány.

Incidence, statistický ukazatel v epidemiologii, je podíl počtu nově hlášených nemocných jedinců za dané časové období (nových případů) a počtu všech jedinců ve sledované populaci.

Výskyt DMP v ČR



incidence pro ČR ~ 1:1000
dosud ~150 různých nosologických jednotek

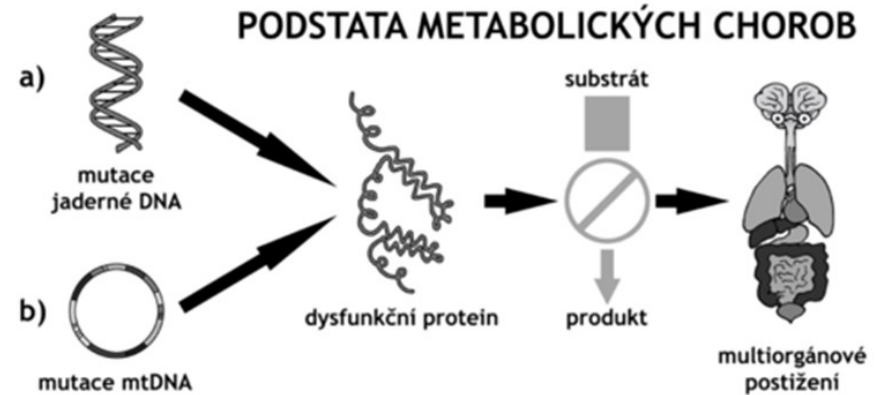
Způsoby přenosu DPM (dědičnost)

JADERNÁ DNA

- Autosomálně recesivní
- Autosomálně dominantní
- Gonosomálně dominantní
- Gonosomálně recesivní

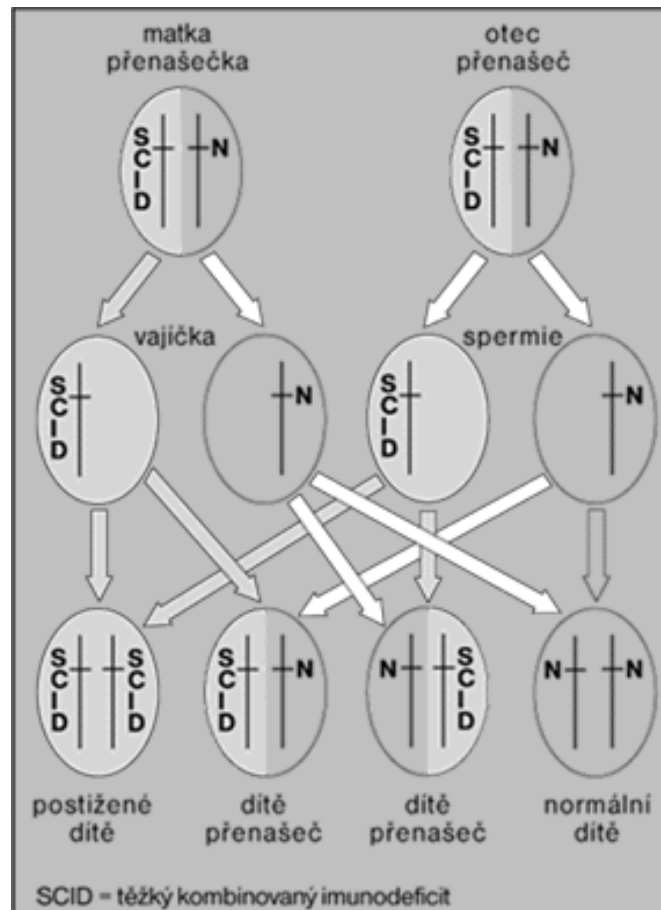
MIMOJADERNÁ DNA

- Maternální typ dědičnosti (mitochondriální DNA)



Dědičnost AR (Autosomálně recesivní)

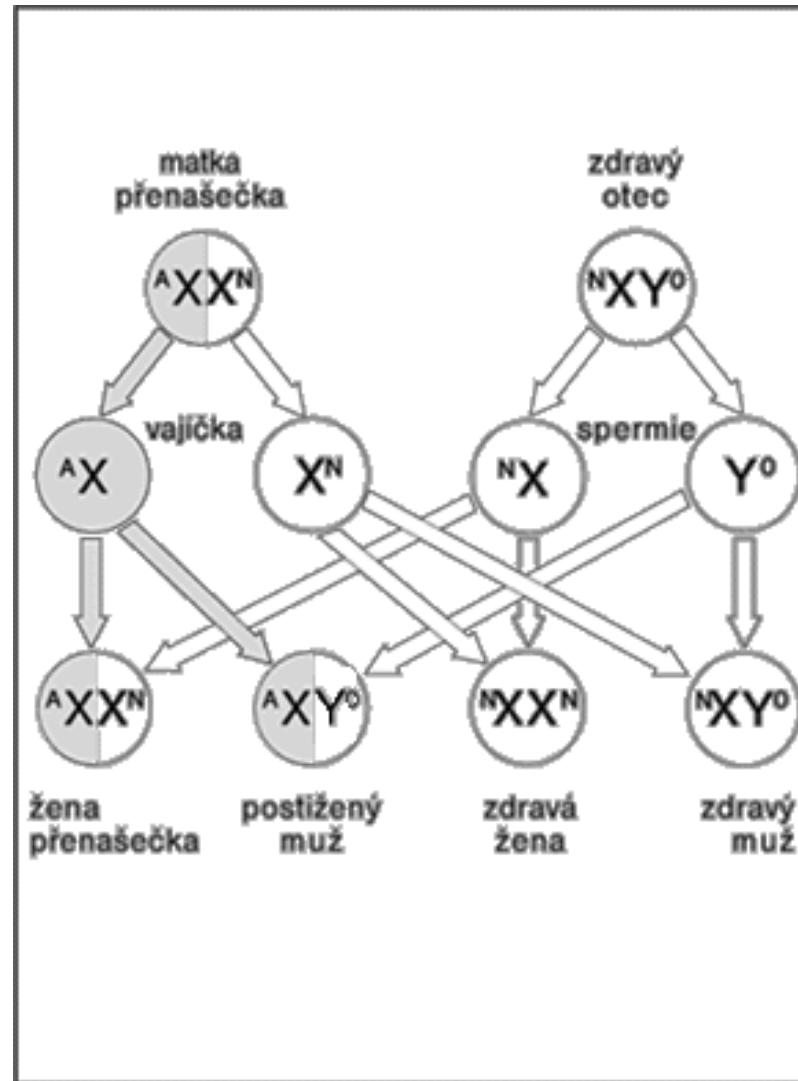
- Dědí se tak naprostá většina DPM např. PKU
- Onemocnění se projeví pouze u **homozygota** (nositel obou defektních alel pro daný znak)
- **Heterozygot** je klinicky zdravý jedinec, je přenašečem defektního genu



Dědičnost GR (Gonosomálně recesivní)

- Abnormní gen recesivního typu je vázán **na pohlavní chromozom X**
- **Klinicky se projeví jen u mužů**
(mají jeden X chromozom, ženy mají XX)
- Je-li postižen jeden z rodičů, pak jsou
 - muži buď zdraví, nebo trpí chorobou
 - **ženy mohou být z 50% přenašečky**

Příklady:
mukopolysacharidóza
Hunterova, glykogenóza typ VIII



Maternální typ dědičnosti

- Přestože mitochondriální DNA (mtDNA) má zanedbatelný objem proti jaderné DNA, mutace v mtDNA mohou způsobit závažné choroby

1) Veškeré mitochondrie zdědí každý jedinec výhradně **po matce** (mitochondrie zygoty jsou totiž všechny původem z vajíčka, všechny mitochondrie spermie zanikají).

2) V každé buňce je okolo **1000 mitochondrií** - jedna mitochondrie s mutovanou mtDNA tudíž na buňku nemá žádný vliv. Zda se mutace v mtDNA nějakým způsobem projeví na úrovni buňky nebo celého organismu závisí na tom, **kolik procent mitochondrií** má mutovanou genetickou informaci.

Dělení DMP dle postižené metabolické dráhy

- Dědičné metabolické poruchy typicky zahrnují poruchy metabolismu:
- **poruchy metabolismu organel**
 - mitochondriální onemocnění
 - peroxizomální onemocnění
 - lysozomální onemocnění
 - poruchy glykosylace (vázané na endoplazmatické retikulum)
- **poruchy metabolismu primárně nevázané na organely**
 - poruchy metabolismu aminokyselin
 - organické acidurie
 - poruchy metabolismu sacharidů včetně glykogenóz
 - poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů
 - poruchy metabolismu lipidů
 - porfyrie
- jiné DMP

Klasifikace DMP

1. Podle rychlosti nástupu klinických příznaků
2. Podle jednotlivých metabolických systémů
3. Podle subcelulární lokalizace změněného proteinu
4. Podle typu molekul
5. Podle analytické metodiky používané pro průkaz DPM

1. Podle rychlosti nástupu klinických příznaků – onemocnění:

- **akutní** metabolická
- s intermitentním průběhem
- **chronické**

2. Podle jednotlivých metabolických systémů – poruchy metabolismu

- **aminokyselin**
- **sacharidů**
- **lipidů**
- **purinů a pyrimidinů**
- **vysokomolekulárních látek**
- **barviv atd.**

3. Podle subcelulární lokalizace změněného proteinu :

- **cytosolové**
- **mitochondriální**
- **lysozomální**
- **peroxisomální**
- **Golgiho aparátu**
- **iontových kanálů atd.**

4. Typ molekul:

- **nemoci malých molekul**
- **nemoci komplexních molekul**

1) Klinika DMP

- Projevy - v kterémkoliv věku od narození až do dospělosti
- Manifestace - pestrá, od mírných chronicky probíhajících forem až po akutní život ohrožující stavy
- Závažnost se odvíjí od stupně postižení změněného proteinu (např. aktivita enzymu 0-20%)

Klinické příznaky DMP

- **Nespecifické** - těch je většina (poruchy svalového napětí, poruchy chování, poruchy vědomí, křeče, neprospívání, zvracení, postižení funkce srdce, svalů, jater, ledvin...
- **Specifické** - např. typický abnormální zápach moče, potu..., ektopie čočky a trombembolické příhody

Laboratorní nespecifické nálezy

- Acidóza (např. laktátová při deficitu PDH)
- Alkalóza (např. deficit OTC-ornitinkarbamoyltransferáza)
- Hypoglykémie
- Hyperamonémie
- Hypoketóza (s hypoglykémií u poruch β oxidace)
- Hyperketóza (u některých org. acidurií)
- Hypourikémie/hyperurikémie (porucha met.purinů)
- Hypocholesterolémie/hypercholesterolémie (deficit 7-dehydrocholesterolu tzv. Smith-Lemli-Opitzův sy)

1_1. Akutní metabolická onemocnění

- **Začátek:** obvykle v časném novorozeneckém či raném kojenecké období
- **Projevy:** respirační selhání, sepse, křeče, poruchy vědomí, protrahovaná žloutenka, rozvíjející se RDS či DIC atd.
- **Příklady:** poruchy metabolismu AMK, galaktózy, ureageneze, organických kyselin, β oxidace mastných kyselin

1_2. Metabolická onemocnění s chronickým průběhem

- **Charakteristika:** střídání bezpříznakových období s atakami, které se typicky objevují po zátěži např. změna výživy (bílkovinná zátěž), horečnaté období (zvýšená energetická potřeba organismu v průběhu katabolismu)...
- **Příklady:** pozdní formy deficitu OTC (ornitinkarbamoyltransferáza -porucha močovinového cyklu), některé poruchy β oxidace MK

1_3. Chronicky progredující metabolická onemocnění

- **Charakteristika:** zpočátku normální psychomotorický vývoj se po určitém období zastavuje případně dochází k jeho regresi
- **Příklady:** strádavá onemocnění (mukopolysacharidózy, neurodegenerativní onemocnění...)

4) Dělení DMP podle projevů DMP

Zásadní rozdíl v **povaze metabolitů, které způsobují klinické projevy onemocnění**, umožňuje dědičné metabolické poruchy rozdělit do dvou skupin:

- **nemoci malých molekul**
- **nemoci komplexních molekul**

Fenotypové projevy u dvou jedinců se stejným genotypem se mohou lišit v důsledku **dalších faktorů** jako je vliv prostředí (dieta, životní styl u nemocí malých molekul) či jako jsou např. epigenetické změny, epistáze (interakce s alelickými variantami v jiných genech), inaktivace X-chromozomu (lyonizace).

4_1_Nemoci malých molekul

jsou způsobeny

- hromaděním malých toxických molekul (**amoniak, organické kyseliny**)
- **nedostatkem** žádoucích metabolitů (**ketolátky, glukóza**), které vznikají katabolismem látek přijímaných potravou (aminokyseliny bílkovin, **sacharidy**, mastné kyseliny).
- 1) Typicky se **onemocnění manifestuje v novorozeneckém věku v průběhu několika hodin či dnů**, k nevyvážené koncentraci toxických molekul dojde po **zvýšeném přísunu zdroje v potravě či při horečnatých infektech**, a to atakovitě, jako akutní stav se **změnou chování až přechodem do kómatu** (např. *hypoketotické kóma u deficitu MCAD-Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD)*).
- Ataky se mohou dostavit opakovaně, ve spojení se specifickou situací, se kterou si ji pacient spojuje (*dlouhé hladovění nebo naopak náhlé přejídání*).

2) Některá onemocnění se ovšem mohou od tohoto schématu lišit a mívají i subakutní či chronickou formu a postihují i jiné orgány než jen **CNS**.

4_2_Nemoci komplexních molekul

- Nemoci velkých molekul vznikají defektem v metabolismu (porucha tvorby, transportu látek, ale také v jejich odbourávání) endogenně tvořených makromolekul (**glykosaminoglykany, glykolipidy, glykoproteiny a jiné**).
- Některé tyto látky tvoří stavební části buněčných membrán, což se pak projeví defektem tohoto typu, jiné jsou odbourávány v **peroxisomech** a **lysozomech**, v nichž se pak mohou hromadit. To **trvá řádově měsíce až roky, nemoc probíhá bez atak a zřejmých krátkodobých nutričních či infekčních souvislostí, má chronický charakter**, který se manifestuje až po uběhnutí latentní fáze, během níž se nahromadilo dostatek makromolekul, aby se defekt projevil na úrovni funkce.
- Nemoci, při nichž se **hromadí makromolekuly v peroxisomech či lysosomech**, mohou imitovat **neurodegenerativní** či nádorová onemocnění.
- Nemoci, při nichž dochází k membránovým defektům, zase **chromozomové aberace**, a to příznaky jako organomegalie, dysmorfie hlavy a obličeje, postižení CNS a jiných orgánů.

Příklady nejznámějších DMP

- Poruchy metabolismu AMK
- Organické acidurie
- Poruchy metabolismu sacharidů
- Poruchy metabolismu lipoproteinů
- Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů
- Poruchy metabolismu vysokomol. látek

Diagnostika DMP

Laboratorní diagnostika DMP - na několika úrovních:

- **Prenatální diagnostika** - vyšetření ke zjištění, zda je plod postižen DMP, která byla prokázána v rodině - jen odůvodněné případy (AFP, vada v rodině)
- **Postnatální diagnostika** - *novorozenecký screening* (PKU, hypothyreosa aj.)

Většinu DMP lze diagnostikovat prenatálně -

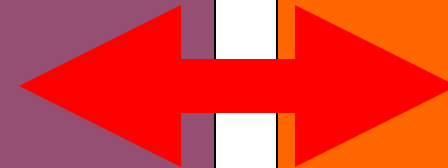
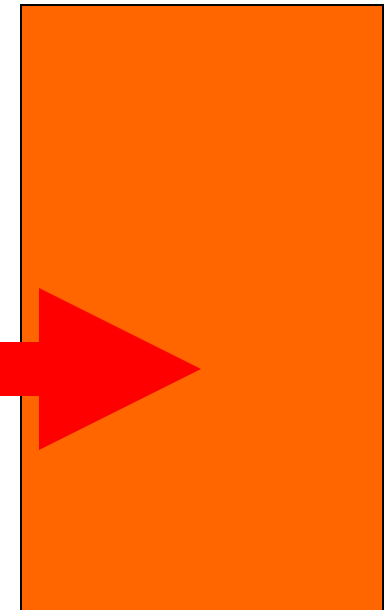
analýzou enzymové aktivity nebo mutací v choriových klcích či amniocytech, nebo vyšetřením metabolitů v plodové vodě.

- Včasná diagnostika – **léčba, kompenzace**

Metabolická příručka, Laboratorní příručka Diagnostických laboratoří
Ústavu dědičných metabolických poruch

VFN a 1. LF UK - udmp.lf1.cuni.cz/file/5673/Metabolická%20příručka%20verze%2002.pdf

Laboratorní diagnostika DMP



Příznaky
specifické-např.
zápach
barva moči
nespecifické-např.
koma
PMR
dysmorfie
hepato/myopathie
další

DNA/RNA

Enzymologie

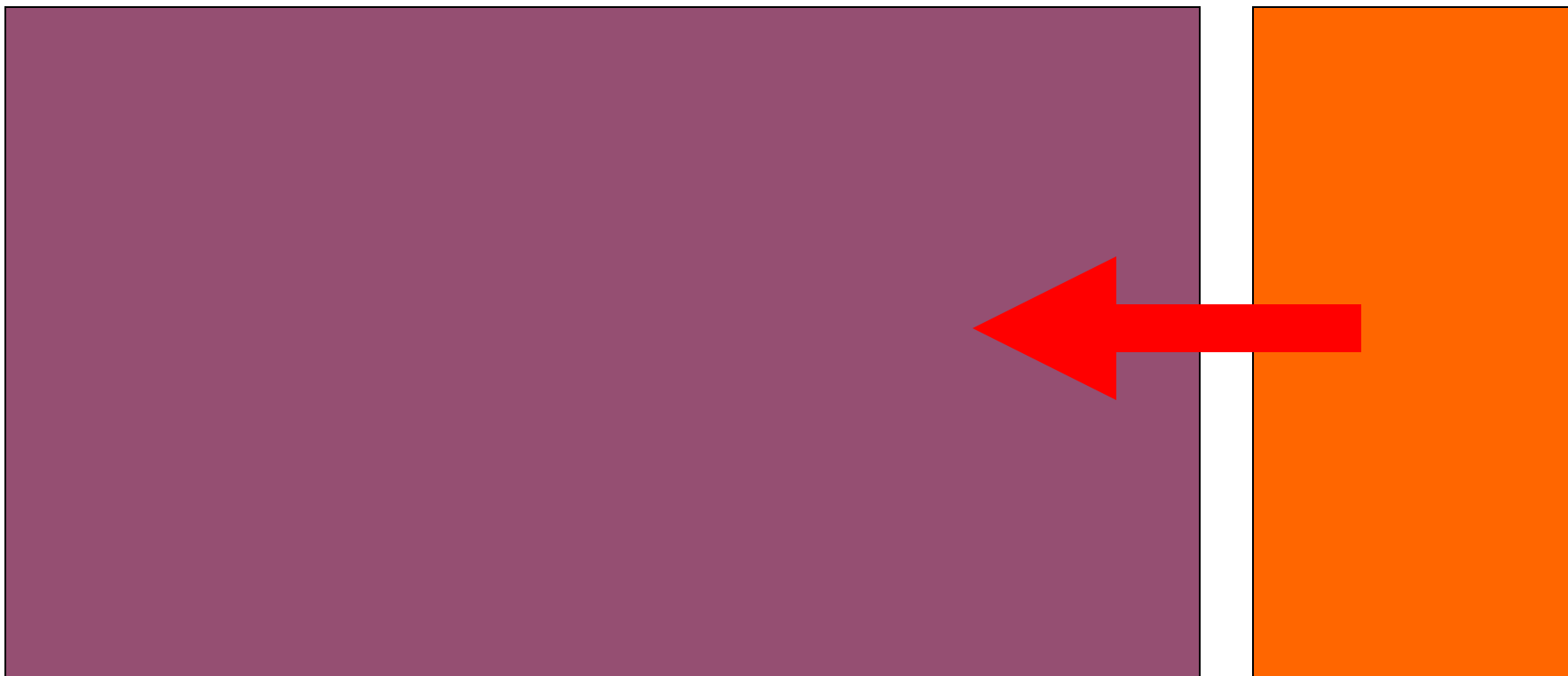
Metabolity

1. na úrovni metabolitů
2. na úrovni enzymů
3. na molekulární úrovni

Parabiochemie 2020

TEST

Diagnostika symptomatická



DNA/RNA

screening
scanning

Sekvenování

NGS (celogenové
Sekvenování)

Enzymologie

leuko/lymfo
fibro
sval

Metaboly

analyt
profil analytů
moč/krev/likvor
METABOLOMIKA

Příznaky

specifické
nespecifické

koma
PMR

dysmorfie

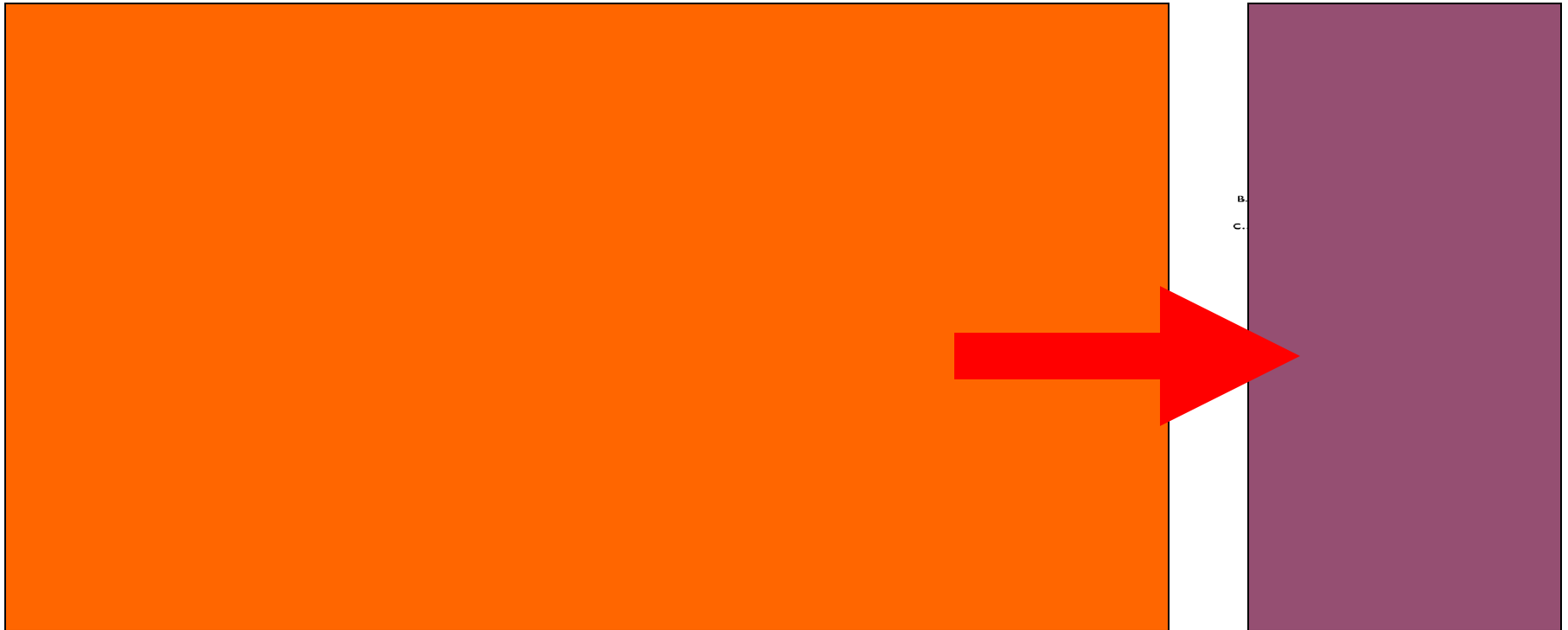
hepto/myopathie

V diagnostice **DMP** se stejně jako v jiných oblastech medicíny uplatňují nové biotechnologie založené na komplexní analýze biologického materiálu a generující poměrně značné množství heterogenních dat. Jedná se zejména o metody stanovení velkého spektra metabolitů – metabolomiky a sekvenování nové generace. Zaváděním těchto metod do klinické praxe vznikají etické problémy, které nejsou zcela nové a byly do určité míry popsány již dříve, např. u genetických vyšetření či zobrazovacích metod. U metabolomických metod a sekvenování nové generace je ovšem unikátní rozsah, daný právě značným objemem generovaných dat a jejich komplikovanou interpretací.

Pro diagnostiku **DMP** se standardně používá řada profilových vyšetření, a jedná se tedy o cílenou metabolomiku. Příkladem jsou vyšetření organických kyselin v moči pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (jednou analýzou jsou vyšetřeny stovky metabolitů), vyšetření profilu aminokyselin (v séru, moči či likvoru) detekující okolo šedesáti různých látek či vyšetřování desítek různých metabolitů pomocí vysoce citlivé tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS).

Druhou progresivní metodou je sekvenování nové generace (NGS), které umožňuje vyšetřit veškerou genetickou informaci jedince (sekvenování celého genomu), informaci kódujících oblastí genomu (sekvenování exomu) či informaci panelu předem vybraných genů (typicky desítky až stovky genů v jedné analýze). U NGS se získaná data v různé míře filtrují a množství interpretačních obtíží vzrůstá přímo úměrně s rozsahem vyšetřené oblasti. Při sekvenování panelu genů se lze zaměřit pouze na relevantní výsledky, které mají vztah ke konkrétní diagnóze. Podstatně složitější situace nastává, jsou-li tyto metody užity u presymptomatických jedinců nebo při vyšetřeních pacientů, u nichž je etiologie onemocnění neznámá a NGS se použije jako diagnostická metoda. V těchto případech je jisté, že budou generovány neočekávané nálezy nesouvisející s hlavním důvodem vyšetření. Některé z neočekávaných nálezů

Diagnostika presymptomatická



vyšetření příbuzných s rizikem DMP
prenatální diagnostika

screening segmentu populace

novorozenecký screening

jedna nemoc nebo skupina
předem známých nemocí

Základní situace s rozdílnou diagnostikou pro DMP

- **DMP malé molekuly**

- akutně nemocný novorozenec
- (opakovaná) ataka dlouhotrvajícího bezvědomí
- neprospívání kojence
- hypoglykémie

- **DMP velké molekuly**

- progredující postižení CNS a svalstva
- dysmorfie obličeje
- organomegalie (játra, slezina, srdce)

Abnormální zápach a barva moči

- zápach (malé těkavé molekuly):
 - z pocené nohy-isovalerát
 - karamel/javorový sirup-oxokyseliny
 - vařené zelí-methionin oxid
 - rybina-trimethylamin
 - černý rybíz- některé organické kyseliny
 - myšina-fenylacetát
- zbarvení
 - červenooranžové-uráty
 - černohnědé při oxidaci-homogentisát
 - modré-indoxalové deriváty
 - zelené-4-OH-butyrát

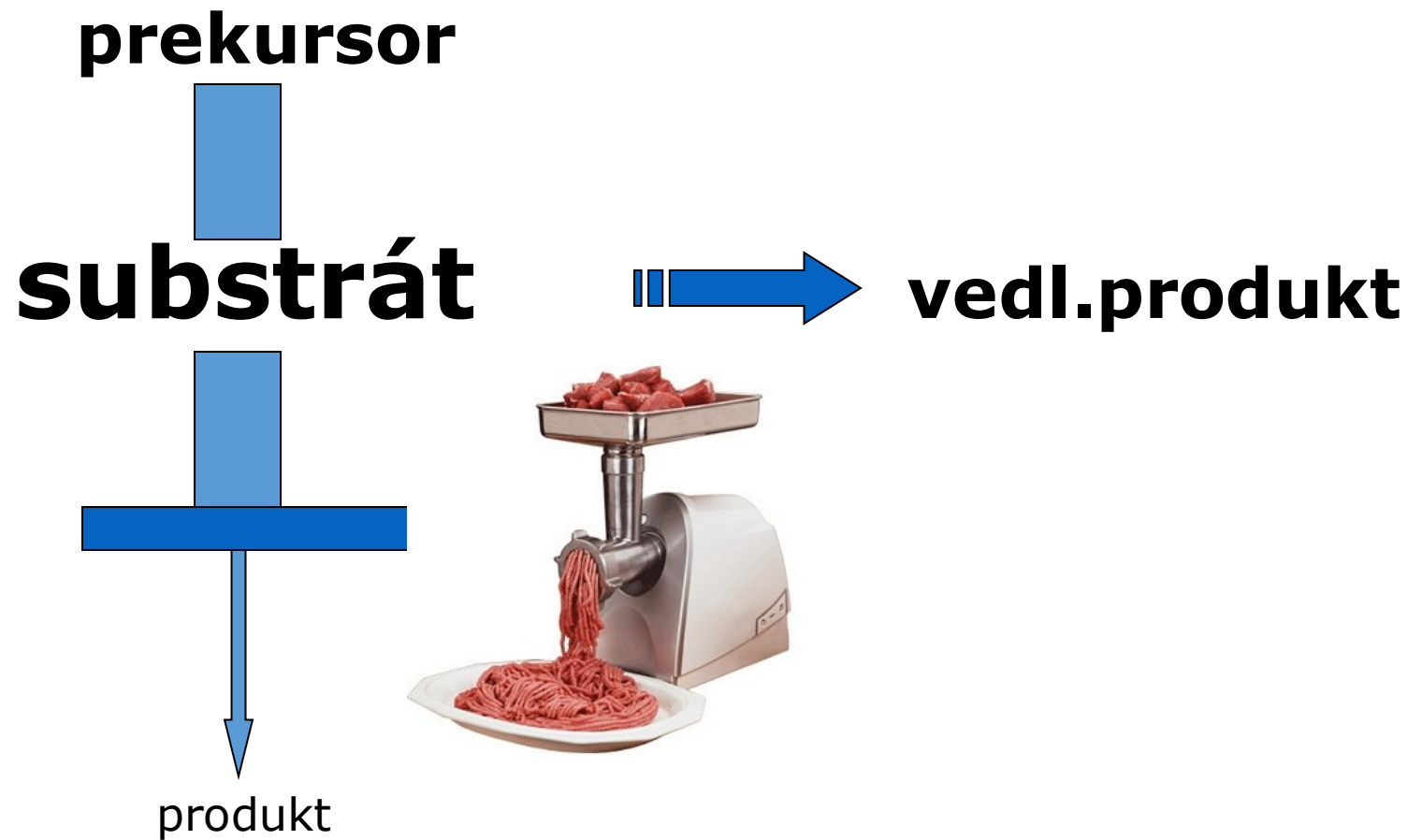


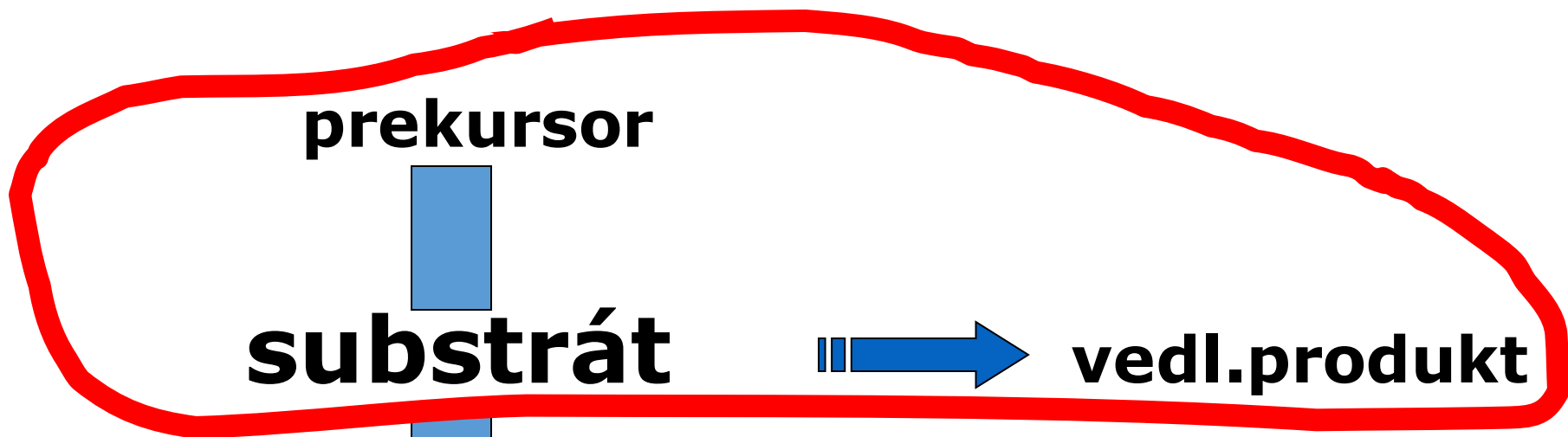
1. Diagnostika na úrovni metabolitů (biochemické vyšetření)

- **Charakteristika:** prokazujeme změněnou koncentraci nějakého metabolitu (substrát, produkt, abnormní metabolit).

Nejstarší,nejjednodušší,nejrozšířenější.

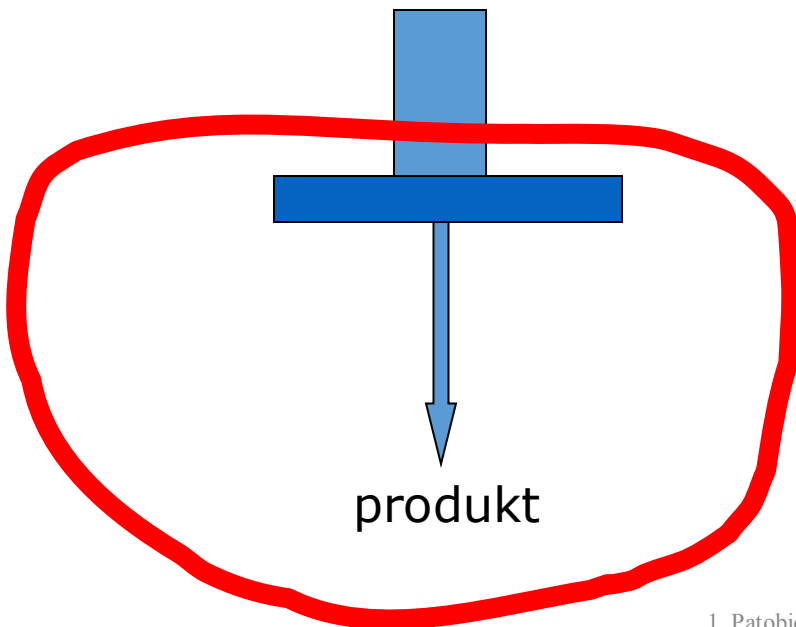
- **Užití:** všude tam, kde defektním proteinem je enzym či transportní protein → v místě metabolického bloku **dochází k hromadění substrátu a nedostatku produktu, případně k tvorbě jiných metabolitů** v důsledku aktivace alternativních metabolických drah
- **Materiál:** sérum či plazma, moč, likvor, plná krev v podobě suché krevní skvrny na filtračním papírku





Příklady:

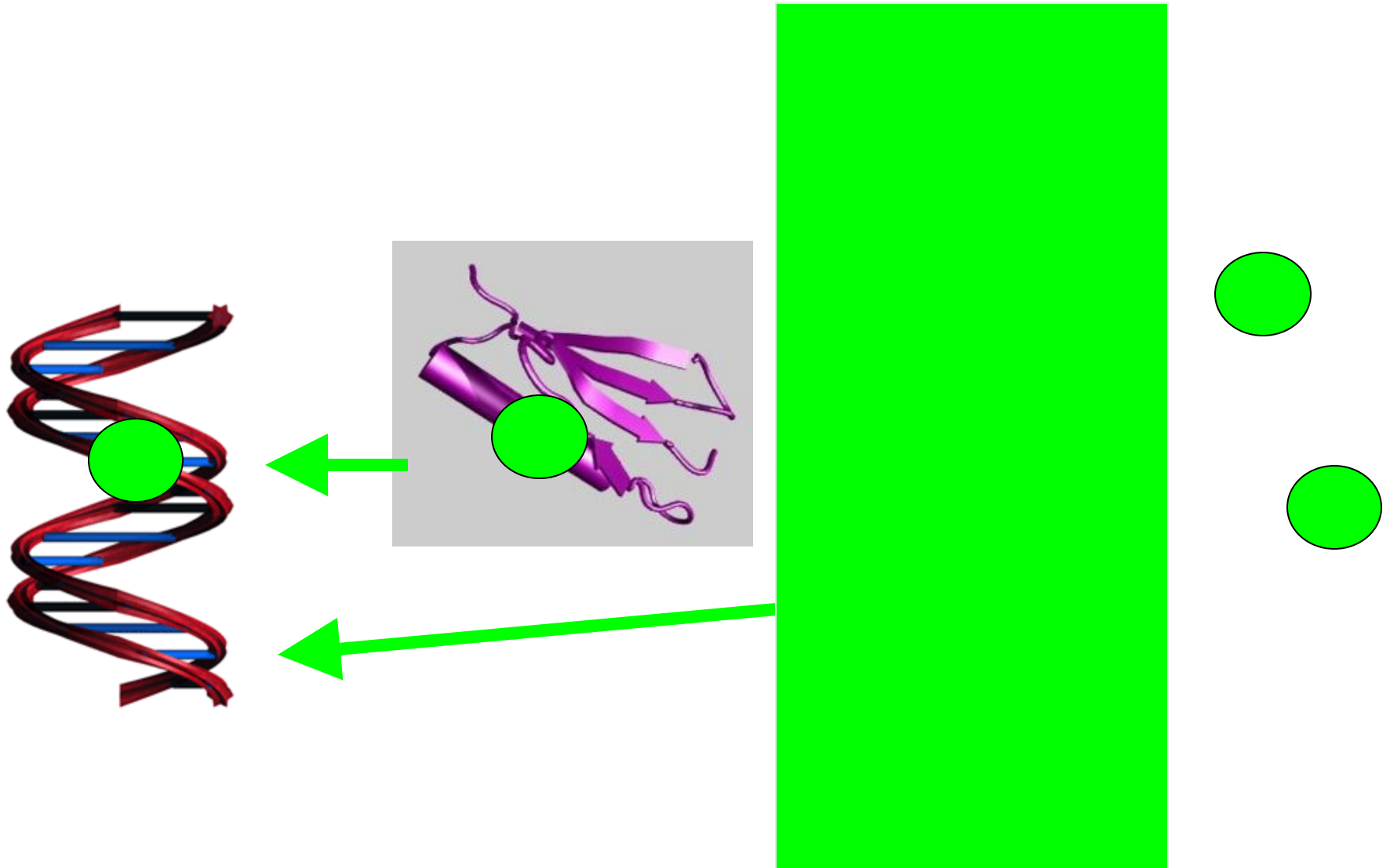
- Phe a Phe-deriváty
- amoniak
- cystin u cystinosy
- cystin u cystinurie
- mukopolysacharidy



Příklady:

- glukosa u GSD
- ketolátky u poruch beta.oxidace MK
- plasmalogeny u peroxisom.poruch
- cystein u deficitu CBS
- AdoMet u RM
- ATP u mitochondriálních nemocí

DMP- diagnostika metabolitů



1.Diagnostika na úrovni metabolitů – pokračování – vyšetřovací metody

- **Vyšetřované metabolity:** AMK, sacharidy, oligosacharidy, glykosaminoglykany, puriny, pyrimidiny, lipidy, steroidy atd.

- **Používané laboratorní techniky:**

chromatografie - papírová

- tenkovrstvá

- kapalinová (iontoměničová, vysokoúčinná HPLC)

- plynová (s hmotnostní spektrometrií GC/MS)

elektromigrační techniky

- elektroforéza

- kapilární elektroforéza

tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS

Běžné laboratorní nálezy u DMP

Krev

- glykemie
- cholesterol
- TG
- kys.močová
- MAc
- hyperamonemie, RAIk
- ALT, AST
- CK
- anemie/pancytopenie

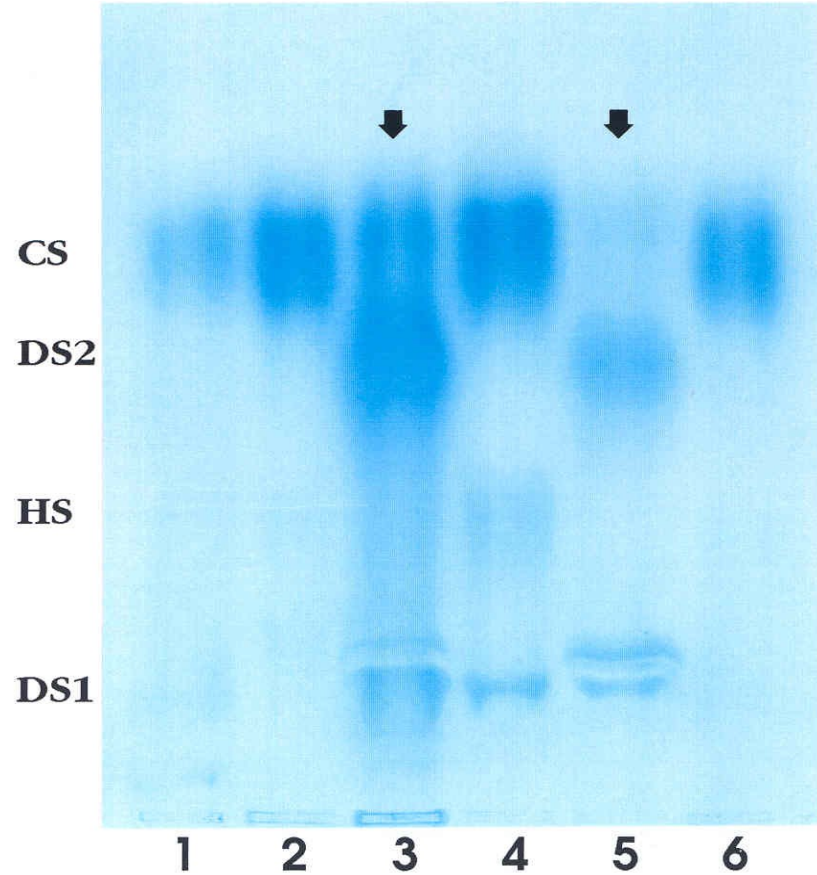
Moč

- ketolátky
- kys.močová
- krystalurie
- myoglobinurie

MPS I – Hurlerova choroba (deficit α –iduronidasy)



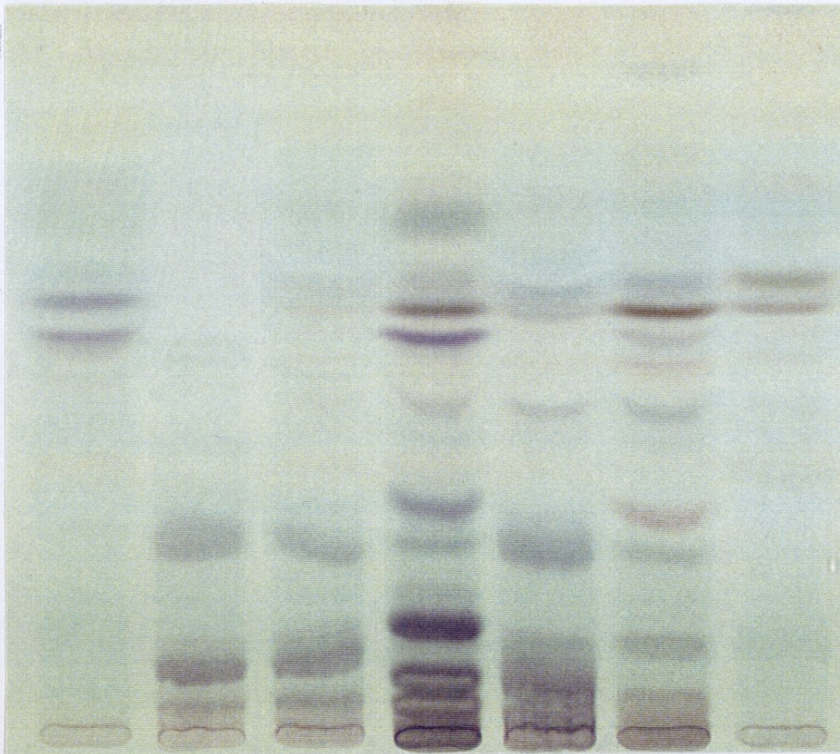
MPS I in a 6-year-old girl



Electrophoresis of urinary GAGs
(*excretion of dermatan sulphate/DS and heparan sulphate/HS*)

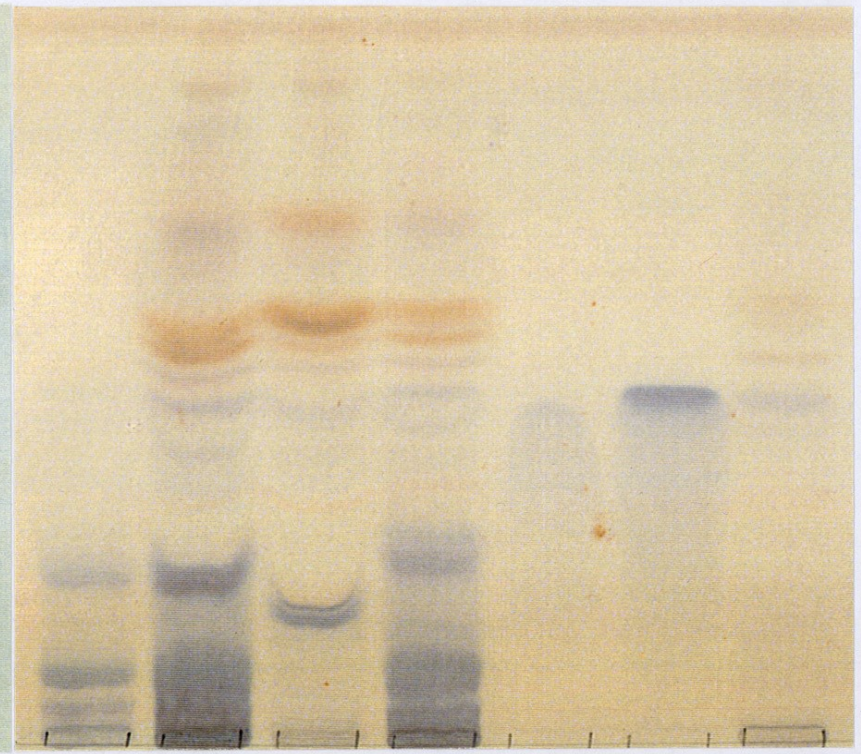
Glykoproteinosy – HPTLC oligosacharidů v moči

ORCINOL



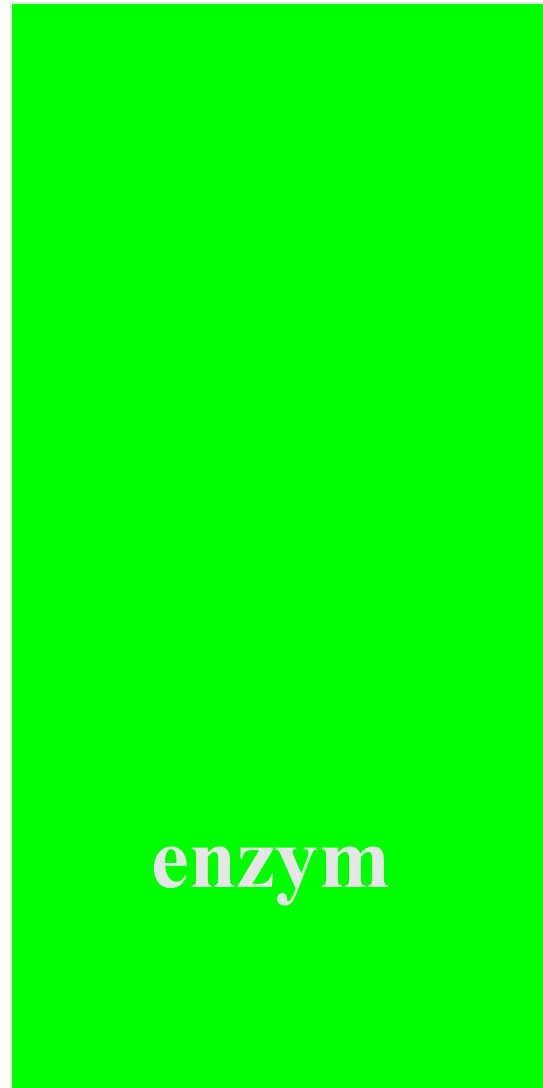
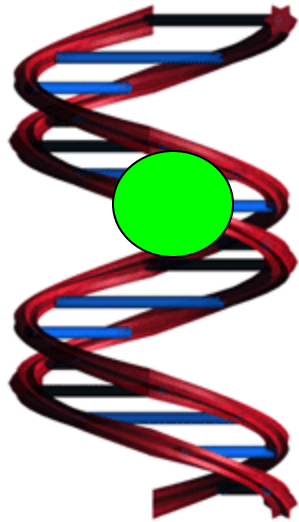
KO Sial P1 GM1 P2 Fuc KO

RESORCINOL

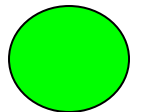
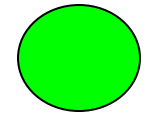
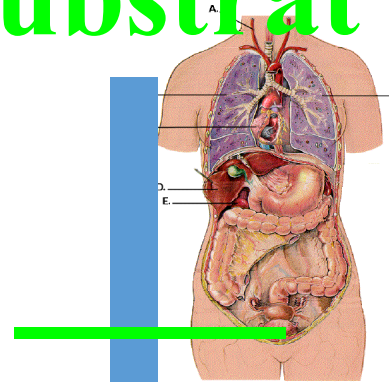


Sial P2 Sch P1 NANA KO

Diagnostika DMP - enzymů



Substrát



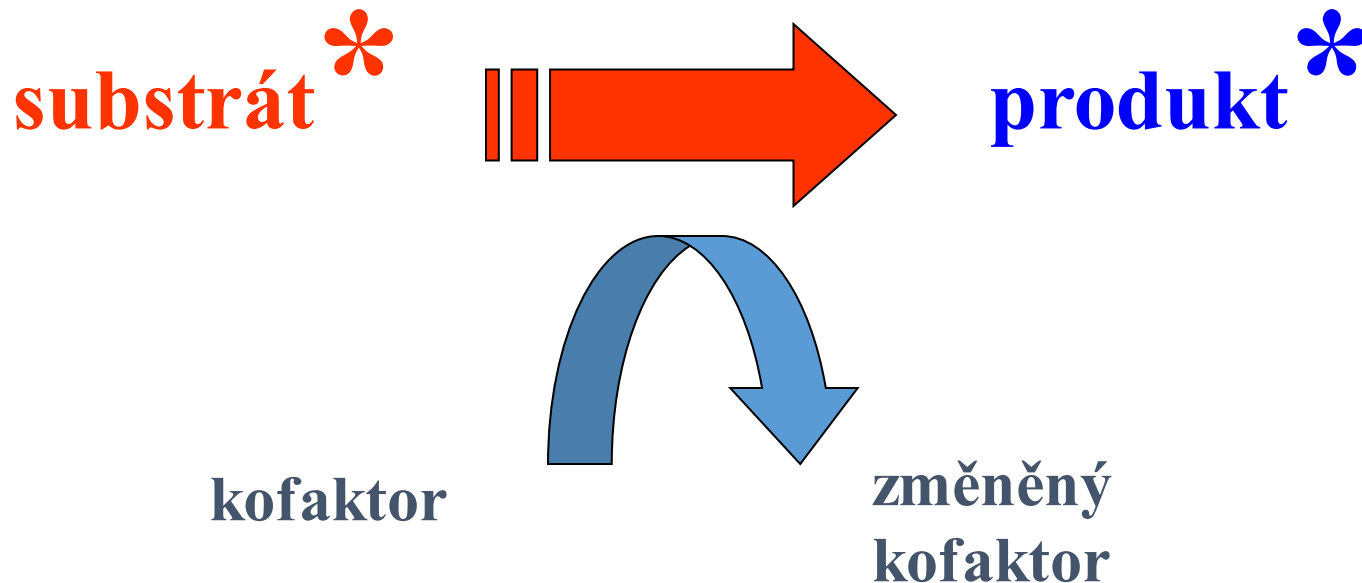
produkt

2. Diagnostika na úrovni enzymů

- **Charakteristika:** prokazujeme sníženou aktivitu postiženého enzymu. Vyšetření je náročnější (ekonomicky nákladnější, často větší zátěž pro pacienta – odběr materiálu).
- **Užití:** v prenatální diagnostice, pro potvrzení příslušné DPM, obvykle mu předchází vyšetření na úrovni metabolitů
- **Materiál:** leukocyty, erytrocyty a trombocyty izolované z periferní krve, sérum nebo plazma, kultura kožních fibroblastů, tkáň ze svalové či jaterní biopsie

Principy enzymologického vyšetření

- separace **substrátu** a **produktu**
- kvantifikace přírůstku či úbytku



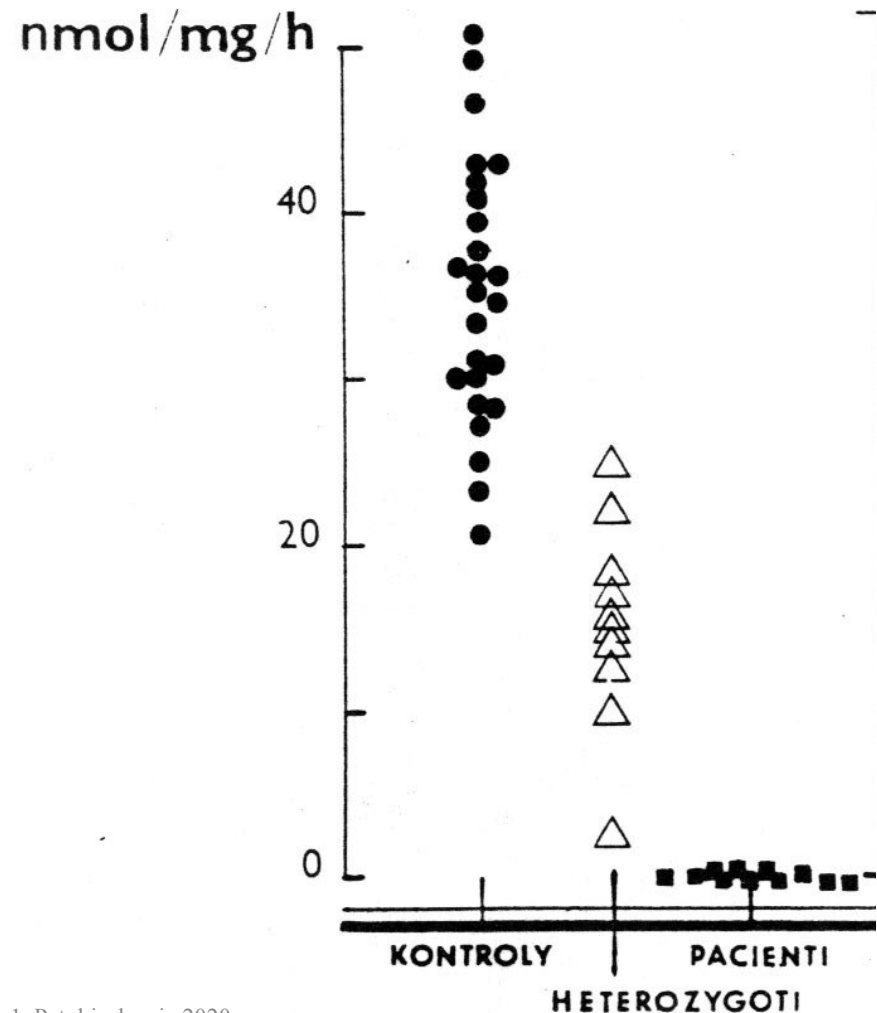
- kvantifikace přírůstku či úbytku

Stanovení enzymů u DMP

- **Obvykle nutné buňky**
- **Leukocyty, fibroblasty**
- **Tkáně plodu a obalů plodu**
- **Techniky fluorimetrické a radiometrické (event. fotometrické)**
- **Měřený parametr: úbytek substrátu nebo tvorba produktu**

Typické výsledky enzymologie

- Postižení homozygoti jasně deficitní
- Heterozygoti: překryv
- Zdraví homozygoti: obvykle normální rozdělení aktivity v populaci

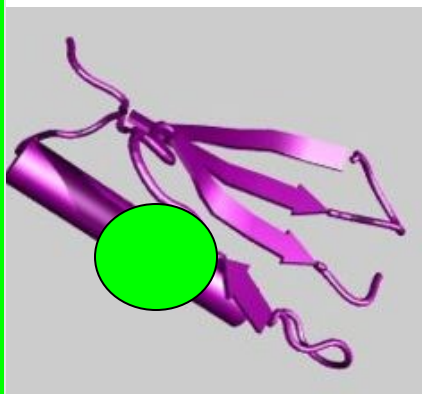


Množství enzymu

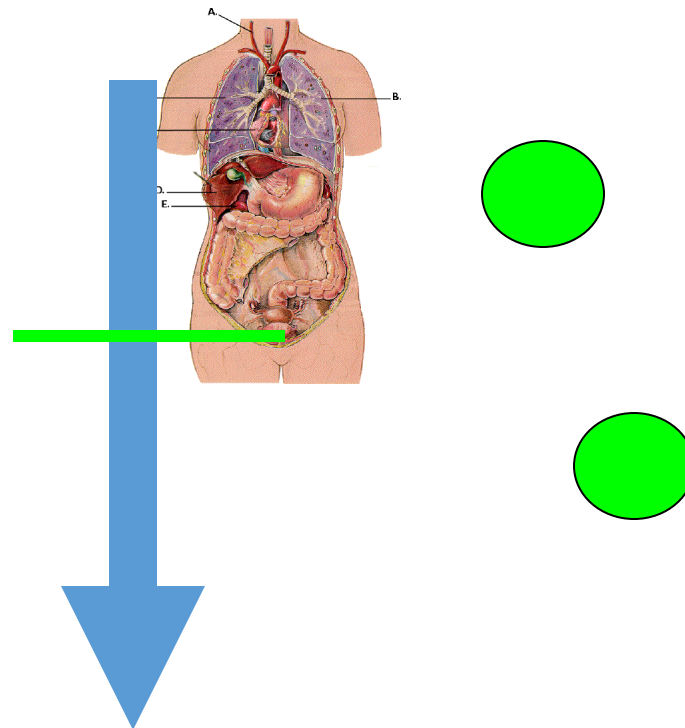
- **katalytická koncentrace enzymu, enzymová aktivita**
- Katal – množství enzymu, které katalizuje přeměnu 1 mol substrátu za 1s, za definovaných podmínek (T, pH, nasycení mol. Enz S)
- mkatal/l (na 1 L vyšetřované tekutiny)
- dříve mezinárodní jednotka U/IU (
- přeměna 1mmol S za 1min)
- mkatal/l = 60 U/l
- **Imunochemické stanovení enzymů**
- Specifická protilátka, neměří aktivitu enzymu
- mg/l

Molekulární diagnostika DMP

DNA



Substrát

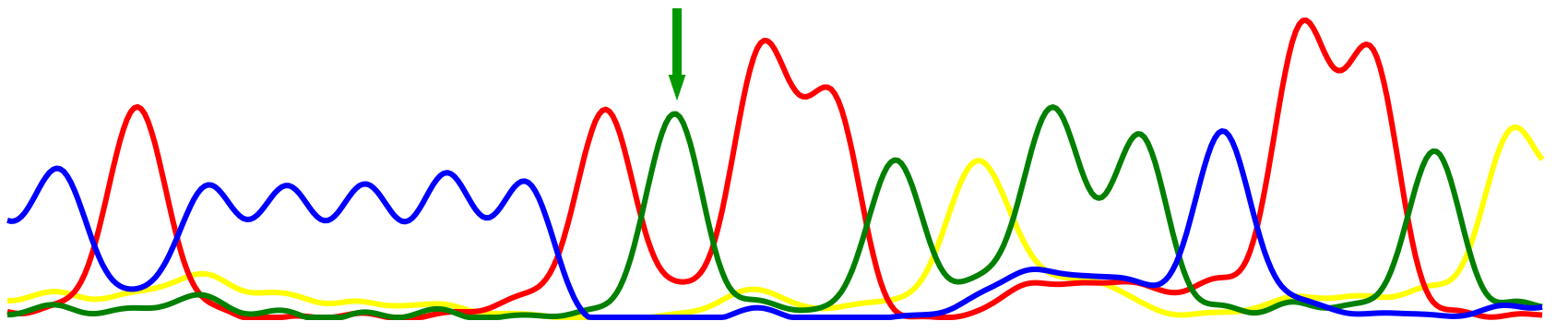
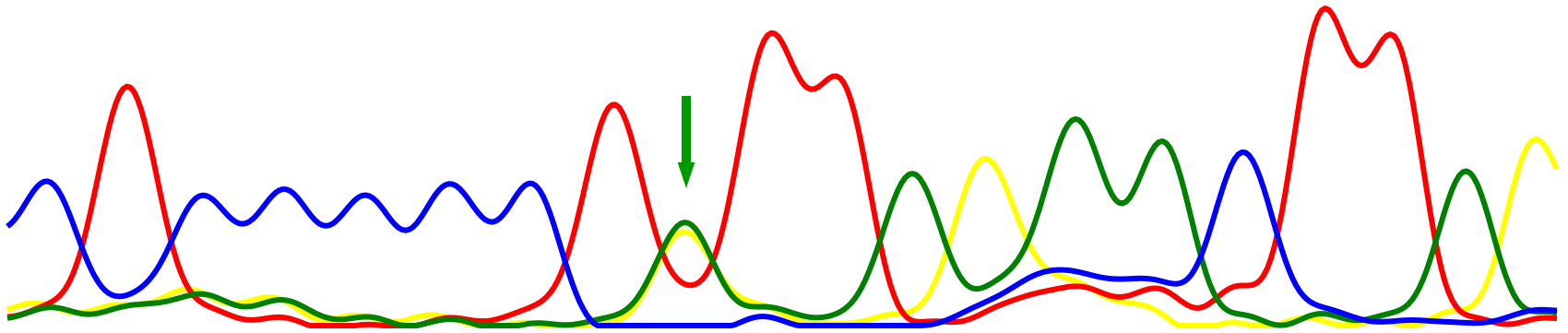
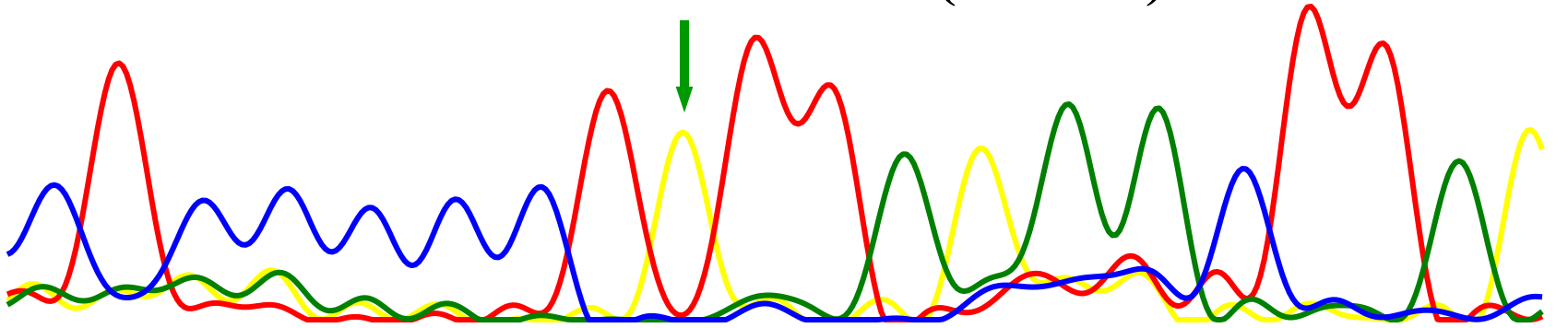


produkt

3. Diagnostika na molekulární úrovni

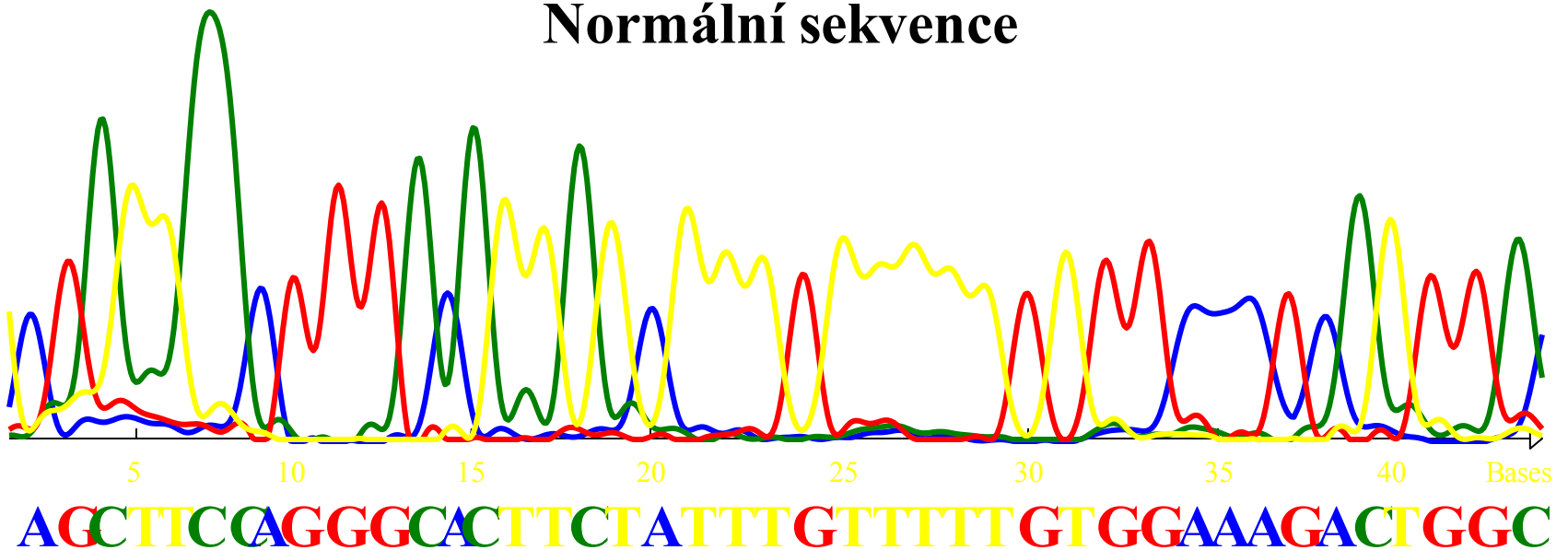
- **Charakteristika:** diagnostika na úrovni DNA prokazuje přímo defektní gen. Ekonomicky nejnákladnější, indikovat uvážlivě
- **Užití:** k definitivnímu potvrzení diagnózy tam, kde tak nelze jednoznačně učinit na základě vyšetření metabolitů či enzymů, dále v genetickém poradenství
- **Materiál:** leukocyty z periferní krve, buňky z plodové vody získané amniocentézou, buňky choriových klků získané biopsií placenty

OTC: Mutace c. 829 C>T (R277W)

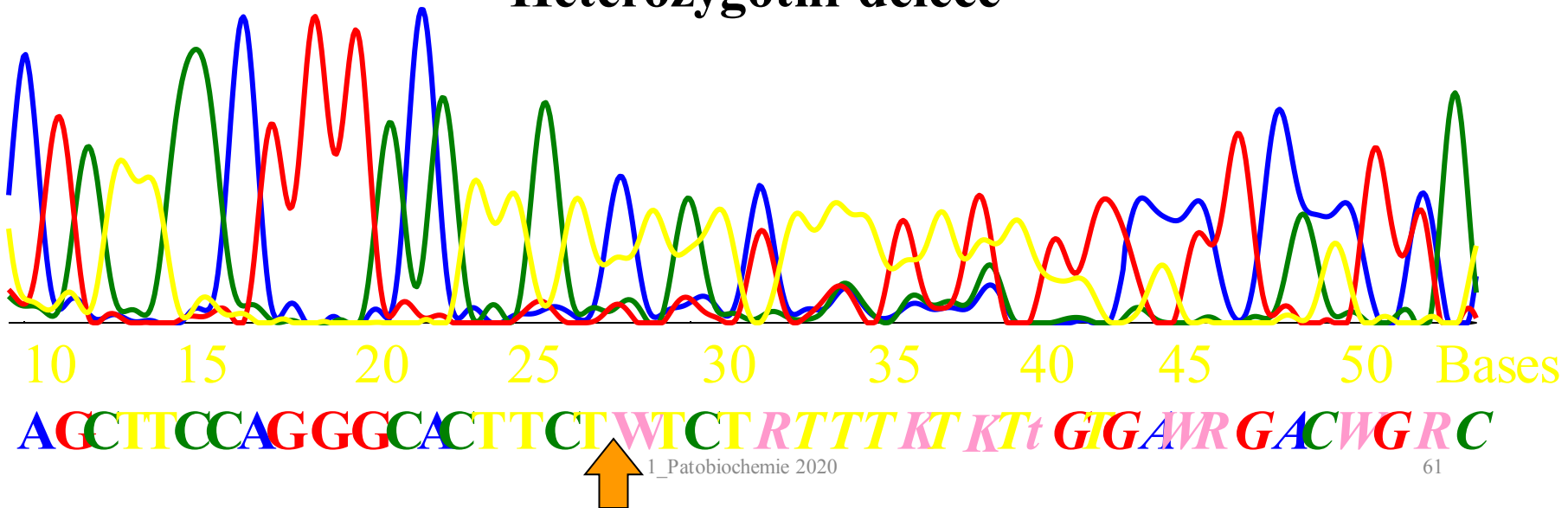


A G A A A A A G T C C A G G C T

Normální sekvence



Heterozygotní delece



- **Novorozenecký laboratorní screening**



- **Hyperfenylalaninémie, fenylketonurie**

- **Novorozenecký laboratorní screening (NLS) je aktivní vyhledávání chorob v jejich časném, preklinickém stadiu** tak, aby se tyto choroby diagnostikovaly a léčily dříve, než se stačí projevit a způsobit nevratné poškození.
- NLS spočívá v diagnostice onemocnění na základě **stanovení koncentrace specifické látky v suché kapce krve na tzv. novorozenecké screeningové kartičce.**
- V ČR se od 1. 6. 2016 vyšetřuje 18 onemocnění:

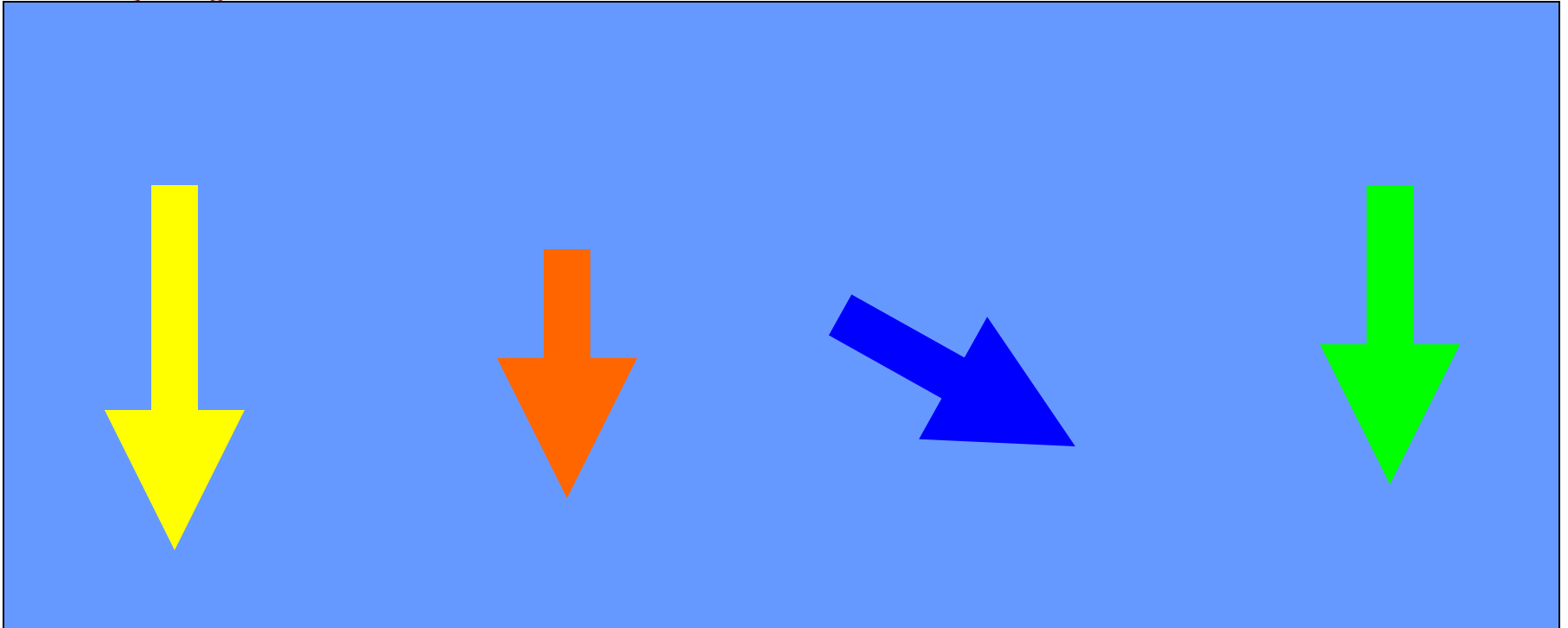
- **snížená funkce štítné žlázy (kongenitální hypotyreóza - CH)**
- **nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinách (kongenitální adrenální hyperplazie - CAH)**
- **porucha tvorby hlenu (cystická fibróza - CF)**
- poruchy látkové výměny aminokyselin
 - **vrozená porucha látkové výměny aminokyseliny fenylalaninu (fenylketonurie – PKU, hyperfenylalaninemie - HPA)**
 - argininémie (ARG); citrulinémie I. typu (CIT); porucha látkové výměny větvených aminokyselin (leucinóza, nemoc javorového sirupu – MSUD); homocystinurie z deficitu cystathionin beta-syntázy (CBS), pyridoxin non-responzivní forma; homocystinurie z deficitu methylenetetrahydrofolátreduktázy (MTHFR); glutarová acidurie typ I (GA I); izovalerová acidurie (IVA)
- dědičné poruchy látkové výměny mastných kyselin
 - deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (deficit MCAD); deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (deficit LCHAD); deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (deficit VLCAD); deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (deficit CPT I); deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (deficit CPT II); deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (deficit CACT)
- dědičná porucha přeměny vitamínů
 - deficit biotinidázy (BTD)

Výsledky novorozeneckého laboratorního screeningu v ČR v roce 2015:

- V roce 2015 se narodilo 110 800 živých novorozenců.
- NLS bylo zachyceno 87 novorozenců s některou ze 13 vyšetřovaných nemocí

Onemocnění	Počet zachycených	Prevalence	Počet pacientů od r. 2010	Prevalence (kumulativní)
CH	36	1 : 3 078	248	1 : 2 669
CAH	10	1 : 11 080	50	1 : 13 236
HPA/PKU	21	1 : 5 276	125	1 : 5 295
MSUD	0	-	1	1 : 661 823
MCADD	4	1 : 27 700	32	1 : 20 682
LCHADD	0	-	10	1 : 66 182
VLCADD	0	-	4	1 : 165 456
CPT I	0	-	0	-
CPT II / CACT	0	-	0	-
GA I	1	1 : 110 800	4	1 : 165 456
IVA	0	-	3	1 : 220 608
CF	15	1 : 7 387	95	1 : 6 967
CELKEM	87	1 : 1 274	572	1 : 1 157

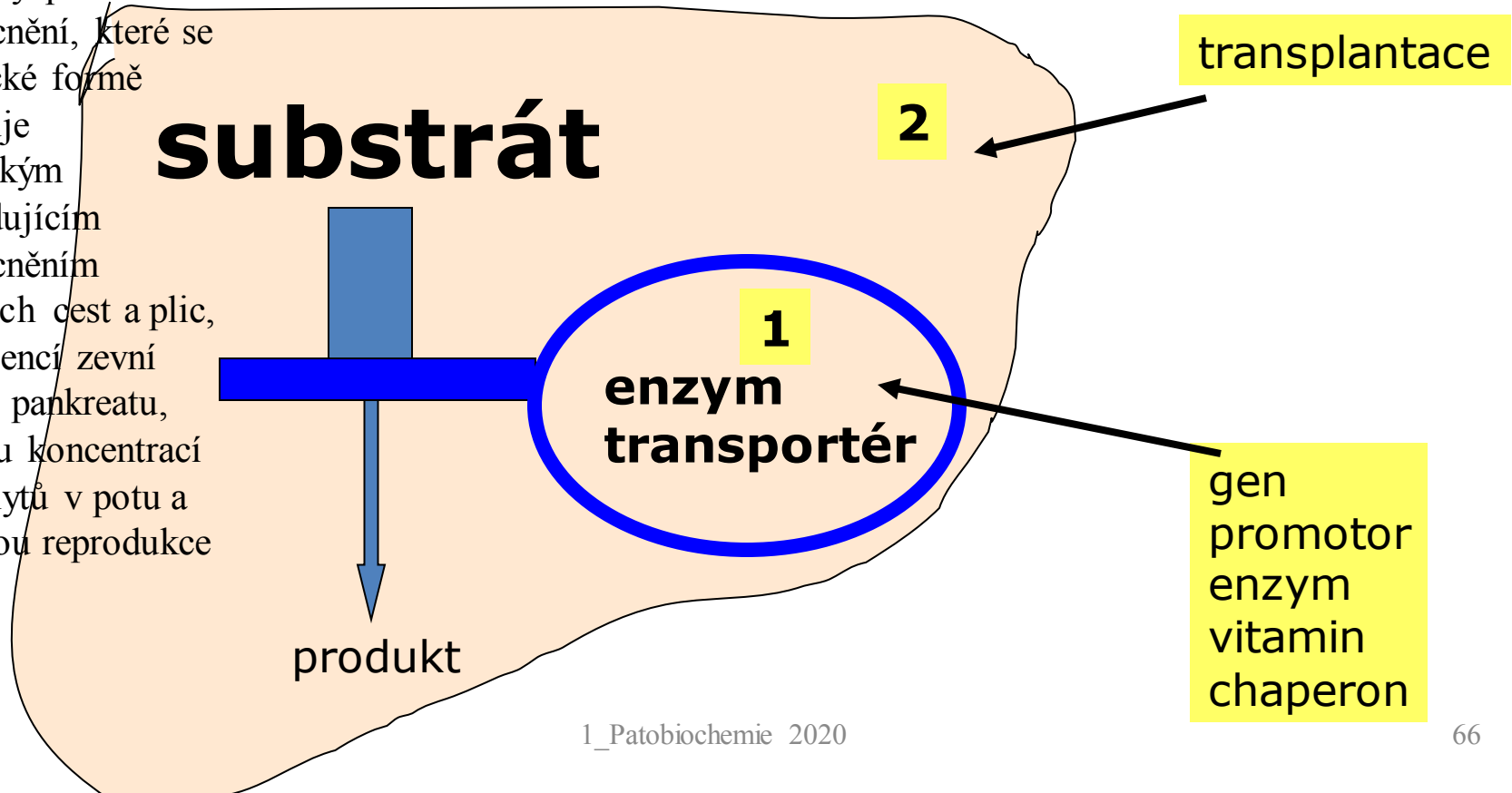
Léčba DMP



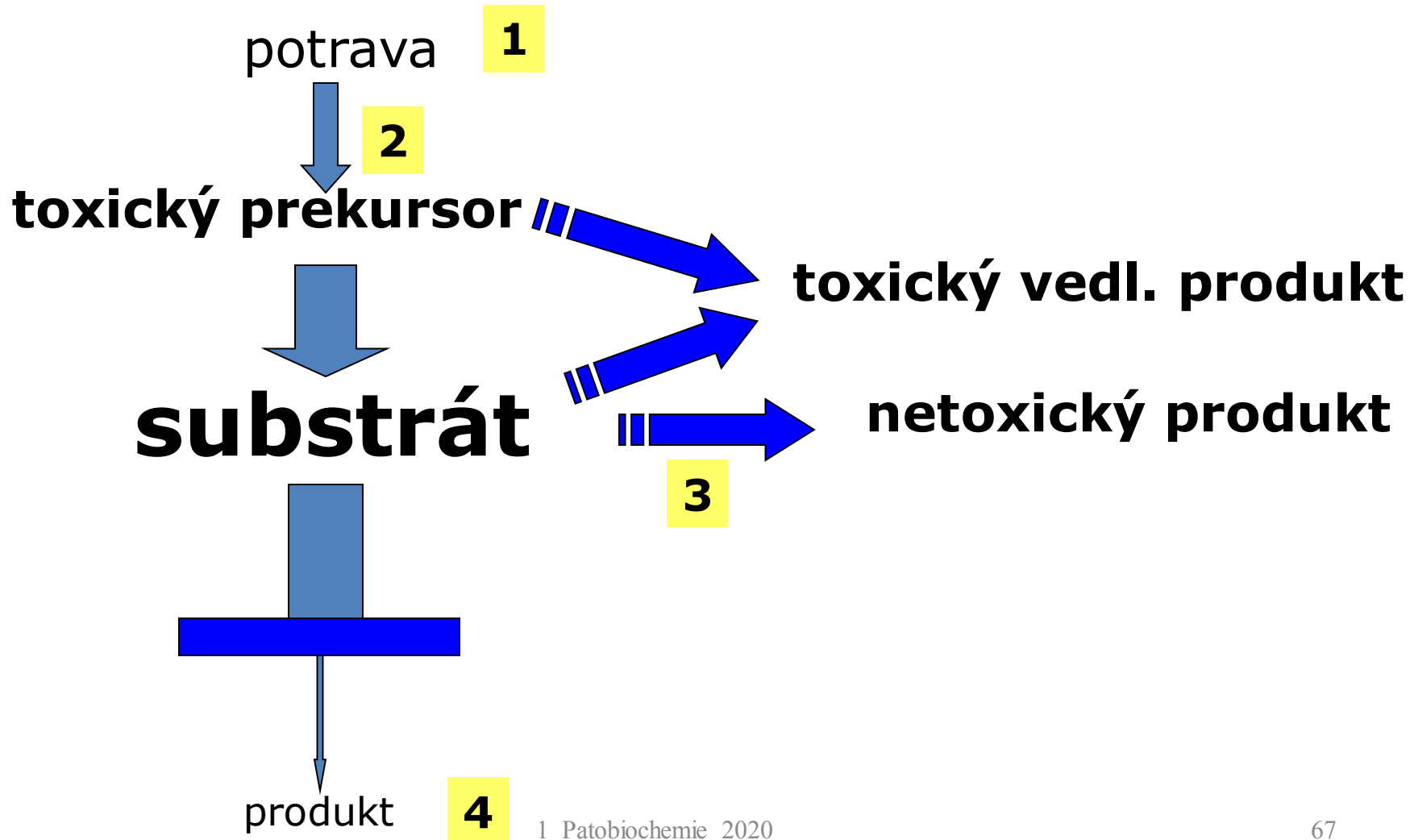
Léčba 1- kauzální

Cystická fibróza (CF) neboli **mukoviscidóza** je multisystémové geneticky podmíněné onemocnění, které se v klasické formě projevuje chronickým progredujícím onemocněním dýchacích cest a plic, insuficiencí zevní sekrece pankreatu, vysokou koncentrací elektrolytů v potu a poruchou reprodukce mužů.

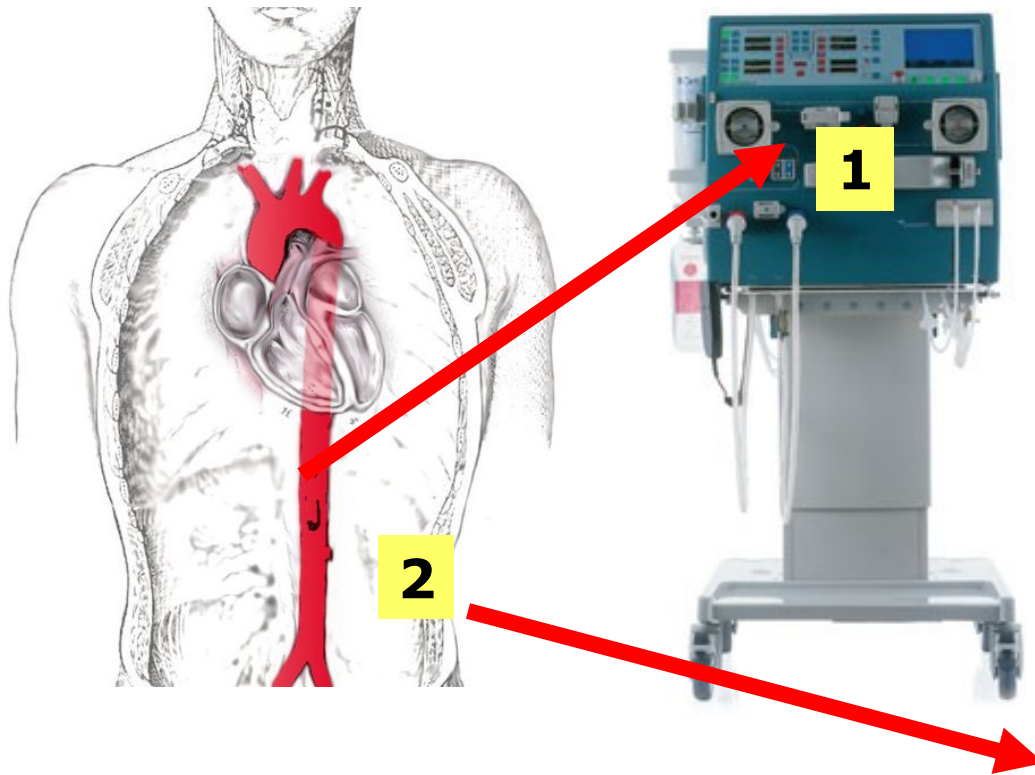
Pro pacienty s **cystickou fibrózou (CF)**, kteří mají **mutaci třídy III G551D**, je od roku 2012 k dispozici kauzální léčba. Mechanismus účinku léku **ivacaftor** spočívá v opravě funkce chloridového kanálu CFTR, poškozeného touto mutací. Potvrzená účinnost nového léčebného postupu, reprezentovaného právě lékem **ivacaftor**, přináší reálnou naději, že bude časem možné řešit základní příčinu onemocnění i u pacientů s dalšími typy mutací v genu CFTR.



Léčba 2- ovlivnění dráhy



Léčba 3- systémová



Eliminace toxinů
Hemodialýza
Hemadsorption
Výměnná transfúze

Obecná léčba
Energie
Hydratace
Léčba infekce
Atd.

Léčba DPM

- 1. Na úrovni metabolitu**
 - 2. Na úrovni enzymu**
 - 3. Na buněčné úrovni**
- Jediná kauzální léčba – na buněčné úrovni.
 - Léčba symptomatická a podpůrná – zmírňuje projevy, neodstraňuje příčinu.

1. Léčba na úrovni metabolitu

- a) Omezení příjmu či vzniku toxických metabolitů (např. dieta u PKU, galaktosémie, prevence katabolismu u aminoacidopatií, org.acidurií)
- b) Odstranění toxických metabolitů (peritoneální dialýza, hemodialýza, výměnná transfúze) a využití alternativních metabolických drah (např. **podávání benzoátu u hyperamonémií**)
- c) Podávání metabolických inhibitorů (např. allopurinol při hyperurikémii)
- d) Náhrada deficitních produktů (např. argininu u poruch močovinového cyklu, tyrosinu u PKU)

2. Léčba na úrovni enzymu

- a) **Aktivace enzymu** dodávkou koenzymů ve farmakologických dávkách (např. pyridoxinu u deficitu cystathionin β -synázy)
- b) **Dodávka deficitního enzymu** přímo – **enzymoterapie** (např. u Gaucherovy či Fabryho choroby, některých typů mukopolysachyridóz či glykogenóz)

3. Léčba na buněčné úrovni

- **Genová terapie** s virovými či nevirovými vektory
- Zvláštní postavení v léčbě pak zaujímá **transplantace orgánů a tkání** (např. jater u tyrosinémie, ledvin u cystinózy, kostní dřeně u adrenaleukodystrofie)

Choroby potenciálně léčitelné genovou terapií

Chybějící sérové proteiny

Hemofilie-faktor VIII, IX

Wilsonova choroba- Ceruloplasmin

Metabolické choroby

Deficience omitin dekarboxylázy

Svalové dystrofie

Poruchy imunitního systému

SCID-ADA deficience, X=linked...

Další choroby s Mendelovskou dědičností

Cystická fibróza

Nahrazení chybějícího
či mutovaného genu

Malignity

Solidní nádory

Leukemie, Lymfomy

Zabití buněk

Neurodegenerativní choroby

Alzheimer- agregace Tau

Huntingtonova choroba

Parkinsonova choroba

Odstranění
agregovaného proteinu

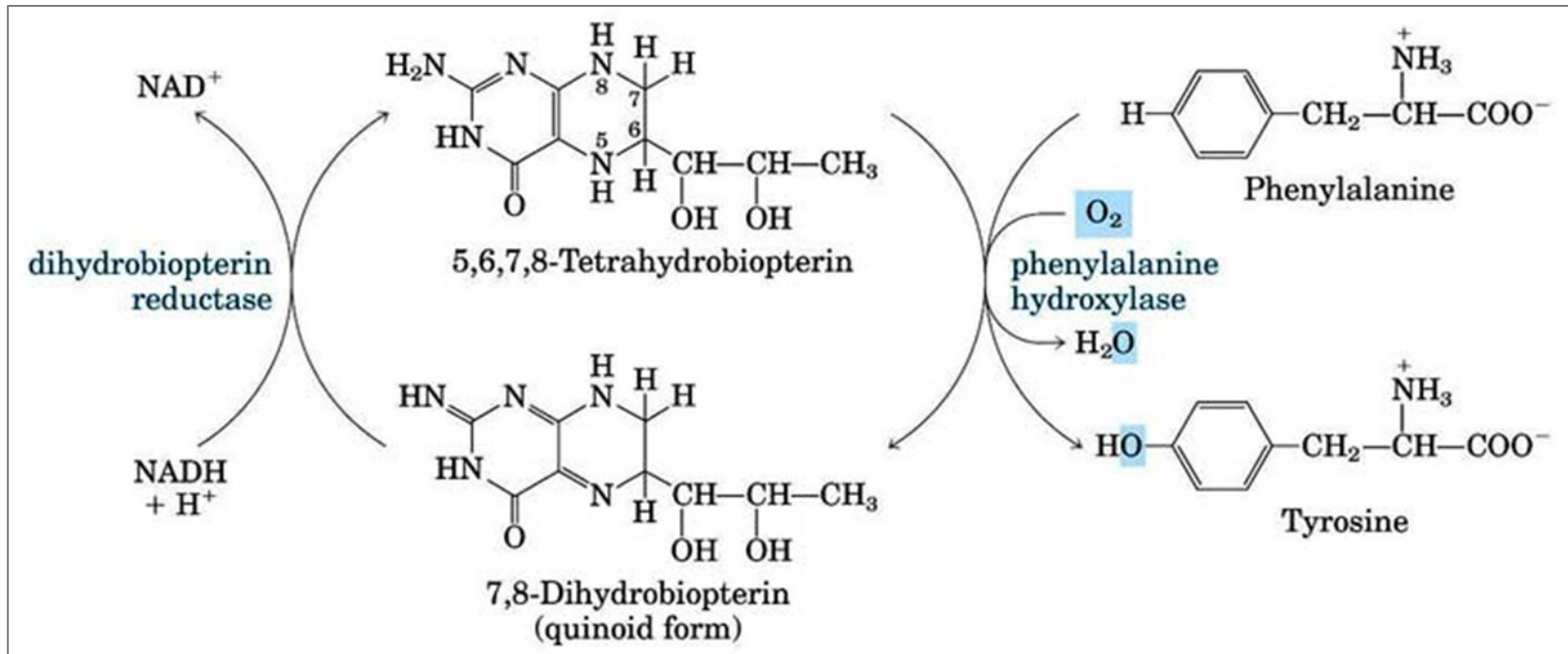
Multifaktoriální choroby

Kardiovaskulární choroby

Oční choroby

Kompenzace poruchy,
regulace

- Autosomálně recesivní onemocnění
- Porucha metabolismu aminokyseliny **fenylalaninu (Phe)**
- Mutace v genu *PAH* (**fenylalaninhydroxyláza**), chromosom 12q23.2
- PAH metabolizuje fenylalanin (Phe) za vzniku tyrozinu (Tyr), jako kofaktor je vyžadován tetrahydrobiopterin (BH4).



Klasifikace: Porucha metabolismu aminokyselin

Dědičnost: Autosomálně recesivní

Incidence: 1:13 000 (v ČR 1 : 6 500)

Etnicita: Severní Evropa, Irsko (1:4 500), Turecko (1:3 000)

Enzym a lokalizace: fenylalaninhydroxyláza, játra; **Gen a lokalizace:** *PAH*, 12q24.1

Informace o onemocnění

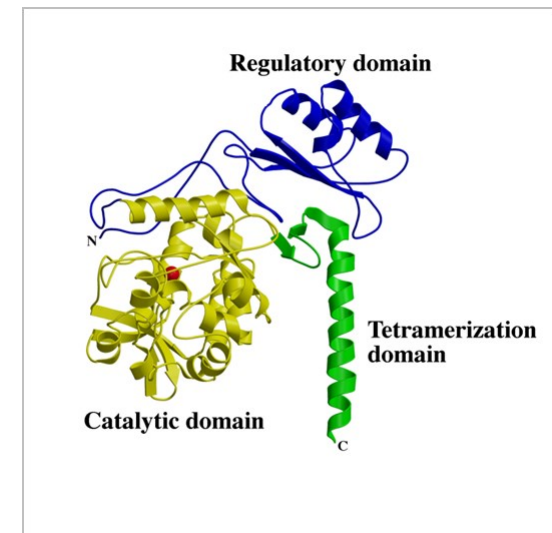
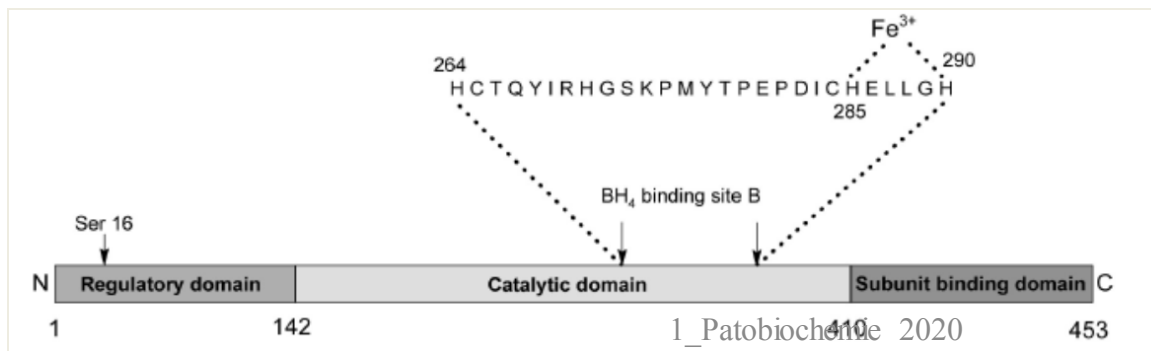
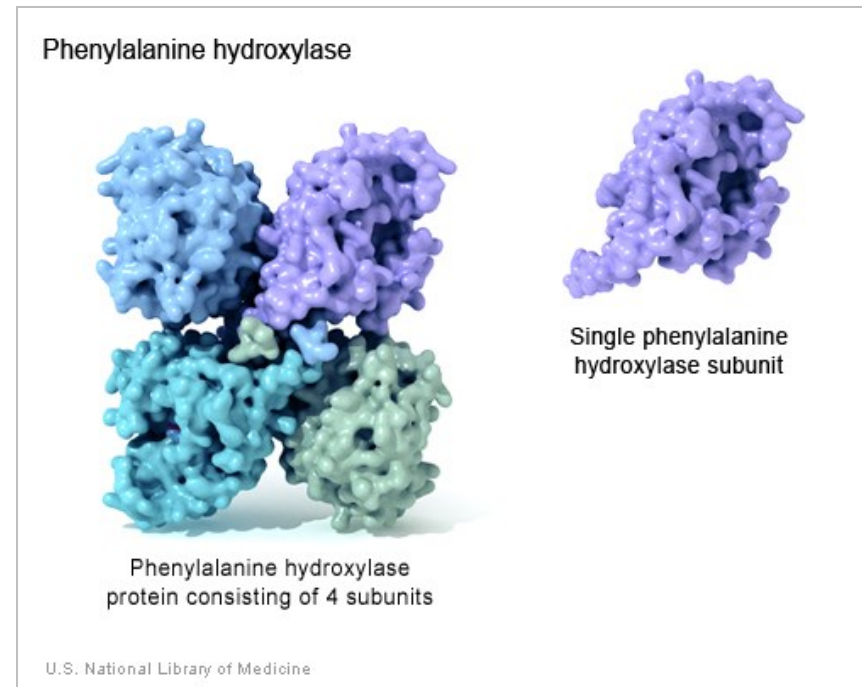
Průběh onemocnění bez léčby: **Pozvolná mentální retardace (patrná od 6 měsíců věku)**. Ostatní symptomy - ekzém, zápach moče, křeče, světlejší pigmentace, zvláštnosti chůze a držení těla. Rozsah klinických příznaků je závislý na stupni enzymového deficitu.

Léčba: Standardní péče je léčba všech osob s hladinou fenylalaninu nad 350-400 $\mu\text{mol/l}$, **spočívá v nízkobílkovinné dietě s omezením fenylalaninu a podáváním směsi aminokyselin bez fenylalaninu**. Dieta je doporučována po celý život a její dodržování je považováno za nejdůležitější faktor **normálního vývoje mozku**.

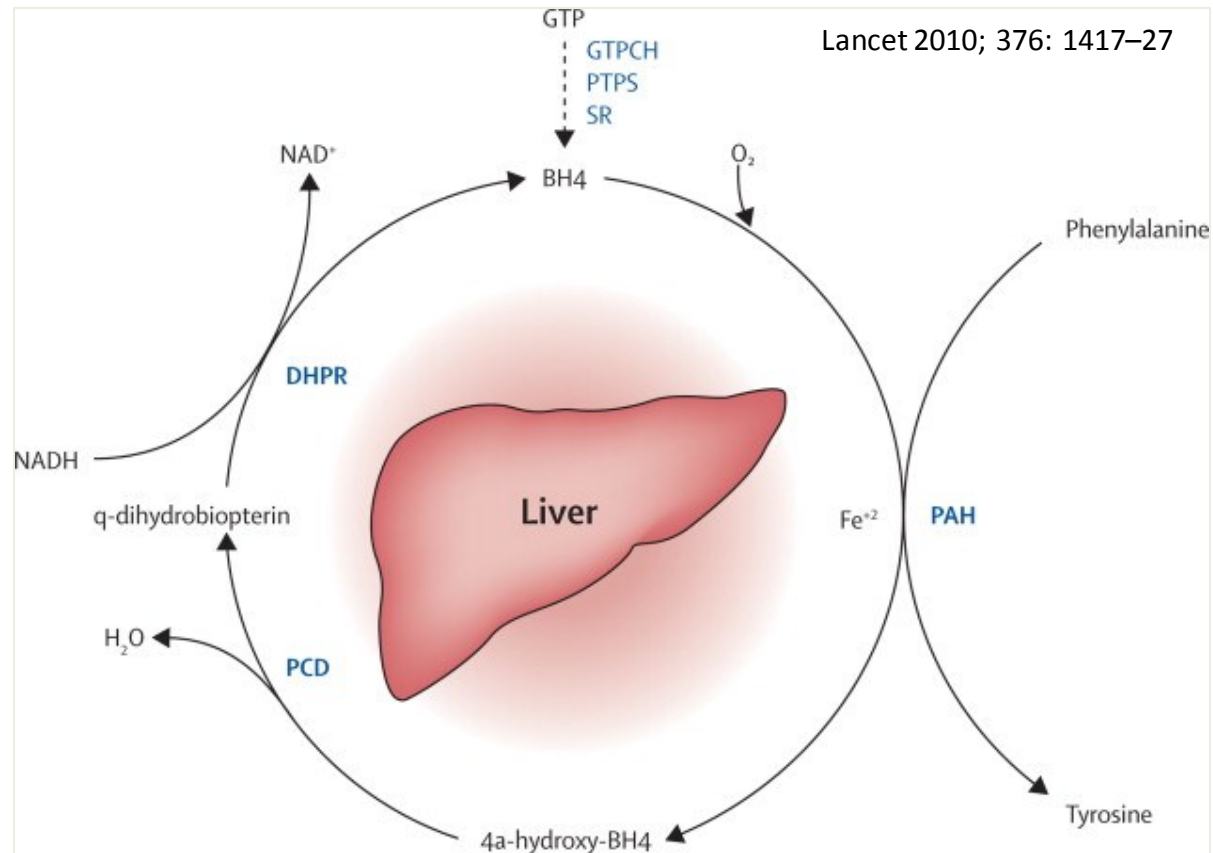
Průběh onemocnění s léčbou: Není mentální retardace, mohou být specifické poruchy učení. Při přerušení diety se sníženým obsahem fenylalaninu dochází k poklesu IQ, poruchám chování a soustředění, objevuje se ekzém, zápach a mohou se objevit křeče. Ženy s PKU/HPA mají vysokou pravděpodobnost narození postiženého dítěte (mikrocefalie a postižení mozku plodu, vrozené srdeční vady), jestliže nedrží přísnou dietu před plánovaným otěhotněním a během těhotenství.

Nález při novorozeneckém screeningu: **zvýšený fenylalanin a poměr Phe/Tyr**

- **Fenylalaninhydroxyláza** – enzym obsahující tři funkční domény:
 - N-koncová regulační doména
 - katalytická doména
 - C-koncová oligomerizační doména
- **Katalytická doména** - vazba fenylalaninu, kofaktoru (tetrahydrobiopterin, BH₄), iontu železa
- Oligomerizační doména – tvorba homotetrameru (aktivní forma enzymu)



- 98% způsobeno mutacemi v genu *PAH*
- 2% mutacemi v genech kódujících enzymy podílejících se na syntéze a regeneraci kofaktoru (tetrahydrobiopterin, BH4)



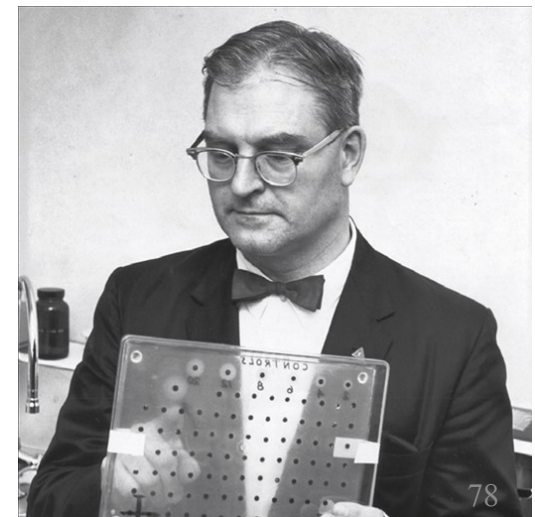
During the hydroxylation of phenylalanine by **PAH** (O₂, Fe³⁺), tetrahydrobiopterin (BH4) is oxidised to 4a-hydroxy-BH4 intermediate, which is subsequently regenerated back to BH4 by the enzymes **carbinolamine-4a-dehydratase (PCD)** and by the NADH-dependent **dihydropteridine reductase (DHPR)**. BH4 is synthesised from guanosine triphosphate (GTP) by three additional enzymes GTP cyclohydrolase I (GTPCH), 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase (PTPS), and sepiapterin reductase (SR). Mutations in genes coding for PCD, DHPR, GTPCH, PTPS, and SR result in BH4 deficiency.

Tři mílníky spojené s diagnostikou a léčbou HPA/PKU:

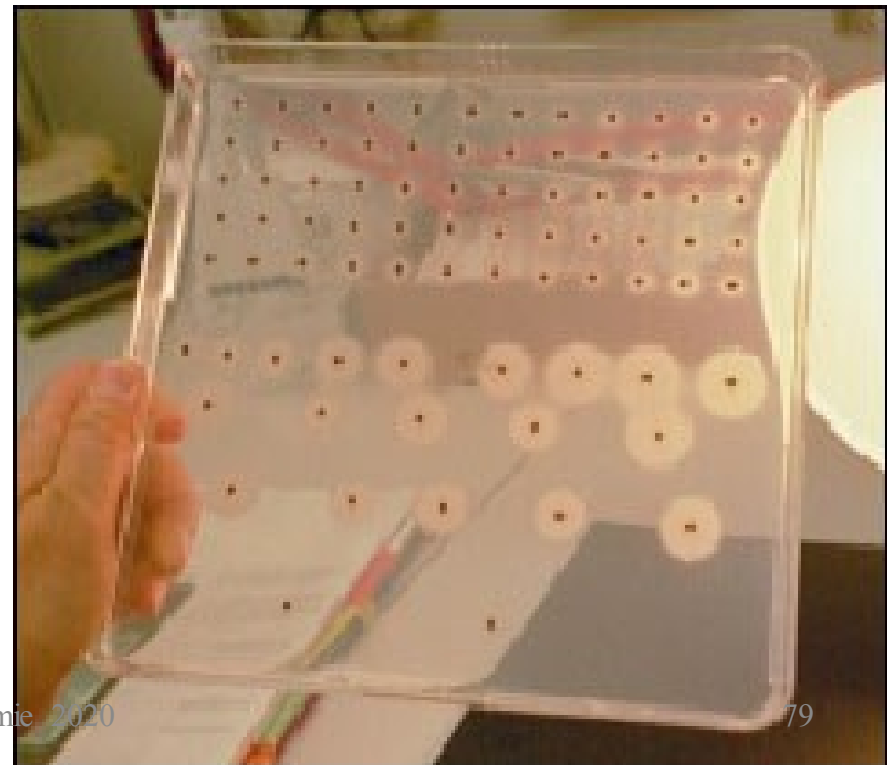
- ~ 1930, Asbjorn Folling (norský lékař a biochemik) identifikoval u části pacientů s mentální retardací zvýšenou hladinu Phe v krvi
- ~ 1950, Horst Bickel (německý lékař) zavedl dietu s nízkým obsahem Phe pro pacienty se zvýšenou hladinou Phe v krvi.
- ~ 1960, Robert Guthrie (americký mikrobiolog) zavedl diagnostický test vhodný pro screening HPA/PKU.



Současný novorozenecký laboratorní screening HPA/PKU – **tandemová hmotnostní spektrometrie** – analýza hladiny fenylalaninu a poměru fenylalanin/tyrosin.

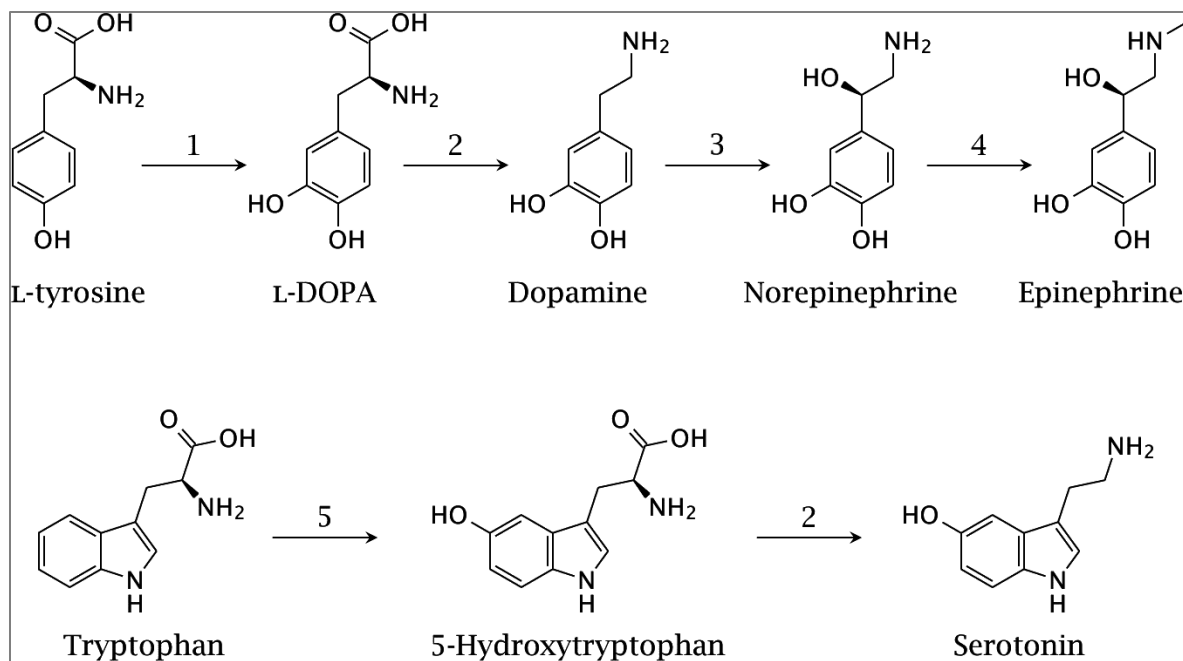


- **Semikvantitativní test** určený pro detekci zvýšené hladiny Phe využívající schopnosti Phe usnadnit růst bakterií v kultivačním médiu s inhibitorem.
- Malý disk filtračního papíru se zaschlou krví se umístí na agarový gel obsahující bakterii *Bacillus subtilis* a inhibitor B-2-thienylalanin. Agarový gel je schopen podporovat růst bakterií, ale B-2-thienylalanin tento růst inhibuje.
- V přítomnosti zvýšeného množství Phe je inhibice překonána a bakterie rostou. Intenzita růstu bakterií je přímo úměrná množství Phe v krvi, který se vyluhuje z filtračního papíru do agaru.

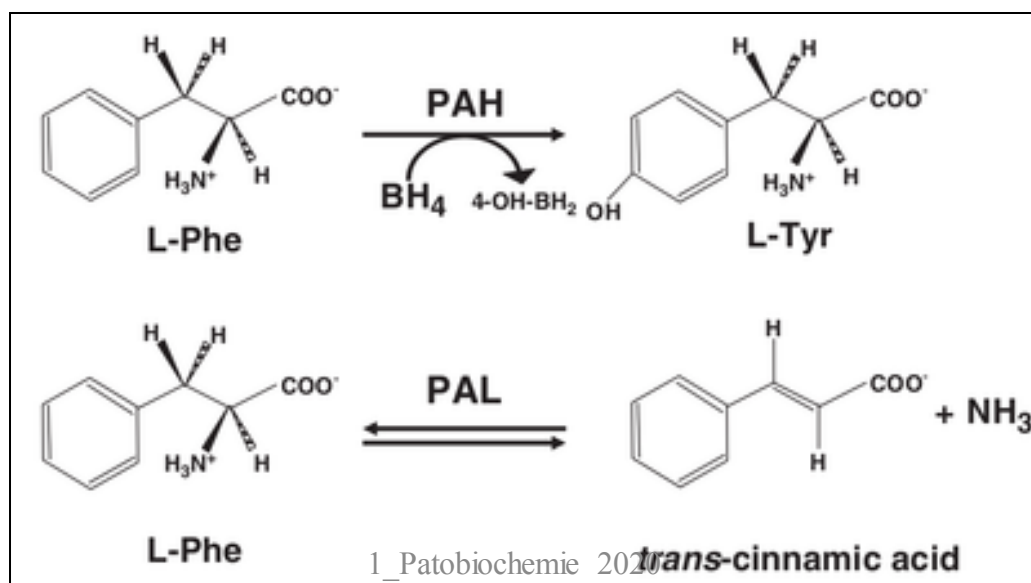


- **PAH - enzym fungující v jaterních buňkách** **x** mentální retardace jako klinický projev HPA/PKU
- **Hematoencefalická bariéra** – aminokyselinový transportér LAT1 – transport Phe a dalších velkých neutrálních aminokyselin (LNAA: Tyr, Trp) z krve do mozku. **Phe má vyšší afinitu k LAT1 než Tyr, Trp → vysokou koncentrací v krvi Phe snižuje příjem dalších LNAA do mozku; tj tyrosinu a tryptofanu (prekurzory dopaminu a serotoninu).**

➤ Terapie – nízkobílkovinná dieta s omezením fenylalaninu a podáváním směsi aminokyselin bez fenylalaninu + **podávání velkých neutrálních aminokyselin (LNAA).**



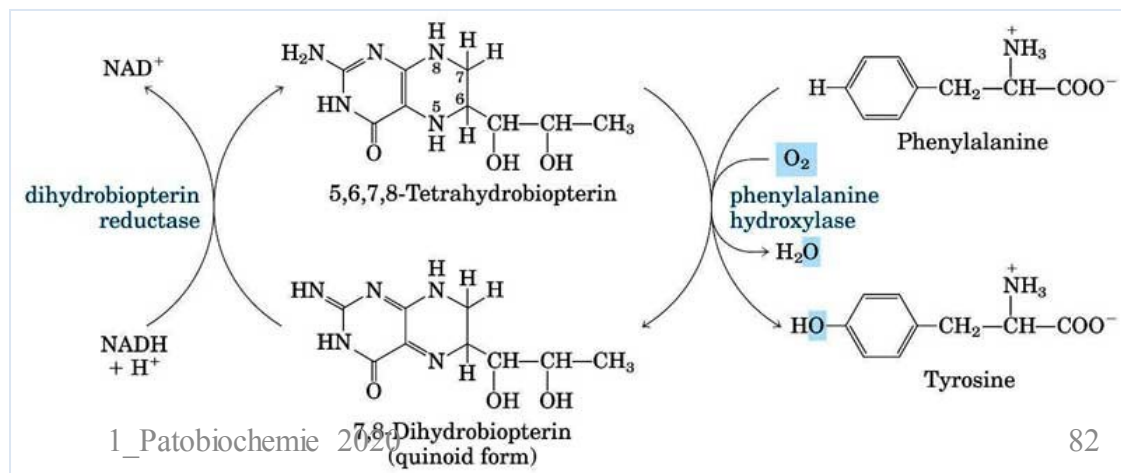
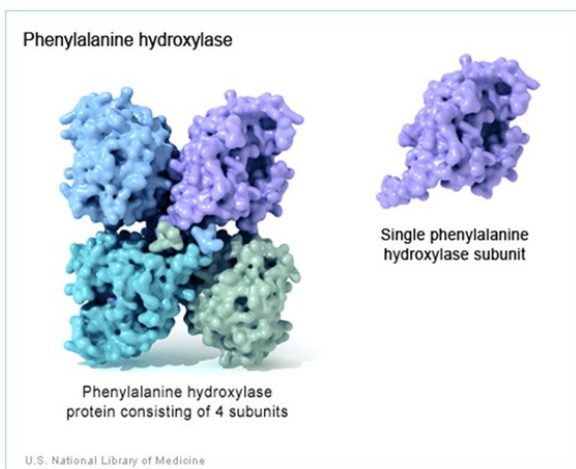
- **Enzymová substituční terapie pomocí fenylalanin amonium-lyázy (PAL)**
- PAL – konvertuje Phe na kyselinu skořicovou (*trans*-cinnamic acid) a amoniak (rostliny, houby, kvasinky)
- **Terapie:** i) orální podání je komplikováno proteolytickou degradací enzymu; ii) injektovaná PAL je imunogenní, konjugace PAL a polyethylenglykolu (PEG-PAL) snižuje imunitní odpověď.
- Byly provedeny klinické studie hodnotící bezpečnost a účinnost opakovaně podávaných injekcí PEG-PAL podkožní podávání PEG-PAL bylo bezpečné a dobře tolerované a zdá se účinné při snižování krevního Phe



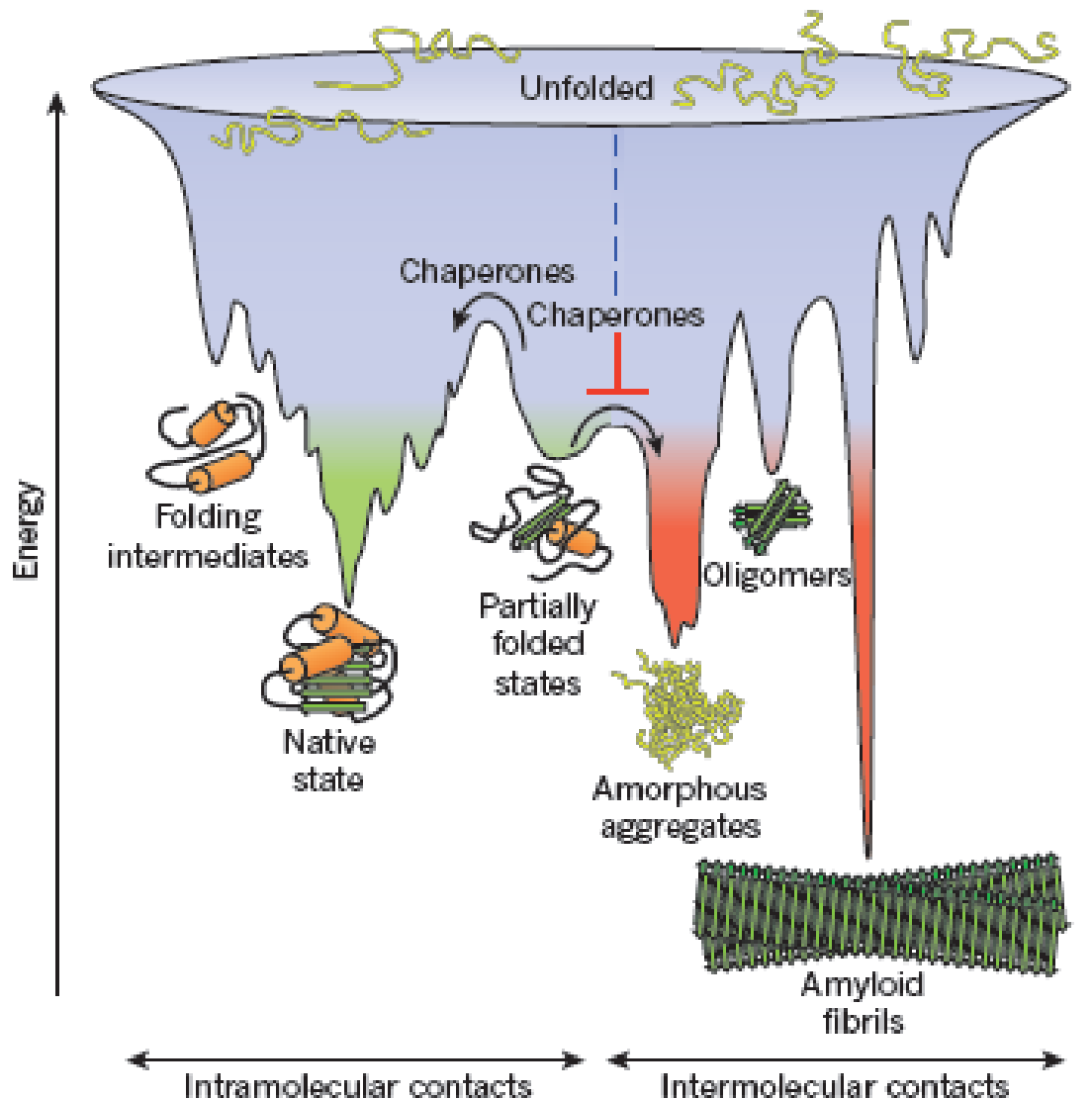
- Bylo zjištěno, že zvýšená hladina Phe může být redukována podáním BH4.
- Klinické zkoušky ukázaly, že **BH4 (Sapropterin dihydrochlorid, Kuvan)** je bezpečný a efektivní v terapii pacientů s mírnou HPA a mírnou PKU.

Hladina Phe v krvi:

- Norma: 50 - 110 $\mu\text{mol/L}$
- Mírná HPA: 120 - 600 $\mu\text{mol/L}$
- Mírná PKU: 600 - 1200 $\mu\text{mol/L}$
- Klasická PKU: > 1200 $\mu\text{mol/L}$

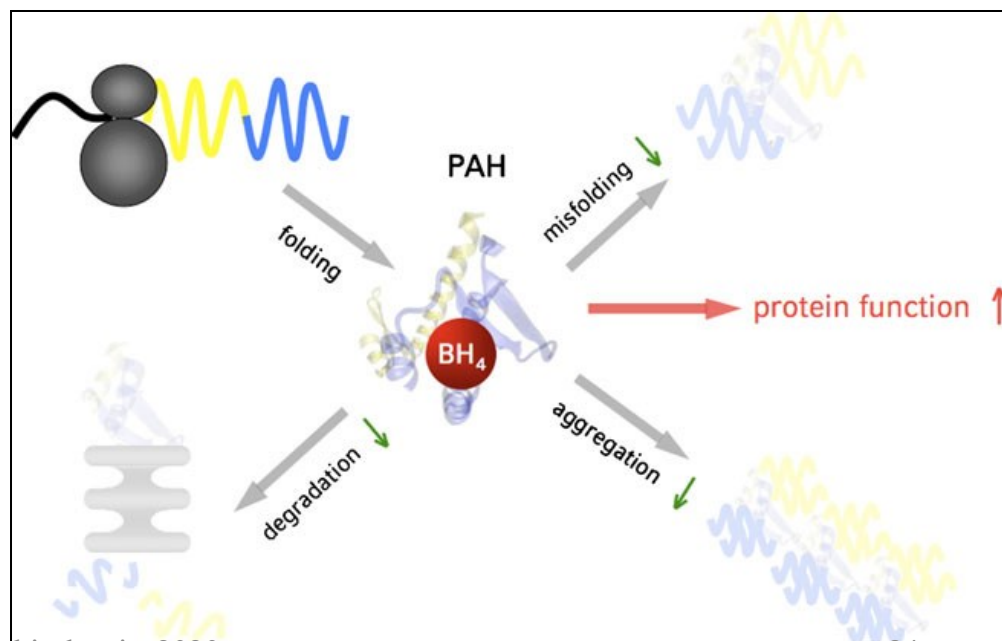
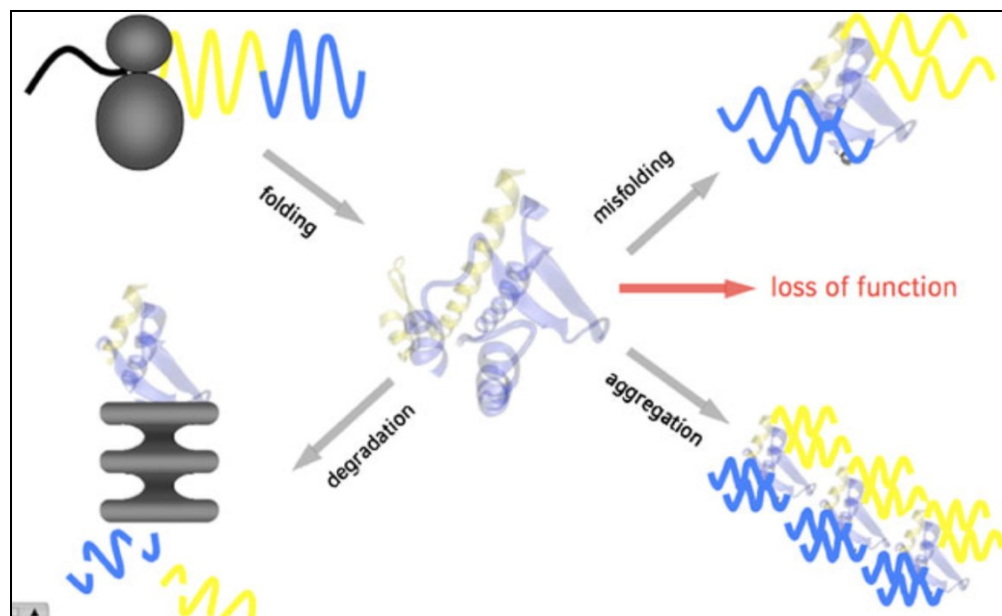


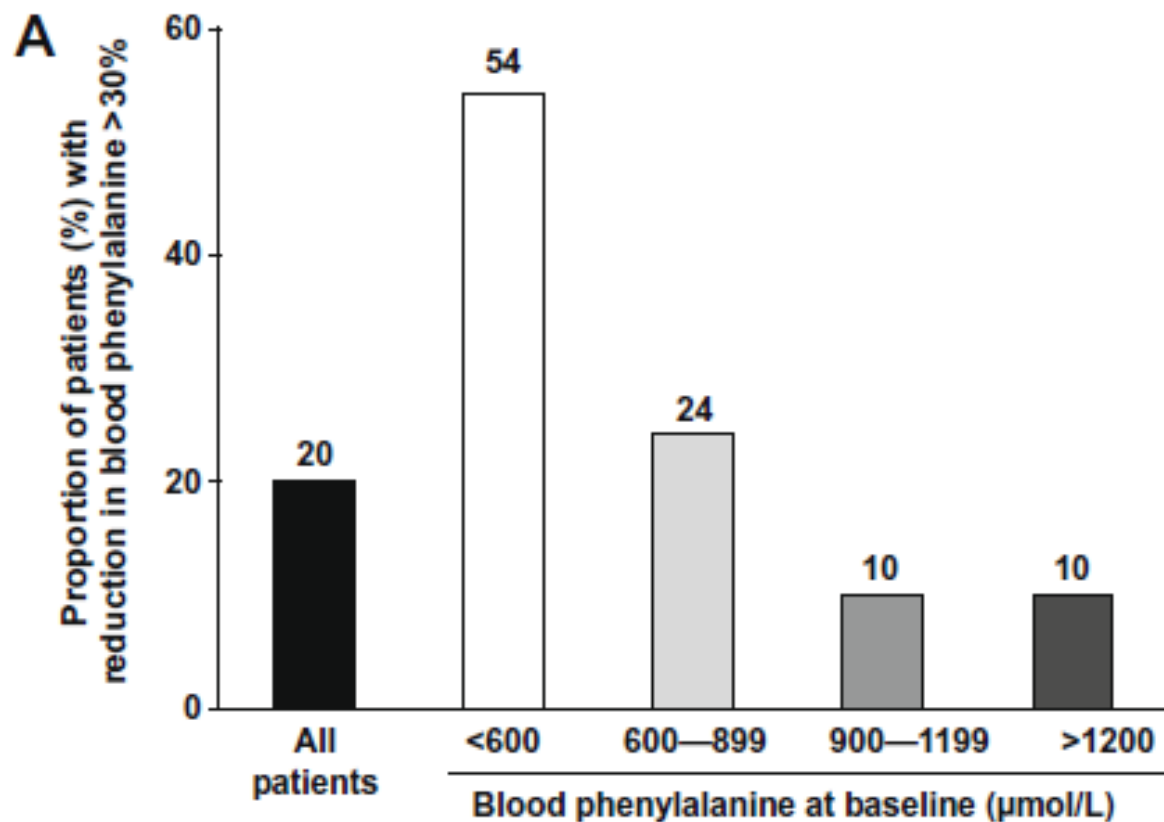
The surface free-energy changes of proteins during their moving towards the native state.



- Partially folded states are problematic - proteins tend to aggregate in concentration dependent manner.
- Aggregation primarily results in amorphous structures, oligomers, and amyloid fibrils. Formation of these structures is strongly restricted by chaperones.
- **Molecular chaperone interact with, stabilize, and help proteins to acquire its functionally active conformation, without being present in its final structure.**
- Different classes of structurally unrelated chaperones exist in cells.

- Molekulární chaperony – zabraňují „misfoldingu“ proteinu, pomáhají proteinu získat funkční konformaci, nejsou přítomny v konečné struktuře proteinu.
- **Mutace v PAH genu mohou vést ke změnám ve výsledné struktuře proteinu („protein misfolding“), které následně vedou k jeho degradaci event. agregaci.**
- **Tetrahydrobiopterin, BH₄ – molekulární chaperon pro PAH.**
- **Odpověď na terapii BH₄ závisí u pacienta s HPA/PKU na typu mutací v PAH genu – pacienti s mutací zachovávající zbytkovou aktivitu PAH (tj. pacienti s mírnějšími fenotypy) reagují na léčbu BH₄.**





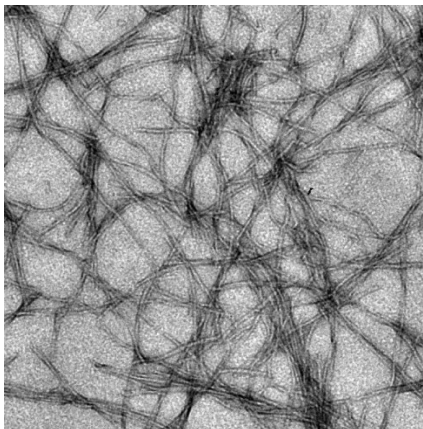
Efficacy of BH4 therapy in the management of HPA/PKU.

(A) Response rates (%) according to blood phenylalanine levels after sapropterin treatment (10 mg/kg/day) over a period of 8 days.

Molecular Genetics and Metabolism 96 (2009) 158–163

Hladina Phe v krvi:

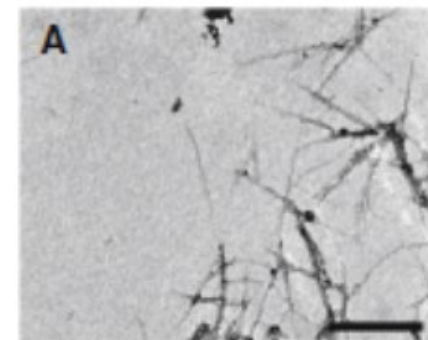
- Mírná HPA: 120 - 600 $\mu\text{mol/L}$
- Mírná PKU: 600 - 1200 $\mu\text{mol/L}$
- Klasická PKU: > 1200 $\mu\text{mol/L}$



Amyloid fibril formation by proteins and polypeptides:

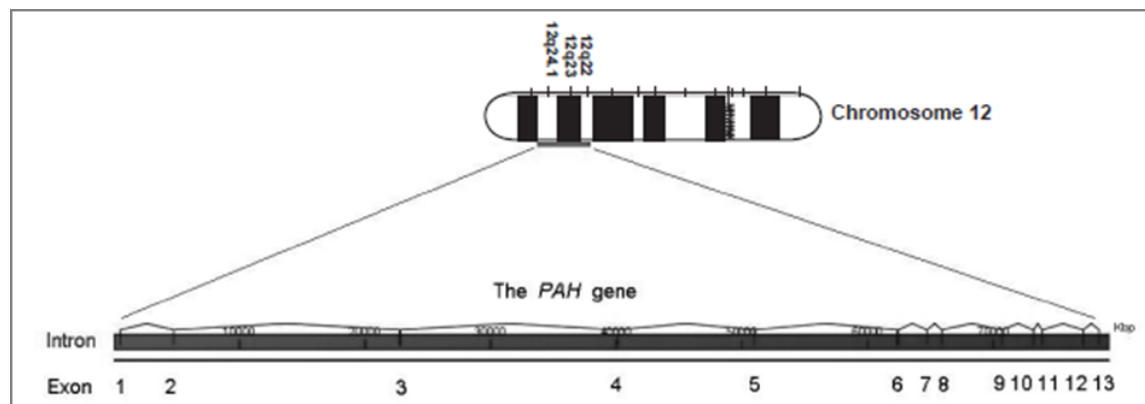
- Well-known amyloid-associated disease - Alzheimer's disease, in which the β -amyloid polypeptide aggregates and learning and memory is affected; Parkinson's disease, in which α -synuclein protein aggregates and motor function is affected; and type 2 diabetes, in which the islet amyloid polypeptide (IAPP, or amylin) aggregates and pancreatic β -cell function is affected.

- It was determined that the single amino acid could form amyloid-like assemblies. The formed assemblies had the same typical ultrastructural morphology as protein amyloids when visualized using electron microscopy.
- **The ability of phenylalanine to form amyloid assemblies was demonstrated in the brains of PKU-mice and PKU human patients, in which Phe is accumulated due malfunction of PAH.**
- The mechanism of degeneration appears to be the induction of apoptotic cell death in various organs and tissues in which assemblies are being accumulated.



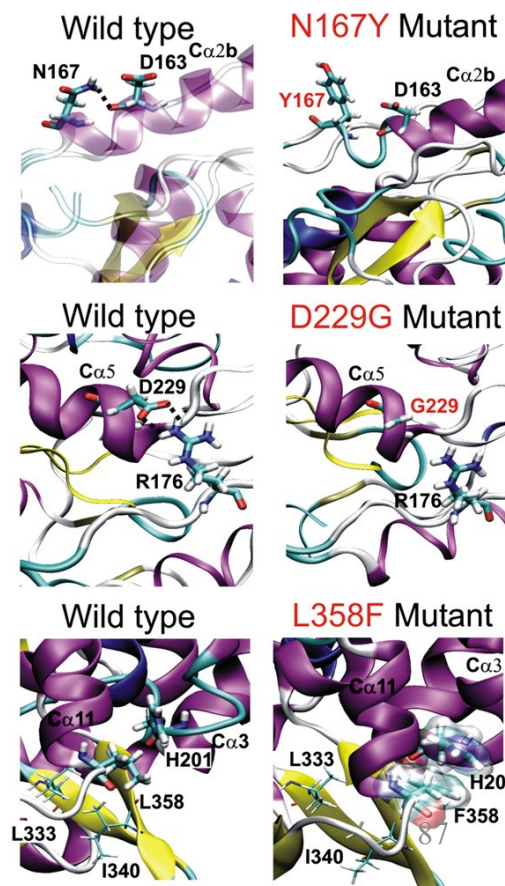
Ehud Gazit | Inherit Metab Dis (2016) 39:483–488

- **Detekce sekvenčních změn malého rozsahu:** PCR + sekvenční analýza exonů a přilehlých intronových oblastí
- **Detekce rozsáhlých delecí/duplikací:** MLPA



Celkový počet pacientů: 758

- Počet pacientů kompletním genotypem (2 mutace): 751 (99,1%)
- Počet pacientů s jednou mutací: 7
- 77% mutací je typu *missense*.
- Nejčastější mutace: c.1222C>T, p.(Arg408Trp) – 42% mutantních alel



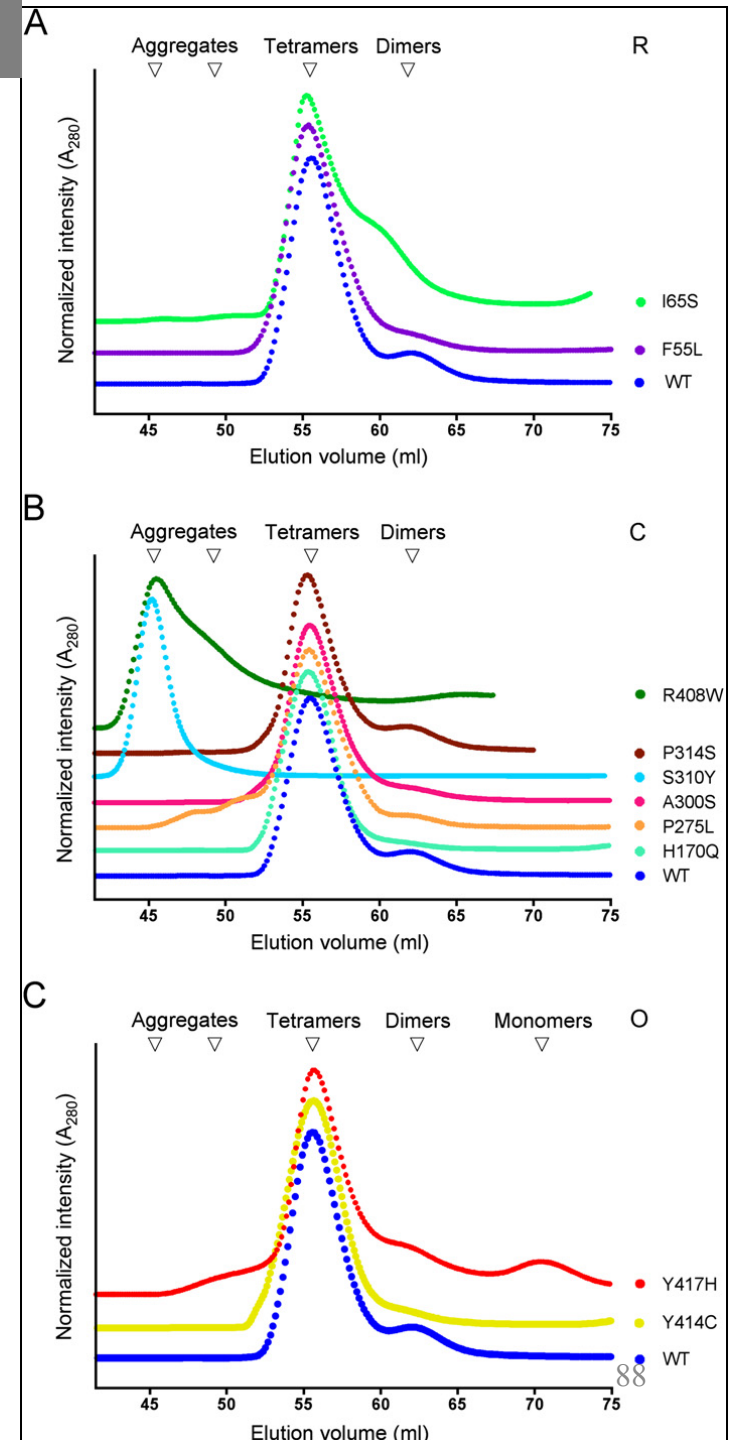
PAH mutations can lead to impaired tetramer assembly

Oligomerization profiles of wild-type and variant PAH were determined by size-exclusion chromatography. Arrows mark the elution volumes of soluble aggregates, tetramers, dimers, and monomers.

(A) Profiles of variants arising from mutations located in the regulatory domain (R). I65S showed increased amounts of dimers.

(B) Profiles of variants arising from mutations located in the catalytic domain (C). **S310Y and R408W eluted as high-molecular-weight aggregates without any detectable tetramers.**

(C) Profiles of variants arising from mutations mapping to the dimerization motif of the oligomerization domain (O). Y417H showed significant amounts of monomers and increased amounts of dimers.



Analýza DNA - poznámka

- Laboratoř provádí molekulárně genetickou diagnostiku vybraných DMP a jiných genetických chorob. V současné době pracoviště může analyzovat více než 60 genů pro potřeby postnatální i prenatální diagnostiky (Tabulka 23 – metodická příručka). Základními technikami je sekvenování Sangerovou metodou,
- fragmentační analýza a MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).
- Při vyšetření genomové DNA je metodou sekvenování analyzována celá kódující sekvence genu
- spolu s přiléhajícími intronovými oblastmi. Pokud byly v rodině mutace již identifikovány, u
- příbuzných se obvykle vyšetřují pouze tyto mutace.

- Gene Therapy has made important medical advances in less than two decades. Within this short time span, it has moved from the conceptual stage to technology development and laboratory research to clinical translational trials for a variety of deadly diseases. Among the most notable advancements are the following:
- **Gene Therapy for Genetic Disorders**
- **Severe Combined Immune Deficiency (ADA-SCID)** ADA-SCID is also known as the bubble boy disease. Affected children are born without an effective immune system and will succumb to infections outside of the bubble without bone marrow transplantation from matched donors. A landmark study representing a first case of gene therapy "cure," or at least a long-term correction, for patients with deadly genetic disorder was conducted by investigators in Italy. The therapeutic gene called ADA was introduced into the bone marrow cells of such patients in the laboratory, followed by transplantation of the genetically corrected cells back to the same patients. **The immune system was reconstituted in all six treated patients without noticeable side effects, who now live normal lives with their families without the need for further treatment.**

Chronic Granulomatous Disorder (CGD)

CGD is a genetic disease in the immune system that leads to the patients' inability to fight off bacterial and fungal infections that can be fatal. Using similar technologies as in the ADA-SCID trial, investigators in Germany treated two patients with this disease, whose reconstituted immune systems have since been able to provide them with full protection against microbial infections for at least two years.

- **Hemophilia**
Patients born with Hemophilia are not able to induce blood clots and suffer from external and internal bleeding that can be life threatening. In a clinical trial conducted in the United States, the therapeutic gene was introduced into the liver of patients, who then acquired the ability to have normal blood clotting time. The therapeutic effect however, was transient because the genetically corrected liver cells were recognized as foreign and rejected by the healthy immune system in the patients. This is the same problem faced by patients after organ transplantation, and curative outcome by gene therapy might be achievable with immune-suppression or alternative gene delivery strategies currently being tested in preclinical animal models of this disease.
- **Other genetic disorders** After many years of laboratory and preclinical research in appropriate animal models of disease, a number of clinical trials will soon be launched for various genetic disorders that include congenital blindness, lysosomal storage disease and muscular dystrophy, among others.

Gene Therapy for Acquired Diseases

- **Cancer** Multiple gene therapy strategies have been developed to treat a wide variety of cancers, including suicide gene therapy, oncolytic virotherapy, anti-angiogenesis and therapeutic gene vaccines. Two-thirds of all gene therapy trials are for cancer and many of these are entering the advanced stage, including a **Phase III trial of Ad.p53 for head and neck cancer and two different Phase III gene vaccine trials for prostate cancer and pancreas cancer**. Additionally, numerous Phase I and Phase II clinical trials for cancers in the brain, skin, liver, colon, breast and kidney among others, are being conducted in academic medical centers and biotechnology companies, using novel technologies and therapeutics developed on-site.
- **Neurodegenerative Diseases** Recent progress in gene therapy has allowed for novel treatments of neurodegenerative diseases such as Parkinson's Disease and Huntington's Disease, for which exciting treatment results have been obtained in appropriate animal models of the corresponding human diseases. Phase I clinical trials for these neurodegenerative disorders have been, or will soon be, launched.
- **Other acquired diseases**
The same gene therapeutic techniques have been applied to treat other acquired disorders such as viral infections (e.g. influenza, HIV, hepatitis), heart disease and diabetes, among others. Some of these have entered, or will soon be entering, into early phase clinical trials.
- www.asgct.org/about_gene_therapy/diseases.php
- http://www.asgct.org/about_gene_therapy/diseases.php