

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Diagnostika metabolických poruch aminokyselin a peptidů metodou UHPLC-MS/MS**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Helena Konvalinová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	duben 2011

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 22. 4. 2011

Zde bych chtěla velmi poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za možnost vypracovávat diplomovou práci na zajímavé téma, odborné vedení a trpělivý přístup. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Krätschmerové a RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za pomoc a cenné rady.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Bc. Helena Konvalinová
Název práce	Diagnostika metabolických poruch aminokyselin a peptidů metodou UHPLC-MS/MS
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	Metabolomika je vědní obor zabývající se stanovením velkého počtu nízkomolekulárních metabolitů v biologických vzorcích a podává nám informace o aktuálním stavu jedince. Metabolomika může být uplatněna i pro diagnostiku dědičných metabolické poruch. Tyto poruchy jsou velmi závažná onemocnění, která mohou dítě trvale zdravotně poškodit nebo mohou způsobit jeho úmrtí. Včasná diagnostika a cílená léčba může tyto nepříznivé faktory nemoci minimalizovat. Cílem experimentální části byl vývoj metody pro analýzu aminokyselin a peptidů pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na vzorky sér a extrakty kožních fibroblastů, v nichž se podařilo identifikovat až 23 látek. Analýzou sér se též podařilo rozlišit kontroly od pacientů s fenylketonurií a leucinosou dle specifických markerů pro danou poruchu. V této práci byly též zkoumány matricové efekty jednotlivých analyzovaných biologických vzorků.
Klíčová slova	metabolomika, dědičné metabolické poruchy aminokyselin a peptidů, hmotnostní tandemová spektrometrie
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Bc. Helena Konvalinová
Title	Diagnosis of metabolic disorders of amino acids and peptides by UHPLC-MS/MS
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Palacky University and University Hospital Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstrakt	Metabolomics is a scientific discipline, which analyses simultaneously large numbers of low molecular weight metabolites and may inform us of the actual state of an individual. Metabolomics also can be applied to diagnosing inborn errors of metabolism. Inborn errors of metabolism are serious disorders which may result in permanent impairment of a child or have fatal consequences. Such negative factors can be minimised by timely diagnosis and specific treatment. The aim of the experimental part of this thesis was development of a high performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometric detection for analysis of amino acids and peptides. The optimised method was applied to samples of serum and extracts of skin fibroblasts, in which up to 23 compounds were identified. Samples of patients with phenylketonuria and leucinose were distinguished from controls by serum analyses, according to markers specific to the respective disease. Furthermore, matrix effects of the analysed biological matrices were assessed in this thesis.
Keywords	Metabolomics, inherited metabolic disorders of amino acids and peptides, tandem mass spectrometry
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

Cíle práce .....	8
Teoretická část .....	9
1 Metabolomika .....	10
1.1 Metabolomické přístupy .....	10
1.2 Metabolity .....	11
1.3 Metody v metabolomice.....	11
1.3.1 Plynová chromatografie .....	11
1.3.2 Kapalinová chromatografie.....	12
1.3.3 Kapilární elektroforéza .....	12
1.3.4 Hmotnostní spektrometrie.....	13
1.3.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR) .....	16
2 Dědičné metabolické poruchy aminokyselin .....	16
2.1 Fenyloketonurie (PKU).....	21
2.1.1 Metabolismus fenylalaninu .....	22
2.1.2 Molekulární podstata.....	23
2.1.3 Patogeneze .....	23
2.1.4 Diagnostika .....	23
2.1.5 Terapie .....	23
2.2 Nemoc javorového sirupu (leucinoso, MSUD).....	24
2.2.1 Metabolismus leucinu, isoleucinu a valinu .....	25
2.2.2 Molekulární podstata.....	26
2.2.3 Patogeneze .....	26
2.2.4 Diagnostika .....	26
2.2.5 Terapie .....	26
3 Dědičné metabolické poruchy oligopeptidů.....	27
3.1 Dědičné metabolické poruchy glutathionu.....	27
3.1.1 Metabolismus glutathionu.....	27

3.1.2	Deficit $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasy .....	28
3.1.3	Deficit glutathionsyntetasy .....	28
3.2	Dědičné metabolické poruchy imidazolových dipeptidů .....	29
3.2.1	Metabolismus karnosinu, anserinu a homokarnosinu .....	29
3.2.2	Deficit sérové karnosinasy .....	30
3.2.3	Homokarnosinosa.....	30
3.3	Deficit prolidasy.....	31
3.3.1	Molekulární podstata.....	31
3.3.2	Patogeneze .....	31
3.3.3	Diagnostika .....	31
3.3.4	Terapie .....	31
	Experimentální část.....	32
4	Materiál .....	33
4.1	Biologický materiál.....	33
4.2	Chemikálie .....	33
4.3	Přístrojové vybavení .....	34
5	Metody .....	34
5.1	Příprava biologického materiálu .....	34
5.2	Optimalizace MS/MS.....	34
5.3	Optimalizace UHPLC .....	35
5.4	Analýza standardů.....	35
5.5	Analýza vzorků .....	35
5.6	Matricové efekty .....	35
6	Výsledky .....	36
6.1	Optimalizace MS/MS metody.....	36
6.2	Optimalizace UHPLC .....	41
6.3	Analýza standardů.....	41
6.4	Analýza biologického materiálu .....	45
6.4.1	Analýza sér.....	45

6.4.2	Analýza fibroblastů.....	47
6.5	Matricové efekty .....	48
7	Diskuse.....	50
8	Závěr .....	52
	Seznam zkratk .....	53
	Použitá literatura .....	57

## **Cíle práce**

- Vypracování rešerše na téma metabolomika a dědičné metabolické poruchy aminokyselin a oligopeptidů
- Optimalizace podmínek pro MS/MS
- Optimalizace podmínek pro UHPLC
- Aplikace na reálné vzorky



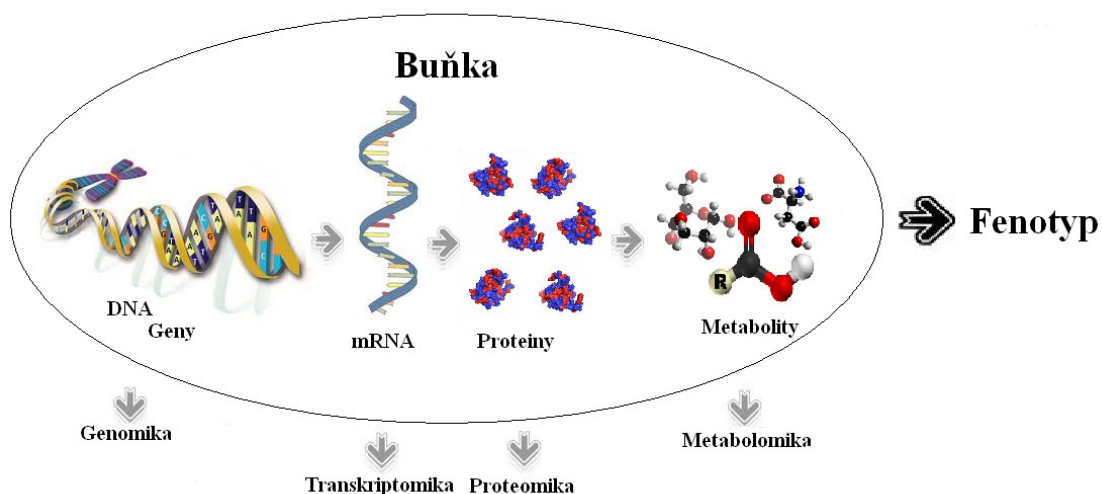
# **Teoretická část**

# 1 Metabolomika

Živý organismus je dynamický systém, který je ovlivňován vnějšími a vnitřními podněty a jeho snahou je udržet stálost vnitřního prostředí. Výsledkem těchto fyziologických pochodů je soubor různých metabolitů, které se podílejí na udržení homeostázy. Narušení rovnováhy je projevem nemoci a způsobí změnu metabolitů ve smyslu zvýšení, respektive snížení jejich koncentrací nebo zastoupení (Birková et al., 2007).

Metabolomika je vědní obor, který se zabývá komplexní a kvantitativní analýzou všech metabolitů ve tkáních a biologických tekutinách v daném čase (Dettmer et al., 2006). Pomocí metabolomických přístupů se stanovuje velké množství nízkomolekulárních metabolitů, kterými lze rozlišit chorobné stavy, detekovat farmakologické nebo toxikologické účinky či identifikovat biomarkery (Fukui et al., 2009).

Metabolomika se zaměřuje na kvantitativní analýzu nebo na kvalitativní profilování velkého počtu nitrobuněčných metabolitů. Doplnjuje další disciplíny s koncovkou *omika*, jako je genomika, transkriptomika a proteomika (Obr.1) (Bajad & Shulaev, 2011). Pomocí těchto přístupů lze lépe pochopit a porozumět biochemickým a fyziologickým mechanismům v živých systémech (Dettmer et al., 2006).



Obr.1: Schéma úrovní analýz buňky

## 1.1 Metabolomické přístupy

Metabolomika přistupuje k analýze metabolomu různými postupy. Lze analyzovat celý metabolom, vybranou skupinu metabolitů nebo extracelulární metabolity v médiu buněčné kultury (Tab.1).

Tab.1: Metabolomické přístupy (Dettmer et al., 2006).

Přístup	Druh analýzy
Metabolomické profilování	Kvantitativní analýza skupiny metabolitů ve vybrané metabolické dráze nebo specifické třídy. Je to cílená analýza limitovaného počtu metabolitů prekurzorů nebo produktů metabolické dráhy.
Metabolomický fingerprinting	Necílená, celková analýza metabolitů ve vzorku (moč, plasma, sérum, sliny, tkáň nebo buněčná kultura). Sledují se změny v metabolomu způsobené chorobou, prostředím nebo genetickou odchylkou.
Metabolomický footprinting	Analýza extracelulárních metabolitů v médiu buněčné kultury, stanovuje se buněčná exkrece a absorpce.

## 1.2 Metabolity

Metabolity jsou malé molekuly, které vznikají v metabolických drahách a jsou důležité pro dělení, růst a další významné fyziologické funkce buňky. Celý komplex metabolitů v buňce v daném čase se nazývá *metabolom* (Dettmer et al., 2006). Ten je velice variabilní a jeho složení nám odráží aktuální stav systému, nejvíce se tedy přibližuje fenotypu (Birková et al., 2007).

Metabolity patří do velké skupiny látek odlišných chemických a fyzikálních vlastností. Patří sem například aminokyseliny, nukleotidy, organické kyseliny, sacharidy. U lidí je odhadován počet metabolitů na 2000 a v rostlinné říši až na 200 000 (Dettmer et al., 2006).

## 1.3 Metody v metabolomice

Metody analytické chemie dokáží kvalitativně a kvantitativně identifikovat soubor metabolitů v analyzovaném biologickém materiálu (Dettmer et al., 2007). Výběr metody závisí na typu biologického materiálu a na druhu metabolomu (jeho fyzikálně chemických vlastností), který má být analyzován (Issaq et al., 2009). Dodnes neexistuje metoda, která by spolehlivě stanovila celý metabolom daného organismu v jedné analýze (Dettmer et al., 2007).

Velmi používaná metoda v metabolomice je hmotnostní spektrometrie nejčastěji ve spojení s plynovou (GC) a kapalinovou (LC) chromatografií (Dunn & Ellis, 2005). Experiment byl prováděn pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (UHPLC-MS/MS), proto je níže probrán podrobněji.

### 1.3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační analytická metoda, kde je analyt separován na základě rozlišných schopností vázat se na stacionární fázi. Vzorek je dávkován do plynu, který ho dále unáší kolonou. Složky opouštějící kolonu jsou detekovány na detektoru, kde je možno pomocí generujícího signálu identifikovat a kvantifikovat látky.

Plynová chromatografie dokáže separovat látky, které jsou těkavé, tepelně stabilní a jejich relativní molekulová hmotnost je nižší než 1000. Většinu látek tak není možné použít pro analýzu na plynném chromatografu, proto je nutné je převést na jejich deriváty, které mají vyhovující vlastnosti pro zvolený typ metody.

Nosný plyn unášející analyt kolonou vyústí k detektoru, který reaguje na přítomnost analyzovaných látek a vytvářející signál je zaznamenáván v závislosti na čase. Plynový chromatograf může být kombinován s několika druhy detektorů. Mezi nejpoužívanější patří tepelně- vodivostní detektor, ionizační detektor a hmotnostní spektrometr. Tyto detektory se liší citlivostí, senzitivitou, mezí detekce, lineárním dynamickým rozsahem, ale i principem funkce (Klouda, 2003).

### **1.3.2 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je separační analytická metoda, kde je analyt separován na principu rozlišných interakcí se stacionární fází. Separace je velmi ovlivněna výběrem mobilní fáze, která je u této metody kapalina. V průběhu separace se analyt dělí mezi mobilní a stacionární fází. Doba, kterou stráví v jedné nebo druhé fázi, je závislá na afinitě analytu ke každé z nich. Kapalinová chromatografie využívá různé mechanismy separace jako je adsorpce, rozdělení na základě rozpustnosti, iontové výměny, molekulárního síťového efektu nebo specifických vazeb v afinitní chromatografii.

Kapalinová chromatografie může být prováděna za laboratorní teploty, proto je vhodná k separaci netěkavých a teplotně nestabilních látek.

U této analytické metody jsou fotometrické, refraktometrické a fluorescenční detektory nejpoužívanější. Velký význam v klinické praxi má také spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Klouda, 2003).

### **1.3.3 Kapilární elektroforéza**

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační metoda, která spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Malé množství vzorku je aplikováno do kapiláry a po separaci je detekováno na detektoru, nejčastěji spektrofotometrickém.

Velkou výhodou kapilárního uspořádání oproti plošné elektroforéze je zkrácení doby analýzy a možnost propojení s počítačovým zařízením. Ke zkrácení analýzy dochází z důvodu možnosti aplikace vysokého napětí (10 – 30 kV), vznikající teplo je dobře odváděno stěnami kapiláry. Počítačové zařízení umožňuje on-line detekci a počítačové vyhodnocování píku.

Pohyb částic je dán jejich elektroforetickou pohyblivostí, nabitě částice různých složek migrují v elektrickém poli rozdílnou rychlostí. Při aplikaci napětí se začnou pohybovat částice k opačně nabitě elektrodě. Zároveň dochází ke vzniku elektroosmotického toku (EOF –

ElectroOsmotic Flow), který nese ke katodě i anionty. Neutrální částice se pohybují rychlostí EOF, nabitě částice se pohybují dle jejich elektroforetické pohyblivosti, kationty migrují rychleji než anionty.

Kapilární elektroforéza má zpracovanou celou řadu separačních technik, jako je kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, kapilární gelová elektroforéza, kapilární isoelektrická fokusace nebo kapilární elektrochromatografie (Klouda, 2003).

### **1.3.4 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda k určení hmot volných molekul a jejich částí, jež je nutné převést na kladné nebo záporné ionty. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které ze směsi plynných molekul separuje nabitě částice dle jejich  $m/z$ . Během ionizace dochází ke vzniku nabitých celých molekul (molekulární ionty), ale také jejich fragmentů. Typ ionizace poskytuje informace o struktuře látky a na jejím základě lze odvodit nebo potvrdit strukturu studované látky (Ubik, 2000).

#### **1.3.4.1 Přístrojová technika**

Hmotnostní spektrometr je tvořen základními složkami, jako je iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vyhodnocovací zařízení.

V iontovém zdroji dochází k tvorbě iontů, které jsou v iontově optickém systému fokusovány na úzký paprsek, urychlovány a „injekovány“ do hmotnostního analyzátoru. Zde dochází k separaci iontů jedním nebo více hmotnostními analyzátory. Ty mohou být tvořeny kombinací elektrických a magnetických polí, nebo může být separace založena na měření rychlostí iontů.

Hmotnostní spektrometr pracuje pod nízkým tlakem  $10^{-6}$  až  $10^{-3}$  Pa, aby nedocházelo ke srážkám iontů s neutrálními molekulami.

Detekce hmotnostních spekter může být elektrická nebo optická. Při elektrické registraci jsou ionty vedeny do elektronového násobiče, poté do zesilovače a následně je záznam převeden do počítače. Pro zvýšení citlivosti detekce se používají konverzní diody, které přitahují ionty a dále je emitují na fotonásobič. Pro zaznamenávání většího počtu svazků se dnes používá fotodiodové pole. Při optické detekci dopadá svazek iontů na fotografickou desku a po vyvolání se získá čárové spektrum (Ubik, 2000).

#### **1.3.4.2 Iontové zdroje**

Typ iontového zdroje se volí dle druhu studované látky a požadavků na analýzu.

Ionizace při atmosférickém tlaku (API) má v současné době největší význam. Do tohoto typu ionizace můžeme zařadit ionizace elektrosprejem (ESI), iontovými spreji (ISP) a chemickou ionizace při atmosférickém tlaku (APCI).

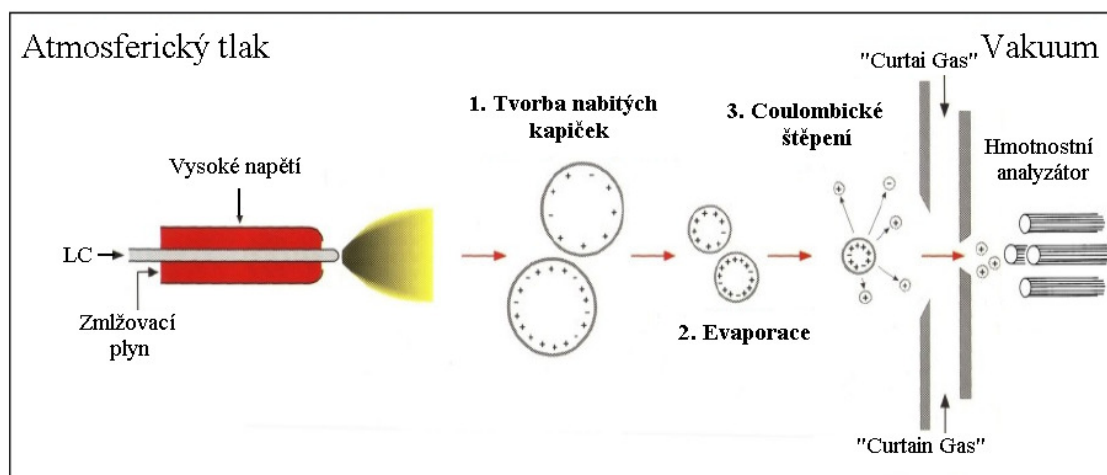
Separace iontů v hmotnostním spektrometru se děje za vysokého vakua, a proto je analyzátor od iontového zdroje (ionizace při atmosférickém tlaku) oddělen diafragmou nebo iontovou optikou s malými vstupními štěrbinami (Ubik, 2000).

### Ionizace elektrosprejem (ESI)

Tato ionizační technika patří mezi měkkou ionizaci, která se používá při analýze disperzních kapalin a aerosolů.

ESI ionizace (Obr.2) elektrosprejem se skládá ze tří kroků. V prvním kroku dochází ke vzniku malých nabitých kapek na konci kapiláry, dále následuje odpařování rozpouštědla a v posledním kroku dojde k uvolnění iontů z vysoce nabitých malých kapiček do plynné fáze (Ho et al., 2003).

Kapilára, kterou prochází vzorek, je pod vysokým napětím (3 – 5 kV). Tvořící se malé kapičky na konci kapiláry nesou kladný nebo záporný náboj, dle polarity napětí na kapiláře, způsobené vlivem vysokého gradientu elektrického pole. Zmenšování objemu kapiček a zvýšení hustoty povrchového náboje je způsobeno odpařováním rozpouštědla, což vede k opakovanému rozpadu (Coulombické štěpení) a uvolnění protonových molekulárních iontů  $[M + H]^+$  nebo uvolnění aduktů molekul se sodnými ionty  $[M + Na]^+$  při snímání v kladném módu, nebo deprotonované molekulární ionty  $[M - H]^-$  při snímání v negativním módu (Holčápek & Jandera, 1998).



Obr.2: ESI ionizace (AB Sciex)

#### 1.3.4.3 Analyzátoři iontů

Z iontového zdroje vstupují ionty různých hmot  $m$  nesoucí jeden i více nábojů  $z$  do hmotnostního analyzátoru. Zde dochází k separaci dle jejich účinných hmot  $m/z$  a kvalita rozlišení se označuje jako rozlišovací schopnost přístroje. Lze ji definovat dvěma způsoby:

První způsob definice označuje rozlišovací schopnost, jako poměr účinné hmoty píku k rozdílu hmot iontu daného píku a sousednímu píku stejné velikosti. Je nutno udat v % výšku údolí mezi těmito dvěma píky, tedy

$$RP = m_1 / (m_1 - m_2)$$

Druhý způsob definice označuje rozlišovací schopnost, jako poměr hmoty iontů tvořících píku ku jeho šířce a výšce, tedy

$$RP = m / \Delta m$$

Šířka píku by měla být udávána ve výšce 0,5 %, 5 % nebo 50 % (tato hodnota musí být uvedena při stanovení rozlišovací schopnosti) (Ubik 2000).

Dle principu funkce analyzátoru iontů je lze rozdělit na magnetické analyzátorů, elektrostatické analyzátorů, kvadrupólové analyzátorů, průletové analyzátorů, iontové pasti a cyklotronovou rezonanci iontů.

#### **1.3.4.4 Kvadrupólové hmotnostní analyzátorů**

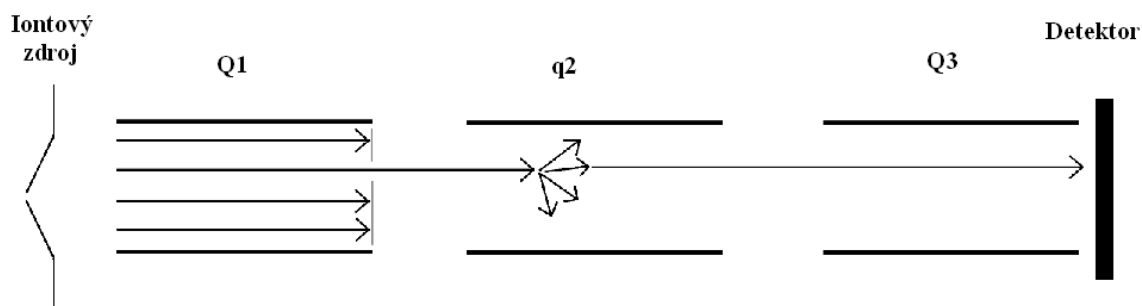
Principem separace iontů pomocí kvadrupólových hmotnostních analyzátorů je řízený pohyb iontů dle jejich  $m/z$  poměru v magnetickém nebo elektrickém poli.

Takový systém se skládá ze 4 kovových tyčí umístěné ve stejné vzdálenosti. Tyto kruhové tyče jsou připojeny ke střídavému a stejnosměrnému zdroji napětí. Selekcce iontů je docílena zvolením daných hodnot elektrického pole, které zapříčiní, že jen ionty o daném  $m/z$  projdou kvadrupólem. Ionty dopadají na detektor a je generováno hmotové spektrum (Ho et al., 2003).

#### **Tandemová hmotnostní spektrometrie**

Typický tandemový kvadrupólový analyzátor obsahuje tři za sebou lineárně umístěné kvadrupóly. V prvním kvadrupólu (Q1) dochází k selekci rodičovského iontu, který dále putuje do kolizní cely (druhý kvadrupól, Q2), kde dochází k fragmentaci pomocí inertního plynu (dusík). Vzniklé dceřiné iontu jsou rozlišeny ve třetím kvadrupólu (Q3) a dále pak detekovány (Obr.3) (Ho et al., 2003).

Pro zlepšení detekčního limitu se používá mód sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (multiple reaction monitoring, MRM). Pro danou látku je zvolen jeden prekurzorový ion, který je v kolizní cele fragmentován na produktové ionty. Ze skupiny produktových iontů je vybrán specifický fragment, který dále pokračuje v analyzační fázi a následně je detekován.



Obr.3: Princip metody MS/MS

### 1.3.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR je nedestruktivní analytická metoda, která využívá silného vnější magnetické pole za působení radiofrekvenčních impulzů k zjištění chemického posunu u jader atomů s lichým nukleovým nebo atomovým číslem a nenulovým spinem. Tyto radiofrekvenční impulzy způsobují přechod jádra z nižší energetické hladiny do vyšší a následná emise záření je poté detekována.

Pomocí NMR se mohou provádět identifikační a strukturní analýzy organických látek, dále se používá ke studiu chemických dějů. Se zvyšující koncentrací roste výška signálu, proto se tato metoda také používá ke kvantitativní analýze stanovení koncentrace a čistoty studované látky v daném vzorku (Klouda, 2003).

## 2 Dědičné metabolické poruchy aminokyselin

Dědičné metabolické poruchy jsou způsobeny genovou mutací kódující specifický protein. Mutace může vést ke změně primární struktury proteinu nebo poruše syntézy. Mutovaný protein může zaujímat funkci enzymu, receptoru, transportéru nebo strukturní jednotky. Tímto způsobem zasahuje porucha proteinu do metabolických drah a zapříčiňuje vznik vrozené metabolické poruchy. Dochází ke kumulaci metabolitů v tělních tekutinách a tkáních. Zvýšená koncentrace takto kumulovaných látek je pro tělo toxická a způsobují celou řadu symptomů a může vést až ke smrti dítěte.

Dědičné metabolické poruchy aminokyselin shrnuje Tab.2. Některé z nich se mohou projevit abnormální koncentrací amoniaku, což je způsobeno obsahem aminoskupiny v aminokyselinách. První projevy onemocnění se manifestují především v novorozeneckém období nebo krátce po něm, neboť v době těhotenství metabolickou poruchu dítěte kompenzuje matka (Chace & Kalas, 2005). Klinické symptomy jsou nespecifické, vyskytuje se například letargie, vyhublost, křeče, zvracení. Pokud nedojde k včasné diagnostice a cílené terapii mohou tyto choroby pro dítě znamenat trvalé poškození zdraví (např. mentální retardace) nebo smrt.



Incidence vrožených metabolických poruch není vysoká, avšak může vést k trvalému poškození zdraví až k úmrtí novorozence nebo dítěte (Hannon et al., 2001). Z tohoto důvodu je každému nově narozenému dítěti v České republice prováděn novorozenecký screening. Cílem screeningu je včasná diagnostika a léčba těchto poruch. Ze suché kapky krve, odebrané 48 až 72 hodin po porodu, se zjišťují endokrinní onemocnění (např. kongenitální hypotyreóza), dědičné poruchy metabolismu (např. fenylketonurie) a jiné onemocnění (např. cystická fibróza) (Hellerová, 2009). Vyšetření se provádí metodou tandemové hmotnostní spektrometrie, která dovoluje zjistit metabolický stav novorozence a detekovat případně vroženou metabolickou poruchu (Chace & Kalas, 2005). Vývoj této metody umožnil rychlou analýzu a identifikaci více metabolických poruch najednou (Pandor et al., 2006).

Tab.2: Přehled dědičných metabolických poruch aminokyselin (ARG – arginasa, AASDHPPT – 2-aminodipátsemialdehydsyntasa, ASL – argininosukcinátlyasa, ASPA – aspartoacylasy, SR – sepiapterinreduktasa, ASS – argininosukcinátsynthetasa, BCKD - dehydrogenasový komplex 2-ketokyselin s větvenými řetězci, AAT – 2-aminoadipátaminotransferasa, SAHH – S-adenosylhomocysteinhydrolasa, CPS – karbamoylfosfátsynthetasa, DHPR – dihydropteridinreduktasa, D2HGDH – D-2-hydroxyglutarátdehydrogenasa, TAT – tyrosinaminotransferasa, FAH - fumarylacetoacetáthydrolasa, GCHD – glutaryl-CoA dehydrogenasa, GCS - glycine cleavage systém - enzymatický komplex, GMT – glycine N-methyltransferasa, GTPCH – guanosintrifosfátcyklohydrolasa I, HPD - 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasa, IVD – isovaleryl-CoA dehydrogenasa, L2HGDH – L-2-hydroxyglutarátdehydrogenasa, MAT – methionin S-adenosyltransferasa, MCM – methylmalonyl-CoA mutasa, NAGS – N-acetylglutamátsynthetasa, OAT – ornithinaminotransferasa, OCT – ornithintranskarnibamylasa, PAH – fenylalaninhydroxylasa, CBS - cystathionin  $\beta$ -syntasa, PCC – propionyl-CoA karboxylasa, PCD – pterin-4a-karbinolamindehydratasa, PHGDH – 3-fosfoglycerátdehydrogenasa, PRODH – prolinoxidasa, SUOX –sulfitoxidasa, PTPS – 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasa, P5CDH – 1-pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa, HGD – homogentisát-dioxygenasa, 3-MCC – 3-methylkrotonyl-CoA karboxylasa, 3-MGC-CoA-hydratasa – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA hydratasa, CTH -  $\gamma$ -cystathionasa, SBCAD – acyl-CoA dehydrogenasa, MHBD –2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasa, IBD – isobutyryl-CoA dehydrogenasa, MLYCD – malonyl-CoA dekarboxylasa)

\*enzymový komplex, \*\*porucha je způsobena částečně sníženou aktivitou enzymu

Metabolismus	Porucha	Defektní enzym (EC)	Abnormality
<b>Fenylalanin</b>	Fenylketonurie	PAH (EC 1.14.16.1)	↑ fenylalanin
	Hyperfenylalaninemie (porucha metabolismu biopterinu)	GTPCH (EC 3.5.4.16) PTPS (EC 4.6.1.10) DHPR (EC 1.5.1.34) PCD (EC 1.14.16.1) SR (EC 1.1.1.153)	↑ fenylalanin
<b>Větvené aminokyseliny</b>	Leucinoso (MSUD)	BCKD *	↑2-ketokyseliny ↑2-hydroxykyseliny ↑ leucin
	Isovalerová acidurie	IVD (CE 1.3.99.10)	↑kyselina isovalerová ↑deriváty kyseliny isovalerové
	Propionová acidurie	PCC (CE 4.1.1.41)	↑kyselina propionová ↑deriváty kyseliny propionové ↓kyselina tiglová
	Methylmalonová acidurie	MUT (EC 5.4.99.2)	↑methylmalonyl-CoA ↑kyselina methylmalonová
	3-Methylkrotonylglycinurie	3-MCC (EC 6.4.1.4)	↑3-methylkrotonyl-CoA ↑kyselina 3-methylkrotonová
	3-Methylglutakonová acidurie typu	3-MGC-CoA-hydratasa (EC 4.2.1.18)	↑kyselina 3-methylglutarová
	Deficit dehydrogenasy acyl- CoA s krátkými/větvenými řetězci	SBCAD (EC 1.3.99.12)	↑2-methylbutyrylglycin ↑2-methylbutyrylkarnitin
	Deficit 2-methyl-3- hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasy	MHBD (EC 1.1.1.178)	↑2-methyl-3-hydroxybutyrát
	Deficit isobutyryl-CoA dehydrogenasy	IBD (EC 1.3.99.3)	↑butyrylkarnitin ↑isobutyrylkarnitin
	Malonová acidurie	MLYCD (EC 4.1.1.9)	↑malonyl-CoA

Metabolismus	Porucha	Defektní enzym (EC)	Abnormality
Tyrosin	Tyrosinemie I typu	FAH (EC 3.7.1.2)	↑tyrosin ↑maleylacetoacetát ↑fumarylacetoacetát ↑sukcinylaceton ↑sukcinylacetoacetát
	Tyrosinemie II typu	TAT (EC 2.6.1.5)	↑tyrosin ↑4-hydroxyfenylpyruvát ↑4-hydroxyfenyllaktát ↑4-hydroxyfenylacetát
	Tyrosinemie III typu	HPD (EC 1.13.11.27)	↑tyrosin ↑4-hydroxyfenylpyruvát ↑4-hydroxyfenyllaktát ↑4-hydroxyfenylacetát
	Alkaptonurie	HGD (EC 1.13.11.5)	↑homogentisát ↑benzochinonacetát
	Hawkinsinurie **	HPD (EC 1.13.11.27)	↑2-cysteinyl-1,4-dihydroxycyklohexenylacetát ↑4-hydroxycykloxyacetát
Sírné aminokyseliny	Homocystinurie z důvodu defektu cystathionin $\beta$ -syntasy	CBS (EC 4.2.1.22)	↑methionin ↑homocystein ↑S-adenosyl-derivaty methioninu a homocysteinu ↓cystathionin ↓cystein
	Deficit methionin S-adenosyltransferasy	MAT (EC 2.5.1.6)	↑methionin
	Deficit glycin N-metyltransferasy	GMT (EC 2.1.1.20)	↑methionin ↑S-adenosylmethionin
	Deficit S-adenosylhomocysteinhydrolasy	SAHH (EC 3.3.1.1)	↑S-adenosylhomocystein ↑S-adenosylmethionin ↑methionin ↓fosfatidylcholin ↓cholin
	Deficit $\gamma$ -cystathionasy	CTH (EC 4.4.1.1)	↑cystathionin
	Izolovaný deficit sulfitoxidasy	SUOX (EC 1.8.3.1)	↑thiosulfát ↑S-sulfocystein

Metabolismus	Porucha	Defektný enzym (EC)	Abnormality
Močovinový cyklus	Deficit N-acetylglutamátsynthetasy	NAGS (EC 2.3.1.1)	↑glutamin ↑alanin ↑amoniak
	Deficit karbamoylfosfátsynthetasy	CPS (EC 6.3.4.16)	↑glutamin ↑alanin ↑amoniak ↓citrullin ↓arginin
	Deficit ornithintranskarmylasy	OTC (EC 2.1.3.3)	↑glutamin ↑alanin ↑kyselina orotová ↑amoniak ↓citrullin ↓arginin
	Citrullinemie	ASS (EC 6.3.4.5)	↑citrullin ↑kyselina orotová ↑amoniak
	Argininojantarová acidurie	ASL (EC 4.3.2.1)	↑citrullin ↑kyselina orotová ↑kyselina argininojantarová ↑amoniak ↓arginin
	Hyperargininemie	ARG (EC 3.5.3.1)	↑arginin ↑kyselina orotová ↑amoniak
Ornithin	Hyperornithinemie z deficitu ornithinaminotransferasy	OAT (EC 2.6.1.13)	↑amoniak ↑ornithin
	HHH syndrom	OTC (EC 2.1.3.3) OAT (EC 2.6.1.13)	↑ornithin ↑amoniak ↑homocitrulin
Glycin	Novorozenecká NKHG (neketotická hyperglycinemie)	GCS *	↑glycin
Prolin	Hyperprolinemie I typu	PRODH (EC 1.5.99.8)	↑prolin
	Hyperprolinemie II typu	P5CDH (EC 1.5.1.2)	↑prolin ↑pyrrolin-5-karboxylát
Serin	Deficit 3-fosfoglycerátdehydrogenasy	PHGDH (EC 1.1.1.95)	↑3-fosfoglycerát

Metabolismus	Porucha	Defektní enzym (EC)	Abnormality
Lysin, tryptophan	Hyperlysinemie	AASDHPPT (EC 1.2.1.31)	↑lysín ↑pipekolát
	2-amino-2oxoadipová acidurie	AAT (EC 2.6.1.39)	↑kyselina 2-aminoadipová
	Glutarová acidurie I typu	GCHD (EC 1.3.99.7)	↑glutaryl-CoA
	L-2-hydroxyglutarová acidurie	L2HGDH (EC 1.1.99.2)	↑kyselina L-2-hydroxyglutarová ↑lysín
	D-2-hydroxyglutarová acidurie	D2HGDH (EC 1.1.99.6)	↑kyselina D-2-hydroxyglutarová
	Choroba Canavanové	ASPA (EC 3.5.1.15)	↑N-acetylaspartát

## 2.1 Fenyلكetonurie (PKU)

Fenyلكetonurie je vrozená porucha metabolismu aminokyseliny fenylalaninu způsobena mutací fenylalaninhydroxylasy. PAH je primárně exprimována v játrech, kde hydroxyluje fenylalanin na tyrosin za přítomnosti kofaktoru tetrahydrobiopterinu, kyslíku a železa. Ztráta funkce PAH vede ke zvýšené koncentraci fenylalaninu v krvi a tím dochází k toxickým účinkům na mozek. Fenyلكetonurii lze klasifikovat dle vážnosti hyperfenylalaninemie na mírnou hyperfenylalaninemii, mírnou fenyلكetonurii a klasickou fenyلكetonurii (Tab.3).

Tab.3: Klasifikace fenyلكetonurie dle koncentrace fenylalaninu v krvi (Lindner, 2006)

Klasifikace	Koncentrace fenylalaninu v krvi (μmol/l)
Fyziologická hladina	50 – 110 μmol/l
Mírná hyperfenylalaninemie	120 – 600 μmol/l
Mírná fenyلكetonurie	600 – 1200 μmol/l
Klasická fenyلكetonurie	nad 1200 μmol/l

Neléčená fenyلكetonurie se projevuje progresivní duševní nezpůsobilostí, mentální retardací doprovázenou dalšími symptomy jako je ekzém, autismus nebo záchvaty (Scriver et al., 2001). Včasnou diagnostikou a lékařskou intervencí se zabrání vážnému mentálnímu postižení (Walter et al., 2002).

Výskyt této choroby je ve světě rozdílný. V Evropě se obecně vyskytuje jeden případ na deset tisíc živě narozených dětí, ale například Finsko má incidenci nemoci pouze jeden případ na sto tisíc živě narozených dětí (Tab.4)

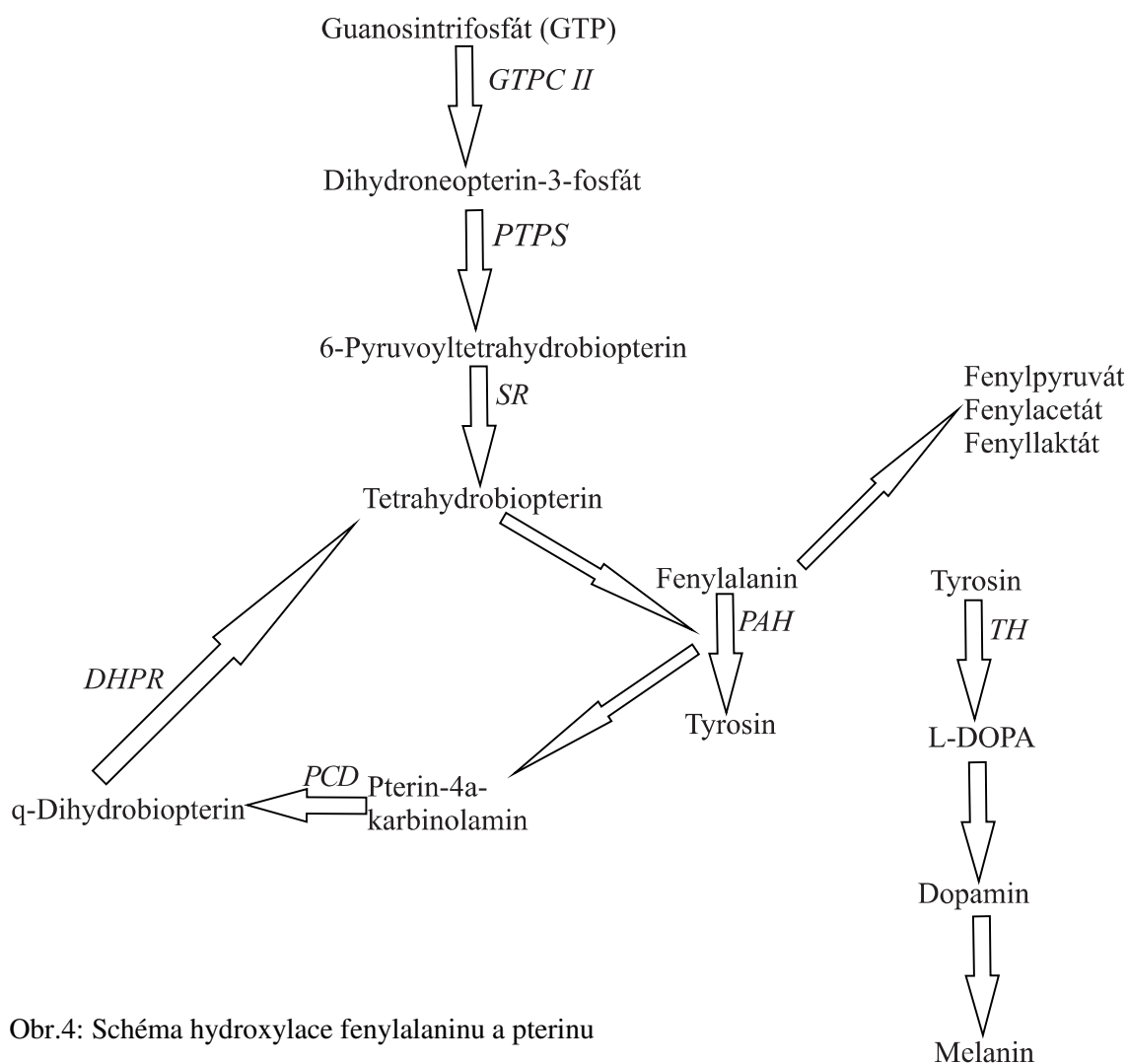
Tab.4: Incidence fenylketonurie ve vybraných zemích

Země	1 případ na počet živě narozených dětí
Evropa	1 : 10 000 (Loeber, 2007)
Finsko	1 : 100 000 (Guldberg et al., 1995)
Turecko	1 : 4000 (Ozalp et al., 2001)
USA	1 : 15 000
Latinská Amerika	1 : 25 000 – 50 000 * (Borrajo, 2007)

\*Pozn: prevalence je vyšší v jižní Latinské Americe

### 2.1.1 Metabolismus fenylalaninu

Fenylalanin je esenciální aminokyselina, kterou získáváme z potravy. Patří mezi glukogenní a ketogenní aminokyseliny. Spolu s tyrosinem je prekurzorem biosyntézy hormonů adrenalinu, tyroxinu a trijodthyroninu, kožního pigmentu melatoninu (Obr.4). V potravě přijatý fenylalanin je částečně metabolizován na tyrosin a druhá část je využita k syntéze proteinů.



Obr.4: Schéma hydroxylace fenylalaninu a pterinu

TH - tyrosinhydroxylasa, TPH – tryptophanhydroxylasa

### 2.1.2 Molekulární podstata

Fenylketonurie je autosomálně recesivní choroba. Do roku 2007 bylo popsáno 548 různých mutací v lidské PAH (Scriver, 2007), z toho představuje 50% missense mutací. 1 – 2 % případů hyperfenylalaninemie je zapříčiněno poruchou enzymu biosyntézy nebo regenerace tetrahydrobiopterinu (Thony & Blau, 2006).

### 2.1.3 Patogeneze

Dosud není zcela objasněna patogeneze poškození mozku u fenylketonurie, ale je kauzálně spjata se zvýšenou koncentrací fenylalaninu v krvi.

Poruchou funkce PAH dochází ke zvýšení hladiny fenylalaninu a ke snížení hladiny tyrosinu v krvi. Tento stav vede k poruše biosyntézy aminů, jako je melanin, dopamin a noradrenalin. Dále dochází k disbalanci dlouhých neutrálních aminokyselin v mozku, což způsobuje zvýšenou hladinu tyrosinu a serotoninu. Mezi další mechanismy poškozující mozek při hyperfenylalaninemii je snížená aktivita pyruvatkinasy (Horster et al., 2006), narušení glutamatergní neurotransmise (Martynyuk et al., 2005), snížení aktivity enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasy (Shefer et al., 2000) a snížení enzymatické funkce monoaminoxidasy B (Ghozlan et al., 2004).

### 2.1.4 Diagnostika

Zjištění zvýšené koncentrace fenylalaninu ( $>120 \mu\text{mol/l}$ ) v novorozeneckém screeningu, vede k provádění dalších testů, které potvrdí nebo vyloučí diagnosu. Stanovuje se celkový stav aminokyselin v krvi a moči, významné jsou koncentrace fenylalaninu a tyrosinu. Dále se vyšetřuje, zda není porucha v syntéze nebo regeneraci tetrahydrobiopterinu.

### 2.1.5 Terapie

Cílem terapie je snížit hladinu fenylalaninu v organismu, která je pro tělo toxická a způsobuje vážné poškození zdraví.

#### Dieta

Pacienti s fenylketonurií musí dodržovat speciální semisyntetickou dietu. Dělí potraviny na *potraviny s velmi nízkým obsahem fenylalaninu* (neomezený příjem – sacharidy, ovoce), *potraviny se středním obsahem fenylalaninu* (vypočítané množství – brambory, špenát, brokolice, nízkobílkovinný chléb a těstoviny), *směsi aminokyselin bez fenylalaninu* (vypočítané množství – obohacené vitaminy, minerály a stopové prvky) a *stravu s vysokou koncentrací fenylalaninu* (z jídelníčku úplně vypustit – maso, ryby, jogurt, obilí, zmrzlina).

Mateřské mléko má relativně nízkou koncentraci fenylalaninu, proto se doporučuje kojení. Dnes jsou i k dispozici *kojenecké výživy s aminokyselinami bez fenylalaninu*.

*Glycomacropeptid* je protein získaný ze syrovátky, bohatý na aminokyseliny, ale neobsahuje tyrosin, tryptophan a fenylalanin (Laclair et al., 2009) a může být užitečným doplňkem v dietě.

### **Tetrabiopterin**

U některých pacientů exogenní příjmem tetrabiopterinu dochází ke zvýšení aktivity PAH a tím ke snížení fenylalaninu (Phe) v krvi až na terapeutickou hladinu (Zurflü et al., 2008). Exogenní dávka tetrabiopterinu může zvýšit vazebnou afinitu mutované PAH k tetrabiopterinu, ochránit aktivní tetramerický enzym před degradací, zvýšit biosyntézu BH<sub>4</sub> a zvýšit expresi PAH. Studie uvádějí, že tento mechanismus účinku je multifaktoriální. Na snížení hladiny Phe v krvi by se tedy měly podílet všechny čtyři zmíněné účinky (Blau & Erlandsen, 2004).

### **Alternativní přístupy léčby**

Fenylketonurie je vážné onemocnění, u kterého pacient musí dodržovat velmi striktně dietu. Tato léčba je sice účinná, ale je pro nemocného obtěžující, proto se výzkum nadále zabývá dalšími možnostmi léčby.

Fenylalninamoniumlyasa (EC 4.3.5.1) je enzym získaný z bakterie, který katalyzuje bez kofaktoru přeměnu L-fenylalaninu na kyselinu trans skořicovou a amoniak (MacDonald & D’Cunha, 2007). Tento druh léčby je zatím ve stádiu výzkumu.

Transplantace jater zcela spravuje deficit PAH, ale rizika spojená s transplantací jsou příliš vysoké, proto se k této léčbě nepřistupuje.

Pomocí genová terapie by mohlo dojít k úplné nápravě, ale bohužel vnesené neviróvé nebo rekombinantní adenovirové vektory dosud nevedly k trvalé fenotypové korekci (Ding et al., 2004).

## **2.2 Nemoc javorového sirupu (leucinos, MSUD)**

Je geneticky podmíněná choroba způsobená deficitem dehydrogenasového komplexu 2-ketokyselin s větveným řetězcem (BCKD).

Nástup klinických příznaků může být rozlišný. Nemoc lze klasifikovat na těžkou novorozeneckou formu s metabolickým rozvratem, akutní intermitentní formu s opožděným začátkem a chronickou progresivní formu. Relativně velmi častý je i výskyt asymptomatické formy nemoci.

Mezi první příznaky patří nasládlý karamelový zápach moče připomínající javorový sirup. Nemoc se projevuje opakovanými atakami postihující nervový systém (kóma, letargie), může dojít k rozvratu vnitřního prostředí (ketoacidosa) a narušení funkce jater. Chronická forma

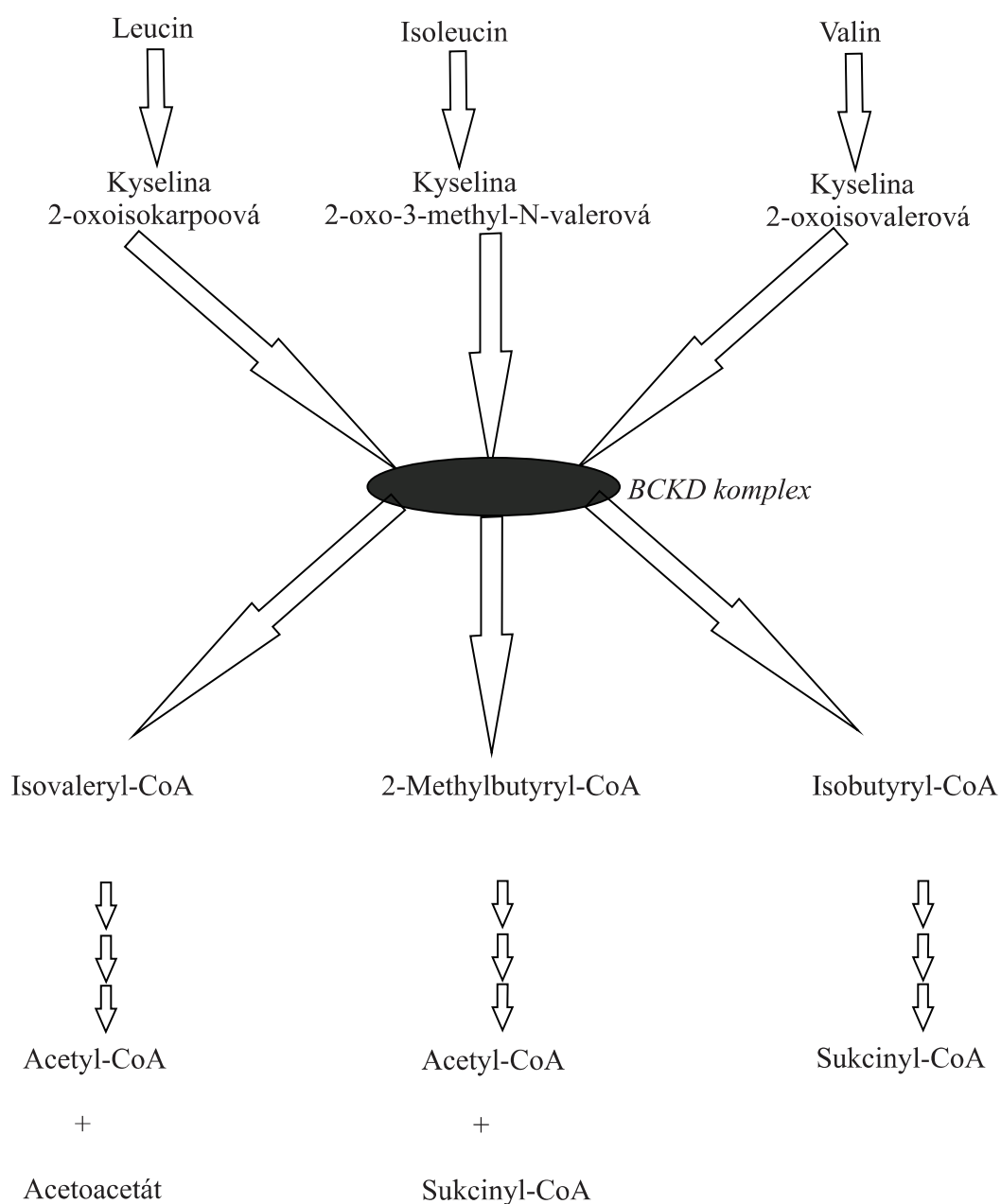


nemoci poškozuje i gastrointestinální trakt (trvalá anorexie, chronické zvracení, neprospívání a osteoporóza).

Prevalence této choroby je ve světě rozdílná, udává se jeden případ na sto dvacet tisíc až pět set tisíc živě narozených dětí. V zemích, kde jsou obvyklé příbuzenské sňatky je incidence této nemoci vyšší (např. Turecko – 1 případ na 50 000 živě narozených dětí)

### 2.2.1 Metabolismus leucinu, isoleucinu a valinu

Leucin, isoleucin a valin jsou esenciální alifatické aminokyseliny (Obr.5).



Obr.5: Schéma metabolismu leucinu, isoleucinu a valinu

### 2.2.2 Molekulární podstata

Leucinososa je autosomálně recesivní choroba, u které bylo dosud popsáno 150 různých asociovaných mutací, které způsobují klasický nebo intermitentní klinický fenotyp (Aevarsson et al., 2000). Enzymový komplex BCKD se skládá ze tří podjednotek a každá z nich má gen lokalizovaný na jiném chromosomu (Nellis & Danner, 2001). Dekarboxylasa E1 se skládá z podjednotek E<sub>1α</sub> a E<sub>1β</sub>, kde E<sub>1α</sub> má gen umístěný na dlouhém raménku chromosomu 19, E<sub>1β</sub> gen na krátkém raménku chromosomu 6. Dihydrolipoacyltransferasa E2 má gen umístěn na krátkém raménku chromosomu 1, dihydrolipoamiddehydrogenasa E3 na dlouhém raménku chromosomu 7. Mutace v genu pro podjednotky E1 a E2 způsobuje nemoc javorového sirupu a mutace v genu pro podjednotky E3 specifický syndrom.

### 2.2.3 Patogeneze

BCKD je enzymový komplex, který dekarboxyluje 2-ketokyseliny vzniklé ve druhém kroku katabolismu leucinu, isoleucinu a valinu. Z tohoto důvodu dochází k jejich kumulaci v krvi, moči a mozkomíšním moku. První krok transaminace je reversibilní reakce, proto dochází k přeměně 2-ketokyselin na aminokyseliny a jejich hromadění.

Mezi nejvíce toxické metabolity patří leucin a kyselina 2-oxoisokaproová, která negativně ovlivňují mozkové funkce.

### 2.2.4 Diagnostika

Stanovení koncentrace leucinu v krevní skvrně patří v České republice do novorozeneckého screeningu. V případě zvýšené koncentrace leucinu se stanovují hladiny dalších aminokyselin v krvi a moči. Pro potvrzení diagnózy se dále provádí enzymová studie.

### 2.2.5 Terapie

Včasná diagnostika a zahájení adekvátní léčby je nutné pro minimalizaci poškození CNS (centrální nervový systém). V akutní fázi klasické leucinosy se provádí exogenní odstranění toxinů (hemodialýza, hemofiltrace s vysokoenergetickou dietní terapií) (Jouvet et al., 1997). Po úspěšném překonání akutní fáze nemoci se přechází na dlouhodobou léčbu, která spočívá v přísném dodržování semisyntetické diety (snížení příjmu větvených aminokyselin, hlavně leucinu).

### 3 Dědičné metabolické poruchy oligopeptidů

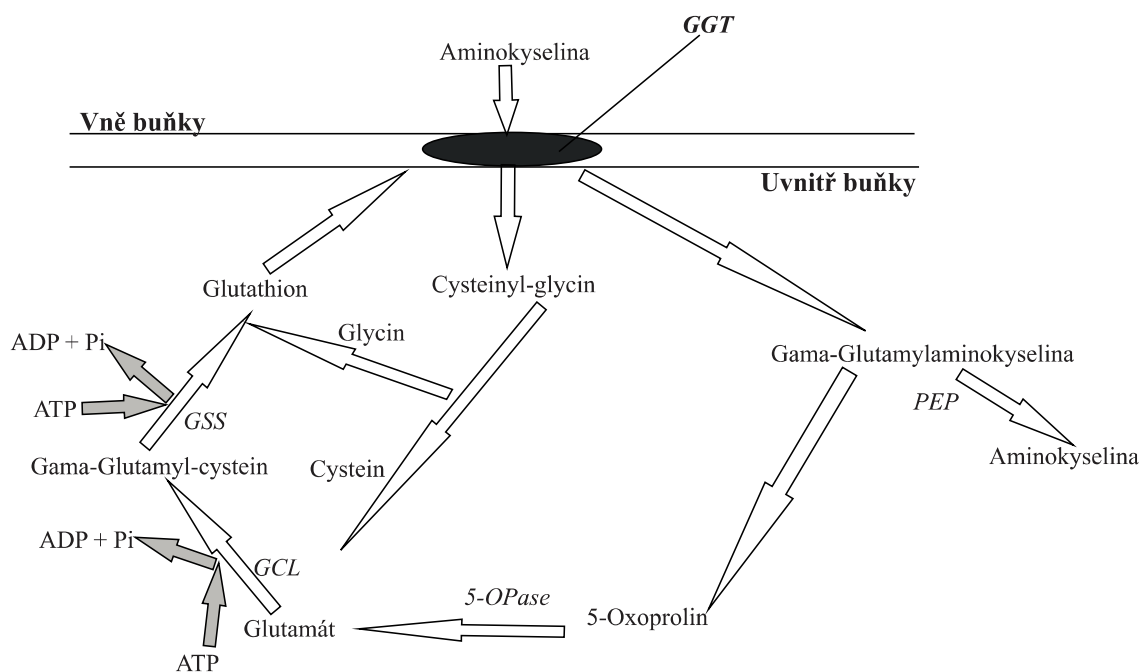
V této kapitole se budu věnovat dědičným poruchám metabolismu glutathionu, imidazolových dipeptidů a deficitu prolidasy.

#### 3.1 Dědičné metabolické poruchy glutathionu

Dědičné metabolické poruchy glutathionu jsou způsobeny deficitem enzymů v  $\gamma$ -glutamyllovém cyklu. Patří sem nemoci jako deficit  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasy, deficit glutathionsynthetasy, deficit  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasy a deficit 5-oxoprolinasy.

##### 3.1.1 Metabolismus glutathionu

Glutathion je tripeptid složený z glutamátu, cysteinu a glycinu, je tvořen v  $\gamma$ -glutamyllovém cyklu probíhající v buňkách (Obr.6). Je přítomen téměř ve všech buňkách a má významnou roli v řadě biologických funkcí, jako je biosyntéza DNA a proteinů, detoxikace xenobiotik a karcinogenů, odstraňování volných radikálů, transport aminokyselin a metabolismu léků.



Obr.6:  $\gamma$ -Glutamyllový cyklus

ADP - adenosindifosfát, ATP - adenosintrifosfát, GCL –  $\gamma$ -glutamyl-cysteinsynthetasa,

GGT- gama-glutamyltransferasa, GSS - glutathionsynthetasa, PEP - dipeptidasa,

Pi – odštěpený anorganický fosfát, 5-OPase – 5-oxoprolinasa,

### **3.1.2 Deficit $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasy**

Deficit  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasy je nemoc projevující se hemolytickou anemií a neurologickými symptomy. Dodnes byla diagnostikována pouze u 9 pacientů ze 7 rodin (Fernandes et al., 2008).

#### **3.1.2.1 Molekulární podstata**

Deficit  $\gamma$ -glutamylcysteinsynthetasy je velmi vzácná autosomálně recesivní porucha.  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetasa je enzym skládající se ze dvou podjednotek (lehká - regulační, těžká-katalytická). Tyto podjednotky jsou kódovány dvěma různými geny, gen pro lehkou podjednotku leží na chromosomu 1p21 (Sierra-Rivera et al., 1996) a gen pro těžkou podjednotku je lokalizován na chromosomu 6p12 (Sierra-Rivera et al., 1995).

#### **3.1.2.2 Patogeneze**

Porucha se u všech pacientů projevovala sníženou koncentrací glutathionu v erythrocytech, leukocytech a kosterních svalech. Také byl pozorován úbytek erytrocytů. Další symptomy byly u pacientů rozličné.

#### **3.1.2.3 Diagnostika**

Pro potvrzení diagnózy se provádí mutační analýza a měření aktivity enzymu v erythrocytech.

#### **3.1.2.4 Terapie**

Pacienti by se měli vyvarovat léků a potravy, které vyvolávají hemolytickou krizi.

### **3.1.3 Deficit glutathionsyntetasy**

Tuto nemoc můžeme klasifikovat dle závažnosti klinických příznaků na vážnou, středně vážnou a mírnou formu. U pacientů s mírnou formou byla popsána pouze hemolytická anemie. Středně vážná forma nemoci se u pacientů projevovala již po narození jako metabolická acidosa, oxoprolinurie, hemolytická anemie a žloutenka. Stav pacienta se obvykle po novorozeneckém období stabilizoval. Infekce mohou vyvolat u takto nemocných lidí závažnou acidosu a disbalanci elektrolytů, která pro ně může být fatální. Závažná forma nemoci se projevuje progresivním postižením CNS, jako je mentální retardace, ataxie, křeče a spasticita.

Deficit glutathionsyntetasy byl dosud diagnostikován u 65 pacientů v 55 rodinách (Fernandes et al., 2008).

#### **3.1.3.1 Molekulární podstata**

Je autosomálně recesivní choroba, kde mutovaný gen pro enzym leží na chromosomu 20q11 (Webb et al., 1995). Vážná a středně vážná forma je asociována s mutací postihující

katalytické vlastnosti enzymu, mírná forma je způsobena mutací způsobena nestabilitou enzymu.

### **3.1.3.2 Patogeneze**

Pro tento deficit je charakteristická snížená koncentrace glutathionu a zvýšená koncentrace  $\gamma$ -glutamylcysteinu.  $\gamma$ -Glutamylcystein je přeměněn na 5-oxoprolin, ten je dále metabolizován 5-oxoprolinase na glutamát. Při excesivní tvorbě 5-oxoprolinu dochází k jeho kumulaci v tělních tekutinách, z důvodu limitující koncentrace 5-oxoprolidasy, způsobuje tak 5-oxoprolinurii a metabolickou acidosu.

### **3.1.3.3 Diagnostika**

U novorozenců s těžkou formou nemoci se projevuje metabolická acidosa. V moči je stanovena zvýšená koncentrace 5-oxoprolinu.

Pro potvrzení diagnózy se měří aktivita GS v erythrocytech, leukocytech nebo kultivovaných kožních fibroblastech, dále se provádí mutační analýza.

### **3.1.3.4 Terapie**

Prvním krokem léčby je úprava acidózy. Byly provedeny studie, kde podávání vitamínu E a C vedlo ke zlepšení stavu (Fernandes et al., 2008).

## **3.2 Dědičné metabolické poruchy imidazolových dipeptidů**

Imidazolové dipeptidy obsahují imidazolové jádro histidinu, do této skupiny patří karnosin a anserin. Dosud byly popsány dvě choroby, deficit sérové karnosinasy a homokarnosinasy.

### **3.2.1 Metabolismus karnosinu, anserinu a homokarnosinu**

Karnosin, také znám jako  $\beta$ -alanylhistidin, se nachází v kosterním svalstvu a mozku, kde může fungovat jako neurotransmitter. Cytosolová a sérová karnosinasa jsou dva isoenzymy, které ho hydrolyzují. Cytosolová karnosinasa se nachází ve všech lidských tkáních, neúčastní se hydrolyzy anserinu a homokarnosinu, ale má vysokou dipeptidasovou specifitu. Pomocí sérové karnosinasy dochází k hydrolyze karnosinu a anserinu, avšak velmi špatně katalyzuje hydrolyzu homokarnosinu. S věkem stoupá její aktivita.

Anserin, také znám jako  $\beta$ -alanyl-1-methylhistidin, je dipeptid, který se za fyziologických okolností v lidských tělních tekutinách a tkáních nenachází. Nepatrné množství může pocházet ze stravy.

Homokarnosin, také znám jako  $\gamma$ -aminobutyrylhistidin, je specifický peptid nacházející se v mozku. Jeho funkce není dosud jasná. Je hydrolyzován sérovou karnosinase.

### **3.2.2 Deficit sérové karnosinasy**

Tato nemoc se projevuje mentální retardací různého stupně, v některých případech byly popsány křečové stavy.

Porucha byla poprvé popsána v roce 1967 (Perry et al., 1967) a dodnes bylo zaznamenáno 30 případů (Fernandes et al., 2008).

#### **3.2.2.1 Molekulární podstata**

Deficit sérové karnosinasy je autosomálně recesivní choroba. U dětí s 18q syndromem byl též popsán deficit tohoto enzymu, což naznačuje lokalizaci genu pro tento protein (Williet al., 1997).

#### **3.2.2.2 Patogeneze**

U tohoto onemocnění dochází při bezmasé dietě k trvalé karnosinurii. Zdravý jedinec při požití anserinu vyloučí močí jeho metabolit (1-methylhistidin), u nemocných je koncentrace metabolitu v moči nízká.

#### **3.2.2.3 Diagnostika**

Diagnostika se provádí stanovením aminokyselin v krvi a moči při bezmasé dietě. Dále se může stanovit aktivita karnosinasy v séru, která může být snížena i u poruch močoviného cyklu a *sclerosis multiplex* (Wassif et al., 1994).

#### **3.2.2.4 Terapie**

V současné době není žádná účinná léčba známá.

### **3.2.3 Homokarnosinosa**

Nemoc se projevuje mentální retardací různého stupně, u některých pacientů byly popsány spastická diplegie a *retinitis pigmentosa*.

Nemoc byla poprvé popsána v roce 1976 (Sjaastad et al., 1976) a dodnes byly zaznamenány 4 případy (Fernandes et al., 2008).

#### **3.2.3.1 Molekulární podstata**

Nejspíše se jedná o autosomálně recesivní onemocnění (Fernandes et al., 2008).

#### **3.2.3.2 Patogeneze**

U 3 případů ze 4 byla objevena zvýšená hladina homokarnosinu v likvoru, koncentrace karnosinu byla přitom fyziologická. Domnívá se, že homokarnosinosa a deficitu sérové karnosinasy je pravděpodobně stejná porucha (Fernandes et al., 2008).

#### **3.2.3.3 Diagnostika**

Pro diagnostiku této poruchy se využívá kvantitativní analýza aminokyselin v likvoru.

### **3.2.3.4 Terapie**

Dosud nebyla popsána žádná účinná léčba.

## **3.3 Deficit prolidasy**

Pro toto onemocnění jsou charakteristické kožní léze predilekčně se vyskytující na dolních končetinách, dále porucha motoriky, či mentálního vývoje a časté opakující se infekce. Asi jedna čtvrtina pacientů je však asymptomatická.

Nemoc byla poprvé popsána v roce 1968 (Goodman et al., 1968) a dodnes bylo zaznamenáno 40 případů (Fernandes et al., 2008).

### **3.3.1 Molekulární podstata**

Tato choroba se dědí autosomálně recesivně, gen pro prolidasu je lokalizován na chromosomu 19q13 (McAlpine et al., 1976).

### **3.3.2 Patogeneze**

Abnormálním nálezem je masivní vylučování imidopeptidů, jedná se o dipeptidy, které mají na N-terminálním konci prolin nebo hydroxyprolin.

### **3.3.3 Diagnostika**

Pro určení diagnózy se stanovuje koncentrace imidodipeptidů v moči.

### **3.3.4 Terapie**

Zkušenosti s léčbou jsou malé vzhledem k nízké incidenci choroby (Fernandes et al., 2008).

# **Experimentální část**



## 4 Materiál

### 4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byly analyzovány vzorky sér a lidské kožní fibroblasty. Séra pocházela od dětí vyšetřovaných pro podezření na dědičnou metabolickou poruchu.

### 4.2 Chemikálie

#### Standardy aminokyselin, derivátů aminokyselin a oligopeptidů:

Alanin, beta-alanin, fenylserin, valin, tyrosin, tryptophan, serin, cysteát, O-fosfo-L-serin, N-methylhistidin, 4-hydroxyprolin, 5-hydroxytryptophan, isoleucin, arginin, glycy-leucin, karnosin, L-anserin byly zakoupeny u firmy Calbiochem (Darmstadt, Německo). Threonin, prolin, methionin, cystin, asparagin, fenylalanin, glycin, leucin, lysin, cystathionin, sarkosin, aspartát, glycy-glycy-glycy-glycin, glycy-L-tryptophan, D,L-alanyl-D,L-asparagin, histidyl-histidin, glycy-glycin, glycy-glycy-glycin, alanyl-alanin, D,L-alanyl-D,L-norvalin, glycy-norvalin, L-leucyl-L-tyrosin, glycy-L-tyrosin, DL-leucyl-glycy-glycin, D,L-alanyl-D,L-fenylalanin, glycy-D,L-alanin, D,L-alanyl-D,L-valin, glycy-D,L-fenylalanin, D,L-alanyl-D,L-methionin, glycy-D,L-norleucin, D,L-alanyl-glycy-glycin, glycy-D,L-valin, glycy-D-asparagin byly zakoupeny u firmy Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland, Ohio). Norleucin, homocystin, N-acetyl-L-aspartát, homoserin, glutamin, N-acetylornithin, N-formylmethionin, cystein, 5-oxoprolin, 3-aminoisobutyrát, 2-aminoadipát, glutamát, homokarnosin, glutathion, S-lactoylglutathion byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA), ornithin u firmy Feinbiochemica (Německo, Heidelberg), citrullin u firmy LACHEMA (Brno, Česká republika) a histidin u firmy Reanal (Budapešť, Maďarsko).

#### Stabilně značené standardy:

Směs značených standardů (Alanin-D4, arginin-D7, aspartát-D3, citrullin-D2, glutamát-D5, glycin-C2N, leucin-D3, ornithin-D6, fenylalanin-D5, tyrosin-D4, valin-D8) byla zakoupena u firmy Chromsystems (Mnichov, Německo).

#### Roztoky:

Methanol LC-MS, acetonitril LC-MS, hydroxid amonný a kyselina octová byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pro přípravu všech roztoků byla použita voda LC-MS zakoupená též u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

### 4.3 Přístrojové vybavení

Studované látky byly analyzovány pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) Dionex Ultimate 3000 RS (Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

Při experimentech byly dále použity: vortex (IKA Works, USA), centrifuga (Micro 120, Hettich, Německo), sonifikátor (Kraintek s.r.o., Slovensko), analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Belling, Německo) a pH metr Cyberscan ph 510 (Thermo scientific, Waltham, MA, USA).

## 5 Metody

### 5.1 Příprava biologického materiálu

#### Příprava séra

K 25  $\mu$ l séra bylo přidáno 125  $\mu$ l směsi značených standardů rozpuštěných v methanolu. Séra byla vortexována (10 s), sonifikována (5 min) a centrifugována (2 min, 14 000 rpm). Odebraný supernatant byl před analýzou desetkrát naředěn vodou.

#### Příprava fibroblastů

Kožní fibroblasty byly quenchovány a extrahovány podle dříve popsaného postupu (Prachařová, 2010). K lyofilizovanému extraktu bylo přidáno 25  $\mu$ l vody a 125  $\mu$ l směsi značených standardů. Vzorky byly vortexovány (10 s), sonifikovány (5 min) a centrifugovány (2 min, 14 000 rpm). Supernatant byl desetkrát naředěn vodou.

#### Příprava standardů

Celkem 69 aminokyselin, oligopeptidů a jejich derivátů byly vybrány z Olomoucké metabolické databáze OLMEDA, která byla vytvořena v Laboratoři dědičných metabolických poruch a sdružuje data z databází HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), KEGG (<http://kegg.com/>) a dalších zdrojů. Zásobní standardy byly rozpuštěny ve vodě na výslednou koncentraci 0.1  $\mu$ mol/l.

### 5.2 Optimalizace MS/MS

Pro optimalizaci podmínek MS/MS byly zásobní roztoky studovaných látek naředěny na výslednou koncentraci 0,1  $\mu$ mol/l alkalickým pufrem (20mmol/l octan amonný, pH 9,45: acetonitril; 1:1) a poté aplikovány přímo do iontového zdroje syringe pumpou o průtoku 7 $\mu$ l/min. Prostřednictvím monoizotopových hmotností bylo identifikováno 5 nejintenzivnějších

multiple-reaction monitoring (MRM) přechodů. Pro každý MRM přechod byly optimalizovány deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE), vstupní potenciál (EP) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Optimalizace studovaných látek probíhala v pozitivním i negativním módu.

### **5.3 Optimalizace UHPLC**

Optimalizace podmínek UHPLC se skládala z výběru vhodné kolony, mobilní fáze, gradientové eluce, teploty, tlaku, množství nastříknutého vzorku a průtoku kolony. Dále se zjišťovaly retenční časy daných látek.

### **5.4 Analýza standardů**

Bylo vytvořeno deset směsí ze zásobních standardů (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ), které byly desetkrát naředěny alkalickým puftrem. Látky byly vybrány tak, aby se ve stejné směsi nevyskytovaly standardy o stejné nebo podobné monoizotopové hmotnosti (rozdíl větší jak 1 Da). Analýza takto připravených směsí probíhala za optimalizovaných podmínek a každá studovaná látka byla identifikována pomocí 5 MRM přechody.

Po zjištění retenčního času a výběru jednoho či dvou MRM přechodů pro každou látku byly jednotlivé směsi standardů analyzovány znovu s přidavkem směsi stabilně značených standardů. Poté byly vytvořeny pouze dvě směsi, směs 1 obsahovala 35 látek, směs 2 obsahovala 34 látek. Tyto směsi byly analyzovány pouze s jedním MRM přechodem za optimalizovaných podmínek.

### **5.5 Analýza vzorků**

Deproteinované vzorky s přidavkem stabilně značených standardů byly analyzovány za optimalizovaných podmínek stejným způsobem jako jednotlivé směsi standardů. V této metodě byl již pro identifikaci látek používán jeden MRM přechod, který byl srovnán s literaturou a opakovaně při analýze neznačených standardů ověřován.

### **5.6 Matricové efekty**

Při zjišťování matricových efektů bylo vybráno 5 neznačených standardů aminokyselin (leucin, prolin, glutamát, cystein a histidin), které se lišily MRM přechody a retenčním časem. Z těchto látek se vytvořila směs o koncentraci 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . Při analýze reálných vzorků (5 vzorků sér, 5 extraktů z kožních fibroblastů) se kontinuálně pomocí syringe pumpy o průtoku 0,3  $\mu\text{l/min}$  aplikovala tato směs přímo do iontového zdroje.

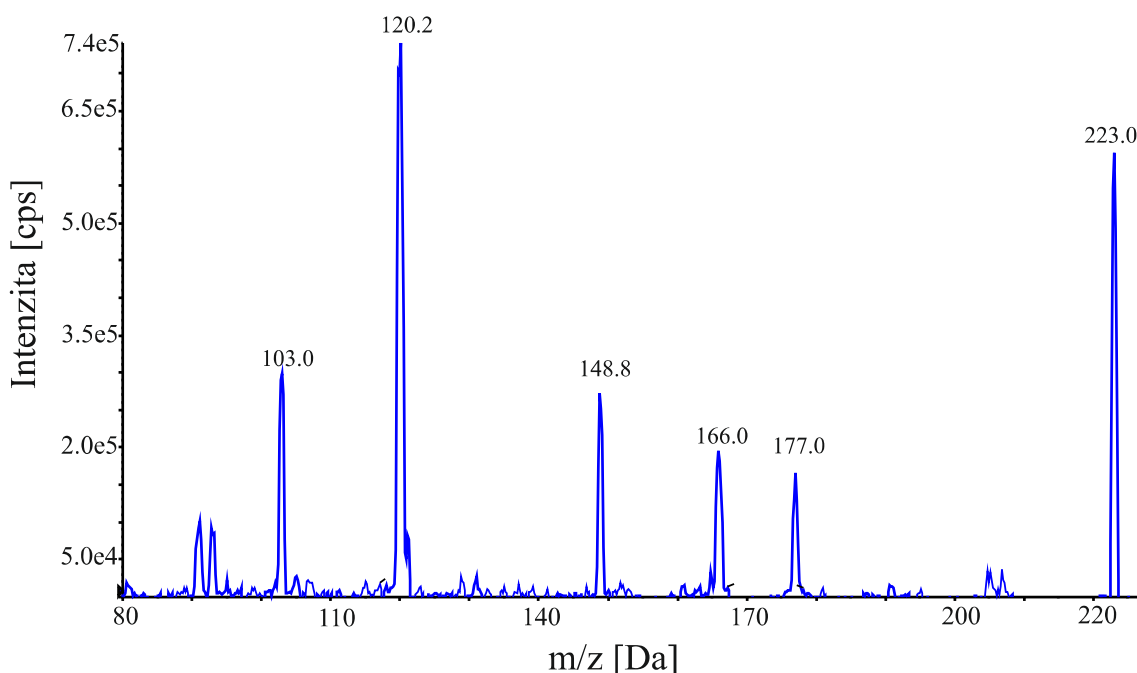
## 6 Výsledky

### 6.1 Optimalizace MS/MS metody

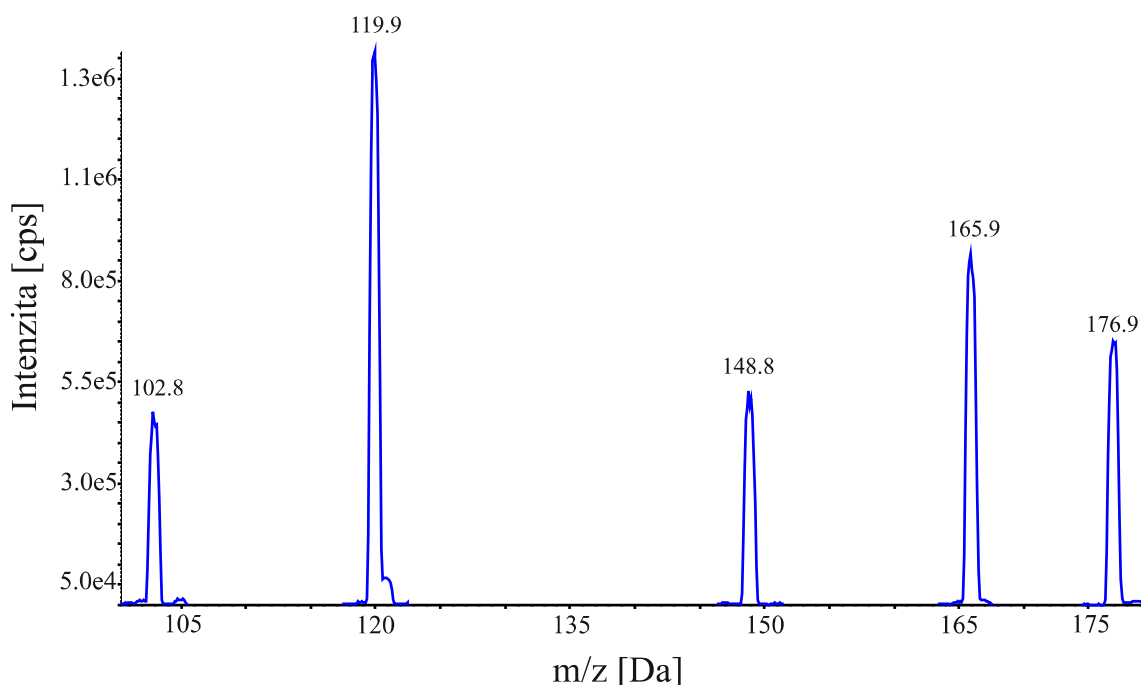
Při optimalizaci MS/MS metody byly nalezeny optimální MRM přechody studovaných látek. Všem studovaným látkám byla změřena hmotnostní spektra a fragmentační spektra molekulových iontů.

Jako příklad uvádím hmotnostní (Obr.7) a fragmentační (Obr.8) spektrum dipeptidu glycyl-fenylalaninu (GlyPhe). Hmotnostní spektrum GlyPhe obsahuje protonovaný molekulární ion  $m/z = 223.0$  Da a jeho dceřinné fragmenty. Pro další analýzy byl vybrán fragment  $m/z = 119,9$  Da. Fragmentační spektrum již vzniklo za optimalizovaných MS parametrů pro každý MRM přechod.

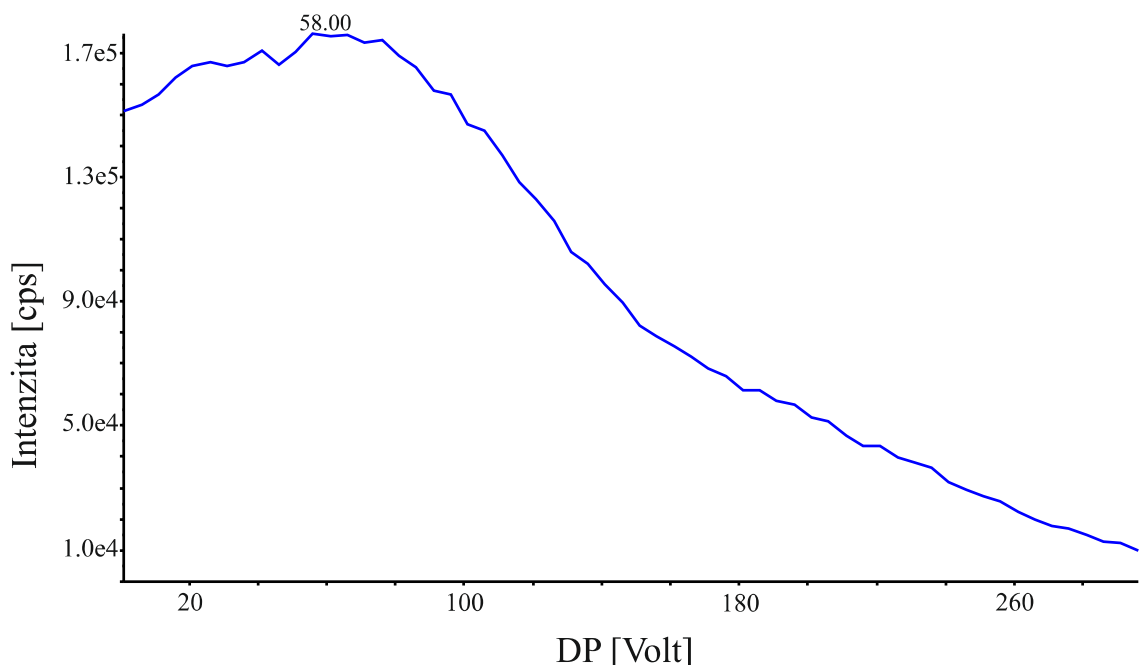
Při optimalizaci MS bylo zjištěno, že studované látky se lépe štěpí v pozitivním módu. Přístroj v průběhu optimalizace automaticky vyhodnotil 5 nejintenzivnějších MRM přechodů, dále se optimalizovaly parametry jako deklasterační potenciál (DP), vstupní potenciál (EP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Jako příklad uvádím optimalizaci GlyPhe DP (Obr.9), CE (Obr.10) a CXP (Obr.11).



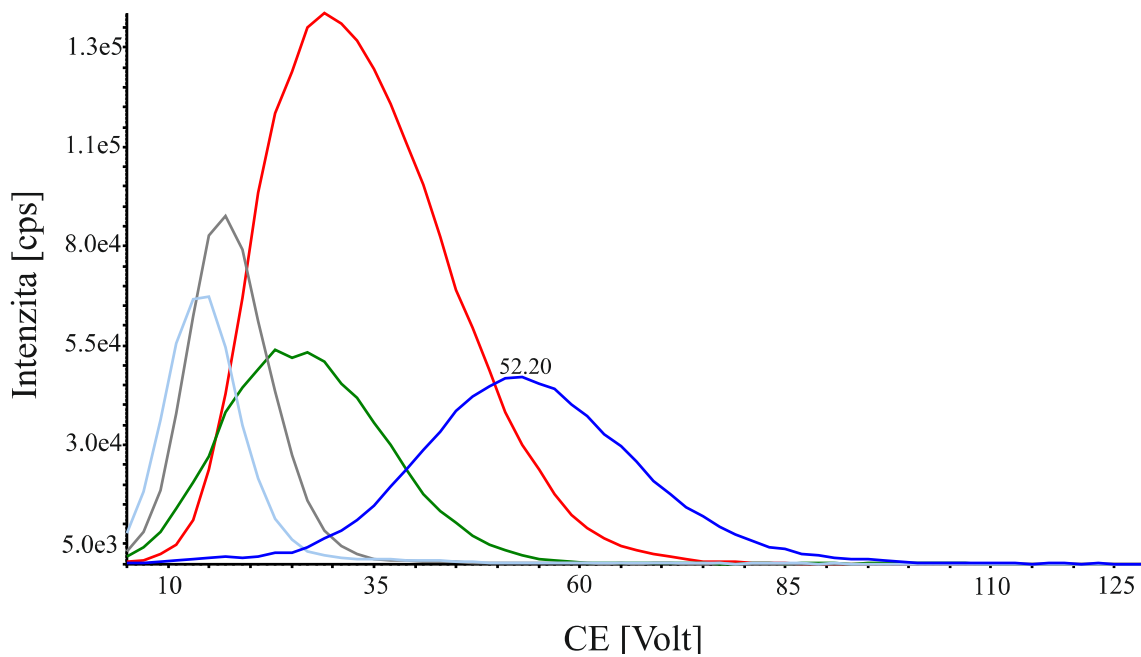
Obr.7: Hmotnostní spektrum dipeptidu GlyPhe



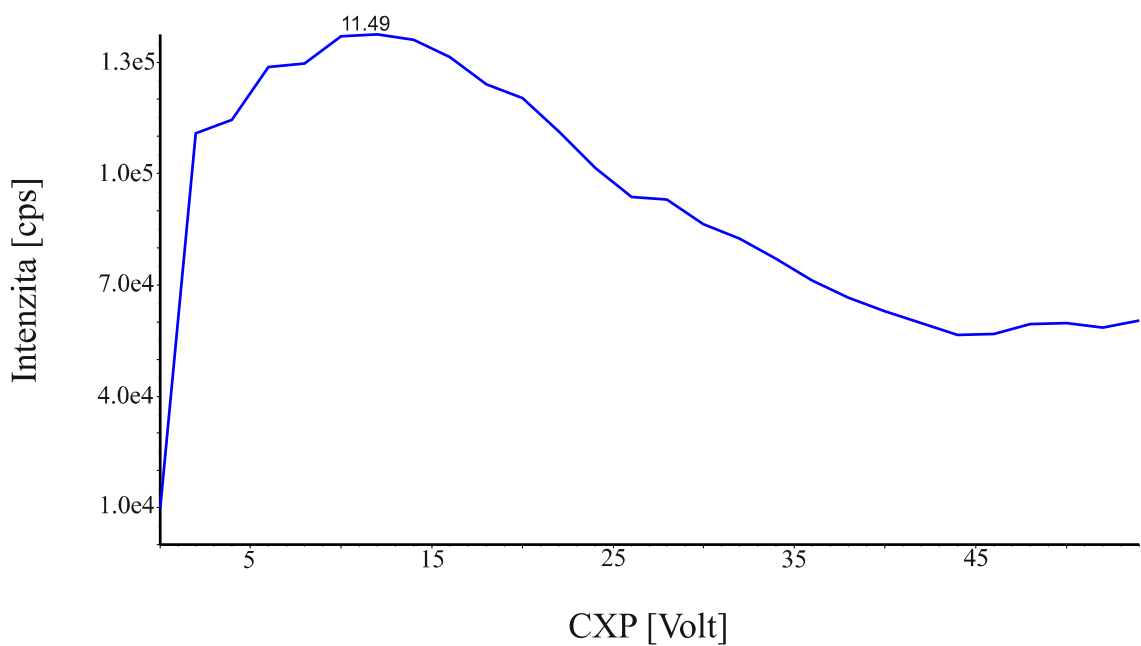
Obr.8: Fragmentační spektrum molekulového iontu GlyPhe



Obr.9: Optimalizace DP GlyPhe



Obr.10: Optimalizace CE 5 nejintenzivnějším MRM přechodů GlyPhe



Obr.11: Optimalizace CXP pro fragment 119.9 Da

V tabulce (Tab.5, 6, 7) je uveden přehled vybraných MRM přechodů, optimalizované parametry DP, EP, CE a CXP všech studovaných látek. Dále byly optimalizovány parametry jako tlak "curtain gas" (CUR – 30 psi), tlak kolizního plynu (CAD – medium), napětí na kapiláře

iontového zdroje (IS – 5500 V), teplota zmlžujících plynů (TEM – 500 °C), tlak zmlžujícího (GS1 – 40 psi) a sušícího plynu (GS2 – 40 psi).

Tab.5: Optimalizované parametry MS/MS aminokyselin a jejich derivátů

<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>ID</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
181,894	118	fenylserin	36	10	21	10
117,936	72,1	valin	56	10	17	8
204,896	145,8	tryptophan	41	10	25	14
89,911	71,9	beta-alanine	26	10	13	8
105,848	60	serin	16	10	15	8
115,916	69,9	prolin	31	10	21	8
131,909	86	norleucin	31	10	15	10
240,9	151,8	cystin	36	10	19	20
268,865	135,9	homocystin	56	10	15	12
155,888	110	histidin	46	10	19	10
181,914	136	tyrosin	46	10	19	12
119,92	73,9	threonin	41	10	15	8
133,911	106,9	asparagin	226	10	29	10
89,919	44,1	alanin	51	10	23	6
175,847	134	N-acetylaspartat	36	10	15	12
185,963	87,8	O-fosfo-L-serin	31	10	17	12
146,909	83,9	glutamin	66	10	25	10
169,923	96	N-methylhistidin	41	10	27	10
220,903	161,9	5-hydroxytryptophan	46	10	25	16
165,895	119,9	fenylalanin	36	10	19	12
119,91	102	homoserin	21	10	13	10
131,915	85,8	4-hydroxyprolin	41	10	19	10
174,896	114,9	N-acetylorithin	51	10	17	12
177,871	130	N-formylmethionin	46	10	15	12
75,898	58,6	glycin	41	10	13	8
103,988	86,1	3-aminoisobutyřat	56	10	11	8
161,81	98	2-aminoadipát	56	10	21	8
146,921	83,9	lysin	66	10	23	10
222,875	88,1	cystathionin	51	10	41	10
89,733	44,1	sarkosin	51	10	21	8
121,894	75,9	cystein	156	10	19	10
129,906	83,9	5-oxoprolin	51	10	19	10
132,857	115,6	ornithin	51	10	13	12
147,796	83,9	glutamát	41	10	23	8
175,865	112,8	citrullin	36	10	23	12
161,939	102,9	carnitin	56	10	23	10
131,951	86,1	leucin	51	10	15	10
131,918	86	isoleucin	31	10	15	10
133,854	87,9	aspartát	51	10	15	10

<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>ID</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
149,908	104	methionin	41	10	15	10
169,866	105,8	cysteát	96	10	27	12
174,9	115,8	arginin	51	10	19	10

Tab.6: Optimalizované parametry MS/MS peptidů

<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>ID</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
246,927	115,1	GlyGlyGlyGly	56	10	25	14
188,932	132	GlyLeu	56	10	17	12
261,949	188	GlyTrp	56	10	25	16
203,918	133,1	AlaAsn	46	10	17	12
292,967	110,1	HisHis	61	10	37	12
132,936	75,9	GlyGly	51	10	15	10
160,933	89,9	AlaAla	66	10	15	10
188,919	118,1	AlaNorval	46	10	15	12
174,928	72	GlyNorval	56	10	23	8
295,004	182	LeuTyr	56	10	17	20
189,632	114,8	GlyGlyGly	46	10	13	10
238,907	136	GlyTyr	1	10	27	12
146,912	89,9	GlyAla	56	10	15	10
222,878	119,9	GlyPhe	61	10	29	12
245,944	86	LeuGlyGly	51	10	21	10
236,934	166	AlaPhe	46	10	17	14
188,909	117,9	AlaVal	41	10	15	10
220,905	149,8	AlaMet	61	10	17	14
174,893	118	GlyVal	51	10	17	12
203,901	129	AlaGlyGly	36	10	13	12
188,908	131,9	GlyNorleu	41	10	17	12
226,89	109,9	karnosin	86	10	33	10
240,831	108,8	anserin	46	10	33	12
189,876	132,9	GlyAsp	31	10	19	16
240,843	155,9	homokarnosin	41	10	15	14
307,915	178,9	glutathion	41	10	17	16
380,304	233	S-lactoylglutathion	56	10	23	18

Tab.7: Optimalizované parametry MS/MS značených standardů

<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>ID</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
136,918	90,9	aspartát-D3	36	10	15	10
152,913	88,1	glutamát-D5	31	10	25	10
134,957	89,1	leucin-D3	51	10	15	10
152,913	136,1	methionin-D3	41	10	15	10
170,974	125,2	fenylalanin-D5	36	10	19	12
185,916	140,1	tyrosin-D4	46	10	19	12



Q1	Q3	ID	DP	EP	CE	CXP
125,885	80,1	valin-D8	56	10	17	8
181,913	123	arginin-D7	51	10	19	10
177,91	115	citrullin-D2	36	10	15	14
79,948	62,1	glycin-C2N	41	10	13	8
138,959	122,2	ornithin-D6	51	10	13	12

## 6.2 Optimalizace UHPLC

V další fázi experimentu byla optimalizována separace látek na koloně. Pro experiment byla použita kolona Luna s aminopropylovou stacionární fází (NH<sub>2</sub>) o průměru částic 3 μm a délce 150 mm. Separace probíhala při teplotě kolony 20 °C a tlak v průběhu analýzy kolísal od 70 do 230 barů. Byla použita gradientová eluce, kde mobilní fáze A obsahovala 20 mmol/l octan amonný (pH 9,45) a mobilní fáze B acetonitril. Lineární gradientová eluce probíhala za podmínek, v čase 0 minut s 95 % mobilní fáze B, do 10. minuty klesala k hodnotě 5 %. V čase 10 až 14,3 minuty byl udržován stav mobilní fáze B na 5 %. Od 14,3 do 15,3 minuty stoupalo zastoupení B na 95 % a tento stav se udržoval do konce analýzy. Celková analýza trvala 20 minut. Průtok kolonou byl 0,3 ml/min a nástřik 5 μl.

## 6.3 Analýza standardů

Metodou UHPLC-MS/MS se podařilo identifikovat všechny studované látky. Analýza směsi standardů probíhala za optimalizovaných podmínek a při separaci byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek (Tab.8).

Studovaným látkám byl přiřazen stabilně značený interní standard, který bude v příští studii použit ke kvantifikaci látek. Značené interní standardy mají velký význam i pro korekci matricových efektů.

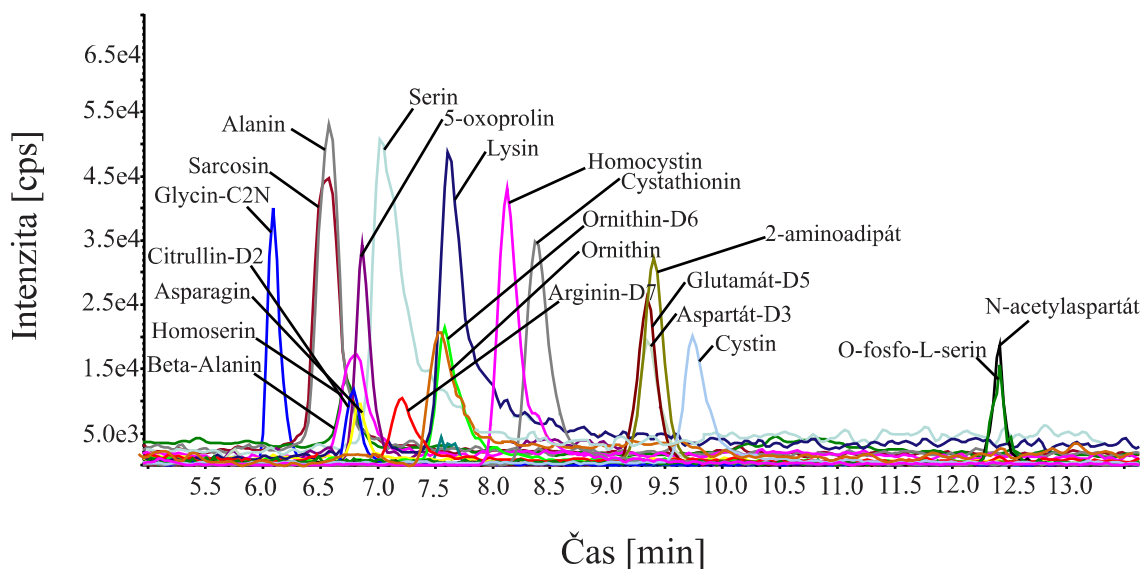
Tab.8: Retenční časy studovaných látek a příslušný stabilně značený standard

Q1	Q3	ID	Ret t (min)	Značený standard
131,915	85,8	4-hydroxyprolin	5,70	Leucin-D3
131,909	86	norleucin	5,74	Leucin-D3
131,951	86,1	leucin	5,75	Leucin-D3
131,918	86	isoleucin	5,75	Leucin-D3
75,898	58,6	glycin	5,94	Glycin-C2N
169,866	105,8	cysteát	5,99	Glycin-C2N
165,895	119,9	fenylalanin	6,01	Fenylalanin-D5
117,936	72,1	valin	6,12	Valin-D8

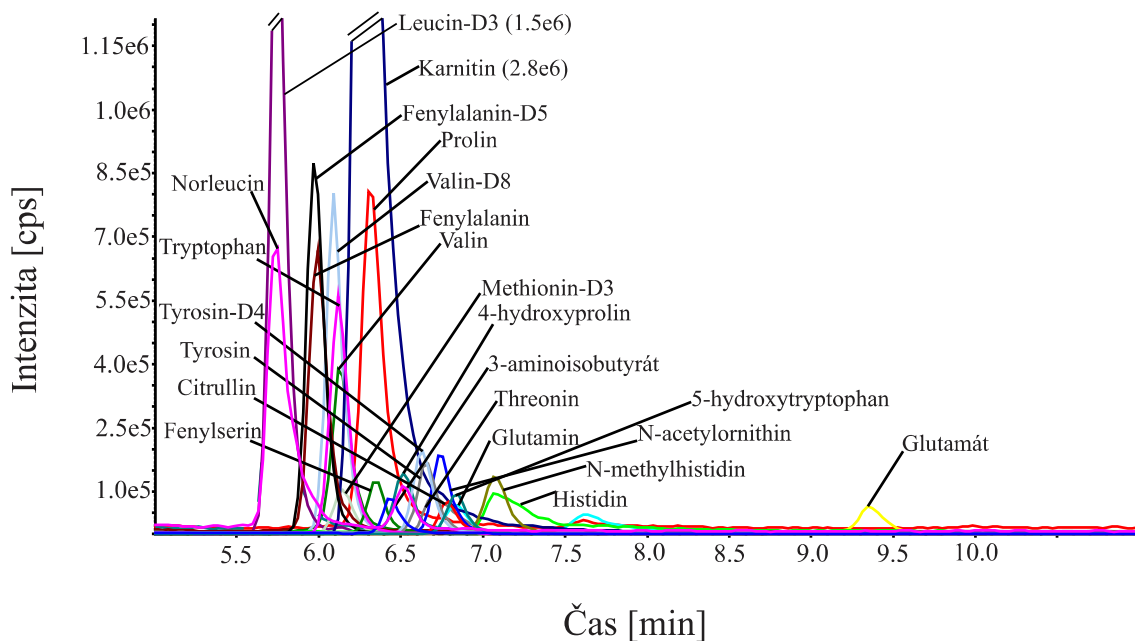
Q1	Q3	ID	Ret t (min)	Značený standard
149,908	104	methionin	6,13	Methionin-D3
204,896	145,8	tryptophan	6,14	Methionin-D3
161,939	102,9	karnitin	6,25	Methionin-D3
236,934	166	AlaPhe	6,26	Methionin-D3
115,916	69,9	prolin	6,31	Methionin-D3
181,894	118	fenylserin	6,36	Methionin-D3
295,004	182	LeuTyr	6,37	Methionin-D3
177,871	130	N-formylmethionin	6,42	Methionin-D3
103,988	86,1	3-aminoisobutyrát	6,42	Methionin-D3
222,878	119,9	GlyPhe	6,48	Methionin-D3
220,905	149,8	AlaMet	6,53	Methionin-D3
89,733	44,1	sarkosin	6,54	Tyrosin-D4
89,919	44,1	alanin	6,56	Tyrosin-D4
188,908	131,9	GlyNorleu	6,59	Tyrosin-D4
188,932	132	GlyLeu	6,61	Tyrosin-D4
188,919	118,1	AlaNorval	6,62	Tyrosin-D4
188,909	117,9	AlaVal	6,62	Tyrosin-D4
245,944	86	LeuGlyGly	6,63	Tyrosin-D4
181,914	136	tyrosin	6,65	Tyrosin-D4
119,92	73,9	threonin	6,70	Tyrosin-D4
89,911	71,9	beta-alanin	6,71	Citrullin-D2
174,896	114,9	N-acetyloronithin	6,71	Citrullin-D2
175,865	112,8	citrullin	6,75	Citrullin-D2
119,91	102	homoserin	6,76	Citrullin-D2
146,921	83,9	lysin	6,79	Citrullin-D2
146,909	83,9	glutamin	6,82	Citrullin-D2
133,911	106,9	asparagin	6,83	Citrullin-D2
220,903	161,9	5-hydroxytryptophan	6,83	Citrullin-D2
129,906	83,9	5-oxoprolin	6,84	Citrullin-D2
174,893	118	GlyVal	6,93	Citrullin-D2
174,928	72	GlyNorval	6,95	Citrullin-D2
105,848	60	serin	6,98	Citrullin-D2
155,888	110	histidin	7,05	Arginin-D7
169,923	96	N-methylhistidin	7,05	Arginin-D7
240,831	108,8	aserin	7,05	Arginin-D7
261,949	188	GlyTrp	7,09	Arginin-D7
160,933	89,9	AlaAla	7,17	Arginin-D7
174,9	115,8	arginin	7,19	Arginin-D7
240,843	155,9	homokarnosin	7,31	Arginin-D7
226,89	109,9	karnosin	7,43	Arginin-D7
146,912	89,9	GlyAla	7,59	Ornithin-D6
121,894	75,9	cystein	7,64	Ornithin-D6
132,857	115,6	ornithin	7,65	Ornithin-D6
203,918	133,1	AlaAsn	7,67	Ornithin-D6

Q1	Q3	ID	Ret t (min)	Značený standard
238,907	136	GlyTyr	7,69	Ornithin-D6
203,901	129	AlaGlyGly	7,73	Ornithin-D6
132,936	75,9	GlyGly	7,91	Ornithin-D6
189,876	132,9	GlyAsp	7,99	Ornithin-D6
189,632	114,8	GlyGlyGly	8,08	Ornithin-D6
246,927	115,1	GlyGlyGlyGly	8,10	Aspartát-D3
268,865	135,9	homocystin	8,11	Aspartát-D3
222,875	88,1	cystathionin	8,38	Aspartát-D3
292,967	110,1	HisHis	8,74	Aspartát-D3
133,854	87,9	aspartát	9,37	Aspartát-D3
147,796	83,9	glutamát	9,39	Glutamát-D5
161,81	98	2-aminoadipát	9,40	Glutamát-D5
380,304	233	S-lactoylglutathion	9,73	Glutamát-D5
240,9	151,8	cystin	9,79	Glutamát-D5
307,915	178,9	glutathion	10,78	Glutamát-D5
185,963	87,8	O-fosfo-L-serin	12,45	Glutamát-D5
175,847	134	N-acetylaspartát	12,46	Glutamát-D5

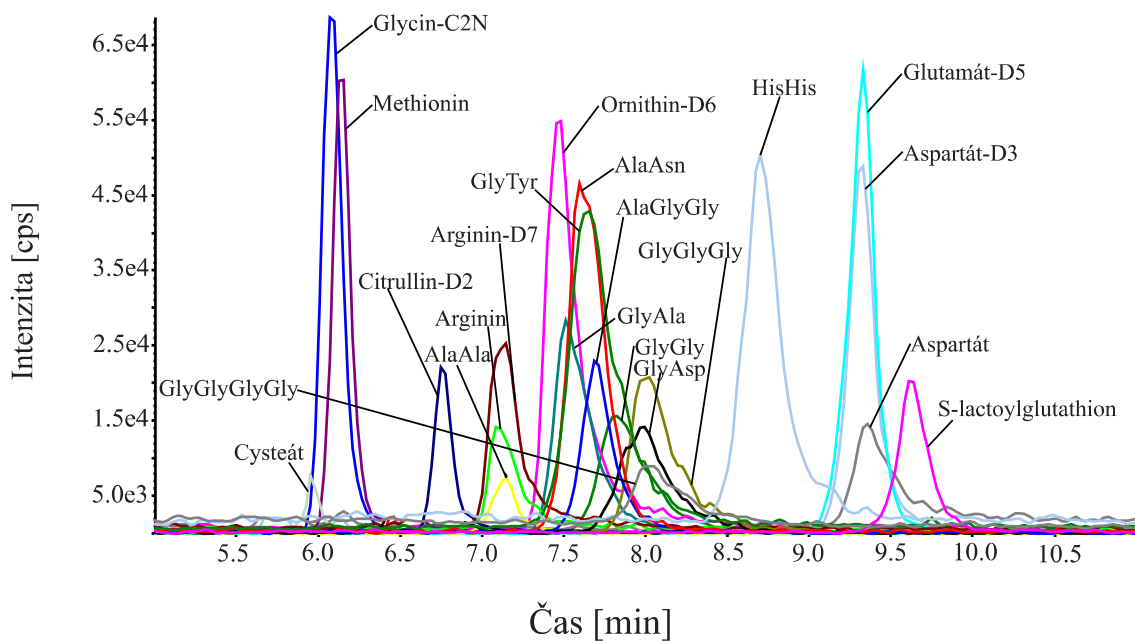
Ve směsích standardů 1 a 2 byly identifikovány všechny studované látky. Pro lepší přehlednost jsem oba chromatogramy rozdělila dle intenzity - chromatogramy látek s nižší intenzitou (Obr.11 a 13) a chromatogramy látek s vyšší intenzitou (Obr.12 a 14).



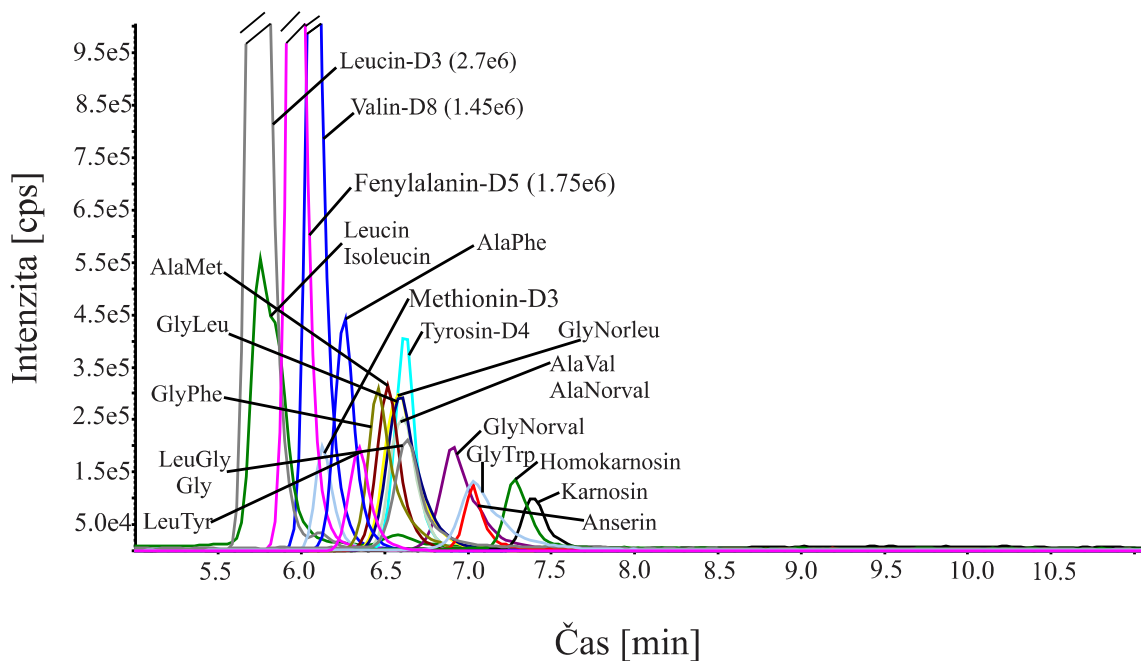
Obr.11: Chromatogram látek s nižší intenzitou směsného vzorku standardů 1



Obr.12: Chromatogram látek s vyšší intenzitou směsného vzorku standardů 1



Obr.13: Chromatogram látek s nižší intenzitou směsného vzorku standardů 2



Obr.14: Chromatogram látek s vyšší intenzitou směsného vzorku standardů 2

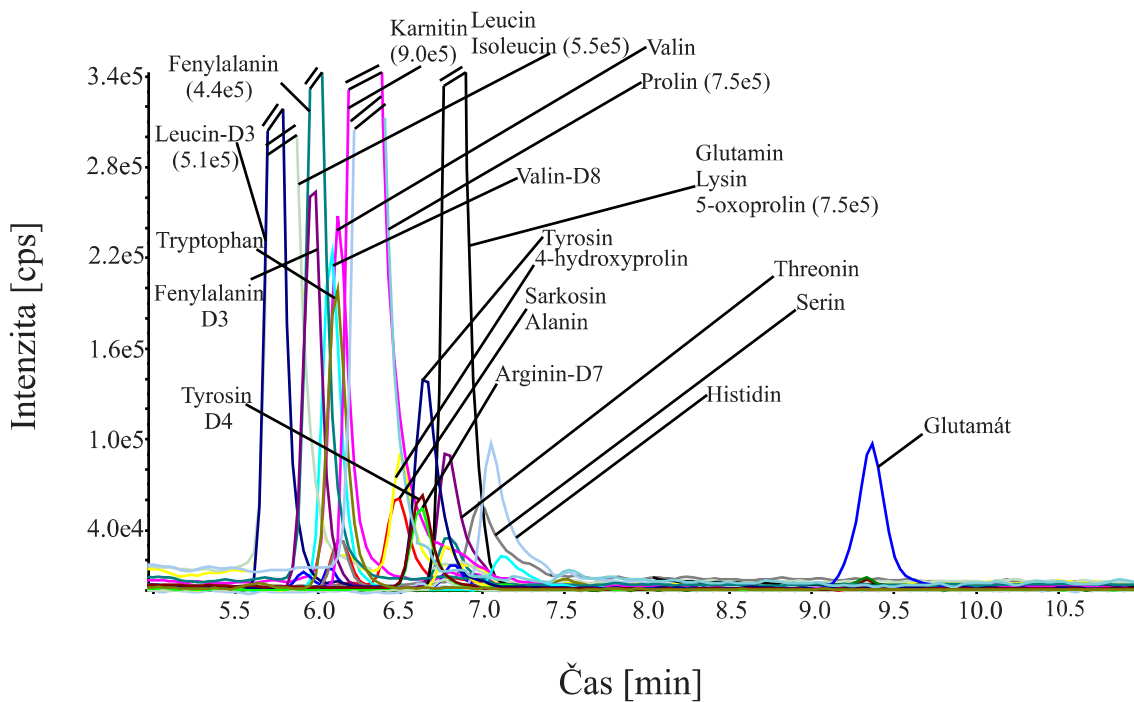
## 6.4 Analýza biologického materiálu

### 6.4.1 Analýza sér

Deproteinovaná séra byla analyzována za optimalizovaných podmínek.

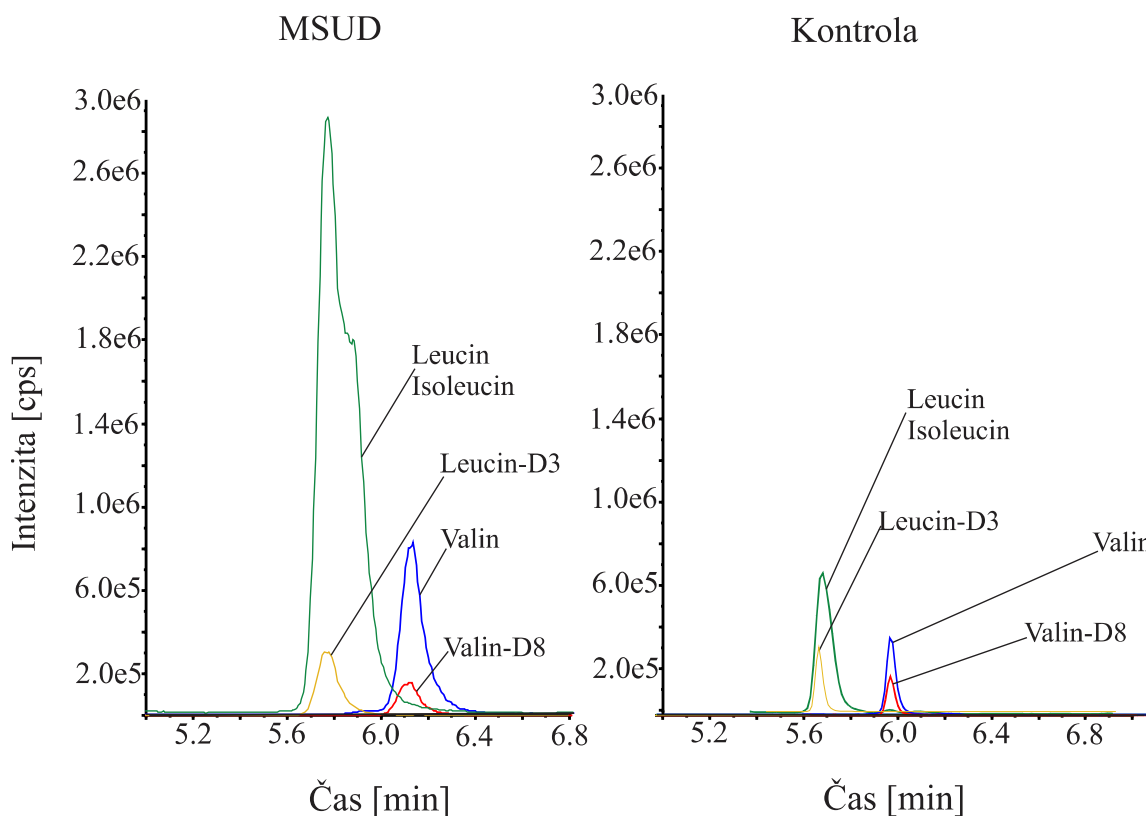
Celkem bylo analyzováno 5 kontrolních sér a 2 séra od pacientů s dědičnými metabolickými poruchami (fenylketonurie, leucinoso). V kontrolních vzorcích sér bylo identifikováno 24 studovaných látek (Obr.15) (leucin, isoleucin, fenylalanin, valin, methionin, tryptophan, karnitin, prolin, sarkosin, alanin, tyrosin, 4-hydroxyprolin, citrullin, homoserin, threonin, lysin, glutamin, 5-oxoprolin, serin, histidin, arginin, cystein, aspartát a glutamát).

Analýzy kontrolních sér si byly podobné, proto níže uvádím jeden příklad kontrolního séra. Látky byly identifikovány pomocí MRM přechodů a jejich retenčních časů, které byly srovnány s retenčními časy standardů.



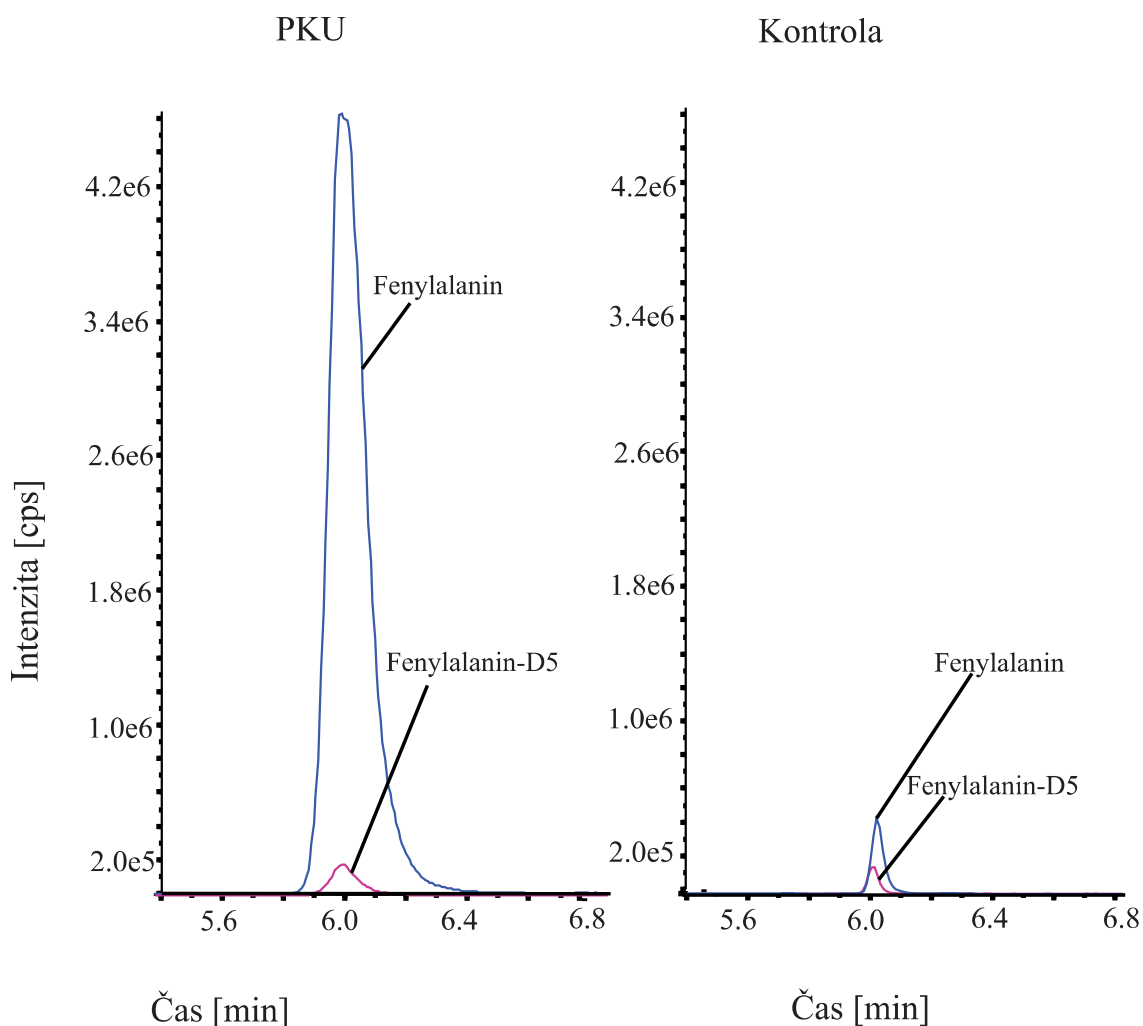
Obr.15: Chromatogram kontrolního séra

Porovnáním kontrolního séra se sérem pacienta s MSUD (Obr.16) lze vidět velký rozdíl intenzity píků leucinu, isoleucinu a valinu, i když intenzita píků interních standardů je téměř totožná.



Obr.16: Porovnání kontrolního séra a séra od pacienta s MSUD

Na chromatogramech kontrolního séra a séra pacienta s fenylketonurií (Obr.17) je zřetelně vidět velký rozdíl intenzity píků fenylalaninu při téměř stejné intenzitě píku interních standardů.

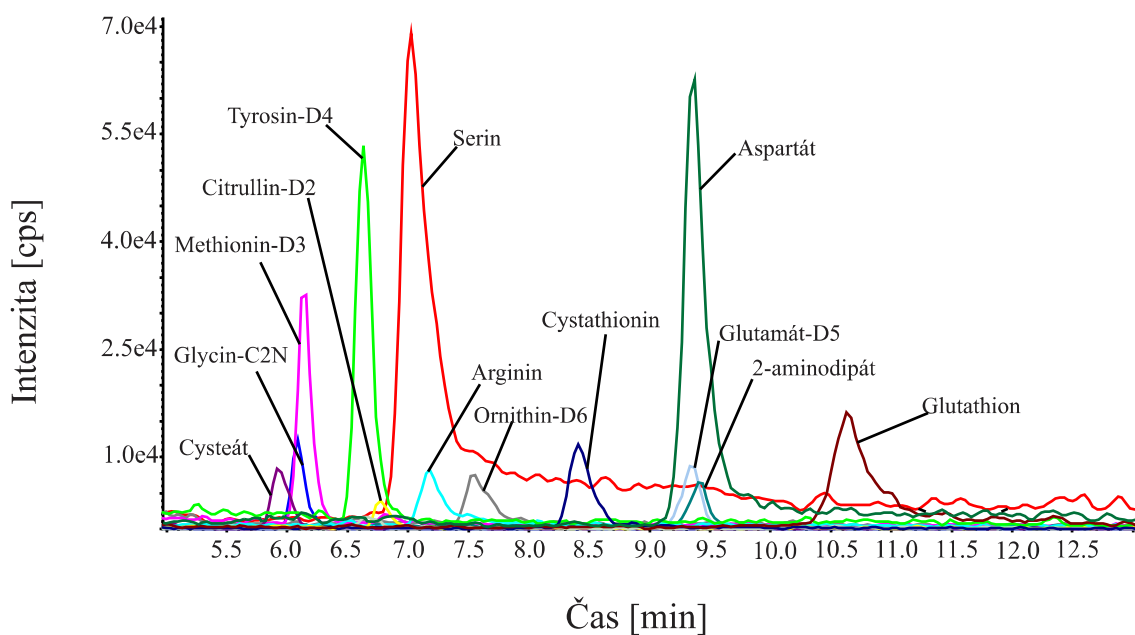


Obr.17: Porovnání kontrolního séra a séra od pacienta s PKU

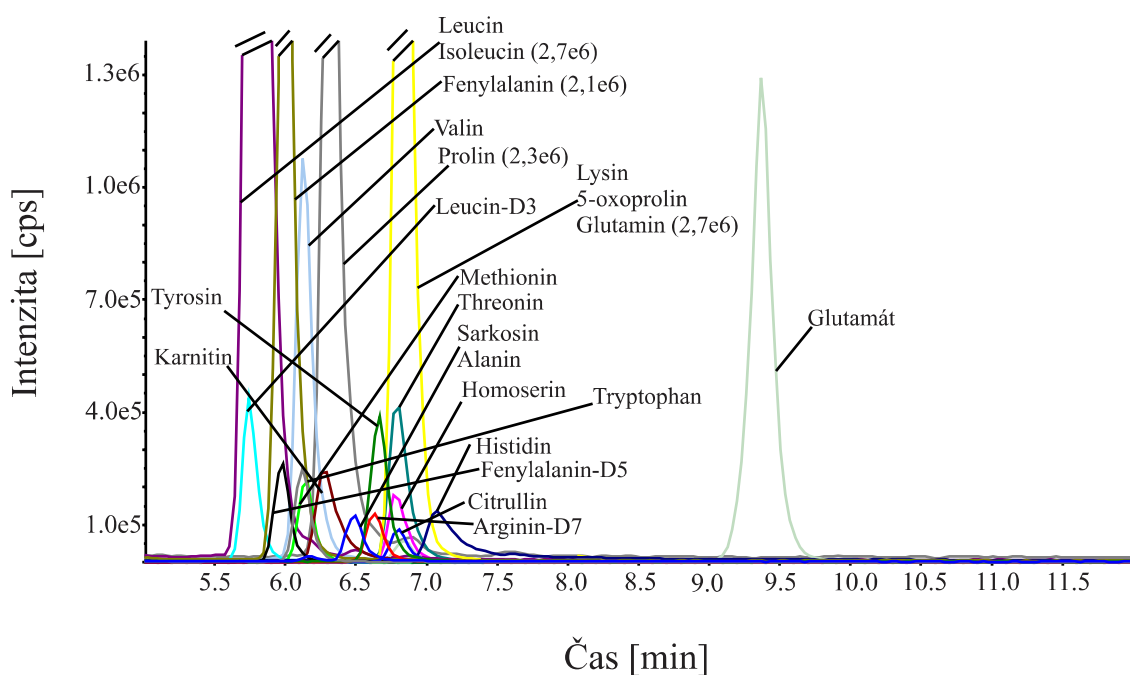
#### 6.4.2 Analýza fibroblastů

Deproteinované extrakty kožních fibroblastů byly analyzované za optimalizovaných podmínek. Celkem bylo analyzováno 5 extraktů buněk. Pro přehlednost jsem chromatogramy opět rozdělila dle intenzit - chromatogramy látek s nižší intenzitou (Obr.18) a látek s vyšší intenzitou (Obr.19).

V buňkách bylo identifikováno celkem 23 látek (leucin, isoleucin, cysteát, fenylalanin, tryptophan, valin, methionin, karnitin, prolin, sarkosin, alanin, tyrosin, homoserin, threonin, citrullin, lysin, 5-oxoprolin, glutamin, serin, histidin, arginin, glutathion a aspartát).



Obr.18: Chromatogram látek s nižší intenzitou identifikovaných v extraktu kožních fibroblastů



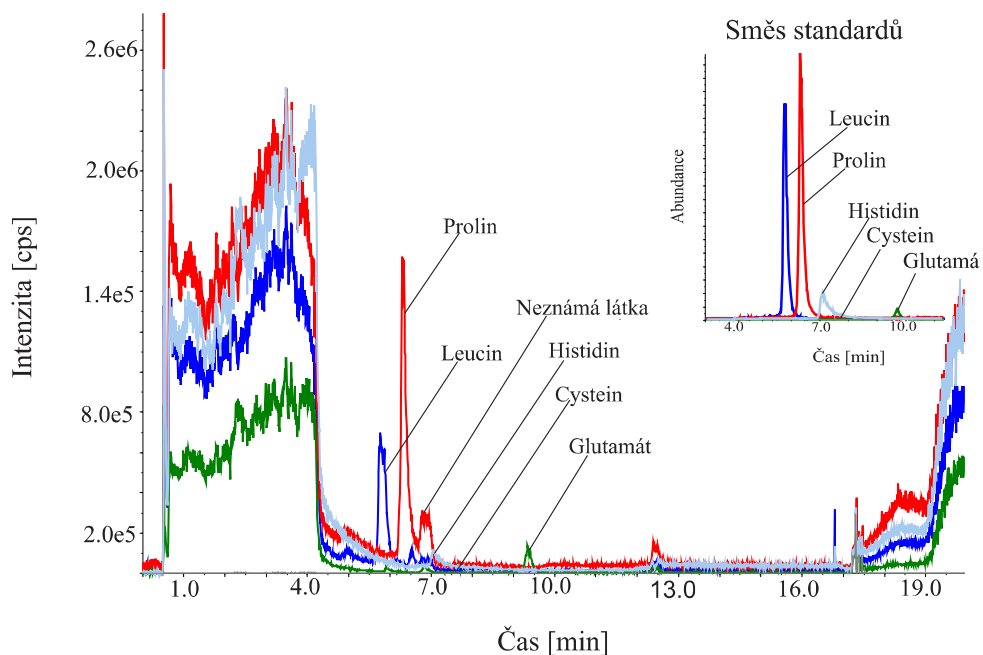
Obr.19: Chromatogram látek s vyšší intenzitou identifikovaných v extraktu kožních fibroblastů

## 6.5 Matricové efekty

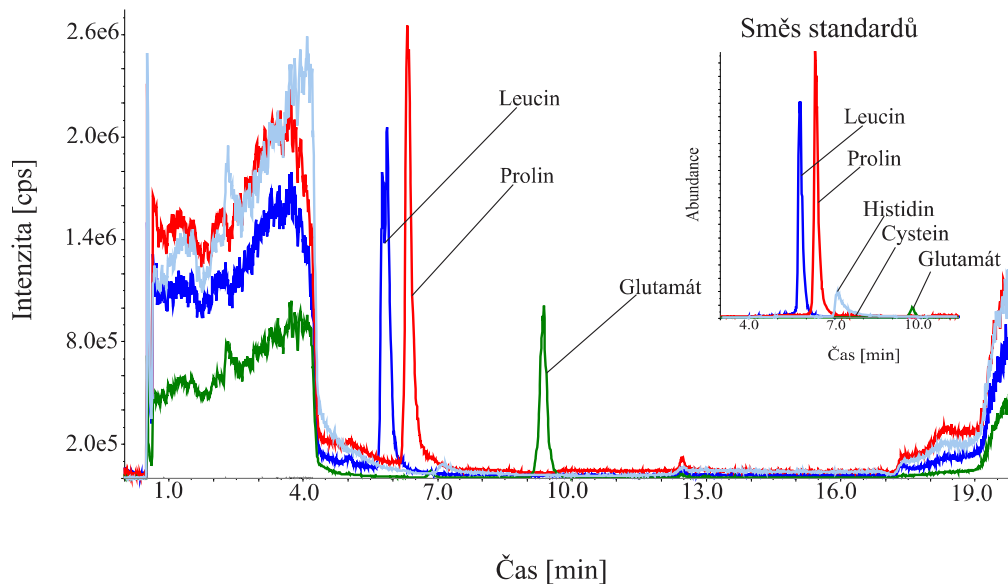
Vlivy matrice byly zkoumány post-kolonovou infúzí směsi 5 vybraných standardů aminokyselin na 5 různých vzorcích sér a 5 extraktů kožních fibroblastů. Všechny biologické vzorky vykazovaly podobné profily matricových efektů. Od 4. min docházelo u všech látek k výraznému poklesu intenzity signálu (až desetkrát), která byla až do 17. min konstantní vyjma píků, které odpovídaly látkám přirozeně se vyskytujících v daném biologickém vzorku.



V případě vzorků sér byl přítomen leucin, prolin, cystein a glutamát (Obr.20), v extraktu fibroblastů byl identifikován leucin, prolin a glutamát (Obr.21). Všech 69 studovaných látek se separovalo mezi 5. až 13. min, tudíž v oblasti, kdy byl pozorován konstantní vliv matrice.



Obr.20: Matricové efekty - analýza sér s post-kolonovou infúzí směsi standardů



Obr.21: Matricové efekty - analýza extraktů kožních fibroblastů s post-kolonovou infúzí směsi standardů

## 7 Diskuse

V praktické části své diplomové práci jsem se zabývala analýzou aminokyselin a peptidů metodou UHPLC-MS/MS, která může sloužit pro diagnostiku různých dědičných poruch v metabolismu aminokyselin (Tab.2).

Optimalizace MS podmínek byla provedena u každé ze studovaných látek. Zjištěné MRM přechody byly porovnávány s dříve publikovanými výsledky (Piraud et al., 2011, Bajad & Shulaev, 2011) a také s HMDB databází. U většiny případů se vybraný MRM přechod shodoval. U látek, jejichž fragmentace nebyla dosud publikována, byl MRM přechod vybrán na základě odvození ze struktury jednotlivých látek. Jednalo se hlavně o oligopeptidy, jejichž vzniklé fragmenty odpovídaly nejčastěji odštěpení aminokyselin.

Optimalizace LC podmínek byla prováděna v rámci vývoje metabolomické metody, která zahrnovala nejen analýzu aminokyselin, peptidů a jejich derivátů, ale také různých organických kyselin, purinových a pyrimidinových látek, nukleotidů, cukrů atd. Separace byly nejprve provedeny ve směsích přibližně po deseti látkách, které se lišily svou hmotností více než o jednotku a byly tak identifikovány na základě všech 5 MRM přechodů zjištěných při MS optimalizaci. Po zjištění jejich retenčních časů a výběru nejvhodnějšího přechodu byly studované látky rozděleny pouze do dvou směsí po 34 a 35 látkách a byly detekovány na základě jednoho MRM přechodu a dříve zjištěného retenčního času. Bohužel se nám nepodařilo od sebe separovat leucin a isoleucin, které mají stejný MRM přechod. Tato skutečnost však nebrání diagnostice MSUD, protože u pacientů s tímto onemocněním dochází ke zvyšování jak sérových hladin leucinu, tak i isoleucinu (Tab.2). Rozlišit leucin od isoleucinu se nepodařilo ani v dříve publikované studii (Bajad, 2011), kde byla použita k separaci podobná kolona s větším průměrem částic a větší délkou (průměr částic 5 $\mu$ m, délka 250 mm).

Celková doba vyvíjené metabolomické metody činila 40 min, ale protože všechny aminokyseliny a jejich deriváty se separovaly do 13. minuty, byla metoda pro účely této diplomové práce zkrácena na 20 min - ve srovnání s metabolomickou metodou nastal návrat k iniciálním podmínkám o 20 min dříve.

Při aplikaci metody na reálných vzorcích se podařilo separovat a identifikovat celkem 24 látek ve vzorcích séra a 23 látek v extraktech fibroblastů. V sérech byly identifikovány látky jako glutamát, 4-hydroxyprolin a cystein, které se nenacházely v extraktech kožních fibroblastů. Cysteát a glutathion byly detekovány v extraktech kožních fibroblastů, ale nenacházely se séru. Dále byla analyzována séra od pacientů s leucinosou a fenylketonurií. V séru od pacienta s leucinovou byla potvrzena vysoká akumulace leucinu a isoleucinu a menší míře též valinu ve srovnání s kontrolními séry (Obr.16). V séru od pacienta s fenylketonurií byla zjištěna vysoká

akumulace fenylalaninu ve srovnání s kontrolami (Obr.17), což též odpovídá laboratorním nálezům u této poruchy (Tab.2).

Matricové efekty byly zkoumány na vzorcích sér a extraktů fibroblastů. Bylo zjištěno, že všechny studované látky byly separovány v čase, kdy byl vliv matrice konstantní.

## 8 Závěr

V teoretické části diplomové práce jsem se zabývala metabolomikou a dědičnými metabolickými poruchami aminokyselin a peptidů. Metabolomika je vědní obor zabývající se stanovením velkého počtu nízkomolekulárních metabolitů v biologických vzorcích a podává nám informace o aktuálním stavu jedince. Metabolomika může být uplatněna i pro diagnostiku dědičných metabolické poruch.

V experimentální části byla vyvíjena metoda UHPLC-MS/MS pro analýzu aminokyselin, jejich derivátů a peptidů. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na reálných vzorcích. Byla analyzována kontrolní séra, v nichž se podařilo identifikovat celkem 24 studovaných látek. V extraktech kožních fibroblastů bylo detekováno 23 studovaných látek. Metoda byla též ověřována analýzou sér od pacientů s MSUD a PKU. U těchto patientských sér byly zjištěny ve srovnání s kontrolou zvýšené intenzity metabolitů, které jsou pro danou poruchu specifické. V této studii byly též zkoumány matricové efekty jednotlivých analyzovaných biologických vzorků.

## Seznam zkratek

AASDHPPT	2-aminodipátsemialdehydsyntasa
AAT	2-aminoadipátaminotransferasa
ADP	adenosindifosfát
AlaAla	alanyl-alanin
AlaAsn	alanyl-asparagin
AlaGlyGly	alanyl-glycyl-glycin
AlaMet	alanyl-methionin
AlaNorval	alanyl-norvalin
AlaPhe	alanyl-fenylalanin
AlaVal	alanyl-valin
APCI	chemická ionizace při atmosférickém tlaku (atmospheric pressure chemical ionisation)
API	ionizace při atmosférickém tlaku (atmospheric pressure ionisation)
ARG	arginasa
ASL	argininosukcinátlyasa
ASPA	aspartoacylasa
ASS	argininosukcinátsynthetasa
ATP	adenosintrifosfát
BCKD	dehydrogenasový komplex 2-ketokyselin s větvenými řetězci
BH4	tetrahydrobiopterin
CAD	tlak kolizního plynu (collision gas pressure)
CBS	cystathionin $\beta$ -syntasa
CE	kolizní energie (collision energy)
CNS	centrální nervový systém
CPS	karbamoylfosfátsynthetasa

CTH	$\gamma$ -cystathionasa
CUR	curtain gas
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential)
D2HGDH	D-2-hydroxyglutarátdehydrogenasa
DHPR	dihydropteridinreduktasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DP	deklasterační potenciál (declustering potential)
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
FAH	fumarylacetoacetáthydrolyasa
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GCL	$\gamma$ -glutamyl-cysteinsynthetasa
GCS	glycin cleavage systém - enzymatický komplex
GGT	gama-glutamyltransferasa
GCHD	glutaryl-CoA dehydrogenasa
GlyAla	glycyl-alanin
GlyAsp	glycyl-asparagin
GlyGly	glycyl-glycin
GlyGlyGly	glycyl-glycyl-glycin
GlyGlyGlyGly	glycyl-glycyl-glycyl-glycin
GlyLeu	glycyl-leucin
GlyNorleu	glycyl-norleucin
GlyNorval	glycyl-norvalin
GlyPhe	glycyl-fenylalanin
GlyTrp	glycyl-tryptophan
GlyTyr	glycyl-tyrosin
GlyVal	glycyl-valin

GMT	glycin N-methyltransferasa
GS1	zmlžující plyn (nebulizing gas)
GS2	sušící plyn (heater gas)
GSS	glutathionsynthetasa
GTPCH	guanosintrifosfátcyklohyrolasa I
HGD	homogentisátdioxygenasa
HisHis	histidyl-histidin
HPD	4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasa
IBD	isobutyryl-CoA dehydrogenasa
IS	napětí na kapiláře v iontovém zdroji (ion spray voltage)
ISP	ionizace iontovými spreji (ion spray)
IVD	isovaleryl-CoA dehydrogenasa
L2HGDH	L-2-hydroxyglutarátdehydrogenasa
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LeuGlyGly	leucyl-glycyl-glycin
LeuTyr	leucyl-tyrosin
MAT	methionin S- adenosyltransferasa
MCM	methylmalonyl-CoA mutasa
MHBD	2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasa
MLYCD	malonyl-CoA dekarboxylasa
MRM	multiple-reaction monitoring
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
MSUD	nemoc javorového sirupu (leucinoso)
NAGS	N-acetylglutamátsynthetasa
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
OAT	ornithinaminotransferasa
OCT	ornithintranskarbamylasa

P5CDH	1-pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa
PAH	fenylalaninhydroxylasa
PCC	propionyl-CoA karboxylasa
PCD	pterin-4a-karbinolamindehydratasa
PEP	dipeptidasa
Phe	fenylalanin
PHGDH	3-fosfoglycerátdehydrogenasa
Pi	odštěpený anorganický fosfát
PKU	fenylketonurie
PRODH	prolinoxidasa
PTPS	6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasa
SAHH	S-adenosylhomocysteinhydrolasa
SBCAD	acyl-CoA dehydrogenasa
SR	sepiapterinreduktasa
SUOX	sulfitoxidasa
TAT	tyrosinaminotransferasa
TEM	teplota zmlžujícího plynu (source temperature)
TH	tyrosinhydroxylasa
TPH	tryptophanhydroxylasa
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
UHPLC-MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie/tandemová hmotnostní spektrometrie (ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry)
3-MCC	3-methylkrotonyl-CoA karboxylasa
3-MGC-CoA-hydratasa	3-hydroxy-3-mythylglutaryl-CoA hydratasa
5-Opase	5-oxoprolinasa



## Použitá literatura

- ❖ Aevansson A., Chuang JL., Wynn RM., Turley S., Chuang DT., Hol WG. (2000) Crystal structure of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease. *Structure* **8**, 277-291.
- ❖ Bajad S., Shulaev V. (2011) LC-MS-based metabolomics. *Methods Mol Biol* **708**, 213-228.
- ❖ Birková A., Dubayová K., Kušnír J. (2007) Metabolické profilovanie - nový pohľad na hodnotenie biologického materiálu. *Klin Biochem Metab* **3**, 145-149.
- ❖ Blau N., Erlandsen H. (2004) The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* **82**, 101-111.
- ❖ Borrajo G. J. (2007) Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J Inherit Metab Dis* **30**, 466-481.
- ❖ Dettmer K., Aronov P. A., Hammock B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**, 51-78.
- ❖ Ding Z., Harding C. O., Thony B. (2004) State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab* **81**, 3-8.
- ❖ Dunn W. B., Ellis D. (2005) Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal Chem* **4**, 285-294.
- ❖ Fernandes J., Saudubray J. M., Berghe G., Walter J. H. (2008) Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch, pp. 415-421, Triton, Praha, ČR
- ❖ Fukui Y., Kato M., Inoue Y., Matsubara A., Itoh K. (2009) A metabonomic approach identifies human urinary phenylacetylglutamine as a novel marker of interstitial cystitis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 3806-3812.

- ❖ Ghozlan A., Varoquaux O., Abadie V. (2004) Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria? *Mol Genet Metab* **83**, 337-340.
- ❖ Goodman S. I., Solomons C. C., Muschenheim F., McIntyre C. A., Miles B., O'Brien D. (1968) A syndrome resembling lathyrism associated with iminodipeptiduria. *Am J Med* **45**, 152-159.
- ❖ Guldberg P., Henriksen K. F., Sipila I., Guttler F., de la Chapelle A. (1995) Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet* **32**, 976-978.
- ❖ Hannon W. H., Grosse S. D., Therrell B. L., Becker W. J., Chace D. H., Cunningham G. C., Grady G. F., Hoffman G. L., Mann M. Y., Muenzer J., Mulvihill J. J., Panny S. R. (2001) Using tandem mass spectrometry for metabolic disease screening among newborns. A report of a work group. *MMWR Recomm Rep* **50**, 1-34.
- ❖ McAlpine P.J., Mohandas T., Ray M., Wang H., Hamerton J.L. (1976) Assignment of the peptidase D gene locus (PEPD) to chromosome 19 in man. *Cytogenet Cell Genet* **16**, 204-205.
- ❖ Hellerová M. (2009) Věstník, pp. 5-7, Ministerstvo zdravotnictví ČR, Praha, ČR.
- ❖ Ho C. S., Lam C. W., Chan M. H., Cheung R. C., Law L. K., Lit L. C., Ng K. F., Suen M. W., Tai H. L. (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3-12.
- ❖ Hoeksma M., Reijngoud D. J., Pruijm J., de Valk H. W., Paans A. M., van Spronsen F. J. (2009) Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab* **96**, 177-182.
- ❖ Holčápek M., Jandera P. (1998) Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MC). *Chem Listy* **92**, 278-286.

- ❖ Horster F., Schwab M. A., Sauer S. W., Pietz J., Hoffmann G. F., Okun J. G., Kolker S., Kins S. (2006) Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res* **59**, 544-548.
- ❖ Chace D. H., Kalas T. A. (2005) A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem* **38**, 296-309.
- ❖ Issaq H. J., Van Q. N., Waybright T. J., Muschik G. M., Veenstra T. D. (2009) Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *J Sep Sci* **32**, 2183-2199.
- ❖ Jouvett P., Poggi F., Rabier D., Michel J. L., Hubert P., Sposito M., Saudubray J. M., Man N. K. (1997) Continuous venovenous haemodiafiltration in the acute phase of neonatal maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* **20**, 463-472.
- ❖ Klouda P. (2003) Moderní analytické metody, pp. 10-39, Klouda Pavel, Ostrava, ČR.
- ❖ Laclair C. E., Ney D. M., MacLeod E. L., Etzel M. R. (2009) Purification and use of glycomacropptide for nutritional management of phenylketonuria. *J Food Sci* **74**, E199-206.
- ❖ Loeber J. G. (2007) Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* **30**, 430-438.
- ❖ MacDonald M. J., D'Cunha G. B. (2007) A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem Cell Biol* **85**, 273-282.
- ❖ Martynyuk A. E., Glushakov A. V., Sumners C., Laipis P. J., Dennis D. M., Seubert C. N. (2005) Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain. *Mol Genet Metab* **86**, 34-42.
- ❖ Nat.Inst.HealthCons.Dev.P. (2001) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000. *Pediatrics* **108**, 972-982.
- ❖ Nellis M. M., Danner D. J. (2001) Gene preference in maple syrup urine disease. *Am J Hum Genet* **68**, 232-237.

- ❖ Ozalp I., Coskun T., Tokatli A., Kalkanoglu H. S., Dursun A., Tokol S., Koksal G., Ozguc M., Kose R. (2001) Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk J Pediatr* **43**, 97-101.
- ❖ Pandor A., Eastham J., Chilcott J., Paisley S., Beverley C. (2006) Economics of tandem mass spectrometry screening of neonatal inherited disorders. *Int J Technol Assess Health Care* **22**, 321-326.
- ❖ Perry T. L., Hansen S., Tischler B., Bunting R., Berry K. (1967) Carnosinemia. A new metabolic disorder associated with neurologic disease and mental defect. *N Engl J Med* **277**, 1219-1227.
- ❖ Pietz J., Kreis R., Rupp A., Mayatepek E., Rating D., Boesch C., Bremer H. J. (1999) Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest* **103**, 1169-1178.
- ❖ Piraud M., Ruet S., Boyer S., Acquaviva C., Clerc-Renaud P., Cheillan D., Vianey-Saban C. (2011) Amino acid profiling for the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Methods Mol Biol* **708**, 25-53.
- ❖ Prachařová J. (2010) Intracelulární nukleotidy v analýze metabolomu, Diplomová práce PFF UP.
- ❖ Scriver C. R. (2007) The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* **28**, 831-845.
- ❖ Scriver C. R., Kaufman S. (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease, pp. 1667-1724, McGraw-Hill, New York, USA.
- ❖ Shefer S., Tint G. S., Jean-Guillaume D., Daikhin E., Kendler A., Nguyen L. B., Yudkoff M., Dyer C. A. (2000) Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* **61**, 549-563.
- ❖ Sierra-Rivera E., Dasouki M., Summar M. L., Krishnamani M. R., Meredith M., Rao P. N., Phillips J. A., 3rd, Freeman M. L. (1996) Assignment of the human gene (GLCLR)

that encodes the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase to chromosome 1p21. *Cytogenet Cell Genet* **72**, 252-254.

- ❖ Sierra-Rivera E., Summar M. L., Dasouki M., Krishnamani M. R., Phillips J. A., Freeman M. L. (1995) Assignment of the gene (GLCLC) that encodes the heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase to human chromosome 6. *Cytogenet Cell Genet* **70**, 278-279.
- ❖ Sjaastad O., Berstad J., Gjesdahl P., Gjessing L. (1976) Homocarnosinosis. 2. A familial metabolic disorder associated with spastic paraplegia, progressive mental deficiency, and retinal pigmentation. *Acta Neurol Scand* **53**, 275-290.
- ❖ Stenson P. D., Ball E. V., Mort M., Phillips A. D., Shiel J. A., Thomas N. S., Abeyasinghe S., Krawczak M., Cooper D. N. (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* **21**, 577-581.
- ❖ Thony B., Blau N. (2006) Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat* **27**, 870-878.
- ❖ Ubik K. (2000) Fyzikálně-chemické metody, pp. 1-105, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha, ČR.
- ❖ Walter J. H., White F. J., Hall S. K., MacDonald A., Rylance G., Boneh A., Francis D. E., Shortland G. J., Schmidt M., Vail A. (2002) How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* **360**, 55-57.
- ❖ Wassif W. S., Sherwood R. A., Amir A., Idowu B., Summers B., Leigh N., Peters T. J. (1994) Serum carnosinase activities in central nervous system disorders. *Clin Chim Acta* **225**, 57-64.
- ❖ Waterval W. A., Scheijen J. L., Ortmans-Ploemen M. M., Habets-van der Poel C. D., Bierau J. (2009) Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. *Clin Chim Acta* **407**, 36-42.

- ❖ Webb G. C., Vaska V. L., Gali R. R., Ford J. H., Board P. G. (1995) The gene encoding human glutathione synthetase (GSS) maps to the long arm of chromosome 20 at band 11.2. *Genomics* **30**, 617-619.
  
- ❖ Willi S. M., Zhang Y., Hill J. B., Phelan M. C., Michaelis R. C., Holden K. R. (1997) A deletion in the long arm of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. *Pediatr Res* **41**, 210-213.
  
- ❖ Zurfluh M. R., Zschocke J., Lindner M., Feillet F., Chery C., Burlina A., Stevens R. C., Thony B., Blau N. (2008) Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* **29**, 167-175.