Svoluji k zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE AKUTNÍ INTERMITENTNÍ PORFYRIE

Matouš Hrdinka

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc., Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK, Praha

Prohlašuji, že diplomovou práci s názvem **Molekulární patologie akutní intermitentní porfyrie** jsem vypracoval samostatně pod vedením Prof. MUDr. Pavla Martáska, DrSc. a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne: 5. 5. 2006 Matouš Hrdinka

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc. a skupině pracovníků v Laboratoři pro studium mitochondriálních poruch na Klinice dětského a dorostového lékařství 1. LF UK za odborné vedení.

Tato práce vznikala v letech 2004–2006 v rámci grantového projektu GA UK 10/2004 (Porfobilinogen deamináza – strukturálně funkční studie).

ABSTRACT

Molecular Pathology of Acute Intermittent Porphyria

Author: Matouš Hrdinka

Acute intermittent porphyria (AIP) is autosomal dominant disorder caused by the partial deficiency of porphobilinogen deaminase (PBGD), the third enzyme in the heme biosynthetic pathway. AIP is manifested by life-threatening acute neurological attacks that can be provoked by various factors such as drugs or alcohol.

Objective of this study was to identify and characterize the molecular lesions in Czech and Slovak AIP patients. To identify disease-causing mutations screening was performed by PCR, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), automated DNA sequencing and restriction fragment lenght polymorphism (RFLP) assays. Total of 35 individuals from 8 families were analyzed to detect asymptomatic carriers. Seven mutations were identified, including 3 novel mutations. Of particular interest, one patient had two mutations R173Q and Q204K, both located in exon 10 on the same allele. To further characterize these mutations, human PBGD was cloned into the pGEX-4T-1 vector and mutations were generated by site-directed mutagenesis. The wild-type and mutated enzyme species were expressed in *E. coli* as GST fusions and purified by affinity chromatography. Conditions of the PBGD enzyme assay were determined and specific activities, thermostability and pH optima of mutated enzymes were measured and compared to the wild-type protein. R173Q was the causative mutation with major effect on the PBGD function. The Q204K mutated PBGD had high residual activity but thermostability was decreased by 75%. pH optimum for Q204K mutated protein was the same as for the wild-type.

To conclude, three novel mutations were identified in AIP patients. These studies provide accurate detection of asymptomatic carriers and emphasize the molecular heterogeneity of AIP. An unusual case of AIP with two mutations both located in 10. exon of the PBGD gene was characterized at molecular and enzymatic level.

Keywords: acute intermittent porphyria, porphobilinogen deaminase, mutations

Klíčová slova: akutní intermitentní porfyrie, porfobilinogen deamináza, mutace

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK **8**
1. ÚVOD **9**
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED **10**
2.1. Porfyriny a porfyrinogeny **10**
2.1.1. Fotochemické vlastnosti porfyrinů 11
2.2. Biosyntéza hemu **11**
2.3. Regulace biosyntézy hemu **14**
2.3.1. Regulace v hepatocytech 14
2.3.2. Regulace v kostní dřeni 16
2.3.3. Regulace v ostatních buňkách 17
2.4. Porfyrie, obecný přehled **17**
2.5. Akutní intermitentní porfyrie (AIP) **20**
2.5.1. Historie 20
2.5.2. Incidence a geografické rozšíření 21
2.5.3. Klinický obraz onemocnění 21
2.5.4. Patogeneze 23
2.5.5. Biochemické nálezy a diagnostika AIP 25
2.5.6. Léčba AIP 26
2.6. Porfobilinogen deamináza (PBGD) **27**
2.6.1. Funkce PBGD 27
2.6.2. Struktura PBGD 28
2.7. Molekulární genetika AIP **30**
2.7.1. Gen pro PBGD 30
2.7.2. Mutace způsobující AIP 32
3. CÍLE PRÁCE **36**
4. MATERIÁL A METODY **37**
4.1. Klinicko-genetická část **37**
4.1.1. Pacienti 37
4.1.2. Izolace DNA 37
4.1.3. Amplifikace DNA 38
4.1.4. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) 38

4.1.5. Sekvencování DNA 40
4.1.6. Restrikční štěpení DNA 40
4.1.7. TA klonování PCR fragmentu s mutacemi 518 G>A a 610 C>A 41
4.2. Experimentální část 43
4.2.1. Izolace leukocytů 43
4.2.2. Izolace RNA 43
4.2.3. Reverzní transkripce a amplifikace cDNA pro PBGD 44
4.2.4. Klonování cDNA pro lidskou PBGD 45
4.2.5. Cílená mutageneze 47
4.2.6. Exprese rekombinantní PBGD v *E. coli* 49
4.2.7. Izolace a purifikace rekombinantní PBGD 49
4.2.8. Kvantifikace purifikované PBGD 50
4.2.9. SDS-PAGE 51
4.2.10. Měření enzymové aktivity PBGD 52
4.2.11. Stanovení pH optima wt PBGD a mut204 PBGD 52
4.2.12. Stanovení tepelné stability wt PBGD a mut204 PBGD 53
5. VÝSLEDKY 54
5.1. Klinicko-genetická část 54
5.1.1. Pacient P1 54
5.1.2. Pacient P2 56
5.1.3. Pacient P3 58
5.1.4. Pacient P4 59
5.1.5. Pacient P5 60
5.1.6. Pacient P6 61
5.1.7. Pacienti P7 a P8 63
5.2. Experimentální část 63
5.2.1. Klonování a cílená mutageneze PBGD 63
5.2.2. Exprese a purifikace PBGD 64
5.2.3. Měření specifické aktivity PBGD 66
5.2.4. Stanovení pH optima PBGD 67
5.2.5. Měření teplotní stability PBGD 68
6. DISKUZE 69
6.1. Molekulární diagnostika AIP v ČR 69
6.2. Mutace způsobující AIP 70

6.3. Exprese a purifikace PBGD 74
6.4. Měření enzymové aktivity PBGD 75
6.5. Charakterizace identifikovaných mutací 76
6.5.1. Mutace R26C a R26H 76
6.5.2. Mutace 771+1 G>T 77
6.5.3. Mutace 675delA a 965-966insA 78
6.5.4. Mutace R173Q a Q204K 79
7. SOUHRN 81
8. DODATKY 82
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 95

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	akutní porfyrie s defektem ALA dehydratázy
AIP	akutní intermitentní porfyrie
ALA	δ-aminolevulová kyselina
ALAD	dehydratáza δ-aminolevulové kyseliny
ALAS	syntáza δ-aminolevulové kyseliny
bp	páry bazí (z angl. base pairs)
cDNA	DNA komplementární k mRNA (získaná reverzní transkripcí)
CEP	kongenitální erytropoetická porfyrie
CPO	koproporfyrinogen oxidáza
ddH_2O	deionizovaná destilovaná voda
EPP	erytropoetická protoporfyrie
FECH	ferochelatáza
g	gravitační zrychlení
gDNA	genomová DNA
GST	glutathion S-transferáza
HCP	hereditární koproporfyrie
IVS	intronová sekvence
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
K_m	Michaelisova konstanta
KOPRO	koproporfyrin(ogen)
mut PBGD	mutovaná PBGD
nm	nanometr
PBG	porfobilinogen
PBGD	porfobilinogen deamináza
PCT	porfyria cutanea tarda
PPOX	protoporfyrinogen oxidáza
PROTO	protoporfyrin(ogen)
rpm	počet otáčkek za minutu (z angl. rotation per minute)
U	enzymová jednotka (z angl. Unit)
URO	uroporfyrin(ogen)
UROD	uroporfyrinogen dekarboxyláza
UROS	uroporfyrinogen III syntáza
VP	porfyria variegata
wt PBGD	wild-type PBGD

Nukleotidy jsou značeny standardním jednopísmenným kódem. Aminokyseliny jsou značeny standardním jednopísmenným nebo trojpísmenným kódem.

1. ÚVOD

Porfyrie jsou dědičná metabolická onemocnění způsobená enzymovými defekty v biosyntetické dráze hemu. Hem je součástí mnoha proteinů a podílí se na řadě životně důležitých procesů, jako jsou přenos kyslíku a elektronů, tvorba a odbourávání peroxidů, smíšené oxidace, syntéza cyklického GMP a oxidu dusnatého. Mezi nejznámější hemoproteiny patří hemoglobin, myoglobin, cytochrom aa_3, b, c a c_3, cytochrom P450 oxidázy, peroxidázy, kataláza, tryptofan pyroláza, peroxid syntáza, NO syntáza a indolamin dioxygenáza.

Biosyntéza hemu probíhá v osmi krocích a poruchy v sedmi z nich vyvolávají charakteristickou porfyrii; poruchy erytroidně specifické ALA syntázy mají za následek X-chromozomálně vázanou sideroblastickou anémii.

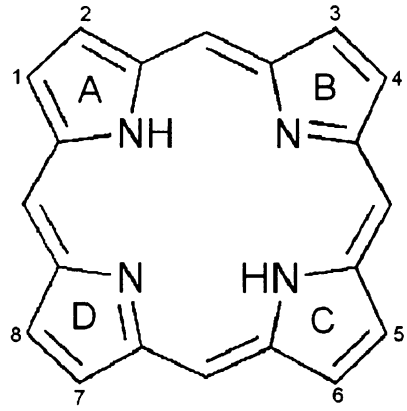
Akutní intermitentní porfyrie (AIP) je způsobena poruchou třetího enzymu v biosyntetické dráze hemu, porfobilinogen deaminázy (PBGD) [EC 4.3.1.8], který také bývá označován jako hydroxymetylbilan syntáza (HMBS) nebo uroporfyrinogen I syntáza. Tato nejběžnější akutní porfyrie je charakterizována potenciálně letálními akutními záchvaty (akutní ataka) provázenými křečovitou bolestí břicha a dalšími neuropsychiatrickými příznaky. Gen pro lidskou PBGD byl popsán roku 1986 (RAICH et al. 1986), což umožnilo charakterizovat AIP na molekulárně genetické úrovni.

V diplomové práci jsem se zabýval studiem molekulárních poruch u AIP pacientů z České a Slovenské republiky s cílem vysvětlit, jaký dopad mají mutace na funkci enzymu PBGD.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Porfyriny a porfyrinogeny

Základní porfyrinový skelet se skládá ze čtyř pyrolových kruhů označovaných písmeny A, B, C a D (cyklický tetrapyrol). Ty jsou navzájem spojeny pomocí metinových můstků (-CH=). Jedná se o rigidní planární strukturu, na kterou může být připojeno osm vedlejších řetězců v pozicích 1–8 (Fischerova nomenklatura, obr. 1). Typ postranního řetězce určuje fyzikální vlastnosti porfyrinů.



Obr. 1: *Chemická struktura porfyrinu.*

Během biosyntézy hemu vznikají nekonjugované bezbarvé porfyrinogeny, u kterých jsou pyroly spojeny metylenovými skupinami (-CH_2-). Porfyrinogeny se na vzduchu oxidují na barevné porfyriny s propojeným systémem konjugovaných dvojných vazeb.

Důležitou vlastností cyklické struktury tetrapyrolů je schopnost vázat kovy. V této podobě mohou plnit svou nejdůležitější funkci. Hem, komplex obsahující železo, se váže k různým typům proteinů. Chlorofyl obsahuje hořčík a má nezastupitelnou funkci při využívání solární energie v biosféře.

2.1.1. Fotochemické vlastnosti porfyrinů

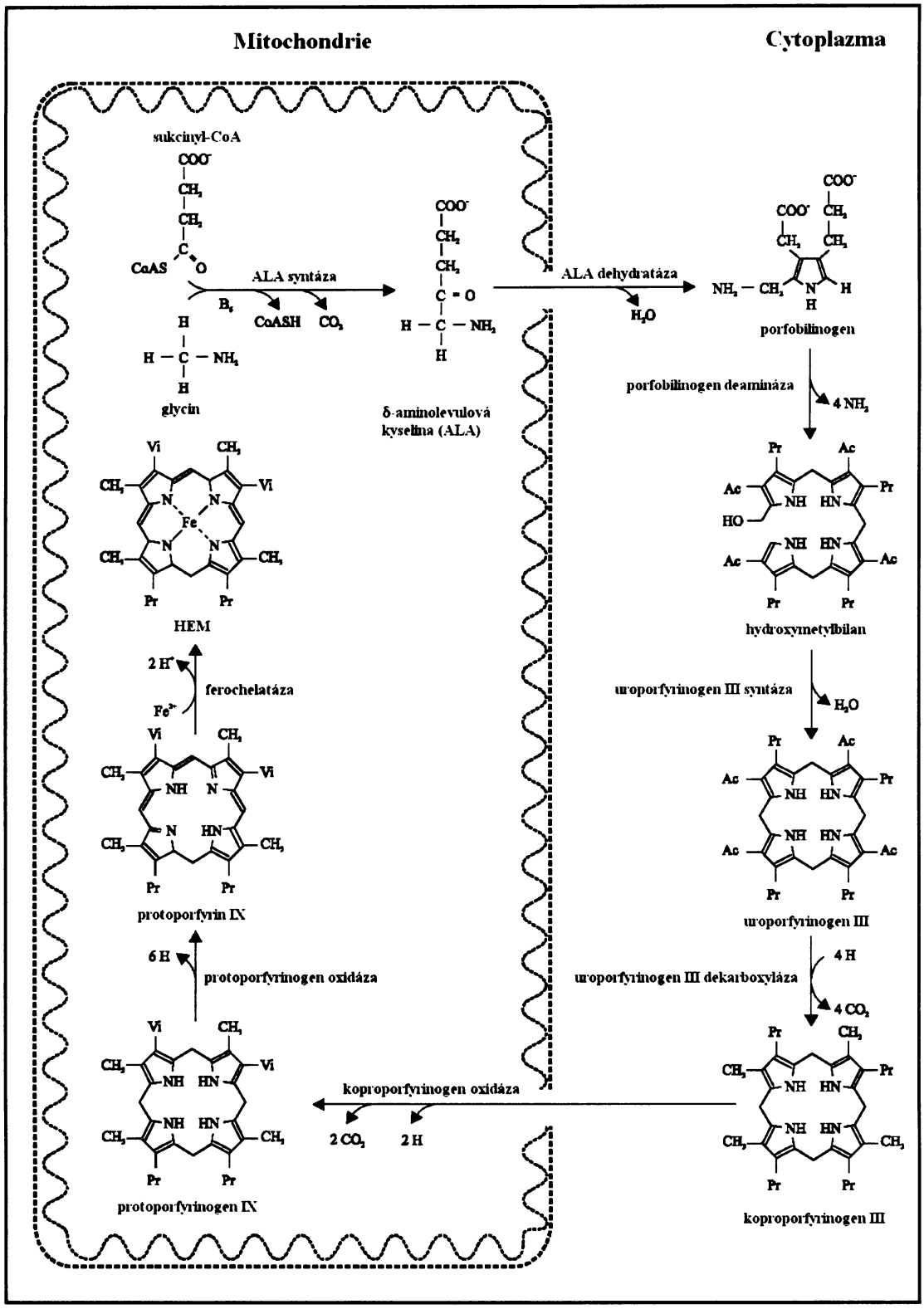
Porfyriny jsou excitovatelné světlem o vlnové délce 400 nm a intenzivně hnědočerveně až purpurovočerveně fluoreskují. V kyselém prostředí porfyriny vykazují dva silné emisní pruhy o vlnové délce 600–610 nm a 640–660 nm. Této vlastnosti porfyrinů využívají spektrofluorometrické metody k jejich velmi citlivé detekci. Hem (fero-protoporfyrin) nefluoreskuje vůbec, stejně jako další porfyriny chelatované paramagnetickými kovy (Mn, Co). Porfyriny chelatované diamagnetickými kovy (Zn, Sn, Mg) fluoreskují. Porfyriny bez fluorescence lze detekovat pomocí absorpčních vlastností. Nejdůležitější absorpční pásmo porfyrinů leží v oblasti Soretova pásu, tj. v oblasti s vlnovou délkou 390–450 nm. Tento úkaz je podmíněn aromatickým charakterem tetrapyrolového kruhu se systémem konjugovaných dvojných vazeb. Čtyři menší absorpční pásma se nacházejí v oblasti s vlnovou délkou 500–630 nm.

2.2. Biosyntéza hemu

Biosyntéza hemu probíhá v převážné většině živočišných, rostlinných a bakteriálních buněk. Výjimku tvoří např. známý modelový organizmus *C. elegans*, který není schopen syntézy hemu *de novo* a hem získává pouze z prostředí (RAO et al. 2005).

Nejlépe známou funkcí hemu je vazba a přenos kyslíku (hemoglobin). Hem je také nezbytný pro přenos elektronů na cytochromy v mitochondriálním dýchacím řetězci. Hemoproteiny cytochrom P450 oxidázy jsou enzymy oxidativního metabolismu steroidů, žlučových solí, mastných kyselin, aminokyselin, prostaglandinů, leukotrienů, biogenních aminů, léčiv, chemických karcinogenů, mutagenů a kontaminant z prostředí (GONZALES 1988). Tryptofan pyroláza katalyzující oxidaci tryptofanu, peroxidázy, kataláza, peroxid syntáza, NO syntáza a indolamin dioxygenáza patří rovněž mezi enzymy přímo závisející na hemu (BERI a CHANDRA 1993).

Hem je odvozen z osmi molekul glycinu a osmi molekul sukcinyl-CoA a jeho tvorby se účastní osm enzymů. Všechny tyto enzymy i jejich geny byly popsány (KAPPAS et al. 1995, MOORE 1998, SASSA a KAPPAS 2000). Biosyntetická dráha hemu je znázorněna na obrázku 2.



Obr. 2: *Enzymy a intermediáty biosyntetické dráhy hemu.*

Ac: -CH_2COOH, Pr: -CH_2CH_2COOH, Vi: -$CH{=}CH_2$

První a tři poslední enzymy jsou lokalizovány v mitochondriích, ostatní enzymy jsou cytosolické. Prekurzory hemu (glycin a sukcinyl-CoA) vstupují do reakce katalyzované syntázou δ-aminolevulové kyseliny (ALAS) [EC 2.3.1.37] a v přítomnosti kofaktoru pyridoxal 5´-fosfátu dávají vzniknout δ-aminolevulové kyselině (ALA). U některých organizmů byla prokázána ještě přídatná syntetická dráha, kdy ALA vzniká z L-alaninu a γ,δ-dioxovalerátu transaminační reakcí katalyzovanou L-alanin:4,5-dioxovalerát transaminázou (MORTON et al. 1981, TYAGI a DATTA 1993).

Dvě molekuly ALA jsou dehydratázou δ-aminolevulové kyseliny (ALAD) [EC 4.2.1.24] kondenzovány na monopyrol porfobilinogen (PBG).

Porfobilinogen deamináza (PBGD) [EC 4.3.1.8] postupně přidává čtyři molekuly PBG na svůj kovalentně vázaný dipyrometanový kofaktor, který tak funguje jako primer pro připojení substrátu. Produktem této reakce je hydroxymetylbilan.

Čtvrtý enzym biosyntetické dráhy hemu, uroporfyrinogen III syntáza (UROS) [EC 4.2.1.75], přeměňuje vysoce nestabilní hydroxymetylbilan na uroporfyrinogen III, čímž dochází k uzavření lineárního tetrapyrolu do kruhu. V nepřítomnosti uroporfyrinogen III syntázy může z hydroxymetylbilanu neenzymaticky vznikat uroporfyrinogen I. Za normální situace se tato izoforma nachází v buňkách pouze v nepatrném množství.

Čtyři karboxylové skupiny řetězců octové kyseliny v uroporfyrinogenu III jsou postupně odstraněny v reakci katalyzované cytosolickou uroporfyrinogen dakarboxylázou (UROD) [EC 4.1.1.37].

V přítomnosti kyslíku katalyzuje koproporfyrinogen oxidáza (CPO) [EC 1.3.3.3] odstranění karboxylových skupin a dvou vodíků z propionových skupin pyrolových kruhů za tvorby vinylových skupin, čímž vzniká protoporfyrinogen IX, který volně difunduje do mitochondriální matrix.

V sedmém kroku biosyntézy hemu, je odstraněno šest atomů vodíku z protoporfyrinogenu IX za vzniku protoporfyrinu IX. Reakce je katalyzovaná protoporfyrinogen oxidázou (PPOX) [EC 1.3.3.4]. Oxidace protoporfyrinogenu může probíhat i neenzymatickou cestou.

Působením mitochondriální ferochelatázy (FECH, známé také pod názvem hem syntáza) [EC 4.99.1.1] je v posledním kroku do protoporfyrinu IX začleněn železnatý ion (Fe^{2+}).

2.3. Regulace biosyntézy hemu

V savčím organizmu je nejvíce hemu syntetizováno v kostní dřeni (asi 85% z celkového množství hemu obsaženého v lidském těle) za účelem tvorby hemoglobinu a v játrech, v nichž se hem uplatňuje převážně jako prostetická skupina cytochromů P450 oxidáz. Biosyntéza hemu je v kostní dřeni a jaterní tkáni regulována odlišnými způsoby (SASSA 1990, ABRAHAM 1991, MAY et al. 1995, FUJITA 1997, PONKA 1999).

První tři enzymy v erytroidní dráze syntézy hemu jsou zcela odlišné od enzymů v jaterní dráze díky tkáňově specifické transkripci a alternativnímu sestřihu jejich mRNA. ALAS kódují dva různé geny (BISHOP 1990). Gen pro tzv. „housekeeping" jaterní ALAS se u lidí nachází na chromozómu 3p21 a podléhá negativní regulaci volným hemem. Erytroidně specifická ALAS kódovaná genem na X-chromozómu je indukována více faktory, např. volným hemem, erytropoetinem, některými steroidy nebo nízkou tenzí kyslíku (BEUKEVELD 1995). ALAD a PBGD jsou kódovány unikátními geny, které však obsahují dva odlišné promotory. Jeden z nich je funkční jen v erytropoetických buňkách, zatímco druhý je aktivován v ostatních buňkách (GRANDCHAMP et al. 1987, KAYA et al. 1994). Tvorba zbylých pěti enzymů biosyntetické dráhy hemu probíhá ve všech tkáních stejným způsobem.

2.3.1. Regulace v hepatocytech

Hlavním regulačním mechanizmem biosyntézy hemu v hepatocytech je působení volného hemu na ALAS, první enzym v biosyntetické dráze, na úrovni transkripční, translační a na úrovni přenosu cytosolického prekurzoru ALAS do mitochondrií (PONKA 1999). Alosterická inhibice mitochondriální ALAS hemem hraje v regulaci rychlosti biosyntézy hemu méně důležitou roli, než se předpokládalo dříve, protože koncentrace volného hemu v mitochondriích je za fyziologických podmínek příliš nízká (KAPPAS et al. 1995).

Volný hem reguluje rychlost transkripce ALAS. Děje se tak prostřednictvím proteinu vázajícího hem (HRP, heme regulatory protein), který při nízké koncentraci hemu disociuje z promotorové oblasti DNA a umožní tak transkripci genu pro ALAS. 5´-nepřekládaná oblast ALAS mRNA obsahuje sekvenci pro vazbu regulačního proteinu vázajícího hem, který inhibuje translaci a snižuje stabilitu mRNA (HAMILTON et al. 1991). ALAS je syntetizována v cytosolu na volných polyribozómech. Nově syntetizovaný prekurzor ALAS obsahuje na N-konci signální sekvenci pro transport do mitochondrie dlouhou 56 aminokyselin, která je odštěpena během translokace prekurzoru do mitochondrie. Translokaci negativně ovlivňuje hem (HAYASHI et al. 1980) a glukóza (glukózový efekt, DELOSKEY a BEATTIE 1984).

Dalším mechanizmem regulujícím syntézu hemu v játrech je koncentrace glycinu (substrátu pro ALAS). V mitochondriích je koncentrace glycinu mnohem nižší (asi 1 mM) než je hodnota K_m pro ALAS (5–19 mM). Skutečnost, že koncentrace glycinu v mitochondriích je 10x vyšší než v plazmě, svědčí o aktivním transportu glycinu do mitochondrií (KAPPAS et al 1995).

Pátým regulačním mechanizmem syntézy hemu v játrech je rychlý obrat ALAS. Poločas života ALAS činí přibližně 70 min, což je nejméně ze všech známých mitochondriálních proteinů (KAPPAS et al. 1995).

Hem indukuje hem oxygenázu, která degraduje nadbytek nově syntetizovaného hemu na žlučová barviva. (BERY et al. 1993)

Další mechanizmy vedoucí ke snížení koncentrace volného hemu v játrech jsou tyto (KAPPAS et al. 1995):

- zvýšená utilizace hemu po indukci cytochrom P450 oxidáz,
- narušení syntézy hemu endogenními látkami např. sukcinylacetonem, produkovaným ve zvýšeném množství u vrozené poruchy tyrozinémie I. typu,
- v případě porfyrií, částečná deficience enzymů biosyntetické dráhy hemu.

Některé z výše uvedených mechanizmů se uplatňují jen za patologických podmínek, ale všechny mají větší či menší vliv na výslednou rychlost syntézy hemu v játrech. Pokud je v důsledku nedostatku hemu několikanásobně stimulována ALAS, může limitovat rychlost biosyntézy hemu v hepatocytech i aktivita PBGD.

2.3.2. Regulace v kostní dřeni

Regulační funkce hemu se uplatňuje také v erytroidních buňkách. Zde však proteosyntézu enzymů potřebných pro tvorbu hemoglobinu spíše stimuluje (MAY 1995). Syntéza hemu stejně jako maturace a diferenciace erytrocytů je řízena hormonem erytropoetinem. Hem i globin jsou syntetizovány současně v ekvivalentním množství. Pokud je syntéza hemu v erytroidních buňkách spuštěna, všechny její kroky běží maximální rychlostí (SASSA 1990, ABRAHAM 1991, PONKA 1999). Jakmile koncentrace volného hemu dosáhne určité hladiny, uplatní se jeho regulační funkce, inhibuje ALAS a indukuje syntézu hem oxygenázy, která hem degraduje.

Rychlost syntézy hemu v erytroidních buňkách rovněž závisí na buněčném příjmu železa. Příjem železa je kontrolován receptorem zprostředkovanou endocytózou transferinu (protein přenášející železo v krvi) a jeho receptoru (PONKA 1999). Rychlost syntézy transferinového receptoru je regulována železem prostřednictvím sekvence IRE (iron responsive element) v 3′-nepřekládaném úseku jeho mRNA. Pokud je železa nedostatek, váže se na IRE mRNA transferinového receptoru vazebný protein (IRE-BP). Tím dochází ke stabilizaci mRNA a k následné indukci syntézy transferinového receptoru. Také translace feritinu (protein, který v buňce váže železo a zabraňuje tak toxickému účinku vysoké koncentrace železa) je kontrolována vazbou IRE-BP na IRE, tentokrát na 5′-konci mRNA. Při nízké koncentraci železa se aktivovaný IRE-BP váže na IRE a brání nasednutí malé podjednotky ribozómu a zahájení translace (ROUAULT a KLAUSNER 1997). IRE v 5′-nepřekládané oblasti mRNA erytroidní ALAS plní stejnou funkci jako v případě feritinu (COX et al. 1991).

Transferin přenáší do buněk železo i zinek. V cytoplazmě tak dochází u většiny metaloproteinů k termodynamické kompetici mezi železem a zinkem. Avšak po oxidaci na železitý ion je železo selektivně transportováno do mitochondrií, zatímco zinek převažuje v cytoplazmě. Tato selekce mezi buněčnými kompartmenty je nezbytná pro vznik železoporfyrinů, protože oba prvky jsou dobrým substrátem s ekvimolární afinitou pro FECH (BEUKEVELD 1995).

Rychlost uvolňování železa z transferinu, oxidace cytoplazmatického železa, transport železa do mitochondrií prostřednictvím citrátu nebo feritinu, redukce mitochondriálního

železa a afinita redukovaného železa k FECH jsou faktory, které musí být brány v úvahu při posuzování rychlosti syntézy hemu v kostní dřeni (BEUKEVELD 1995).

2.3.3. Regulace v ostatních buňkách

Regulace syntézy hemu v jiných buňkách byla studována méně. Bylo například prokázáno, že některé léky schopné vyvolat porfyrický záchvat indukují pouze jaterní ALAS a nemají vliv na ALAS v kultivovaných fibroblastech nebo srdci, varlatech, mozku a slezině potkana. Z toho lze usuzovat na poněkud odlišný způsob regulace biosyntézy hemu v těchto buněčných typech (KAPPAS et al. 1995).

2.4. Porfyrie, obecný přehled

Porfyrie jsou zděděná nebo získaná onemocnění způsobená částečným defektem některého z enzymů v biosyntetické dráze hemu (MARTÁSEK a KORDAČ 1989, KAPPAS et al. 1995, BERK et al. 1998, ELDER 1998, NORDMANN et al. 1999, GROSS et al. 2000, IFTIKHAR 2002, NORDMANN a PUY 2002, DEYBACH a PUY 2003, viz dotatky tab. 11).

Porfyrie tvoří heterogenní skupinu metabolických poruch. Biochemicky lze rozlišit 7 porfyrií (tab. 1). Podle tkáně, kde je syntetizován nadbytek porfyrinů nebo jejich prekurzorů se porfyrie dělí na erytropoetické a jaterní. Praktické je rozdělení porfyrií na chronické a akutní (indukovatelné). Klinickými projevy porfyrií jsou fotosenzitivita způsobená fotoreaktivitou porfyrinů, neuroviscerální dysfunkce (akutní záchvaty) nebo obojí (POH-FITZPATRICK 1998). Dvě hlavní kožní porfyrie jsou porfyria cutanea tarda (PCT) s nadprodukcí uroporfyrinu (KAPPAS et al. 1995, ELDER 1998) a erytropoetická protoporfyrie (EP, COX et al. 1998) s nadprodukcí protoporfyrinu. Vzácným typem porfyrie s nejsilnější fotosenzitivitou je kongenitální (vrozená) erytropoetická porfyrie (CEP, DESNICK et al. 1998, DESNICK a ASTRIN 2002). Tyto porfyrie vykazují odlišné kožní léze. Kožní fotosenzitivita je důsledkem fluorescenčních vlastností porfyrinů. Po absorpci světla o vnové délce 400–410 nm přejdou porfyriny do excitovaného stavu. Přebytečná energie může být uvolněna za tvorby kyslíkového radikálu (DALLE-CARBONARE a PATHAK 1992). Tento radikál pak reaguje se

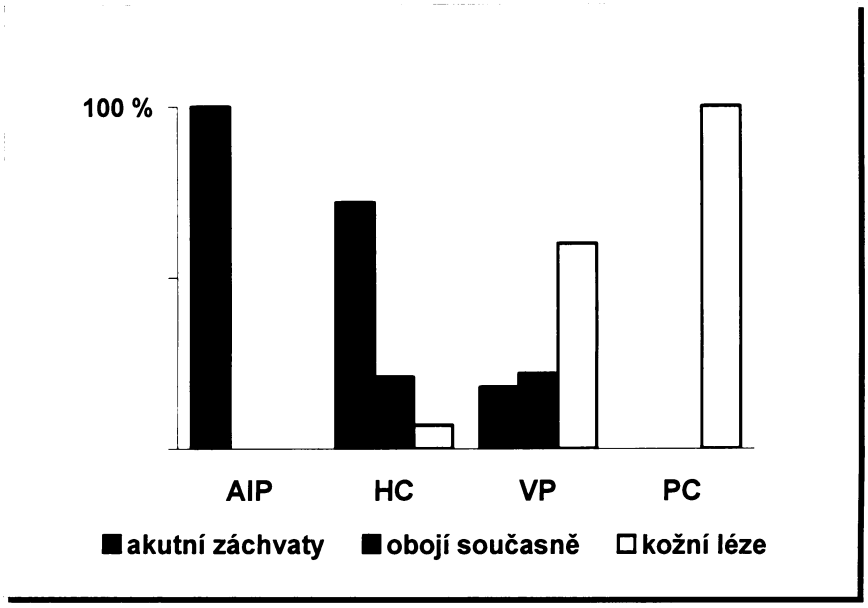
všemi látkami v okolí. Fotopoškození způsobené porfyriny je tudíž závislé na buněčné lokalizaci porfyrinů. Lipofilní protoporfyrin, produkovaný v nadbytku v případě erytropoetické protoporfyrie, se koncentruje v membránách mitochondriích a ničí je. Hydrofilní uroporfyrin, v případě porfyrie cutanei tardy, se koncentruje v lyzozomech a po ozáření způsobuje uvolnění lyzozomálních enzymů. Z tohoto důvodu lze u EP a PCT pozorovat různé kožní léze (LIM 1989).

Tab. 1: *Klasifikace a biochemická charakteristika porfyrií.*

Klasifikace	Klinické projevy	Prekurzory v moči	Prekurzory ve stolici
Erytropoetické porfyrie			
Kongenitální erytropoetická porfyrie	fotosenzitivita, kožní léze, hemolýza	URO I, KOPRO I	URO I, KOPRO I
Erytrohepatální porfyrie			
Erytropoetická protoporfyrie	fotosenzitivita, poškození jater		PROTO
Hepatoerytropoetická porfyrie	fotosenzitivita		KOPRO
Hepatální porfyrie			
- akutní			
akutní intermitentní porfyrie	akutní záchvaty	ALA, PBG, URO I, KOPRO	
porfyria variegata	akutní záchvaty a/nebo fragilita kůže	ALA, PBG, URO I, KOPRO III	PROTO
hereditární koproporfyrie	akutní záchvaty a/nebo fragilita kůže	ALA, PBG, KOPRO III	KOPRO III
akutní porfyrie s defektem ALA dehydratázy	chronické neurologické příznaky	ALA, KOPRO III	
- chronické			
porfyria cutanea tarda	fragilita kůže	URO I	KOPRO
- souběžné			
Chesterova porfyrie [AIP+VP]			
duální porfyrie [VP+PCT]			

Mezi porfyrie s neurologickou manifestací patří akutní porfyrie s defektem ALA dehydratázy (SASSA 1998), akutní intermitentní porfyrie (GRANDCHAMP 1998, DEYBACH a PUY 2003), hereditární koproporfyrie (MARTÁSEK 1998) a porfyria variegata (KIRSCH et al. 1998). Poslední dvě mohou být doprovázeny kožními projevy. Prevalence klinických příznaků u akutních jaterních porfyrií je znázorněna v grafu 1. Neurologické příznaky, často velmi vážné, zahrnují křečovité bolesti břicha, tachykardii, parézu končetin, psychické změny, paralýzu, bezvědomí a další.

Graf 1: *Klinické příznaky akutních jaterních porfyrií.*



Většina porfyrií se dědí autozomálně dominantně, deficience ALA dehydratázy a kongenitální erytropoetická porfyrie vykazují autozomálně recesivní dědičnost. Hepatoerytropoetická porfyrie je vzácná homozygotní forma porfyrie cutanei tardy. Dědičnost a molekulární podstata porfyrií je uvedena v tabulce 2.

Tab. 2: *Dědičnost a molekulární podstata porfyrií (podle SASSA 2002).*

Choroba	Dědičnost	Gen	Chromozóm	Velikost genu (kb)	Počet exonů
ADP	AR	ALAD	9q34	13	13
AIP	AD	PBGD	11q24.1-2	10	15
CEP	AR	UROS	10q25.2-26.3	34	10
PCT	AR/AD	UROD	1p34	3	10
HCP	AD	CPO	3q12	14	7
VP	AD	PPOX	1q21-23	5	13
EPP	AD	FECH	18q21.3	45	11

2.5. Akutní intermitentní porfyrie (AIP)

2.5.1. Historie

První popis akutní formy porfyrie pochází od Hippokrata, který kolem roku 460 př. n. l. popsal premenstruální krizi ženy z Thasu v Řecku (RIMINGTON 1993). Moderní historie akutních porfyrií začíná na konci 19. století (TSCHUDY et al. 1975, KORDAČ 1978, GOLDBERG 1998). První klinický popis porfyrie (CEP) pochází od Schultze z roku 1871. McMunn v roce 1888 pozoroval u svých pacientů červený pigment v moči, jehož stopy však nalézal i u zdravých osob. V roce 1889 jako první popsal akutní porfyrii Stokvis. Na přelomu století se pigmenty v moči pacientů zabýval Garrod, který později řadí porfyrie do skupiny vrozených metabolických poruch. Günther v letech 1911–1922 rozdělil porfyrie na akutní v případě hematoporfyrinurií, kongenitální s fotosenzitivitou od narození a chronické pokud se fotosenzitivita objevila v průběhu života. Typické záchvaty akutní porfyrie měly už tehdy spojitost s užíváním léků (např. hypnotikum sulfonal).

V roce 1937 popsal Jan Waldenström, který původně pracoval v laboratoři slavného porfyrinologa a nositele Nobelovy ceny Hanse Fischera, 103 pacientů s akutní porfyrií. Většina pacientů pocházela z malé vesnice v severním Švédsku. V této studii byla poprvé prokázána autozomálně dominantní dědičnost AIP. Později Waldenström vyslovil hypotézu, že porfyrie jsou způsobeny enzymatickými poruchami v biosyntetické dráze hemu; jako první také použil termín akutní intermitentní porfyrie (WALDENSTRÖM 1957). Test na porfobilinogen byl vyvinut dalším Fischerovým spolupracovníkem Watsonem v roce 1941. Watson kromě toho poprvé použil hematin k léčbě akutních porfyrií (WATSON et al. 1978). Granick v 60. letech objevil, že tvorba ALAS, může být indukovaná chemickými látkami, které zapříčiňují akutní záchvaty (GRANICK 1966). Biochemické pozadí AIP bylo ověřeno až po předložení důkazů, že onemocnění je způsobeno poruchou PBGD (MIYAGI 1970, MEYER et al. 1972). Charakterizace genu pro porfobilinogen deaminázu (RAICH et al. 1986, GRANDCHAMP et al. 1987, CHRETIEN et al. 1988, NAMBA et al. 1991) odstartovala rozsáhlý výzkum molekulárně genetické podstaty AIP a byla popsána řada mutací způsobujících tuto chorobu (viz. kap. 2.7.2.).

2.5.2. Incidence a geografické rozšíření

Ve většině zemí je AIP nejběžnějším typem akutní porfyrie (KAPPAS et al. 1995), pouze v Jihoafrické republice je častější porfyrie variegata (GORCHEIN 1997). Například v USA je prevalence AIP 5–10:100 000, v západní Austrálii 3:100 000 (TSCHUDY et al. 1975). Prevalence AIP v argentinské populaci byla odhadnuta na 1:125 000, což je méně než v jiných populacích (DE SIERVI et al. 1999b). Neobvykle vysoký výskyt AIP (1,46%) byl zjištěn v komunitě Kumhar v západním Rajahstánu v Indii (SACHDEV et al. 2005).

V Evropě jako celku se prevalence odhaduje na 2–5:100 000. Nejvyšší prevalence AIP byla dosud popsána v severním Švédsku 100:100 000, ve dvou malých oblastech dokonce až 0,5–2%. Nicméně celková prevalence AIP ve Švédsku je pouze 10:100 000 (FLODERUS et al. 2002). V Polsku je podle nejnovějších údajů prevalence AIP 1:70 000 (SCHNEIDER-YIN et al. 2006). Ve Finsku udává původní studie prevalenci na 3:100 000 (MUSTAJOKI a KOSKELO 1976), podle novější studie byla prevalence nízké aktivity PBGD v krvi zdravých dárců 1:500 (MUSTAJOKI et al. 1992). Podobná studie z Francie uvádí hodnoty 1:1 675 (NORDMANN et al. 1997). Tato fakta vedou nutně k závěru, že prevalence AIP, byť i bez zjevných příznaků (tzv. asymptomatická AIP), může být mnohem vyšší, než se předpokládalo.

2.5.3. Klinický obraz onemocnění

K akutním záchvatům dochází přibližně u 10–20% postižených jedinců. Asi 50% pacientů má pouze mírnější příznaky typické pro AIP (KAUPPINEN a MUSTAJOKI 1992). Přibližně polovina osob se sníženou aktivitou PBGD tak zůstává celý život bez příznaků. K akutním záchvatům téměř nedochází před pubertou, ale obvykle až mezi 15. a 40. rokem života (MUSTAJOKI a KOSKELO 1976). Ke klinickým projevům dochází 3x častěji u žen než u mužů (viz dále).

Příznaky během akutního záchvatu se většinou vztahují k neurologickým dysfunkcím. Přehled příznaků je uveden v tabulce 3 (podle MUSTAJOKI 1999). Téměř vždy je přítomná křečovitá až agonizující bolest břicha. Tmavá nebo červená moč bývá také často pozorována, ale ostatní příznaky jsou značně variabilní, což způsobuje potíže při

stanovení správné diagnózy. Pokud nedojde k okamžité léčbě, může akutní záchvat vést až k letální respirační paralýze. V současnosti ale dochází k takovým příznakům jen zřídka a to zejména díky dobré znalosti faktorů vyvolávajících záchvat a také díky dokonalejší terapii (MARTÁSEK a KORDAČ 1989, KAUPPINEN a MUSTAJOKI 1992). Průběh akutního záchvatu je značně individuální a příznaky přetrvávají dny až týdny. Někteří pacienti mají téměř nepřetržité příznaky choroby, ale u většiny symptomatických pacientů se záchvaty střídají s obdobím relativně asymptomatickým (KAPPAS et al. 1995).

Tab. 3: *Příznaky během akutního záchvatu.*

Bolest břicha	90%
Tmavá nebo červená moč	89%
Zvracení	61%
Zácpa	56%
Bolest končetin a/nebo zad	53%
Svalová slabost	53%
Psychické příznaky	46%
Hypertenze (diast. > 100 mmHg)	42%
Tachykardie	40%
Horečka	35%
Porucha smyslového vnímání	19%
Křeče	14%
Paralýza dýchacích svalů	14%
Průjem	9%

Porfyrické záchvaty bývají často vyvolány vnějšími nebo vnitřními faktory např. hormonálními změnami během menstruačního cyklu a těhotenství, některými léčivy (např. barbituráty, sulfonaminy, pyrazolonovými deriváty – induktory cytochromů P450), alkoholem, infekcí, stresem a nepřiměřeným kalorickým příjmem (MARTÁSEK a KORDAČ 1989, KAPPAS et al. 1995, DEYBACH a PUY 2003). Prevencí těchto faktorů se obvykle sníží četnost záchvatů. Ženy v plodném období potřebují hormonální terapii k potlačení produkce pohlavních hormonů.

U AIP pacientů se některá onemocnění vyskytují mnohem častěji než ve zdravé populaci. Riziko hepatocelulárního karcinomu je zvýšeno 61–114x (KAUPPINEN a MUSTAJOKI 1992, ANDERSSON et al. 1996, LINET et al. 1999) a je příčinou smrti u jedné čtvrtiny AIP pacientů (ANDERSSON et al. 1996). Chronická hypertenze je mnohem běžnější u pacientů s manifestovanou AIP než u pacientů s AIP latentní nebo u zdravých jedinců (ANDERSSON a LITHNER 1994): 56% pacientů s manifestovanou

AIP mělo hypertenzi. Naproti tomu výskyt chronické hypertenze ve studovaném souboru finských porfyriků z 53 rodin byl mnohem nižší (~24%) a navíc nekoreloval s klinickou manifestací (KAUPPINEN a MUSTAJOKI 1992). Zvýšená úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění nebyla u AIP pacientů prokázána (KAUPPINEN a MUSTAJOKI 1992, ANDERSSON et al. 1996). Riziko chronického selhání ledvin je mezi AIP pacienty vyšší (KAUPPINEN a MUSTAJOKI 1992, ANDERSSON a LITHNER 1994, ANDERSSON et al. 2000).

2.5.4. Patogeneze

Mechanizmy, kterými deficience PBGD vyvolává příznaky AIP, nejsou ještě zcela objasněny. Za normálních podmínek je biosyntetická dráha hemu schopna plnit svou úlohu i při snížené aktivitě PBGD. Zvýšená metabolická potřeba hemu v játrech vede k indukci exprese ALAS (KAPPAS et al. 1995, ELDER et al. 1997). Výsledkem je nahromadění meziproduktů biosyntézy hemu (ALA a PBG), protože poškozený enzym (PBGD) není schopen přeměnit veškerý porfobilinogen na hydroxymetylbilan.

Některé léky (např. rifampicin, barbituráty), alkoholické nápoje a steroidní hormony (a další látky, které mohou vyvolat příznaky porfyrií) buď indukují syntézu hemu pro tvorbu cytochrom P450 izoenzymů (DOSS et al. 2000) nebo přímo degradují hem v buňkách (např. alylisopropylacetamid) a tím indukují jaterní ALAS. K vyčerpání hemu a k indukci ALAS může dojít i zvýšením aktivity hem oxygenázy (např. nedostatečným kalorickým příjmem nebo infekcí, HERRICK a MCCOLL 2005).

Akutní záchvaty AIP jsou vyvolány indukcí ALAS a příznaky jsou důsledkem neurologických dysfunkcí. Přesto podrobnosti molekulární patogeneze zůstávají stále nejasné. Existují tři hlavní hypotézy, které se snaží vysvětlit symptomatologii akutních záchvatů:

1) vyčerpání hemu v buňkách centrálního nervového systému (LINDBERG et al. 1996, 1999),
2) neurotoxicita nahromaděných meziproduktů, zejména ALA (BONKOVSKY 1993), a

3) disturbance neurotransmiterů jako důsledek nedostatku hemu a tryptofan pyrolázy (enzym závisející na hemu) v játrech (LITMAN a CORREIA 1983, 1985).

Neurologické manifestace jsou podle první teorie způsobeny vyčerpáním hemu, následným narušením oxidativní fosforylace v buňkách a zvýšením tvorby serotoninu (ABRAHAM 1991). Zvýšená produkce serotoninu je důsledkem úbytku hemu pro syntézu tryptofan pyrolázy.

Dříve se předpokládalo, že neurologické symptomy jsou způsobeny toxicitou nahromaděné ALA, ale umělé zvýšení koncentrace ALA u potkanů podobné projevy nevyvolalo (BEUKEVELD 1995). Neurologické a psychické změny bez zvýšené hladiny ALA jsou navíc přítomny u některých vzácných případů porfyrie cutanei tardy a erytropoetické protoporfyrie (MEYER et al. 1998).

Na zvířecím modelu bylo prokázáno, že ALA nahromaděná během akutního záchvatu zvyšuje oxidativní zátěž v hepatocytech. Touto zátěží je poškozována řada proteinových struktur a také klíčové enzymy metabolismu glukózy. To vede k rychlému vyčerpání glukózy v hepatocytech. Tím lze vysvětlit, proč podávání glukózy během porfyrického záchvatu vede ke zlepšení klinického stavu (LELLI et al. 2005).

V modulaci patogeneze akutních záchvatů hrají důležitou úlohu kromě genetického poškození v biosyntetické dráze hemu a precipitujících faktorů i další geny. Jedná se zejména o geny metabolismu léků, hormonů a porfyrinů a geny ovlivňující biosyntézu hemu. Například mulidrug resistance protein 2 a P glykoprotein, které transportují různé látky přes membránu hepatocytů do žluče, jsou (stejně jako enzymy P450) vysoce polymorfní. Tím může být vysvětlena různá rychlost clearance porfyrinů a jejich prekurzorů v játrech u různých pacientů (VON UND ZU FRAUNBERG.et al. 2005).

Ačkoliv jsou všechny uvedené teorie podporovány experimentálními výsledky, žádná z nich nemůže vysvětlit rozličné příznaky akutní ataky, a tak patogenetické mechanizmy akutního záchvatu zůstávají dosud ne zcela objasněné.

Vytvořením transgenní myši s částečně chybějící PBGD (LINDBERG et al. 1996, 1999) vznikl první experimentální model akutních porfyrií. Studie provedené na těchto myších naznačují, že nedostatek hemu a následná dysfunkce hemoproteinů způsobuje

chronickou a progresivní neuropatii vedoucí až ke zhoršené motorické koordinaci a svalové ochablosti (LINDBERG et al. 1999).

2.5.5. Biochemické nálezy a diagnostika AIP

Diagnostika akutních porfyrických záchvatů je založena na stanovení zvýšené exkrece ALA a PBG močí (BLAKE et al. 1992). Další klinické testy (tj. test Watson-Schwartzův a test Hoeschův) slouží ke stanovení porfyrinů v moči a exkrementech a jsou důležité pro odlišení AIP od dalších porfyrií, u kterých může docházet k podobným akutním záchvatům (HC a VP). Tato diferenční analýza je důležitá zvláště pro presymptomatickou diagnózu latentních AIP pacientů. Ačkoliv většina nositelů tohoto genetického poškození zůstává po celý život bez potíží (asymptomatičtí), záchvaty mohou být poměrně snadno vyvolány vnějšími faktory. Proto je časná detekce nositelů poškozeného genu důležitá pro prevenci akutních záchvatů.

Do poloviny 90. let bylo hlavní metodou pro vyhledávání latentní AIP v postižených rodinách stanovení aktivity PBGD v erytrocytech (MAGUSSEN et al. 1974, FORD et al. 1980). V takovém uspořádání je jako substrát použit PBG a množství vzniklého uroporfyrinu I je měřeno spektrofluorometricky. Aktivita erytrocytární PBGD je u AIP pacientů poloviční ve srovnání se zdravými osobami. Problém představuje tzv. variantní AIP, při níž je enzymovým defektem postižena pouze neerytropoetická tkáň (MUSTAJOKI 1981). Navíc v určitých případech (~5–15%) může docházet k překryvu naměřených hodnot enzymatických aktivit u zdravých a postižených jedinců a test tak není průkazný (KAUPPINEN et al. 1995, PUY et al. 1997). Aktivitu PBGD může ovlivnit také řada chorob (MUSTAJOKI 1999).

V současnosti se běžně využívá DNA diagnostika. Jednotlivé exony PBGD lze analyzovat sekvencováním. U většího souboru pacientů je výhodnější amplifikované části genu otestovat na přítomnost mutace a sekvencovat jen fragmenty s mutací. Přítomnost mutace lze ověřit např. pomocí metody DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) nebo SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, PUY et al. 1997a, MUSTAJOKI 1999).

2.5.6. Léčba AIP

V roce 1966 bylo prokázáno, že intravenózně podaný hem (ve formě derivátu hematinu) efektivně snižuje aktivitu jaterní ALAS u porfyrických krys a zároveň zlepšuje jejich klinický stav. V humánní medicíně není používání hematinu možné kvůli vedlejším účinkům. Místo toho se k infuzím používá hem stabilizovaný L-argininem (Normosang), který má obdobné účinky na metabolickou dráhu porfyrinů jako hematin, ale bez vedlejších účinků. Má rovněž mnohem vyšší stabilitu (TENHUNEN a MUSTAJOKI 1998).

Jelikož symptomatická léčba je pouze dočasná a neposkytuje dlouhodobou ochranu proti akutním atakám, cílem vědeckého výzkumu jsou nové terapeutické alternativy. Nejdůležitějším orgánem pro vznik akutního záchvatu jsou játra, protože akutní záchvaty jsou často vyvolány faktory, které indukují jaterní ALAS, nebo kladou vysoké nároky na tvorbu hemu v játrech. Bylo prokázáno, že transplantace jater může vést k úplnému vyléčení AIP (SOONAVALLA et al. 2004).

Možným přístupem k léčbě akutních záchvatů je aplikace inhibitoru hem oxygenázy, klíčového enzymu hemové degradace. Tímto způsobem lze zvýšit množství metabolicky využitelného hemu (ANDERSON a KORMOS-HALLBERG 2003). Další možnost léčby akutního záchvatu představuje podání rekombinantní PBGD (SARDH et al. 2003).

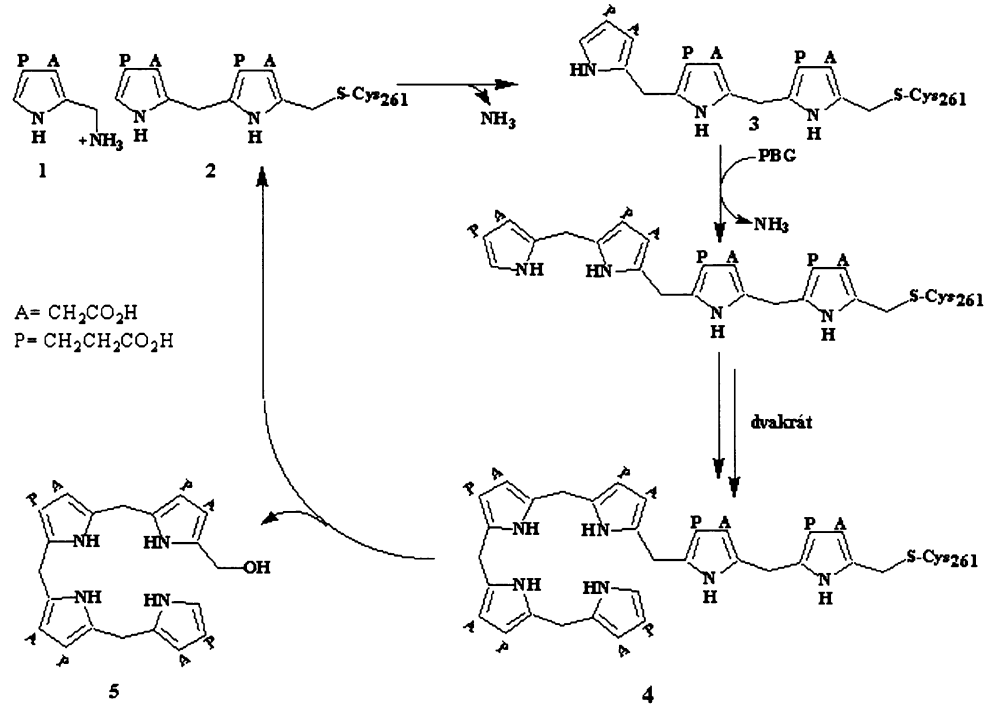
AIP splňuje základní kritéria pro genovou terapii metabolických onemocnění. Je monogenně podmíněna, gen pro PBGD byl dobře charakterizován a byl vytvořen myší model AIP. Byla provedena úspěšná transfekce PBGD expresních plazmidů pomocí nevirového genového přenosu v různých buněčných systémech, včetně fibroblastů pacientů s AIP (JOHANSSON et al. 2003). Pomocí adenovirového genového přenosu byl vyléčen enzymatický defekt u myšího modelu AIP (JOHANSSON et al. 2004).

2.6. Porfobilinogen deamináza (PBGD)

PBGD je monomerní enzym, který se u lidí vyskytuje ve dvou izoformách: 44 kDa „housekeeping" enzym (nespecifická forma přítomná ve všech buňkách) a 42 kDa erytroidně specifický enzym. Nespecifické forma je na N-konci delší o 17 aminokyselin (GRANDCHAMP et al. 1989). Všudypřítomný protein je tvořen 361 aminokyselinami a je kódován unikátním genem v distální části dlouhého raménka 11. chromozómu. Obě formy enzymu mají stejné kinetické parametry (BRONS-POULSEN et al. 2005).

2.6.1. Funkce PBGD

PBGD katalyzuje tetramerizaci porfobilinogenu. Produktem reakce je vysoce nestabilní 1-hydroxymetylbilan (preuroporfyrinogen). Tento krok je následován tvorbou cyklického tetrameru uroporfyrinogenu pomocí uroporfyrinogen III syntázy. PBGD pracuje v několika krocích, v nichž postupně přidává PBG (obr. 3). Dipyrometanový kofaktor slouží k uchycení molekul substrátu do katalytického centra a řídí tvorbu tetrapyrolu (JORDAN a WARREN 1987). Kofaktor není sestavován z molekul porfobilinogenu, ale vzniká z preuroporfyrinogenu reakcí zahrnující C-alkylaci cysteinu-261 (apoenzymu PBGD) 1-hydroxymetylovou skupinou preuroporfyrinogenu (SHOOLINGIN-JORDAN 1995). Apoenzym si kofaktor vytváří sám.



Obr. 3: *Znázornění katalytické funkce PBGD.*

Dále byly izolovány komplexy enzymu s navázaným meziproduktem (WARREN a JORDAN 1988). Z nich nejlabilnější je při 37°C první intermediátový komplex (tj. enzym s jednou navázanou substrátovou molekulou, ES), nejstabilnější druhý intermediát (ES_2). Poslední enzym-intermediátový komplex (ES_4), ve kterém jsou na dipyrometanový kofaktor navázány všechny čtyři porfobilinogenové kruhy, se vůbec nehromadí, pravděpodobně díky rychlému uvolňování tetrapyrolu z enzymu.

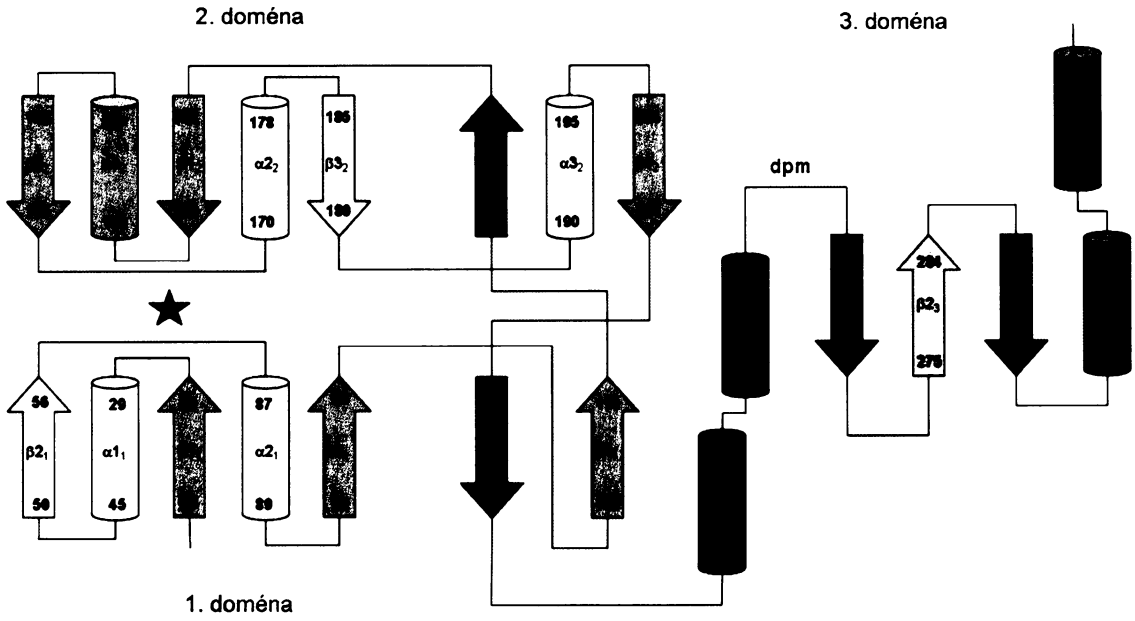
Přes svou malou velikost má PBGD schopnost katalyzovat vícenásobné chemické reakce. Katalyzuje opakovanou kondenzaci PBG podjednotek s akceptorovým pyrolovým řetězcem a ukončí reakci po sestavení tetrapyrolu.

2.6.2. Struktura PBGD

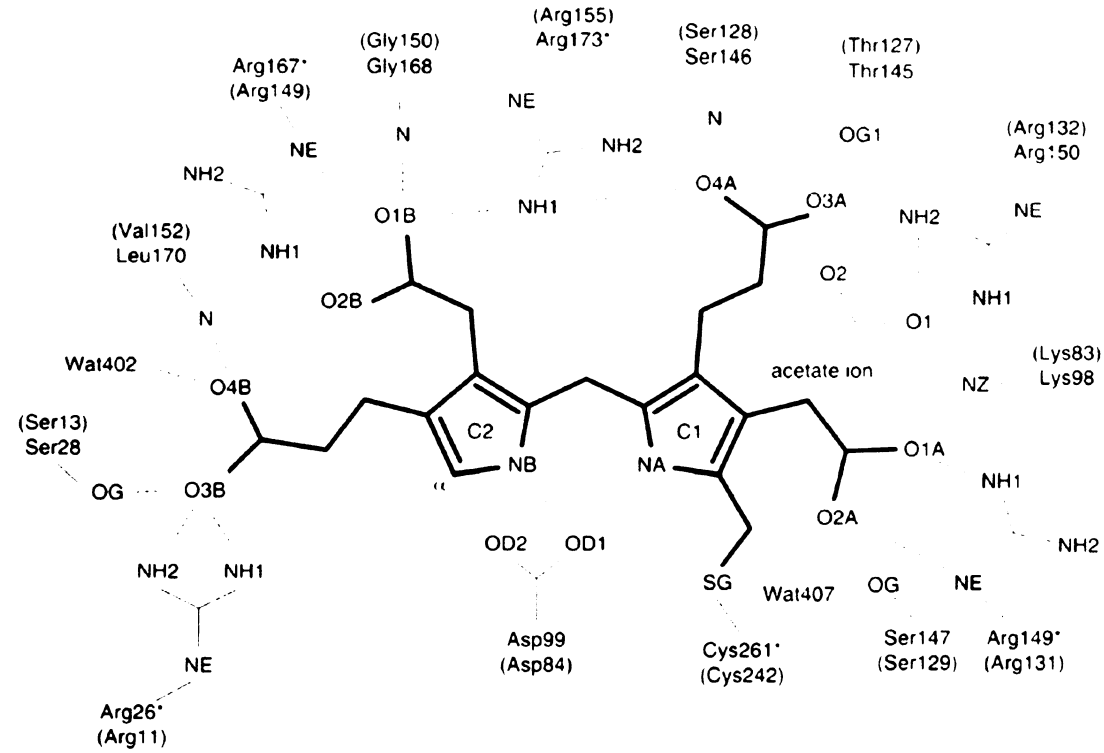
Struktura lidské PBGD byla předpovězena za použití třírozměrné struktury PBGD přečištěné a krystalizované z *E. coli* s rozlišením 1.66 Å (LOUIE et al. 1992, 1996, BROWNLIE et al. 1994, HELLIWELL et al. 1998, 2002). Struktury PBGD (*E. coli)* jsou zveřejněny v databázi www.PDB.org (1AH5, 1GTK, 1PDA, 1YPN, 2YPN).

Molekula se skládá ze tří domén podobné velikosti spojených navzájem flexibilní oblastí (obr. 4). Mezi 1. a 2. doménou má enzym jedno aktivní místo, které využívá pro kondenzaci PBG (WARREN a JORDAN 1988, LOUIE et al. 1992). V případě *E. coli* (odpovídající aminokyselinové zbytky lidského proteinu jsou uvedeny v závorce) je dipyrometanový kofaktor kovalentně vázán na cystein-242 (Cys261). Další aminokyselinové zbytky tj. aspartát-84 (Asp99), argininy-131, 132, 149, 155 (Arg149, 150, 167, 173), lysin-83 (Lys98) a ještě některé další tvoří iontové interakce a vodíkové můstky s kofaktorem (BROWNLIE et al. 1994). Pozitivně nabité postranní řetězce argininu-11, 132 a 155 (Arg26, 150, 173) pravděpodobně interagují se substrátem (obr. 5).

Podle aminokyselinové sekvence odvozené ze sekvence nukleotidů řady organizmů je 58 zbytků v PBGD invariantních. Tyto konzervované aminokyseliny jsou seskupeny v hydrofobním jádře molekuly, v aktivním místě nebo v jiných konformačně důležitých pozicích. To svědčí o podobné struktuře a mechanizmu katalytické aktivity PBGD v organizmech různého fylogenetického stáří (BROWNLIE et al. 1994).



Obr. 4: *Schematické znázornění topologie sekundárních struktur lidské PBGD, modelované podle E. coli PBGD. Změnou barvy jsou odlišeny jednotlivé exony. Každý sekundární prvek je číslován podle lidské aminokyselinové sekvence a je označen identifikátorem sekundárního prvku (např. $\alpha 1_1$ je 1. α-helix v 1. doméně). Hvězdou je označeno aktivní místo enzymu a dpm označuje místo, kam se váže kofaktor (Cys261).*

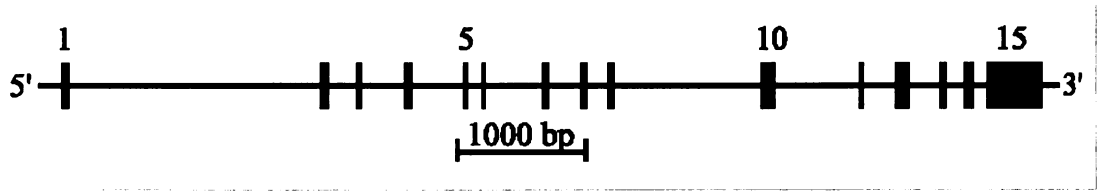


Obr. 5: *Znázornění vodíkových a iontových vazeb dipyrometanového kofaktoru (tučně) s aminokyselinami a molekulami vody v aktivním centru PBGD. Aminokyseliny jsou číslovány podle lidské sekvence, ekvivalentní zbytky E. coli jsou uvedeny v závorce. Převzato z WOOD et al. (1995).*

2.7. Molekulární genetika AIP

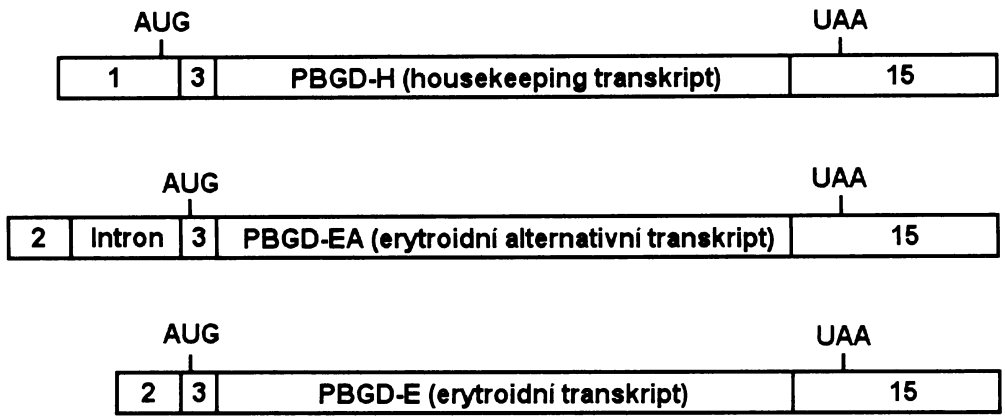
2.7.1. Gen pro PBGD

Gen kódující PBGD byl identifikován a důkladně charakterizován (RAICH et al. 1986, GRANDCHAMP et al. 1987, CHRETIEN et al. 1988, NAMBA et al. 1991, YOO et al. 1993). Je lokalizován na dlouhém raménku 11. chromozómu (NAMBA et al. 1991). Velikost genu je 10 kb, z toho 1,3 kb představuje kódující sekvenci. Genomová sekvence je rozdělena na 15 exonů o velikosti 39–438 bp a 14 intronů o velikosti 87–2913 bp (obr. 6).



Obr. 6: *Struktura genu pro PBGD.*

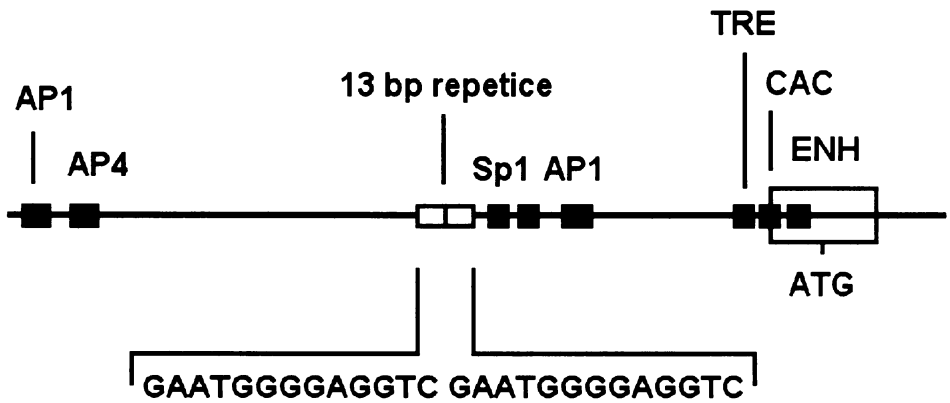
Transkripce probíhá ze dvou různých promotorů (CHRETIEN et al. 1988). mRNA pro nespecifickou izoformu enzymu obsahuje exony 1 a 3–15 a kóduje enzym dlouhý 361 aminokyselin. Erytroidní izoforma je kódována exony 2–15. Translační iniciační kodón je lokalizován v exonu 1 pro nespecifickou izoformu a v exonu 3 pro erytroidně specifickou izoformu. Erytroidní izoforma tak na N-konci postrádá prvních 17 aminokyselin. Poměrně nedávno byla prokázána existence dvou rozdílných erytroidních mRNA transkriptů. Tzv. alternativní erytroidní transkript obsahuje mezi exony 2 a 3 intron 2 a prodlužuje tak 5´-nepřekládanou oblast o 176 bazí (obr. 7, GUBIN a MILLER 2001).



Obr. 7: *Transkripty genu pro PBGD.*

Erytroidní promotorová oblast se nachází v intronu 1 a strukturně připomíná promotor β-globinového genu. Obsahuje CAAC motiv, CAAT box, jedno NFE-2 a dvě GATA-1 vazebná místa (CHRETIEN et al. 1988). Transkripce erytroidní formy PBGD tak může být regulována podobným souborem transkripčních faktorů jako β-globinový gen, což dovoluje zahájit transkripci obou genů současně během erytroidní diferenciace (MIGNOTTE et al. 1989, 1989a).

Promotorová oblast pro tzv. „housekeeping" transkript je lokalizována v exonu 1, blíže 5′-konci (CHRETIEN et al. 1988, YOO et al. 1993). Minimální promotorová sekvence byla určena pomocí delečního mapování a je lokalizována mezi -243 a -115 nukleotidem od translačního iniciačního kodónu. Tato oblast obsahuje dvě Sp1 rozpoznávací konsenzus sekvence, 13 bp repetici neznámé funkce a AP1 rozpoznávací konsenzus sekvenci. Navíc poblíž translačního iniciačního místa jsou sekvenční elementy (TRE, CAC box, ENH) s negativní regulační funkcí (LUNDIN a ANVRET 1997, obr. 8).



Obr. 8: *Struktura promotoru nespecifické formy PBGD.*

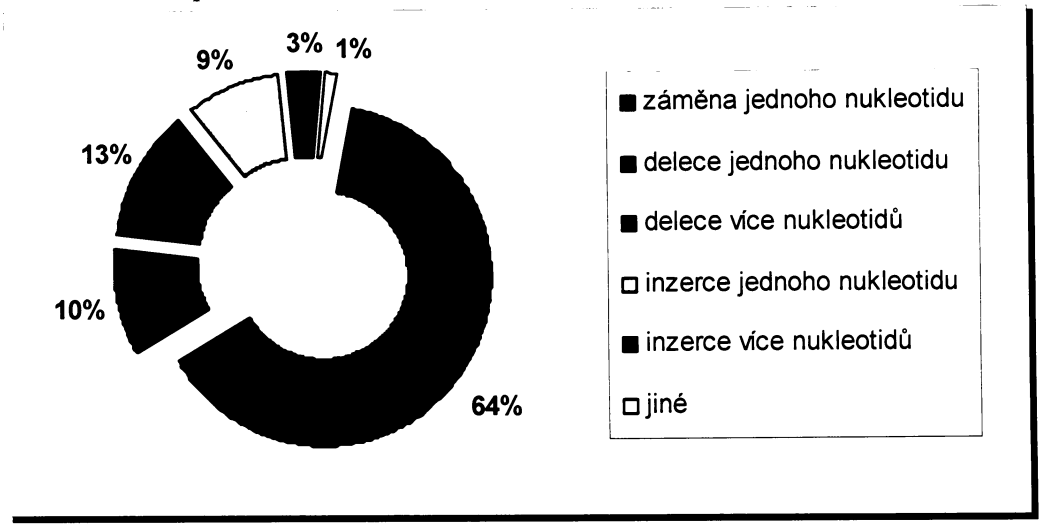
Do konce roku 2005 bylo v genu pro PBGD identifikováno 18 intragenových polymorfismů (LEE a ANVRET 1987, LLEWELLIN et al. 1987, KAUPPINEN et al. 1990, LEE et al. 1991, GU et al. 1991, DAIMON et al. 1993, YOO et al. 1993, PUY et al. 1997, WHATLEY et al. 1999, LAM et al. 2001, ROBREAU-FRAOLINI et al. 2000, BRASCH et al. 2003, viz dodatky tab. 14). Tři z polymorfismů jsou exonové, v exonech 4, 7 a 10, ale nemění aminokyselinovou sekvenci. Patnáct polymorfismů je lokalizováno v intronových oblastech genu; čtyři z nich se nalézají v intronu 1, nejdelším (2,9 kb) intronu v genu pro PBGD. Kromě těchto intragenových polymorfismů byly nalezeny ještě dva polymorfismy v neerytroidní promotorové oblasti (PICAT et al. 1991, LUNDIN a ANVRET 1997) a jeden v 3´-nepřekládané oblasti genu (LAW et al. 1999).

V intronových sekvencích genu pro PBGD bylo nalezeno šest Alu elementů. Alu elementy jsou odvozeny od 7SL RNA nahromaděním vnitřních delecí nebo bodových mutací následovaných dimerizací (MAKALOWSKI et al. 1994). Uvnitř genomu primátů se Alu elementy integrují retropozicí (ROGERS 1985), která zahrnuje tvorbu transkriptu RNA polymerázou III, reverzní transkripci a integraci Alu DNA do AT-bohatých oblastí genomu (JAGADEESWARAN et al. 1981). Typický Alu element je dlouhý 282 nukleotidů a skládá se ze dvou homologních, ale odlišných podjednotek. Alu repetice mohou být rozděleny do různých podrodin na základě všeobecně sdílených diagnostických mutací (JURKA 1993). Dvě z Alu sekvencí v PBGD genu jsou lokalizovány v 5´-oblasti, tři v intronu 1. Šestý Alu element je v intronu 9 a jako jediný je v sense orientaci. Pět Alu sekvencí patří do relativně moderní Sa podrodiny, zatímco jedna je homologní se starší J podrodinou (YOO et al. 1993).

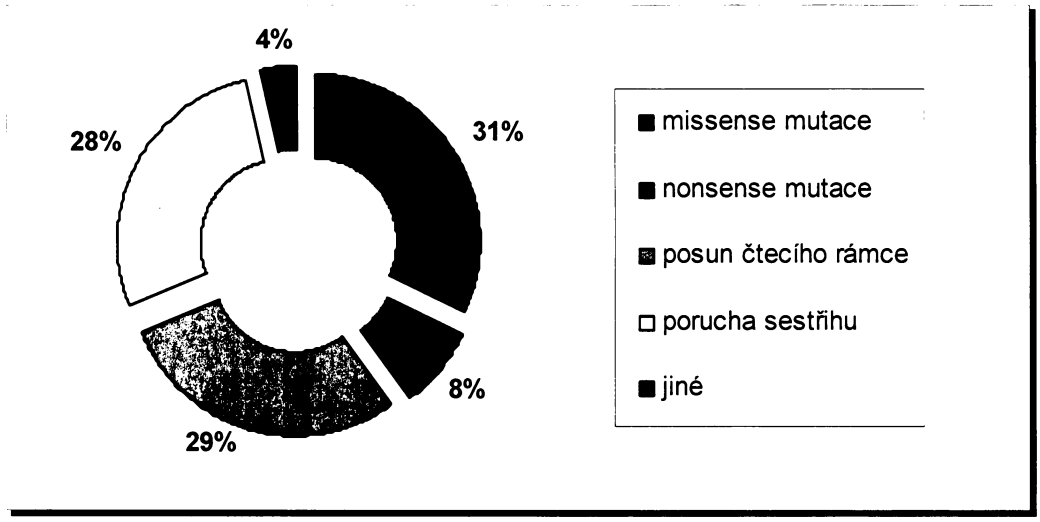
2.7.2. Mutace způsobující AIP

Do konce roku 2005 bylo v genu pro PBGD identifikováno 301 mutací způsobujících AIP (viz dodatky tab. 12). Z těchto mutací patří 192 (64%) mezi jednonukleotidové substituce, 69 (23%) jsou delece a 37 (12%) inzerce. Důsledkem mutací je nejčastěji záměna aminokyseliny (missense mutace, 31%). 29% mutací mění čtecí rámec, což vede k předčasné terminaci translace. 28% mutací ovlivňuje sestřih a 8% mutací vytváří translační terminační kodón (grafy 2 a 3).

Graf 2: *Zastoupení nukleotidových změn v genu pro PBGD.*

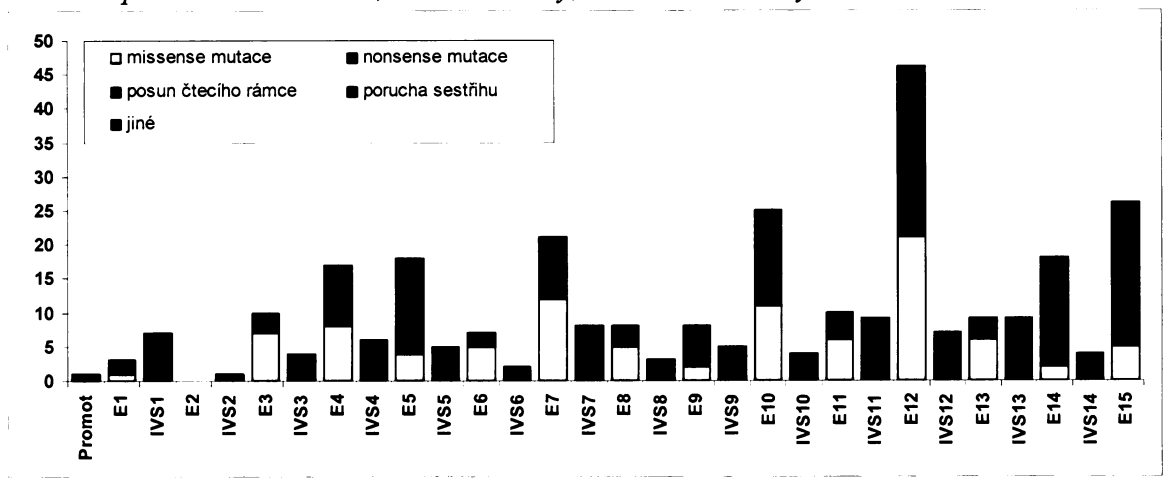


Graf 3: *Typy mutací v genu pro PBGD podle funkčního dopadu.*

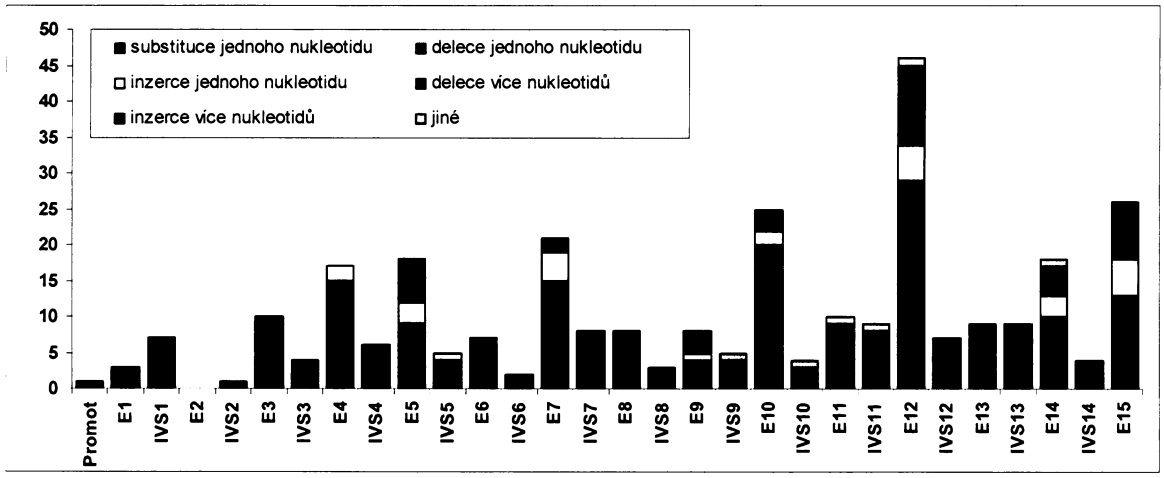


Žádné mutace nebyly nalezeny v exonu 2 a v přilehlých sekvencích. Exon 2 nekóduje protein a je transkribován pouze do erytroidní mRNA. Iniciační kodón této izoformy je lokalizován v exonu 3. Mutace způsobující AIP jsou v genu pro PBGD rozloženy rovnoměrně a nikoliv v tzv. hot spots. 46 (15%) mutací je lokalizováno v exonu 12, což je nejvíce ze všech exonů. Tento exon je ale také druhý nejdelší (grafy 4 a 5). Alternativní pohled na rozložení mutací v genu pro PBGD poskytuje graf 6. Počet mutací v každém exonu je vydělen délkou exonu v bp (počet mutací na bp). Pozoruhodné je, že šest z osmi aminokyselinových zbytků klíčových pro enzymovou aktivitu (R26, K98, D99, R149, R150, R167, R173, a C261) je substituováno za vzniku AIP. Jen v pozicích R150 a C261 nebyly dosud žádné mutace zaznamenány.

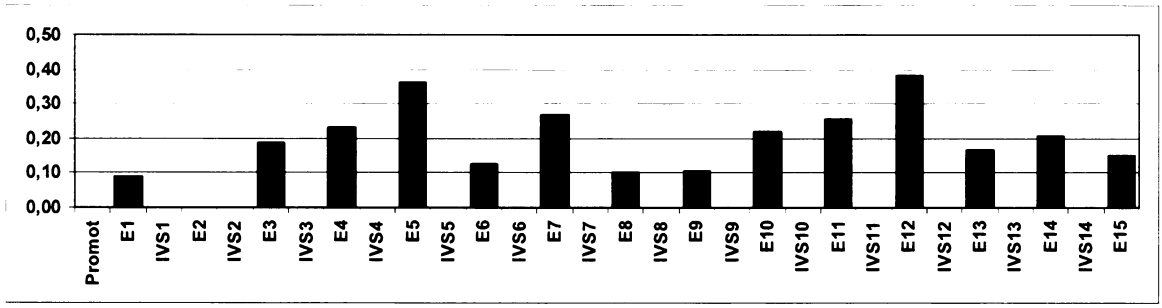
Graf 4: *Typy mutací podle funkčního dopadu a jejich lokalizace v genu pro PBGD. Promot - promotorová oblast, E1-15 - exony, IVS1-14 - introny.*



Graf 5: *Zastoupení a lokalizace nukleotidových změn v genu pro PBGD. Promot - promotorová oblast, E1-15 - exony, IVS1-14 - introny.*



Graf 6: *Počet mutací připadajících na bp v jednotlivých exonech genu pro PBGD. Promot – promotorová oblast, E1-15 – exony, IVS1-14 – introny.*



Navzdory uniformním klinickým projevům je molekulárně genetické pozadí choroby vysoce heterogenní. Bylo prokázáno, že typ nebo lokalizace mutace ovlivňuje klinické projevy choroby pouze z 20% (VON UND ZU FRAUNBERG et al. 2005). Většina mutací dramaticky snižuje enzymatickou aktivitu a/nebo stabilitu proteinu kódovaného mutantní alelou.

Rozšíření jednotlivých mutací je velmi různorodé. Většina dosud zaznamenaných mutací se dědí v rámci jedné rodiny. Výjimku tvoří mutace, které jsou v určitých oblastech poměrně časté. Například ve Švédsku asi polovina všech rodin s AIP sdílí stejnou mutaci W198X (MGONE et al. 1992) V Holandsku připadá na třetinu AIP pacientů mutace R116W (DE ROOIJ et al. 1995). Mutace se většinou dědí z generace na generaci, ale bylo zaznamenáno i několik *de novo* mutací (KAUPPINEN et al. 1995, WHATLEY 1995, PUY et al. 1997a, tato studie).

3. CÍLE PRÁCE

1. Identifikovat mutace způsobující AIP u nově diagnostikovaných pacientů z České a Slovenské republiky a tím definitivně potvrdit diagnózu.

2. Zavést metodologii pro molekulární analýzu genu pro PBGD a následný genetický screening u nově diagnostikovaných nemocných s AIP a v jejich rodinách.

3. Připravit rekombinantní proteiny s vybranými mutacemi.

4. Charakterizovat mutace na molekulární úrovni a vlastnosti mutovaných proteinů baterií biochemických technik.

4. MATERIÁL A METODY

Kapitola obsahuje podrobný popis použitých metod, materiálu, přístrojů a chemikálií. V závorce za přístrojem nebo chemikálií je uvedeno na prvním místě katalogové číslo výrobku (pokud bylo dostupné), následuje přesný název výrobce a země původu. Kapitola je rozdělena na část klinicko-genetickou a část experimentální.

4.1. Klinicko-genetická část

4.1.1. Pacienti

Do této studie bylo zahrnuto celkem 35 osob z 8 nepříbuzných rodin z České a Slovenské republiky. Jednalo se o rodiny či osoby s potvrzeným (klinicky nebo biochemicky) výskytem AIP nebo s podezřením na výskyt tohoto onemocnění (bolesti břicha a jednorázové zvýšení vylučování porfyrinů močí, tab. 4). Bylo nutné identifikovat kauzální mutaci a provést rodinný screening pro detekci doposud asymptomatických osob.

Tab. 4: *Osoby vyšetřované v této studii.*

Pacient	Diagnostikovaná AIP	Počet vyšetřovaných příbuzných
P1	ANO	7
P2	ANO	5
P3	ANO	6
P4	ANO	5
P5	ANO	4
P6	ANO	-
P7	NE	-
P8	NE	-

4.1.2. Izolace DNA

Leukocytární DNA byla izolována ze 7 nebo 10 ml venózní krve personálem Mitochondriální laboratoře, KDDL, 1. LF UK. Izolovaná DNA byla naředěna na pracovní koncentraci 50 ng/μl a skladovaná při 4°C.

4.1.3. Amplifikace DNA

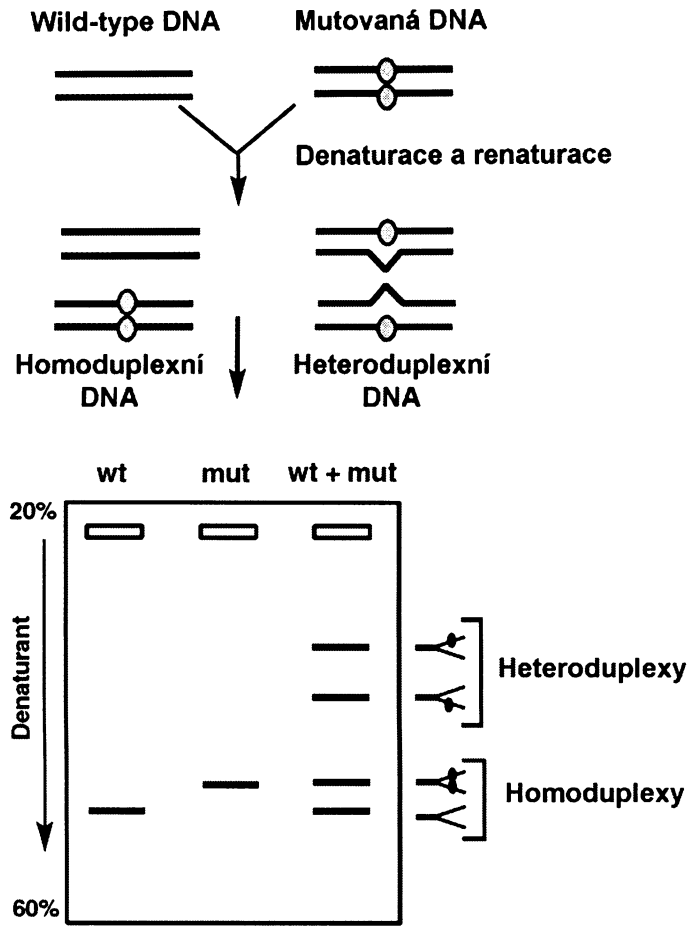
Pro mutační analýzu pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) byly všechny exony a rozhraní intron/exon genu pro PBGD amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) sadou 14 párů speciálně navržených oligonukleotidů (PUY et al. 1997a). Oligonukleotidy byly syntetizovány firmami EAST PORT Praha s.r.o. a GENERI BIOTECH s.r.o. Reakce obsahovala 50 ng příslušné gDNA, 1x PCR pufr (P 2317, Sigma, USA), 1,5 mM $MgCl_2$ (M 8787, Sigma, USA), 0,2 pM každého primeru, 0,1 mM směs nukleotidů (dNTP, D 7295, Sigma, USA), 1 U Taq DNA polymerázy (D 4545, Sigma, USA) a vodu na PCR v celkovém objemu 50 µl. Reakce probíhala v termocyklérech TGradient (Biometra, Germany), Touchgene Gradient (Techne, UK) nebo DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, USA) za těchto podmínek: Počáteční denaturace 5 min 94°C, 35x denaturace 30 sec 94°C, 30 sec teplota nasedání primerů (59,3°C fragmenty 3 a 5/6; 62,9°C fragmenty 1 a 11; 55,8°C ostatní fragmenty), syntéza DNA 40 sec 72°C. V posledním kroku probíhalo dosyntetizování DNA (5 min 72°C), denaturace (5 min 95°C) a tvorba heteroduplexů (5 min 72°C).

Amplifikace všech fragmentů byla ověřena kontrolní elektroforézou (horizontální elektroforézy Liberty 1 a 2, Biokey American Instrument, USA) v 1,5% agarózovém gelu (11404, Agarose for DNA Electrophoresis, Serva, Germany) a 1x TBE pufru (T-4415, 10x TBE Buffer, Sigma, USA). Napětí 18 $V.cm^{-1}$, čas 15 min (POWER-PAC 1000 Power Supply, Bio-Rad, USA).

4.1.4. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

DGGE představuje rychlou a spolehlivou metodu pro vyhledávání mutací a polymorfismů v amplifikovaných úsecích DNA (FODDE a LOSEKOOT 1994) a byla prokázána její vhodnost i pro molekulární diagnostiku AIP (TCHERNITCHKO et al. 1999). Principem metody je postupná denaturace fragmentů dsDNA migrujících v akrylamidovém gelu gradientem denaturačních činidel. Fragmenty obsahující mutaci denaturují dříve než fragmenty bez mutace a tudíž v gelu migrují pomaleji. Po obarvení separované DNA v gelu ethidium bromidem lze vizuálně rozlišit fragmenty s mutací a

bez mutace (obr. 9). Citlivost metody je mnohonásobně zvýšena použitím speciálních primerů, kdy jeden z primerů obsahuje na svém 5´-konci 30–50 GC nukleotidů. Během PCR je tímto způsobem v amplifikovaném úseku DNA vytvořena hůře denaturovatelná oblast, která během denaturace zbytku fragmentu drží obě vlákna dsDNA u sebe a umožňuje tak lepší rozlišení mutovaných a nemutovaných fragmentů.



Obr. 9: *Princip DGGE. Převzato z DCode Manual (Bio-Rad Laboratories, USA).*

Metoda popsaná v literatuře (PUY et al. 1997, NISSEN et al. 1997) byla přizpůsobena našim podmínkám a dostupnému přístrojovému vybavení. Veškeré analýzy byly provedeny na přístroji DCode, univerzálním systému pro detekci mutací (170–9106, Bio-Rad Laboratories, USA) za použití chemikálií obsažených v soupravě DCode Electrophoresis Reagent Kit for DGGE a CDGE (170–9170, Bio-Rad Laboratories, USA). Na 8% akrylamidový gel (akrylamid-bisakrylamid 37,5:1) formátu 16x16 cm s denaturačním gradientem 40–90% (100% denaturans odpovídá 7 M močovině, U-0631, Sigma, USA a 40% v/v formamidu) bylo naneseno 15 µl PCR produktu. Skla s gelem byla ponořena v 1x TAE elektrodovém pufru o teplotě 60°C. Elektroforéza

probíhala při konstantním napětí 10 $V.cm^{-1}$ po dobu 3,5 hod. Po ukončení elektroforézy byla DNA v gelu vizualizována ethidium bromidem. Gel byl vyfotografován pod UV lampou na film Polaroid (Black & White 667).

4.1.5. Sekvencování DNA

Vzorky DNA vytypované pomocí DGGE byly podrobeny sekvenační analýze. Pro dosažení optimálních výsledků při sekvencování byly všechny vzorky přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (28706, QIAGEN, Germany) a mikrocentrifugy (MICRO-200, Hettich, Germany). Pracovní postup byl převzat z protokolu QIAquick Spin Handbook dodávaného s kitem. 25–50 µl produktu PCR reakce bylo elektroforeticky rozděleno na 1,5% agarózovém gelu. Po obarvení separované DNA v gelu ethidium bromidem byly pod UV lampou vyřezány jednotlivé proužky DNA. Pomocí výše uvedeného kitu byla DNA z vyřezaných proužků gelu extrahována a navázána na silikagel v mikrocentrifugačních kolonách. DNA byla eluována ve 30 µl ddH_2O. Koncentrace přečištěné DNA byla změřena na přístroji ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Koncentrace se pohybovala v rozmezí 10–25 ng/µl. Vzorky byly sekvencovány Ing. Kateřinou Veselou z Kliniky dětského a dorostového lékařství na přístroji ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Pro sekvenační reakci byly použity stejné primery jako pro PCR, pouze v nižší koncentraci (3,2 pmol/µl).

4.1.6. Restrikční štěpení DNA

Pro ověření mutací a snadný screening v postižených rodinách bylo pro některé mutace možné navrhnout test využívající restrikčního štěpení. Vznik nebo zánik restrikčního místa v důsledku mutace byl testován pomocí webové aplikace NEBcutter V2.0 na internetové adrese http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php.

DNA z PCR reakční směsi byla přečištěna QIAquick PCR Purifikačním Kitem (28106, QIAGEN, Germany). Pracovní postup byl převzat z protokolu QIAquick Spin Handbook dodávaného s kitem. DNA byla eluována ve 20 µl ddH_2O.

V důsledku mutací 76 C>T a 77 G>A zaniká a v důsledku mutace 675delA vzniká restrikční místo pro enzym AciI. Složení reakční směsi (20 µl): 2 µl 10x NEBuffer 3 (New England Biolabs, USA), 5 U AciI (New England Biolabs, USA), 10 µl purifikované DNA a ddH_2O do 20 µl. Reakce probíhala přes noc při 37°C.

Mutace 518 G>A vede k zániku jednoho ze dvou restrikčních míst pro enzym HpaII (MspI). Složení reakční směsi (20 µl): 2 µl 10x NEBuffer 1 (New England Biolabs, USA), 5 U HpaII (New England Biolabs, USA), 10 µl purifikované DNA a ddH_2O do 20 µl. Reakce probíhala přes noc při 37°C.

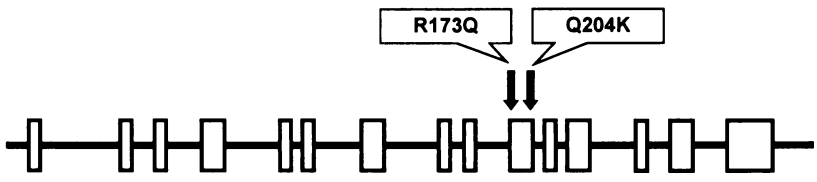
Mutace 610 C>A vede k zániku restrikčního místa pro enzym BspMI. Složení reakční směsi (20 µl): 2 µl 10x NEBuffer 3 (New England Biolabs, USA), 5 U BspMI (New England Biolabs, USA), 10 µl purifikované DNA a ddH_2O do 20 µl. Reakce probíhala přes noc při 37°C.

Mutace 966insA vede k zániku restrikčního místa pro enzym MaeIII. Složení reakční směsi (25 µl): 12,5 µl 2x Buffer for MaeIII (Roche, Switzerland), 1 U MaeIII (Roche, Switzerland), 10 µl purifikované DNA a ddH_2O do 25 µl. Reakce probíhala 10 hod při 55°C.

Po restrikci byla provedena kontrolní elektroforéza s 10 µl reakční směsi v 3,5% agarózovém gelu (elektroforéza OMNI, 20 ml gelu, agaróza Serva, Germany, 1x TAE elektrodový pufr). V gelu separovaná DNA byla obarvena ethidium bromidem a gel byl vyfotografován pod UV lampou na film Polaroid.

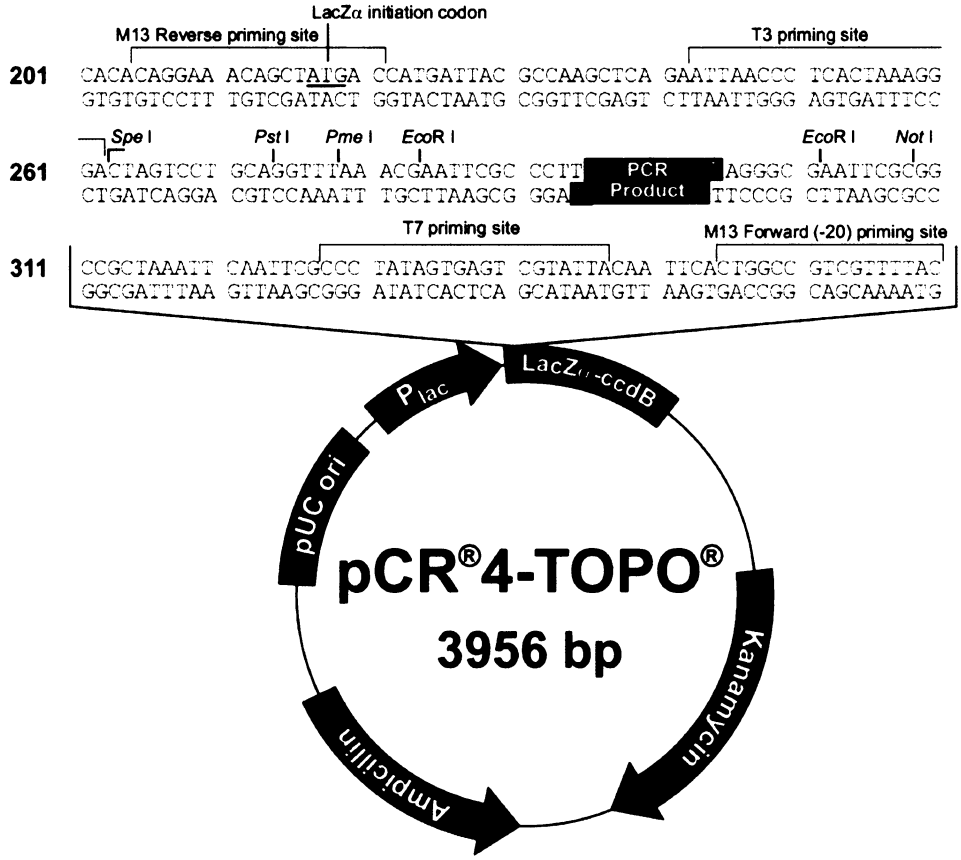
4.1.7. TA klonování PCR fragmentu s mutacemi 518 G>A a 610 C>A

V jednom případě byly u pacienta nalezeny dvě kauzální mutace, 518 G>A (R173Q) a 610 C>A (Q204K), obě lokalizované v 10. exonu genu pro PBGD (obr. 10).



Obr. 10: *Schema genu pro PBGD s vyznačením lokalizace mutací R173Q a Q204K.*

Ke zjištění, zda jsou mutace lokalizované na stejné nebo na různých alelách, posloužila metoda molekulárního klonování. Příslušný PCR fragment DNA přečištěný z gelu (viz kap. 4.1.5) byl nejdříve opatřen přesahujícími A-konci v reakci katalyzované Taq polymerázou. Složení reakční směsi (13 µl): 10 µl DNA, 1,3 µl 10x PCR pufru (P 2317, Sigma, USA), 0,52 µl 25 mM $MgCl_2$ (M 8787, Sigma, USA), 1,3 µl 2 mM dATP (Sigma, USA) a 0,1 µl Taq polymerázy (D 4545, Sigma, USA). Reakce probíhala v termocykléru Touchgene Gradient (Techne, UK) 15 min při 72°C. Takto připravený inzert byl ligován do vektoru pCR®4—TOPO (obr. 11), který byl součástí soupravy TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (K 4575, Invitrogen, USA).



Obr. 11: *Genetická mapa vektoru pCR®4-TOPO. Převzato z manuálu k TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (K 4575, Invitrogen, USA).*

Ligační směs obsahovala 3 µl DNA inzertu, 1 µl Salt Solution a 0,5 µl vektoru pCR®4—TOPO. Reakce probíhala 10 min při pokojové teplotě. 2 µl ligační směsi byly použity na transformaci 25 µl TOP10 chemicky kompetentních buněk *E. coli* (Invitrogen, USA). Buňky s ligační směsí byly inkubovány 15 min na ledu a pak vystaveny teplotnímu šoku ve vodní lázni o teplotě 42°C po dobu 30 sec a 5 min na

ledu. Poté byly inkubovány ve 125 µl SOC média (15544–034, Invitrogen, USA) při 37°C, 250 rpm po dobu 1 hod (Inkubátor IOX400, Gallenkamp, UK). 50 µl a 100 µl směsi bylo vyseto na plotny s LB agarem (1 l LB agaru obsahoval: 10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g NaCl, 15 g Agaru, pH 7,0) a ampicilinem (100 µg/ml, A-9518, Sigma, USA). Inkubace probíhala v termostatu přes noc při 37°C. Druhý den bylo vybráno 10 kolonií a kultivováno přes noc v 5 ml tekutého LB média s ampicilinem. Další den byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu (27106, QIAGEN, Germany) a mikrocentrifugy (MICRO-200, Hettich, Germany) podle protokolu QIAprep Miniprep Handbook dodávaného s kitem. Plazmidová DNA byla v posledním kroku izolace eluována v 50 µl ddH_2O a podrobena sekvenační analýze s primerem T7 (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen, USA).

4.2. Experimentální část

4.2.1. Izolace leukocytů

Leukocyty byly izolovány z periferní krve zdravé kontroly v gradientu Histopaque (10771, Sigma, USA). 3 ml Histopaque byly převrstveny 7 ml čerstvě odebrané nesrážlivé krve (EDTA). Po centrifugaci 30 min při 2000 rpm byl vzniklý prstenec leukocytů odebrán a 3x promyt 1x PBS (Phosphate buffered saline, fosfátový pufr, složení 500 ml 10x PBS: 4,1 g NaCl, 1 g KCl, 7,2 g Na_2HPO_4, 1,2 g KH_2PO_4, dH_2O, pH 7,3). Peleta leukocytů byla resuspendována v 500 µl zamražovacího roztoku (3,6 µl 2-merkaptoetanolu, 333,5 µl 6 M guanidium thiokyanátu, 12,5 µl 1 M citrátu sodného, 25 µl 10% sarkosylu a 125,4 µl dH_2O) a uskladněna v -80°C.

4.2.2. Izolace RNA

Celková RNA byla izolována ze zmražených leukocytů periferní krve zdravé kontroly. K rozmrznutým leukocytům bylo přidáno 50 µl 2 M octanu sodného (pH 4,0), 500 µl fenolu syceného vodou a 150 µl směsi chloroform-isoamylalkohol 49:1. Po důkladném promíchání byla směs inkubována 10 min na ledu. 10 min centrifugací při 12 000 x g a

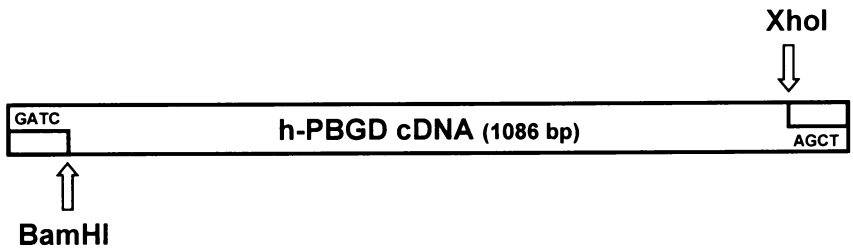
4°C byla směs rozvrstvena na 3 fáze. Vodní fáze s RNA byla odebrána a jemně promíchána se stejným objemem ledového isopropanolu. Během 30 min inkubace při -20°C byla RNA z roztoku vysrážena a izolována 15 min centrifugací při 12000 x g a 4°C. Peleta RNA byla 3x promyta 500 µl 75% etanolu a 1x 500 µl 100% etanolu. Po posledním promytí se peleta nechala 15 min oschnout při laboratorní teplotě a následně byla rozpuštěna v 30 µl ddH_2O.

4.2.3. Reverzní transkripce a amplifikace cDNA pro PBGD

Bezprostředně po izolaci RNA následovala reverzní transkripce. Syntéza 1. řetězce cDNA byla zajištěna pomocí M-MLV reverzní transkriptázy SuperScript III (18080–093, Invitrogen, USA) a Oligo$(dT)_{20}$ primerů (18418–020, Invitrogen, USA) specifických pro polyA konec mRNA. Reakční směs obsahovala 1 µl 50 µM Oligo$(dT)_{20}$ primerů, 4 µl izolované RNA, 1 µl 10 mM dNTP (D-7295, Sigma, USA) a 7 µl vody na PCR. Směs byla inkubována 5 min při 65°C, 1 min 4°C a umístněna na led. Ke směsi byly přidány 4 µl 5x First Strand pufru (18080–093, Invitrogen, USA), 1 µl 0,1 M dithiotreitolu (18080–093, Invitrogen, USA), 1 µl RNAsin Plus RNAse Inhibitoru (N2611, Promega, USA) a 1 µl (200 U) reverzní transkriptázy SuperScript III. Reakce probíhala 60 min při 50°C a 15 min při 70°C v termocykléru Touchgene Gradient (Techne, UK). RNA byla z reakční směsi odstraněna přidáním 2 U RNAse H (18021–014, Invitrogen, USA) a 20 min inkubací při 37°C. cDNA byla uskladněna v -20°C.

Pro amplifikaci cDNA housekeeping formy PBGD byl navržen pár specifických primerů. Každý oligonukleotid byl na 5´-konci opatřen restrikčním místem umožňujícím orientované vložení do vektoru (obr. 12). Primery byly navrženy pomocí webové aplikace Primer3 na internetové stránce: http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi a zadány k syntéze firmě EAST PORT Praha s.r.o.

Sekvence oligonukleotidů hPBGD cDNA+BamHI S (24 bp): 5´-ATA TTG GAT CCA TGT CTG GTA ACG G-3´ a hPBGD cDNA+XhoI AS (28 bp): 5´-TAT ACT CGA GTT AAT GGG CAT CGT TAA G-3´. Teplota nasedání primerů v PCR byla odhadnuta pomocí výše uvedeného programu na 61°C.

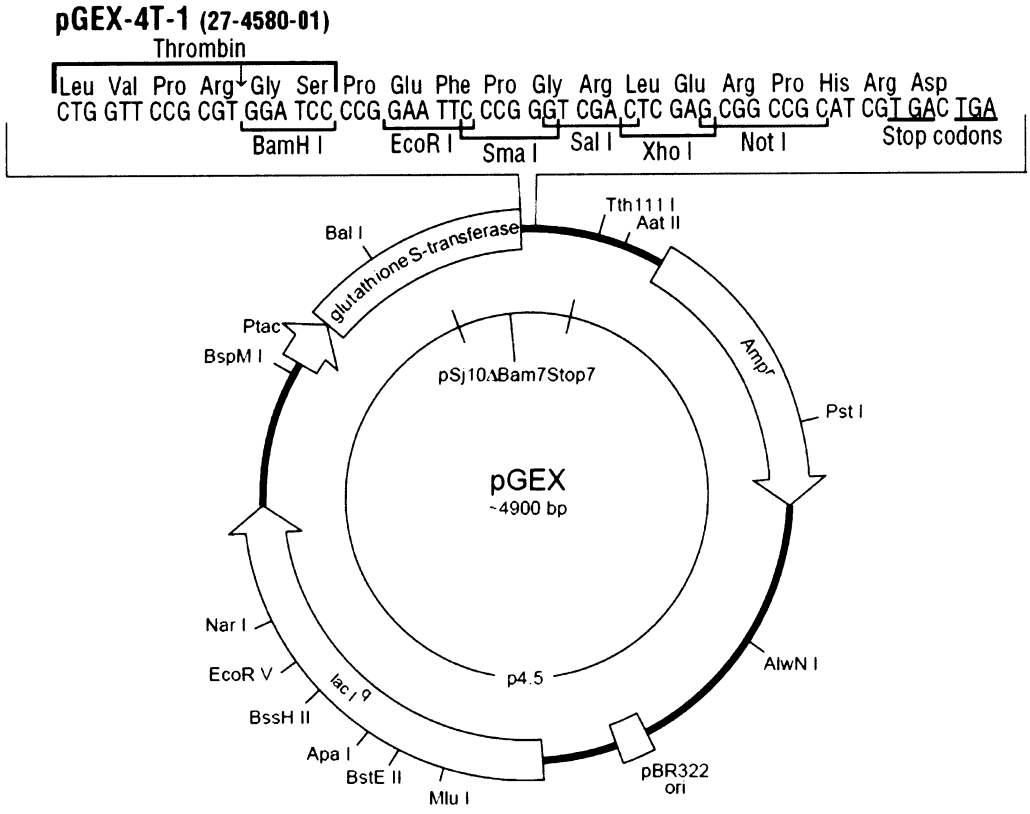


Obr. 12: *Schema inzertu připraveného z cDNA lidské nespecifické PBGD s restrikčními místy vytvořenými během PCR.*

Složení amplifikační reakce (celkový objem 25 µl): 12,5 µl Plain PP Master Mixu (P-201, Top-Bio, Czech Republic), 9,5 µl PCR H_2O, 1 µl každého primeru (10 pM) a 1 µl templátu (cDNA). Reakční podmínky: první krok 3 min 94°C, 32 cyklů 30 sec 94°C, 30 sec 61°C, 45 sec 72°C a poslední krok 10 min 72°C. Reakce probíhala v termocykléru DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, USA). Produkty ze 4 reakcí byly přečištěny z 1% agarózového gelu (viz. kap 4.1.5.). Pomocí QIAquick PCR Purification Kitu byla cDNA ze všech extrakcí zkoncentrována na 35 ng/µl (viz kap. 4.1.6.).

4.2.4. Klonování cDNA pro lidskou PBGD

Klonování předcházela volba vhodného vektoru. Požadavky byly kladeny zejména na možnost vysoké exprese a snadnou purifikaci rekombinantního proteinu. Vektor musel obsahovat rovněž vhodné klonovací místo. Těmto požadavkům nejlépe vyhovoval vektor pGEX-4T-1 (27–4580–01, Amersham, UK) obsahující *tac* promotor, gen pro glutathion S-transferázu (GST) a ampicilinovou rezistenci a klonovací místa BamHI / XhoI (obr. 13). Nepřítomnost restrikčních míst pro BamHI a XhoI v cDNA pro PBGD byla otestována pomocí programu NEBcutterV2.0 na internetové adrese http://tools.neb.com/NEBcutter2.



Obr. 13: *Genetická mapa expresního vektoru pGEX-4T-1 s detailem polyklonovacího místa. Převzato z manuálu GST Gene Fusion System (18–1157–58, Amersham, UK).*

K zajištění dostatečného množství vektoru pro další experimenty, byl vektor namnožen tímto způsobem: 25 µl buněk *E. coli* DH5α TOP10 (Invitrogen, USA) bylo transformováno 1 µl zásobního vektoru pGEX-4T-1 (500 ng/µl, viz kap. 4.1.7.). Byly vybrány 4 přes noc narostlé kolonie a kultivovány v 5 ml LB média s ampicilinem (viz kap. 4.1.7.). Plazmidová DNA byla izolována QIAprep Spin Miniprep Kitem (viz kap. 4.1.7.) a zkoncentrována na 185 ng/µl.

Na vektoru i na inzertu byly v samostatných reakcích vytvořeny kohezní konce pro orientovanou ligaci pomocí štěpení (double digestion) enzymy BamHI a XhoI. Štěpení probíhalo v reakční směsi obsahující 5 µl 10x TANGO pufru (BY5, Fermentas, Canada), 20 µl (3,7 µg) plazmidové DNA resp. 31 µl (1 µg) cDNA, 10 U BamHI (#ER0051, Fermentas, Canada) a 10 U XhoI (#ER0691, Fermentas, Canada) a ddH_2O do objemu 50 µl 16 hod při teplotě 37°C. Enzymy byly inaktivovány 20 min při 80°C.

Linearizovaný vektor byl na koncích defosforylován 1 U Calf Intestine Alkaline Phosphatase (#EF0341, Fermentas, Canada), která byla přidána do směsi po restrikční reakci na 45 min při 37°C.

Štěpený plazmid i inzert byly přečištěny z restrikční reakce a zkoncentrovány pomocí QIAquick PCR Purification kitu (viz kap. 4.2.3.).

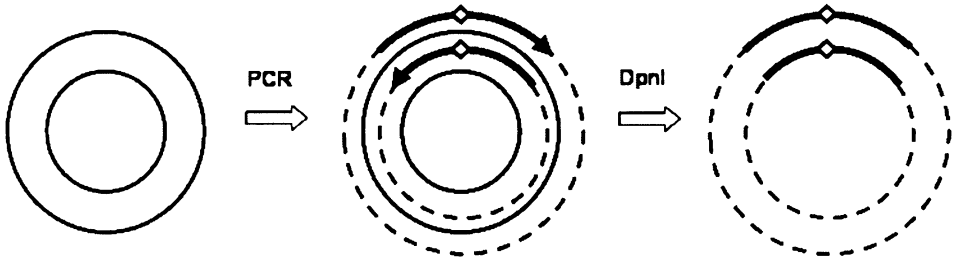
Při ligaci bylo dodrženo doporučení výrobce ligázy týkající se molárního poměru konců DNA (vektor:inzert = 1:5) a maximálního množství vektorové DNA (200 ng). Ligační reakce (20 μl) obsahovala 150 ng vektorové DNA, 120 ng inzertu, 0,5 μl T4 Ligase (M0202S, NEB, USA) a deionizovanou H_2O. Směs byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě.

25 μl buněk *E. coli* DH5α TOP10 (Invitrogen, USA) bylo transformováno 3 μl ligační směsi. Buňky byly kultivovány na agarových plotnách s ampicilinem (viz kap. 4.1.7.). Screening pozitivních klonů byl proveden u 24 náhodně vybraných kolonií. Jednotlivé kolonie byly kultivovány přes noc ve 3 ml LB média s ampicilinem (viz kap. 4.1.7) a plazmidová DNA byla izolována QIAprep Spin Miniprep Kitem (viz kap. 4.1.7.). 3 μl každého izolovaného plazmidu byly elektroforeticky analyzovány na 1% agarózovém gelu. Tímto způsobem bylo identifikováno 8 konstruktů obsahujících inzert. Sekvence konstruktů byla ověřena sekvencováním inzertu z obou stran s primery pGEX5´ a pGEX3´ (27–1410–01, 27–1411–01, Amersham, UK).

4.2.5. Cílená mutageneze

Z výchozího wild-type PBGD konstruktu byly připraveny 3 mutantní konstrukty: konstrukt s mutací 518 G>A (R173Q), konstrukt s mutací 610 C>A (Q204K) a konstrukt se dvěma mutacemi 518 G>A a 610 C>A. Mutace byly generovány pomocí Quick Change Site-Directed Mutagenesis kitu (#200519, Stratagene, USA, obr. 14). Mutační primery, vzájemně komplementární pár pro každou mutaci, byly navrženy přesně podle doporučení výrobce kitu pomocí webové aplikace Primer3 na internetové stránce: http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi a syntetizovány firmou EAST PORT Praha s.r.o.

Sekvence oligonukleotidů: PBGD_Mut610C-A_S (29 bp) 5′-CAA CCG GGT GGG GAA GAT CCT GCA CCC TG-3′, PBGD_Mut610C-A_AS (29 bp) 5′-CAG GGT GCA GGA TCT TCC CCA CCC GGT TG-3′, PBGD_Mut518G-A_S (25 bp) 5′-CCT CAA CAC CCA GCT TCG GAA GCT G-3′, PBGD_Mut518G-A_AS (25 bp) 5′-CAG CTT CCG AAG CTG GGT GTT GAG G-3′.



Obr. 14: *Princip cílené mutageneze. Plné soustředné kružnice představují původní konstrukt, kružnice znázorněné přerušovanou čárou pak představují konstrukt nový s mutací (značka).*

Pro mutagenezní reakci bylo použito 5 µl 10x reakčního pufru (součást kitu), 1 µl (10 ng) konstruktu, 1,5 µl (125 ng) každého primeru pro mutaci 518 nebo 1,3 µl (125 ng) každého primeru pro mutaci 610, 1 µl dNTP mixu (součást kitu), 1 µl (2,5 U) Pfu Turbo DNA Polymerázy (součást kitu). Reakce probíhala v termocykléru DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, USA) za těchto podmínek: 1x 30 sec 95°C, 12x 30 sec 95°C, 1 min 55°C, 6 min 68°C. Původní nemutovaný plazmid byl z reakce odstraněn přidáním 1 µl (10 U) enzymu DpnI a inkubací 1 hod při 37°C.

2 µl mutagenezní směsi byly použity na transformaci 50 µl buněk *E. coli* DH5α TOP10 (Invitrogen, USA). Buňky byly kultivovány na agarových plotnách s ampicilinem (viz kap. 4.1.7.). Screening pozitivních klonů byl proveden u 8 náhodně vybraných kolonií od každé mutace. Jednotlivé kolonie byly kultivovány přes noc ve 3 ml LB média s ampicilinem (viz kap. 4.1.7) a plazmidová DNA byla izolována QIAprep Spin Miniprep Kitem (viz kap. 4.1.7.). Mutace byly ověřeny sekvencováním (viz kap. 4.2.4.). Konstrukt s mutací 518 G>A byl výchozím materiálem pro tvorbu konstruktu se dvěma mutacemi.

4.2.6. Exprese rekombinantní PBGD v *E. coli*

Wild-type a mutantní PBGD byly exprimovány v *E. coli* fúzované s glutathion S-transferázou (GST). Pro expresi byl zvolen kmen *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP (#230255, Stratagene, USA). K 55 µl buněk byl přidán 1 µl 1:10 XL10-Gold β-merkaptoetanol mixu (Stratagene, USA). Po 10 min inkubaci na ledu bylo k buňkám přidáno 0,6 µl konstruktu. Po dalších 30 min na ledu byly buňky vystaveny na 25 sec teplotnímu šoku ve vodní lázni o teplotě 42°C a inkubovány na ledu 3 min. K transformační směsi bylo přidáno 450 µl SOC média předehřátého na 42°C a následovala inkubace 1 hod při 37°C a intenzivním třepání (230 rpm). Na agarové plotny s ampicilinem bylo vyseto 100 µl kultury. Kultivace probíhala přes noc při 37°C.

Jedna přes noc narostlá kolonie byla zaočkována do 20 ml 2x YTG média (1 l média obsahoval 16 g tryptonu, 10 g kvasinkového extraktu, 5 g NaCl a 2% glukózu, pH 7,0) s ampicilinem (100 µg/ml) a chloramfenikolem (50 µg/ml, C-0378, Sigma, USA). Kultury rostly přes noc (15 hod) při 30°C a důkladné aeraci (třepání 250 rpm). Tyto kultury byly použity k zaočkování 280 ml 2x YTG média s ampicilinem (100 µg/ml) předehřátého na 30°C. Kultivace pokračovala při 30°C a intenzivním třepání (250 rpm) až do dosažení optické denzity 0,7–0,9 při 600 nm. Exprese rekombinantního proteinu byla zahájena přidáním isopropyl-1-thio-β-D galaktopyranosidu (IPTG, 582–001–G025, Alexis Biochemials, Switzerland) do finální koncentrace 0,5 mM. Po 2 hod byly buňky umístněny na led a postupně izolovány z média 10 min centrifugací při 7700 x g a 4°C (Centrifuga MR-23i, Jouan, France). Pelety byly zmraženy při -20°C.

4.2.7. Izolace a purifikace rekombinantní PBGD

Zmražené pelety izolovaných buněk byly resuspendovány v 10 ml ledového 1x koncentrovaného fosfátového pufru (PBS, složení 500 ml 10x PBS: 4,1 g NaCl, 1 g KCl, 7,2 g Na_2HPO_4, 1,2 g KH_2PO_4, dH_2O, pH 7,3) obsahujícího 5 mM dithiotreitol (DTT, D0632, Sigma, USA), 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF, 195381, ICN Biomedicals, USA), 1 mM pepstatin A (US20037, USB Corporation, USA) a 1 mg/ml lysozymu (18645, USB Corporation, USA). Suspenze byla inkubována 10 min na ledu a buňky byly lyzovány mírnou sonikací. K lyzátu byl přidán 20% Triton X-100 (T-9284,

Sigma, USA) do výsledné koncentrace 1% a lyzát byl inkubován 30 min na ledu za občasného jemného promíchání. Zbytky buněk byly z lyzátu odstraněny 10 min centrifugací při 12000 x g a 4°C. Supernatant byl dekantován do sterilních 15 ml zkumavek. Alikvoty pelety buněčných zbytků a supernatantu byly uchovány pro SDS-PAGE analýzu.

PBGD fúzovaná s GST byla purifikována afinitní chromatografií na kolonách s glutathion separózou 4B (17–0756–01, Amersham, USA).

Kolony PD-10 (17–0851–01, Amersham, USA) s 300 µl 50% suspenze glutathion separózy byly 3x promyty 1x koncentrovaným PBS. Poté byl na kolony aplikován supernatant získaný centrifugací buněčného lyzátu. Po 30 min inkubaci při laboratorní teplotě byl supernatant z kolony odstraněn a glutathion separóza s navázaným proteinem byla 3x promyta 1,5 ml 1x PBS. Protein byl z glutathion separózy uvolněn 150 µl elučního pufru (1 ml elučního pufru obsahoval: 50 µl Tris-HCl, pH 8,0 a 100 µl 0,1 M glutathionu, G-6529, Sigma, USA). Eluce byla provedena 150 µl elučního pufru celkem 3x. GST část byla z fúzovaného proteinu proteolyticky odštěpena trombinem. Ke glutathion separóze s navázaným proteinem bylo přidáno 600 µl 1x PBS se 100 U trombinu (154163, Bovine Thrombin, ICN Biomedicals, USA). Štěpení probíhalo 12 hod za laboratorní teploty. Po odštěpení GST části trombinem zůstaly na N-konci proteinu navíc 2 aminokyseliny glycin a serin. Následovala centrifugace při 500 x g 5 min a byl odebrán supernatant s rozpuštěným proteinem. Druhá eluce byla provedena 400 µl 1x PBS. Alikvoty proteinů byly zmraženy v tekutém dusíku a uskladněny při -80°C.

4.2.8. Kvantifikace purifikované PBGD

Koncentrace purifikovaného proteinu byla stanovena metodou dle Bradfordové pomocí činidla Bradford Reagent (B 6916, Sigma, USA). K sestrojení kalibrační přímky bylo použito 1, 2, 3, 4, 5 µg bovinního sérového albuminu (BSA, A-6003, Sigma, USA). Všechna měření byla prováděna v tripletech na spektrofotometru UV-2401PC (Shimadzu, Japan) a vyhodnocena pomocí obslužného programu (Shimadzu, Japan).

4.2.9. SDS-PAGE

Výsledky exprese, izolace a purifikace PBGD byly kontrolovány pomocí SDS (dodecylsulfát sodný) polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Všechny proteinové elektroforézy byly provedeny na přístroji Mini-PROTEAN 3 Cell (165–3301, Bio-Rad, USA) standardním postupem. Složení 10% rozdělovacího gelu bylo (rozpis na 15 ml, 2 gely, 1,5 mm): 6,15 ml dH_2O, 4,95 ml 30% akrylamidu/bis 37,5:1 (Bio-Rad, USA), 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 150 µl 10% SDS (L3771-500G, SDS For Electrophoresis 99%, Sigma, USA), 75 µl 10% amonium persulfátu (APS, Bio-Rad, USA), 7,5 µl Tetrametylethylenediaminu (TEMED, Bio-Rad, USA). Složení 4% zaostřovacího gelu bylo (rozpis na 5 ml, 2 gely, 1,5 mm): 3,05 ml dH_2O, 0,65 ml 30% akrylamidu/bis 37,5:1, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8). 25 µl APS, 5 µl TEMED.

Jako vzorek bylo použito 10–15 µl bakteriální kultury nebo 1,5–2 µg purifikovaného proteinu. Vzorky v 1x vzorkovém pufru (složení 2x vzorkového pufru: 100 mM Tris-HCl, pH 6,5, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, B-5525, Sigma USA, 20% glycerol) byly inkubovány 5 min při 95°C a následně separovány Tris-Glycinovou SDS-PAGE (LAEMMLY 1970). Jako marker molekulových hmotností byl použit BenchMark Protein Ladder (10747–012, Invitrogen, USA). SDS-PAGE probíhala v 1x koncentrovaném elektrodovém pufru (složení 500 ml 10x elektrodového pufru: 15,15 g Tris báze, 72 g glycinu, 5 g SDS, pH 8,3) při počátečním napětí 60 V. Po vstupu vzorků do rozdělovacího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V. Elektroforeticá separace byla ukončena po vyputování bromfenolové modři z gelu. Gel byl následně barven 1 hod v barvicím roztoku (100 ml barvicího roztoku obsahovalo: 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 ml metanolu, 10 ml kyseliny octové, 45 ml dH_2O) a přes noc odbarvován v odbarvovacím roztoku (roztok 25% methanolu a 10% kyseliny octové). Po odbarvení byl gel vyfotografován a vysušen na sušičce gelů (Whatman Biometra, Germany).

4.2.10. Měření enzymové aktivity PBGD

PBGD katalyzuje vznik nestabilního hydroxymetylbilanu, jehož stanovení je problematické. Hydroxymetylbilan je proto fotooxidován na stabilní uroporfyrin I, který má dobré fluorescenčními vlastnostmi. Spektrofluorometrie umožňuje velmi citlivou a přesnou detekci uroporfyrinu I.

Alikvoty purifikovaných proteinů byly naředěny 1x PBS. Wt a mut204 PBGD byly naředěny 200x, mut173 a mut173+204 PBGD byly použity bez ředění. K 5 µl proteinového vzorku bylo přidáno 355 µl inkubačního pufru (50 mM Tris-HCl, 0,1% BSA, 0,1% Triton X-100, pH 8,2 při 20°C). Vzorky byly inkubovány v termobloku (Techne, UK) při 37°C 3 min. Reakce byla zahájena přidáním 40 µl 1 mM porfobilinogenu (PBG, 156336, ICN Biomedicals, USA). Reakce probíhala 1 hod ve tmě při 37°C a byla zastavena 400 µl 25% trichloroctové kyseliny (TCA). Fotooxidace hydroxymetylbilanu na uroporfyrin I probíhala 30 min pod UV lampou (365 nm). Následovala 10 min centrifugace při 1500 x g. Fluorescence supernatantu byla měřena na přístroji Perkin Elmer LS55 Luminiscence Spectrometer. K excitaci byl použit paprsek o vlnové délce 405 nm, emise byla měřena při 599 nm. Jako standard byl použit 50 nM uroporfyrin I (194897, ICN Biomedicals, USA) v 12,5% TCA, který byl kvantifikován na spektrofotometru (UV-2401PC, Shimadzu, Japan) při 405 nm. Všechna měření enzymové aktivity pro každý vzorek byla provedena ve třech stanoveních (tripletech).

4.2.11. Stanovení pH optima wt PBGD a mut204 PBGD

Pro stanovení pH optima byla upravena metoda podle DELFAU et al. (1990). Aktivita PBGD byla měřena v pufrech o různém pH v rozmezí 6,5–9,0. Pro hodnoty pH 6,5, 7,0, 7,5 byl použit 50 mM fosfátový pufr s 0,1% BSA a 0,1% Tritonem X-100. Pro hodnoty pH 8,0, 8,5, 9,0 byl použit 50 mM pufr Tris s 0,1% BSA a 0,1% Triton X-100. Hodnoty pH byly upraveny na požadovanou hodnotu pomocí pH metru 744 (Metrohm, Switzerland). Měření enzymové aktivity byla provedena ve dvou stanoveních (doubletech), tak jak bylo popsáno v kap 4.2.10.

4.2.12. Stanovení tepelné stability wt PBGD a mut204 PBGD

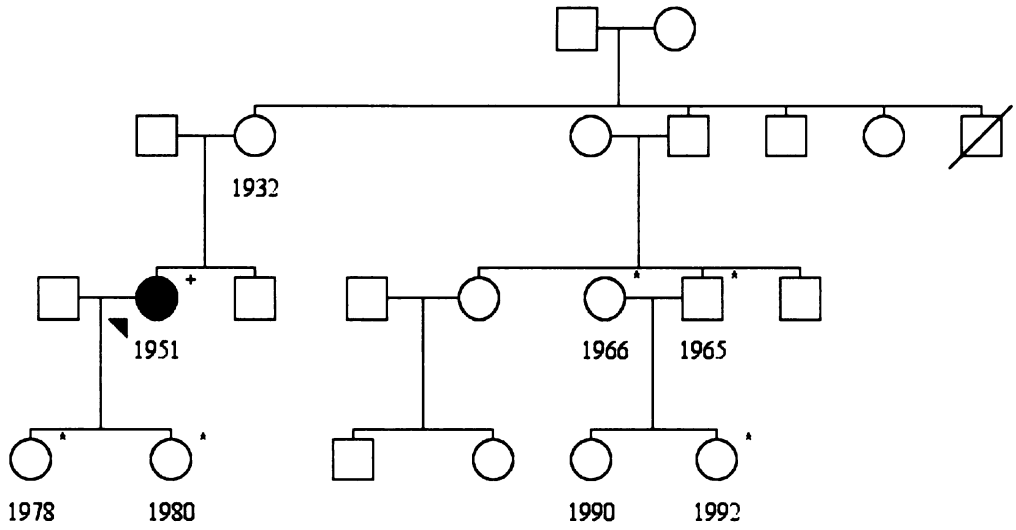
Pro stanovení tepelné stability byla upravena metoda podle CHEN et al. (1994). Vzorky enzymů byly inkubovány v termobloku při 65°C. V intervalech 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min bylo odebíráno 5 µl vzorku na měření enzymové aktivity (viz kap. 4.2.10). Enzymová aktivita byla měřena ve dvou stanoveních (doubletech).

5. VÝSLEDKY

5.1. Klinicko-genetická část

5.1.1. Pacient P1

Byla provedena analýza genu pro PBGD u 7 příbuzných pacienta P1; matky, dvou dcer, bratrance, jeho manželky a jejich dvou dcer (obr. 15).

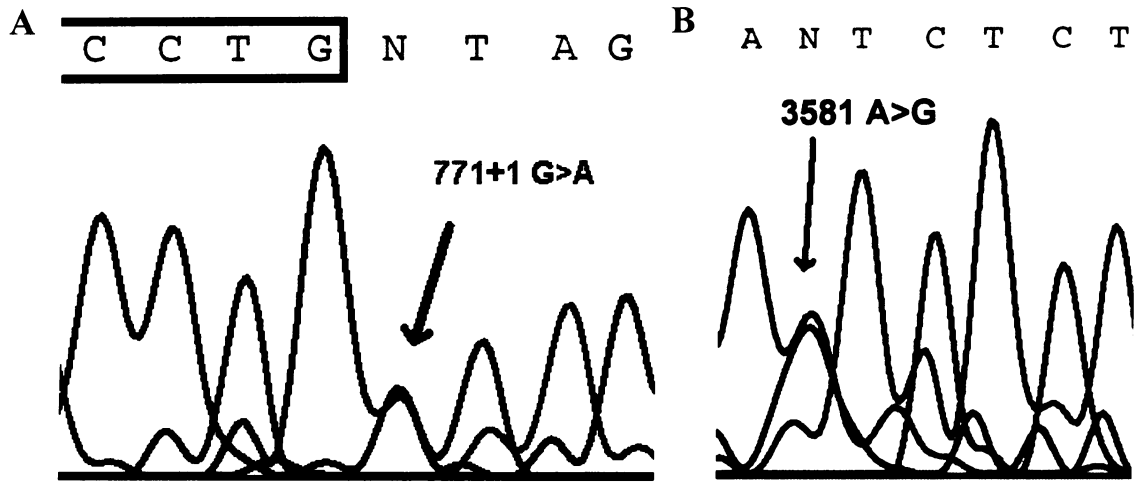


Obr. 15: *Rodokmen rodiny pacienta P1. U vyšetřovaných osob uvedeno datum narození.* $^{+}$ *mutace 771+1 G>T,* * *polymorfismus 4681 A>G.* Pacient P1 *označen plným symbolem.*

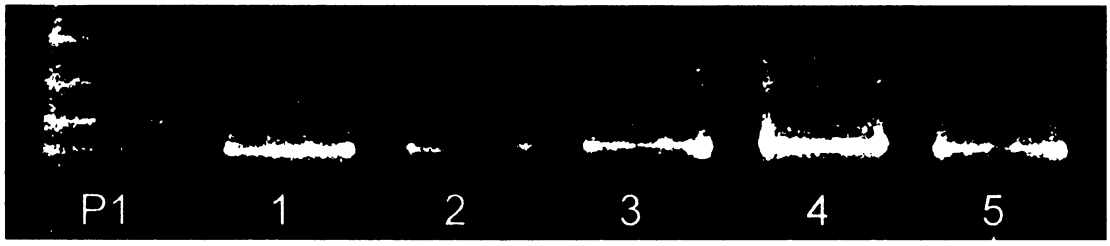
Pacient P1 je nositelem mutace 771+1 G>T ve 12. intronu (obr 16A).

K rodinnému screeningu mutací byla použita metoda DGGE (obr. 17). Mutace 771+1 G>A ve 12. intronu byla prokázána pouze u pacienta P1.

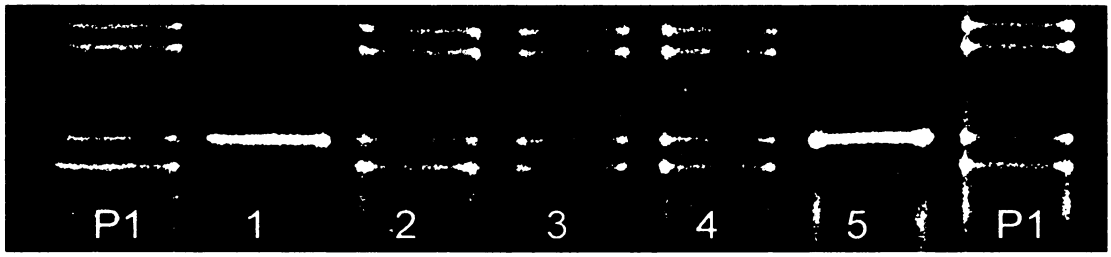
Ve 3. intronu byl u většiny členů rodiny nalezen polymorfismus 3581 A>G (obr. 16B a 18).



Obr. 16 A: *Část sekvence 12. fragmentu s místem mutace 771+1 G>A.*
Obr. 16 B: *Část sekvence 4. fragmentu s místem polymorfismu 3581 A>G.*



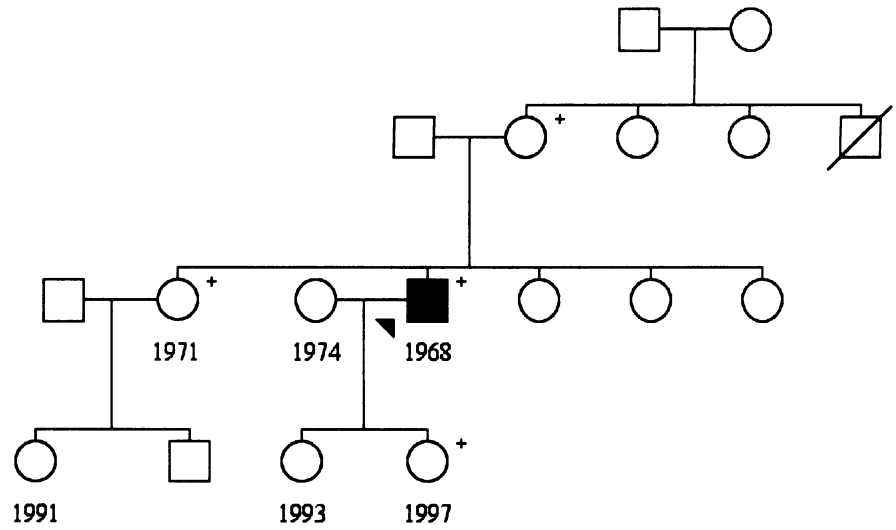
Obr. 17: *Výsledek DGGE analýzy 12. fragmentu genu pro PBGD příbuzných pacienta P1 (kromě dcer). 1. starší dcera bratrance, 2. bratranec, 3. mladší dcera bratrance, 4. manželka bratrance, 5. matka. Mutace byla prokázána pouze u pacienta P1.*



Obr. 18: *Výsledek DGGE analýzy 4. fragmentu genu pro PBGD příbuzných pacienta P1 (kromě dcer). 1. matka, 2. manželka bratrance, 3. mladší dcera bratrance, 4. bratranec, 5. starší dcera bratrance. Polymorfismus 3581 A>G se nevyskytuje pouze u matky a u starší dcery bratrance.*

5.1.2. Pacient P2

U pacienta P2 a pěti členů jeho rodiny byla provedena analýza genu pro PBGD (obr. 19).



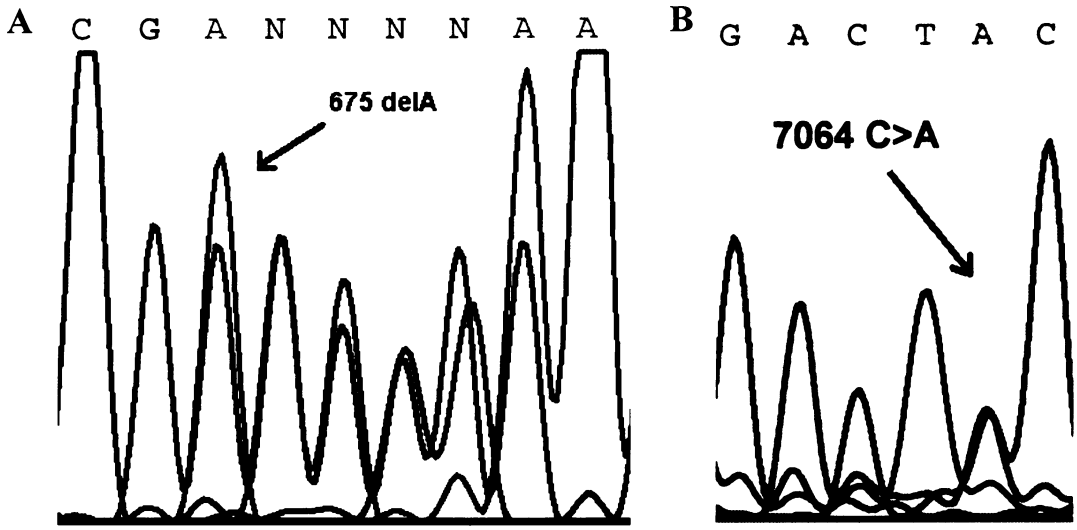
Obr. 19: *Rodokmen rodiny pacienta P2. U vyšetřovaných osob je uvedeno datum narození.* $^{+}$ *mutace 675delA. Pacient P2 označen plným symbolem.*

V rodině se vyskytuje dosud nepopsaná mutace 675delA lokalizovaná ve 12. exonu genu pro PBGD. Mutace vede k posunu čtecího rámce (obr. 20A).

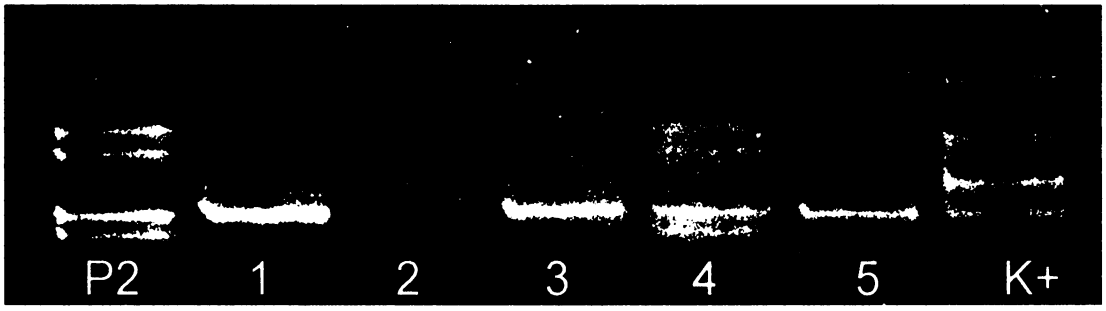
K vyhledání mutace byla použita DGGE analýza. Sekvencování odhalilo mutaci 675delA ve 12. exonu. Mutace byla prokázána u pacienta P2, jeho sestry a mladší dcery (obr. 21).

Pro ověření mutace byl navržen test využívající restrikčního enzymu. V důsledku mutace vzniká restrikční místo pro enzym AciI.

Dále byl nalezen polymorfismus 7064 C>A v 10. intronové oblasti genu pro PBGD. Tento polymorfismus se vyskytuje u P2 a jeho starší dcery (obr. 20B a 22).



Obr. 20 A: *Část sekvence 12. exonu s místem mutace.*
Obr. 20 B: *Část sekvence 11. fragmentu s místem polymorfismu 7064 C>A.*



Obr. 21: *Výsledek DGGE analýzy 12. fragmentu genu pro PGGD příbuzných pacienta P2. 1. neteř, 2. sestra, 3. starší dcera, 4. mladší dcera, 5. manželka. Mutace 675delA se vyskytuje u P2, jeho sestry (2.) a mladší dcery (4.). K+ je pozitivní kontrola.*

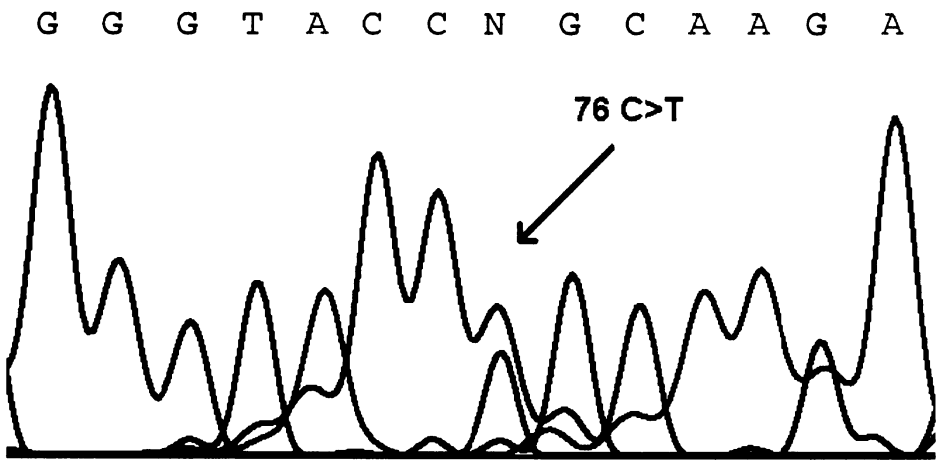
Obr. 22: *Fotografie výsledku DGGE analýzy 11. fragmentu genu pro PBGD u pacienta P2. K+ je pozitivní a K- negativní kontrola.*

5.1.3. Pacient P3

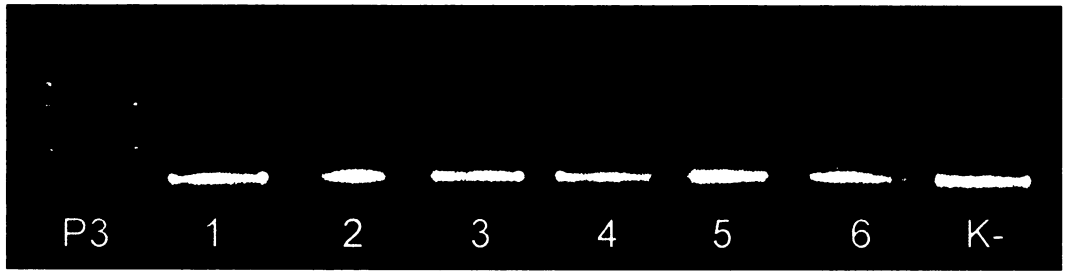
Byla provedena DGGE analýza genu pro PBGD u 6 příbuzných pacienta P3. Rodokmen není k dispozici.

Pacient P3 je nositelem mutace 76 C>T ve 3. exonu genu pro PBGD (obr. 23). U žádné z dalších vyšetřovaných osob nebyla mutace 76 C>T ve 3. exonu prokázána (obr. 24).

Pro snadné a rychlé ověření mutace byl navržen restrikčí test. Mutace vede k zániku restrikčního místa pro enzym AciI.



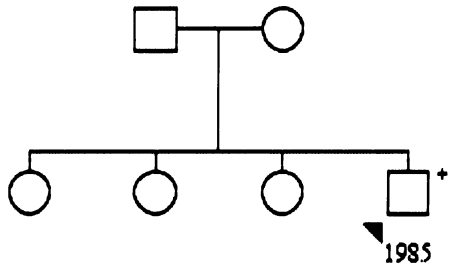
Obr. 23: *Část sekvence 3. exonu genu pro PBGD s místem mutace 76 C>T.*



Obr. 24: *Výsledek DGGE analýzy 3. fragmentu genu pro PBGD příbuzných pacienta P3 (1–6). Mutace 76 C>T byla prokázána pouze u pacienta P3. K- je negativní kontrola.*

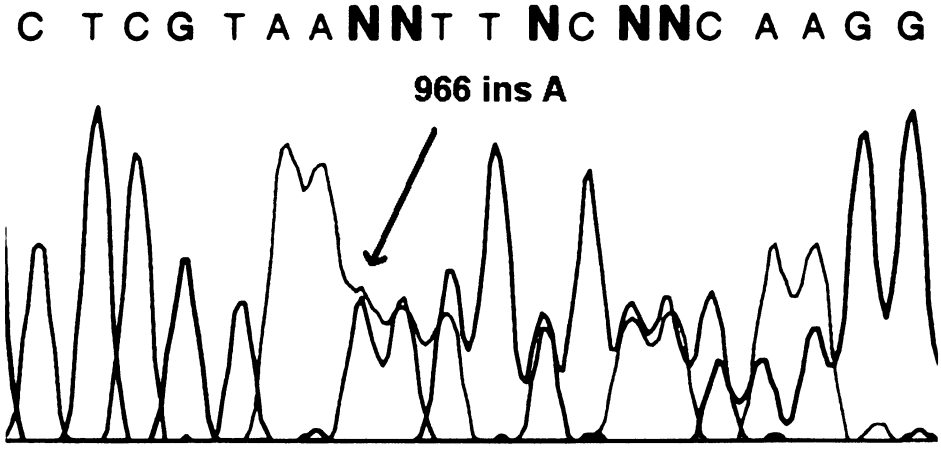
5.1.4. Pacient P4

Byla provedena analýza genu pro PBGD 5 příbuzných pacienta P4 (obr. 25).

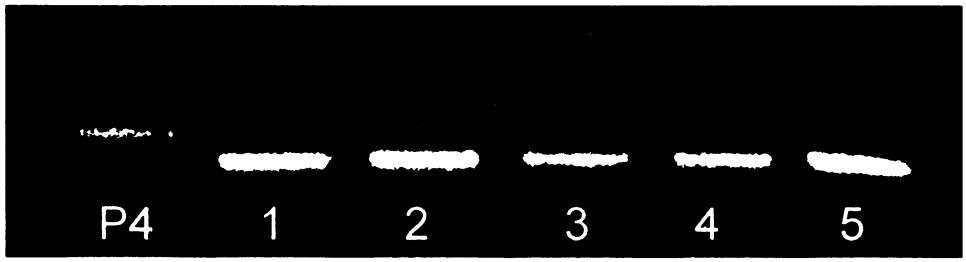


Obr. 25: *Rodokmen rodiny pacienta P4. Byli vyšetřeni všichni rodinní příslušníci. Proband označen šipkou.* $^{+}$ *mutace 965–966insA.*

Pacient P4 je nositelem mutace 965–966insA v 15. exonu (obr. 26). Byla provedena DGGE analýza 15. exonu u pěti příbuzných pacienta P4 (obr. 27). Jelikož u žádné z vyšetřovaných osob nebyla tímto způsobem mutace v 15. exonu potvrzena a nemocný je průkazně synem svých rodičů (Martásek P., osobní sdělení), jedná se o velmi vzácný případ *de novo* mutace. Mutaci lze ověřit také pomocí restrikčního enzymu MaeIII, neboť mutace vede k zániku restrikčního místa pro tento enzym.



Obr. 26: Část *sekvence 15. exonu pacienta P4 s místem mutace.*



Obr. 27: *Výsledek DGGE analýzy 15. fragmentu genu pro PBGD příbuzných pacienta P4. Mutace se vyskytuje pouze u pacienta P4. 1. sestra, 2. sestra, 3. otec, 4. sestra, 5. matka.*

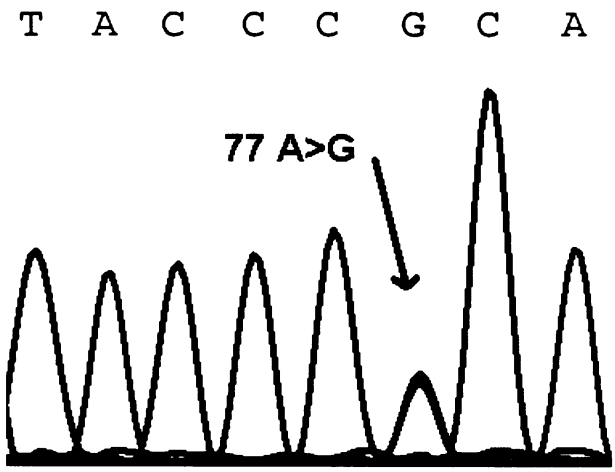
5.1.5. Pacient P5

Byla provedena DGGE analýza genu pro PBGD u pacienta P5 a 4 příbuzných. Rodokmen není k dispozici.

Výsledky typické pro mutaci či polymorfismus byly nalezeny při analýze 3. (obr. 28) a 11. fragmentu. V případě 11. fragmentu sekvenační analýza odhalila běžný polymorfismus 7064 C>A v 10. intronu. Sekvenační analýza 3. fragmentu prokázala mutaci 77 G>A (LLEWELLYN et al. 1993, obr. 29).

Pro snadné a rychlé ověření mutace byl navržen restrikčí test. Mutace vede k zániku restrikčního místa pro enzym AciI.

Obr. 28: *Výsledek DGGE analýzy 3. fragmentu genu pro PBGD u příbuzných pacienta P5. Mutace se vyskytuje ve pouze u pacienta P5.*



Obr. 29: *Část sekvence 3. exonu s místem mutace.*

5.1.6. Pacient P6

U pacienta P6 byla provedena DGGE analýza genu pro PBGD. Mutace byla lokalizována v 10. fragmentu (obr. 31).

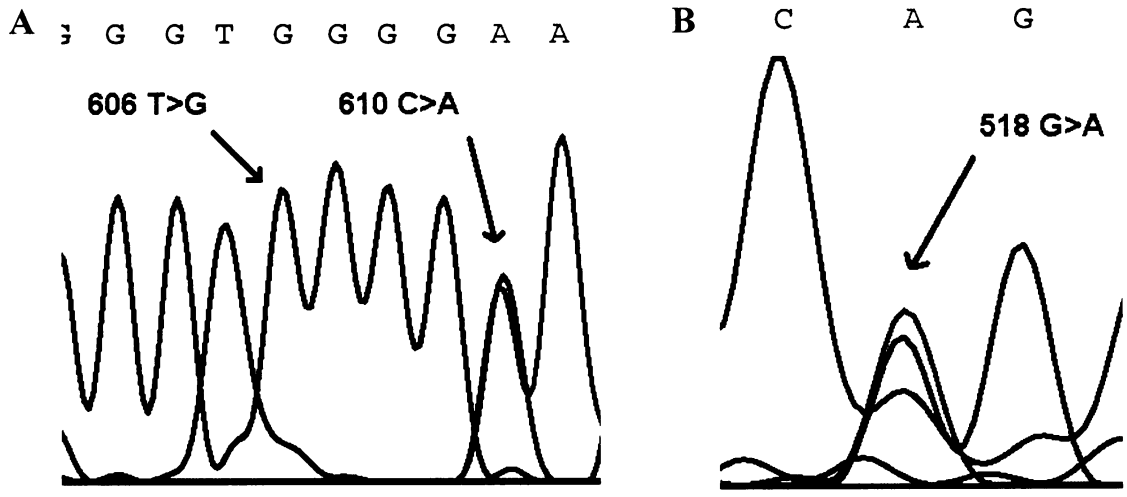
Sekvenační analýza 10. exonu odhalila 2 mutace a 1 polymorfismus. První mutace se nalézá v pozici 518 (číslováno podle cDNA) a jedná se o tranzici G>A, která má za následek změnu aminokyselinové sekvence v pozici 173 (R173Q, DELFAU et al. 1990, obr. 30B).

Druhá mutace se nalézá na 3'-konci 10. exonu v pozici 610 a jedná se o transverzi C>A, která má za následek výměnu glutaminu za lysin na 204. pozici v primární proteinové struktuře (Q204K, obr. 30A). Tato mutace dosud nebyla popsána.

Zmíněný polymorfismus se nachází v homozygotní formě na 606. pozici. Jedná se o transverzi T>G, která nemá za následek změnu aminokyselinové sekvence (V202V, obr. 30A).

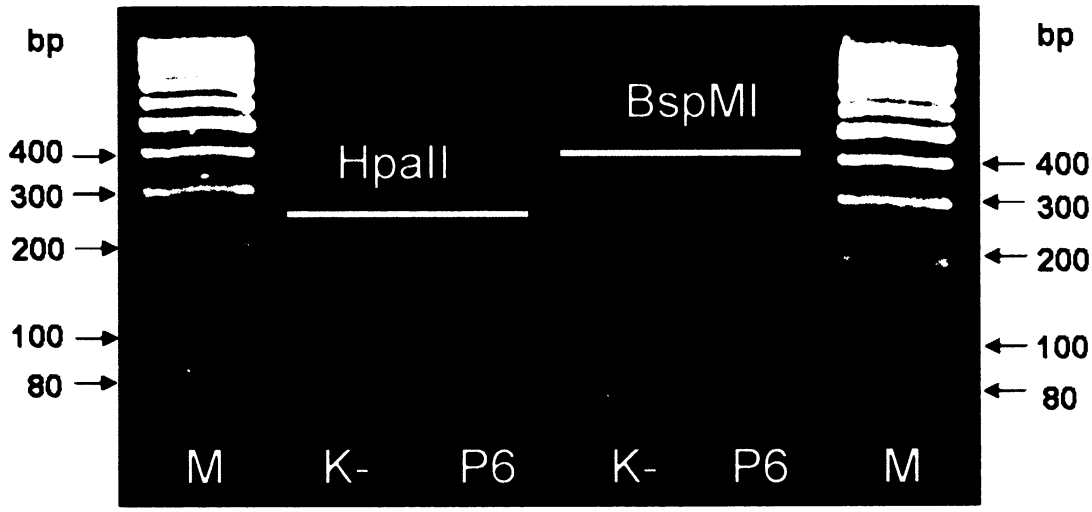
Výsledky sekvenace byly dále potvrzeny restrikčním štěpením v místech obou mutací. V případě mutace 518 G>A dochází k zániku jednoho ze dvou restrikčních míst pro enzym HpaII. Mutace 610 C>A vede k zániku jediného restrikčního místa pro enzym BspMI (obr. 32).

Aby bylo možné určit, zda se mutace R173Q a Q204K nalézají na stejné nebo na různých alelách, byl příslušný fragment genu pro PBGD vložen do vektoru pCR®4-TOPO a osekvencován (viz kap. 4.1.7). Sekvenační analýzou bylo prokázáno, že se obě mutace nacházejí na stejné alele.



Obr. 30 A: *Část sekvence 10. exonu genu pro PBGD s místem mutace.*
Obr. 30 B: *Část sekvence 10. exonu s místem mutace a polymorfismem.*

Obr. 31: *Fotografie výsledku DGGE analýzy 10. fragmentu genu pro PBGD pacienta P6. K+ je pozitivní kontrola, K- a 1–5 jsou kontroly negativní.*



Obr. 32: *Fotografie výsledku restrikčního štěpení 10. exonu genu pro PBGD pacienta P6 pomocí enzymů HpaII a BspMI. M je marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (SM0241/1/2/3, Fermentas, Canada), K- je negativní kontrola.*

5.1.7. Pacienti P7 a P8

Byla provedena DGGE analýza genu pro PBGD u pacientů P7 a P8. Vybrané fragmenty genu byly osekvencovány. Provedenými analýzami nebyla u pacientů zjištěna ve vyšetřovaných oblastech genu pro PBGD přítomnost kauzální mutace. Byly identifikovány pouze polymorfismy. U pacienta P7 polymorfismus 7064 C>A a v případě pacienta P8 polymorfismus 3581 A>G.

5.2. Experimentální část

5.2.1. Klonování a cílená mutageneze PBGD

Byla klonována nespecifická (tzv. housekeeping) forma lidské PBGD. Výchozím materiálem pro klonování byla cDNA připravená reverzní transkripcí z mRNA. Celková RNA byla izolována z leukocytů periferní krve. Pro reverzní transkripci byl použit dvoustupňový proces. V prvním kroku bylo připraveno 1. vlákno cDNA. V druhém kroku byla specificky amplifikována cDNA pro PBGD. Během PCR byla vytvořena unikátní restrikční místa pro orientované vložení cDNA do vektoru pGEX-4T-1. Takto připravený konstrukt byl pomnožen v *E. coli* DH5α a jeho sekvence byla ověřena přímým sekvencováním. V průběhu klonování došlo v cDNA k samovolnému vzniku dvou nukleotidových záměn v pozicích 564 A>G a 867 T>G, které ale nemění sekvenci aminokyselin v proteinu.

Pro zavedení mutací do klonovaného genu pro PBGD byla zvolena metoda cílené místně specifické mutageneze. Tímto způsobem byly připraveny další 3 konstrukty: konstrukt s mutací 518 G>A (R173Q), konstrukt s mutací 610 C>A (Q204K) a konstrukt se dvěma mutacemi 518 G>A (R173Q) a 610 C>A (Q204K). Sekvence všech konstruktů byly ověřeny sekvencováním. Úspěšnost mutageneze byla ve všech případech >90%.

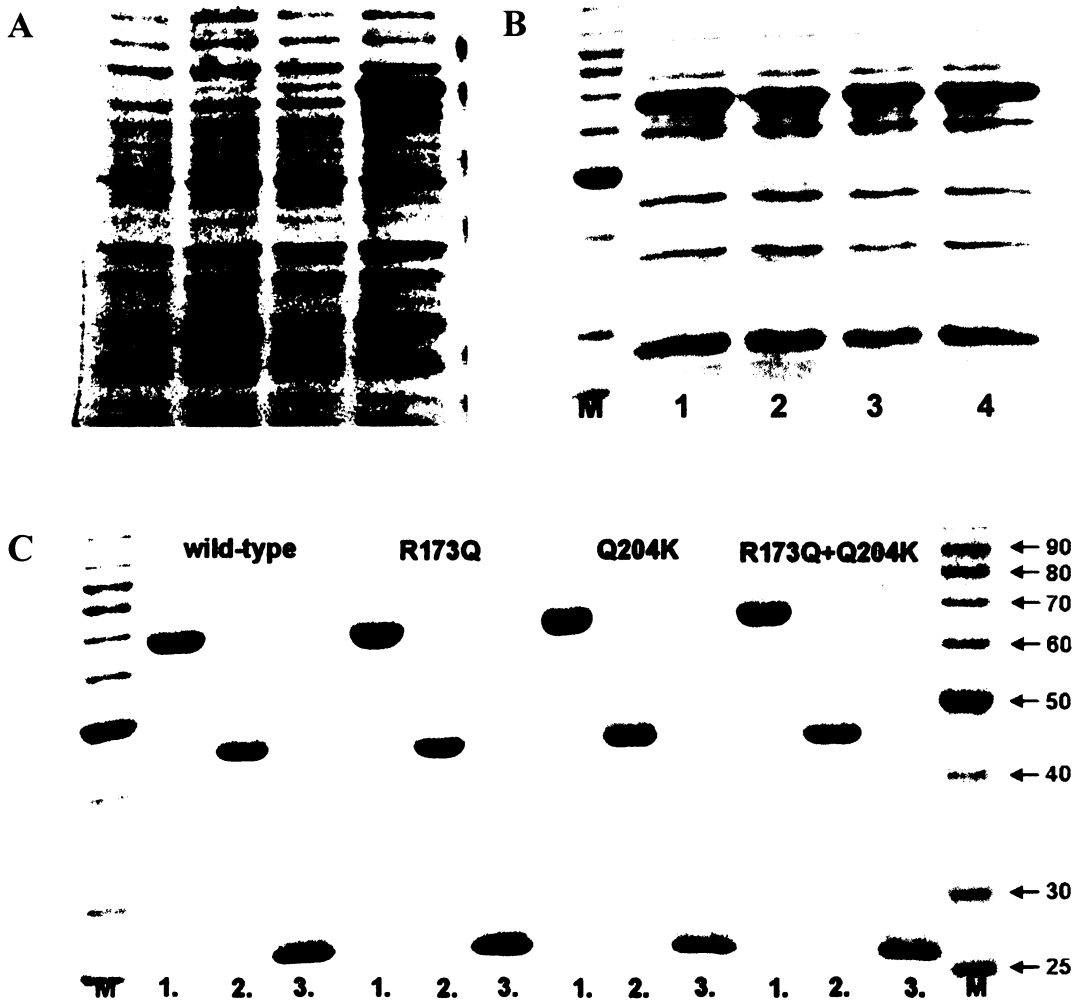
5.2.2. Exprese a purifikace PBGD

PBGD byla exprimována v *E. coli*. Podmínky exprese byly zvoleny tak, aby bylo eliminováno co nejvíce faktorů, které by při expresi mohly vést k ukládání exprimovaného proteinu ve formě nerozpustných inkluzních tělísek. Pro expresi byla zvolena teplota 30°C. Dále byla provedena řada expresních pokusů, při kterých byla exprese PBGD indukována 0,1–1 mM IPTG po dobu 2–6 hod. Jako nejvhodnější pro indukci exprese PBGD se jevila 0,5 mM koncentrace IPTG a délka exprese 2 hod (obr. 33A a 33B). Za těchto podmínek nedocházelo k tvorbě inkluzních tělísek a byl získán rozpustný protein.

PBGD byla purifikována afinitní chromatografií na glutathion separóze 4B. Čistota proteinu byla podle SDS-PAGE >95% (obr. 33C). Výtěžky exprese z 300 ml kultury jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5: Výtěžky *čistého proteinu po expresi v 300 ml média.*

ENZYM	VÝTĚŽEK (mg)
wt PBGD	1,99
mut173 PBGD	1,84
mut204 PBGD	0,99
mut173+204 PBGD	0,92
wt PBGD-GST	1,47
mut173 PBGD-GST	1,4
mut204 PBGD-GST	0,5
mut173+204 PBGD-GST	0,55



Obr. 33: *SDS-PAGE.*

A: *Analýza buněčných extraktů (10 μl bakteriální kultury) před a po expresi (2 h při 37°C v 2x YTG médiu a 0,5 mM IPTG). 1. pGEX-4T-1 (GST) před expresí, 2. pGEX-4T-1 (GST) po expresi, 3. wild-type PBGD před expresí, 4. wild-type PBGD po expresi. Barveno Coomassie Brilliant Blue.*

B: *Analýza buněčných extraktů (10 μl bakteriální kultury po 2 h expresi při 37°C v 2x YTG médiu a 0,5 mM IPTG/dráhu). 1. wild-type PBGD, 2. R173Q PBGD, 3. Q204K PBGD, 4. R173Q+Q204K PBGD. M. 5 μl hmotnostního markeru Benchmark Protein Ladder (Invitrogen). Barveno Coomassie Brilliant Blue.*

C*: Purifikace PBGD. 1. fúzní protein PBGD-GST po eluci z glutathion separózové kolony 10 mM glutathionem (2 μg, 66 kDa), 2. eluát z glutathion separózové kolony po štěpení trombinem (1,5 μg, 44 kDa), 3. odštěpená GST (1,5 μg, 26 kDa). M. 5 μl hmotnostního markeru Benchmark Protein Ladder (Invitrogen). Barveno Coomassie Brilliant Blue. Čísla u šipek v pravé části obrázku udávají velikost jednotlivých proužků markeru v kDa.*

5.2.3. Měření specifické aktivity PBGD

Specifickou aktivitou PBGD se rozumí aktivita v jednotkách U, kterou vykazuje 1 mg PBGD. 1 U je takové množství PBGD, které vytvoří 1 nmol hydroxymetylbilanu (resp. detekovatelného uroporfyrinu I) za 1 h při optimálních podmínkách (pH, teplota, atd.). Relativní aktivita je vyjádření, kolika procent specifické aktivity wt PBGD dosahují mutované proteiny.

Aby bylo možné zjistit funkční dopad připravených mutací na PBGD, bylo nejdříve nezbytné stanovit vhodné podmínky pro měření enzymové aktivity. Kvůli vysoké citlivosti spektrofluorometrické metody byly enzymy s vysokou aktivitou (wt PBGD a mut204 PBGD) naředěny. Množství proteinu v reakční směsi se tak pohybovalo od 13 μg (mut173 a mut173+204 PBGD) do 35 ng (wt a mut204 PBGD). Díky používání mikrokyvet (B0631123, Luminiscence Spectroscopy Cell, Perkin Elmer) na měření fluorescence mohl být objem jedné reakce pouze 400 μl. Pro každé měření byl naředěn čerstvý vzorek enzymu.

Výsledky měření specifické aktivity jsou shrnuty v tabulce 6. Aktivita byla pro srovnání měřena i u PBGD fúzované s GST. Intervaly spolehlivosti byly vypočteny ze směrodatných odchylek. Pro výpočet relativní aktivity byla v případě enzymů fúzovaných s GST provedena korekce na GST část proteinů.

Tab. 6: *Specifické a relativní aktivity wild-type a mutovanýchPBGD.*

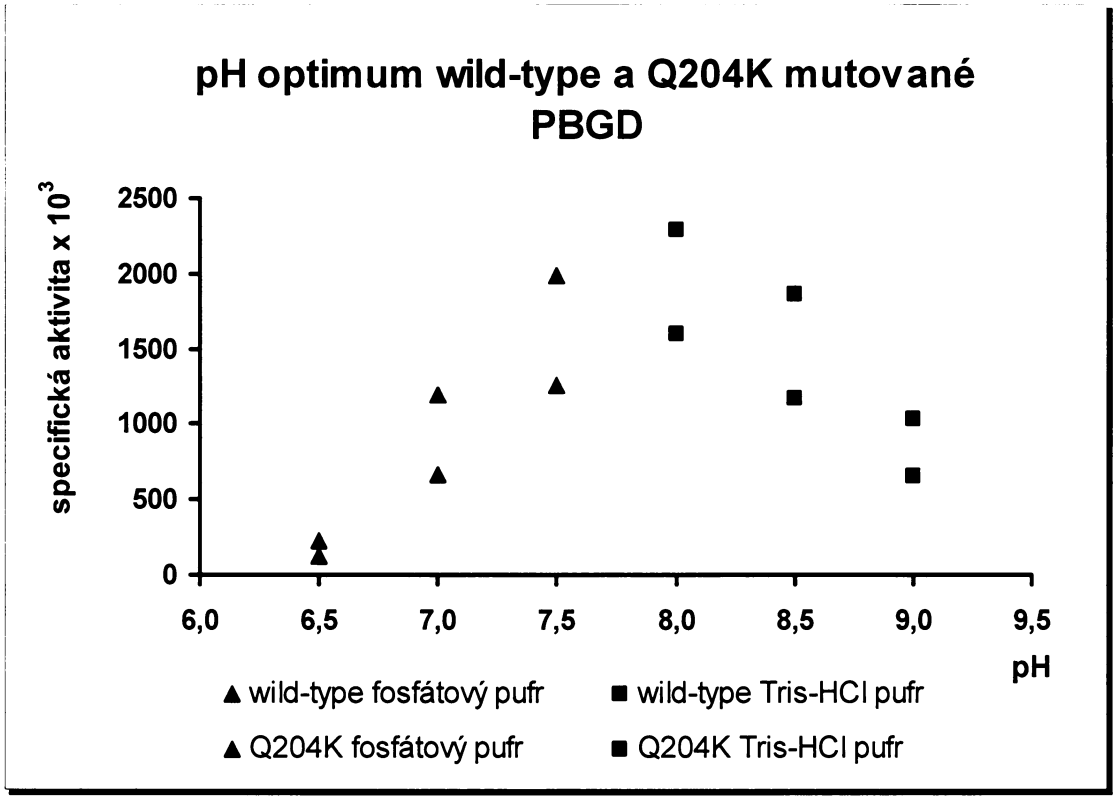
PBGD	SPECIFICKÁ AKTIVITA (nmol URO/h/mg PBGDx10^3)	RELATIVNÍ AKTIVITA (% aktivity wt PBGD)
wild-type	2300 ± 9,2	100
R173Q	2,4 ± 0,01	0,1
Q204K	1682 ± 125	73
R173Q+Q204K	2 ± 0,01	0,1
wild-type GST	1079 ± 77,6	80
R173Q GST	2 ± 0,01	0,1
Q204K GST	916 ±11,8)	68
R173Q+Q204K GST	2 ± 0,01	0,1

Enzymy s mutacemi R173Q vykazovaly pouze zanedbatelnou aktivitu. Aktivita enzymu s mutací Q204K dosahovala 73% wt PBGD. Rovněž fúze PBGD s GST měla za následek snížení enzymové aktivity.

5.2.4. Stanovení pH optima PBGD

Bylo stanoveno pH optimum PBGD s mutací Q204K (mut204 PBGD) a bylo porovnáno s pH optimem wt PBGD. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu 5. Každý bod v grafu je aritmetickým průměrem dvou měření.

Graf 5: *Porovnání pH optima wt PBGD a PBGD s mutací Q204K.*

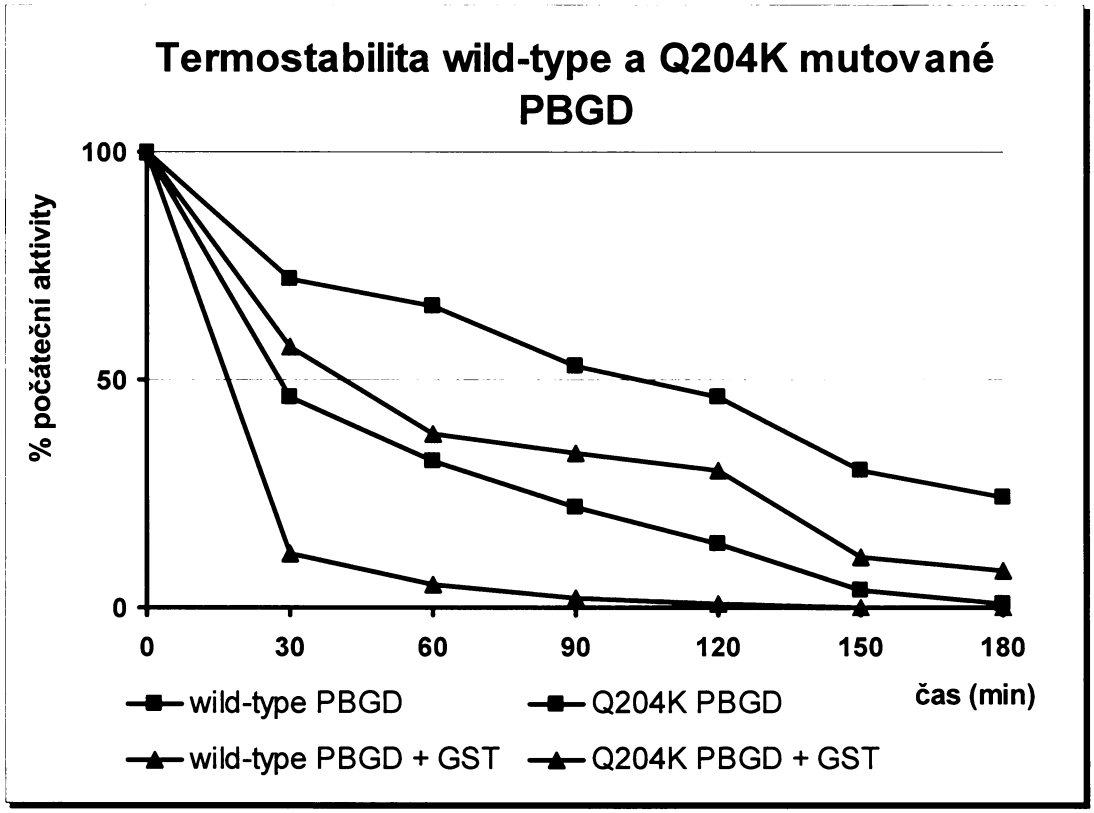


Provedenými měřeními nebyl zjištěn rozdíl v pH optimu wt PBGD a enzymu s mutací Q204K.

5.2.5. Měření teplotní stability PBGD

Byla změřena teplotní stabilita PBGD s mutací Q204K a porovnána s teplotní stabilitou wt PBGD. Měření byla provedena pro samotnou PBGD i pro PBGD fúzovanou s GST. Výsledky měření jsou prezentovány formou grafu (graf 6). Každý bod v grafu je aritmetickým průměrem dvou měření.

Graf 6: *Porovnání tepelné stability wild-type PBGD a PBGD s mutací Q204K.*



Největší stabilitu vykazovala wt PBGD. Ještě po 100 min inkubace při 65°C dosahovala enzymová aktivita 50% počátečních hodnot. Negativní vliv na stabilitu wt PBGD měla fúze s GST. Mutace Q204K způsobila prudké snížení stability PBGD. Aktivita Q204K mutovaného enzymu klesla na polovinu po méně než 30 min inkubace při 65°C. Nejmenší stabilitu vykazovala mut204 PBGD fúzovaná s GST.

6. DISKUZE

6.1. Molekulární diagnostika AIP v ČR

V laboratoři Prof. MUDr. Pavla Martáska, DrSc., KDDL 1. LF UK, má diagnostika a studium molekulárních poruch AIP i dalších akutních porfyrií dlouholetou tradici. Např. jako první v Evropě zde byla vypracována studie zabývající se molekulárními poruchami v genu pro PBGD u pacientů s AIP slovanského původu (ROSIPAL et al. 1997). Je to jediné pracoviště v České republice, kde je možná molekulární diagnostika akutních porfyrií.

Nález kauzální mutace v genu pro PBGD přináší definitivní potvrzení klinicky stanovené diagnózy. Praktickým dopadem výzkumu je rovněž identifikace asymptomatických osob v postižených rodinách. Pomocí vhodných preventivních opatření pak lze u těchto osob předcházet akutním projevům choroby. Výsledky molekulárně-biologické diagnostiky jsou využívány pro účely genetického poradenství. Z vědeckého hlediska přispívá identifikace nových mutací k lepšímu poznání molekulárně-genetického pozadí AIP.

Přes vysokou spolehlivost molekulárně-genetického vyšetření existují možné zdroje chyb (nesprávná identifikace vzorků nebo vzácné genetické varianty), které mohou zapříčinit nesprávný výsledek. Byly vyšetřovány pouze kódující oblasti genu s bezprostředním okolím. Případné další mutace v promotorové oblasti, 3´- a 5´-nepřekládaných oblastech a jiných regulačních oblastech genu pro PBGD (které se do proteinové sekvence nepřekládají, a přesto mají vliv na vznik vlastního proteinu) toto vyšetření nezachytí. Je-li např. deletováno místo nasedání jednoho z primerů, může metoda založená na PCR vést k falešně negativnímu výsledku. Uváděná spolehlivost DGGE je až 95–100% (GROMPE 1993, PUY et al. 1997, 1997a, TCHERNITCHKO et al. 1999). Podle literatury nejsou mutace v genu pro PBGD detekovány u 5–10% pacientů s klinickými příznaky AIP (PUY et al. 1997). I v případě negativního nálezu proto vyšetření zcela nevylučuje AIP. V diferenciální diagnostice je třeba uvažovat o porfyrii variegatě a hereditární koproporfyrii. U osob, kde nebyl prokázán defekt v genu pro PBGD, je proto doporučováno biochemické vyšetření porfyrinů v moči, plazmě a ve

stolici, enzymatické vyšetření k přesnému určení typu porfyrie a dále molekulární vyšetření k nalezení mutace a možnosti diagnostiky rodinných příslušníků.

V této studii byla potvrzena vhodnost metody DGGE pro genetický screening AIP, zejména u větších souborů pacientů. Kvůli drahému přístrojovému vybavení, obtížné optimalizaci, složitému navrhování primerů a časové náročnosti, nelze tuto metodu doporučit pro malý počet analýz. Pokud je prováděna molekulární diagnostika AIP u jednotlivých pacientů, je preferována sekvenační analýza celého genu. Vhodným navržením primerů lze pokrýt celou kódující oblast genu i méně než deseti páry primerů (WHATLEY et al. 1999, DE SIERVI et al. 1999a).

Pro screening v rodinách, kde už je známá kauzální mutace, je po všech stránkách nejvýhodnější použít restrikční štěpení příslušných částí genu (pokud mutace vede k zániku nebo ke vzniku restrikčního místa). Taková analýza je levná, rychlá, spolehlivá a nenáročná na laboratorní vybavení. V této studii byly navrženy testy (využívající restrikčního štěpení) pro 5 ze 7 identifikovaných mutací.

V reakci na nejnovější poznatky v oblasti molekulární diagnostiky AIP je připravována také sekvenační analýza regulačních oblastí genu pro PBGD u těch osob, kde mutace nebyly nalezeny standardním postupem. Tím budou podstatně rozšířeny možnosti molekulární diagnostiky AIP.

6.2. Mutace způsobující AIP

Specifikem AIP je vysoká heterogenita mutací (viz kap. 2.7.2). Doposud bylo v genu pro PBGD identifikováno více než 300 různých mutací (viz dodatky tab. 12). Rozložení mutací v genu je víceméně náhodné a rovnoměrné. Neexistuje žádná celosvětově prevalentní mutace. Pouze v některých populacích se rozšířily určité mutace, pravděpodobně v důsledku founder efektu (efekt zakladatele). Z tohoto důvodu je molekulární diagnostika náročnější než u některých jiných genetických poruch, jelikož musí být provedena analýza celého genu, popř. i regulačních oblastí genu.

Ve slovanské populaci bylo doposud popsáno celkem 65 mutací (viz dodatky tab. 13). Typy a zastoupení jednotlivých mutací jsou srovnatelné se světem (grafy 7 a 8). Ve slovanské populaci doposud nebyla v genu pro PBGD zaznamenána inzerce více

nukleotidů. Mírně převládají jednonukleotidové záměny a vícenukleotidové delece. O něco častější jsou poruchy sestřihu a méně časté posuny čtecího rámce. Rozložení mutací v genu pro PBGD se příliš neliší od situace ve světě. Ve slovanské populaci doposud nebyly nalezeny mutace v promotorové oblasti, v 6. a 14. exonu a intronech 2, 6, 9, 10. Výrazně častěji, ve srovnání se světem, se mutace vyskytují v exonech 3 a 10 a intronech 3, 12 a 13, méně často v exonu 12 (graf 9).

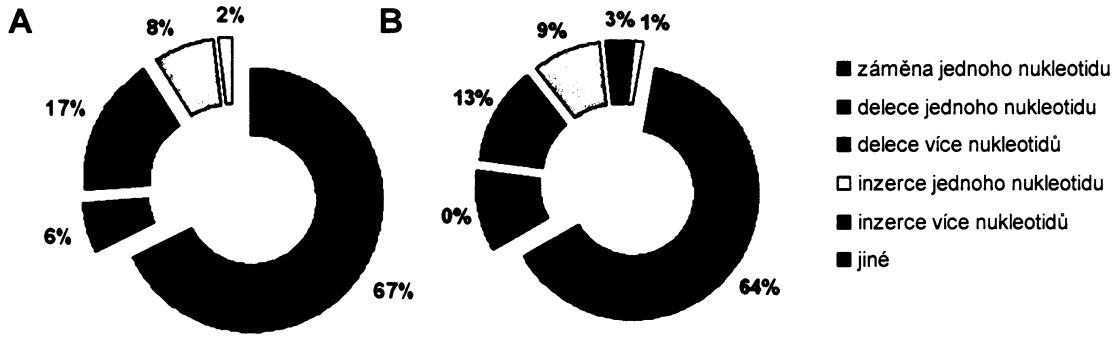
V československé populaci bylo v genu pro PBGD doposud identifikováno 11 různých mutací způsobujících AIP (tabulka 7). Žádná z mutací není prevalentní, každá mutace se vyskytuje v rámci jedné rodiny. Mutace jsou v genu pro PBGD rozloženy rovnoměrně, způsobem odpovídajícím pravděpodobnosti výskytu mutace v dané části genu.

Tab. 7: *Doposud identifikované mutace v československé populaci.*

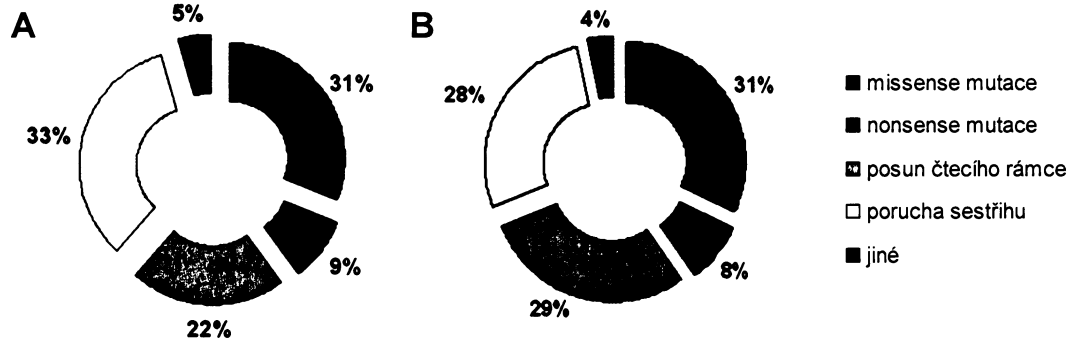
mutace	**typ/lokalizace**	**důsledek mutace**	**reference**
70 G>A	MS / E3	G24S	*Rosipal et al. 1997*
76 C>T	MS / E3	R26C	*Kauppinen et al. 1995*
77 G>A	MS / E3	R26H	*Llewellyn et al. 1993*
158–159insA	FS / E4	FS → Stop + 12	*Puy et al. 1997*
331 G>A	MS / E7	G111R	*Gu et al. 1993*
518 G>A	MS / E10	R173Q	*Delfau et al. 1990*
610 C>A	MS / E10	Q204K	*Tato studie*
675delA	FS / E12	FS → Stop + 29	*Tato studie*
771+1 G>T	SD / IVS12	delece exonu 12	*Rosipal et al. 1997*
799 G>A	MS / E13	V267M	*Rosipal et al. 1997*
965–966insA	FS / E15	FS → Stop + 36	*Tato studie*

Mutace číslovány podle lidské cDNA, kde A v1. kodónu ATG je +1. ins – inzerce, MS – missense mutace, FS – posun čtecího rámce (frameshift), E – exon, IVS – intron. Literární odkaz je vždy pro první popis mutace.

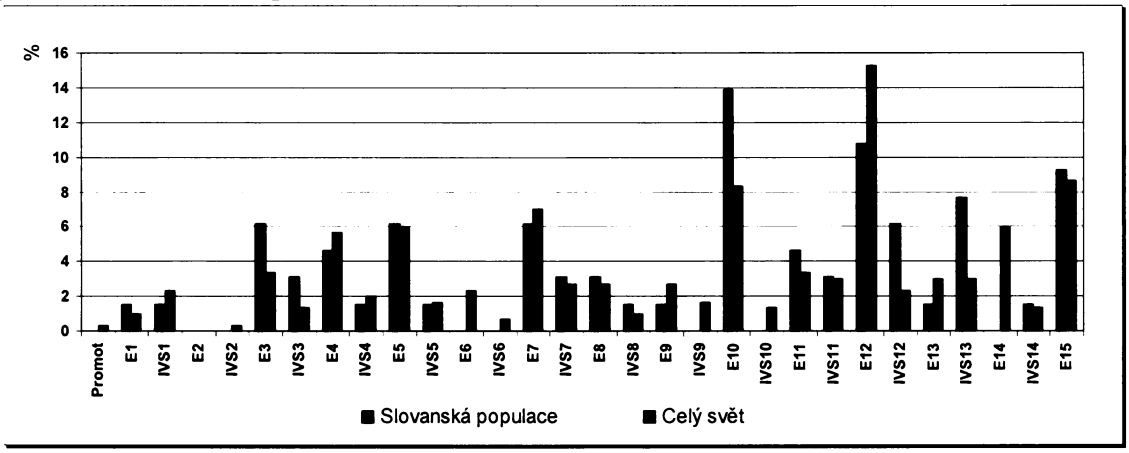
Graf 7: *Zastoupení nukleotidových změn v genu pro PBGD. Srovnání slovanské populace (graf A) se světem (graf B).*



Graf 8: *Typy mutací v genu pro PBGD podle funkčního dopadu. Srovnání slovanské populace (graf A) se světem (graf B).*



Graf 9: *Srovnání výskytu mutací v jednotlivých úsecích genu pro PBGD ve slovanské populaci a ve světě. Graf znázorňuje, kolik procent mutací z celkového počtu mutací (slovanská populace 65, svět celkem 301) je lokalizováno v jednotlivých částech genu pro PBGD. Promot - promotorová oblast, E1-15 - exony, IVS1-14 – introny.*



V souboru osob vyšetřovaných v rámci této diplomové práce byl výskyt AIP potvrzen v 6 rodinách. U dvou pacientů (P7 a P8) nebyly provedenými analýzami genu pro PBGD kauzální mutace zjištěny. Mezi mutacemi byly 3 mutace zcela nové (610 C>A, 675delA, 965–966insA), doposud nepopsané a 1 mutace nová pro slovanskou populaci (518 G>A). Výskyt zbývajících 4 mutací byl v československé populaci popsán již dříve (ROSIPAL et al. 1997, tabulka 8). V rodině pacienta P2 byly provedeným screeningem identifikovány další 2 osoby s poškozeným genem pro PBGD. Výsledky tohoto screeningu byly použity pro účely genetického poradenství.

Tab. 8: *Mutace identifikované v této studii u českých a slovenských AIP pacientů.*

mutace	typ / lokalizace	důsledek mutace	reference
76 C>T	MS / E3	R26C	*Kauppinen et al. 1995*
77 G>A	MS / E3	R26H	*Llewellyn et al. 1993*
518 G>A	MS / E10	R173Q	*Delfau et al. 1990*
610 C>A	MS / E10	Q204K	*Tato studie*
675delA	FS / E12	FS → Stop + 29	*Tato studie*
771+1 G>T	SD / IVS 12	Delece exonu 12	*Rosipal et al. 1997*
965–966insA	FS / E15	FS → Stop + 36	*Tato studie*

Mutace číslovány podle lidské cDNA, kde A v1. kodónu ATG je +1. ins – inzerce, MS – missense mutace, FS – posun čtecího rámce (frameshift), E – exon. IVS – intron. Literární odkaz je vždy pro první popis mutace.

Pozornost zasluhuje výskyt dvou různých mutací (R173Q, Q204K) u pacienta P6. Obě mutace byly lokalizovány v 10. exonu genu pro PBGD. AIP vykazuje autozomálně dominantní dědičnost. Výskyt mutace v homozygotním stavu proto většinou není slučitelný se životem. Doposud bylo popsáno pouze několik případů homozygotní formy AIP (BEUKEVELD et al. 1990, HESSELS et al. 2004), a dobře zdokumentován na molekulární úrovni byl pouze jeden případ (LLEWELLIN et al. 1992). Nejednalo se ale o homozygotní stav v pravém slova smyslu, ale o 2 různé mutace, vyskytující se každá na jedné alele (tzv. složený heterozygot). Životaschopnost jedince byla umožněna alespoň minimální zbytkovou aktivitou mutantního enzymu při fyziologickém pH (EDIXHOVEN-BOSDIJK et al. 2002). U našeho pacienta nebylo běžnou analýzou možné určit, zda se jedná o homoalelický nebo heteroalelický výskyt mutací. Proto byl příslušný amplifikovaný fragment genu pro PBGD vložen do bakteriálního vektoru a naklonován. Poté bylo každé vlákno vloženého fragmentu (odpovídající jedné alele) sekvencováno samostatně. Provedenou analýzou bylo zjištěno, že u pacienta se jedná o homoalelický stav, tj. obě mutace se vyskytují na jedné alele.

Případ byl natolik ojedinělý, že bylo rozhodnuto, dále studovat jeho molekulární podstatu a zjistit zda jsou obě mutace stejně závažné a jaký dopad mají mutace na funkci enzymu. Byla naklonována cDNA pro lidskou PBGD a byly připraveny 4 prokaryotické expresní konstrukty (wild-type, konstrukt s mutací R173Q, konstrukt s mutací Q204K a konstrukt s oběma mutacemi R173Q a Q204K). Tyto enzymy byly exprimovány fúzované s GST v *E. coli* a purifikovány do vysokého stupně čistoty. Poté byla provedena enzymatická měření, stanovení specifické aktivity, stanovení pH optima a test stability. Provedenými měřeními bylo zjištěno, že obě mutace poškozují enzym. Mutace R173Q způsobuje neschopnost PBGD katalyzovat enzymatickou reakci, zatímco mutace Q204K podstatně snižuje stabilitu enzymu, což se zřejmě projevilo i nižšími výtěžky PBGD s mutací Q204K během exprese (tabulka 5).

Na základě enzymatických studiích provedených na mutovaných lidských PBGD (DELFAU et al. 1990, CHEN et al. 1994, ONG et al. 1997), mutantech PBGD z *E. coli* (JORDAN a WOODCOCK 1991, LANDER et al. 1991) a z 3D modelu PBGD (LOUIE et al. 1992, BROWNLIE et al. 1994) lze tvrdit, že záměna aminokyseliny v blízkosti aktivního místa vždy způsobuje nefunkčnost enzymu. Záměny aminokyselin v jiných částech enzymu mohou mít rozličné důsledky. Předpokládá se, že tyto mutace buď enzym destabilizují, nebo mění strukturu enzymu tak, že brání přístupu substrátu do aktivního centra. CHEN et al. (1994) prokázali, že PBGD s mutacemi C247F a R201W ztrácejí 90% enzymové aktivity za méně než 30 min inkubace při teplotě 65°C. Poločas stability wild-type PBGD byl 120 min. Podobné výsledky byly získány i v této studii s mutovaným enzymem Q204K. Některé mutace pravděpodobně způsobují obojí, tj. destabilizují enzym a snižují aktivitu. CHEN et al. (1994) exprimovali 4 PBGD s mutacemi ve 3. doméně a všechny měly relativně vysokou reziduální aktivitu 10–50%.

6.3. Exprese a purifikace PBGD

Exprese proteinů v *E. coli* představuje běžný způsob syntézy lidských proteinů k jejich dalšímu studiu. Existuje celá řada komerčně dostupných expresních vektorů a kmenů *E. coli*. V této studii byl použit vektor pGEX-4T-1. Hlavní předností tohoto vektoru je možnost připravit rekombinantní protein fúzovaný na N-konci s GST a zajistit tak snadnou a účinnou purifikaci exprimovaného proteinu afinitní chromatografií na

glutathion separóze. Proteiny byly exprimovány v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) RP. Výhodou tohoto kmene je schopnost používat kodóny pro arginin a prolin, které se v *E. coli* vyskytují méně často, a zajistit tak vysokou rychlost exprese rekombinantního proteinu. Tento systém (pGEX-4T-1 + *E. coli* BL21 RP) se při expresi lidské PBGD velmi osvědčil. Bylo připraveno dostatečné množství aktivního proteinu o vysokém stupni čistoty.

Lidská PBGD byla již dříve klonována v *E. coli* za účelem studia molekulární podstaty AIP a vlivu mutací na funkci enzymu (DELFAU et al. 1990, CHEN et al. 1994, ONG et al. 1997, BRONS-POULSEN et al. 2005). Byly provedeny také studie v eukaryotickém expresním systému (MUSTAJOKI 1999, PISCHIK et al. 2005). Ve většině studií nebyla PBGD purifikována a k stanovení enzymatické aktivity byl použit pouze buněčný lyzát.

6.4. Měření enzymové aktivity PBGD

V enzymatických studiích mutovaných PBGD (DELFAU et al. 1990, CHEN et al. 1994, ONG et al. 1997, MUSTAJOKI 1999) se mutace vždy projevovaly snížením enzymové aktivity. Vlastnosti mutantních proteinů byly dále analyzovány měřením enzymatické aktivity v prostředí o různém pH (DELFAU et al. 1990, EDIXHOVEN-BOSDIJK et al. 2002) nebo stanovením termostability (CHEN et al. 1994). Mutantní enzymy vykazují srovnatelnou aktivitu v prokaryotickém i eukaryotickém systému, jelikož PBGD je cytosolický enzym a nepotřebuje další posttranslační modifikace.

Bylo popsáno několik možných uspořádání pro měření enzymové aktivity PBGD. Měření enzymové aktivity PBGD v erytrocytech pacientů je běžný diagnostický postup. Jeho nevýhoda, kromě často diskutované spolehlivosti (pouze 85%, KAUPPINEN et al. 1995), spočívá v nemožnosti porovnávat absolutní údaje o enzymových aktivitách mezi jednotlivými laboratořemi. Každá laboratoř totiž používá k měření enzymové aktivity vlastní metody. Porovnání je možné pouze v relativních hodnotách. V posledních letech je snaha o standardizaci těchto měření (ERLANDSEN et al. 2000).

Při srovnání specifických enzymových aktivit PBGD z různých studií je patrné široké rozpětí absolutních hodnot (např. DE SIERVI et al. 1999, 1 400 x 10^3 U/mg, SMYTHE

a WILLIAMS 1988, 2 400 x 10^3 U/mg, ONG et al. 1997, 2 734 x 10^3 U/mg, MUSTAJOKI 1999, 3 173 x 10^3 U/mg, EDIXHOVEN-BOSDIJK et al. 2005, 3 909 x 10^3 U/mg). Evidentně záleží na tom, zda byl k měření aktivity použit purifikovaný enzym nebo buněčný lyzát. Dalším zdrojem variability hodnot může být složení reakční směsi, pH a koncentrace použitého pufru, kvalita substrátu nebo způsob oxidace produktu reakce na detekovatelný uroporfyrin I. Specifická aktivita je vždy vztahována na množství enzymu, jehož přesné stanovení je v biochemii obecným problémem. Další faktory, které musí být brány v potaz, jsou kvalita laboratorních přístrojů, zejména spektrofluorometru používaného ke kvantifikaci uroporfyrinu I.

Hodnoty enzymové aktivity získané v této studii spadají do intervalu hodnot uváděných v literatuře a patří spíše mezi hodnoty průměrné.

Pro stanovení pH optima byla použita upravená metoda podle DELFAU et al. (1990). Byly použity pufry o pH v rozmezí 6,0–9,0, lišící se o půl stupně pH. Tímto způsobem nebyl zjištěn rozdíl v pH optimu wt a mut204 PBGD, nicméně nelze vyloučit, že se pH optimum obou enzymů liší v rozmezí desetin stupně pH. Ve výše uvedené studii se jeden mutovaný enzym v pH optimu lišil od wt PBGD o celý stupeň.

Pro měření termostability enzymu byla upravena metoda podle CHEN et al. (1994). Metoda vychází z předpokladu, že pokud je mutovaná aminokyselina důležitá pro strukturu proteinu, bude mít protein nižší stabilitu a bude teplem snáze inaktivován. V práci CHEN et al. (1994) byla prokázána nestabilita PBGD s mutací R201W a C247F. Tyto mutované enzymy ztratily 90% aktivity po 30 min inkubce při 65°C.

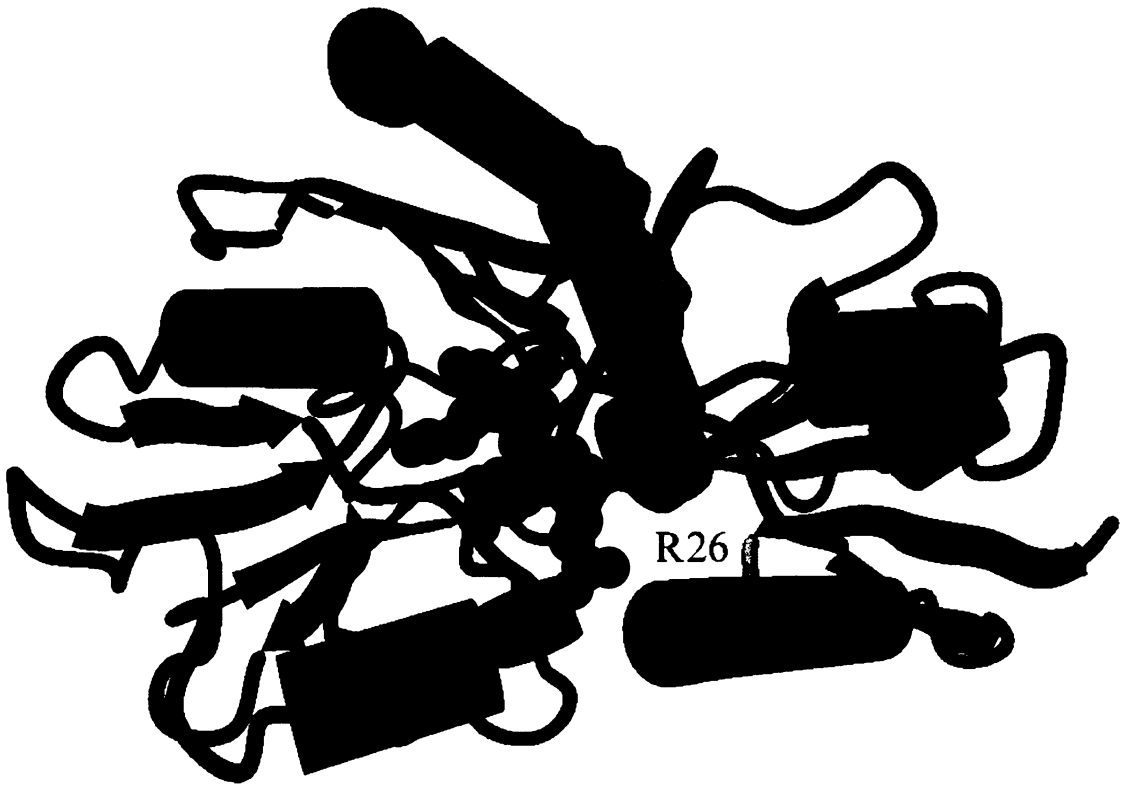
6.5. Charakterizace identifikovaných mutací

6.5.1. Mutace R26C a R26H

U dvou nepříbuzných pacientů P3 a P5 se vyskytují 2 missense mutace postihující arginin 26. Mutace 76 C>T vede k záměně argininu za cystein (R26C) a mutace 77 G>A způsobuje záměnu argininu za histidin (R26H).

Arginin 26 se nachází v 1. doméně PBGD v blízkosti aktivního místa (obr. 34). Předpokládá se, že pozitivně nabitý postranní řetězec argininu interaguje se substrátem

(LAMBERT et al. 1994). V expresní studii provedené MUSTAJOKI (1999) nevykazoval mutantní enzym žádnou aktivitu. Rovněž mutageneze homologního zbytku u *E. coli* (arginin 11) vedla k úplné inaktivaci enzymu, jelikož bylo inhibováno navázání první molekuly substrátu (JORDAN a WOODCOCK 1991, LANDER et al. 1991).



Obr. 34: *Model 3D struktury PBGD z E. coli. Žlutě zvýrazněn arginin 11, který je homologní s lidským argininem 26.*

Srovnáním aminokyselinové sekvence PBGD ze 60 organizmů bylo vypočteno skóre konzervace argininu 26 na 0,955. Z toho vyplývá, že tato aminokyselina je vysoce konzervovaná, invariantní a nezbytná pro funkci a/nebo strukturu enzymu.

6.5.2. Mutace 771+1 G>T

Pacient P1 je nositelem mutace 771+1 G>T ve 12. intronu. Tato mutace se nachází v místě nezbytném pro správný sestřih mRNA transkriptu a má za následek deleci celého 12. exonu (ROSIPAL et al. 1997).

6.5.3. Mutace 675delA a 965–966insA

V rodinách pacientů P2 a P4 byly nalezeny 2 nové dosud nepopsané mutace. Obě způsobují změnu čtecího rámce a vytvoření předčasného terminačního kodónu. Předčasná terminace syntézy proteinu má pro enzymatickou funkci drastické následky. Je pravděpodobné, že takový enzym je zcela inaktivní, protože mu chybí důležité funkční skupiny. Rovněž stabilita takových proteinů je nízká kvůli chybějícím strukturním elementům (BROWNLIE et al. 1994). Často je snížena i úroveň transkripce mutantní alely (MUSTAJOKI 1999).

Inzerce 965–966insA se nachází v 19 kodónu 15. exonu PBGD. Mutace způsobuje posun čtecího rámce, změnu primární struktury proteinu a po 36 chybně zařazených aminokyselinách vzniká předčasný terminační kodón (FS→ stop+36, tabulka 9).

V případě této mutace se jedná o *de novo* poruchu. Pacient je průkazně synem svých rodičů (Martásek P., osobní sdělení). Mutace nebyla nalezena u rodičů ani u sourozenců. Vznik mutace *de novo* je velmi vzácný jev. Mutace se v případě AIP většinou dědí z generace na generaci. Doposud bylo u AIP zaznamenáno pouze několik *de novo* mutací (KAUPPINEN et al. 1995, WHATLEY 1995, PUY et al. 1997a).

Tab. 9: *Aminokyselinová sekvence PBGD s mutací 965–966insA. Důsledkem mutace je zkrácení proteinu na 357 aminokyselin a chybné zařazení 36 aminokyselin na C-konec proteinu (červeně).*

MSGNGNAAATAEENSPKMRVIRVGTRKSQLARIQTDSVVATLKASYPGLQFEIIAMSTTG
DKILDTALSKIGEKSLFTKELEHALEKNEVDLVVHSLKDLPTVLPPGFTIGAICKRENPH
DAVVFHPKFVGKTLETLPEKSVVGTSSLRRAAQLQRKFPHLEFRSIRGNLNTRLRKLDEQ
QEFSAIILATAGLQRMGWHNRVGQILHPEECMYAVGQGALGVEVRAKDQDILDLVGVLHD
PETLLRCIAERAFLRHLEGGCSVPVAVHTAMKDGQLYLTGGVWSLDGSDSIQETMQATIH
VPAQHEDGPEDDPQLVGITARKHSTRAPVGCPELGHQPGQLVAEQRSQKHPGCCTAA

Delece 675delA se nachází ve 12. exonu genu pro PBGD. Mutace taktéž způsobuje posun čtecího rámce, změnu primární struktury proteinu a po 29 chybně zařazených aminokyselinách vzniká předčasný terminační kodón (FS → Stop + 29, tabulka 10).

Tab. 10: *Aminokyselinová sekvence PBGD s mutací 675delA. Důsledkem mutace je zkrácení proteinu na 253 aminokyselin a chybné zařazení 29 aminokyselin na C-konec proteinu (červeně).*

MSGNGNAAATAEENSPKMRVIRVGTRKSQLARIQTDSVVATLKASYPGLQFEIIAMSTT
GDKILDTALSKIGEKSLFTKELEHALEKNEVDLVVHSLKDLPTVLPPGFTIGAICKREN
PHDAVVFHPKFVGKTLETLPEKSVVGTSSLRRAAQLQRKFPHLEFRSIRGNLNTRLRKL
DEQQEFSAIILATAGLQRMGWHNRVGQILHPEECMYAVGQGALGVEVRPRTRTSWIWWV
CCTIPRLCFAASLKGPS

U obou mutací budou připraveny expresní konstrukty a provedeny enzymatické studie.

6.5.4. Mutace R173Q a Q204K

Sekvenační analýza 10. exonu PBGD odhalila u pacienta P6 2 mutace.

První mutace se nalézá v pozici 518 a jedná se o tranzici G>A, která má za následek záměnu argininu za glutamin v pozici 173 (R173Q, obr. 35). Tuto mutaci jako první popsal DELFAU et al. (1990). Srovnáním aminokyselinové sekvence PBGD ze 60 organizmů bylo vypočteno skóre konzervace argininu 173 na 0,978. Tato aminokyselina je tedy téměř invariantní a nezbytná pro funkci enzymu. Postranní řetězec argininu 173 totiž interaguje s kofaktorem a zbytek se rovněž účastní vazby substrátu (SHOOLINGIN-JORDAN 1995). PBGD s mutací R173Q byla exprimována v *E. coli* a nevykazovala téměř žádnou enzymatickou aktivitu (tabulka 6). Mutageneze argininu 155 u *E. coli* (odpovídá lidskému R173) rovněž vedla k neschopnosti enzymu vázat substrát (JORDAN a WOODCOCK 1991, LANDER et al. 1991).

Druhá mutace se nalézá na 3'-konci 10. exonu v pozici 610 a jedná se o transverzi C>A, která má za následek výměnu glutaminu za lysin na 204. pozici v primární proteinové struktuře (Q204K, obr. 34). Tato mutace dosud nebyla popsána.

Obr. 35: *3D model struktury PBGD z E. coli. Žlutě zvýrazněny aminokyseliny homologní s lidským argininem 173 a glutaminem 204.*

Srovnáním aminokyselinové sekvence PBGD ze 60 organizmů bylo vypočteno skóre konzervace glutaminu 204 na 0,43. Z toho je možné usuzovat, že aminokyselina nepatří mezi zbytky klíčové pro funkci enzymu. PBGD s mutací Q204K byla exprimována v *E. coli,* purifikována a byly s ní provedeny enzymatické studie. Mutovaný enzym vykazoval relativně vysokou zbytkovou aktivitu (73%) a pH optimum bylo stejné jako v případě wt proteinu (pH 8,0). Dalšími měřeními bylo prokázáno, že mutace Q204K způsobuje snížení stability proteinu. Aktivita mutantního enzymu klesla na polovinu po méně než 30 min inkubace při teplotě 65°C. Aktivita wt PBGD poklesla na polovinu teprve po více než 100 min inkubace při teplotě 65°C (graf 6). Na sníženou stabilitu PBGD s mutací Q204K lze usuzovat i z výsledků samotné exprese, kdy výtěžky mut204 a mut173+204 PBGD byly maximálně poloviční ve srovnání s wt a mut173 PBGD (tabulka 5). Všechny expresní experimenty probíhaly za stejných podmínek.

7. SOUHRN

Všechny cíle diplomové práce byly splněny.

- Byly identifikovány kauzální mutace způsobující AIP u nově diagnostikovaných pacientů z České a Slovenské republiky a byl proveden genetický screening v postižených rodinách. Výsledky vyšetření byly použity pro účely genetického poradenství.

- Byla zavedena a optimalizována metodologie pro rutinní molekulární analýzu genu pro PBGD a následný genetický screening u nově diagnostikovaných nemocných s AIP a v jejich rodinách.

- Lidská PBGD byla klonována a exprimována v *E. coli*. Byly připraveny enzymy s mutacemi R173Q, Q204K a R173Q+Q204K.

- Mutace byly charakterizovány na molekulární úrovni. Vlastnosti mutovaných PBGD byly určeny měřením specifické enzymové aktivity a stanovením pH optima a tepelné stability.

Tato studie přispívá k lepšímu poznání molekulární podstaty AIP.

- Byly identifikovány 3 nové dosud nepopsané mutace v genu pro PBGD (Q204K, 675delA, 965–966insA).

- Byl popsán a charakterizován neobvyklý případ AIP se dvěma mutacemi (R173Q, Q204K) lokalizovanými na stejné alele v 10. exonu genu pro PBGD. Mutace R173Q způsobuje neschopnost PBGD katalyzovat enzymatickou reakci, mutace Q204K snižuje stabilitu enzymu.

Poznání patologických mutací, specifických pro jednotlivé rodiny, výrazně přispěje k prevenci závažných, až život ohrožujících záchvatů akutní jaterní porfyrie a má tedy velký zdravotně-sociální dopad.

S použitím všech dostupných literárních pramenů byl vytvořen kompletní seznam 301 popsaných mutací způsobujících AIP a bylo provedeno srovnání výskytu mutací v genu pro PBGD ve slovanské populaci a ve světě.

8. DODATKY

Kapitola obsahuje materiály doplňující a rozšiřující text diplomové práce. Byly sem zařazeny zejména rozsáhlé tabulky. Jejich použití v příslušných kapitolách by vedlo k neúměrnému narůstání objemu diplomové práce a bylo by na úkor přehlednosti a srozumitelnosti textu. V textu je na tyto materiály odkazováno. Tabulky 12–14 jsou psány v angličtině.

Tab. 11: *Nomenklatura porfyrií.*

Onemocnění	**Synonyma**
deficience PBG syntázy	*akutní porfyrie s defektem ALA dehydratázy* plumboporfyrie Dossova porfyrie ALA-urie
deficience PBG deaminázy	*akutní intermitentní porfyrie (AIP)* Waldenströmova (Švédská) porfyrie pyroloporfyrie
deficience URO III syntázy	kongenitální erytropoetická porfyrie (CEP) hereditární erytropoetická porfyrie Güntherova choroba morbus Günther
deficience URO dekarboxylázy	*porfyria cutanea tarda (PCT)* symptomatická jaterní porfyrie chronická hepatální porfyrie porphyria cutanea tarda symptomatica urokoproporfyrie
deficience COPRO oxidázy	*hereditární koproporfyrie (HCP)* koproporfyrie
deficience PROTO oxidázy	*porfyria variegata (PV)* smíšený typ jihoafrický typ mixed porphyria protokoproporfyrie porphyria cutanea tarda hereditaria
deficience ferochelatázy	*Protoporfyrie (PP)* erytropoetická protoporfyrie erytrohepatální protoporfyrie

Kurzívou zvýrazněny doporučené názvy

Tab. 12: *Mutace identifikované v genu pro PBGD.*

Position	Nucleotide change	Type of mutation	Mutation consequence	Reference (first report)
Promoter				
-154	del G	other	Transcription impairment	*Whatley et al. 2000*
Exon 1				
3	G>A	MS	M1I	*Chen et al. 1994*
33	G>A	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41?	*Luchinina et al. 2005*
33	G>T	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Grandchamp et al. 1989a*
IVS 1				
33+1	G>A	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Grandchamp et al. 1989b*
33+1	G>T	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Yu et al. 2000*
33+2	T>A	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Puy et al. 1998*
33+2	T>C	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Brasch et al. 2004*
33+3	G>T	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Mustajoki et al. 1998*
33+5	G>A	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41?	*Luchinina et al. 2005*
33+5	G>C	SD	IVS1 67 bp retention , FS→stop+41	*Puy et al. 1998*
IVS 2				
34-2	A>G	SA	Exon 3 deletion	*Gouya et al. 2004*
Exon 3				
41	del A	FS	FS → Stop + 3	*Whatley et al. 2000*
53	del T	FS	FS → Stop + 2	*Surin et al. 2001*
64	C>T	MS	R22C	*Ong et al. 1998*
66	C>G	SD	Exon 3 deletion	*Llewellin et al. 1996*
70	G>A	MS	G24S	*Rosipal et al. 1997*
72	G>A	MS	G24D	*Luchinina et al. 2005*
76	C>T	MS	R26C	*Kauppinen et al. 1995*
77	G>A	MS	R26H	*Llewellyn et al. 1993*
83	G>A	MS	S28N	*Puy et al. 1997*
86	A>T	MS	Exon 3 deletion	*Mustajoki et al. 1998*
IVS 3				
87+1	G>A	SD	Exon 3 deletion	*Lundin et al.1995*
87+2	T>G	SD	Exon 3 deletion?	*Schneider-Yin et al. 2006*
87+5	G>T	SD	Exon 3 deletion?	*Luchinina et al. 2005*
88-2	A>G	SA	Exon 4 deletion	*Floderus et al. 2002*
Exon 4				
88	C>A	SA	Exon 4 deletion	*Gouya et al. 2004*
91	G>A	MS	A31T	*Gu et al. 1994*
91	G>C	MS	A31P	*Whatley et al. 1999*
92	C>T	MS	A31V	*Luchinina et al. 2005*
97	del A	FS	FS → Stop + 10	*Kauppinen et al. 1995*
100	C>A	MS	Q34K	*Mgone et al. 1992*
100	C>T	MS	Q34X	*Kauppinen et al. 1995*
101	A>C	MS	Q34P	*De Siervi et al. 1999a*
101	A>G	MS	Q34R	*Gouya et al. 2004*

104	C>T	MS	T35M	*De Siervi et al. 2000*
108-109	ins T	FS	FS → Stop + 16	*Solis et al. 1999*
125	T>A	NS	L42X	*Puy et al. 1996*
125	T>C	MS	L42S	*Whatley et al. 1999*
134	C>A	NS	S45X	*Martinez di Montemuros et al. 2000*
138	C>A	NS	Y46X	*Gregor et al. 2002*
148	C>T	NS	Q50X	*Floderus et al. 2002*
158-159	ins A	FS	FS → Stop + 12	*Rosipal et al. 1997*
IVS 4				
160+1	G>T	SD	Exon 4 deletion	*Puy et al. 1997*
160+1	G>A	SD	Exon 4 deletion	*Whatley et al. 1999*
161-6	C>G	SD	Exon 5 deletion	*Whatley et al. 1999*
161-3_5	del CTC	SA	Exon 5 deletion?	*Schneider-Yin et al. 2006*
161-2	A>C	SA	Exon 5 deletion	*Whatley et al. 1999*
161-1	G>C	SA	Exon 5 deletion	*Petersen et al. 1998*
Exon 5				
163	G>T	MS	A55S	*Gu et al. 1994*
168-169	del GT	FS	FS → Stop + 8	*Schreiber et al. 1995a*
174	del C	FS	FS → Stop + 40	*Gu et al. 1994*
178-179	ins G	FS	FS → Stop + 5	*Gouya et al. 2004*
180	ins Alu (333 bp)	FS	FS → Stop + 18	*Mustajoki et al. 1999*
181	G>A	MS	D61N	*Whatley et al. 1999*
181	G>T	MS	D61Y	*Gregor et al. 2002*
181	G>C	MS	D61H	*Brasch et al. 2004*
181	del G	FS	FS → Stop + 37	*Di Pierro et al.2005*
182	ins G	FS	FS → Stop + 5	*Gu et al. 1994*
182	del A	FS	FS → Stop + 36	*Martinez di Montemuros et al. 2000*
182	ins GA	FS	FS → Stop + 37	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
184-185	del AA	FS	FS → Stop + 3	*Whatley et al. 1999*
202-203	del CT	FS	FS → Stop + 2	*Luchinina et al. 2005*
206-207	del CT	NS	S69X	*Puy et al. 1997*
207	del T	FS	FS → Stop + 28	*Floderus et al. 2002*
207-208	ins T	FS	FS → Stop + 1	*Gouya et al. 2004*
210	G>A	SD	Exon 5 deletion?	*Floderus et al. 2002*
IVS 5				
210+1	G>A	SD	Exon 5 deletion	*Gu et al. 1994*
210+(2-3)	ins G	SD	Exon 5 deletion	*Puy et al. 1997*
210+2	T>C	SD	Exon 5 deletion	*Whatley et al. 1999*
211-1	G>A	SA	Exon 6 deletion	*Di Pierro et al. 2005*
211-1	G>C	SA	Exon 6 deletion	*Surin et al. 2001*
Exon 6				
215-216	del GA	FS	FS → Stop + 10	*Gross et al. 1999*
218-219	del AG	FS	FS → Stop + 9	*Gu et al. 1994*
232	A>C	MS	T78P	*Ramdall et al. 2000*
239	A>G	MS	E80G	*Ramdall et al. 2000*
242	T>C	MS	L81P	*Hesslels et al. 2004*
254	T>G	MS	L85R	*Whatley et al. 1999*
257	A>T	MS	E86V	*Floderus et al. 2002*
IVS 6				
266+1	G>C	SD	Exon 6 deletion	*Lundin et al. 1997*

267-61	del 8 bp	SD	Exon 7 deletion?	*Brasch et al. 2004*
Exon 7				
269	T>G	MS	V90G	*Whatley et al. 1999*
275	T>C	MS	L92P	*Floderus et al. 2002*
277	G>T	MS	V93F	*Chen et al. 1994*
278	T>A	MS	V93D	*Luchinina et al. 2005*
278-280	del TTG	IFD	del V93	*Gregor et al. 2002*
287	C>T	MS	S96F	*De Rooij et al. 1995*
291	del G	FS	FS → stop + 37	*Puy et al. 1997*
293	A>G	MS	K98R	*Kauppinen et al. 1995*
295	G>C	MS	D99H	*De Rooij et al. 1995*
295	G>A	MS	D99N	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
296	A>G	MS	D99G	*Floderus et al. 2002*
308-309	del TG	FS	FS → stop + 18	*Martinez di Montemuros et al. 2000*
314-315	ins C	FS	FS → stop + 15	*Schreiber et al. 1995a*
315	del T	FS	FS → stop + 15	*Gregor et al. 2002*
323-324	ins T	FS	FS → stop + 13	*Whatley et al. 1999*
331	G>A	MS	G111R	*Gu et al. 1993a*
335	C>A	MS	A112D	*Luchinina et al. 2005*
338	T>C	MS	I113T	*Floderus et al. 2002*
339-340	ins T	FS	FS → stop + 7	*Solis et al. 2004*
340-341	ins T	FS	FS → stop + 7	*Whatley et al. 1999*
342	C>A	NS	C114X	*Puy et al. 1997*
IVS 7				
344+1	G>A	SD	Exon 7 deletion	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
344+1	G>C	SD	Exon 7 deletion	*Cappellini et al. 2002*
344+2	T>C	SD	Insertion 15 bp	*Martinez di Montemuros et al. 2000*
344+(2-5)	del TAAG	SD	Exon 7 deletion	*Surin et al. 2001*
344+33	G>T	SD	Exon 7 deletion	*Whatley et al. 1999*
345-2	A>G	SA	Exon 8 deletion	*Floderus et al. 2002*
345-1	G>C	SA	Exon 8 deletion	*Brasch et al. 2004*
345-1	G>A	SA	Exon 8 deletion	*Schreiber et al. 1994a*
Exon 8				
346	C>T	MS	R116W	*Gu et al. 1993*
347	G>A	MS	R116Q	*Mgone et al. 1994*
356	C>T	MS	P119L	*Lundin et al. 1995*
361	G>T	MS	D121Y	*Schneider-Yin et al. 2006*
371	T>A	MS	V124D	*Puy et al. 1997*
415	G>T	NS	E139X	*Luchinina et al. 2005*
416-417	ins CA	FS	FS → stop + 116	*Mustajoki et al. 1998*
422	del G	SD	Exon 8 deletion	*Whatley et al. 1999*
IVS 8				
422+1	G>T	SD	Exon 8 deletion	*Lundin et al.1995*
423-1	G>A	SA	Deletion 15 bp Exon 9?	*Luchinina et al. 2005*
423-1	G>T	SA	Deletion 15 bp Exon 9	*De Siervi et al. 1999*
Exon 9				
445	C>T	NS	R149X	*Kauppinen et al. 1995*
446	G>A	MS	R149Q	*Delfau et al. 1991*
446	G>T	MS	R149L	*Gu et al. 1994*
453-455	del AGC	IFD	Deletion A152	*De Siervi et al. 1999*
463	C>T	NS	Q155X	*Scobie et al. 1990a*

469-470	del AA	FS	FS → stop + 52	*Di Pierro et al. 2004a*
470-471	ins A	FS	FS → stop + 53	*Schreiber et al. 1994*
489-490	ins TCCT	FS	FS → stop + 1	*Whatley et al. 1999*
IVS 9				
498+1	G>A	SD	Exon 9 deletion	*Nielsen 1997*
498+15	G>T	SD	Exon 9 deletion	*Brasch et al. 2004*
498+22	G>A	SD	?	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
499-13	del 14 ins 3	SD	Exon 10 deletion	*Brasch et al. 2004*
499-1	G>A	SA	Exon 10 deletion	*Lundin et al. 1994*
Exon 10				
499	C>T	MS	R167W	*Gu et al. 1992*
500	G>A	MS	R167Q	*Delfau et al. 1990*
500	del G	FS	FS → stop + 98	*Puy et al. 1997*
503-504	ins A	FS	FS → stop + 40	*Schuurmans et al. 2001*
508-510	del CTC	IFD	del L170	*Schuurmans et al. 2001*
517	del 17 bp	FS	FS → stop + 30	*Puy et al. 1997*
517	C>T	MS	R173W	*Lee 1991*
518	G>A	MS	R173Q	*Delfau et al. 1990*
530	T>G	MS	L177R	*Mgone et al. 1992*
532	G>A	MS	D178N	*Puy et al. 1997*
541	C>T	NS	Q181X	*Whatley et al. 1999*
552	del T	FS	FS → stop + 5	*Gregor et al. 2002*
569	C>T	MS	T190I	*Schuurmans et al. 2001*
576-595	del 19 bp	FS	FS → stop + 58	*Puy et al. 1997*
580	C>T	NS	Q194X	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
583	C>T	MS	R195C	*Kauppien et al. 1995*
593	G>A	NS	W198X	*Lee and Anvret 1991*
600	del C	FS	FS → stop + 55	*Luchinina et al. 2005*
601	C>T	MS	R201W	*Lundin et al. 1994*
604	G>T	MS	V202F	*Gross et al. 1999*
604	del G	FS	FS → stop + 53	*Schreiber et al. 1994*
609-610	ins G	FS	FS → stop + 5	*Schneider-Yin et al. 2006*
610	C>A	MS	Q204K	*Hrdinka et al. 2005*
610	C>T	NS	Q204X	*Mgone et al. 1994*
612	G>T	SD	Deletion 9 bp exon 10	*Delfau et al. 1991*
IVS 10				
612+2	T>C	SD	Exon 10 deletion	*Puy et al. 1997*
612+2	inv TAGGG >CCCTA	SD	Exon 10 deletion	*Petersen et al. 1998*
613-1	G>A	SA	Exon 11 deletion	*Gouya et al. 2004*
613-1	G>T	SA	Exon 11 deletion	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
Exon 11				
623	del C	FS	FS → stop + 47	*Lam et al. 2001*
625	G>A	MS	E209K	*Puy et al. 1997*
629	del A	FS	FS → stop + 45	*Lee et al. 1995*
634	A>G	MS	M212V	*Solis-Villa et al. 1997*
639	T>G	NS	Y213X	*Puy et al. 1997*
647	G>A	MS	G216D	*Lundin et al. 1997*
646-647	ins A	FS	FS → stop + 51	*Luchinina et al. 2005*
650	A>G	MS	Q217R	*Schneider-Yin et al. 2006*
650	A>T	MS	Q217L	*Schneider-Yin et al. 2000*
651	G>T	MS	Q217H	*Puy et al. 1997*

IVS 11				
651+1	G>C	SD	Exon 11 retention	*Petersen et al. 1998*
651+2	T>C	SD	Exon 11 retention	*Whatley et al. 1999*
652-5_4	del ins AT>TC	SA	?	*Luchinina et al. 2005*
652-3	C>G	SA	Exon 12 deletion	*Llewellyn et al. 1996*
652-2	A>G	SA	Exon 12 deletion	*Petersen et al. 1998*
652-2	A>C	SA	Exon 12 deletion	*Bor et al. 2003*
652-2	del A	SA	Exon 12 deletion	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
652-1	del G	SA	Exon 12 deletion	*Puy et al. 1997*
652-1	G>C	SA	Exon 12 deletion	*Puy et al. 1997*
Exon 12				
654-655	ins G	FS	FS → stop + 33	*Di Pierro et al. 2004b*
656	C>A	MS	A219D	*Whatley et al. 1999*
664	G>A	MS	V222M	*Mustajoki et al. 1998*
665-666	ins A	FS	FS → stop + 28	*De Siervi et al. 1999a*
666-667	del GG	FS	FS → stop + 28	*De Siervi et al. 1997*
667	G>A	MS	E223K	*Gu et al. 1994*
669-698	del 30 bp	IFD	Deletion 11 aa	*Guillen-Navarro et al. 2004*
673	C>G	MS	R225G	*Kauppinen et al. 1995*
673	C>T	NS	R225X	*Kauppinen et al. 1995*
674	G>A	MS	R225Q	*Floderus et al. 2002*
675	del A	FS	FS → stop + 41	*Hrdinka et al. 2005*
680-681	ins AA	FS	FS → stop + 28	*Whatley et al. 1999*
691-721	del 30 bp	IFD	del AK 231-241	*Puy et al. 1997*
706	G>A	MS	G236S	*Gouya et al. 2004*
713	T>G	MS	L238R	*Kauppinen et al. 1995*
715-716	del CA	FS	FS → stop + 9	*Puy et al. 1996*
716	ins C	FS	FS → stop + 10	*Puy et al. 1997*
721	C>T	MS	P241S	*Schuurmans et al. 2001*
723	dupl 21bp	IFI	Repeat 7 aa	*Puy et al. 1997*
723	del C	FS	FS → stop + 13	*Whatley et al. 1999*
728	del C	FS	FS → stop + 12	*De Siervi et al. 1997*
728-729	del CT	FS	FS → stop + 6	*De Siervi et al. 1999a*
730-731	del CT	FS	FS → stop + 6	*Mgone et al. 1993*
731	T>C	MS	L244P	*Gouya et al. 2004*
731-732	ins T	FS	FS → stop + 6	Schneider-Yin et al. 2006
734	T>G	MS	L245R	*Delfau et al. 1991*
739	T>C	MS	C247R	*Mgone et al. 1993*
740	G>T	MS	C247F	*Chen et al. 1994*
741-742	ins 13 bp	FS	FS → stop + 7	*Gouya et al. 2004*
742-743	ins TTCGCTGC	FS	FS → stop + 10	*Gu et al. 1994*
744-751	del CGCTGAAA	FS	FS → stop + 40	*Bor et al. 2003*
748	G>C	MS	E250Q	*Lundin et al. 1995*
748	G>A	MS	E250K	*Gu et al. 1994*
748-749	ins CATCGCTG	FS	FS → stop + 7	*Whatley et al. 1999*
749	A>T	MS	E250V	*Puy et al. 1997*
749	A>C	MS	E250A	*Puy et al. 1997*
749	del A	FS	FS → stop + 12	*Gouya et al. 2004*
754	G>A	MS	A252T	*Mgone et al. 1993*
754	G>C	MS	A252P	*Nissen et al. 1997*

755	C>T	MS	A252V	*Mgone et al. 1993*
766	C>T	MS	H256Y	*Puy et al. 1997*
766	C>A	MS	H256N	*Mgone et al. 1992*
770	T>C	MS+FS	L257P + Exon11/12 del.	*Pischik et al. 2005*
771-772	ins T	FS	FS → stop + 33	*Ong et al. 1996*
771	G>A	SD	Exon 12 deletion	*Grandchamp et al. 1989*
771	G>C	SD	Exon 12 deletion	*Diamon et al. 1993*
IVS 12				
771+1	G>C	SD	Exon 12 deletion	*De Siervi et al. 1999a*
771+1	G>A	SD	Exon 12 deletion	*Puy et al. 1996*
771+1	G>T	SD	Exon 12 deletion	*Rosipal et al. 1997*
771+2	T>C	SD	Exon 12 deletion	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
772-17	A>G	SA	?	*Luchinina et al. 2005*
772 - 2	A>G	SA	Exon 13 retention	*Mustajoki et al. 1998*
772-1	G>A	SA	Exon 13 deletion	*Puy et al. 1997*
Exon 13				
779	G>A	MS	G260D	*Floderus et al. 2002*
798-799	ins AGCC	FS	FS → stop + 24	*Whatley et al. 1999*
799	G>A	MS	V267M	*Rosipal et al. 1997*
806	C>T	MS	T269I	*Mgone et al. 1994*
809	C>A	MS	A270D	*Puy et al. 1997*
809	C>G	MS	A270G	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
815-818	del AGGA	FS	FS → stop + 6	*De Siervi et al. 1999a*
820	G>A	MS	G274R	*Mgone et al. 1994*
823	C>T	NS	Q275X	*Puy et al. 1997*
IVS 13				
825+1	G>C	SD	Exon 13 deletion	*Brasch et al. 2004*
825+1	G>A	SD	Exon 13 deletion	*Llewellin et al. 1996*
825+2	T>C	SD	Exon 13 deletion	*Brasch et al. 2004*
825+2	T>A	SD	Exon 13 deletion	*Gross et al. 1999*
852+2(+6)	T>G	SD	Exon 13 deletion?	*Luchinina et al. 2005*
825+5	G>C	SD	Deletion 2 aa Exon 13+FS	*Pischik et al. 2005*
825+3_6	del AAGT	SD	Exon 13 deletion	*Pischik et al. 2005*
826-2	A>G	SA	Intron 13 retention	*Mustajoki et al. 1998*
826-1	G>A	SA	Intron 13 retention	*Martinez di Montemuros et al. 2001*
Exon 14				
833	T>C	MS	L278P	*Mustajoki et al. 1998*
835-837	del ACT ins G	FS	FS → stop + 10	*Solis et al. 1999*
838	G>A	MS	G280R	*Kauppinen et al. 1995*
841-843	del GGA	IFD	G281 del	*De Siervi et al. 2000*
847-848	del TG	FS	FS → stop + 7	*Lundin et al. 1997*
848	G>A	NS	W283X	*Mgone et al. 1994*
849	G>A	NS	W283X	*Schreiber et al. 1995a*
854-855	del TA	FS	FS → stop + 4	*Puy et al. 1997*
863	C>A	NS	S288X	*Puy et al. 1997*
863	C>G	NS	S288X	*Petersen et al. 1998*
863	ins T	FS	FS → stop + 29	*Floderus et al. 2002*
866-869	del ATAG	FS	FS → stop + 26	*Whatley et al. 1999*
874	C>T	NS	Q292X	*Schneider-Yin et al. 2000*
886-887	ins A	FS	FS → stop + 10	*Gross et al. 1999*
886	C>T	NS	Q296X	*Kauppinen et al. 1995*

900-901	ins T	FS	FS → stop + 6	*Schreiber et al. 1995*
900	del T	FS	FS → stop + 15	*Delfau et al. 1991*
911	del A	FS	FS → stop + 13?	*Bor et al. 2003*
IVS 14				
912+1	G>A	SD	Exon 14 deletion	*Gu et al. 1993a*
912+1	G>T	SD	Exon 14 deletion	*Whatley et al. 1999*
912+2	T>C	SD	Exon 14 deletion?	*Luchinina et al. 2005*
913-2	A>G	SA	Exon 15 deletion	*Floderus et al. 2002*
Exon 15				
913-914	ins C	FS	FS → stop + 1	*Puy et al. 1996*
940	C>T	NS	Q314X	*Di Pierro et al. 2004*
948	del A	FS	FS → stop + 27	*De Siervi et al. 1999a*
950-951	ins G	FS	FS → stop + 5	*Flachsová et al. 2003*
962	G>A	MS	R321H	*Schuurmans et al. 2001*
965-966	ins A	FS	FS → stop + 36	*Hrdinka et al. 2005*
973	C>T	NS	R325X	*Petersen et al. 1996*
980-986	del CCCAGTT	FS	FS → stop + 14	*De Siervi et al. 1997*
982	del C	FS	FS → stop + 16	*Whatley et al. 1999*
982-983	del CA	FS	FS → stop + 30	*Maeda et al. 2000*
985-996	del 12 bp	IFD	329-332 deletion LAAQ	*De Siervi et al. 1999a*
986-987	ins T	FS	FS → stop + 30	*Petersen et al. 1998*
992-1123	del 131 bp	IFD	Deletion 31 aa	*Gregor et al. 2002*
1000-1018	del 19 bp	FS	FS → stop + 9	*Kauppinen et al. 2005*
1002	del G	FS	FS → stop + 8	*Ong et al. 1998*
1003	G>A	MS	G335S	*De Siervi et al. 1999a*
1004	G>A	MS	G335D	*Puy et al. 1997*
1004	del G	FS	FS → stop + 9	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
1013	T>G	MS	L338R	*Luchinina et al. 2005*
1024-...	del 67 bp	FS	?	*Luchinina et al. 2005*
1028	T>C	MS	L343P	*Floderus et al. 2002*
1029-1033	del GAGCA	FS	FS → stop + 13	*Luchinina et al. 2005*
1062-1063	ins C	FS	FS → stop + 4	*Daimon et al. 1994*
1067	del A	FS	?	*Brasch et al. 2004*
1067-1068	ins CGGCA	FS	FS → stop + 90	*Brasch et al. 2004*
1073	del A	FS	?	*Kauppinen et al. 1995*

Nucleotide positions are numbered according to human PBGD cDNA (ATG initiation codon for the housekeeping isoform is +1), Aminoacids a nucleotides – standard one letter abbreviations, SD – donor site splice defect, SA - acceptor site splice defect, NS - nonsense mutation, MS - missense mutation, FS - frameshift mutation, IFD - in-frame deletion, IFI - in-frame insertion, IVS – intervening sequence (intron), X – nonsense codon, ins – insertion, del – deletion, delins – deletion followed by insertion, inv - inversion, dupl - duplication, ? - predicted consequence/not tested

Tab. 13: *Mutace v genu pro PBGD u AIP pacientů slovanského původu.*

Position	Nucleotide change	Type of mutation	Mutation consequence	Country	Reference (first report)
Exon 1					
33	G>A	SD	IVS1 67 bp retent.	Russia	*Luchinina et al. 2005*
IVS 1					
33+5	G>A	SD	IVS1 67 bp retent.	Russia	*Luchinina et al. 2005*
Exon 3					
70	G>A	MS	G24S	Czech Rep.	*Rosipal et al. 1997*
72	G>A	MS	G24D	Russia	*Luchinina et al. 2005*
76	C>T	MS	R26C	Czech Rep., Russia	*Kauppinen et al. 1995*
77	G>A	MS	R26H	Czech Rep., Poland, Russia	*Llewellyn et al. 1993*
IVS 3					
87+2	T>G	SD	Exon 3 deletion?	Poland	*Schneider-Yin et al. 2006*
87+5	G>T	SD	Exon 3 deletion?	Poland, Russia	*Luchinina et al. 2005*
Exon 4					
92	C>T	MS	A31V	Russia	*Luchinina et al. 2005*
138	C>A	NS	Y46X	Poland	*Gregor et al. 2002*
158-159	ins A	FS	FS → Stop + 12	Czech Rep.	*Puy et al. 1997*
IVS 4					
161-3_5	del CTC	SA	Exon 5 deletion?	Poland	*Schn.-Yin et al. 2006*
Exon 5					
181	G>T	MS	D61Y	Poland	*Gregor et al. 2002*
202-203	del CT	FS	FS → Stop + 2	Russia	*Luchinina et al. 2005*
206-207	del CT	NS	S69X	Russia	*Puy et al. 1997*
210	G>A	SD	Exon 5 deletion?	Poland	*Floderus et al. 2002*
IVS 5					
211-1	G>C	SA	Exon 6 deletion	Russia	*Surin et al. 2001*
Exon 7					
278-280	del TTG	IFD	del V93	Poland	*Gregor et al. 2002*
315	del T	FS	FS → stop + 15	Poland	*Gregor et al. 2002*
331	G>A	MS	G111R	Czech Rep., Poland, Russia	*Gu et al. 1993a*
335	C>A	MS	A112D	Russia	*Luchinina et al. 2005*
IVS 7					
344+1	G>A	SD	Exon 7 deletion	Poland	*Rob.-Fraol et al. 2000*
344+(2-5)	del TAAG	SD	Exon 7 deletion	Russia	*Surin et al. 2001*
Exon 8					
415	G>T	NS	E139X	Russia	*Luchinina et al. 2005*
361	G>T	MS	D121Y	Poland	*Schn.-Yin et al. 2006*
IVS 8					
423-1	G>A	SA	Del. 15 bp Ex9	Russia	*Luchinina et al. 2005*
Exon 9					
445	C>T	NS	R149X	Poland, Russia	*Kauppinen et al. 1995*
Exon 10					
499	C>T	MS	R167W	Russia	*Gu et al. 1992*
517	C>T	MS	R173W	Russia	*Leet 1991*
518	G>A	MS	R173Q	Czech Rep., Poland	*Delfau et al. 1990*
552	del T	FS	FS → stop + 5	Poland	*Gregor et al. 2002*
583	C>T	MS	R195C	Russia	*Kauppien et al. 1995*

600	del C	FS	FS → stop + 55	Russia	*Luchinina et al. 2005*
609-610	ins G	FS	FS → stop + 5	Poland	*Schn.-Yin et al. 2006*
610	C>T	NS	Q204X	Russia	*Mgone et al. 1994*
610	C>A	MS	Q204K	Czech Rep.	*Hrdinka et al. 2005*
Exon 11					
647	G>A	MS	G216D	Russia	*Lundin et al. 1997*
646-647	ins A	FS	FS → stop + 51	Russia	*Luchinina et al. 2005*
650	A>G	MS	Q217R	Poland	*Schn.-Yin et al. 2006*
IVS 11					
652-1	G>C	SA	Exon 12 deletion	Russia	*Puy et al. 1997*
652-5_4	delins AT>TC	SA	?	Russia	*Luchinina et al. 2005*
Exon 12					
673	C>T	NS	R225X	Poland, Russia	*Kauppinen et al. 1995*
675	del A	FS	FS → stop + 41	Czech Rep.	*Hrdinka et al. 2005*
730-731	del CT	FS	FS → stop + 6	Poland	*Mgone et al. 1993*
731-732	ins T	FS	FS → stop + 6	Poland	Schn.-Yin et al. 2006
739	T>C	MS	C247R	Russia	*Mgone et al. 1993*
748	G>C	MS	E250Q	Russia	*Lundin et al. 1995*
770	T>C	MS+FS	L257P+del E11/12	Russia	*Pischik et al. 2005*
IVS 12					
771+1	G>T	SD	Exon 12 deletion	Czech Rep., Russia	*Rosipal et al. 1997*
771+1	G>C	SD	Exon 12 deletion	Russia	*De Siervi et al. 1999a*
771+2	T>C	SD	Exon 12 deletion	Poland	*Martinez di Mont. et al. 2001*
772-17	A>G	SA	?	Russia	*Luchinina et al. 2005*
Exon 13					
799	G>A	MS	V267M	Czech Rep.	*Rosipal et al. 1997*
IVS 13					
825+1	G>A	SD	Exon 13 deletion	Russia	*Llewellin et al. 1996*
825+2	T>A	SD	Exon 13 deletion	Russia	*Gross et al. 1999*
825+3_6	del AAGT	SD	Exon 13 deletion	Poland, Russia	*Pischik et al. 2005*
825+5	G>C	SD	Del 2 aa E13+FS	Russia	*Pischik et al. 2005*
852+2(+6)	T>G	SD	Exon 13 deletion?	Russia	*Luchinina et al. 2005*
IVS 14					
912+2	T>C	SD	Exon 14 deletion?	Russia	*Luchinina et al. 2005*
Exon 15					
1013	T>G	MS	L338R	Russia	*Luchinina et al. 2005*
1024-...	del 67 bp	FS	?	Russia	*Luchinina et al. 2005*
1029-1033	del GAGCA	FS	FS → stop + 13	Russia	*Luchinina et al. 2005*
965-966	ins A	FS	FS → stop + 36	Czech Rep.	*Hrdinka et al. 2005*
982-983	del CA	FS	FS → stop + 30	Poland	*Maeda et al. 2000*
992-1123	del 131 bp	IFD	Deletion 31 aa	Poland	*Gregor et al. 2002*

Nucleotide positions are numbered according to human PBGD cDNA (ATG initiation codon for the housekeeping isoform is +1), Aminoacids a nucleotides – standard one letter abbreviations, SD – donor site splice defect, SA - acceptor site splice defect, NS - nonsense mutation, MS - missense mutation, FS - frameshift mutation, IFD - in-frame deletion, IFI - in-frame insertion, IVS – intervening sequence (intron), X – nonsense codon, ins – insertion, del – deletion, delins – deletion followed by insertion, inv - inversion, dupl - duplication, ? - predicted consequence/not tested

Tab. 14: *Polymorfismy a varianty genu pro PBGD.*

Nucleotide change	Screening method	Population studied	Frequency reported	No. studied	References
Promoter					
-235 A>T	Sequencing	Swedish	A: 0,67, T: 0,33	33	*Lundin and Anvret 1997*
		Caucasians	A: 0,65; T: 0,35	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	A: 0,75; T: 0,25	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	A: 0,67, T: 0,33	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
5'UTR					
-64 C>T	RFLP	Euro. Caucasians	C: 0,63; T: 0,37	35	*Picat et al. 1991*
	(ApaI)	Canadians	C: 0,52; T: 0,48	100	*Schreiber et al. 1992*
		Caucasians	C: 0,63; T: 0,37	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	C: 0,63; T: 0,37	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	C: 0,71; T: 0,29	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
IVS 1					
245 G>A	RFLP	Euro. Caucasians	G: 0,53; A: 0,47	20	*Llewellin et al. 1987*
	(MspI)	Finnish	G: 0,41; A: 0,59	66	*Kauppinen et al. 1990*
		European	G: 0,54; A: 0,46	96	*Scobie et al. 1990*
		Swedish	G: 0,6; A: 0,4	98	*Lee et al. 1991*
		N.A Caucasians	G: 0,58; A: 0,42	104	*Yoo et al. 1993*
		Caucasians	G: 0,58; A: 0,42	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	G: 0,53; A: 0,47	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	G: 0,64; A: 0,36	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
400 T>C	RFLP	European	T: 0,58; C: 0,42	37	*Lee and Anvret 1987*
	(PstI)	European	T: 0,55; C: 0,45	137	*Scobie et al. 1990*
		Finnish	T: 0,74; C: 0,26	66	*Kauppinen et al. 1990*
		Swedish	T: 0,60; C: 0,40	98	*Lee et al. 1991*
		N.A. Caucasians	T: 0,62; C: 0,38	106	*Yoo et al. 1993*
		Caucasians	T: 0,62; C: 0,38	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	T: 0,65; C: 0,35	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	T: 0,68; C: 0,32	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
1277 C>A	RFLP	Swedish	C: 0,60; A: 0,40	98	*Lee et al. 1991*
	(ApaLI)	N.A. Caucasians	C: 0,54; A: 0,46	100	*Yoo et al. 1993*
		Caucasians	C: 0,54; A: 0,46	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	C: 0,55; A: 0,45	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	C: 0,59; A: 0,41	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
2478 A>G	RFLP	Finnish	A: 0,25; G: 0,75	66	*Kauppinen et al. 1990*
	(BstNI)	European	A: 0,53; G: 0,47	100	*Scobie et al. 1990*
		Swedish	A: 0,55; G: 0,45	34	*Lee et al. 1991*
		N.A. Caucasians	A: 0,62; G: 0,38	104	*Yoo et al. 1993*
		Caucasians	A: 0,62; G: 0,38	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	A: 0,62; G: 0,38	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*

		Africans	A: 0,66; G: 0,34	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
IVS 2					
3119 G>T	DGGE	Japanese	G: 0,95; T: 0,05	31	*Daimon et al. 1993a*
		Caucasians	G: 0,95; T: 0,05	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	G: 0,97; T: 0,03	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	G: 0,97; T: 0,03	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
3167 del G	DGGE	Caucasians	G: 1,0; delG: 0,0	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	G: 0,83; delG: 0,17	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	G: 0,91; delG: 0,09	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
IVS 3					
3581 A>G	RFLP (BsmAI)	Japanese	A: 0,21; G: 0,79	31	*Daimon et al. 1993*
		N.A. Caucasians	A: 0,59; G: 0,41	100	*Yoo et al. 1993*
		Argentinean	A: 0,56; G: 0,44	64	*De Siervi et al. 1999a*
		Caucasians	A: 0,75; G: 0,25	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	A: 0,79; G: 0,21	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	A: 0,85; G: 0,15	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
Exon 4					
3615 C>T	DGGE	French	?		*Puy et al. 1997*
IVS 4					
3982	RFLP (HhaI)	British	T: 0,58; C: 0,42	20	*Whatley et al. 1999*
		Caucasians	T: 0,58; C: 0,42	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	T: 0,60; C: 0,40	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	T: 0,67; C: 0,33	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
Exon 7					
4679 C>T	Sequencing	German	?		*Brasch et al. 2004*
Exon 10					
6479 G>T	DGGE	Euro. Caucasians	G: 0,65; T: 0,35	43	*Gu et al. 1991*
		N.A Caucasians	G: 0,69; T: 0,31	100	*Yoo et al. 1993*
		Argentinean	G: 0,81; T: 0,19	74	*De Siervi et al. 1999a*
		Caucasians	G: 0,69; T: 0,31	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	G: 0,76; T: 0,24	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	G: 0,70; T: 0,30	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		German	G: 0,73; T: 0,27	22	*Brasch et al. 2004*
IVS 10					
6589 A>G	Sequencing	German	?		*Brasch et al. 2004*
6761 A>G	Sequencing	German	?		*Brasch et al. 2004*
7052 A>G	DGGE	Caucasians	A: 1; G: 0	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	A: 0,6; G: 0,4	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	A: 0,54; G: 0,46	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
7064 C>A	RFLP (HinfI)	N.A Caucasians	C: 0,75; A: 0,25	92	*Yoo et al. 1993*
		Chinese	C: 0,5; A: 0,5	50	*Lam et al. 2001*
		Caucasians	C: 0,75; A: 0,25	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*

		Afro-Caribbeans	C: 0,69; A: 0,31	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	C: 0,70; A: 0,30	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
IVS 12					
7539 C>T	Sequencing	British	C: 0,87; T: 0,13	19	*Whatley et al. 1999*
		Caucasians	C: 0,87; T: 0,13	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	C: 0,94; T: 0,06	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	C: 0,98; T: 0,02	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
IVS 14					
7998 G>A	RFLP	N.A Caucasians	G: 0,97; A: 0,03	96	*Yoo et al. 1993*
	(MnLI)	Caucasians	G: 0,97; A: 0,03	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	G: 0,94; A: 0,06	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	G: 0,95; A: 0,05	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
8003 G>A	Sequencing	Chinese	G: 0,99; A: 0,01	50	*Lam et al. 2001*
3′ UTR					
8578 G>A	RFLP	Chinese	G: 0,64; A: 0,36	48	*Law et al. 1999*
	(BsrI)	Caucasians	G: 0,65; A: 0,35	78	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Afro-Caribbeans	G: 0,65; A: 0,35	30	*Robreau-Fraolini et al. 2000*
		Africans	G: 0,58; A: 0,42	68	*Robreau-Fraolini et al. 2000*

Position of nucleotide change is numbered relative to the translation initiation codon in Exon 1 in genomic DNA sequence (i.e. A in ATG initiation codon is +1), Nucleotides – standard one letter abbreviations, DGGE – Denaturating Gradient Gel Electrophoresis, RFLP – Restriction Fragments Gel Polymorphysm, IVS – intervening sequence (intron), UTR – Untranslated Region, in parenthes – name of restriction enzyme, N. A Caucasians – North American Caucasians, Euro. Caucasians – European Caucasians, ? – not tested/data not available

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abraham NG (1991): Molecular regulation-biological role of heme in hematopoiesis. Blood Rev, 5:19-28.

Anderson KE and Kormos-Hallberg C (2003): Tin mesoporphyrin potentiation of heme therapy: A dose-ranging study in asymptomatic porphyria. Physiol Res, 52:1S.

Andersson C and Lithner F (1994): Hypertension and renal disease in patients with acute intermittent porphyria. J Intern Med, 236:169-175.

Andersson C, Bjersing L, and Lithner F (1996): The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. J Intern Med, 240:195-201.

Andersson C, Wikberg A, Stegmayr B, and Lithner F (2000): Renal symptomatology in patients with acute intermittent porphyria. A population-based study. J Intern Med, 248:319-325.

Beri R and Chandra R (1993): Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. Drug Metab Rev, 25:49-152.

Berk P (1998): The Porphyrias. Sem Liver Dis 18, 1-101.

Beukeveld GJ, Wolthers BG, Nordmann Y, Deybach JC, Grandchamp B, and Wadman SK (1990): A retrospective study of a patient with homozygous form of acute intermittent porphyria. J Inherit Metab Dis, 13:673-683.

Beukeveld GJJ (1995): Clinical relevance of porphyrin determinations in porphyria. Chapter 1. University Groningen.

Bishop DF (1990): Two different genes encode delta-aminolevulinate synthase in humans: nucleotide sequences of cDNAs for the housekeeping and erythroid genes. Nucleic Acids Res, 18:7187-7188.

Blake D, Poulos V, and Rossi R (1992): Diagnosis of Porphyria - Recommended Methods for Peripheral Laboratories. Clin Biochem Revs, 13:1-24.

Bonkovsky HL (1993): Advances in understanding and treating 'the little imitator,' acute porphyria. Gastroenterology, 105:590-594.

Bor M, Balogh K, Berkes E, Szekely E, Pusztai A, Tasnadi G, and Hunyady L (2003): Genetic screening of acute intermittent porphyria in Hungary: an update. Physiol Res, 52:3S.

Brons-Poulsen J, Christiansen L, Petersen NE, Horder M, and Kristiansen K (2005): Characterization of two isoalleles and three mutations in both isoforms of purified recombinant human porphobilinogen deaminase. Scand J Clin Lab Invest, 65:93-105.

Brownlie PD, Lambert R, Louie GV, Jordan PM, Blundell TL, Warren MJ, Warren MJ, Cooper JB, and Wood SP (1994): The three-dimensional structures of mutants of porphobilinogen deaminase: toward an understanding of the structural basis of acute intermittent porphyria. Protein Sci, 3:1644-1650.

Cappellini MD, Martinez di Montemuros F, Di Pierro E, and Fiorelli G (2002): Hematologically important mutations: acute intermittent porphyria. Blood Cells Mol Dis, 28:5-12.

Cox TC, Bawden MJ, Martin A, and May BK (1991): Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. EMBO J , 10:1891-1902.

Cox TM, Alexander GJ, and Sarkany RP (1998): Protoporphyria. Semin Liver Dis, 18:85-93.

Daimon M, Morita Y, Yamatani K, Igarashi M, Fukase N, Ohnuma H, Sugiyama K, Ogawa A, Manaka H, and Tominaga M (1993): Two new polymorphisms in introns 2 and 3 of the human porphobilinogen deaminase gene. Hum Genet, 92:115-116.

Daimon M, Yamatani K, Igarashi M, Fukase N, Morita Y, Ogawa A, Tominaga M, and Sasaki H (1994): Acute intermittent porphyria caused by a single base insertion of C in

exon 15 of the porphobilinogen deaminase gene that results in a frame shift and premature stopping of translation. Human Genetics, 93:533-537.

Daimon M, Yamatani K, Igarashi M, Fukase N, Ogawa A, Tominaga M, and Sasaki H (1993): Acute intermittent porphyria caused by a G to C mutation in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene that results in exon skipping. Human Genetics, 92:549-553.

Dalle Carbonare M and Pathak MA (1992): Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. J Photochem Photobiol B, 14:105-124.

de Rooij F, Voortman G, and de Baar E (1995): Frequency and distribution of mutations in the gene of porphobilinogen deaminase in Dutch acute intermittent porphyria patients. Scand J Clin Lab Invest, 55:223.

De Siervi A, Glass IA, Rossetti MV, Xu W, Astrin KH, Battle A, and Desnick RJ (1997): Identification of nine new mutations and acommon missense mutation in the HMB Synthase gene in Argentinean patients with acute intermittent porphyria. Acta Haematologica, 98:105.

De Siervi A, Mendez M, Parera VE, Varela L, Batlle AM, and Rossetti MV (1999): Acute intermittent porphyria: characterization of two novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene, one amino acid deletion (453-455delAGC) and one splicing aceptor site mutation (IVS8-1G>T). Hum Mutat, 14:355.

De Siervi A, Rossetti MV, Parera VE, Astrin KH, Aizencang GI, Glass IA, Batlle AM, and Desnick RJ (1999a): Identification and characterization of hydroxymethylbilane synthase mutations causing acute intermittent porphyria: evidence for an ancestral founder of the common G111R mutation . Am J Med Genet, 86:366-375.

De Siervi A, Rossetti MV, Parera VE, Mendez M, Varela LS, and del C Batlle AM (1999b): Acute intermittent porphyria: biochemical and clinical analysis in the Argentinean population. Clin Chim Acta, 288:63-71.

De Siervi A, Weiss Cadiz DE, Parera VE, del C Batlle AM, and Rossetti MV (2000): Identification and characterization of two novel mutations that produce acute

intermittent porphyria: A 3-base deletion (841-843delGGA) and a missense mutation (T35M). Hum Mutat , 16:373-378.

Delfau MH, Picat C, de Rooij F, Voortman G, Deybach JC, Nordmann Y, and Grandchamp B (1991): Molecular heterogeneity of acute intermittent porphyria: identification of four additional mutations resulting in the CRIM-negative subtype of the disease. Am J Hum Genet, 49:421-428.

Delfau MH, Picat C, de Rooij FW, Hamer K, Bogard M, Wilson JH, Deybach JC, Nordmann Y, and Grandchamp B (1990): Two different point G to A mutations in exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene are responsible for acute intermittent porphyria. J Clin Invest, 86:1511-1516.

DeLoskey RJ and Beattie DS (1984): The effects of insulin and glucose on the induction and intracellular translocation of delta-aminolevulinic acid synthase. Arch Biochem Biophys , 233:64-71.

Desnick RJ and Astrin KH (2002): Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment. Br J Haematol, 117:779-795.

Desnick RJ, Glass IA, Xu W, Solis C, and Astrin KH (1998): Molecular genetics of congenital erythropoietic porphyria. Semin Liver Dis, 18:77-84.

Deybach JC and Puy H (2003): Acute Intermittent Porphyria: From Clinical to Molecular Aspects. 14:23-42. The Porphyrin Handbook. Kadish KM, Smith KM and Guilard R. Elsevier, New York.

Di Pierro E, Brancaleoni V, and Cappellini MD (2005): Gene symbol: HMBS. Disease: Porphyria, acute intermittent. Hum Genet, 116:537.

Di Pierro E, Roselli EA, and Cappellini MD (2004): Gene Symbol: HBMS, Disease: Porphyria, Acute intermittent. Hum Genet, 114:607.

Doss MO, Kuhnel A, and Gross U (2000): Alcohol and porphyrin metabolism. Alcohol and Alcoholism, 35:109-125.

Edixhoven-Bosdijk A, de Rooij FW, de Baar-Heesakkers E and Wilson JH (2002): Residual activity of human porphobilinogen deaminase with R167Q or R167W mutations: an explanation for survival of homozygous and compound heterozygous acute intermittent porphyrics. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 48:861-866.

Elder GH (1998): Genetic Defects in the Porphyrias: Types and Significance. Clinics in Dermatology, 16:225-233.

Elder GH, Hift RJ, and Meissner PN (1997): The acute porphyrias. Lancet, 349:1613-1617.

Erlandsen EJ, Jorgensen PE, Markussen S, and Brock A (2000): Determination of porphobilinogen deaminase activity in human erythrocytes: pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurements . Scand J Clin Lab Invest, 60:617-624.

Flachsova E, Verma IC, Z, Zeman J, Raman CS, and Martasek P (2003): Novel mutation in porphobilinogen deaminase gene in a family with acute intermittent porphyria from Nepal. Physiol Res, 52:8S.

Floderus Y, Shoolingin-Jordan PM, and Harper P (2002): Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene. Clin Genet, 62:288-297.

Fodde R and Losekoot M (1994): Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Hum Mutat, 3:83-94.

Ford RE, Ou CN, and Ellefson D (1980): Assay for Erythrocyte Uroporphyrinogen I Synthase Activity, with Porphobilinogen as Substrate. Clin Chem, 26:1182-1185.

Fujita H (1997): Molecular mechanism of heme biosynthesis. Tohoku J Exp Med, 183:83-99.

Goldberg A (1998): Historical Perspective. Clinics in Dermatology, 16:189-193.

Gonzalez FJ (1988): The molecular biology of cytochrome P450s. Pharmacol Rev, 40:243-288.

Gorchein A (1997): Drug treatment in acute porphyria. Br J Clin Pharmacol, 44:427-434.

Gouya L, Puy H, Robreau AM, Lyoumi S, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, and Deybach JC (2004): Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. Hum Genet, 114:256-252.

Grandchamp B (1998): Acute intermittent porphyria. Semin Liver Dis, 18:17-24.

Grandchamp B, de Verneuil H, Beaumont C, Chretien S, Walter O, and Nordmann Y (1987): Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase. Two isoenzymes from a single gene. Eur J Biochem, 162:105-110.

Grandchamp B, Picat C, de Rooij FW, Beaumont C, Wilson JH, Deybach JC, and Nordmann Y (1989): A point mutation G-A in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene results in exon skipping and is responsible for acute intermittent porphyria. Nucleic Acids Res, 17:6637-6649.

Grandchamp B, Picat C, Kauppinen R, Mignotte V, Peltonen L, Mustajoki P, Romeo PH, Goossens M, and Nordmann Y (1989): Molecular analysis of acute intermittent porphyria in a Finnish family with normal erythrocyte porphobilinogen deaminase. Eur J Clin Invest, 19:415-418.

Grandchamp B, Picat C, Mignotte V, Wilson JH, te Velde K, Sandkuyl L, Romeo PH, Goossens M, and Nordmann Y (1989): Tissue-specific splicing mutation in acute intermittent porphyria. Proc Natl Acad Sci USA, 86:661-664.

Granick S (1966): The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. J Biol Chem, 241:1359-1375.

Gregor A, Schneider-Yin X, Szlendak U, Wettstein A, Lipniacka A, Rufenacht UB, and Minder EI (2002): Molecular study of the hydroxymethylbilane synthase gene (HMBS) among Polish patients with acute intermittent porphyria. Hum Mutat, 19 :310-314.

Grompe M (1993): The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. Nat Genet, 5:111-117.

Gross U, Hoffmann GF, and Doss MO (2000): Erythropoietic and hepatic porphyrias. J Inherit Metab Dis, 23:641-661.

Gross U, Puy H, Doss M, Robreau AM, Nordmann Y, Doss MO, and Deybach JC (1999): New mutations of the hydroxymethylbilane synthase gene in German patients with acute intermittent porphyria. Mol Cell Probes, 13:443-447.

Gu XF, de Rooij F, de Baar E, Bruyland M, Lissens W, Nordmann Y, and Grandchamp B (1993): Two novel mutations of the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. Hum Mol Genet, 2:1735-1736.

Gu XF, de Rooij F, Lee JS, Velde KT, Deybach JC, Nordmann Y, and Grandchamp B (1993): High prevalence of a point mutation in the porphobilinogen deaminase gene in Dutch patients with acute intermittent porphyria. Human Genetics, 91:128-130.

Gu XF, de Rooij F, Voortman G, te Velde K, Nordmann Y, and Grandchamp B (1992): High frequency of mutations in exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene in patients with a CRIM-positive subtype of acute intermittent porphyria. Am J Hum Genet, 51:660-665.

Gu XF, de Rooij F, Voortman G, Velde KT, Deybach JC, Nordmann Y, and Grandchamp B (1994): Detection of eleven mutations causing acute intermittent porphyria using denaturing gradient gel electrophoresis. Hum Genet, 93:47-52.

Gu XF, Lee JS, Delfau MH, and Grandchamp B (1991): PCR detection of a G/T polymorphism at exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene (PBG-D). Nucleic Acids Res, 19:1966.

Gubin AN and Miller JL (2001): Human erythroid porphobilinogen deaminase exists in 2 splice variants. Blood, 97:815-817.

Guillen-Navarro E, Carbonell P, Glover G, Sanchez-Solis M, and Fernandez-Barreiro A (2004): Novel HMBS founder mutation and significant intronic polymorphism in Spanish patients with acute intermittent porphyria. Ann Hum Genet, 68:509-514.

Hamilton JW, Bement WJ, Sinclair PR, Sinclair JF, Alcedo JA, and Wetterhahn KE (1991): Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. Arch Biochem Biophys, 289:387-392.

Hayashi N, Terasawa M, Yamauchi K, and Kikuchi G (1980): Effects of hemin on the synthesis and intracellular translocation of delta-aminolevulinate synthase in the liver of rats treated with 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine. J Biochem (Tokyo), 88:1537-1543.

Helliwell JR, Nieh YP, Habash J, Faulder PF, Raftery J, Cianci M, Wulff M, and Hadener A (2002): Time-resolved and static-ensemble structural chemistry of hydroxymethylbilane synthase. Faraday Discuss, 122:131-144.

Helliwell JR, Nieh YP, Raftery J, Cassetta A, Habash J, Carr PD, Ursby T, Wulf M, Thompson AW, Niemann AC, and Hadener A (1998): Time-resolved structures of hydroxymethylbilane synthase (Lys59Gln mutant) as it is loaded with substrate in the crystal determined by Laue difraction. Faraday Trans, 94:2615-2622.

Herrick AL and McColl KE (2005): Acute intermittent porphyria. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 19:235-249.

Hessels J, Voortman G, van der Wagen A, van der Elzen C, Scheffer H, and Zuijderhoudt FM (2004): Homozygous acute intermittent porphyria in a 7-year-old boy with massive excretions of porphyrins and porphyrin precursors. J Inherit Metab Dis, 27:19-27.

Hrdinka M, Ulbrichova D, Flachsova E, Mikula I, Bodnarova M, Prochazkova J, Saligova J, Silhanova E, Halamkova H, Zeman J, and Martasek P (2005): Molecular analysis of the porphobilinogen deaminase gene in newly (2004) diagnozed Czech and Slovak acute intermittent porphyria patients: Report of three novel mutations. Eur J Hum Genet, 13:261.

Chen CH, Astrin KH, Lee G, Anderson KE, and Desnick RJ (1994): Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the

housekeeping transcript causes "variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme. J Clin Invest, 94:1927-1937.

Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M, and Romeo PH (1988): Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. Proc Natl Acad Sci USA, 85:6-10.

Iftikhar A (2002): Childhood Porphyrias. Mayo Clin Proc, 77:825-836.

Jagadeeswaran P, Forget BG, and Weissman SM (1981): Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA pol III transcripts. Cell, 26:141-142.

Johansson A, Moller C, and Harper P (2003): Correction of the biochemical defect in porphobilinogen deaminase deficient cells by non-viral gene delivery. Mol Cell Biochem, 250:65-71.

Johansson A, Nowak G, Moller C, Blomberg P, and Harper P (2004): Adenoviral-mediated expression of porphobilinogen deaminase in liver restores the metabolic defect in a mouse model of acute intermittent porphyria. Mol Ther, 10:337-343.

Jordan PM and Warren MJ (1987): Evidence for a dipyrromethane cofactor at the catalytic site of E. coli porphobilinogen deaminase. FEBS Lett, 225:87-92.

Jordan PM and Woodcock SC (1991): Mutagenesis of arginine residues in the catalytic cleft of Escherichia coli porphobilinogen deaminase that affects dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole chain initiation and elongation. Biochem J, 280:445-449.

Jurka J (1993): A new subfamily of recently retroposed human Alu repeats. Nucleic Acids Res, 21:2252.

Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, and Nordmann Y (1995): The Porphyrias. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, edited by Scriver CR et al., pp. 2103-2159. McGraw Hill, New York.

Kauppinen R and Mustajoki P (1992): Prognosis of acute porphyria: occurrence of acute attacks, precipitating factors, and associated diseases. Medicine (Baltimore), 71:1-13.

Kauppinen R, Mustajoki S, Pihlaja H, Peltonen L, and Mustajoki P (1995): Acute intermittent porphyria in Finland: 19 mutations in the porphobilinogen deaminase gene. Hum Mol Genet, 4:215-222.

Kauppinen R, Peltonen L, Palotie A, and Mustajoki P (1990): RFLP analysis of three different types of acute intermittent porphyria. Hum Genet, 85:160-164.

Kauppinen R, Yrjonen A, and Pischik E (2005): Novel 19 bp deletion of exon 15 in the PBGD gene and normal erytrocyte porphobilinogen activity in a patient with acute intermittent porphyria. Proceedings of Porphyrins and Porphyrias Conference 2005, Cape Town, 29.

Kaya AH, Plewinska M, Wong DM, Desnick RJ, and Wetmur JG (1994): Human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs. Genomics, 19:242-248.

Kirsch RE, Meissner PN, and Hift RJ (1998): Variegate porphyria. Semin Liver Dis, 18:33-41.

Kordač V (1978): Porfyrie v klinické praxi. Avicenum, Praha.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

Lam CW, Poon PMK, Tong SF, Lo AWI, Lai CK, Choi KL, Tiu SC, Chan YW, and Shek CC (2001): Novel mutation and polymorphisms of the HMBS gene detected by denaturing HPLC. Clin Chem , 47:343-346.

Lambert R, Brownlie PD, Woodcock SC, Louie GV, Cooper JC, Warren MJ, Jordan PM, Blundell TL, and Wood SP (1994): Structural studies on porphobilinogen deaminase. Ciba Found.Symp., 180:97-104.

Lander M, Pitt AR, Alefounder PR, Bardy D, Abell C, and Battersby AR (1991): Studies on the mechanism of hydroxymethylbilane synthase concerning the role of arginine residues in substrate binding. Biochem J, 275:44-452.

Law WK, Choy KW, and Lam CW (1999): Novel single nucleotide polymorphism (9678G-A) for linkage analysis of acute intermittent porphyria. Clin Chem, 45:308-309.

Lee GY, Astrin KH, and Desnick RJ (1995): Acute intermittent porphyria: a single-base deletion and a nonsense mutation in the human hydroxymethylbilane synthase gene, predicting truncations of the enzyme polypeptide. Am J Med Genet, 58 :155-158.

Lee JS and Anvret M (1987): A PstI polymorphism for the human porphobilinogen deaminase gene (PBG). Nucleic Acids Res, 15:6307.

Lee JS and Anvret M (1991): Identification of the most common mutation within the porphobilinogen deaminase gene in Swedish patients with acute intermittent porphyria. Proc Natl Acad Sci USA, 88:10912-10915.

Lee JS, Lundin G, Anvret M, Lannfelt L, Forsell L, Picat C, and Grandchamp B (1991): Genetic heterogeneity of the porphobilinogen deaminase gene in Swedish families with acute intermittent porphyria. Human Genetics, 87:484-488.

Lelli SM, San Martin de Viale LC, and Mazzetti MB (2005): Response of glucose metabolism enzymes in an acute porphyria model. Role of reactive oxygen species. Toxicology, 216:49-58.

Lim HW (1989): Mechanisms of phototoxicity in porphyria cutanea tarda and erythropoietic protoporphyria. Immunol Ser, 46:671-685.

Lindberg RL, Martini R, Baumgartner M, Erne B, Borg J, Zielasek J, Ricker K, Steck A, Toyka KV, and Meyer UA (1999): Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. J Clin Invest, 103:1127-1134.

Lindberg RL, Porcher C, Grandchamp B, Ledermann B, Burki K, Brandner S, Aguzzi A, and Meyer UA (1996): Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. Nat Genet, 12:195-199.

Linet MS, Gridley G, Nyren O, Mellemkjaer L, Olsen JH, Keehn S, Adami HO, and Fraumeni JF Jr (1999): Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: a cohort study in Denmark and Sweden. Am J Epidemiol, 149:1010-1015.

Litman DA and Correia MA (1983): L-tryptophan: a common denominator of biochemical and neurological events of acute hepatic porphyria. Science, 222:1031-1033.

Litman DA and Correia MA (1985): Elevated brain tryptophan and enhanced 5-hydroxytryptamine turnover in acute hepatic heme deficiency: clinical implications. J Pharmacol Exp Ther , 232:337-345.

Llewellyn DH, Elder GH, Kalsheker NA, Marsh OW, Harrison PR, Grandchamp B, Picat C, Nordmann Y, Romeo PH, and Goossens M (1987): DNA polymorphism of human porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. Lancet, 2:706-708.

Llewellyn DH, Scobie GA, Urquhart AJ, Whatley SD, Roberts AG, Harrison PR, and Elder GH (1996): Acute intermittent porphyria caused by defective splicing of porphobilinogen deaminase RNA: a synonymous codon mutation at -22 bp from the 5' splice site causes skipping of exon 3. J Med Genet, 33:437-438.

Llewellyn DH, Smyth SJ, Elder GH, Hutchesson AC, Rattenbury JM, and Smith MF (1992): Homozygous acute intermittent porphyria: compound heterozygosity for adjacent base transitions in the same codon of the porphobilinogen deaminase gene. Human Genetics, 89:97-98.

Llewellyn DH, Whatley S, and Elder GH (1993): Acute intermittent porphyria caused by an arginine to histidine substitution (R26H) in the cofactor-binding cleft of porphobilinogen deaminase. Hum Mol Genet, 2:1315-1316.

Louie GV, Brownlie PD, Lambert R, Cooper JB, Blundell TL, Wood SP, Warren MJ, Woodcock SC, and Jordan PM (1992): Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. Nature, 359:33-39.

Louie GV, Brownlie PD, Lambert R, Cooper JB, Blundell TL, Wood SP, Malashkevich VN, Hadener A, Warren MJ, and Shoolingin-Jordan PM (1996): The three-dimensional structure of Escherichia coli porphobilinogen deaminase at 1.76-A resolution. Proteins, 25:48-78.

Luchinina YA, Surin VL, Luk'yanenko AV, Karpova IV, Pustovoit YS, and Kravchenko SK (2005): Molecular diagnostics of acute intermittent porphyria in Russia. Eur J Hum Genet, 13:134.

Lundin G and Anvret M (1997): Characterization and regulation of the nonerythroid porphobilinogen deaminase promoter. Biochem Biophys Res Commun, 231:409-411.

Lundin G, Hashemi J, Floderus Y, Thunell S, Sagen E, Laegreid A, Wassif W, Peters T, and Anvret M (1995): Four mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria. Journal of Medical Genetics, 32:979-981.

Lundin G, Lee JS, Thunell S, and Anvret M (1997): Genetic investigation of the porphobilinogen deaminase gene in Swedish acute intermittent porphyria families. Hum Genet, 100:63-66.

Lundin G, Wedell A, Thunell S, and Anvret M (1994): Two new mutations in the porphobilinogen deaminase gene and a screening method using PCR amplification of specific alleles. Human Genetics, 93:59-62.

Maeda N, Horie Y, Adachi K, Nanba E, Kawasaki H, Daimon M, Kudo Y, and Kondo M (2000): Two deletion mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in two unrelated Japanese patients with acute intermittent porphyria. J Hum Genet, 45:263-268.

Magnussen CR, Levine J, Doherty JM, Cheesman JO, and Tschudy DP (1974): A red cell enzyme method for the diagnosis of acute intermittent porphyria. Blood, 44:857-868.

Makalowski W, Mitchell GA, and Labuda D (1994): Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. Trends Genet, 10:188-193.

Martasek P (1998): Hereditary coproporphyria . Semin Liver Dis, 18:25-32.

Martásek P and Kordač V (1989): Léčba jaterních porfyrií. Avicenum.

Martinez di Montemuros F, Di Pierro E, Biolcati G, Rocchi E, Bissolotti E, Tavazzi D, Fiorelli G, and Cappellini MD (2001): Acute intermittent porphyria: heterogeneity of mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in Italy. Blood Cells Mol Dis, 27:961-970.

Martinez di Montemuros F, Di Pierro E, Fargion S, Biolcati G, Griso D, Macri A, Fiorelli G, and Cappellini MD (2000): Molecular analysis of the hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene in Italian patients with acute intermittent porphyria: report of four novel mutations. Hum Mutat, 15:480.

May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhasker CR, Cox TC, and Bottomley SS (1995): Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 51:1-51.

Meyer UA, Schuurmans MM, and Lindberg RL (1998): Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations. Semin Liver Dis, 18:43-52.

Meyer UA, Strand LJ, Doss M, Rees AC, and Marver HS (1972): Intermittent acute porphyria-demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism. N Engl J Med, 286:1277-1282.

Mgone CS, Lanyon WG, Moore MR, and Connor JM (1992): Detection of seven point mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria, by direct sequencing of in vitro amplified cDNA. Human Genetics, 90:12-16.

Mgone CS, Lanyon WG, Moore MR, Louie GV, and Connor JM (1993): Detection of a high mutation frequency in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria. Human Genetics, 92:612-622.

Mgone CS, Lanyon WG, Moore MR, Louie GV, and Connor JM (1994): Identification of five novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene. Hum Mol Genet, 3:809-811.

Mignotte V, Eleouet JF, Raich N, and Romeo PH (1989): Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. Proc Natl Acad Sci USA, 86:6548-6552.

Mignotte V, Wall L, deBoer E, Grosveld F, and Romeo PH (1989): Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. Nucleic Acids Res, 17:37-54.

Miyagi K (1970): Deficiency of hepatic porphobilinogen deaminase in acute intermittent porphyria. J Kyushu Haematol Soc, 20:190-203.

Moore MR (1998): The Biochemistry of Heme Synthesis in Porphyria and in the Porphyrinurias. Clinics in Dermatology, 16:203-223.

Morton KA, Kushner JP, Burnham BF, and Horton WJ (1981): Biosynthesis of porphyrins and heme from gamma, delta-dioxovalerate by intact hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 78:5325-5328.

Mustajoki P (1981): Normal erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in a kindred with acute intermittent porphyria. Ann Intern Med, 95:162-166.

Mustajoki P and Koskelo P (1976): Hereditary hepatic porphyrias in Finland. Acta Med Scand, 200:171-178.

Mustajoki P, Kauppinen R, Lannfelt L, Lilius L, and Koistinen J (1992): Frequency of low erythrocyte porphobilinogen deaminase activity in Finland. J Intern Med, 231:389-395.

Mustajoki S (1999): Molecular genetics of acute intermittent porphyria in Finland. 1-79. University of Helsinki.

Mustajoki S, Ahola H, Mustajoki P, and Kauppinen R (1999): Insertion of Alu element responsible for acute intermittent porphyria. Hum Mutat, 13:431-438.

Mustajoki S, Pihlaja H, Ahola H, Petersen NE, Mustajoki P, and Kauppinen R (1998): Three splicing defects, an insertion, and two missense mutations responsible for acute intermittent porphyria. Hum Genet, 102:541-548.

Namba H, Narahara K, Tsuji K, Yokoyama Y, and Seino Y (1991): Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1-q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies. Cytogenet Cell Genet, 57:105-108.

Nielsen KR (1997): A case of acute intermittent porphyria. Ugeskr Laeger, 159:960-961.

Nissen H, Petersen NE, Mustajoki S, Hansen TS, Mustajoki P, Kauppinen R, and Horder M (1997): Diagnostic strategy, genetic diagnosis and identification of new mutations in intermittent porphyria by denaturing gradient gel electrophoresis. Hum Mutat, 9:122-130.

Nordmann Y and Puy H (2002): Human hereditary hepatic porphyrias. Clin Chim Acta, 325:17-37.

Nordmann Y, Puy H, and Deybach JC (1999): The porphyrias. J Hepatol, 30:12-16.

Nordmann Y, Puy H, Da Silva V, Simonin S, Robreau AM, Bonaiti C, Phung LN, and Deybach JC (1997): Acute intermittent porphyria: prevalence of mutations in the porphobilinogen deaminase gene in blood donors in France. J Intern Med, 242:213-217.

Ong PM, Lanyon WG, Graham G, Hift RJ, Halkett J, Moore MR, and Connor JM (1997): Acute intermittent porphyria: the in vitro expression of mutant hydroxymethylbilane synthase. Mol Cell Probes, 11:293-296.

Ong PM, Lanyon WG, Hift RJ, Halkett J, Moore MR, and Connor JM (1998): Identification of two novel mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene in three patients from two unrelated families with acute intermittent porphyria. Hum Hered, 48:24-29.

Ong PM, Lanyon WG, Hift RJ, Halkett J, Moore MR, Mgone CS, and Connor JM (1996): Detection of four mutations in six unrelated South African patients with acute intermittent porphyria. Mol Cell Probes, 10:57-61.

Petersen NE, Nissen H, Hansen TS, Rasmussen K, Brock A, and Horder M (2005): R325X mutation in exon 15 of the hydroxymethylbilane synthase gene identified in two Danish families with acute intermittent porphyria. Clin Chem, 42:106-107.

Petersen NE, Nissen H, Horder M, Senz J, Jamani A, and Schreiber WE (1998): Mutation screening by denaturing gradient gel electrophoresis in North American patients with acute intermittent porphyria. Clin Chem, 44:1766-1768.

Picat C, Bourgeois F, and Grandchamp B (1991): PCR detection of a C/T polymorphism in exon 1 of the porphobilinogen deaminase gene (PBGD). Nucleic Acids Res, 19:5099.

Pischik E, Mehtala S, and Kauppinen R (2005): Nine mutations including three novel mutations among Russian patients with acute intermittent porphyria. Hum Mutat, 26:496.

Poh-Fitzpatrick MB (1998): Clinical Features of the Porphyrias. Clinics in Dermatology, 16:251-264.

Ponka P (1999): Cell biology of heme. Am J Med Sci, 318:241-256.

Puy H, Aquaron R, Lamoril J, Robreau AM, Nordmann Y, and Deybach JC (1997a): Acute intermittent porphyria: rapid molecular diagnosis. Cell Mol Biol, 43:37-45.

Puy H, Deybach JC, Lamoril J, Robreau AM, and Nordmann Y (1996): Detection of four novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene in French Caucasian patients with acute intermittent porphyria. Hum Hered, 46:177-180.

Puy H, Deybach JC, Lamoril J, Robreau AM, Da Silva V, Gouya L, Grandchamp B, and Nordmann Y (1997): Molecular epidemiology and diagnosis of PBG deaminase gene defects in acute intermittent porphyria. Am J Hum Genet, 60:1373-1383.

Raich N, Romeo PH, Dubart A, Beaupain D, Cohen-Solal M, and Goossens M (1986): Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. Nucleic Acids Res, 14:5955-5968.

Ramdall RB, Cunha L, Astrin KH, Katz DR, Anderson KE, Glucksman M, Bottomley SS, and Desnick RJ (2000): Acute intermittent porphyria: novel missense mutations in the human hydroxymethylbilane synthase gene. Genetics in Medicine, 2:290-295.

Rao AU, Carta LK, Lesuisse E, and Hamza I (2005): Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. Proc Natl Acad Sci USA, 102:4270-4275.

Rimington C (1993): Was Hippocrates the first to describe a case of acute porphyria. Int J Biochem, 25:1351-1352.

Robreau-Fraolini AM, Puy H, Aquaron C, Bogard C, Traore M, Nordmann Y, Aquaron R, and Deybach JC (2000): Porphobilinogen deaminase gene in African and Afro-Caribbean ethnic groups: mutations causing acute intermittent porphyria and specific intragenic polymorphisms. Hum Genet, 107:150-159.

Rogers JH (2006): The origin and evolution of retroposons. Int Rev Cytol, 93:187-279.

Rosipal R, Puy H, Lamoril J, Martasek P, Nordmann Y, and Deybach JC (1997): Molecular analysis of porphobilinogen (PBG) deaminase gene mutations in acute intermittent porphyria: first study in patients of Slavic origin. Scand J Clin Lab Invest, 57:217-224.

Rouault T and Klausner R (1997): Regulation of iron metabolism in eukaryotes. Curr Top Cell Regul, 35:1-19.

Sachdev R, Haldiya KR, and Dixit AK (2005): Acute Intermittent Porphyria in a Kumhar community of Western Rajasthan. J Assoc Physicians India, 53:101-104.

Sardh E, Rejkjaer L, Harper P, and Ansersson DE (2003): First clinical trial of i.v. rhPBGD in healthy subjects with and without diagnosed manifest acute intermittent porphyria (AIP). Physiol Res, 52.

Sassa S (1990): Regulation of the genes for heme pathway enzymes in erythroid and in non-erythroid cells. Int J Cell Cloning, 8:10-26.

Sassa S (1998): ALAD porphyria. Semin Liver Dis, 18:95-101.

Sassa S (2002): The porphyrias. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 18:56-67.

Sassa S and Kappas A (2000): Molecular aspects of the inherited porphyrias. J Intern Med, 247:169-178.

Scobie GA, Llewellyn DH, Urquhart AJ, Smyth SJ, Kalsheker NA, Harrison PR, and Elder GH (1990): Acute intermittent porphyria caused by a CT mutation that produces a stop codon in the porphobilinogen deaminase gene. Human Genetics, 85:631-634.

Shoolingin-Jordan PM (1995): Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase: structure, molecular biology, and mechanism. J Bioenerg Biomembr, 27:185-192.

Shoolingin-Jordan PM (1995): Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase: structure, molecular biology, and mechanism. J Bioenerg.Biomembr, 27:181-195.

Schneider-Yin X, Bogard C, Rufenacht UB, Puy H, Nordmann Y, Minder EI, and Deybach J (2000): Identification of a prevalent nonsense mutation (W283X) and two novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene of Swiss patients with acute intermittent porphyria. Hum Hered, 50:247-250.

Schneider-Yin X, Szlendak U, Lipniacka A, Minder EI, and Gregor A (2006): Nine novel mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene of Polish patients with acute intermittent porphyria. Clin Genet, in press.

Schreiber WE, Fong F, and Jamani A (1994): Frameshift mutations in exons 9 and 10 of the porphobilinogen deaminase gene produce a crossreacting immunological material (CRIM)-negative form of acute intermittent porphyria. Human Genetics, 93:552-556.

Schreiber WE, Fong F, and Jamani A (1994): Molecular diagnosis of acute intermittent porphyria by analysis of DNA extracted from hair roots. Clin Chem, 40:1744-1748.

Schreiber WE, Fong F, Nassar BA, and Jamani A (1995): Heteroduplex analysis detects frameshift and point mutations in patients with acute intermittent porphyria. Human Genetics, 96:161-166.

Schreiber WE, Jamani A, and Armstrong JG (1995): Acute Intermittent Porphyria in a Native North American Family. Am J Clin Pathol, 103:730-734.

Schuurmans MM, Schneider-Yin X, Rufenacht UB, Schnyder C, Minder CE, Puy H, Deybach JC, and Minder EI (2001): Influence of age and gender on the clinical

expression of acute intermittent porphyria based on molecular study of porphobilinogen deaminase gene among Swiss patients. Mol Med, 7:535-542.

Smythe E. and Williams DC (1988): A simple rapid purification scheme for hydroxymethylbilane synthase from human erythrocytes. Biochem J, 251:237-241.

Solis C, Lopez-Echaniz I, Sefarty-Graneda D, Astrin KH, and Desnick RJ (1999): Identification and expression of mutations in the hydroxymethylbilane synthase gene causing acute intermittent porphyria (AIP) . Mol Med, 5:664-671.

Solis CS, Lopez-Echaniz I, Sefarty-Graneda D, Astrin KH, and Desnick RJ (2004): Gene Symbol: HMBS. Disease: Acute intermittent porphyria. Hum Genet, 114:402.

Soonawalla ZF, Orug T, Badminton MN, Elder GH, Rhodes JM, Bramhall SR, and Elias E (2004): Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria. Lancet, 363:705-706.

Surin VL, Luk'yanenko AV, Karpova IV, Misyurin AV, Pustovoit A, and Pivnik AV (2001): Three Novel Mutations in Porphobilinogen Deaminase Gene Identified in Russian Patients with Acute Intermittent Porphyria. Genetika, 37:690-697.

Tenhunen R and Mustajoki P (1998): Acute porphyria: treatment with heme. Semin Liver Dis, 18:53-55.

Tchernitchko D, Lamoril J, Puy H, Robreau AM, Bogard C, Rosipal R, Gouya L, Deybach JC, and Nordmann Y (1999): Evaluation of mutation screening by heteroduplex analysis in acute intermittent porphyria: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. Clin Chim Acta, 279:133-143.

Tschudy DP, Valsamis M, and Magnussen CR (1975): Acute intermittent porphyria: clinical and selected research aspects. Ann Intern Med, 83:851-864.

Tyagi RK and Datta K (1993): In vitro translocation of L-alanine:4,5-dioxovalerate transaminase into rat kidney mitochondria. J Biochem (Tokyo), 113:557-562.

von Brasch L, von Brasch L, Haverkamp T, Schlechte H, Heckers H, and Petrides PE (2004): Molecular analysis of acute intermittent porphyria: mutation screening in 20 patients in Germany reveals 11 novel mutations. Blood Cells Mol Dis, 32:309-314.

von und zu Fraunberg M, Pischik E, Udd L, and Kauppinen R (2005): Clinical and Biochemical Characteristics and Genotype-Phenotype Correlation in 143 Finnish and Russian Patients With Acute Intermittent Porphyria. Medicine, 84:35-47.

Waldenstrom J (1957): The porphyrias as inborn errors of metabolism. Am J Med, 22:758-773.

Warren MJ and Jordan PM (1988): Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of Escherichia coli porphobilinogen deaminase. Biochemistry, 27:9020-9030.

Watson CJ, Pierach CA, Bossenmaier I, and Cardinal R (1978): Use of hematin in the acute attack of the "inducible" hepatic prophyrias. Adv Intern Med, 23:265-286.

Whatley SD, Roberts AG, Llewellyn DH, Llewellyn DH, Garrett C, and Elder GH (2000): Non-erythroid form of acute intermittent porphyria caused by promoter and frameshift mutations distant from the coding sequence of exon 1 of the HMBS gene. Hum Genet, 107:243-248.

Whatley SD, Woolf JR, and Elder GH (1999): Comparison of complementary and genomic DNA sequencing for the detection of mutations in the HMBS gene in British patients with acute intermittent porphyria: identification of 25 novel mutations. Hum Genet, 104:505-510.

Wood S, Lambert R, and Jordan PM (1995): Molecular basis of acute intermittent porphyria . Molecular Medicine Today, 1:232-239.

Yoo HW, Warner CA, Chen CH, and Desnick RJ (1993): Hydroxymethylbilane synthase: complete genomic sequence and amplifiable polymorphisms in the human gene. Genomics, 15:21-29.

Yu S, Poulos V, and Stewart P (2000): A novel mutation in a family with non-erythroid variant form of acute intermittent porphyria. J Hum Genet, 45:367-369.