

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Daniela Beyerová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Deficit trehalázy
Bakalářská práce

2024

Daniela Beyerová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Trehalase deficiency
Bachelor thesis

2024

Daniela Beyerová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Daniela Beyerová**
Osobní číslo: **C21147**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Deficit trehalázy**
Téma práce anglicky: **Trehalase Deficiency**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši na téma deficit trehalázy
2. V úvodních kapitolách zmínit strukturu a výskyt trehalózy, její syntézu, využití a funkce
3. V dalších kapitolách popsat strukturu, funkci a výskyt enzymu trehaláza a zmínit efekty tohoto enzymu
4. Následující kapitoly věnovat deficitu trehalázy, uvést příčiny a dopady tohoto stavu
5. V závěru práce uvést možnosti léčby deficitu trehalázy

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Deficit trehalázy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 19. 06. 2024

Daniela Beyerová

PODĚKOVÁNÍ

Poděkovat bych chtěla především vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za čas, který věnovala kontrole a čtení této bakalářské práce, za odborné vedení, klidný a milý přístup. Dále bych chtěla poděkovat Oddělení lékařské genetiky Fakultní Thomayerovy nemocnice a velké poděkování směřuje také k Oddělení laboratorních metod v IKEMu. Moje poslední poděkování bych chtěla věnovat své rodině a přátelům.

ANOTACE

Cílem bakalářské práce je komplexně analyzovat deficit trehalázy, což je vzácné genetické onemocnění charakterizované nedostatkem enzymu trehalázy, který je klíčový pro štěpení trehalózy na glukózu. Práce se zaměřuje na genetické a biochemické aspekty tohoto deficitu, jeho klinické projevy, metody diagnostiky a možnosti léčby.

KLÍČOVÁ SLOVA

Deficit trehalázy, trehalóza, trehaláza, TREH gen, metabolismus sacharidů.

TITLE

Trehalase deficiency

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis is to comprehensively analyse trehalase deficiency, a rare genetic disorder characterised by a deficiency of the enzyme trehalase, which is crucial for the breakdown of trehalose into glucose. The thesis focuses on the genetic and biochemical aspects of this deficiency, its clinical manifestations, methods of diagnosis and treatment options.

KEYWORDS

Trehalase deficiency, trehalose, trehalase, TREH gene, carbohydrate metabolism.

OBSAH

| | |
|--|----|
| SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 11 |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK | 12 |
| ÚVOD..... | 14 |
| 1 TREHALÓZA..... | 15 |
| 1.1 STRUKTURA A VÝSKYT | 15 |
| 1.2 SYNTÉZA TREHALÓZY | 16 |
| 1.2.1 Biosyntéza trehalózy | 16 |
| 1.2.2 Enzymatický vznik trehalóza-fosfátu | 16 |
| 1.2.3 Enzymatická přeměna trehalóza-fosfátu na volnou trehalózu | 17 |
| 1.2.4 Alternativní cesty syntézy trehalózy | 18 |
| 1.3 FUNKCE A VYUŽITÍ TREHALÓZY | 19 |
| 1.3.1 Funkce a využití trehalózy u živých organismů | 19 |
| 1.3.2 Funkce a využití trehalózy v potravinářském průmyslu | 20 |
| 1.3.3 Funkce a využití trehalózy ve farmaceutickém průmyslu a medicíně | 21 |
| 2 TREHALÁZA..... | 22 |
| 2.1 STRUKTURA A VÝSKYT | 22 |
| 2.1.1 Primární struktura | 23 |
| 2.1.2 Kvartérní struktura a interakce..... | 23 |
| 2.1.3 Výskyt v buňce | 24 |
| 2.1.4. Exprese a klonování trehalázy | 24 |
| 2.1.5 TREH gen – funkce a struktura | 25 |
| 2.2 FUNKCE..... | 26 |
| 2.3 INHIBITORY A AKTIVÁTORY TREHALÁZY | 27 |
| 3 DEFICIT TREHALÁZY | 31 |
| 3.1 PŘÍČINY DEFICITU TREHALÁZY | 31 |
| 3.1.2 Komorbidita deficitu trehalázy s celiakií..... | 32 |
| 3.2 PREVALENCE DEFICITU TREHALÁZY | 33 |
| 3.3 DOPADY DEFICITU TREHALÁZY | 35 |
| 3.4 STANOVENÍ DEFICITU TREHALÁZY | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.4.1 Histochemické metody pro stanovení deficitu trehalázy | 36 |
| 3.4.2 Genetické metody pro stanovení deficitu trehalázy | 38 |
| 3.5 LÉČBA DEFICITU TREHALÁZY | 42 |
| ZÁVĚR | 44 |
| CITOVANÁ LITERATURA..... | 45 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 – Struktura trehalózy | 15 |
| Obrázek 2 – Syntéza trehalózy | 17 |
| Obrázek 3 – Alternativní cesta syntézy trehalózy pomocí TS | 18 |
| Obrázek 5 – Výskyt trehalózy v živočišné buňce | 24 |
| Obrázek 6 – Lokace genu TREH na chromozomu 11 | 26 |
| Obrázek 7 – Štěpení trehalózy za katalýzy trehalázou | 27 |
| Obrázek 8 – Struktura validamycinu A | 29 |
| Obrázek 9 – Zobrazení biopsie tkáně tenkého střeva | 33 |
| Obrázek 10 – Histologické barvení vzorků tenkého střeva | 37 |
| Obrázek 11 – Přeměna diaminobenzidinu na hnědou sraženinu | 38 |
| Obrázek 12 – Metodický postup při celoexomovém sekvenování | 41 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|------|---|
| ADP | adenosindifosfát (adenosine diphosphate) |
| AMK | aminokyselina |
| Asn | asparagin |
| CeD | celiakie (celiac disease) |
| CDP | cytidindifosfát (cytidine diphosphate) |
| DGP | deamidované gliadinové peptidy (deamidated gliadin peptide) |
| EMA | endomysiální protilátky (endomysial antibody) |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| GDP | guanosindifosfát (guanosine diphosphate) |
| GPI | glykosylfosfatidylinositol (glycosylphosphatidylinositol) |
| GRAS | všeobecně považovaný za bezpečný (generally recognised as safe) |
| HLA | hlavní histokompatibilní komplex (human leukocyte antigen) |
| MPS | masivní paralelní sekvenování (massively parallel sequencing) |
| mRNA | messenger RNA |
| NGS | sekvenování nové generace (next generation sequencing) |
| NMD | nonsensem zprostředkovaný rozklad (nonsense-mediated decay) |
| PKA | protein kináza A (protein kinase A) |
| PTC | předčasný terminační kodon (premature termination codon) |
| RI | zachovaný intron (retained intron) |
| Ser | serin |
| SNP | jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphism) |
| T2DM | diabetes mellitus 2. typu |
| TDP | thymidindifosfát (thymidine diphosphate) |

| | |
|------|--|
| TPP | trehalóza-6-fosfát fosfatáza (trehalose-6-phosphate phosphatase) |
| TPS | trehalóza-fosfát syntáza (trehalose-phosphate synthase) |
| TS | trehalóza syntáza (trehalose synthase) |
| tTGA | protilátky proti tkáňové transglutamináze (tissue transglutaminase antibodies) |
| tTG | tkáňová transglutamináza (tissue transglutaminase) |
| UDP | uridindifosfát (uridine diphosphate) |
| WES | celoexomové sekvenování (whole exome sequencing) |

ÚVOD

Trehaláza je enzym, který hraje klíčovou roli v metabolismu sacharidů, zejména při rozkladu trehalózy, disacharidu skládajícího se ze dvou molekul glukózy. Trehalóza je důležitá pro mnoho organismů, protože slouží jako zásobní cukr a osmoregulátor. U lidí je trehaláza přítomna zejména ve střevní sliznici, kde napomáhá při trávení trehalózy přijaté z potravy.

Deficit trehalázy je vzácné genetické onemocnění, které se vyznačuje nedostatečnou aktivitou tohoto enzymu. Tento stav může vést k různým zdravotním problémům, včetně gastrointestinálních obtíží, jako jsou průjem, bolesti břicha a nadýmání, které jsou způsobeny neschopností efektivně rozkládat trehalózu. Vzhledem k tomu, že trehalóza je přítomna v mnoha potravinách, může mít deficit trehalázy významný dopad na kvalitu života postižených jedinců.

Cílem této bakalářské práce je prozkoumat deficit trehalázy z různých úhlů pohledu, včetně jeho genetického základu, diagnostiky, klinických projevů a možností léčby. Dále se zaměřuje na epidemiologii tohoto onemocnění a jeho prevalenci v různých populacích. Výzkum na toto téma je klíčový nejen pro lepší porozumění samotnému deficitu trehalázy, ale také pro vývoj efektivních terapeutických strategií, které mohou zlepšit kvalitu života pacientů trpících tímto onemocněním.

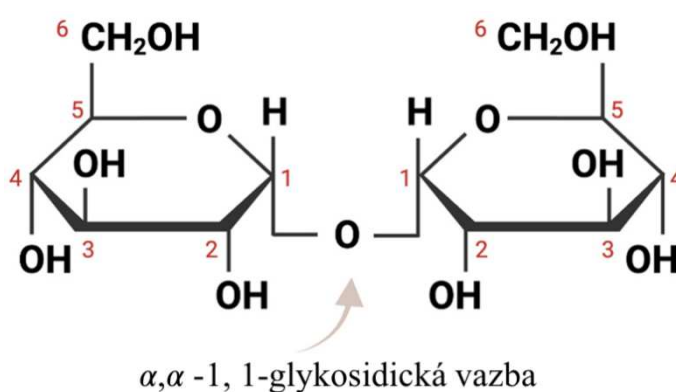
V následujících kapitolách bude podrobně popsána biochemie trehalázy, genetické mutace spojené s jejím deficitem, diagnostické metody a současné přístupy k léčbě. Tato práce také přináší přehled nejnovějších výzkumů a studií, které přispívají k našemu chápání tohoto složitého onemocnění.

1 TREHALÓZA

1.1 STRUKTURA A VÝSKYT

Trehalóza je přirozeně se vyskytující, neredukující disacharid, který se skládá ze dvou glukopyranosylových jednotek, které jsou spojené přes α , α -1, 1-glykosidickou vazbu. I přesto, že existuje více izomerů trehalózy - α , β - 1, 1-; β , β - 1, 1- a α , α - 1, 1-, tak pouze α -, α -trehalóza byla izolovaná a syntetizovaná v přírodě, díky nízké konformační energii tohoto izomeru (Elbein 2003).

Žádný živý organismus není schopný syntetizovat α , β -trehalózu nebo β , β -trehalózu, ale oba dva tyto izomery mohou být syntetizovány skrz Koenigs-Knorr reakci (Chen a Gibney 2023). Na obr. 1 je znázorněna struktura trehalózy, která je složena ze dvou glukózových jednotek spojených přes α , α -1, 1-glykosidickou vazbu.



Obrázek 1 – Struktura trehalózy. Převzato a upraveno z (Chen a Gibney 2023)

Trehalóza neobsahuje žádnou volnou aldehydovou skupinu, která by se mohla účastnit redukčních procesů. Energie glykosidické vazby je menší než 1 kcal/mol, díky tomu je molekula mimořádně stabilní (Iturriaga et al. 2009). Trehalóza se redukuje na dva redukující monosacharidy pouze za extrémních hydrolytických podmínek nebo v přítomnosti enzymů, zatímco sacharóza se rychle redukuje při vystavení reaktivním aminoskupinám (Chen a Gibney 2023).

Je velice rozšířena ve spoustě organismů a to bakteriích, houbách, hmyzu, rostlinách a některých bezobratlých. Díky své struktuře je trehalóza vysoce rezistentní vůči kyselé hydrolyze, a také dehydrataci. Také může sloužit jako kryoprotektant v různých mikroorganismech, rostlinách a zvířatech (Chen a Gibney 2023).

1.2 SYNTÉZA TREHALÓZY

α,α -Trehalózu lze chemicky syntetizovat pomocí adice ethylenoxidu mezi 2,3,4,5-tetra-O-acetylem-D-glukózy a 3,4,6-tri-O-acetylem-1,2-anhydro-D-glukózy. Tato reakce dává vzniknout i jednomu z ostatních anomerů trehalózy, konkrétně α,β -trehalóze, která se také nazývá neotrehalóza. Neotrehalózu lze také syntetizovat pomocí Koenigs-Knorr reakce. Další z možných způsobů syntézy trehalózy je kyselá přeměna glukózy. Jediný anomer trehalózy, který je biosyntetizovaný mnoha organismy, je α,α -trehalóza. Druhý anomer trehalózy, β,β -trehalóza neboli isotrehalóza, nebyla nikdy izolována z žádného živoucího organismu, ale byla nalezena ve škrobových hydrolyzátech a také byla syntetizována chemicky pomocí Koenigs-Knorr reakce (Elbein 2003).

1.2.1 Biosyntéza trehalózy

1.2.2 Enzymatický vznik trehalóza-fosfátu

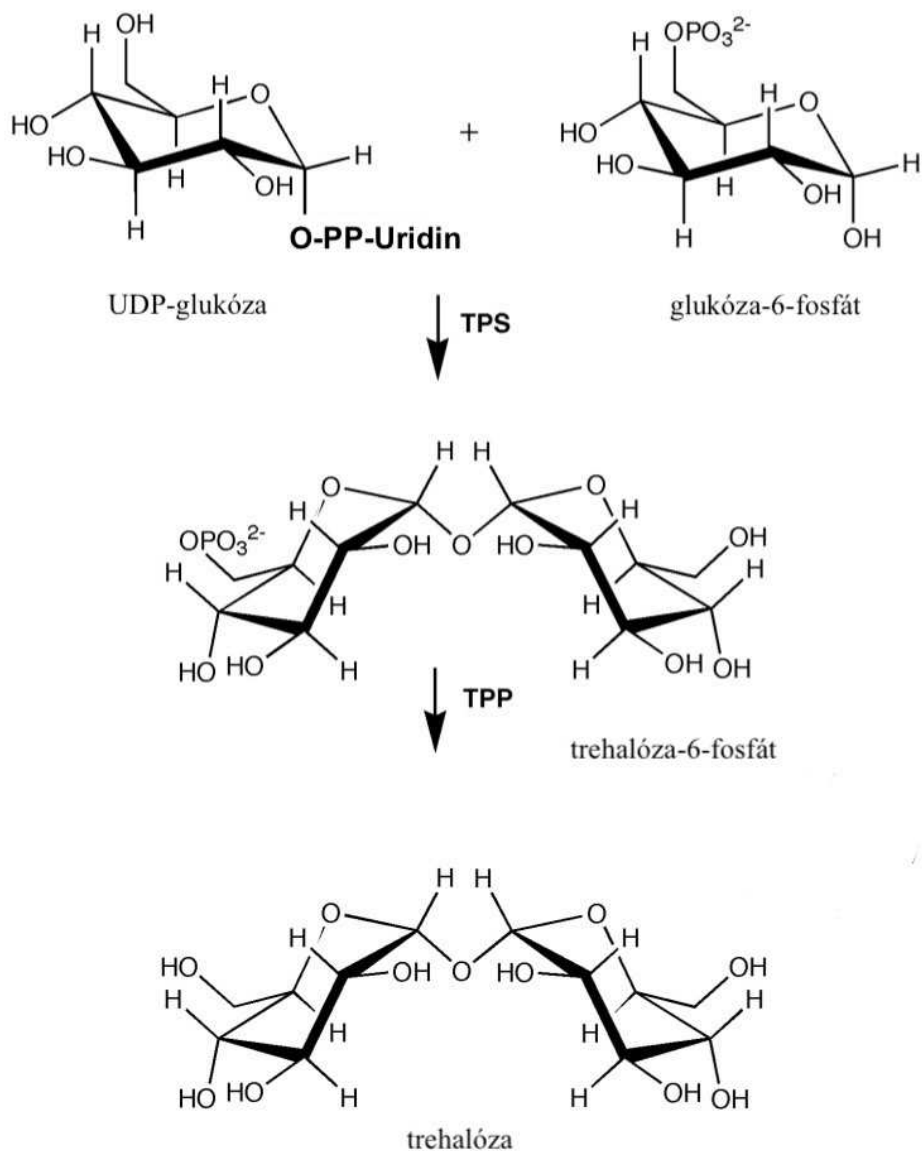
Nejvíce prozkoumaná cesta biosyntézy α,α -1,1-trehalózy je za pomoci enzymu trehalóza-fosfát syntáza (dále již jako TPS), který katalyzuje přenos glukózy z UDP-glukózy na glukóza-6-fosfát za vzniku trehalóza-6-fosfát a UDP (Cabib a Leloir 1958).

Poprvé byla tato reakce popsána u kvasinek a od té doby pozorována i u ostatních organismů, a to konkrétně hmyzu, a dále také u *Mycobacterium tuberculosis*, *Dictyostelium discoideum* a *Streptomyces hygroscopicus*. U ostatních různých druhů rodu *Streptomyces*, které také produkují trehalóza-6-fosfát, bylo zjištěno, že radši využívají GDP-glukózu jako glykosylového donora (Elbein 2003)

Jak bylo již naznačeno, TPS, která byla získaná z kvasinek, hmyzu či streptomycet, byla specifická buď pro UDP-glukózu nebo GDP-glukózu, žádný z těchto získaných enzymů nemůže použít oba glukosylové donory. Po důkladnějším prozkoumání bylo zjištěno, že TPS z *Mycobacterium smegmatis* byla enzymaticky aktivní se všemi přirozeně se vyskytujícími se nukleotidy obsahujícími glukózu (ADP-glukóza, CDP-glukóza, GDP-glukóza, TDP-glukóza a UDP-glukóza), z toho UDP-, ADP- a GDP-glukóza byly nejlepšími substráty pro tento enzym (Elbein 2003).

1.2.3 Enzymatická přeměna trehalóza-fosfátu na volnou trehalózu

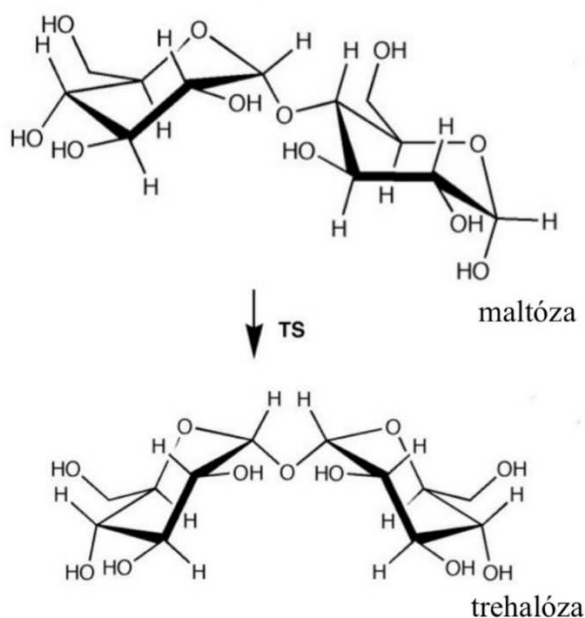
Většina buněk, které obsahují TPS také obsahují fosfatázu (trehalóza-6-fosfát fosfatáza, TPP), která dokáže přeměnit trehalóza-6-fosfát na volnou trehalózu. Tato fosfatáza je specifická pro trehalóza-fosfát a nemá žádnou enzymatickou aktivitu s jinými fosfátovými estery, jako je glukóza-6-fosfát, glukóza-1-fosfát, fruktóza-6-fosfát, glyceraldehyd-3-fosfát (Elbein 2003). Na obr. 2 je znázorněna nejčastější biosyntéza trehalózy, která zahrnuje přenos glukózy z UDP-glukózy nebo jiného glukózového cukerného nukleotidu na glukóza-6-fosfát za vzniku trehalóza-6-fosfátu pomocí TPS a následně defosforylaci pomocí TPP.



Obrázek 2 – Syntéza trehalózy. Převzato a upraveno z (Elbein 2003)

1.2.4 Alternativní cesty syntézy trehalózy

I přes to, že nejvíce využívanou cestou syntézy trehalózy, je syntéza za účasti dvou výše popsanych enzymů – trehalóza-fosfát syntázy a trehalóza fosfatázy, byly objeveny další možné reakce v bakteriích, které trehalózu produkují. V jednom z případů, enzym, trehalóza syntáza (TS) z *Pimelobacter* sp., katalyzovala intramolekulární přeměnu maltózy, kdy konvertovala α -1,4-glykosidickou vazbu tohoto disacharidu na α,α -1,1-glykosidickou vazbu trehalózy (Elbein 2003). Na obr. 3 je znázorněna alternativní cesta syntézy trehalózy pomocí enzymu TS, který katalyzuje intramolekulární přeskupení maltózy na trehalózu.



Obrázek 3 – Alternativní cesta syntézy trehalózy pomocí TS. Převzato a upraveno z (Elbein 2003)

Další možná z cest syntézy trehalózy v bakteriích zahrnuje konverzi maltooligosacharidů nebo škrobů na trehalózu. Termofilní archaebakterie patřící do rodu *Sulfolobus* mají takovou amylolytickou aktivitu, díky které produkují glukózu a trehalózu. Tato biosyntéza trehalózy probíhá ve dvou reakcích. V první reakci maltooligosyltrehalóza syntáza (TreY) katalyzuje konverzi maltodextrinu na maltooligosyltrehalózu. Ve druhé reakci poté maltooligosyltrehalóza trehalohydroláza (TreZ) hydrolyzuje produkt z předchozí reakce na volnou trehalózu. Reakce katalyzovaná TreY je intramolekulární transglukosylace pro tvorbu α,α -1,1-glykosidické vazby trehalózy (Elbein 2003).

1.3 FUNKCE A VYUŽITÍ TREHALÓZY

1.3.1 Funkce a využití trehalózy u živých organismů

Jednou z možných funkcí trehalózy v buňkách je zásobní funkce. Trehalóza může sloužit jako zásoba energie a uhlíku. Hladiny trehalózy v buňkách se liší dle typu buněk, fázi růstu buněk, nutričním stavu organismu nebo buňky a také podmínkách okolí, ve kterém se organismus nachází. U hmyzu je trehalóza hlavním cukrem v hemolymfě a svalech hrudi a je především využita při létání. Také je velice důležitou součástí spor hub, kde hydrolýza trehalózy je jedna z nejdůležitějších reakcí při ranném pučení a nejspíše slouží jako zdroj uhlíku pro syntézu a zdroj glukózy pro energii (Rousseau et al. 1972; Thevelein 1984).

Další z možných funkcí je stabilizační a ochranná funkce proteinů a membrán a ochrana před dehydratací. Voda je nezbytná k životu, některé organismy jsou však schopny přežít i při kompletní dehydrataci, kdy je z nich odstraněno až 99 % vody. Mezi tyto organismy patří rostliny, kvasinky, spory hub, ale také mikroskopičtí živočichové, a to hlístice, vířníci a cysty rodu *Artemia*. Některé organismy v tomto dehydratovaném stavu, kterému se také říká anhydrobióza, zůstávají delší dobu, dokud nenastanou příznivější podmínky, kdy je voda dostupná. Když tyto příznivé podmínky nastanou, dojde u těchto organismů k nasátí vody a k přechodu do aktivního stavu. Porozumění tohoto mechanismu může vést k vývoji nových metod pro uchování biologických materiálů, které jsou za normálních podmínek citlivé na vyschnutí (Crowe et al. 1984).

Anhydrobiotické organismy obecně obsahují vysoké koncentrace trehalózy (někdy i dalších disacharidů a oligosacharidů). Byla prokázána korelace mezi přežitím při absenci vody a syntézou trehalózy. Kultury kvasinek v log fázi mají velmi nízké koncentrace trehalózy, při přechodu do stacionární fáze růstu se hladiny trehalózy zvyšují, společně se schopností přežít při dehydrataci (Gadd et al. 1987).

Trehalóza může také sloužit jako ochrana před teplem i chladem. Stimul spouštějící reakci na teplotní šok v kvasinkách také způsobuje akumulaci trehalózy. Aspoň dvě podjednotky trehalóza-6 fosfát syntázového komplexu *Saccharomyces cerevisiae* jsou aktivně syntetizovány při teplotním šoku. Následně vyšší koncentrace trehalózy prokázaly ochrannou funkci vůči enzymům při teplotní inaktivaci. Trehalóza ochraňuje buňky před teplem pomocí stabilizace proteinů při vysoké teplotě. Dalším

ochranným mechanismem je schopnost trehalózy snížit agregaci proteinů, které již byly denaturovány. Při nízkých teplotách brání trehalóza denuraci a agregaci specifických proteinů. Také stabilizuje buněčnou membránu, jejíž fluidita se snižuje při nízkých teplotách (Elbein 2003)

Další z rolí funkce trehalózy je ochrana buněk před kyslíkovými radikály. Působení kyslíkových radikálů na buňky způsobuje poškození aminokyselin buněčných proteinů. Přítomnost trehalózy zabraňuje tomuto poškození buněčných proteinů tím, že volné radikály pohltní (Elbein 2003).

1.3.2 Funkce a využití trehalózy v potravinářském průmyslu

Teplota skelného přechodu je u trehalózy mimořádně vysoká. Disacharidy se obecně používají díky jejich stabilizačním efektům, pro kryokonzervaci a dehydratované prezervaci, díky tomu může být životnost daných produktů prodloužena (Crowe et al. 1998).

Před rokem 1995 v Japonsku a před začátkem nového století v USA a v Evropě, většina konzumované trehalózy pocházela z přírodních zdrojů – houby, kvasinky, fazole, mořské řasy, mušle, avšak příjem trehalózy z těchto zdrojů oproti přidaným cukrům v jídle je velmi nízký (Collins et al. 2019).

Celková konzumace trehalózy v USA byla odhadnuta na 21 g na člověka ročně, kdy přírodní zdroje tvoří pouze 0,3 g (Collins et al. 2019).

V polovině 90. let 20. století byla vyvinuta revoluční enzymová technologie založená na izolaci trehalózy ze škrobu, která se začala ve velkém měřítku využívat v potravinářském průmyslu, a to konkrétně v potravinách typu těstoviny, snídanové cereálie, sušené ovoce, zpracovaná zelenina, mléčné produkty, žvýkačky, mořské plody a zmrzlina. Sladkosti a cukrovinky tedy zabírají největší část potravin, do kterých se trehalóza přidává. Neustále rostoucí používání trehalózy do cukrovinek je také zapříčiněno díky její nízké intenzitě sladkosti a dlouhému udržení sladkosti. Nyní se denní příjem trehalózy, který byl v roce 2021 zjištěn jako všeobecně uznávaný jako bezpečný (Generally Recognized As Safe – GRAS), zvýšil na 85 g na osobu za den (FDA 2019).

Nadměrná konzumace přidaných cukrů byla spojována s rostoucím výskytem chronických onemocnění, jako např. diabetes, obezita, kardiovaskulární a jaterní onemocnění, rakovina a vada kognitivních funkcí (Rippe a Angelopoulos 2016). Mezi těmito onemocněními je diabetes jedno z nejvíce rozšířených metabolických onemocnění, což vede k velmi vážným zdravotním komplikacím. Během let byly formulovány různé formy léčby a léků, které by modulovaly glukózovou homeostázu u diabetických jedinců (Chen a Gibney 2023).

1.3.3 Funkce a využití trehalózy ve farmaceutickém průmyslu a medicíně

Trehalóza je schopná ochránit různé druhy biologických materiálů, včetně DNA, bílkovin, buněčných linií a tkání, což rozšířilo potenciál jejího využití v oblasti farmacie a biotechnologií (O'Neill et al. 2017). Trehalóza si také získává pozornost jako potenciální lék proti neurodegenerativním a kardiometabolickým onemocněním (Khalifeh et al. 2021). Bylo zjištěno, že má různé biologické působení, jako např. potlačení resorpce kostí a zánětu, indukce autofagie a zmírnění Huntingtonovy choroby (Liu et al. 2020; Lee et al. 2018).

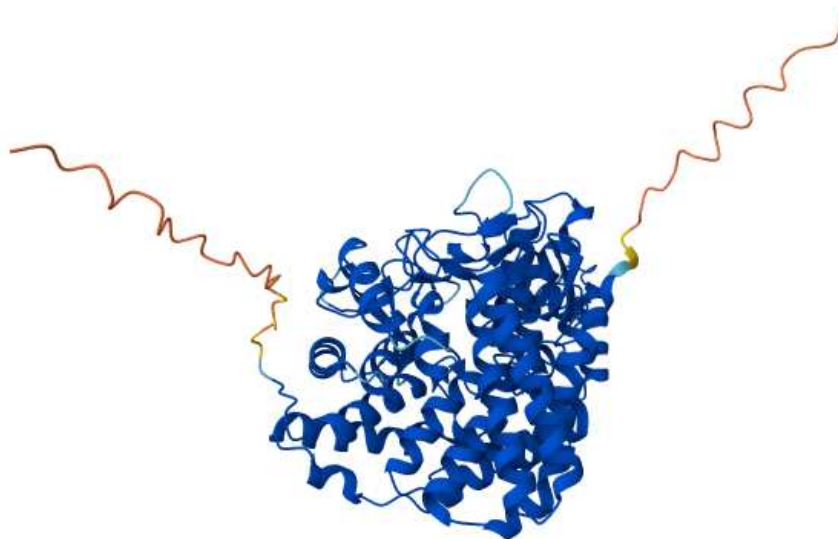
Jedním z předpokládaných biologických účinků trehalózy je schopnost potenciálně udržovat stabilní hladiny glukózy v krvi prostřednictvím pomalejšího uvolňování glukózy a mírnější reakce inzulinu ve srovnání s jinými monosacharidy a disacharidy (Yaribeygi et al. 2019; Yoshizane et al. 2017; Kozlov et al. 2023). Bylo zjištěno, že trehalóza nevyvolává výrazný nárůst hladiny cukru v krvi ani snížení sekrece inzulinu u vysokoškolských studentek ve srovnání s glukózou. Dále bylo prokázáno, že konzumace 25 g trehalózy rozpuštěné v 100 ml vody stimulovala produkci inzulinu a aktivovala inkretinové hormony vylučované enterokrinními buňkami tenkého a tlustého střeva jako reakci na příjem potravy, což následně vyvolává menší inzulinovou odpověď než glukóza (Yoshizane et al. 2017).

2 TREHALÁZA

α,α -Trehaláza je vnitřní glykoprotein, jehož aktivita byla objevena v ledvinách, játrech a tenkém střevě. Je to specifický enzym pro trehalózu a štěpí ji na dvě molekuly glukózy (Terra a Ferreira 2012).

2.1 STRUKTURA A VÝSKYT

Trehaláza patří do rodiny glykosyl hydroláz 37. Enzymy ze skupiny hydroláz katalyzují hydrolytické štěpení vazeb C-C, C-O, C-N, P-O a i další jiné vazby, včetně kyselých anhydridových vazeb (Kennelly et al. 2023). Trehaláza se vyskytuje ve dvou izoformách díky alternativnímu sestřihu, kdy vzniká více než jedna mRNA z přepisu stejného genu, díky různé kombinaci exonů a intronů (UniProt - O43280 2023, Zhang a Min 2005). První izoforma trehalázy je kanonickou sekvencí, což je standardní nebo referenční sekvence DNA, RNA nebo proteinu, která je považována za typickou pro daný gen nebo protein. Tato sekvence je používána jako základní model pro studium genetických variací, mutací a dalších biologických procesů (UniProt - O43280 2023). Na obr. 4 je znázorněna struktura první izoformy trehalázy.



Obrázek – Model první izoformy trehalázy (Jumper et al. 2021)

2.1.1 Primární struktura

Trehaláza se skládá z 583 aminokyselin (AMK). Její doménou je signální sekvence, což je peptid, který je přítomný na N-konci proteinu a je určen k sekreci nebo je součástí membránových složek. Tato signální sekvence, u trehalázy dlouhá 1–23 AMK, interaguje se signální rozpoznávací částicí a nasměruje ribozom do endoplazmatického retikula (ER), kde dochází ke ko-translačnímu vkládání. Signální peptidy jsou vysoce hydrofobní, ale mají některé kladně nabitě AMK. Za normálních okolností je signální sekvence odstraněna z rostoucího peptidového řetězce specifickými peptidázami (signální peptidázy) umístěnými na cisternální straně ER (UniProt - O43280 2023).

AMK 24–556 tvoří primární strukturu trehalázy a nachází se zde sedm vazebných míst pro substrát, a to konkrétně u AMK 168–168, 175–176, 212–212, 221–223, 286–288, 319–319, 529–529. V tomto polypeptidovém řetězci se také nachází dvě aktivní místa pro přeměnu substrátu na produkt, v případě trehalázy je to přeměna α,α -trehalózy na jednu molekulu α -D-glukózy a jednu molekulu β -D-glukózy. Tato dvě aktivní místa se konkrétně nachází u AMK 321–321 a 514–514 (UniProt - O43280 2023).

V hlavní části řetězce se také vyskytuje pět částí enzymu, které byly posttranslačně modifikovány. AMK 78–78, 239–239, 261–261, 369–369 byly modifikovány pomocí N-glykosylace. Při tomto procesu byl připojen N-acetylglukosamin prostřednictvím amidové vazby k postrannímu řetězci AMK Asn. Tato modifikace zajišťuje správné skládání enzymu při kalnexin/kalretikulín cyklu (Hang, 2010). Dále se u trehalázy nachází ještě jedno místo posttranslační modifikace, a to u AMK 556–556. Zde je trehaláza lipidována pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI), která je připojena přes amidovou vazbu k AMK Ser. Tato posttranslační modifikace slouží k uchycení enzymu k membráně (Kinoshita, 2016). AMK 47–141 a AMK 386–477 jsou antigenní sekvence pro navázání protilátek. Poslední částí primárního řetězce je propeptid, který je štěpen během zrání nebo aktivace enzymu. Po odštěpení nemá propeptid obvykle žádnou nezávislou biologickou funkci (UniProt - O43280 2023).

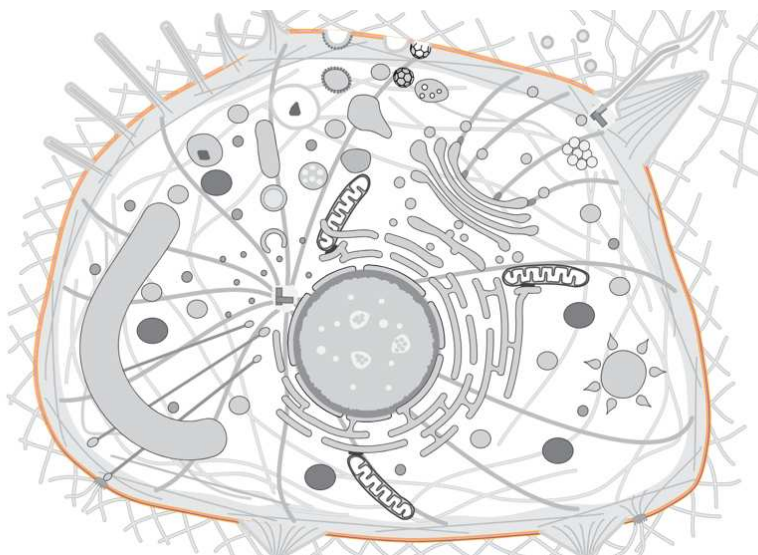
2.1.2 Kvartérní struktura a interakce

Kvartérní struktura definuje polypeptidové složení proteinu, a u oligomerního proteinu prostorové vztahy mezi jeho protomery nebo podjednotkami. Trehaláza

obsahuje dva polypeptidové řetězce a řadí se mezi homodimery, což znamená, že jsou oba dva polypeptidové řetězce stejné. Tyto polypeptidové řetězce jsou u trehalázy spojeny disulfidickým můstkem (UniProt - O43280 2023).

2.1.3 Výskyt v buňce

Trehaláza je v buňce ukotvená v buněčné membráně. Konkrétně je ukotvená pomocí GPI (UniProt - O43280 2023). GPI je lipidová kotva pro spoustu proteinů na buněčném povrchu. Představuje posttranslační modifikaci proteinu glykolipidem a používá se všudypřítomně u eukaryot. Takto ukotvené proteiny jsou zabudovány do buněčné stěny (Kinoshita, 2016). Na obr. 5 je zvýrazněné místo výskytu trehalázy v živočišné buňce – v buněčné membráně.



Obrázek 4 – Výskyt trehalázy v živočišné buňce (Le Mercier et al. 2022)

2.1.4. Exprese a klonování trehalázy

V roce 1996 byla izolována částečná cDNA pro lidskou renální trehalázu. Odvozená aminokyselinová sekvence je homologická s trehalázou králíka, potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) a bource morušového (Sasai-Takedatsu 1996, Ruf et al. 1990).

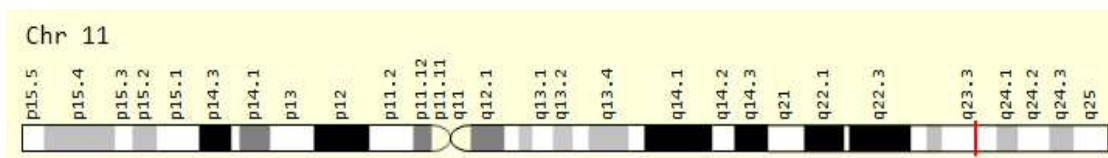
Exprese trehalázy metodou Northern blot byla prokázána pouze v ledvinách, tenkém střevě a játrech. Touto metodou byla také zjištěna mRNA renální trehalázy o velikosti 2,0 kb. Malé množství mRNA trehalázy bylo také objeveno ve slinivce břišní

(Ishihara et al. 1997). Ostatní studie zjistily, že aktivita lidské trehalázy v játrech byla mnohem nižší než v ledvinách (Van Handel, 1969). Tento rozpor nebyl ještě objasněn, ale je možné, že v lidských játrech existuje posttranskripční regulace exprese trehalázy (Ishihara et al. 1997).

Na základě screeningu cDNA ledvin s použitím částečné cDNA trehalázy, která byla analyzována (Sasai-Takedatsu 1996), byla lidská trehaláza naklonována do plné délky (Ishihara et al. 1997). Odvozený protein o 583 AMK má vypočtenou molekulovou hmotnost 66,6 kDa. Oesterreicher se svými spolupracovníky klonovali myší TREH, který kóduje odvozený protein o 576 AMK, a bylo zjištěno, že má 82% identitu s lidským TREH. Sekvence signatury trehalázy od AMK 162 do 175 myšičího TREH sdílí 100% shodu s odpovídající oblastí v lidském TREH. Analýzou Northern blot byla exprese TREH zjištěna pouze v myších ledvinách a tenkém střevě (Oesterreicher et al. 2001).

2.1.5 TREH gen – funkce a struktura

Gen TREH patří mezi geny kódující proteiny. Je tedy zodpovědný za kódování enzymu trehalázy. Tento gen se nachází na 11. chromozomu na proužku q23.3 v rozmezí 118,657,316–118,679,690. Velikost genu je 22 375 bází a orientace vlákna je minusová. Jedná se tedy o komplementární vlákno 3'-5'. Tento gen má pět transkriptů, které vznikly genetickou změnou v sekvenci DNA, jež se vyskytuje na hranici exonu a intronu. Jedná se o tzv. místo sestřihu, kdy tato změna může narušit sestřih RNA, což má za následek ztrátu exonů nebo začlenění intronů a změněnou sekvenci kódující protein. Dva z těchto transkriptů patří mezi protein kódující. Jedním z nich je transkript TREH-201, jehož délka párů bází je 2748 a který kóduje první izoformu trehalázy. Tento transkript obsahuje 15 exonů, je anotován s 18 doménami a funkcemi, spojen s 9884 variantními alelami a mapován na 530 oligo sond. Jedná se o jediný reprezentativní transkript, který má celkově nejvyšší pokrytí exonů, nejvyšší expresi, nejdelší kódující sekvenci a kóduje proteiny v plné délce (Ensembl 2024). Tento transkript byl objeven jak u lidí, tak i u myší. U myší byl však lokalizován na chromozomu 9, který sdílí homologii syntézy s lidským chromozomem 11q23.3 (Oesterreicher et al. 2001). Na obrázku 6 je znázorněna lokace genu TREH na chromozomu 11 a proužku q23.3.



Obrázek 5 – Lokace genu *TREH* na chromozomu 11 (*GeneCards - TREH, Stelzer et al. 2016*)

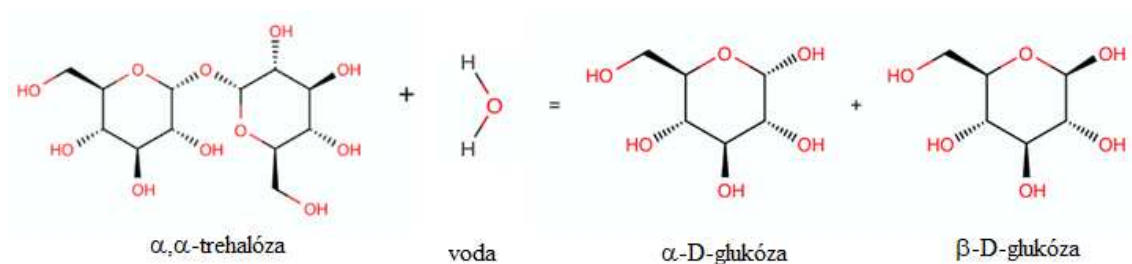
Druhý transkript genu *TREH*-202 patří mezi protein kódující. Obsahuje 14 exonů, je anotován s 18 doménami a funkcemi, asociován s 9477 variantními alelami a mapován 402 oligo sondami. Tento transkript kóduje druhou izoformu trehalázy, která není považována za kanonickou. Třetí transkript *TREH*-205 také kóduje protein, avšak jedná se o mRNA, která je podrobena nonsensem zprostředkovanému rozkladu (NMD – nonsense-mediated decay) (Ensembl 2024). NMD je buněčný mechanismus, kterým jsou identifikovány a degradovány molekuly mRNA obsahující předčasné terminační kodony (PTC – premature termination codon). Tyto mutace vytvářejí stop kodon dříve, než by se měl v normální sekvenci objevit (Kurosaki a Maquat 2016).

Tento proces zabraňuje produkci zkrácených a často nefunkčních nebo škodlivých proteinů, které by mohly vzniknout z takových chybných mRNA (Svidritskiy et al. 2018). Transkript má 13 exonů, je anotován pouze s 1 doménou a funkcí a asociován s 9458 variantními alelami a mapován 445 oligo sondami. Zbylé dva transkripty *TREH*-204 a *TREH*-203 nekódují proteiny a patří mezi tzv. zachované introny (RI – retained intron). RI jsou introny, které by za normálních okolností byly odstraněny v procesu sestřihu. RI jsou tedy v transkriptu ponechány z několika důvodů. Tyto zachované introny mohou ovlivnit stabilitu mRNA, což může vést k rychlejší degradaci mRNA, dále to může ovlivnit translaci a produkci funkčního proteinu a v některých případech může tento intron přidat novou funkčnost nebo regulační schopnosti k mRNA nebo proteinu (Grabski et al. 2021).

2.2 FUNKCE

Trehaláza je v tenkém střevě zodpovědná za štěpení trehalózy přijaté potravou (Bergoz, 1971). Fyziologická role trehalázy v ledvinách je zatím neznámá, protože trehalóza není přítomna v krvi. Kinetické studie s použitím inhibitorů trehalázy naznačují, že v aktivním centru trehalázy mohou být dvě oblasti, které jsou pro její funkci nezbytné – katalytické místo a rozpoznávací místo (Asano et al. 1996). Na obr. 7 je

znázorněna reakce štěpení trehalózy pomocí trehalázy na dvě molekuly glukózy, a to konkrétně α -D-glukózy a β -D-glukózy.



Obrázek 6 – Štěpení trehalózy za katalýzy trehalázou. Převzato a upraveno z (UniProt - O43280 2023)

V lidském zaživacím traktu, kromě hostitelsky produkované trehalázy, je také trehalóza metabolizována mikroby produkovanou trehalázou (Buckley et al. 2021). Mikroby mohou použít trehalázu k rozštěpení trehalózy na glukózu, co poté může být použito pro glykolýzu. Velké množství střevních bakterií produkuje trehalázu, a to konkrétně bakterie *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Blautia spp.* a *Bacillus spp.* (UniProt - O43280 2023). *Bacillus species* využívají trehalózu jako zdroj uhlíku přes osmolárně dependentní proces (Chen a Gibney 2023). Na základě studií vlastností lidské trehalázy v ledvinách a moči bylo zjištěno, že trehaláza v moči může být specifickým markerem poškození ledvinných tubulů (Sasai-Takedatsu 1996).

2.3 INHIBITORY A AKTIVÁTORY TREHALÁZY

Pro hmyz je trehalóza jedním z nejdůležitějších disacharidů. Není využívána pouze jako zásobárna energie, ale také jako doprovodná látka v chemických sloučeninách, kde stabilizuje strukturu bílkovin, čímž je bráněno buněčnému poškození a případné inaktivaci či denaturaci proteinů, které mohou nastat v důsledku vystavení stresu. Trehaláza u hmyzu katalyzuje přeměnu trehalózy na dvě molekuly glukózy, které jsou nezbytné pro létání a pro odolnost larvy proti stresu. Vzhledem k biologickému významu trehalózy a enzymů zpracovávajících trehalózu v patologických a fyziologických stavech, zejména pro důležitou roli glukózy odvozené od trehalózy při přežívání a vývoji larev, jsou inhibitory trehalázy v posledních letech považovány za zajímavý cíl pro výrobu nových insekticidů a fungicidů (Matassini et al. 2020).

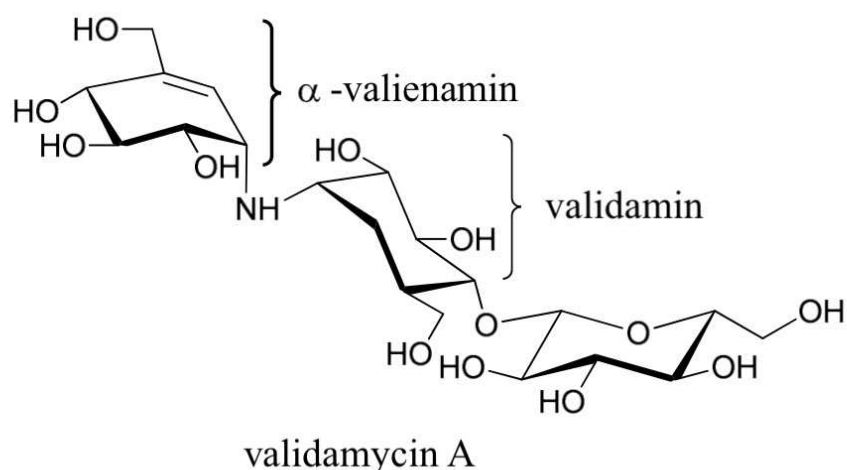
V současné době je naléhavým problémem hledání ekologických pesticidů, a proto se vzhledem k přítomnosti trehalázy i u savců stala specifita vůči hmyzímu

enzymu klíčovou pro vývoj léčiv, která jsou v zásadě bezpečná pro rostliny i savce (Bini et al. 2011). Inhibitory trehalázy jsou navíc považovány za cenné nástroje pro studium molekulární fyziologie funkce trehalázy a metabolismu cukrů u hmyzu (Wegener et al. 2003).

V minulosti bylo z přírodních zdrojů izolováno několik silných inhibitorů trehalázy. Tyto sloučeniny zahrnují pseudodisacharidové struktury a jejich glykosylderiváty obsahující cukr nebo polyhydroxylovaný karbocyklus (např. validamyciny, validoxylaminy, salbostatin a trehazolin). V nedávné době byly jako silné inhibitory trehalázy popsány také přírodní iminosacharidy. Iminosacharidy jsou dusíkatá glykomimetika, u nichž je dusík nahrazující kyslík ve vnitřním kruhu cukrů, a jsou široce známé jako inhibitory glykosidáz (Compain a Martin, 2007).

Nicméně izolace těchto přírodních inhibitorů je velmi náročná a drahá. Některé z těchto struktur nebyly nikdy získány v čisté chemické formě. Proto je vynakládáno velké úsilí na celkovou syntézu těchto analogů. Tato syntéza je velmi náročná kvůli přítomnosti několika sousedních asymetrických uhlíků, pro které je popsáno pouze několik specifických syntéz (Matassini et al. 2020).

Přestože jsou inhibitory trehalázy atraktivním cílem, dosud nebyly žádné vyvinuty jako komerční insekticidy. To lze přičíst nepříznivému příjmu rostlinami v důsledku vysoké hydrofilnosti těchto sloučenin. Bylo totiž prokázáno, že validamycin A, jediný inhibitor trehalázy, který byl od konce 60. let 20. století komerčně vyráběn (společností Takeda Chemical Industries) pro svůj léčebný účinek vůči patogenu *Rhizoctonia solani*, se chová jako proléčivo a je schopen tvořit aktivní pseudodisacharid inhibitoru trehalázy validoxylamin A *in situ* (Matassini et al. 2020). Na obrázku 8 je znázorněna struktura validamycinu A.



Obrázek 7 – Struktura validamycinu A. Převzato a upraveno z (Matassini et al. 2020)

Inhibitory na bázi sacharidů a karbocyklických sloučenin s pseudodisacharidovou strukturou (jako validoxylamin A) jsou velmi silnými inhibitory trehalázy, ale často nejsou specifické vůči hmyzí trehaláze, a proto nemohou být považovány za netoxické (Kyosseva et al. 1995; Asano et al. 1990). Účinnou alternativu zřejmě nabízí přírodní pseudodisacharid trehazolin, který vykazuje pozoruhodnou insekticidní aktivitu u larev různých druhů, ačkoli není toxický vůči myším. Nicméně trehazolin silně inhibuje prasečí ledvinovou trehalázu, obecný model pro savčí enzym, což naznačuje, že pro vývoj bezpečnějších inhibitorů je nutné hlubší pochopení inhibičního profilu (Matassini et al. 2020).

Mezi jedny z hlavních aktivátorů trehalázy patří protein 14-3-3 (Panni et al. 2008). Protein 14-3-3 je součástí rodiny, která patří do regulačních molekul exprimovaných ve všech eukaryotických buňkách. Jedna z pozoruhodných vlastností proteinu 14-3-3 je schopnost vázat množství funkčně rozmanitých signálních proteinů, včetně kináz, fosfatáz a transmembránových receptorů. Díky velkému množství interagujících proteinů má protein 14-3-3 důležitou roli v široké škále životně důležitých regulačních procesů, jako je přenos mitogenního signálu, apoptotická buněčná smrt a řízení buněčného cyklu (Fu et al. 2000).

Protein 14-3-3 váže fosforylovanou trehalázu a aktivuje ji. Fosforylace trehalázy je klíčová pro její aktivaci, kterou zprostředkovávají kinázy jako PKA (protein kinase A – protein kináza A) a poté dochází k vazbě na protein 14-3-3 (Panni et al. 2008).

Dalším aktivátorem trehalázy je i sama trehalóza a může být součástí regulačního cyklu enzymu. Jedny z posledních aktivátorů trehalázy jsou i faktory prostředí. Faktory jako stres a různé metabolické podmínky mohou nepřímo ovlivnit aktivitu trehalázy skrze změny v signalizačních drahách, které vedou k její fosforylaci a aktivaci (Panni et al. 2008).

3 DEFICIT TREHALÁZY

Deficit trehalázy patří mezi takzvané deficity disacharidáz. K poruše disacharidáz může v průběhu života docházet při nemocech nebo stavech, u kterých je poškozen kartáčový lem enterocytů tenkého střeva. Mezi tyto stavy patří například celiakie, Crohnova choroba, poškození sliznice tenkého střeva léky, alkoholem infekcí nebo rentgenovým zářením (Cohen 2016).

Je to metabolické onemocnění, kdy tělo postrádá funkční enzymy trehalázy a není schopné přeměnit trehalózu na glukózu. Patří mezi velmi vzácné deficity disacharidáz, avšak v Grónsku tímto onemocněním trpí 8 % obyvatelstva výsledkem autosomálně dominantní dědičnosti (Gudmand-HøSyer et al. 1988).

3.1 PŘÍČINY DEFICITU TREHALÁZY

Vyšší frekvence deficitu trehalázy se vyskytuje u domorodé populace Grónska, kdy byla zjištěna nízká aktivita trehalázy u 2 z 19 inuitských účastníků ve studii, která byla provedena u grónských Eskymáků v roce 1975 (Asp et al. 1975). V jiné studii byla nízká aktivita trehalázy pozorována u 8 % z 97 grónských občanů. Jinými slovy, deficit trehalázy je běžnější u grónských Inuitů než u Evropanů (Kozlov et al. 2023).

Vyšší prevalence u občanů Grónska byla nejdříve přisuzována endemické poruše, která byla nejspíše způsobena inuitskou stravou. Důkazů pro podporu této teorie nebylo dostatek, ale existovaly argumenty ve prospěch myšlenky o dědičné povaze deficitu trehalázy. V roce 2013 byl lokalizován trehalázový gen TREH na chromozomu 11q23 (Muller, et al., 2013). Bylo prokázáno, že substituce G→A na lokusu rs2276064 ovlivňuje aktivitu trehalázy, kdy nejvyšší je u nositelů GG*TREH genotypu, nejnižší u AA homozygotů a střední u AG heterozygotů. Studie prokázaly, že frekvence alely způsobující toto onemocnění byla mnohem vyšší u populace ruského severu a Grónska než u populace západní Evropy (Clemente et al. 2014). Primární deficit trehalázy je tedy způsoben genetickými změnami v TREH genu. V lékařské literatuře byly popsány jak autozomálně recesivní, tak autozomálně dominantní dědičné vzorce (MalaCards 2024).

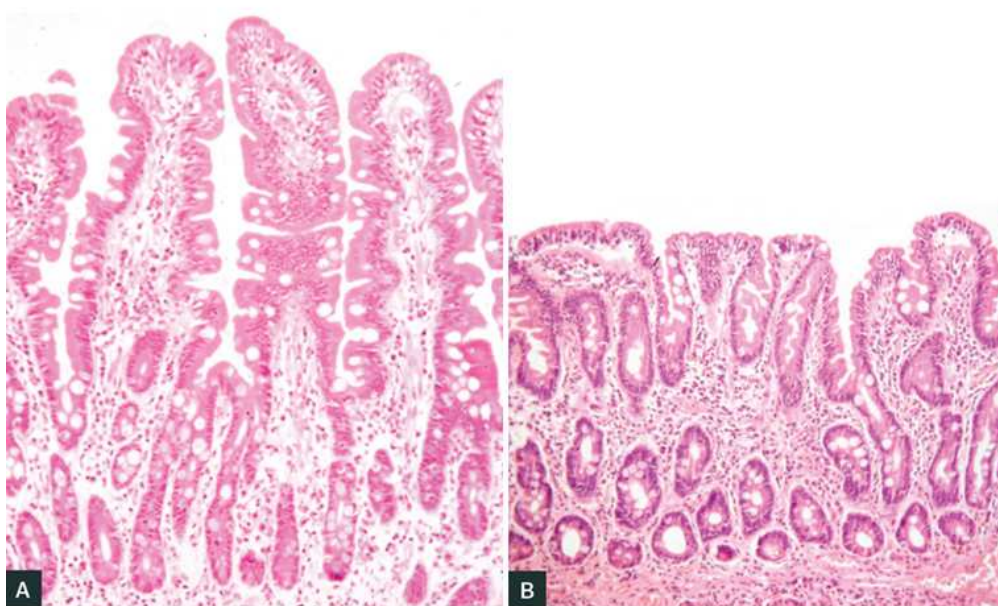
3.1.2 Komorbidita deficitu trehalázy s celiakií

Celiakie (CeD – celiac disease) je chronická imunitou zprostředkovaná enteropatie, kterou u geneticky predisponovaných jedinců vyvolává lepek ve stravě (Ludvigsson et al. 2013). Na vzniku celiakie se podílejí interakce genetických faktorů a vlivy zevního prostředí. CeD má těsnou genetickou vazbu na HLA antigeny DQ2 a DQ8 lokalizované na chromozomu 6p1, kdy tento genotyp má mnohem čtenější výskyt, než je výskyt celiakie (Šetinová et al. 2014). Bylo prokázáno několika multicentrickými studii, že pouze 0,4 % pacientů s celiakií je HLA-DQ2 a HLA-DQ8 negativních (Armstrong et al. 2011). Pro vznik celiakie je také rozhodující zvýšený transport makromolekul přes těsná spojení epitelových buněk střevní sliznice skládající se z více než 50 bílkovin, které mají složitou strukturu. Hlavní úlohu má peptid zonulin, který je součástí systému vrozené imunity a reguluje propustnost slizniční bariéry. Exprese tohoto peptidu je závislá na diverzitě střevního mikrobiotu, vlivu potravinových antigenů, virů, toxinů, alkoholu či poruchách výživy. Průnikem antigenu ze střevního obsahu do zevního prostředí dochází k aktivaci imunitní odpovědi, kdy hlavním antigenním komplexem lepků je α -gliadin, který je výrazně imunogenní (Sanders a Aziz 2012).

α -Gliadin reaguje s makrofágy a dendritickými buňkami střevní sliznice, kdy následně dochází k aktivaci adaptivní imunity, což vede ke stimulaci proliferace T-lymfocytů u geneticky predisponovaných jedinců. Těmito procesy dochází k rozvoji zánětlivých změn střevní sliznice a ke klinickým projevům celiakie (Aziz a Sanders 2012). Histologické změny v klcích tenkého střeva, které jsou způsobeny celiakií, mohou vést k rozvoji enzymopatie (Lebenthal 1975).

Diagnostika tohoto onemocnění je založena na průkazu enteropatie v biopsii tenkého střeva, kde histologické vyšetření prokazuje vilózní atrofii, hyperplazii krypt a interepiteliální lymfocytózu a přítomnost cirkulujících CeD specifických protilátek proti tkáňové transglutamináze (tTG – tissue transglutaminase), deamidovaným gliadinovým peptidům (DGP – deamidated gliadin peptide) a endomysiu (EMA – endomysial antibody, endomysiální protilátka). U dětí, které mají příznaky svědčící pro CeD, se vyskytuje silně pozitivní titer tTG protilátek (tTGA – tissue transglutaminase antibodies, protilátka proti tkáňové transglutamináze) a HLA (HLA – hlavní histokompatibilní komplex, human leukocyte antigen) genotyp spojený s CeD, může být diagnóza CeD možná bez nutnosti biopsie tenkého střeva (Husby et al. 2012). Na

obrázku 9 je porovnání vzorků biopsie tkáně zdravého tenkého střeva a tenkého střeva s vilózní atrofií.



Obrázek 8 – Zobrazení biopsie tkáně tenkého střeva. a) zdravá tkáň tenkého střeva; b) tkáň tenkého střeva s vilózní atrofií (Tye-Din 2018)

3.2 PREVALENCE DEFICITU TREHALÁZY

V roce 2022 byl publikován článek komentující studii, která byla provedena v rámci projektu Antropologie euroasijských populací realizovaného Anuchinovým výzkumným ústavem a muzeem antropologie. Tato studie byla součástí státního úkolu pro Výzkumné centrum lékařské genetiky. Cílem této studie bylo analyzovat frekvenci TREH alel a genotypů (rs22776064 TREH) u severních populací a domorodých populací Sibíře a Dálného ruského východu. V této studii bylo celkem zkoumáno 713 vzorků, kdy 567 z nich bylo získáno od málopočetných domorodých populací Sibíře a Dálného ruského východu a 146 vzorků bylo získáno od Východoslovanské populace Běloruska a Jižní Sibíře. Vzorky Východoslovanské populace Běloruska a Jižní Sibíře představovaly referenční soubor dat (Kozlov et al. 2023).

Všechny analyzované skupiny, včetně geograficky blízkých Severo-záposibiřských populací se významně lišily ve frekvenci alely A*TREH ($p < 0,001$) od referenční skupiny východních Slovanů. Poměr zkoumaných

homo- a heterozygotních genotypů nám ukazuje, že na 3–4 heterozygoty GA*TREH (středně snížená aktivita trehalózy) připadá 1 homozygot AA*TREH (těžká malabsorpce trehalózy). Z gastroenterologického pohledu by to znamenalo, že až 5 % Rusů, Ukrajinců a Bělorusů je geneticky predisponováno k malabsorpci trehalózy. Tyto odhady dávají představu o skutečné prevalenci deficitu trehalózy u hlavních slovanských populací Ruska. Jsou v souladu s výsledky klinických a genetických studií provedených u populací kavkazského původu z jiných oblastí světa. Frekvence A*TREH alely se zvyšuje směrem na východ (Kozlov et al. 2023).

Toto zjištění se shoduje s výsledky rozšíření alely A*TREH, které byly již dříve zaznamenány v předchozích studiích velmi malých počtů vzorků (Gudmand-HøSyer et al. 1988; Welsh et al. 1978). B.A. Malyarchuk a M.V. Derenko shrnuli své výsledky předchozích studií a některá publikovaná data z celoexomového sekvenování pro různé světové populace. Bylo zjištěno, že A*TREH alela se vyskytuje u 0,6 % africké populace, 1,9 % evropské populace a 4,4 % jihoasijské populace. Uvádí se, že frekvence této alely dosahuje 31–32 % u populací střední Asie a 58 % u populací dálného severovýchodu (Malyarchuk a Derenko 2017).

Populace zahrnuté do této analýzy s výjimkou referenčního souboru dat představovaly malé domorodé národy, které žily tradičním způsobem života až do první třetiny 20. století. Výrazné změny v jejich životním stylu a stravě začaly v 60. letech 20. století. Ke konci 20. století prošla strava velkou modernizací. Konkrétně došlo k prudkému nárůstu spotřeby sacharidů, včetně stolního cukru a sladkostí. Je také důležité zohlednit diverzitu konzumovaných cukrů v potravě. Na začátku minulého století byl v potravě převažujícím disacharidem především stolní cukr (sacharóza), na konci 20. století byl jeho podíl na celkové energetické hodnotě konzumovaných potravin téměř stejný jako podíl ostatních sladkostí, včetně čokolády, limonád a dezertů (Kozlov et al. 2023).

V současné době tvoří sladkosti, skládající se z různých druhů disacharidů, téměř třetinu cukrů konzumovaných denně. To znamená, že v době tradiční stravy mohly být cukry tráveny pouze několika enzymy (sacharázou, laktázou), dnes je k metabolizaci třetiny až poloviny konzumovaných cukrů potřeba celý komplex enzymů (Kozlov et al. 2023).

3.3 DOPADY DEFICITU TREHALÁZY

Tento deficit se nejčastěji projevuje bolestmi břicha, rektální flatulencí, zvracením a průjmem po konzumaci potravin, které trehalózu obsahují. Průjem je u pacientů s deficitem trehalázy vyvolaný pomocí osmózy, která je způsobena nerozštěpenými sacharidy, které zůstávají v průsvitu tenkého střeva (Gudmand-HøSyer et al. 1988). Velmi často bývají deficity trávicích enzymů spojovány s funkční dyspepsií. Funkční dyspepsie je jedno z nejčastějších gastrointestinálních onemocnění. Díky tomu, že je tak časté, patří mezi klinické problémy značného významu vzhledem k vysoké míře prevalence a chronické a recidivující povaze symptomů (Sayuk a Gyawali 2020). Symptomy funkční dyspepsie zahrnují pocit diskomfortu, tlaku v břiše, plnosti po jídle, říhání, pyrózy, přelévání ve střevech, nadýmání. Vývoj léků pro funkční dyspepsii je velice obtížný vzhledem k heterogenitě této patologie, a skutečnosti, že patofyziologické mechanismy nejsou plně známy (Ullah et al. 2023).

Nejčastější první intervencí při těchto problémech je změna životního stylu a vyvarování se: konzumace potravin s vysokým obsahem tuku, alkoholu a velkého množství kávy, kouření a užívání NSAID (nesteroidní protizánětlivé léky – léky, které fungují jako analgetika, antipyretika, antiflogistika) (Majeed et al. 2018).

Jak již bylo v předchozích kapitolách uvedeno, deficit trehalázy je způsoben nosičstvím TREH alel a genotypů (rs2200776064 TREH). Bylo zjištěno, že nosičství alely A v lokusu rs2276064 genu TREH zvyšuje riziko rozvoje diabetu 2. typu (T2DM) (Muller et al. 2013).

Existují důkazy, které naznačují možnou souvislost mezi nedostatkem trehalázy a T2DM. V roce 2012 byl proveden výzkum, který identifikoval genetické odchylky v genu TREH a T2DM. Díky tomuto výzkumu, který byl proveden na indiánské populaci kmene Pima, bylo zjištěno, že některé SNP (single nucleotide polymorphism – jednonukleotidové polymorfismy) v genu TREH jsou významně spojeny s T2DM. SNP rs558907 vykazoval reprodukovatelnou asociaci s T2DM napříč různými vzorky, což naznačuje potenciální genetický vliv na riziko vzniku tohoto onemocnění (Muller et al. 2013).

Je důležité poznamenat, že ačkoli tyto genetické odchylky souvisí jak s aktivitou trehalázy, tak s T2DM, přesný mechanismus, kterým ovlivňují riziko rozvoje diabetu,

nemusí přímo souviset se samotnou aktivitou trehalázy. Místo toho mohou tyto genetické markery označovat jiný blízký lokus, který přispívá k riziku T2DM. K objasnění přesné úlohy trehalázy v patofyziologii T2DM a k pochopení, zda by úprava aktivity trehalázy mohla mít terapeutické důsledky pro zvládnání nebo prevenci T2DM, jsou zapotřebí další studie (Muller et al. 2013).

3.4 STANOVENÍ DEFICITU TREHALÁZY

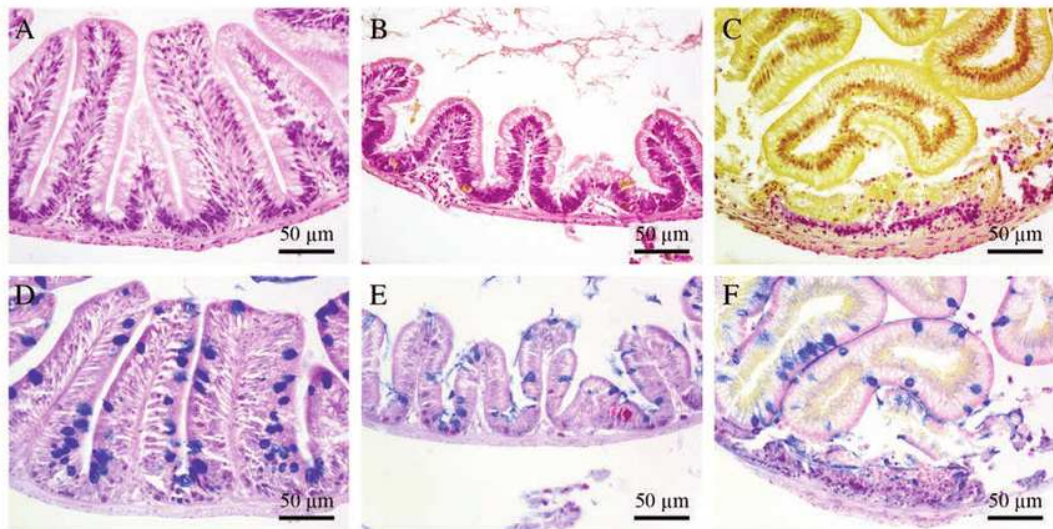
Stanovení tohoto deficitu je velmi složité, jelikož klinické symptomy tohoto onemocnění jsou velmi podobné symptomům ostatních enzymopatií asociovaných se sacharidy. Hlavní způsob stanovení deficitu trehalázy je analýza enzymatické aktivity ve střevních klcích, kdy vzorky střevních klků mohou být získány pouze pomocí biopsie (Muller et al. 2013). Následně se pak vzorky získané biopsií zkoumají pomocí imunochemických metod. Biopsie však patří mezi velmi invazivní metody, a proto je používána pouze pro klinickou praxi a není vhodná pro studie populací. Nicméně existují i méně invazivní metody stanovení, jako například: trehalózové testy pro stanovení krevní glukózy a dechové testy, které jsou také citlivé (H. Arola et al. 1999).

3.4.1 Histochemické metody pro stanovení deficitu trehalázy

Bioptické vzorky tenkého střeva jsou zasílány k histochemickému vyšetření pro stanovení deficitu trehalázy. Tyto vzorky jsou odebírány během gastrokopického vyšetření pomocí speciálních odběrových sond z duodena. Excize zasahují sliznici a případně i přilehlou část podslizničního vaziva, přičemž při jednom zavedení nástroje jsou většinou odebírány čtyři vzorky. Polovina těchto vzorků je fixována na 1–2 hodiny vychlazeným Bakerovým formolem a následně šetrně zalita do parafínu. Parafínové řezy jsou barveny hematoxylin-eosinem, PAS (Periodic Acid Schiff) reakcí a alcianovou modří pro znázornění hlenu, pohárkových buněk a kartáčového lemu. Barvení hematoxylin-eosinem je používáno k vizualizaci celkové morfologie (tloušťka střevní stěny a architektura epiteliálních záhybů), zatímco barvení PAS umožňuje detekovat pohárkové buňky produkující hlen a infiltrující eosinofily (Uyttebroek et al. 2020).

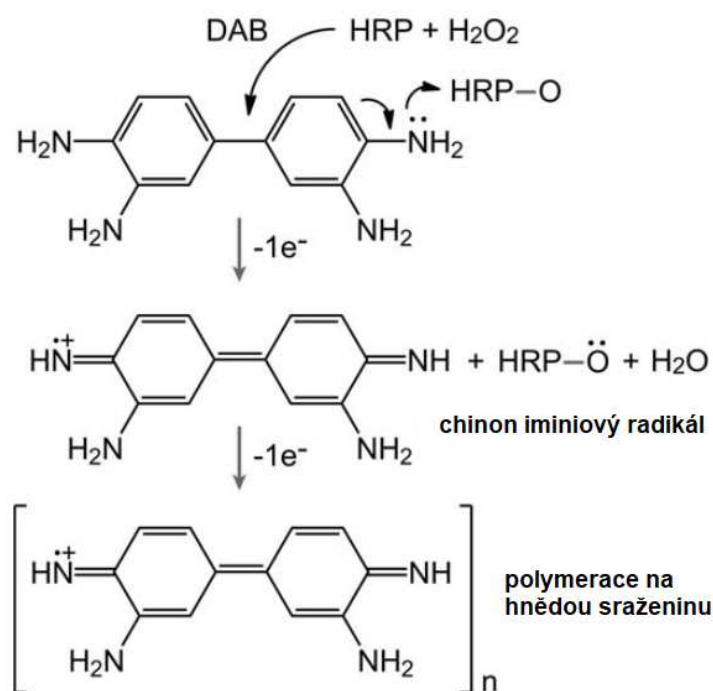
Slizniční reliéf a kartáčový lem jsou znázorněny reakcí na alkalickou fosfatázu, lysozomy kyselou fosfatázou, a plazmatická bazofilie methylzelení s pyroninem. Druhá polovina vzorků je položena na suchý led a kryostatové řezy jsou použity

k histochemickým enzymatickým reakcím na laktázu, trehalázu a sacharázu pro stanovení deficitu disacharidáz (Dvořák et al. 2008). Na obrázku 10 je znázorněno barvení vzorků tenkého střeva, kdy vzorky A, B, C jsou barveny hematoxylin-eosinem a D, E, F jsou barveny alcianovou modří spolu s PAS.



Obrázek 9 – Histologické barvení vzorků tenkého střeva (Uyttebroek et al. 2020)

Přítomnost endogenních disacharidáz je prokazována při podezření jejich deficitu. Disacharidázy prokazujeme s exogenní peroxidázou a glukózooxidázou. Disacharidáza odštěpí z disacharidu glukózu, ta se oxiduje glukózooxidázou na glukonát ze vzniku peroxidu vodíku. Peroxidázou uvolněný kyslík oxiduje diaminobenzidin (DAB – diaminobenzidin) na hnědou sraženinou (obrázek 11) (Dvořák et al. 2008).



Obrázek 10 – Přeměna diaminobenzidinu na hnědou sraženinu. Převzato a upraveno z (Nurjayadi et al. 2016)

3.4.2 Genetické metody pro stanovení deficitu trehalázy

Genetickými metodami ke stanovení deficitu trehalázy jsou MPS/NGS (MPS – massively parallel sequencing, masivní paralelní sekvenování; NGS – next generation sequencing, sekvenování nové generace), Sangerova metoda ukončení řetězce nebo analýza mRNA. Nejčastěji používanou metodou je však MPS/NGS, která se využívá k WES (whole exome sequencing, celoexomové sekvenování). Analýza mRNA by musela být provedena ze tkáně, kde dochází k expresi (Vinkšiel et al. 2021).

Technika MPS je vysoce výkonná metoda používaná ke stanovení části nukleotidové sekvence genomu jedince. Tato technika umožňuje paralelní sekvenování milionů krátkých DNA fragmentů, což je zásadní pokrok oproti tradičním metodám Sangerova sekvenování. Většina technik sekvenování druhé generace je založena na sekvenování syntézou, kdy se jedná o sériové prodloužení primed templátu enzymem, který je buď polymeráza (metoda 454) nebo ligáza (metoda SOLiD) (Bruijns et al. 2018).

Mezi jedny z výhod MPS/NGS patří to, že umožňují paralelní sekvenování milionů fragmentů DNA, což dramaticky zvyšuje rychlost a efektivitu sekvenování ve srovnání se Sangerovým sekvenováním, které sekvenuje pouze jeden fragment najednou (Bagger et al. 2024).

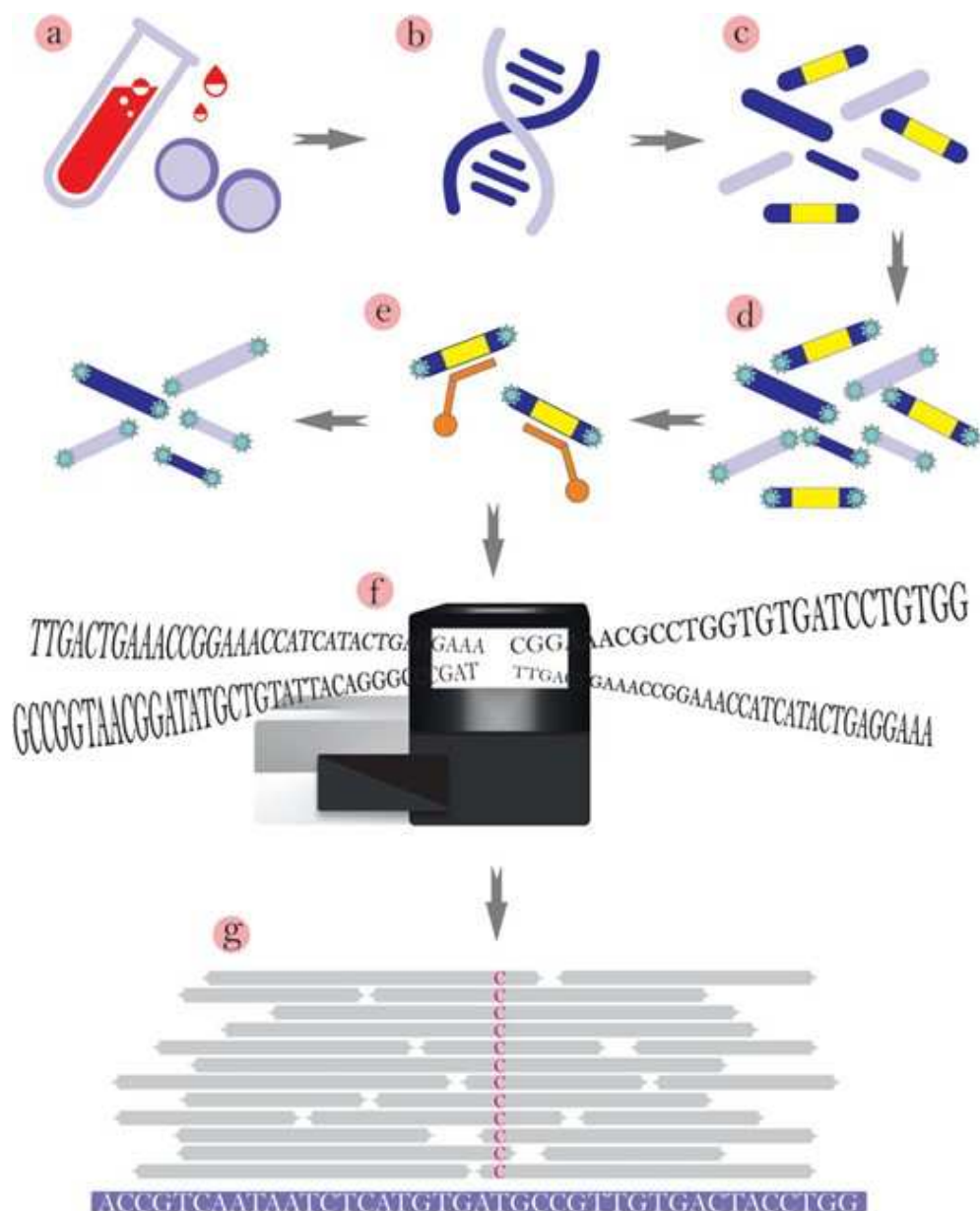
Další výhodou je vysoká průchodnost, což umožňuje analýzu velkých genomů nebo exomů v relativně krátkém čase. Díky tomu se NGS stává vhodnou metodou pro rozsáhlé studie genetických variací v populacích a pro diagnostiku genetických chorob v klinickém prostředí. Poslední z výhod NGS, které je třeba jmenovat je flexibilita. Různé platformy NGS, jako jsou Illumina, Ion Torrent a PacBio, nabízejí různé možnosti v délce čtení, přesnosti a kapacitě dat, což umožňuje výběr vhodné technologie podle specifických požadavků projektu (Seaby et al. 2016).

Ke stanovení deficitu trehalázy se metoda NGS používá k celoexomovému sekvenování. Prvním krokem k WES je získání vysoce kvalitní genomové DNA (gDNA – genome DNA, genomová DNA) z biologického vzorku. Nejčastěji se jedná o gDNA extrahovanou z leukocytů periferní krve. Mezi běžné metody extrakce patří technika solení a metody založené na spinových kolonách. gDNA je možné také získat ze slin, jedná se tedy o neinvazivní alternativu k venesekci, avšak je to na úkor kvality a kvantity, zejména pokud jde o riziko kontaminace DNA ústní mikroflórou a zbytky potravy (Kidd et al. 2014). Dalším zdrojem gDNA jsou histopatologické vzorky fixované formalínem a zalité v parafínu a také vzorky z nádorových onemocnění (Bao et al. 2014).

Po extrakci DNA následuje příprava obohacené knihovny exomu. Mezi běžně používané soupravy pro záchyt exomů patří Agilent, Illumina a NimbleGen. Kdy výběr vhodného produktu je ovlivněn výhodami a nevýhodami daných souprav pro záchyt exomu. Navzdory jejich rozdílům se všechny technologie záchytu řídí stejnými třemi základními principy a to: fragmentace DNA, ligace adaptorů a obohacení cíle (Seaby et al. 2016). gDNA je náhodně fragmentována buď mechanicky ultrazvukovými metodami nebo biologicky enzymatickým štěpením (Van Dijk et al. 2014).

Konce fragmentů jsou následně zkráceny a spojeny pomocí adaptorů. Po přípravě knihovny následuje cílené obohacení exonických oblastí, kdy se metody u jednotlivých záchytných platforem liší. Po obohacení exonů je výsledná zachycená knihovna podrobena vysoce výkonnému MPS, které produkuje miliony krátkých čtení. Mezi

současné sekvenční platformy patří Life Technologies SOLiD, 454 Genome Sequencer společnosti Roche nebo řada sekvenátorů HiSeq společnosti Illumina, která používá přístup sekvenování syntézou. Sekvenování předního i zadního vlákna umožňuje vytvářet čtení s párovým koncem, což poskytuje informace s delším rozsahem než jednotlivá čtení. Při výpočetním mapování na referenční sekvenci lidského genomu nám tato metoda přináší větší přesnost zarovnání. Tento proces mapování cílů umožňuje identifikovat změny kódujících nukleotidů a sestřihových míst v DNA pacienta, které se liší od referenční sekvence (Seaby et al. 2016). Na obrázku 12 je zobrazen metodický postup při celoexomovém sekvenování.



Obrázek 11 – Metodický postup při celoexomovém sekvenování (Seaby et al. 2016)

a) Odběr vzorku krve obsahující periferní lymfocyty. **b)** Extrakce gDNA z bílých krvinek pomocí extrakčních souprav nebo metodou solení a hodnotí se její kvalita a množství. **c)** Fragmentace DNA buď sonikací, nebo enzymatickými metodami, které se u jednotlivých knihovnických preparátů liší. **d)** Úprava konců fragmentů odstraněním převislých nukleotidů a navázání adaptorů (zde znázorněny jako hvězdičky) na jejich konce. Žluté obdélníkové oblasti uvnitř fragmentů zde představují exony přítomné ve fragmentech DNA. **e)** Hybridizační zachycení ve vodní fázi obohacuje exonové sekvence ligací fragmentů na biotinylované sondy. Obohacená knihovna exonických fragmentů se eluuje a amplifikuje. **f)** Výsledná knihovna exomu je sekvencována pomocí MPS, čímž se získá miliony sekvenovaných čtení. **g)** Získaná data jsou zarovnána s referenční sekvencí lidského genomu a následně analyzována.

3.5 LÉČBA DEFICITU TREHALÁZY

U léčby tohoto deficitu se musí zohlednit ten fakt, zdali se jedná o deficit primární nebo sekundární a také se musí brát v úvahu zjištěné enzymové deficity tenkého střeva. Primární deficit je způsobený genetickou mutací genu TREH a dochází tedy ke snížené expresi enzymu trehalázy a může se manifestovat až v dospělosti. V tomto případě je nutné eliminovat příjem trehalózy z potravy celoživotně. Z přirozených zdrojů trehalózy je sledována především konzumace hub, mořských plodů, řas, pekařského droždí a medu. Všechny přírodní zdroje trehalózy se doporučuje z jídelníčku vyloučit a také se doporučuje omezit potencionální zdroje potravy, kde je trehalóza přidána jako aditivum (NORD 2024).

Kategorie potravin, ve kterých se průmyslově vyráběná trehalóza používá jsou zmrzliny, zeleninové pomazánky, ovocné přesnídávky, slazené nápoje včetně ovocných džusů, sladkosti (bonbóny), tyčinky, sušené ovoce, bílá čokoláda, polevy, mouky a těstoviny, sušenky, koláče a pečivo, rybí polotovary, žvýkačky. Dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č.1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům výrobci nemají povinnost uvádět tuto látku na obalech (EU-1169/2011 2011; WHO 2001).

V případě sekundárního deficitu trehalázy je důležité se nejdříve zaměřit na primární onemocnění (nejčastěji enteropatie způsobené celiakií) a dodržovat dietní opatření pro léčbu primárního onemocnění a zároveň po dobu léčby omezit trehalózu. Po zalečení primárního onemocnění a odznění obtíží, se může pomalu zvyšovat příjem trehalózy v potravě, jelikož se předpokládá postupné zvýšení aktivity trehalázy. Při sestavení vhodného nutričního plánu je nutné brát v úvahu zjištěné enzymové deficity sliznice tenkého střeva komplexně. Izolovaný deficit trehalázy s plně aktivními dalšími enzymy disacharidáz se vyskytuje velmi vzácně. Proto se musí zohlednit i případný deficit aktivity laktázy, sacharázy, který se manifestuje stejnými příznaky jako deficit trehalázy (Reed a Pacheco 2019; Puertolas a Fifi 2018; AllergyInsight 2022).

Při deficitu laktázy se jedná o deficit enzymu štěpící mléčný cukr laktózu. Laktóza je kromě mléka a mléčných výrobků obsažena v mnoha dalších produktech. Na rozdíl od trehalózy lze přítomnost laktózy v potravinách zjistit z ingrediencí. Při omezování laktózy je vhodné vyřadit z jídelníčku produkty, které mají v ingrediencích uvedeno

mléko, smetanu, sušené mléko, syrovátku a máslo. Při tomto vyloučení je potřeba myslet na substituci vápníku z jiných zdrojů jako jsou ryby, zelenina, ořechy, případně potravinové doplňky (Deng et al. 2015).

U deficitu aktivity enzymu sacharázy, který štěpí sacharózu (řepný cukr), je nutné kontrolovat příjem sacharózy – slazení nápojů, konzumace sladkého pečiva a sladkostí. Sacharóza se ve vysokém množství vyskytuje v ochucených snídaňových cereáliích, cereální tyčinkách, čokoládě, čokoládových tyčinkách a oplatkách, sladkých pomazánkách, džemech, ale např. také v soleném arašídovém másle, kečupu, majonéze, salátových dresincích, luštěninách apod. Obecně platí, že je vhodné vyloučit potraviny, které v seznamu ingrediencí uvádějí cukr na některém z prvních čtyř míst. Také je potřeba věnovat pozornost ovoci, které kromě fruktózy obsahuje již právě zmíněnou sacharózu. Obsah sacharózy závisí na jednotlivých druzích ovoce. Zároveň je vhodné omezit i některou zeleninu s vysokým obsahem sacharózy (Foley et al. 2022; Cohen 2016).

Dietu při snížené aktivitě disacharidáz, tedy při intoleranci laktózy, sacharózy a trehalózy, lze sestavit z běžných potravin vyvážené racionální stravy, tak aby obsahovala potřebné složení živin a zabránilo se případné malnutrici pacienta (Viswanathan a Rao 2023).

ZÁVĚR

Deficit trehalázy se dělí na primární a sekundární. Primární deficit trehalázy je vzácné genetické onemocnění, které významně ovlivňuje metabolismus sacharidů a kvalitu života postižených jedinců. Sekundární deficit trehalázy bývá často doprovázen deficitem ostatních střevních disacharidáz. V mnoha případech je sekundární deficit trehalázy způsoben poškozením klků tenkého střeva důsledkem celiakie. V této práci jsem se zaměřila na analýzu příčin, klinických projevů, diagnostických metod a možností léčby tohoto onemocnění.

Hlavní příčinou primárního deficitu trehalázy jsou mutace v TREH genu, které vedou k nedostatečné syntéze nebo funkci enzymu trehalázy. Primární deficit trehalázy má nejvyšší prevalenci u obyvatel Grónska. Enzym trehaláza je klíčový pro štěpení trehalózy na dvě molekuly glukózy, a jeho nedostatek způsobuje neschopnost správně trávit trehalózu obsaženou v potravě. Výsledkem jsou gastrointestinální potíže, jako je průjem, nadýmání a bolest břicha.

K diagnostice deficitu trehalázy se používají moderní genetické metody, jako je sekvenování celého exomu. Tyto genetické diagnostické metody umožňují přesnou identifikaci genetických mutací a poskytují hlubší náhled do molekulárních mechanismů onemocnění. Tyto metody jsou doplňovány tradičními biochemickými testy, kterými je měřena aktivita trehalázy ve vzorcích střevní biopsie.

Léčba deficitu trehalázy je především zaměřena na dietní opatření, která u primárního deficitu zahrnují celoživotní vyloučení potravin bohatých na trehalózu z jídelníčku. U sekundárního deficitu je nejdříve potřeba zaléčit primární onemocnění vhodným dietním režimem zároveň s vyloučením trehalózy z jídelníčku. Po zaléčení primárního onemocnění a odznění obtíží, je poté vhodné postupně zařazovat potraviny obsahující trehalózu.

Závěrem lze konstatovat, že deficit trehalázy je složité vzácné onemocnění s významnými dopady na zdraví a kvalitu života pacientů. Včasná a přesná diagnostika, společně s individualizovanou léčbou, jsou klíčové pro efektivní management tohoto onemocnění.

CITOVANÁ LITERATURA

ALLERGYINSIGHT, 2022. *AllergyInsight* [online]. Dostupné z: <https://www.allergy-insight.com/trehalose-intolerance/>.

ARMSTRONG, D., et al., 2011. Testing for Gluten-Related Disorders in Clinical Practice: The Role of Serology in Managing the Spectrum of Gluten Sensitivity. *Canadian Journal of Gastroenterology* [online]. **25**(4), 193–197 [vid. 2024-06-08]. ISSN 0835-7900. Dostupné z: doi:10.1155/2011/642452.

ASANO, N., et al., 1996. Two Subsites on the Active Center of Pig Kidney Trehalase. *European Journal of Biochemistry* [online]. **240**(3), 692–698 [vid. 2024-05-26]. ISSN 0014-2956, 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0692h.x.

ASANO, N., et al., 1990. Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *The Journal of Antibiotics* [online]. **43**(6), 722–726 [vid. 2024-06-17]. ISSN 0021-8820, 1881-1469. Dostupné z: doi:10.7164/antibiotics.43.722.

ASP, N. G., et al., 1975. Intestinal disaccharidases in Greenland Eskimos. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. **10**(5), 513–519. ISSN 0036-5521.

AZIZ, I., a D. S. SANDERS, 2012. The Irritable Bowel Syndrome-Celiac Disease Connection. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* [online]. **22**(4), 623–637 [vid. 2024-06-08]. ISSN 10525157. Dostupné z: doi:10.1016/j.giec.2012.07.009.

BAGGER, F. O., et al., 2024. Whole genome sequencing in clinical practice. *BMC Medical Genomics* [online]. **17**(1), 39 [vid. 2024-06-11]. ISSN 1755-8794. Dostupné z: doi:10.1186/s12920-024-01795-w.

BAO, R., et al., 2014. Review of Current Methods, Applications, and Data Management for the Bioinformatics Analysis of Whole Exome Sequencing. *Cancer Informatics* [online]. **13s2**, CIN.S13779 [vid. 2024-06-11]. ISSN 1176-9351, 1176-9351. Dostupné z: doi:10.4137/CIN.S13779.

BINI, D., et al., 2011. Trehalose mimetics as inhibitors of trehalose processing enzymes. In: Amelia PILAR RAUTER a Thisbe LINDHORST, ed. *Carbohydrate Chemistry* [online]. 1. vyd. B.m.: The Royal Society of Chemistry, s. 259–302 [vid. 2024-05-26]. ISBN 978-1-84973-154-6. Dostupné z: doi:10.1039/9781849732765-00259.

BRUIJNS, B., R. TIGGELAAR a H. GARDENIERS, 2018. Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *ELECTROPHORESIS* [online]. **39**(21), 2642–2654 [vid. 2024-06-11]. ISSN 0173-0835, 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201800082.

BUCKLEY, A. M., et al., 2021. Trehalose-Induced Remodelling of the Human Microbiota Affects *Clostridioides difficile* Infection Outcome in an In Vitro Colonic Model: A Pilot Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **11**, 670935 [vid. 2024-05-26]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2021.670935.

CABIB, E., L. F. LELOIR, 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. **231**(1), 259–275. ISSN 0021-9258.

CLEMENTE, F. J., et al., 2014. A Selective Sweep on a Deleterious Mutation in CPT1A

in Arctic Populations. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **95**(5), 584–589 [vid. 2024-05-26]. ISSN 00029297. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajhg.2014.09.016.

COHEN, S. A., 2016. The clinical consequences of sucrase-isomaltase deficiency. *Molecular and Cellular Pediatrics* [online]. **3**(1), 5 [vid. 2024-06-16]. ISSN 2194-7791. Dostupné z: doi:10.1186/s40348-015-0028-0.

COLLINS, J., H. DANHOF, A. BRITTON, 2019. The role of trehalose in the global spread of epidemic *Clostridium difficile*. *Gut Microbes* [online]. **10**(2), 204–209 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1949-0976, 1949-0984. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2018.1491266.

COMPAIN, P., O. R. MARTIN, ed., 2007. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley [vid. 2024-05-26]. ISBN 978-0-470-03391-3. Dostupné z: doi:10.1002/9780470517437.

CROWE, J. H., J. F. CARPENTER a L. M. CROWE, 1998. THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. *Annual Review of Physiology* [online]. **60**(1), 73–103 [vid. 2024-06-11]. ISSN 0066-4278, 1545-1585. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.73.

CROWE, J. H., L. M. CROWE, D. CHAPMAN, 1984. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* [online]. **223**(4637), 701–703 [vid. 2024-06-11]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.223.4637.701.

DENG, Y., B. MISSELWITZ, N. DAI, M. FOX, 2015. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients* [online]. **7**(9), 8020–8035 [vid. 2024-06-16]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7095380.

DVOŘÁK, K., Z. DVOŘÁKOVÁ, J. FEIT, Z. LUKÁŠ, J. ŠMARDOVÁ, 2008. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod* [online]. 2008. B.m.: MUNI. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2015/BLKHM0422c/um/Zaklady_histopatologickych_vys_etrovacich_metod.pdf?kod=BLKHM0422c;predmet=819148;lang=cs.

ELBEIN, A. D., et al., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* [online]. **13**(4), 17R – 27 [vid. 2024-05-26]. ISSN 14602423. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwg047.

ENSEMBL, 2024. *Ensembl* [online]. Dostupné z: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000118094;r=11:118657316-118679690;t=ENST00000264029.

EU-1169/2011, 2011. *EUR-Lex* [online]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02011R1169-20180101>.

FDA, 2019. *GRAS Notice 912, Trehalose* [online]. 2019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.

FOLEY, A., et al., 2022. Adult sucrase-isomaltase deficiency masquerading as IBS. *Gut* [online]. **71**(6), 1237–1238 [vid. 2024-06-16]. ISSN 0017-5749, 1468-3288. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2021-326153.

FU, H., R. R. SUBRAMANIAN, S. C. MASTERS, 2000. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online].

40(1), 617–647 [vid. 2024-06-13]. ISSN 0362-1642, 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617.

GADD, G.M., K. CHALMERS, R.H. REED, 1987. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **48**(1–2), 249–254 [vid. 2024-06-11]. ISSN 03781097, 15746968. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02551.x.

GRABSKI, D. F., et al., 2021. Intron retention and its impact on gene expression and protein diversity: A review and a practical guide. *WIREs RNA* [online]. **12**(1), e1631 [vid. 2024-06-17]. ISSN 1757-7004, 1757-7012. Dostupné z: doi:10.1002/wrna.1631.

GUDMAND-HØSYER, et al., 1988. Trehalase Deficiency in Greenland. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* [online]. **23**(7), 775–778 [vid. 2024-05-26]. ISSN 0036-5521, 1502-7708. Dostupné z: doi:10.3109/00365528809090759.

H. AROLA, T. KOIVULA, A.-L. KARVONE, 1999. Low Trehalase Activity Is Associated with Abdominal Symptoms Caused by Edible Mushrooms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* [online]. **34**(9), 898–903 [vid. 2024-05-26]. ISSN 0036-5521, 1502-7708. Dostupné z: doi:10.1080/003655299750025372.

HUSBY, S., et al., 2012. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. **54**(1), 136–160 [vid. 2024-06-06]. ISSN 0277-2116, 1536-4801. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e31821a23d0.

CHEN, A., P. A. GIBNEY, 2023. Dietary Trehalose as a Bioactive Nutrient. *Nutrients* [online]. **15**(6). ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu15061393.

ISHIHARA, R., et al., 1997. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. *Gene* [online]. **202**(1–2), 69–74 [vid. 2024-05-26]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(97)00455-1.

ITURRIAGA, G., R. SUÁREZ, B. NOVA-FRANCO, 2009. Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **10**(9), 3793–3810 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms10093793.

JUMPER, J., et al., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* [online]. **596**(7873), 583–589. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03819-2.

KENNELLY, P. J., et al., 2023. Enzymes: Mechanism of Action. In: *Harper's illustrated biochemistry*. Thirty-second edition. New York Chicago San Francisco Athens London Madrid Mexico City Milan New Delhi Singapore Sydney Toronto: McGraw Hill, A Lange medical book, s. 60. ISBN 978-1-260-46994-3.

KHALIFEH, Masoomah, GeorgeE BARRETO a Amirhossein SAHEBKAR, 2021. Therapeutic potential of trehalose in neurodegenerative diseases: the knowns and unknowns. *Neural Regeneration Research* [online]. **16**(10), 2026 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1673-5374. Dostupné z: doi:10.4103/1673-5374.308085

KIDD, J. M., et al., 2014. Exome capture from saliva produces high quality genomic and metagenomic data. *BMC Genomics* [online]. **15**(1), 262 [vid. 2024-06-11]. ISSN 1471-

2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-15-262.

KINOSHITA, T., 2016. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *Journal of Lipid Research* [online]. **57**(1), 4–5 [vid. 2024-05-26]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.E065417.

KOZLOV, A., et al., 2023. Prevalence of genetically determined trehalase deficiency in populations of Siberia and Russian Far East. *International Journal of Circumpolar Health* [online]. **82**(1), 2183931 [vid. 2024-05-26]. ISSN 2242-3982. Dostupné z: doi:10.1080/22423982.2023.2183931.

KUROSAKI, T., L. E. MAQUAT, 2016. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *Journal of Cell Science* [online]. **129**(3), 461–467 [vid. 2024-06-03]. ISSN 1477-9137, 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.181008.

KYOSSEVA, S.V., Z.N. KYOSSEV, A.D. ELBEIN, 1995. Inhibitors of Pig Kidney Trehalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **316**(2), 821–826 [vid. 2024-06-17]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1995.1110.

LE MERCIER, P., et al., 2022. SwissBioPics—an interactive library of cell images for the visualization of subcellular location data. *Database* [online]. **2022**, baac026 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1758-0463. Dostupné z: doi:10.1093/database/baac026.

LEBENTHAL, E., 1975. Small Intestinal Disaccharidase Deficiencies. *Pediatric Clinics of North America* [online]. **22**(4), 757–766 [vid. 2024-06-11]. ISSN 00313955. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-3955(16)33206-0.

LEE, H., Y. YOON, S. LEE, 2018. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death & Disease* [online]. **9**(7), 712 [vid. 2024-05-26]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-018-0749-9.

LIU, Z., et al., 2020. Trehalose Induces Autophagy Against Inflammation by Activating TFEB Signaling Pathway in Human Corneal Epithelial Cells Exposed to Hyperosmotic Stress. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. **61**(10), 26 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1552-5783. Dostupné z: doi:10.1167/iovs.61.10.26.

LUDVIGSSON, J. F., et al., 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* [online]. **62**(1), 43–52 [vid. 2024-06-06]. ISSN 0017-5749, 1468-3288. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2011-301346.

MAJEED, M., et al., 2018. Evaluation of the Safety and Efficacy of a Multienzyme Complex in Patients with Functional Dyspepsia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Medicinal Food* [online]. **21**(11), 1120–1128 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1096-620X, 1557-7600. Dostupné z: doi:10.1089/jmf.2017.4172.

MALACARDS, 2024. *MalaCards - TREHD* [online]. Dostupné z: https://www.malacards.org/card/trehalase_deficiency.

MALYARCHUK, B. A., M. V. DERENKO, 2017. Polymorphism of the trehalase gene (TREH) in native populations of Siberia. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* [online]. **21**(8), 964–968 [vid. 2024-05-26]. ISSN 2500-3259, 2500-0462. Dostupné z: doi:10.18699/VJ17.320.

MATASSINI, C., C. PARMEGGIANI, F. CARDONA, 2020. New Frontiers on Human

Safe Insecticides and Fungicides: An Opinion on Trehalase Inhibitors. *Molecules* [online]. **25**(13), 3013 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25133013.

MULLER, Y. L., et al., 2013. Identification of genetic variation that determines human trehalase activity and its association with type 2 diabetes. *Human Genetics* [online]. **132**(6), 697–707 [vid. 2024-05-26]. ISSN 0340-6717, 1432-1203. Dostupné z: doi:10.1007/s00439-013-1278-3.

NORD, 2024. *Trehalase deficiency* [online]. Dostupné z: <https://rarediseases.org/gard-rare-disease/trehalase-deficiency/>.

NURJAYADI, M., et al., 2016. Immunogenicity and Specificity of Anti recombinant Protein Fim-C-Salmonella typhimurium Antibody as a Model to Develop Typhoid Vaccine. *Procedia Chemistry* [online]. **18**, 237–245 [vid. 2024-06-17]. ISSN 18766196. Dostupné z: doi:10.1016/j.proche.2016.01.037.

OESTERREICHER, T. J., D. C. MARKESICH, S. J. HENNING, 2001. Cloning, characterization and mapping of the mouse trehalase (Treh) gene. *Gene* [online]. **270**(1–2), 211–220 [vid. 2024-05-26]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(01)00474-7.

O'NEILL M. K., et al., 2017. Tailoring trehalose for biomedical and biotechnological applications. *Pure and Applied Chemistry* [online]. **89**(9), 1223–1249 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1365-3075, 0033-4545. Dostupné z: doi:10.1515/pac-2016-1025.

PANNI, S., et al., 2008. Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* [online]. **8**(1), 53–63 [vid. 2024-06-13]. ISSN 15671356, 15671364. Dostupné z: doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00312.x.

PUERTOLAS, M. V., A. C. FIFI, 2018. The Role of Disaccharidase Deficiencies in Functional Abdominal Pain Disorders—A Narrative Review. *Nutrients* [online]. **10**(12), 1835 [vid. 2024-06-16]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10121835.

REED, R. C., M. C. PACHECO, 2019. Clinical and Histopathologic Predictors of Disaccharidase Deficiency in Duodenal Biopsy Specimens. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. **152**(6), 742–746 [vid. 2024-06-16]. ISSN 0002-9173, 1943-7722. Dostupné z: doi:10.1093/ajcp/aqz091.

RIPPE J., T. ANGELOPOULOS, 2016. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. *Nutrients* [online]. **8**(11), 697 [vid. 2024-05-26]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8110697.

ROUSSEAU, P., H. O. HALVORSON, L. A. BULLA, G. St. JULIAN, 1972. Germination and Outgrowth of Single Spores of *Saccharomyces cerevisiae* Viewed by Scanning Electron and Phase-Contrast Microscopy. *Journal of Bacteriology* [online]. **109**(3), 1232–1238 [vid. 2024-06-13]. ISSN 0021-9193, 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/jb.109.3.1232-1238.1972.

RUF, J., et al., 1990. Rabbit small intestinal trehalase. Purification, cDNA cloning, expression, and verification of glycosylphosphatidylinositol anchoring. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**(25), 15034–15039. ISSN 0021-9258.

- SANDERS, D. S., I. AZIZ, 2012. Editorial: Non-Celiac Wheat Sensitivity: Separating the Wheat from the Chat! *American Journal of Gastroenterology* [online]. **107**(12), 1908–1912 [vid. 2024-06-08]. ISSN 0002-9270. Dostupné z: doi:10.1038/ajg.2012.344.
- SASAI-TAKEDATSU, 1996. Human Trehalase: Characterization, Localization, and Its Increase in Urine by Renal Proximal Tubular Damage. *Nephron* [online]. **73**(2), 179–185 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1423-0186, 0028-2766. Dostupné z: doi:10.1159/000189037.
- SAYUK, Gregory S., C. Prakash GYAWALI, 2020. Functional Dyspepsia: Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Drugs* [online]. **80**(13), 1319–1336 [vid. 2024-05-26]. ISSN 0012-6667, 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-020-01362-4.
- SEABY, E. G., R. J. PENGELLY, S. ENNIS, 2016. Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application. *Briefings in Functional Genomics* [online]. **15**(5), 374–384 [vid. 2024-06-11]. ISSN 2041-2649, 2041-2657. Dostupné z: doi:10.1093/bfgp/elv054.
- STELZER, G., et al., 2016. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics* [online]. **54**(1) [vid. 2024-06-12]. ISSN 1934-3396, 1934-340X. Dostupné z: doi:10.1002/cpbi.5.
- SVIDRITSKIY, E., G. DEMO, A. A. KOROSTELEV, 2018. Mechanism of premature translation termination on a sense codon. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **293**(32), 12472–12479. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.AW118.003232.
- ŠETINOVÁ I., M. HAVRANOVÁ, E. DAŇKOVÁ, 2014. Choroby způsobené lepkiem a dalšími moučnými bílkovinami. *Alergie*. **2014**(3), 181–188.
- TERRA W. R., C. FERREIRA, 2012. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: *Insect Molecular Biology and Biochemistry* [online]. B.m.: Elsevier, s. 365–418 [vid. 2024-06-13]. ISBN 978-0-12-384747-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X.
- THEVELEIN, J M, 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews* [online]. **48**(1), 42–59 [vid. 2024-06-13]. ISSN 0146-0749. Dostupné z: doi:10.1128/mr.48.1.42-59.1984.
- TYE-DIN, J., 2018. Interpreting tests for coeliac disease: Tips, pitfalls and updates. *Australian Journal of General Practice* [online]. **47**(1–2), 28–33 [vid. 2024-06-08]. Dostupné z: doi:10.31128/AFP-10-17-4357.
- ULLAH, H., et al., 2023. Efficacy of digestive enzyme supplementation in functional dyspepsia: A monocentric, randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. **169**, 115858 [vid. 2024-05-26]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2023.115858.
- UNIPROT - O43280, 2023. UniProt - O43280. *UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023* [online]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O43280/entry>.
- UYTTEBROEK L., C. PYPE, G. HUBENS, J.-P. TIMMERMANS, L. VAN NASSAUW, 2020. Effect of TNBS-induced colitis on enteric neuronal subpopulations in adult zebrafish. *European Journal of Histochemistry* [online]. **64**(3) [vid. 2024-06-12]. ISSN 2038-8306, 1121-760X. Dostupné z: doi:10.4081/ejh.2020.3161.

- VAN DIJK, E. L., Y. JASZCZYSZYN, C. THERMES, 2014. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research* [online]. **322**(1), 12–20 [vid. 2024-06-11]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.008.
- VAN HANDEL, E., 1969. Do Trehalose and Trehalase Function in Renal Glucose Transport? *Science* [online]. **163**(3871), 1075–1076 [vid. 2024-05-26]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.163.3871.1075.
- VINKŠEL, Mateja, Karin WRITZL, Aleš MAVER a Borut PETERLIN, 2021. Improving diagnostics of rare genetic diseases with NGS approaches. *Journal of Community Genetics* [online]. **12**(2), 247–256 [vid. 2024-06-18]. ISSN 1868-310X, 1868-6001. Dostupné z: doi:10.1007/s12687-020-00500-5
- VISWANATHAN, Lavanya a Satish Sc RAO, 2023. Intestinal Disaccharidase Deficiency in Adults: Evaluation and Treatment. *Current Gastroenterology Reports* [online]. **25**(6), 134–139 [vid. 2024-06-18]. ISSN 1522-8037, 1534-312X. Dostupné z: doi:10.1007/s11894-023-00870-z
- WEGENER, G., V. TSCHIEDEL, P. SCHLÖDER, O. ANDO, 2003. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *Journal of Experimental Biology* [online]. **206**(7), 1233–1240 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1477-9145, 0022-0949. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.00217.
- WELSH, J. D., J. R. POLEY, M. BHATIA, D. E. STEVENSON, 1978. Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology*. **75**(5), 847–855. ISSN 0016-5085.
- WHO, 2001. *InChem* [online]. Dostupné z: https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je05.htm#_46052320.
- YARIBEYGI, H., A. YARIBEYGI, T. SATHYAPALAN, A. SAHEBKAR, 2019. Molecular mechanisms of trehalose in modulating glucose homeostasis in diabetes. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* [online]. **13**(3), 2214–2218 [vid. 2024-05-26]. ISSN 18714021. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsx.2019.05.023.
- YOSHIZANE, C., et al., 2017. Glycemic, insulinemic and incretin responses after oral trehalose ingestion in healthy subjects. *Nutrition Journal* [online]. **16**(1), 9 [vid. 2024-05-26]. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/s12937-017-0233-x.
- ZHANG, P., X. J. MIN, 2005. EST Data Mining and Applications in Fungal Genomics. In: *Applied Mycology and Biotechnology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 33–70 [vid. 2024-05-26]. ISBN 978-0-444-51808-8. Dostupné z: doi:10.1016/S1874-5334(05)80004-8.

