

Univerzity Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



**FAKULTNÍ NEMOCNICE
OLOMOUC**

Defekty purinové *de Novo* syntézy

Disertační práce

Olomouc 2011

Petra Vyskočilová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Adamovi Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a rady při zpracování této disertační práce. Děkuji Prof. Pavlovi Hradilovi CSc. za možnost syntetizovat meziprodukty PDNS v laboratoři organické syntézy společnosti FARMAK a.s. Dále děkuji všem členům Laboratoře dědičných metabolických poruch, především pak RNDr. Davidu Friedeckému Ph.D., RNDr. Petru Hornikovi Ph.D. a Mgr. Haně Janečkové za všestrannou pomoc, rady a příjemné pracovní prostředí. Zvláštní poděkování bych chtěla věnovat své rodině za podporu při studiu.

Tato práce byla podpořena grantem MSM6198959205 30110081, zdroj 32, Ministry of Education, Youth and Sports: Studium genů a molekulárních mechanismů účastnících se řízení krvetvorby, jejich klinický význam a využití k cílené léčbě.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně, s použitím uvedené literatury, pod vedením školitele doc. RNDr. Tomáše Adama Ph.D. a uvádím v ní pouze výsledky své vlastní výzkumné práce.

V Olomouci dne:

.....

RNDr. Petra Vyskočilová

OBSAH

1 PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
2 SOUHRN.....	8
3 SUMMARY.....	9
4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	10
5 ÚVOD.....	12
5.1 Purinový metabolismus	12
5.2 Purinová de novo syntéza.....	13
5.3 Enzymové defekty PDNS.....	17
5.3.1 Deficit ATIC	18
5.3.1.1 Metabolismus AICAr.....	20
5.3.2 Deficit ADSL	22
5.3.3 Superaktivita PRPPS.....	24
5.3.4 Deficit PRPPS.....	25
5.4 Enzymové defekty záchranných cest purinového metabolismu.....	27
5.4.1 Deficit HGPRT.....	27
5.4.2 Deficit APRT	29
6 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CE).....	31
6.1 Pohyblivost (mobilita).....	31
6.1.1 Elektroosmotický tok.....	32
6.1.2 Analytické parametry.....	35
7 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS).....	42
7.1 Ionizační techniky.....	42
7.2 Analyzátoři iontů.....	44
7.3 Spojení MS a separačních technik.....	46
8 MATERIÁL A PŘÍSTROJE.....	49
9 POSTUPY A METODY.....	50
9.1 Příprava ribosidů.....	50
9.2 Čištění ribosidů.....	53
9.3 Potvrzení struktury připravených ribosidů.....	53
9.4 Spektrální charakteristiky aminoimidazolových ribosidů	53
9.5 Elektromigrační charakteristiky aminoimidazolových ribosidů.....	54
9.6 Screening poruch PDNS pomocí TLC.....	55
9.7 Screening poruch PDNS pomocí Bratton-Marshall reakce.....	56

9.8 Diagnostika defektů PDNS analýzou erytrocytů.	57
10 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	58
10.1 Syntéza aminoimidazolových ribosidů.....	58
10.2 Vlastnosti studovaných látek	59
10.2.1 MS charakterizace aminoimidazolových ribosidů.....	60
10.2.2 Elektromigrační a spektrální charakteristiky aminoimidazolových ribosidů	68
10.2.3 Klinické aplikace pro diagnostiku enzymových defektů v PDNS	72
10.2.3.1 Tenkovrstevná chromatografie.....	72
10.2.3.2 Fotometrie s využitím Bratton-Marshall reakce.....	75
10.2.3.3 Diagnostika enzymových defektů s využitím erytrocytů.....	84
11 ZÁVĚR.....	86
12 LITERATURA.....	87
13 PUBLIKACE	96
13.1 Práce související s disertační prací.....	96
13.1.1 Původní vědecké publikace v časopisech s IF.....	96
13.1.2 Původní vědecké publikace v recenzovaných časopisech.....	96
13.1.3 Seznam posterů/přednášek přednesených na veřejných odborných fórech.	96
13.2 Ostatní publikace	98

1 PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

10-f-THF	10-formyl-tetrahydrofolát
2,8-DHA	2,8-dihydroxyadenin
8-HA	8-hydroxyadenin
ACC	acetylCoA-karboxylasa
ADA	Adenosindeaminasa
ADSL	Adenylsukcinátlyasa
ADSS	Adenylsukcinátsyntasa
AICAR(DP)	AICARdifosfát
AICAR(TP)	AICARtrifosfát
AICAR/r	aminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid
AICARTF	AICARtransformylasa
AIR/r	aminoimidazolribotid/ribosid
AK	Adenosinkinasa
AMP	Adenosinmonofosfát
AMPD	Adenylátdeaminasa
AMPK	AMP kinasa
AMPKK	AMPK kinasu
APRT	adeninfosforibosyltransferasa
APRT	adeninfosforibosyltransferasa
ATIC	AICARtransformylasa/IMP cyklohydrolasa
ATP	Adenosintrifosfát
C5N	cytoplazmatická-5'-nukleotidasa
CAIR/r	aminoimidazolkarboxyribotid/ribosid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CE	kapilární elektroforéza
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CoA	koenzym A
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	Flavinadenindinukleotid
FAICAR/r	formylaminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid
FGAM	Formylglycinamidinribotid
FGAR/r	formylglycinamidribotid/ribosid
GABA	γ-amino-n-máselná kyselina
GAR/r	glycinamidribotid/ribosid
GDA	Guanindeaminasa
GMP	Guanosinmonofosfát
GMPR	Guanylátreduktasa
GMPS	Guanylátsyntetasa
GTP	Guanosintrifosfát
HGPRT	hypoxantin-guaninfosforybosyltransferasy
HPLC	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
CHO	ovarální buňky čínského křečka
IMP	inosinmonofosfát
IMPD	inosinmonofosfátdehydrogenasa
IMPCH	IMPcyklohydrolasa
LNS	Lesh-Nyhan syndrom
MS	hmotnostní spektrometrie
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEDA	N-1-naftylendiamin

PDNS	purinová <i>de novo</i> syntéza
PNP	Purinnukleosidfosforylase
PRPP	Fosforibosylpyrofosfát
PRPPS	PRPPsynthasa
RNA	ribonukleová kyselina
S-AMP	Sukcynyladenosinmonofosfát
SAICAR/r	sukcynylaminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid
SDS	Sodiumdodecylsulfát
TABS	kyselina (N-tris[hydroxymethyl]methyl-4-aminobutansulfonová
TCA	kyselina trichloroctová
TLC	tenkovrstevná chromatografie
XHD	Xantindehydrogenasa
XMP	Xantinmonofosfát
XOD	Xantindehydrogenasa

2 SOUHRN

Dědičná metabolická onemocnění patří k závažným onemocněním, která se projevují v každém věku. Tvoří rozsáhlou heterogenní skupinu onemocnění s převážně autozomálně recesivní, gonozomálně recesivní i dominantní, ale také mitochondriální dědičností. Mutace v DNA způsobují změnu proteinu (jeho množství, funkci, aktivitu), který je postiženým místem kódován. Dysfunkce proteinu z pohledu biochemika je často rozeznatelná na podkladě zvýšené koncentrace substrátu nebo snížené koncentrace produktu enzymové reakce.

Purinová *de novo* syntéza (PDNS) je metabolická dráha, která z fosforibosypyrofosfátu produkuje inosinmonofosfát - prekurzor nukleotidů pro výstavbu DNA. Ze šesti enzymů (tři jsou multifunkční) PDNS bylo objasněno postižení pouze tří: prvním objeveným defektem v této metabolické dráze byla v roce 1972 superaktivita fosforibosylpyrofosfátsyntetasy (PRPPS) a v roce 2008 její deficit, v roce 1984 deficit adenylsukcinátlyasy (ADSL), roku 2004 deficit AICARtransformylasy/IMPcyklohydrolasy (ATIC). V souvislosti s pokrokem na poli laboratorního a diagnostického vybavení (jako je např. v poslední době hmotnostní spektrometrie - snižováním meze detekce, identifikace neznámé látky) lze očekávat, že další defekty mohou být brzy objeveny.

Tato práce shrnuje poznatky o meziproduktech PDNS, možnostech jejich identifikace a diagnostiky případného enzymového defektu. Jsou zde popsány syntézy meziproduktů PDNS v ribosidické formě, záznamy MS spekter pro jejich identifikaci. Spektrální vlastnosti slouží pro diagnostiku metodami, které využívají UV detekci (CE, HPLC, spektrometrie). Pro účely analýzy metodou CE tato práce popisuje jejich elektroforetické vlastnosti. Poznatky z popsaných enzymových defektů byly využity pro vývoj screeningové metody TLC, dále pak byly popsány možnosti diagnostiky případných enzymových defektů analýzou erythrocytů.

3 SUMMARY

Inherited metabolic disorders belong to serious disorders manifesting in any age of life. It is a large group of disorders with predominantly autosomal recessive, gonosomal recessive and mitochondrial type of inheritance. Mutation causes change of enzyme amount, function and/or activity. For biochemists the enzyme dysfunction is visible by a build-up of substrate or missing of product of the enzyme reaction.

Purine *de novo* synthesis (PDNS) is metabolic pathway producing the precursor – inosine monophosphate - of nucleotides for building of the DNA via eleven reactions. Defects of only a three from the eleven enzymes involved in the PDNS is currently clear: superactivity of phosphoribosyl diphosphatesynthetase (PRPPS) was discovered in 1972 and their deficiency in 2008, deficiency of adenylysuccinylase (ADSL) in 1984, deficiency of AICAR transformylase /IMP cyclohydrolase (ATIC) in 2004. Progress in laboratory equipment, especially of mass spectrometric techniques could lead to early discovery of the not so far identified defects.

This thesis summarizes the facts about intermediates of the PDNS, the possibilities of their identification and diagnosis of appropriate enzyme defect. There are described syntheses of PDNS intermediates in the ribosidic form, the reported mass spectra are useful for the identification. Reported mass spectrometric and ultraviolet spectral properties are useful for diagnosing of patients using validated methods based on electrophoretic and liquid chromatography principles. A simple thin layer chromatographic method useful in mass screening is also reported here. These screening results can be further studied by the reported method for erythrocyte analysis.

4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Předložená disertační práce se zabývá problematikou enzymových defektů purinové *de novo* syntézy (PDNS). Přestože tato metabolická dráha probíhá v deseti krocích, jsou známy defekty pouze tří enzymů. Předpokládáme, že v této metabolické dráze mohou existovat defekty také dalších enzymů.

Cílem této disertační práce je vypracovat přehlednou rešerši o poruchách purinové *de novo* syntézy. Na základě poznatků o projevech známých enzymových defektů pak následně vypracovat přehled možných chemických syntéz jednotlivých meziproduktů PDNS.

Cílem experimentální části je připravit meziprodukty PDNS ve formě ribosidů, které defektní buňky vylučují do tělních tekutin a na jejichž stanovení je založena diagnostika enzymových defektů. Připravené ribosidy je nutné jednoznačně identifikovat a potvrdit jejich strukturu metodou hmotnostní spektrometrie. Práce si klade za cíl popsat spektrální a elektromigrační charakteristiky ribosidů pro diagnostiku enzymových defektů PDNS metodou kapilární elektroforézy.

Dalším cílem práce je získané poznatky aplikovat v klinické praxi při vývoji metod vhodných pro screening onemocnění PDNS - tenkovrstevná chromatografie a Bratton-Marshall reakce. Dále pak zjistit, zda je možné následně diagnostikovat onemocnění PDNS analýzou červených krvinek.

TEORETICKÁ ČÁST

5 ÚVOD

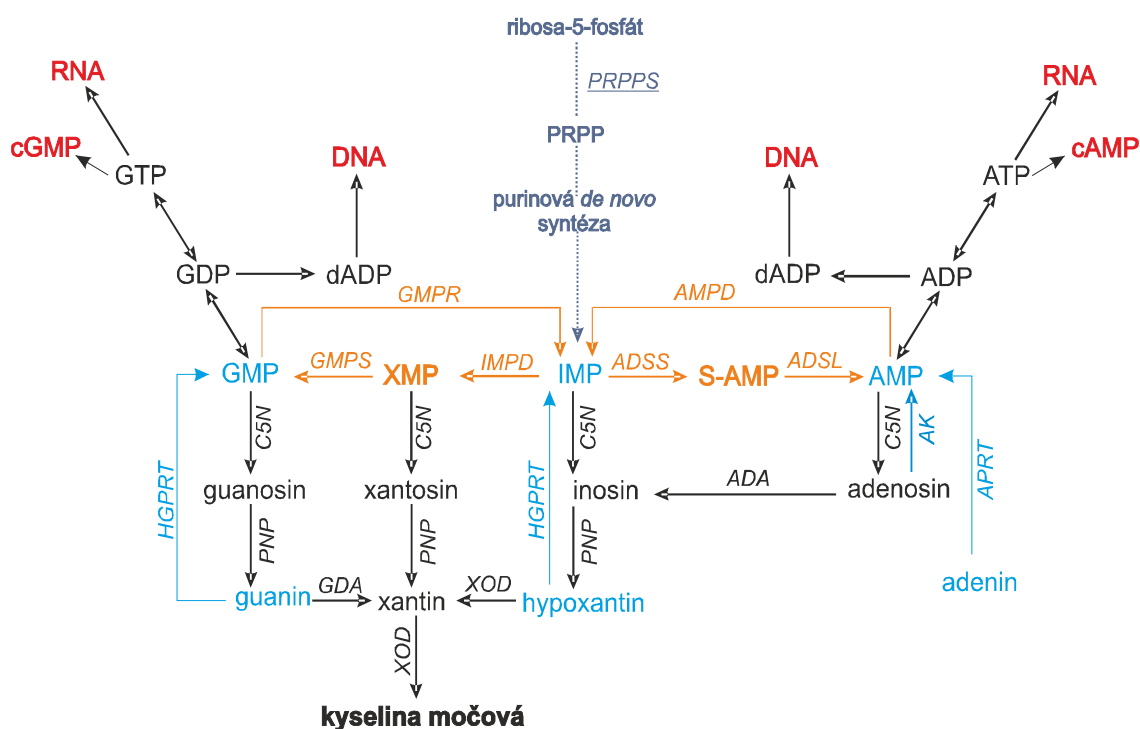
Puriny jsou heterocyklické aromatické sloučeniny složené z pyrimidinového a imidazolového kruhu (báze). Od bází jsou odvozeny purinové nukleosidy, nukleotidy a deoxynukleotidy. Purinové nukleotidy hrají klíčovou roli ve všech biologických procesech. Adenosintrifosfát (ATP) a guanosintrifosfát (GTP) jsou makroergické sloučeniny, které se účastní řady metabolických reakcí a procesů. Jsou substráty cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), koenzymy – nikotinamidadenin (NAD^+), nikotinamidadenindifosfát (NADP^+), flavin adenindinukleotid (FAD), koenzym A (CoA) a v mnoha metabolických cestách fungují jako allosterické efektory. Společně s pyrimidinovými nukleotidy a deoxynukleotidy jsou základní stavebními jednotkami ribonukleové kyseliny (RNA) a deoxyribonukleové kyseliny (DNA).

5.1 Purinový metabolismus

Purinové nukleotidy jsou syntetizovány *de novo* a recyklačními (záchrannými) drahami (Obr. 1). Purinová *de novo* syntéza (PDNS) probíhá všude tam, kde se buňky rychle dělí a musí být k dispozici zvýšená hladina nukleotidů pro výstavbu nukleových kyselin. Příkladem je časný embryonální vývoj [Spiegel *et al.*, 2006], kdy defekt v PDNS nemusí být slučitelný se životem jedince. Pro dospělý organismus je PDNS energeticky náročná a za normálních podmínek probíhá aktivně především v játrech.

Volné purinové báze (adenin, guanin a hypoxantin), vznikající hydrolytickou degradací nukleových kyselin a nukleotidů v procesu trávení, mohou být organismem znovu využity záchrannými drahami (Obr. 1, modrá část). Společným substrátem adeninfosforibosyltransferasy (APRT) a hypoxantinguaninfosforybosiltransferasy (HGPRT) je fosforibosylpyrofosfát (PRPP) [Simmonds *et al.*, 1991].

Pokud purinové báze nejsou využity recyklačními drahami, jsou dále degradovány přes xanthin až na kyselinu močovou.



Obrázek 1.: Metabolismus purinových nukleotidů. AMPD - adenylátdeaminasa, ADA - adenosindeaminasa, ADP - adenosindifosfát, ADSL – adenylsukcinátlyasa, ADSS - adenylsukcinátsyntasa, AK - adenosinkinasa, AMP - adenosinmonofosfát, APRT – adeninfosforibosyltransferasa, ATP - adenosin trifosfát, C5N – cytoplazmatická-5'-nukleotidasa, DNA - deoxyribonukleová kyselina, GDA – guanindeaminasa, GMP - guanosinmonofosfát, GDP - guanosindifosfát, GMPS - guanylátsynthetasa, GMPR - guanylátreduktasa, GTP - guanosin trifosfát, HGPRT – hypoxantinguaninfosforybositltransferasa, IMPD - inosinmonofosfátdehydrogenasa, PNP – purinnukleosidfosforylaza, PRPP - fosforibosylpyrofosfát, PRPPS - fosforibosylpyrofosfátsynthasa, RNA - ribonukleová kyselina, XOD - xantindehydrogenasa.

5.2 Purinová de novo syntéza

PDNS je metabolická dráha probíhající v deseti krocích. Sledem reakcí je fosforibosylpyrofosfát (PRPP) přeměněn na inosinmonofosfát (IMP), který je prekurzorem adeninových a guaninových nukleotidů (Obr. 2).

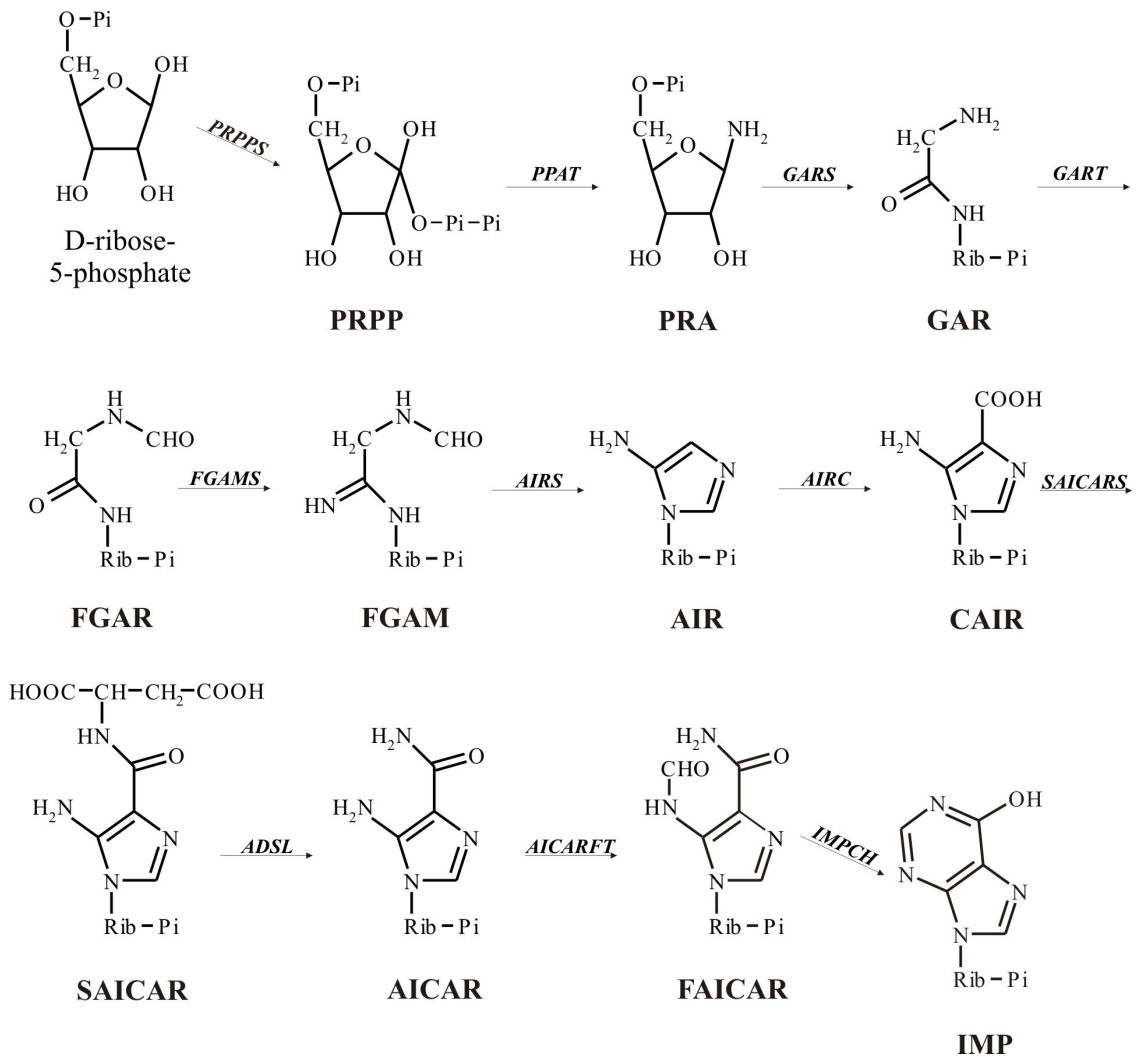
Na syntéze IMP se podílí 6 cytozolických enzymů [Christopherson *et al.*, 1997], čtyři z nich jsou multifunkční proteiny:

- trifunkční protein s glycinamidribotid (GAR) synthetasovou, GARtransformylasovou a aminoimidazolribotid (AIR) synthetasovou aktivitou [Aimi *et al.*, 1990, Gnrke *et al.*, 1991].
- bifunkční enzym s AIRkarboxylasovou a sukcylnlaminoimidazolkarboxamidribotid (SAICAR) synthetasovou aktivitou
- bifunkční enzym katalyzující poslední dva kroky PDNS aminoimidazolkarboxamidribotid (AICAR) transformylasa a IMPcyklohydrolasa.
- adenylsukcinátlyasa (ADSL) katalyzuje přeměnu SAICAR na AICAR a sukcylnadenosinmonofosfát (S-AMP) na AMP. Tento enzym má pouze jedno aktivní místo s duální specifitou [Christopherson & Szabados, 1997]

Formylglycinamidinribotid (FGAM) synthasa katalyzuje konverzi (formylglycinamidribotidu) FGAR na FGAM a v PDNS se nepodílí na žádné jiné reakci [Schendel *et al.*, 1989].

Všechny enzymy PDNS pracují mechanismem „substrate channeling“. Jde o jakousi spolupráci enzymů. Meziprodukt, který si enzymy předávají, neuniká do matrice. Je držen v blízkosti aktivního místa následujícího enzymu, čímž se zvýší účinnost katalyzované reakce, potažmo celé metabolické dráhy [Spivey *et al.* 1999].

V roce 2008 byla publikována práce, kde autoři využili fluorescenční mikroskopii ke sledování vzájemných interakcí enzymů PDNS v buněčných liniích HeLa. Bylo zjištěno, že v případě stresových podmínek vzniká reverzibilní enzymový komplex, který byl nazván purinosom. Dynamicky reaguje na hladinu (snížení/zvýšení koncentrace) purinových nukleotidů, případně přítomnost inhibitorů. Toto vzájemné uspořádání enzymů dynamicky reaguje na okolní vlivy (asociace a disociace) a zajišťuje zachování PDNS mechanismem „substrate channeling“ v případě stresových podmínek [An *et al.*, 2008].

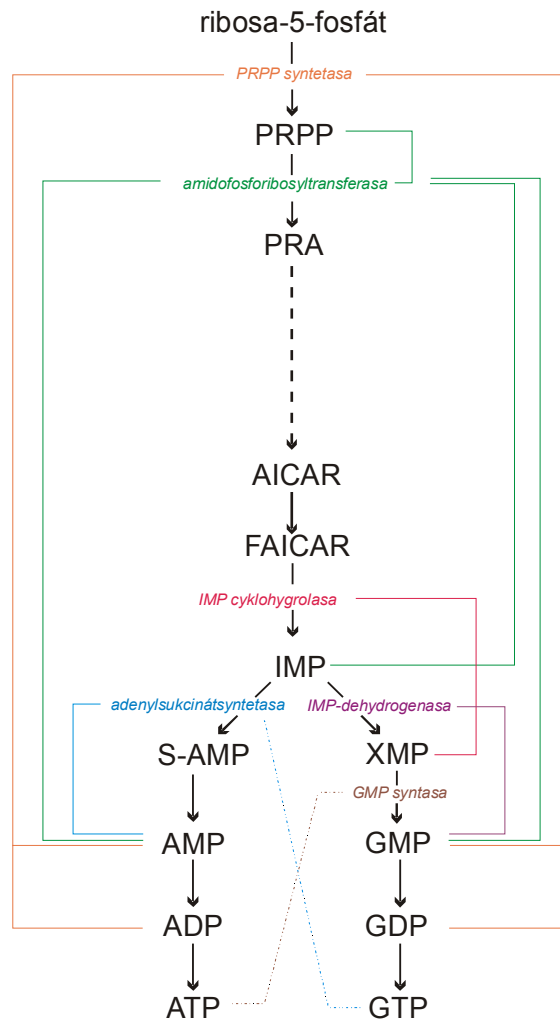


Obrázek 2: Purinová de novo syntéza. PRPP - fosforibosylpyrofosfát, PRPPS - fosforibosylpyrofosfásynthasa, SAICAR - sukcynylaminoimidazolkarboxamidribotid, AICAR - aminoimidazolkarboxamidribotid, FAICAR - formylaminoimidazolkarboxamidribotid, IMP - inosinmonofosfát, CAIR - aminoimidazolkarboxyribotid, AIR - aminoimidazolribotid, FGAR - formylglycinamidribotid, FGAM - formylglycinamidinribotid, PRA - fosforibosylamin, GAR - glycinamidribotid, GART - glycinamidribotidtransformylasa, GARS - glycinamidribotidsynthasa, PPAT, AIRS - aminoimidazolribotidsynthasa, AIRC - aminoimidazolribotidkarboxylasa, SAICARS - sukcynylaminoimidazolkarboxamidribotidsynthasa, ADSL - adenylsukcinátlyasa, AICARTF - aminoimidazolkarboxamidribotidtransformylasa, IMPCH - inosinmonofosfátcyklohydrolasa.

Regulace PDNS (Obr. 3)

PDNS je striktně kontrolována zpětnovazebnou inhibicí na několika úrovních.

- Celková rychlost PDNS je závislá na koncentraci PRPP [Boyle *et al.*, 1972]. Rychlost syntézy PRPP je dána především hotovostí ribosa-5-fosfátu a aktivitou PRPPsyntetasy. Aktivita enzymu je závislá na hladině fosfátu a purinových nukleotidů, které působí jako její allosterické regulátory.
- Následující krok PDNS - amidofosforibosyltransferáza - je klíčovým enzymem pro zpětnovazebnou inhibici. AMP a guanosinmonofosfát (GMP) jako finální produkty syntézy purinů se na inhibici podílí společně.
- Další regulační body se nachází v části syntézy AMP a GMP z IMP. AMP inhibuje adenylsukcinátsyntasu (ADSS) a GMP pak IMPdehydrogenasu.
- Rovnováha mezi adeninovými a guaninovými nukleotidy se udržuje díky jejich vzájemnému vztahu, kdy GTP je substrátem pro syntézu AMP a naopak ATP je substrátem pro GMP. V případě porušení rovnováhy ATP aktivuje GMPsyntasu nebo GTP aktivuje ADSS.
- V neposlední řadě je PDNS regulována na úrovni transkripce. Pokud je nadbytek hypoxantinu a guaninu, u *Escherichia Coli* je transkripce blokována prostřednictvím DNA vázaného proteinu *PurR*.



Obrázek 3: Regulace PDNS.

5.3 Enzymové defekty PDNS

PDNS probíhá v deseti krocích. Doposud jsou známy defekty pouze tři enzymů. V roce 1972 byl popsán první defekt PDNS - superaktivita PRPPsyntasy (PRPPS) [Sperling *et al.*, 1972]. O 12 let později byl objeven deficit ADSL. Deficitem ATIC trpí pouze jediná pacientka, jejíž případ byl popsán v roce 2004. Počátkem roku 2008 byl objeven deficit PRPPS. Pacienti trpící některým z defektů v PDNS se často potýkají s neurologické problémy, ačkoliv doposud není jasné, jakým mechanismem jsou způsobeny. V následujících kapitolách budou tyto defekty podrobně diskutovány.

5.3.1 Deficit ATIC

Enzym ATIC

ATIC je bifunkční enzym, který disponuje dvěma aktivními místy – AICARtransformylasa (EC 2.1.2.3) a IMP cyklohydrolasa (EC 3.5.4.10). V organismu se ATIC vyskytuje v monomerní a dimerní formě, které jsou v rovnováze. Dimerická forma je odpovědná za AICARtransformylasovou (AICARTF) aktivitu, zatímco IMPcyklohydrolasa (IMPCH) má katalytickou aktivitu v obou formách (v dimerické formě vykazuje vyšší aktivitu) [Vergis *et al.*, 2001].

Mechanismus, jakým IMPCH (N-terminální doména) a AICARTF (C-terminální doména) spolupracují je přisuzován tzv. „substrate channeling“. Ve studiích se hovoří o zvýšené koncentraci společného substrátu – formylaminoimidazolkarboxamidribotid (FAICAR) – v blízkosti aktivního místa IMPCH [Christopherson *et al.*, 1997], což zvyšuje účinnost celé reakce. Tomu, že se jedná o „substrate channeling“ nasvědčuje fakt, že v přítomnosti inhibitoru IMPCH se nezměnila aktivita AICARTF [Spivey *et al.*, 1999].

ATIC katalyzuje poslední dva kroky PDNS. AICARTF je odpovědná za přenos formylové skupiny z 10-formyl-tetrahydrofolátu (10-f-THF) na AICAR a FAICAR podléhá IMPCH, která uzavře jeho stále ještě otevřený pyrimidinový cyklus, a vzniká IMP.

V roce 2004 byl poprvé popsán vrozený deficit enzymu ATIC u jediné pacientky a onemocnění bylo pojmenováno AICA-Ribosidurie [Marie *et al.*, 2004].

Klinické projevy AICA-Ribosidurie

Toto onemocnění se projevuje vysokou koncentrací AICAr v moči. Je nutné zmínit, že AICAr (AICAr) se v moči vyskytuje také u dětí s akutní leukémií, u osob trpících deficitem HGPRT [Sidi *et al.*, 1985], při nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové [McGeer *et al.*, 1965]. AICAr je přítomen i v moči zcela zdravého člověka. Ve všech uvedených případech je však koncentrace AICAr v moči mnohonásobně nižší než u pacientky s AICA-Ribosidurií. Kromě tohoto metabolitu byly technikou vysoce-

účinné kapalinové chromatografie (HPLC) detekovány také SAICAr a S-Ado [Marie *et al.*, 2004].

Dalším projevem AICA-Ribosidurie je akumulace AICAR, jeho difosfátu AICAR(DP) a trifosfátu AICAR(TP) v erytrocytech. Koncentrace AICAR(TP) převyšuje koncentraci ATP, která byla vzhledem ke kontrolním erytrocytům snížena na 60 %. V pacientčích fibroblastech byl odhalen hluboký deficit AICARTF a aktivita IMPCH byla snížena na 40 % ve srovnání s kontrolními fibroblasty [Marie *et al.*, 2004].

Genetika

Probandka je dcerou zdravých rodičů, kteří již mají jednoho zdravého syna. Sekvenční analýzou genu pacientky pro ATIC (dlouhé raménko chromozomu 2, exon 13) byla objevena posunová mutace na exonu 2 způsobená duplikací/delecí (125-129dupGGGAT; 130-132 delGCT). Posunová mutace na alele získané od matky způsobuje nestabilitu mRNA. Na druhé alele v exonu 13 byla nalezena mutace způsobená substitucí adeninu za guanin (c. 1277 A→G), což v proteinu vedlo k substituci lysinu za arginin (K426R). Tuto alelu pacientka získala od otce [Marie *et al.*, 2004].

Fenotyp

Po narození se u pacientky vyskytla hypotonie, hypoglykemie a hyponatremie a srdeční šelest. Postupně se začala projevovat psychomotorická retardace a občasné křeče. V 6-ti měsících byla zjištěna vrozená slepota. V prvním roce se u ní vyvíjelo poškození sítnice společně s oční atrofií a byla pozorována ezotropie. Ve věku 4 let byly velmi nápadné dismorfické rysy (výrazné čelo, metopismus, brachycefalus, široká ústa s tenkým horním rtem, nízko usazené uši, nápadný klitoris, splynutí malých stydkých pysků) [Marie *et al.*, 2004].

Diagnostika a léčba

AICA-Ribosidurii je možno diagnostikovat screeningovými testy (tenkovrstevná chromatografie (TLC) s detekcí Paulyho činidlem [de Bree *et al.*, 1986] a spektrofotometricky Bratton-Marshall reakcí. Diagnostika byla provedena technikou

HPLC [Marie *et al.*, 2004] a je možná i technikou CE [Hornik *et al.*, 2006]. V současnosti neexistuje adekvátní způsob léčby.

5.3.1.1 *Metabolismus AICAr*

Metabolismus AICAr byl studován na liniích fibroblastů čínského křečka (CHO) kultivovaných v médiu s přidavkem ribosidu. AICAr proniká do buňky pomocí membránových transportérů, je transformován na AICAR a pak dále na AICAR(DP) a AICAR(TP). S ohledem na koncentraci AICAR v buňce může dojít ke dvěma efektům. V nízkých koncentracích ($< 450 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zvýší flux PDNS ve prospěch adeninových a guaninových nukleotidů. Ve vysoké koncentraci (nad $700 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), odpovídající patofyziologii AICA-Ribosidurie, AICAR poruší rovnováhu přeměny SAICAR na AICAR, což způsobí zpětnou reakci a syntézu SAICAR. Současně inhibuje ADSL a v buňce se akumulují substráty SAICAR a S-AMP. Tyto jsou defosforylovány na ribosidy a vyloučeny z buňky do tělních tekutin. Inhibice ADSL v místě přeměny S-AMP na AMP dále podporuje degradaci IMP na hypoxantin [Sabina *et al.*, 1985].

AICAR je svou strukturou velmi podobný AMP a to může být důvod, proč obě látky mají schopnost vázat se na aktivní místo enzymu. V této souvislosti velmi diskutovaným enzymem je AMP kinasa (AMPK).

AMPK je „downstream“ komponenta kinásové kaskády, heterotrimer s katalytickou podjednotkou α a regulačními podjednotkami β a γ . Každá z podjednotek má své izoformy (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 a γ_3), které jsou exprimované v různých tkáních (játra, sval srdeční a kosterní). Regulační podjednotky β a γ udržují stabilitu a aktivitu AMPK. Podjednotka γ je velmi „citlivá“ na posun rovnováhy AMP : ATP.

Aktivovaná AMPK hraje důležitou roli v udržení energetické homeostázy v buňce. AMPK je aktivována jakýmkoliv stresem (otrava, patofyziologický stres, cvičení, svalová kontrakce), který způsobí pokles hladiny ATP (a současně zvýšení koncentrace AMP) v buňce [Hardie, 2004]. Je schopna velmi rychle „přepnout“ mezi anabolickými (spotřeba ATP) a katabolickými (produkce ATP) drahami ve snaze vyrovnat deficit ATP. AMP kinasa může být aktivována pouze tehdy, jestliže γ podjednotka AMPK změní svou konformaci tak, že se dvě molekuly AMP naváží

na dvě Batemanovy domény lokalizované na této podjednotce, což způsobí odkrytí aktivního místa podjednotky α . Takto pozměněná AMPK je lepším substrátem pro „upstream“ AMPK kinasu (AMPKK), která fosforyluje aktivní místo α podjednotky a tím stonásobně zvýší aktivitu AMPK [Kahn *et al.*, 2005]

AMPK je kromě AMP aktivována také AICAR, který je v jaterních buňkách přítomný v důsledku patofyziologie onemocnění AICA-Ribosidurie [Marie *et al.*, 2004]. AICAR simuluje zvýšenou hladinu AMP a soutěží o volná vazebná místa podjednotky γ [Henin *et al.*, 1996]. Aktivovaná AMPK v játrech inhibuje syntézu mastných kyselin a cholesterolu prostřednictvím acetylCoAkarboxylasy (ACC) a 3-hydroxy-3-methylglutarylreduktasy (HMG) [Henin *et al.*, 1996], což odpovídá laboratornímu obrazu pacientky s AICA-Ribosidurií.

AICAR také ovlivňuje další AMP senzitivní enzymy. Nefyziologická hladina AICAR v játrech inhibuje glykolýzu prostřednictvím hexokinasy, 6-fosfofrukto-1-kinasy a zprostředkovaně také 6-fosfofrukto-2-kinasy. Glukoneogeneze je v játrech blokována v místě přeměny fruktosa-1,6-bifosfátu na fruktosa-6-fosfát, kterou katalyzuje fruktosa-1,6-bifosfatasa.

V těchto souvislostech se v dnešní době uvažuje o potenciálním použití AICAR v léčbě hyperlipidémie a hyperglykémie u pacientů trpících cukrovkou typu II, hypercholesterolemie a hypertriglyceridemie (Marie FV, disertačka). Další oblastí intenzivního výzkumu, který je v současnosti v první fázi klinického testování, je možný přímý neurotoxický účinek AICAR na lidské neuroblastomické buňky [Garcia-Gil *et al.*, 2003]. Bylo prokázáno, že indukuje apoptózu v endoteliálních buňkách [Kim *et al.*, 2008] a osteoblastech [Kim *et al.*, 2008] či jeho využití jako terpeutikum pro pacienty trpící akutním lymfoblastickou leukémií [Sengupta *et al.* 2007, Cronstein & Kamen, 2007].

5.3.2 Deficit ADSL

Enzym ADSL

ADSL je homotetramerní enzym s velikostí každé podjednotky 52 kDa [Kmocho *et al.*, 2000]. Protein tvoří 484 aminokyselin [Spiegel *et al.*, 2006].

ADSL katalyzuje 2 reakce - přeměnu SAICAR na AICAR v PDNS a dále pak konverzi S-AMP na AMP v metabolismu purinů. Tento enzym má jedno aktivní místo s afinitou jak k SAICAR tak i S-AMP [Stone *et al.*, 1993].

Defekt ADSL (McKusic 103050) byl objeven v roce 1984 [Jaeken and Van den Berghe, 1984] u pacienta se známkami autismu a psychomotorické retardace. Deficit ADSL je autozomálně recesivní onemocnění purinového metabolismu. Do současnosti je známo více než 50 pacientů trpících tímto onemocněním. Jak se stále jasněji ukazuje, deficit ADSL může být poměrně častým onemocněním, které bez screeningových programů není diagnostikováno [Šebesta *et al.*, 1997].

Klinické projevy

Deficit ADSL se projevuje vysokou koncentrací SAICAR a S-Ado (defosforylované substráty enzymové reakce) v tělních tekutinách (mozkomíšním moku, moči, plazmě). Vždy se jedná o sníženou aktivitu ADSL, naprostá nefunkčnost pravděpodobně není slučitelná se životem [Spiegel *et al.*, 2006].

Genetika

Gen kódující ADSL je dlouhý 23 kb - má 13 exonů. Do dnešního dne bylo popsáno 38 nejčastěji se vyskytujících mutací. Každá mutace je „single base pair exchange“. Všechny jsou missense mutace kromě dvou: a) mutace vytvářející nové splice místo a b) dochází k deleci 39 páru bazí [Spiegel *et al.*, 2006]. Většina pacientů jsou heterozygoti – každý z rodičů má jednu mutovanou a jednu normální alelu. Rodiče jsou asymptomatictí. Nejčastěji vyskytující se mutace je R426H, přesto s velkou heterogenitou klinických projevů.

Fenotyp

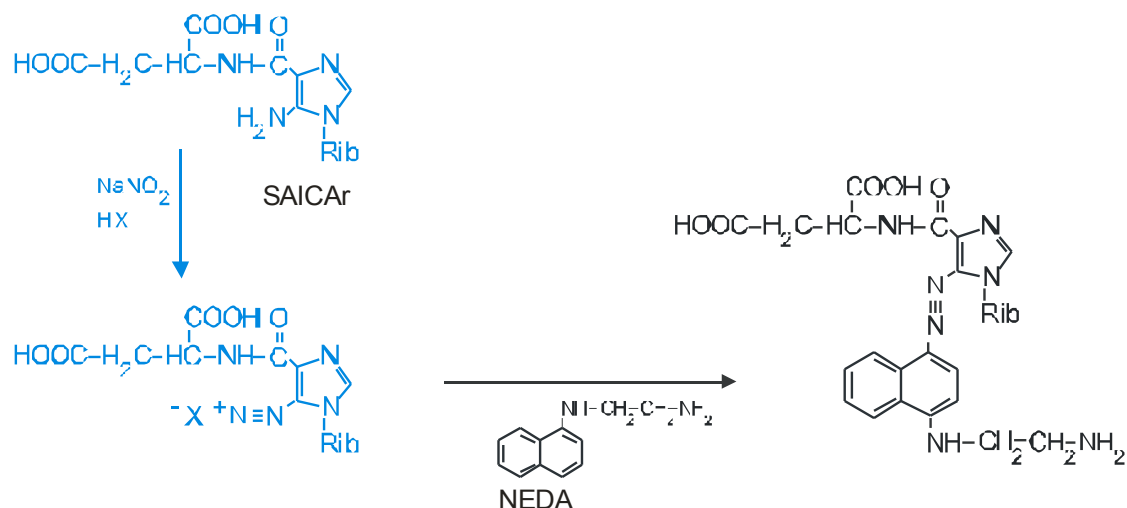
Toto onemocnění se vyznačuje velmi širokým spektrem klinických projevů, ve většině případů se jedná o psychomotorickou retardaci (různě vážnou) s autistickými a epileptickými příznaky. Mezi dalšími jmenujme např. neschopnost očního kontaktu, vážnou hypotonii, abnormální využití glukózy v mozku, svalovou slabost (špatné využití energie ve svalech).

Doposud nebyla prokázána korelace mezi genotypem a fenotypem. Nicméně je známa závislost vážnosti psychomotorické retardace na poměru koncentrací substrátů S-Ado/SAICAr. Deficit ADSL můžeme dále blíže specifikovat na typ 1, kdy S-Ado/SAICAr je blízký 1. To znamená, že aktivita ADSL je snížena k oběma substrátům stejně a to na 30 % své normální aktivity. Pacienti s onemocněním typu 2 mají aktivitu ADSL sniženu k SAICAr na 30 % zatímco k S-AMP na 3 %. Poměr koncentrací metabolitů S-Ado/SAICAr se tedy pohybuje v rozmezí 2 – 4. Obecně pacienti s tímto typem onemocnění mají jen střední obtíže. Do dnešního dne není znám vztah mezi vážností psychomotorických obtíží a hladinou SAICAr a S-Ado v tělních tekutinách, případně mozku. Spekuluje se o tom, že SAICAr může mít toxický efekt, zatímco S-Ado má ochranné účinky [Spiegel *et al.*, 2006].

Diagnostika a léčba

Deficit ADSL je diagnostikován jednoduchým TLC testem (detekce pouze SAICAr) [de Bree *et al.*, 1986], spektrofotometricky Bratton-Marshall reakcí [Laikind *et al.*, 1986] (Obr. 4). Další metody vhodné pro diagnostiku deficitu ADSL jsou HPLC [Šebesta *et al.*, 1995] a CE [Gross *et al.*, 1995]. Pro prenatální diagnostiku je možné použít analýza amniotické tekutiny [Marie *et al.*, 2000], kde jsou koncentrace SAICAr a S-ado v tomto případě milimolární, v kombinaci s molekulární analýzou choriových klků [Race *et al.*, 2000].

Prognóza je u pacientů variabilní - od novorozenců, kteří zemírají v měsíci života až po pacienty dožívající se dospělosti. V současnosti však neexistuje adekvátní způsob léčby.



Obrázek 4.: Schéma Bratton-Marshall reakce pro SAICAr. NEDA je N-1-naftylendiamin.

5.3.3 Superaktivita PRPPS

Superaktivita PRPPS (E.C.2.7.6.1) se projevuje zvýšenou tvorbou PRPP. Důsledkem tohoto enzymového defektu je zvýšená syntéza purinových nukleotidů a tím i kyseliny močové (hyperurikémie, hyperurikurie) [Becker *et al.*, 1987]. Do dnešního dne bylo diagnostikováno pouze 30 postižených rodin, postižení jsou především muži.

Genetika

PRPPS se vyskytuje ve 3 izoformách (PRPPS1, PRPPS2 a PRPPS3), z nichž každá je kódována odlišným genem. PRPPS 1 a 2 jsou kódovány na chromozomu X (PRPPS1: Xq22-q24 a PRPPS2: Xp22.2-p22.3) [Becker *et al.*, 1990] PRPPS1 a PRPPS2 jsou exprimovány ve všech tkáních. PRPPS3 je kódován autozomálně a exprimován pouze ve varlatech [Taira *et al.*, 1989]. Z výše uvedených variant je přímo se superaktivitou PRPPS spojován gen PRPPS1 (bodové mutace znemožní allosterickou kontrolu PRPPS [Becker *et al.*, 1995].

Mechanismus účinku

Hovoří se o dvou základních mechanismech, kterými defekt probíhá. První je tzv. regulační, kdy PRPPS není citlivá ke svým allosterickým regulátorům – ADP, GDP.

V těchto případech se onemocnění projeví u mužů již v dětském věku a klinické symptomy jsou pozorovány i u heterozygotních přenašeček [Becker *et al.*, 1995]. Druhý – katalytický - mechanismus vyplývá ze zvýšené hladiny PRPPS1. Enzym vykazuje nadstandardně vysokou reakční rychlost. Jeho afinita k allosterickým regulátorům zůstává nezměněna [Becker *et al.*, 1996].

Fenotyp

Podle klinických symptomů lze pacienty se superaktivitou PRPPS rozdělit do dvou skupin. V první skupině pacientů se onemocnění projeví již po narození nebo v raném dětství. Pacienti trpí neurologickým poškozením sensoroneurální hluchotou (může se projevit také u žen přenašeček) [Becker *et al.*, 1988]. U pacientů s mírným fenotypovým projevem se onemocnění projeví až při dospívání nebo v rané dospělosti a to jen u mužského pohlaví. U těchto případů není pozorováno neurologické poškození [Sperling *et al.*, 1972].

Diagnostika a léčba

Diagnostika superaktivity PRPPS je založena na stanovení kyseliny močové. Pro potvrzení diagnózy je vyžadováno enzymové vyšetření – měření aktivity PRPPS v dialyzovaných erythrocytech a extraktu fibroblastů. Doplnujícím vyšetřením je hodnocení allosterických vlastností enzymu ve fibroblastech [Torres *et al.*, 1996].

Základem léčby je snížení příjmu purinových nukleotidů (dieta) a omezení vzniku kyseliny močové, která způsobuje rozmanitá poškození organismu (allopurinol s citrátem draselným). Léčba allopurinolem však bohužel nezmírnila neurologické poškození.

5.3.4 Deficit PRPPS

O deficitu PRPPS se hovoří v souvislostech s Artsovým syndromem [Arts *et al.*, 1993] a Charcot-Marie-Toothovy nemoci typu X5 (CMTX5) [Kim *et al.*, 2005]. U pacientů s Artsovým syndromem byla odhalena buď nulová, nebo residuální aktivita PRPPS1 v erythrocytech a fibroblastech [de Brouwer *et al.*, 2007]. V případě CMTX5 byla zjištěna částečná ztráta aktivity PRPPS1 ve fibroblastech [Kim *et al.*, 2007].

Genetika

U obou onemocnění se jedná o deficit PRPPS1 formy enzymu. Ten je způsoben mutacemi měnící smysl kodonu. Stejně jako u superaktivity jsou postiženi muži, ženy bývají asymptomatické přenašečky. Doposud byly popsány 3 postižené rodiny [de Brouwer *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007].

Klinické projevy

Pacienti s Artsovým syndromem mají celkově nižší hladiny purinových nukleotidů, kyseliny močové a v moči zcela chybí hypoxanthin [de Brouwer *et al.*, 2007]. Pacienti s CMTX5 vykazovali normální hladiny kyseliny močové v séru.

Fenotyp

Artsův syndrom je charakterizován především mentální retardací, hypotonií, ataxií, opožděným motorickým vývojem, poškozením sluchu, optickou atrofií a náchylností k infekcím. U pacientů s CMTX5 byla zjevná trojici symptomů: ztráta sluchu, poškození zraku a periferní neuropatie. Pacienti, na rozdíl od Artsova syndromu, nebyli mentálně retardováni [Kim *et al.*, 2005].

Diagnostika a léčba

Ani jedno z onemocnění se neprojevuje laboratorními nálezy. Pro diagnostiku obou poruch je tedy nutné změřit enzymovou aktivitu PRPPS1 v erythrocytech [de Brouwer *et al.*, 2007] nebo fibroblastech [Torres *et al.*, 1996]. Doposud neexistuje způsob léčby.

5.4 Enzymové defekty záchranných cest purinového metabolismu

5.4.1 Deficit HGPRT

HGPRT (EC 2.4.2.8) je enzym záchranných cest v purinovém metabolismu, který je odpovědný za tvorbu IMP a GMP [Torres & Puig, 2007]. Substráty této konverze jsou hypoxantin, guanin a PRPP.

Deficit HGPRT je vrozené X-vázané recesivní onemocnění, jehož jsou známy dvě formy:

- úplná ztráta aktivity HGPRT je označována jako Lesh-Nyhan syndrom (LNS) (OMIM 300322). LNS byl objeven v roce 1967 a pacienti jsou plně závislí na svém okolí, protože nemohou stát ani chodit. Projevují se u nich křeče, choreoatetosa a sebepoškozující chování. U pacientů je také častý výskyt megaloblastické anémie.
- částečný deficit HGPRT (OMIM 300323) (aktivita 0 –10 %) vykazuje podle míry deficiencie variabilitu závažnosti neurologických projevů. Jsou známi jak asymptomatictí jedinci tak i jedinci se zvýšenou hladinou kyseliny močové, ledvinovými kaménky nebo trpící dnou. Tito lidé vedou normální život bez omezení dystonií. Lidé s vážnějším postižením trpí koktáním, dysartrií, dystonií a různým stupněm mentální retardace. Většina však může chodit a vést normální život, v rámci svého postižení. Nejvážněji postižení, u kterých ale nebyl diagnostikován (LNS), trpí závažnou dystonií a jsou upoutáni na vozík. Jsou závislí na pomoci okolí, ale neprojevuje se u nich sebepoškozování [Torres & Puig, 2007].

Mechanismus účinku

Vysoká produkce kyseliny močové je způsobena akumulací hypoxantinu a guaninu (důsledku deficitu HGPRT), které jsou xantinoxidasou metabolizovány na kyselinu močovou. Akumulace PRPP, který je kosubstrátem HGPRT, zvýší rychlost PDNS. Současně je také zvýšena aktivita APRT, neboť nedochází ke zpětnovazebné inhibici enzymu metabolity IMP a GMP. U pacientů s LNS (nikoliv u částečného deficitu

HGPRT) dochází k akumulaci AICAR v erythrocytech a AICAr v moči [Neychev *et al.*, 2004].

Patofyziologie neurologických symptomů a poruch chování není zcela objasněna. Jsou evidentní mozkové dysfunkce neurotransmiterů u LNS. Možných příčin je několik, hovoří se o toxickém účinku hypoxantinu, jehož vysoké hladiny byly naměřeny v CSF, dysfunkce dopaminergního neurotransmiterového systému ganglií nebo důsledku změn hladin nukleotidů.

Genetika

HGPRT je kódována na dlouhém raménku X chromozomu v lokusech 26 – 27.2. Je známo více než 300 mutací s vysokým stupněm variability. Byly popsány delece, inserce, duplikace a bodové mutace. Incidence deficitu HGPRT je popsána u Španělské populace 1 : 235 000 a u Kanadčanů 1 : 380 000. Přestože se jedná o vrozené X-vázané recesivní onemocnění, v posledních letech jsou známy případy žen s LNS.

Fenotyp

Pacienti s HGPRT deficiencí se narodili normální. Jedny z prvních příznaků bývají oranžové krystalky v plenách (poškození močových cest). Následují další příznaky jako ledvinové selhání, acidosa, zvracení. Kolem 6 měsíce je patrné psychomotorické opoždění (pokud je přítomno), hypotonie a nekontrolovatelné pohyby, neurologické poškození. Sebepoškozování se projevuje kousáním do rtů či prstů.

Typická je zvýšená produkce kyseliny močové – mohou být přítomny všechny symptomy, které jsou asociovány se dnou (akutní artritida, ledvinové kameny, močové kameny a onemocnění ledvin). Neurologické projevy jsou variabilní v závislosti na stupni enzymového deficitu. Neurologické symptomy postihují motorickou oblast (křeče, choreoatetosa, dystonie, balismus). Pacienti s LNH trpí mírnou až střední mentální retardací, ale inteligence je ve většině případů zachována. U částečného deficitu je stupeň mentální retardace variabilní, jejich inteligence je normální, ale snížená pozornost. Sebepoškozování se vyskytuje pouze u pacientu s LNS, ale u některých se tato porucha chování nemusí objevit. V některých případech jsou

pacienti agresivní vůči svému okolí. U pacientů s LNS se projevila megaloblastická anémie.

Diagnostika a léčba

Diagnostika je prováděna u pacientů s hyperurikémií, nadprodukcí kyseliny močové, ledvinovými kameny, záněty ledvin a neurologickým postižením. Deficit HGPRT je diagnostikován na základě biochemického vyšetření (zvýšená hladina močoviny, hypoxantinu a xantinu v plazmě a zvýšená exkrece). Následuje enzymatické vyšetření (měření enzymové aktivity ve fibroblastech nebo erythrocytech) a molekulární analýza.

Vysoká hladina kyseliny močové je regulována allopurinolem (inhibitor XO), čímž bývá předcházeno zánětům ledvin. V dospělosti může být podpůrná léčba allopurinolem kombinována s kolchicinovou profylaxí. Křeče a dystonie mohou být mírněny benzodiazepiny a podáváním baklofenu. Benzodiazepin a karbamazepin zlepšují projevy chování a úzkosti. Neexistuje však žádná léčba, pouze podpůrná. Pacienti musí být omezeni, aby si neublížili (dlahy, prsty).

5.4.2 Deficit APRT

APRT (EC 2.4.2.7) je druhým enzymem záchranných cest purinového metabolismu. Katalyzuje konverzi adeninu a PRPP na AMP a těmito produkty je silně inhibován. Je přítomen v mnoha tkáních, nejvyšší aktivitu vykazuje v játrech.

Deficit APRT je buď částečný (25 % zbytková aktivita) nebo úplný, kde je enzymová aktivita neměřitelná. Heterozygoti mívají 50 % aktivity APRT [Simmonds HA, 2003].

Mechanismus účinku

Deficit APRT způsobí odbourávání nahromaděného adeninu xantindehydrogenasou (XDH) přes 8-hydroxyadenin (8-HA) na 2,8-dihydroxyadenin (2,8-DHA), který je velmi málo rozpustný a tvoří hnědé krystaly podobné krystalům kyseliny močové nebo xantinu. Krystaly 2,8-DHA způsobují ledvinová selhání,

makroskopickou hematurii, dysurií. Pacienti mohou trpět na břišní koliky a infekce močové trubice. Ve vážných případech mohou být pacienti v komatu.

Genetika

APRT je kódován na dlouhém raménku 16 chromozomu v lokusu 24.3. Deficit APRT je autozomálně recesivní onemocnění. Je známo více než 15 různých mutací. Mezi nejčastější patří (D65V) u homozygotů typu I v Islandské populaci a (M136T), která se vyskytuje u 68 % homozygotních pacientů typu II. missense mutation Met 136 Thr. Incidence homozygotů je v rozmezí 1 : 250 000 až 1 : 33 000.

Diagnostika a léčba

Pacienti jsou diagnostikováni na základě přítomnosti krystalů 2,8-DHA v moči (UV, IR, MS, rentgenová difrakce, HPLC na reverzní fázi, CE, MS/MS). Diagnóza je potvrzena exkrecí adeninu, 8-HA a 2,8-DHA (obvykle v poměru 1 : 0,03 : 1,5). Kromě toho je také provedena enzymová zkouška v erytrocytárním lyzátu i inaktivních erythrocytech. Hladina 2,8-DHA je snížena podáváním allopurinolu. Pacienti podstupují litotripsii a někteří také transplantaci ledvin.

6 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (CE)

Kapilární elektroforéza je separační metoda založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic v elektromagnetickém poli - elektromigraci. Je to metoda, která je velmi vhodná k analýze látek purinového a pyrimidinového charakteru vzhledem k jejich UV-absorbtivitě a možnosti ionizace [Adam *et al.*, 1999; Friedecký *et al.*, 2007]. CE je využívána jako klinicky diagnostická metoda. V této části práce jsou podány základní charakteristiky a principy této techniky.

Pohyblivost částic závisí na velikosti náboje, tvaru molekuly, podmínkách prostředí a síle el. pole.

6.1 Pohyblivost (mobilita)

Mobilita je definována jako konstanta úměrnosti mezi migrační rychlostí a intenzitou elektrického pole (1). Pro elektromigrační metody je to základní veličina, která určuje dělení směsi analytů.

$$u = v/E \quad (1)$$

Limitní mobilita je fyzikální konstantou - není závislá na koncentraci složek a iontové síle, pouze na teplotě a použitém rozpouštědle. Mobilita definovaná pro určitou iontovou sílu se nazývá aktuální pohyblivost μ_{akt} . Tato hodnota je již experimentálně dostupná, ale nemá charakter fyzikální konstanty.

Pokud měříme mobilitu v neúplně disociovaném stavu, zavádíme tzv. efektivní mobilitu μ_{ef} . Látka se bude v elektrickém poli pohybovat pomaleji, než kdyby byla plně disociovaná. Analyty, které mají stejnou limitní pohyblivost (zcela disociovaná forma) se jeví jako nedělitelné. Tyto látky však mohou mít různé disociační konstanty, tedy i hodnoty efektivních mobilit při vhodně zvoleném pH. Toho lze využít k úspěšné separaci (Obr. 5).

V teorii kapilární elektroforézy lze dále definovat tzv. zdánlivou pohyblivost μ_{app} , která zohledňuje příspěvek elektroosmotického toku (EOF) a je dána vztahem

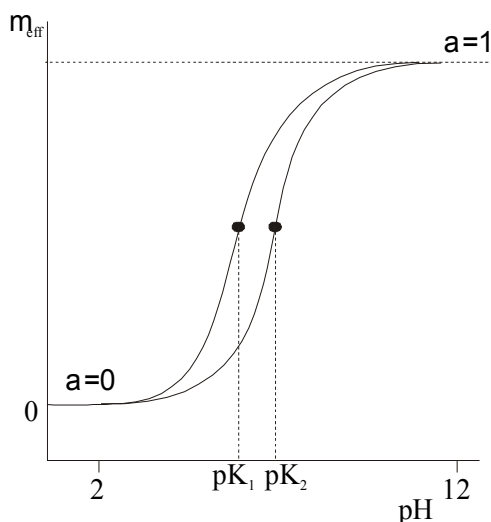
$$\mu_{ap} = \frac{v}{E} = \frac{l}{t \cdot E} \quad (2)$$

μ_{ap} – zdánlivá mobilita [$\text{m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$]

l - celková délka kapiláry [m]

t - migrační čas analytu [s]

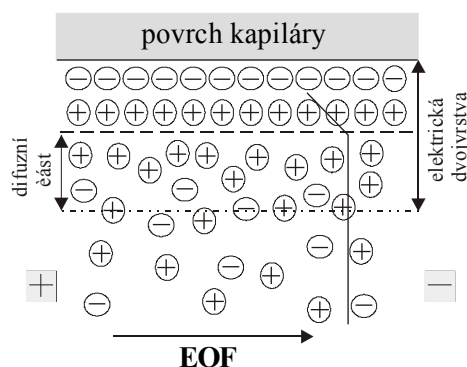
E - napětí [V]



Obrázek 5: Závislost efektivní mobility na pH

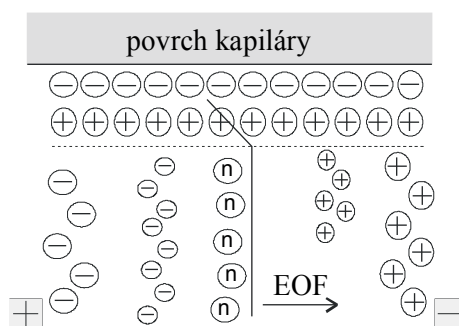
6.1.1 Elektroosmotický tok

Hlavním příspěvkem konvektivního toku kapaliny v kapiláře a je důsledkem povrchového náboje kapiláry. Povrch křemenné kapiláry tvoří silanolové skupiny. Ve vodném prostředí dochází k disociaci těchto skupin a stěna kapiláry tak nese záporný náboj. Tento efekt se projevuje především při $\text{pH} > 4$. Kationty přítomné v elektrolytu tento náboj kompenzují a vytváří se tak elektrická dvojvrstva. Při vložení napětí dojde k pohybu kationtů této vrstvy směrem k elektrodě s opačnou polaritou. Ve vodném prostředí dochází k solvataci molekul, jež strhávají celou objemovou fázi s sebou a vzniká EOF (Obr. 6). EOF má v kapiláře plošný profil toku, což je velká výhoda s ohledem na separaci látek.



Obrázek 6: Schéma elektroosmotického toku v kapiláře.

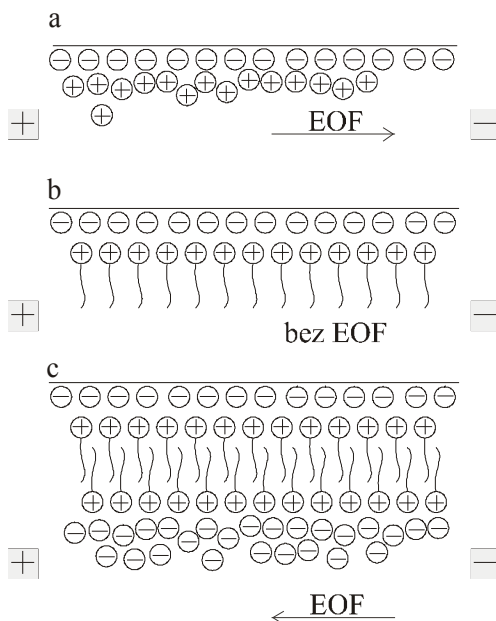
EOF je obvykle rychlejší než pohyb analytů a způsobuje pohyb všech molekul ve stejném směru bez ohledu na náboj. Za normálních podmínek směřuje tok od anody ke katodě. Kationty budou migrovat ke katodě jako první a díky rozdílným mobilitám dojde k jejich separaci. Dále budou detekovány látky neutrální. Tyto látky budou unášeny EOF a všechny budou mít stejnou mobilitu jako tok samotný, proto k separaci nedojde. Anionty jsou přitahovány k anodě, to znamená proti působení EOF. Za předpokladu, že jejich elektroforetická mobilita je menší než mobilita EOF, budou detekovány jako poslední (Obr. 7). V případě, že jejich mobilita je větší, detekovány nebudou vůbec.



Obrázek 7: Schéma separace látek v CE

EOF se významně projevuje při $\text{pH} > 4$. Pokud je nutné použít pro měření prostředí v kyselé oblasti pH , kde je EOF téměř zanedbatelný, je možné využít kovalentního nebo dynamického pokrytí kapiláry kationty, čímž dojde k obrácení toku – generuje se tzv. reverzní EOF. Reverzní EOF je možné vytvořit např. použitím modifikovaných kapilár se sulfonovými skupinami. Tyto skupiny jsou disociovány v širokém rozmezí pH . Sulfonylové skupiny nesou kladný náboj. Anionty v elektrolytu

se tento náboj snaží kompenzovat a po vložení napětí dojde k tomu, že anionty difuzní části elektrické dvojvrstvy migrují k anodě. Tím dochází ke vzniku reverzního EOF. Reverzní EOF může být také vytvořen přidáním tenzidu do separačního pufru. Použití tenzidu je alternativním přístupem pro vytvoření dynamického pokrytí stěny kapiláry. Kationtový tenzid interaguje s povrchem kapiláry. Vytvoří se primární vrstva, která redukuje EOF. Při dostatečné koncentraci interagují další molekuly tenzidu svou hydrofobní částí s primární vrstvou a vzniká sekundární vrstva, která nese kladný náboj (Obr. 8).



Obrázek 8: Vznik reverzního EOF přidáním tenzidu.

Elektroosmotický tok závisí na experimentálních podmínkách. Mnohdy je však pro separaci nezbytný, proto je třeba jej kontrolovat. V tabulce 1 jsou uvedeny nejdůležitější faktory, které EOF ovlivňují. Úspěšné separace se obvykle docílí optimalizací jak EOF tak i mobility analytu.

Pro zjištění velikosti (migračního času) EOF se užívá tzv. EOF markerů, což jsou nenabitě látky, které lze snadno detekovat. Při použití UV detekce tak můžeme použít například aceton, benzen nebo mesityloxid. Někdy je také pro zjištění velikosti EOF užíváno nástřiku vody (negativní odezva při 190 nm).

Tabulka 1: Faktory ovlivňující EOF

Proměnná	Důsledek	Poznámky
Elektrické pole	↓ E => ↓ EOF	při ↓ E se ↓ účinnost; při ↑ E => ↑ Jouleův ohřev
pH pufru	↓ pH => ↓ EOF a naopak	vhodné pro změnu EOF; může měnit náboj nebo strukturu analytu
Iontová síla	↑ I => ↓ EOF	↑ I => ↑ Jouleův ohřev; ↓ I možná adsorpce analytu
Teplota	změna viskozity η (2 %·K ⁻¹)	jednoduchá kontrola instrumentálně
Organická aditiva	změna ζ a η (↓ EOF)	změny komplexů, ovlivnění selektivity
Tenzidy	adsorpce se na povrch kapiláry	variacie popř. reverze EOF; změny selektivity

6.1.2 Analytické parametry

Analytické parametry v kapilární elektroforéze jsou obdobné jako u kapalinové chromatografie.

Mobilita a migrační čas

Migrační čas t je doba, za kterou se analyt dostane k bodu detekce. Je dán podílem migrační vzdálenosti a rychlosti. Migrační čas a další experimentální parametry mohou být použity k výpočtu zdánlivé mobility analytu. V přítomnosti EOF je pak výsledná zdánlivá mobilita dána součtem efektivní mobility analytu a mobility EOF.

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{EOF} \Rightarrow \mu_{ef} = \mu_{ap} - \mu_{EOF} \quad (3)$$

Disperze

Disperze (rozptyl zóny analytu) je definována jako šířka píku při základně w_b nebo v polovině jeho výšky $w_{1/2}$. Aby byla separace úspěšná, měla by být disperze co nejmenší.

Pro Gaussovský pík platí, že disperze je rovna čtyřnásobku rozptylu zony

$$w_b = 4 \cdot \sigma \quad (4)$$

σ - standardní odchylka píku (v čase, délce, nebo objemu); veličina charakterizující parametr rozptylu zóny. Protože σ se měří v jednotkách času, vyjadřuje se i šířka píku ve stejných jednotkách.

Účinnost

Účinnost systému je vyjádřena počtem teoretických pater N kapiláry

$$N = \left(\frac{l}{\sigma} \right)^2 \quad (5)$$

l - efektivní délka kapiláry [m]

σ - standardní odchylka píku

Účinnost je také zahrnuta ve vztahu pro výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra H

$$H = \frac{l}{N} = \frac{\sigma^2}{l} \quad (6)$$

N - počet teoretických pater

l - efektivní délka kapiláry [m]

Jak vyplývá ze vztahu (6), za ideálních podmínek se uvažuje jako jediný příspěvek k rozšiřování zóny v HPCE podélná difuze. Rozptyl způsobený prouděním vzhledem k vlastnostem kapiláry lze zanedbat. V kapalinové chromatografii se účinnost vyjadřuje vztahem

$$\sigma^2 = 2D \cdot t = \frac{2D \cdot l \cdot L}{\mu_e \cdot U} \quad (7)$$

D - difuzní koeficient analytu

Substitucí rovnice (6) rovnicí (7) dostáváme výraz pro počet teoretických pater v CE

$$N = \frac{\mu_e \cdot U \cdot l}{2D \cdot L} = \frac{\mu_e \cdot E \cdot l}{2D} \quad (8)$$

Z rovnice (8) je zřejmá výhoda aplikace vysokého napětí. Analyt zůstává v kapiláře kratší čas a dochází k menší difuzi zón. Z rovnice také vyplývá, že větší molekuly (proteiny, DNA), které mají nízký difuzní koeficient, budou vykazovat nižší disperzi než malé molekuly a tedy vyšší účinnost. Počet teoretických pater lze také spočítat z elektroferogramu

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (9)$$

t - migrační čas [min]

$w_{1/2}$ - šířka v polovině výšky píku [min]

Faktory ovlivňující účinnost

Disperzi v HPCE mohou kromě podélné difuze ovlivňovat také další příspěvky (Tab 2.).

Tabulka 2: Faktory ovlivňující účinnost

Disperzní parametr	Ovlivnění systému
Podélná difuze	definuje hlavní omezení účinnosti; analyty s nízkým dif. koef. tvoří úzké zóny
Jouleův ohřev	způsobuje teplotní gradient a laminární proudění
Délka nástřiku	délka nástřiku by měla být menší než délka difuzí kontrolované zóny
Adsorpce vzorku	interakce se stěnou kapiláry způsobují chvostování píků
Elektrodisperze	analyty s vyšší vodivostí než pufr způsobují frontování píků analyty s nižší vodivostí než pufr způsobují chvostování píků
Různá výška nádobek	vytváří laminární proudění
Velikost okna detektoru	ovlivňuje šířku píku a šum

Rozlišení

Cílem v separaci je rozdělení složek vzorku. Rozlišení **R** lze jednoduše definovat

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (10)$$

t - migrační čas [s]

w - šířka píku [m]

σ - standardní časová odchylka

Čitatel v rovnici (10) popisuje separační proces v podmínkách rozdílné migrace a jmenovatel popisuje disperzní procesy, které působí proti separaci. Separace ve vysokoúčinné kapilární elektroforéze (HPCE) je primárně řízená účinností narozdíl od chromatografických technik, kde je děj řízen naopak selektivitou. Vznikají tedy velmi ostré zóny i při malých rozdílech v mobilitách (v některých případech i méně než 0,05 %). Rozlišení dvou složek lze také vyjádřit v závislosti na účinnosti systému:

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \right) \quad (11)$$

Substitucí rovnice (8) do rovnice (11) dostaneme obvykle citovanou rovnici pro rozlišení, k jehož výpočtu není zapotřebí účinnost. Tato rovnice také zahrnuje účinek EOF na rozdělení.

$$R = \left(\frac{1}{4\sqrt{2}} \right) (\Delta\mu) \cdot \left(\frac{U}{D \cdot (\bar{\mu} + \mu_{EOF})} \right)^{1/2} \quad (12)$$

Selektivita

Selektivita je rozhodující parametr pro účinnost separace. Může být snadno ovlivnitelná např. změnou pH pufru, aditivy, koncentrací nebo teplotou.

Výběr pufru

Jeho složení má zásadní vliv na separaci. Při výběru pufrů se řídíme jejich puфраční kapacitou. Optimální je, aby se pohybovala

- okolo jedné jednotky pH v oblasti svého pK. Pufrы s více disociačními konstantami (fosfát, citrát) mohou být použity ve větším rozsahu pH.

- Pro snadnou UV detekci analytů by měl pufr vykazovat nízkou absorpční při dané vlnové délce měření.
- Současně by měl mít nízkou vodivost, aby co nejméně ovlivňoval generaci elektrického proudu a tím vznik Jouleova tepla.

Na druhé straně je zapotřebí nutně dodržet minimálně dvouřádkový rozdíl ve vodivostech pufru a analytu. Pufr lze také použít pro vytvoření komplexu s analytem s následnou změnou selektivity.

pH pufru

Změna pH pufru může ovlivňovat disociaci nebo protonizaci molekul analytů a tedy i jejich efektivní mobilitu. Obzvláště důležité jsou pro separaci amfiontů (aminokyseliny, proteiny), tedy látek, které lze separovat na základě jejich izoelektrického bodu (pI).

Teplota

Ačkoliv je základním cílem dosažení konstantní teploty a redukce Jouleova ohřevu, může se separační proces optimalizovat také změnou teploty. Zvýšení nebo snížení teploty má za následek změnu viskozity, EOF a času analýzy. Při změně teploty dochází k ovlivnění rovnováhy a chemické kinetiky separačního děje, což může také ovlivnit separaci.

Modifikace stěny kapiláry

Modifikace stěny je alternativní řešení pro omezení adsorpce analytu. Ve větší míře se používají dva postupy:

- a) permanentní modifikace kovalentní vazbou nebo fyzikálně navázanou fází
- b) dynamická deaktivace aditivem v pufru.

Použití aditiv

Tenzidy patří mezi nejvíce používaná aditiva v CE. Obecně se používají kationtové, aniontové, amfiontové nebo neiontové tenzidy. Molekula tenzidu může působit jako rozpouštěcí činidlo pro hydrofobní analyty, jako párovací činidlo nebo modifikátor stěny kapiláry. Dále může interagovat s analytem. Interakce mohou probíhat dvěma způsoby:

- iontové interakce s nabitým koncem molekuly

- hydrofobní interakce mezi nepolárním řetězcem a hydrofobní částí analytu

Koncentrace tenzidů nad kritickou micelární koncentrací (CMC) může významně změnit selektivitu. Vytváří se tzv. micely, které umožňují dělit i hydrofobní nenabitě analyty. Tento systém se nazývá micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).

Chirální selektory se užívají pro separaci chirálních látek v zonové kapilární elektroforéze. Mezi nejrozšířenější selektory patří cyklodextriny, cyklické ethery, soli žlučových kyselin, makrocyclická antibiotika a jiné. Selektivita je optimalizována typem a koncentrací chirálního aditiva a také přidavkem modifikátoru, jako jsou organická rozpouštědla, tenzidy, močovina a kovové ionty. Cyklodextriny byly úspěšně použity také pro dělení polohových izomérů, homologů a jiných směsí strukturně podobných látek.

Organická aditiva mohou působit na selektivitu separačního procesu různými způsoby. Mechanismy působení základních typů aditiv jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3: Aditiva ovlivňující selektivitu v CE.

Aditivum	Příklad	Změny v systému
Tenzidy	SDS, CTAB, TWEEN	modifikace EOF, rozpouštění hydrofobních látek, párování iontů, změna systému na MEKC
Amfionty	MES, Tris, CAPSO	zvýšením iontové síly, bez zvýšení vodivosti, ovlivnění selektivity proteinů
Lineární hydrofilní polymery	Methyl celulóza, PVA, PEG	redukce EOF, snižuje adsorpci analytu při nízké koncentraci, při vysoké koncentraci - CGE
Organické modifikátory	MetOH, Acetonitril, TFA	změna EOF, změna selektivity v MEKC a chirálních analýzách
Chirální selektory	cyklodextriny, cyklické ethery	chirální separace, rozpouštění hydrofobních látek
Kovové ionty	K ⁺ , Na ⁺ , Cu ²⁺ , Li ⁺	změna selektivity v MEKC a CGE
Látky tvořící H - vazby	Močovina	rozpouštění DNA v CGE, rozpuštění proteiny, změna selektivity v MEKC
Kvartérní aminy	diaminopropan	párování iontů, obrácení EOF

7 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS) je v současnosti jedna z nejvíce se rozvíjejících metod analýzy. Své uplatnění nachází napříč celým spektrem odvětví a oblastí (ve fyzice, chemii, enviromentálních vědách, medicíně, farmacii, geologii a průmyslu). Použití MS přešlo z oblasti diagnostiky dědičných metabolických poruch [Hartmann *et al.*, 2006; La Marca *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2000] do obecné klinicko-biochemické diagnostiky a je široce využívána pro analýzu léků, jejich metabolitů, vitamínů, enzymových aktivit atd. MS spektra jsou cenné při kvantifikaci a studiu struktury analytů. V této kapitole budou stručně popsány nejběžněji používané instrumentace v klinické praxi.

Základní princip MS můžeme shrnout do tří částí. V první jsou molekuly/atomy analytu ionizovány (převedeny na nabitě částice v plynné fázi). Nabitě částice se dále separují podle poměru m/z kde m je molekulová hmotnost a z je náboj fragmentu. Detektor zaznamená proud úměrný množství nabitých fragmentů a záznam je převeden do podoby MS spektra (závislost m/z na intenzitě odezvy). Ionizované fragmenty se pohybují ve vakuu ($10^{-4} - 10^{-8}$ torr) z důvodu zamezení kolize s molekulami vzduchu a možné nežádoucí fragmentaci [Ubik K, 2000].

7.1 Ionizační techniky

Mezi nejstarší ionizační techniky patří ionizace elektronem (EI). Zdrojem elektronů je wolframová nebo rheniová katoda. Ionizace závisí na energii elektronu (urychlovací potenciál) a také samotné molekuly (teplota analytu, tedy teplota iontového zdroje). Převážná většina molekul má ionizační potenciál 7 - 16 eV, jako optimální se používá 70 eV. Při tomto napětí vznikají především fragmentované ionty a spektra poskytují informaci o struktuře analyzované látky (výhodou je knihovna spekter, která umožňuje vyhledávat a porovnávat spektra analyzovaných látek). EI se používá pro látky v plynném stavu (výhodné pro spojení GC/MS), které nesmějí být termolabilní a těkavé (nestabilita látky v EI podmínkách se projeví ztrátou molekulárního píku ve spektru).

Další ionizační technika je chemické ionizace (CI). Tato bývá použita pro látky, jež nejsou vhodné pro EI (neposkytují molekulární pík). CI probíhá v několika krocích.

Nejprve je ionizován reakční plyn. Kombinací EI a iontově-molekulárních reakcí se vytvoří stabilní ionty reakčního plynu a tyto pak dále ionizují molekuly analytu. Vznikají molekulární ionty $[M+H]^+$, ale dochází také k sekundárním a terciálním reakcím (adukty s ionizačním plynem). Míra fragmentace je ovlivňována volbou reakčního plynu (jeho ochotě poskytnout H^+). Každý plyn má své specifické výhody pro určité sloučeniny. Kromě methanu se používá izobutan, amoniak, voda, methanol a další. Citlivost CI je ovlivňována volbou experimentálních podmínek.

V současné době jsou především GC/MS analyzátoři vybaveny oběma způsoby ionizace (CI + EI). Z analýzy tak vytěžíme maximum informací o analytu - EI poskytne intenzivní fragmentaci, zatímco chemická ionizace intenzivní molekulární pík $[M+H]^+$.

Pro látky, které nelze derivovat, jsou málo těkavé, termicky labilní je vhodné použít ionizace rychlými atomy (FAB) a ionty (FIB). Analyt je nanesen na vzorkovací terčík, který je ostřelován urychlenými atomy nebo primárními ionty. Ionizací atomů plynu (Ne, Ar, Xe, pro FIB Cs^+) vznikne urychlený ion. Kolizí s neutrálními atomy plynu dojde k přenosu náboje a urychlený atom pak dopadá na matici se vzorkem. Dochází k desorpci analytu z matrice. Látky takto ionizované poskytují velmi intenzivní molekulární nebo kvazi-molekulární pík, což poskytuje informaci nejen o molekulové hmotnosti analytu, ale také o jeho struktuře. Tento způsob ionizace je vhodný pro peptidy, cukry, glykosidy, oligonukleotidy, glykopeptidy, nukleosidy. Protože se vzorek analyzuje v kapalném stavu, je tuto techniku je možné použít ve spojení MS s LC, HPLC, CE.

V současné době velmi využívaná technika ionizace je MALDI - desorpce/ionizace laserem za účasti matrice. Vzorek se s matricí nanese na destičku, nechá se rekrystalizovat. Krystal pak absorbuje UV nebo IR záření, transformuje je na excitační energii, kterou předá analyzovaným látkám, čímž dochází k jejich ionizaci. Jako matrice se volí organické aromatické sloučeniny jako jsou např.: kyselina nikotinová, skořicová, 2,5-dihydroxybenzoová. Matrice musí být ve velkém přebytku. Ostřelováním krystalu dojde k tomu, že molekuly analytu i matrice přejdou do plynného stavu. Vznikají vícenásobné molekulární ionty $[M2^+, M3^+]$ a klastrové ionty více molekul $[2M^+, 3M^+]$.

MALDI rozšířila možnosti analýzy na molekuly (bílkoviny, oligosacharidy, glykolipidy, oligonukleotidy) až do molekulové hmotnosti 150 kDa. Je možné ji provádět také za atmosférického tlaku v proudu přídavného plynu - N₂ - (AP-MALDI). AP-MALDI je měkčí ionizační technika než MALDI a umožňuje analyzovat i labilní cukry a proteiny. MALDI je obvykle spojen s TOF (bude popsáno později).

Další způsoby ionizace za atmosférického tlaku jsou elektrosprej (ESI) a chemická ionizace (APCI) - obě jsou nejpoužívanější u spojených technik - LC/MS, HPLC/MS, CE/MS. Kapičky roztoku z kolony jsou vstřikovány do proudu ohřátého dusíku. Vlivem vloženého napětí vznikají malé (20 nm) nabitě kapičky, které se postupným odpařováním a coulombickým vypuzováním přemění až na plynné ionty. Tím se systém stává tepelně nezávislý, vhodný pro termosensitivní látky. Nanoelektrosprej je prakticky založen na stejném principu, vhodný pro malé objemy vzorků, které mohou obsahovat větší množství solí než ESI.

V případě APCI je vstupní kapilára zahřívána, aby se urychlilo vypařování rozpouštědla. Vlivem koronového výboje dojde ke vzniku chemicko-ionizační plazmy a iontů [M+H]⁺. Spektra dávají informaci o velikosti molekuly, po optimalizaci velikosti vstupního napětí lze získat i fragmentační spektra. APCI je tolerantní k pufrům, je možné ionizovat vodné i bezvodé roztoky.

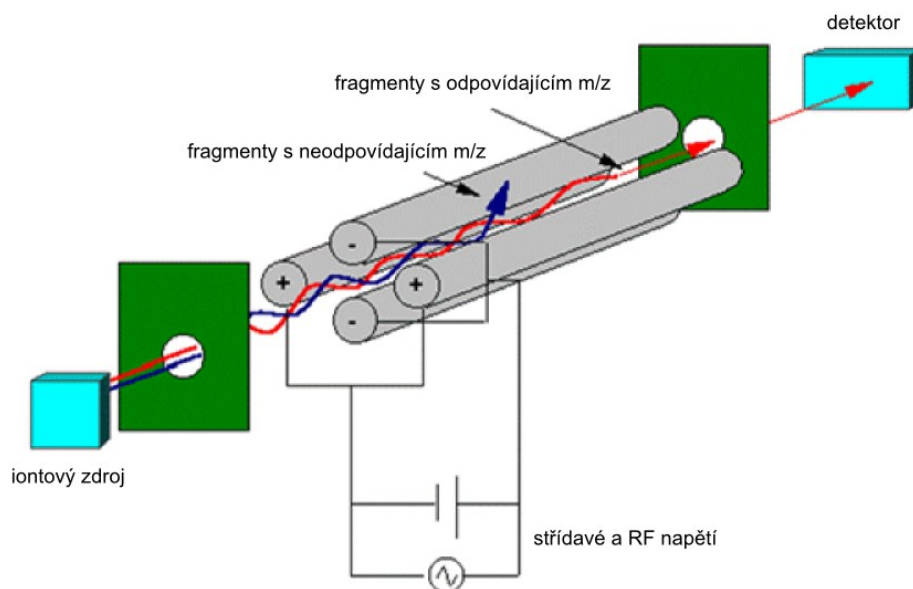
7.2 Analyzátoři iontů

V současné době se v hmotnostních spektrometrech potkáme nejčastěji s kvadrupolem (Q), iontovou pastí (IT), analyzátořem doby letu (TOF) a jejich vzájemnými kombinacemi.

Separace iontů na kvadrupólu probíhá mezi 4 kovovými tyčemi, na kterých je vložené napětí (stejná polarita je na protilehlých tyčích) a superponováno střídavé radiofrekvenční napětí. Ionty letící polem oscilují a proletí jen ty s určitou hodnotou m/z. Částice s jiným m/z jsou z elektrického pole vyneseny ven. Rozlišovací schopnost lze ovlivňovat změnou poměru stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí.

Iontová past je v podstatě uzavřený kvadrupól. Skládá se z prstencové střední elektrody s hyperbolickým průřezem a dvou kruhových elektrod s hyperbolickým průřezem, které prstenec volně uzavírají. Horní a dolní elektroda musí být uzemněny a

na střední prstenec je přivedeno vysokofrekvenční napětí s měnící se amplitudou. Amplituda na nízké hodnotě drží ionty v pasti. Postupným zvyšováním amplitudy jsou z pasti vypuzovány ionty se vzrůstající hodnotou m/z .



Obrázek 9: Schéma MS s kvadrupólem.

Průletový analyzátor (TOF) rozděluje ionty na základě doby letu (Obr. 10). V iontovém zdroji se periodicky vytvářejí krátké pulzy iontů, které po urychlení potenciálem V získají kinetickou energii a vstupují do analyzátorové trubice délky l , kde se měří jejich čas dopadu.

$$z \cdot V = m \cdot v^2 / 2 \quad (13)$$

m - hmotnost iontu,

v - rychlost

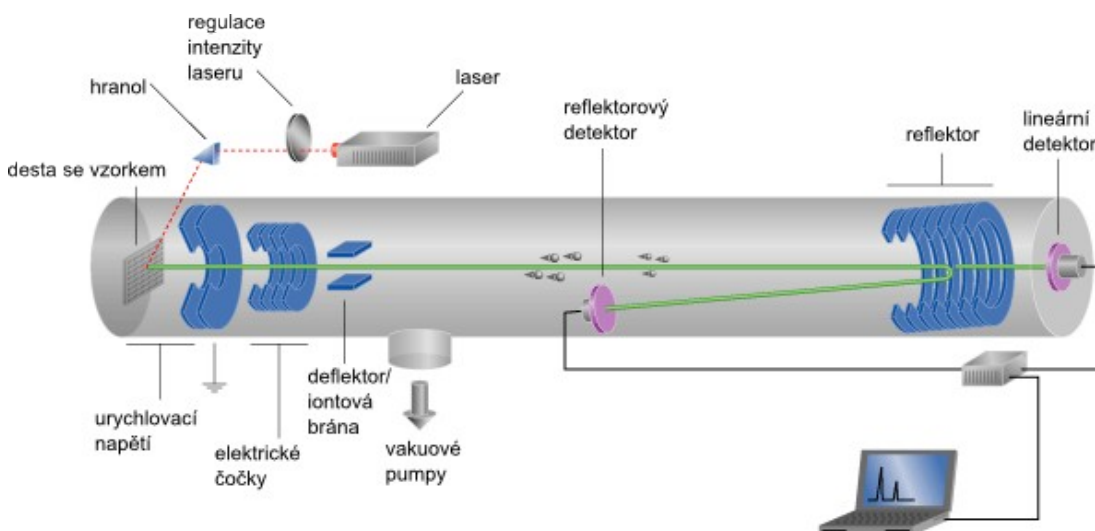
V - urychlovací potenciál

Tím se zjistí rychlost podle vztahu

$$v = l / t. \quad (14)$$

Řešením rovnice vyplývá, že čím je ion lehčí, tím dříve dosáhne kolektoru.

$$z \cdot m / v = 2 \cdot V \cdot t^2 / l^2 \quad (15)$$



Obrázek 10: Schéma MS s analyzátozem TOF.

7.3 Spojení MS a separačních technik

Spojení MS a konkrétní separační techniky volíme podle povahy analytů. Výběr se odvíjí ze znalostí separačních technik a jejich aplikací. Spojení plynové chromatografie s MS (GC/MS) je vhodné pro stanovení či identifikaci látek těkavých. Nejčastěji se pro toto spojení volí EI (nosný plyn He, jehož molekuly jsou ionizovány urychlenými elektrony nebo Penningovou ionizací) a CI, analyátory Q, UT, TOF, QqQ. V současné době se používají především kapilární kolony, které eliminují problém rozdílného množství nosných plynů a není potřeba používat separátory, které odstraňovaly jeho přebtečné množství. Identifikace se provádí na základě shody s knihovnou spekter.

Spojení kapalinové chromatografie s MS (HPLC/MS). Jako iontový zdroj se nejčastěji používá ESI a APCI (méně používané API a APPI, MALDI a EI), kdy mobilní fáze se přímo podílí na ionizačním procesu. MS analyátory pak nejčastěji Q, QqQ, IT, TOF.

Spojení CE s MS není rutinní jako předešlá uspořádání. Slouží k separaci iontových látek. Pro detekci látek se volí UV/VIS detektor, LIF nebo vodivostní detektor. U MS látky jsou nejčastěji ionizovány ESI, MALDI, FAB.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

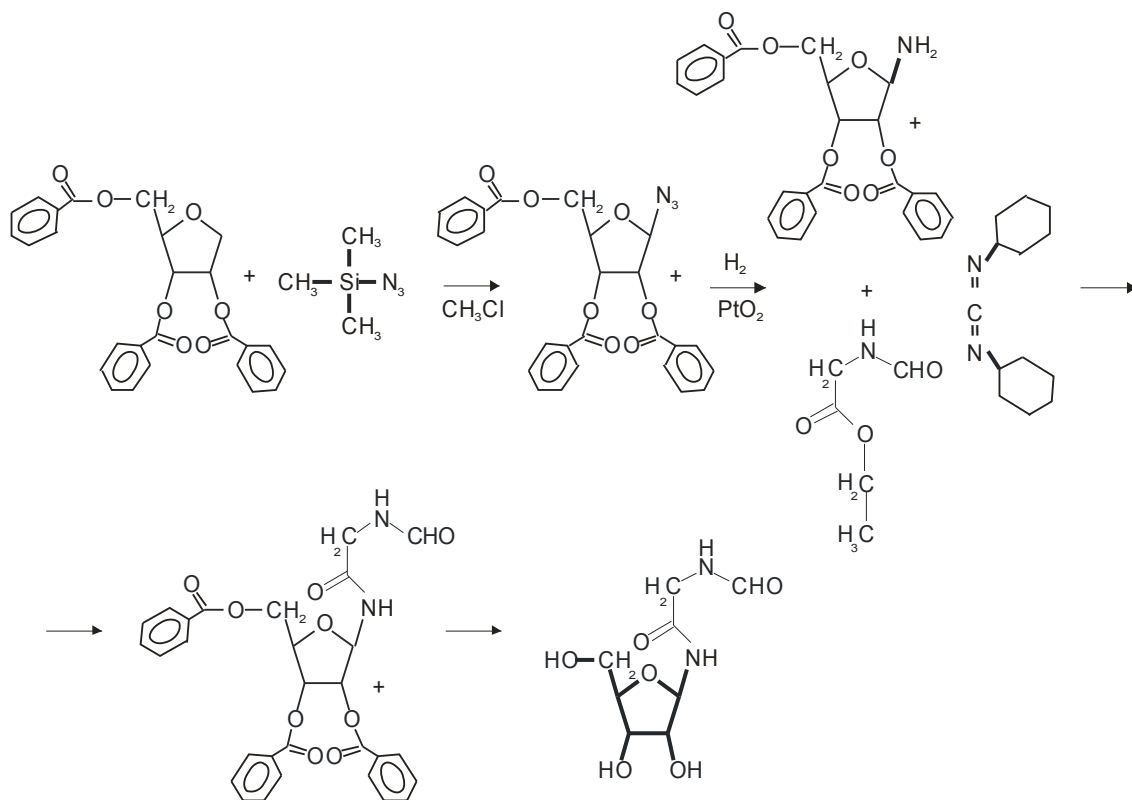
Acetanhydrid p.a., aceton p.a., γ -amino-n-máselná kyselina (GABA), 2-amino-2-methylpropan-1-ol, amoniak (NH_4OH), butan-1-ol p.a., hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB), diethylether nestabilizovaný p.a., ethanol, kyselina (N-tris[hydroxymethyl]methyl-4-aminobutansulfonová (TABS), kyselina trichloroctová (TCA), kyselina octová, kyselina citronová, kyselina chlorovodíková (HCl), hydroxid draselný (KOH), hydroxid sodný (NaOH), chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl), chlorid hořečnatý (MgCl_2), chlorid vápenatý (CaCl_2), glukosa, kyselina boritá (H_3BO_3), kyselina fosforečná (H_3PO_4), kyselina mravenčí (HCOOH), propan-2-ol p.a., sodiumdodecylsulfát (SDS), methanol (CH_3OH), DOWEX 50WX, chlorid cíničitý (SnCl_4), trimethylsilylazid, hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), oxid platičitý (PtO_2), N,N'-dicyklohexylkarbodiimid, 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -ribofuranosa, hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) uhličitan kraselný (K_2CO_3) a dichlormethan byly zakoupeny od Sigma chemical Co., St. Louis, USA. 5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid (AICAr) byl zakoupen u společnosti Toronto Research Chemicals Inc., North York, Canada.

Centrifuga SIGMA 1-13, SRN, ultrazvuk KRAINTEK 12, SR, lyofilizátor LABCONCO, ČR, analytické váhy, *kapilární elektroforéza P/ACE 5510* s detektorem diodového pole (DAD) (Beckman Instruments, Fullerton, CA) a "home made" *intrumentace*, která se skládá s UV detektorem CE-957 (Jasco Corp., Tokyo, Japan), zdroje napětí CZE 3000 HV (Spellman, New York, USA) a PC softwaru CSW 1.7 (DataApex, Praha, Česká republika). Rotační vakuová odparka Hei-VAP Value, Heidoph, přípravná vody WERNER Reinstwassersysteme (SRN), ultrazvuková lázeň Kraittek 12 (SR), vortex IKA (SRN), analytické váhy A&D (Japonsko), pH metr Orion Research (USA).

9 POSTUPY A METODY

9.1 Příprava ribosidů

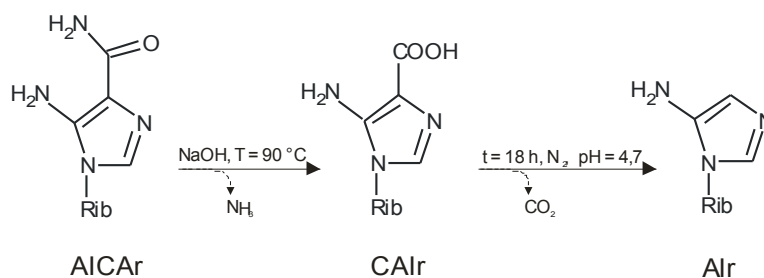
Formylglycinamidribosid (FGAr) – defosforylovaný substrát FGAMS – byl syntetizován čtyř-stupňovou syntézou [Shendel & Stubbe, 1986; Chu & Handerson 1970] z komerčně dostupné 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -ribofuranosy (Obr. 11). Prvním meziproduktem v přípravě FGAr je 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -ribofuranosyl azid [Camarasa *et al.*, 1980]. 3 g 2,3,5-tri-O-benzoyl- β -ribofuranosy byly rozpuštěny v 90 ml bezvodého dichlormethanu. Postupně bylo přidáváno 0,1 ml SnCl_4 (množství SnCl_4 bylo sníženo na 1/10 vzhledem k uvedené literatuře) a 1,5 ml trimethylsilylazidu. Směs byla 3,5 h intenzivně míchána pod zpětným chladičem opatřeným peletou NaOH - ochrana před vzdušnou vlhkostí a CO_2 . Reakční směs byla promyta 2x 50-ti ml vody, nasyceným roztokem NaHCO_3 , opět vodou a vysušena CaCl_2 . Dichlormethan byl odstraněn na rotační vakuové odparce. Příprava azidu proběhla s 95% výtěžností. Převedení do formy aminu spočívalo v rozpuštění azidu z předchozího kroku (uvažované množství 3 g) v bezvodém acetonu (120 ml) a přidavku PtO_2 (150 mg). Tato směs byla hydrogenována H_2 po dobu 45 min, kdy reakce proběhla s 80% výtěžností. Amin reagoval 3 h s formylglycinem ($11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) [Fischer & Warburg, 1906] v přítomnosti N,N'-dicyklohexylkarbodiimidem ($8,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Vyloučená dicyklohexylmočovina byla odstraněna filtrací, filtrát byl pro poslední krok syntézy zahuštěn na rotační vakuové odparce. Odstranění blokujících skupin v molekule bylo provedeno rozpuštěním FGAr ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) v methanolu a přidavkem čerstvě připraveného methoxidu ($0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), který vznikl rozpuštěním 25 mg sodíku v 9 ml methanolu [Chu & Henderson, 1970]. Reakce blokováného FGAr s methoxidem byla po 30-ti minutách zastavena přidavkem DOWEX 50WX8 (H^+ forma). Katex byl odfiltrován a filtrát zahuštěn a zakoncentrován na vakuové rotační odparce. Látka byla rozpuštěna ve 25 ml vody a 3-krát extrahováno do etheru. Vodná fáze byla odpařena do sucha. Finální výtěžnost reakce byla 50 %.



Obrázek 11: Reakční schéma přípravy FGAr.

(5-Aminoimidazol)ribosid (AIr), odpovídající defosforylovanému šestému meziproduktu PDNS, byl připraven z komerčně dostupného AICAr (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada) alkalickou hydrolyzou a následnou dekarboxylací [Groziak *et al.*, 1997]. 1 g AICAr byl zahříván v 6 mol·l⁻¹ NaOH. Směs byla poté ochlazená a pH bylo nastaveno na 4,7 ledovou kyselinou octovou. Spontánní dekarboxylace probíhala za probublávání argonem po dobu 18 hodin. Po odpaření na rotační vakuové odparce byl vzorek uložen do exsikátoru. Čistota byla ověřena metodou CE, výtěžek syntézy byl 80 %.

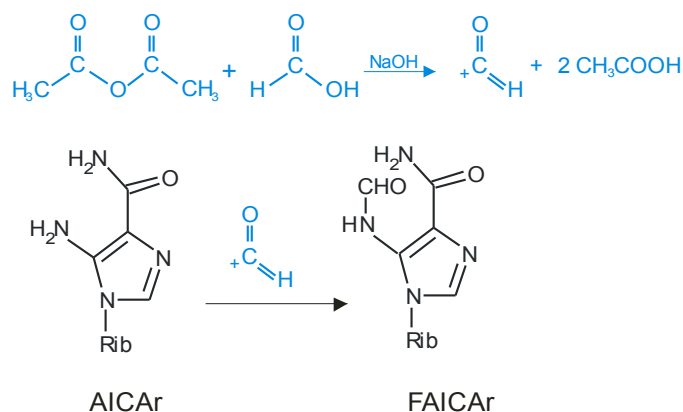
(5-Amino-4-karboxyimidazol)ribosid (CAIr), odpovídající sedmému defosforylovanému meziproduktu PDNS, byl připraven alkalickou hydrolyzou [Srivastava *et al.*, 1974]. 1 g AICAr byl zahříván v 6 mol·l⁻¹ NaOH na 90 °C (Obr. 12). Produkt sirupovité konzistence byl opakovaně rozetřen a dekantován nejprve s ethanolem a následně s methanolem. Hnědý pevný produkt byl uložen do exsikátoru. Výtěžek provedené reakce byl 99%.



Obrázek 12: Reakční schéma přípravy CAIr a Alr.

[5-amino-4-(aspartát-N-karbamoyl)imidazol]ribosid (SAICAr) byl připraven kolegy z Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze enzymaticky s použitím rekombinantní adenylosukcinátlyasy [Zikánová *et al.*, 2005] a byl nám laskavě věnován.

Syntéza (5-formamido-4-karbamoylimidazol)ribosidu (FAICAr), odpovídajícího předposlednímu defosforylovanému intermediátu PDNS, byla popsána ve dvou publikacích [Mueller *et al.*, 1981; Lukens & Flaks, 1963]. Námi provedená příprava dle prvního postupu [Mueller *et al.*, 1981] nebyla úspěšná, během reakce neprobíhala formylace. Syntéza byla proto provedená podle druhého publikovaného postupu [Lukens *et al.*, 1963] (Obr. 13). 1 g AICAr byl zahříván ve formylační směsi složené z 1,1 g NaOH, 13,6 ml kyseliny mravenčí a 25 ml acetanhydridu. Výsledné produkty byly lyofilizovány a uschovány v exsikátoru. Výtěžek syntézy byl 50%.



Obrázek 13.: Reakční schéma přípravy FAICAr. AICAr reaguje s formylační směsí (modrá část) za vzniku FAICAr.

9.2 Čištění ribosidů

CAI_r a SAICA_r neobsahovaly téměř žádné vedlejší produkty. FAICA_r byl znečištěn pouze výchozí látkou syntézy – AICA_r. AI_r obsahoval ze všech syntetizovaných ribosidů nejvíce nečistot. Oba tyto surové ribosidy jsme přečistili na katexu Dowex 50WX8 v NH₄⁺- cyklu. Při čištění byl žádaný produkt FAICA_r získán na ionexové koloně jako nezadržený podíl elucí vodou. V případě AI_r byl surový produkt nanesen na rekondiciovanou kolonu, která byla promývána vodou a čistý AI_r byl pak eluován 1 mol·l⁻¹ NH₄OH. V obou případech byly sbírány objemy v pořadí eluce, jednotlivé frakce eluátů analyzovány kapilární elektroforézou a frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a lyofilizovány. Analýzy přečištěných ribosidů jsou uvedeny v kpt. 6.2.2 na obrázku 22.

9.3 Potvrzení struktury připravených ribosidů

Struktura syntetizovaných ribosidů byla potvrzena technikou tandemové hmotnostní spektrometrie (AB SCIEX QTRAP 5500). Pro analýzu byly roztoky ribosidů naředěny na koncentraci 0,1 μmol·l⁻¹ 20 mmol·l⁻¹ kyselinou mravenčí ve směsi voda - methanol (1:1). Roztoky byly dávkovány pomocí syringe pumpy přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Byla změřena hmotnostní spektra všech studovaných ribosidů a fragmentační spektra molekulových iontů. Iontový zdroj pracoval za následujících nastavení: tlak „curtain“ plynu (Curtain Gas) 20 psi, tlak kolizního plynu (Collision Gas) "medium", napětí na vstupní kapiláře (IonSpray Voltage) 5500 V a tlak zmlžujícího plynu (Ion Source Gas 1) 16 psi (záznamy jsou uvedeny v kpt. 6.2.1).

9.4 Spektrální charakteristiky aminoimidazolových ribosidů

Analýzy produktů syntéz a přečištěných ribosidů byly prováděny na přístroji P/ACE 5510 vybaveném spektrofotometrickým detektorem s polem diod (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Separace probíhaly za konstantního napětí s náběhovou napěťovou rampou 30 s ve vnitřně nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm (Polymicro CE and CEC Technologies, Phoenix, AZ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 20 cm a celková délka 27 cm. Pro analýzy byla využita dříve publikovaná metoda [Adam *et al.*, 1999]. Separace byly prováděny při napětí 10 kV a teplotě 30 °C v módu micelární

elektroforetické chromatografie v alkalickém základním elektrolytu o složení 60 mmol·l⁻¹ H₃BO₃ – 80 mmol·l⁻¹ dodecylsulfát sodný (SDS). Hodnota pH 9,6 byla nastavena pomocí 2-amino-2-methyl-propan-1-olu. Přídavek micelotvorných činidel byl zvolen s ohledem na budoucí použití pro analýzu biologických tekutin s obsahem proteinů.

9.5 Elektromigrační charakteristiky aminoimidazolových ribosidů

Při studiu elektromigračních vlastností ribosidů v závislosti na pH byl každý z ribosidů analyzován kapilární zónovou elektroforézou. Při analýzách byly použity výše popsané podmínky, pouze s jinými základními elektrolyty o různém pH, jejichž složení bylo vybráno podle hodnot pK (Tab. 4).

Tabulka 4.: Složení pufrů pro studium elektromigračních vlastností.

pH	Složení pufru	Iontová síla
3	20 mmol·l ⁻¹ kyselina citronová (pK ₁ 3,13) - 0,8 mmol·l ⁻¹ CTAB	0,009
5	20 mmol·l ⁻¹ kyselina octová (pK 4,76) - 0,8 mmol·l ⁻¹ CTAB	0,014
7	20 mmol·l ⁻¹ kyselina fosforečná (pK ₂ 7,21)	0,035
9	20 mmol·l ⁻¹ TABS (pK 8,90)	0,011

Nastavení pH bylo prováděno titrováním pufrů roztokem NaOH. V případě pH 3 a 5 by doba analýzy byla příliš dlouhá, proto byl přidán kationtový tenzid hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB) v submicelární koncentraci a experiment probíhal při obrácené polaritě. Pufry byly titrovány NaOH na příslušnou hodnotu pH. Tyto analýzy poskytly informace o elektromigračních a spektrálních vlastnostech studovaných látek. Efektivní pohyblivosti ribosidů byly vypočteny dle vztahu

$$\mu_{\text{ef}} = (l_t \cdot l_d / t_{\text{anal}} \cdot U) - (l_t \cdot l_d / t_{\text{EOF}} \cdot U) \quad (16)$$

kde l_t je celková délka kapiláry [cm], l_d je délka kapiláry k detektoru [cm], t_{anal} je migrační čas analytu [s], t_{EOF} je migrační čas značky elektroosmotického toku [s] a U je vložené napětí [V]. Pro stanovení pohyblivosti elektroosmotického toku byl jako značka použit mesityloxid.

Protože neznáme přesnou koncentraci syntetizovaných ribosidů v analyzovaných roztocích, vycházeli jsme při výpočtu molárních absorpčních koeficientů z publikovaných hodnot a uvažovali vztah

$$\varepsilon_x = A_x \cdot \varepsilon_y / A_y \quad (17)$$

kde ε_x je molární absorpční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$], ε_y je publikovaný molární absorpční koeficient při pH 7 [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$], A_x je korigovaná plocha píku [$\text{mAU}\cdot\text{cm}$], A_y je korigovaná plocha píku při pH 7 [$\text{mAU}\cdot\text{cm}$]. Korigované plochy píků byly odečítány při vlnové délce, která je uvedena v literatuře [Mayer E, 1992; Laikind *et al.*, 1986; Hards RG, 1988; Szabados E, 1994].

9.6 Screening poruch PDNS pomocí TLC

Jako zdravé kontrolní vzorky byly použity moče 108 pacientů (62 mužů a 46 žen), ve věkovém rozmezí 1 – 15 let (věkový průměr 4,8 let). Vzorky močí zdravých kontrol. Moč pacienta trpícího defektem ADSL (muž, 5 let) byla laskavě věnována Dr. Jakubem Krijtem (ÚDMP, Praha).

Jednorozměrná tenkovrstevná chromatografie: 10 μl vzorku moči bylo nanášeno na startovní linii chromatografické celulosové desky a vyvíjeno 2x ve směsi butan-1-ol , kyselina octová, voda v poměru 4:1:1 [de Bree *et al.*, 1986].

Dvourozměrná tenkovrstevná chromatografie: 10 μL vzorku moče bylo nanášeno na startovní linii chromatografické celulosové desky a vyvíjeno 2x ve směsi propan-2-ol a 5 % hydroxidu amonného (4:1) v jednom směru. Deska byla vysušena (5 min, 40 °C) a vyvinuta opět 2x ve druhém směru v mobilní fázi butan-1-ol, kyselina octová, voda (4:1:1) jak bylo uvedeno výše [van Gennip *et al.*, 1978].

Hydrolyza a detekce: Vyvinuté chromatogramy byly vysušeny horkým vzduchem cca 10 min a umístěny do chromatografické vany s nasycenou kyselinou chlorovodíkovou. Desky byly exponovány 30 min. Po vyjmutí z par musejí být velmi pečlivě odstraněny z chromatogramu opětovným vysušením (10 min). Analyty byly vizualizovány Paulyho činidlem (4,45 mg kyseliny sulfanilové ve 2,5 ml 10 % K_2CO_3) [de Bree *et al.*, 1986].

9.7 Screening poruch PDNS pomocí Bratton-Marshall reakce.

Pro analýzy byly použity roztoky AICAr, FAICAr, CAIr a Alr o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z výsledného objemu bylo odebráno 500 μl vzorku a přidáno 50 μl HCl ($4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 50 μl 0,1 % NaNO_2 . Směs byla inkubována 3 minuty na ledu a následně bylo přidáno 50 μl 0,5 % amidosulfonanu amonného. Po dalších 2 minutách inkubace bylo ke směsi přidáno 50 μl 0,1 % NEDA. Zbarvení bylo měřeno po 5, 10, 20 a 30 minutách od přidavku barviva. Před spektrofotometrickou analýzou byl vzorek naředěn 1 ml vody. Zbýlých 500 μl bylo upraveno stejným způsobem, pouze před vlastním zpracováním byl vzorek acetylován 10 μl acetanhydridu po dobu 30 minut.

Vzorky u dosud nediodagnostikovaných defektů byly simulovány přidavkem 200 μl ribosidu ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) k 200 μl moči. Testování vzorku Sumetrolimu byl proveden analogicky simulací reálného vzorku, další zpracování bylo identické.

Výsledné roztoky byly analyzovány na spektrofotometru HP 8453 s detektorem diodového pole (Hewlett Packard, Waldbronn, SRN) a osmikanálovou absorpční celou. Absorpční spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 190 - 1100 nm s použitím křemenných kyvet 100-QS majících optickou dráhu 10 mm (Hellma, Müllheim, SRN).

Ověření stability aminoskupiny ribosidů bylo provedeno technikou CE na přístroji P/ACE s detektorem diodového pole (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Analýzy byly prováděny za konstantního napětí 10 kV s náběhovou napěťovou rampou 0,5 minuty v nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a vnějším 375 μm (Polymicro CE a CEC Technologies, Phoenix, AZ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 20 cm a celková délka 27 cm. Nástřik byl prováděn tlakem (0,5 psi). Teplota kapiláry byla 25 °C.

Pro testování použitelnosti provedení Bratton-Marshall reakce z moči nanášené na filtračním papíře byly použity roztoky AICAr, FAICAr, CAIr a Alr o koncentracích $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok byl nanášen na papír ponořením do roztoku, otřením a následným usušením horkým vzduchem. Pomocí děrovače stránek byly z papíru vystříhány 3 disky pro analýzu, tyto byly vyluhovány v 1 ml vody po dobu 5 min za stálého třepání na vortexu. Výsledný roztok byl analyzován na spektrofotometru HP 8453.

9.8 Diagnostika defektů PDNS analýzou erytrocytů.

Krev zdravých jedinců byla centrifugována (900 g, 5 min). Po odstranění supernatantu byla peleta nativních erytrocytů promyta fyziologickým roztokem. Erytrocyty byly inkubovány v médiu ($121 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ glukóza) s příslušným ribosidem ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 min.

Lýza erytrocytů byla provedena zmrazením nativních erytrocytů na $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ a rozmrazením při pokojové teplotě. Lyzát byl inkubován stejně jako nativní erytrocyty.

Erytrocytární membrány byly připraveny hypotonickou lyzí nativních erytrocytů v $0,103 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 (pH 7,6) a následnou centrifugací (10 min, 1000 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Buněčná peleta byla rozpuštěna v médiu, které obsahovalo $6,24 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $12,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaH_2PO_4 (pH 7,6), a jemně míchána 20 min na ledové lázni. Buněčná suspenze byla centrifugována (10 min, 20000 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Vrstva membrán byla rozpuštěna v hypotonickém pufru (viz. výše) a přidána do roztoku ribosidů tak, abych jejich výsledné koncentrace byly $5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $2,5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztoky byly inkubovány 19 h při laboratorní teplotě za mírného míchání.

Stanovení aminoimidazolových ribosidů: Před vlastní analýzou byly buňky 3x promyty fyziologickým roztokem a deproteinovány 1 mol/l kyselinou trichloroctovou a 30 s sonifikovány. Po centrifugaci byl supernatant extrahován diethyletherem do neutrální reakce. Ribosidy byly stanovovány pomocí kapilární elektroforézy P/ACE 5510 s detektorem diodového pole.

Stanovení ribosidů bylo provedeno na elektroforéze „home made“ s UV detektorem. Separace probíhala v pufru, který obsahoval $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny citronové – $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CTAB – GABA (pH 4,0) [Friedecký *et al.*, 2007].

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

10.1 Syntéza aminoimidazolových ribosidů

Meziprodukty PDNS jsou ve formě monofosfátů a jsou označovány jako ribotidy. V živých organismech PDNS probíhá sledem biochemických reakcí bez sebemenších problémů. Přítomnost monofosfátu na ribosovém kruhu je pravděpodobně jedním ze základních prvků nestability ribotidů v laboratorních podmínkách.

Meziprodukty **první poloviny PDNS** je možné připravit enzymaticky, kdy zdrojem příslušného enzymu jsou nejčastěji čerstvá drůbeží játra [Flaks & Lukens, 1963]. Zejména pro účely studia enzymů první poloviny PDNS byly připraveny karbocyklická analoga (ribosový kruh je nahrazen cyklopentanovým kruhem) aminoimidazolových ribotidů [Liu & Caparelli, 1991]. Ačkoliv je enzymy akceptují, pro studium patofyziologie enzymových defektů první poloviny PDNS je nezbytné pracovat s meziprodukty PDNS.

β -5-fosforibosylamin (PRA) je prvním v řadě meziproduktů PDNS. Jde o látku jejíž stabilita se odhaduje na několik vteřin [Liu *et al.*, 1991, Nierlich *et al.*, 1961]. Kromě enzymatické přípravy PRA [Reem, 1974] byla popsána také chemická syntéza přímo z ribosa-5-fosfátu a amoniaku, nicméně výtěžnost reakce byla pouze 10 - 30 % [Lukens & Flaks, 1963]. Alternativní příprava byla popsána jako hydrogenace ribosylazidu [Carrington *et al.*, 1964], jehož OH skupiny jsou chráněny a vytváří tak isopropylidenový derivát. Nicméně jde spíše o úvahu než o vlastní postup přípravy sloučeniny PRA. D-ribosylamin - defosforylovaný PRA - byl autory připraven [Tipson, 1961] s 91 % výtěžností reakcí D-ribosy s amoniakem v methanolu. Ačkoliv se autor o stabilitě D-ribosylaminu v publikaci nezmiňuje, dá se očekávat, že na rozdíl od PRA bude tento ribosid stabilní. Přesto nebyl syntetizován, neboť není možné námi dostupnými analytickými metodami ověřit čistotu syntetizovaného produktu ani jej identifikovat (pro MS je m/z molekuly malé a analýzy MS jsou diskutabilní).

FGAR je sloučenina, jejíž struktura se zdá být v ribosidické formě stabilní. Byla popsána nekomplikovaná chemická syntéza s výtěžností 60% [Schrimsher *et al.*, 1986], podle které byl námi ribosid připraven. Vybavení LDMP však nebylo vhodné pro

tuto organickou syntézu, byl FGAr syntetizován ve výzkumné laboratoři pod vedením prof. Ing. Pavla Hradila, CSc. Na základě faktu, že formylová skupina podléhá hydrolyze, může být FGAr vhodným substrátem pro syntézu GAR (kyselá hydrolyza). Jako monofosfát může být GAR připraven v 10-ti krocích jako barnatá sůl s celkovou výtěžností pouze 23% [Chettur & Benkovic, 1977] a také 7-stupňovou syntézou s 15 % výtěžkem [Boschelli *et al.*, 1989]. V obou případech pravděpodobně vznikne směs izomerů α a β . V živých organismech enzym přijme jako substrát pouze β -formu.

FGAM má kromě monofostátu ve své struktuře další nestabilní prvek - amidinovou skupinu. Z tohoto důvodu je FGAM obecně považována za chemicky labilní látku [Schrimsher *et al.*, 1986], která nebyla připravena jinak, než enzymaticky [Lukens *et al.*, 1963, Levenberg & Buchanan, 1956]. Na základě těchto informací se dá usuzovat, že také příprava FGAM v ribosidické formě bude značně komplikovaná, a proto jsme se o chemickou syntézu nepokoušeli.

Kromě SAICAr byly popsány chemické syntézy všech zbylých meziproductů **druhé poloviny PDNS** v ribosidické formě, výchozí látka společná všem syntézám je AICAr (komerčně dostupná chemikálie).

10.2 Vlastnosti studovaných látek

Během přeměny ribosa-5-fosfátu na IMP vzniká 10 meziproductů ve formě monofosfátu. Pokud rozdělíme PDNS na dvě části, pak látky v její první polovině nemají uzavřený imidazolový kruh – na fosforylovaném ribosovém kruhu je navázán alifatický řetězec. Absence aromatického cyklu v molekule znemožňuje látkám absorbovat UV záření a tudíž je nelze stanovit metodami s UV detekcí (CE, HPLC, TLC, spektrofotometrie). Jediná metoda schopná látky identifikovat je MS.

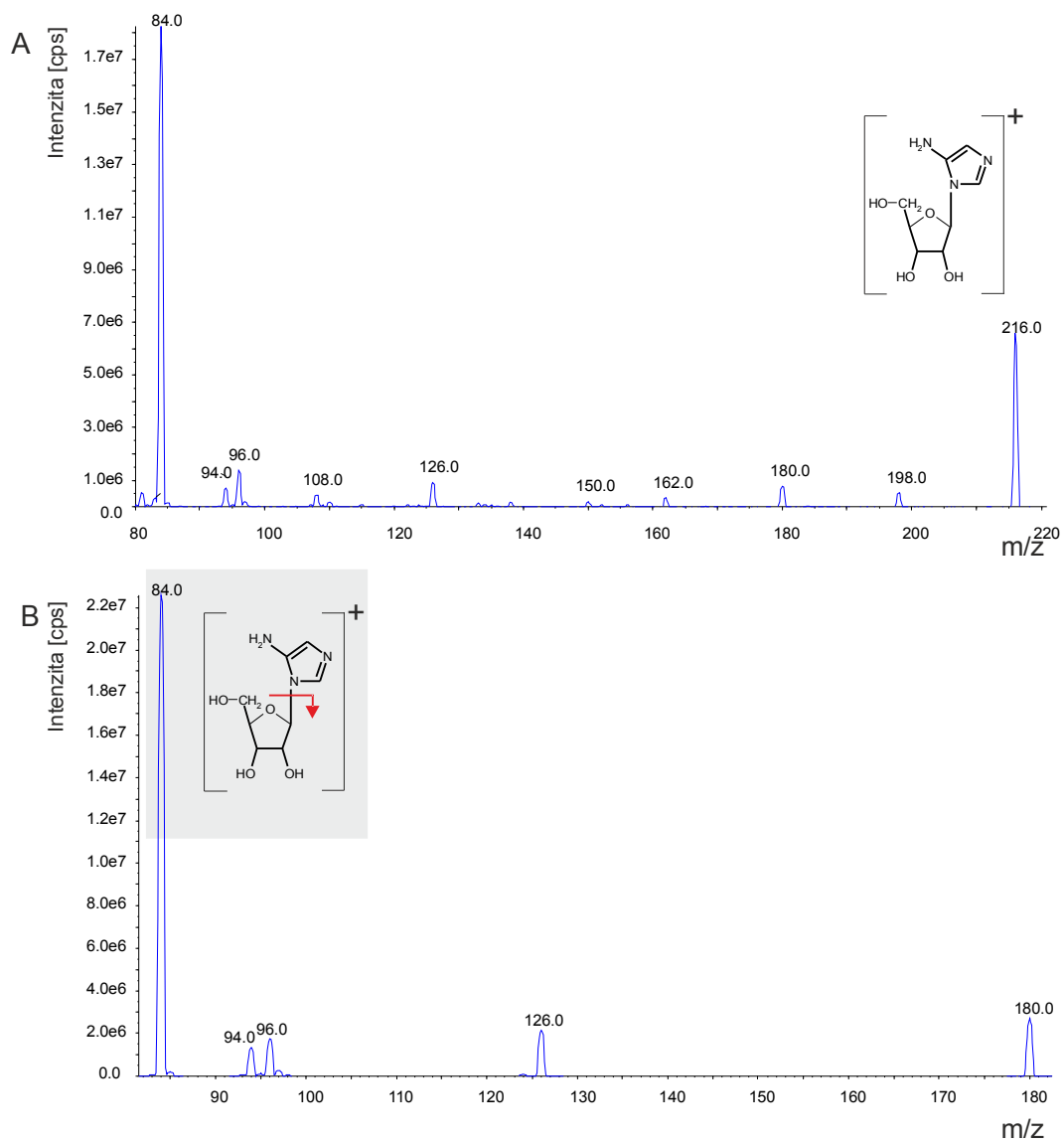
Látky druhé poloviny PDNS mají ve své molekule uzavřený aromatický kruh, což je výhodné pro jejich stanovení jakoukoliv vhodnou separační technikou s UV detekcí (CE, HPLC).

10.2.1 MS charakterizace aminoimidazolových ribosidů

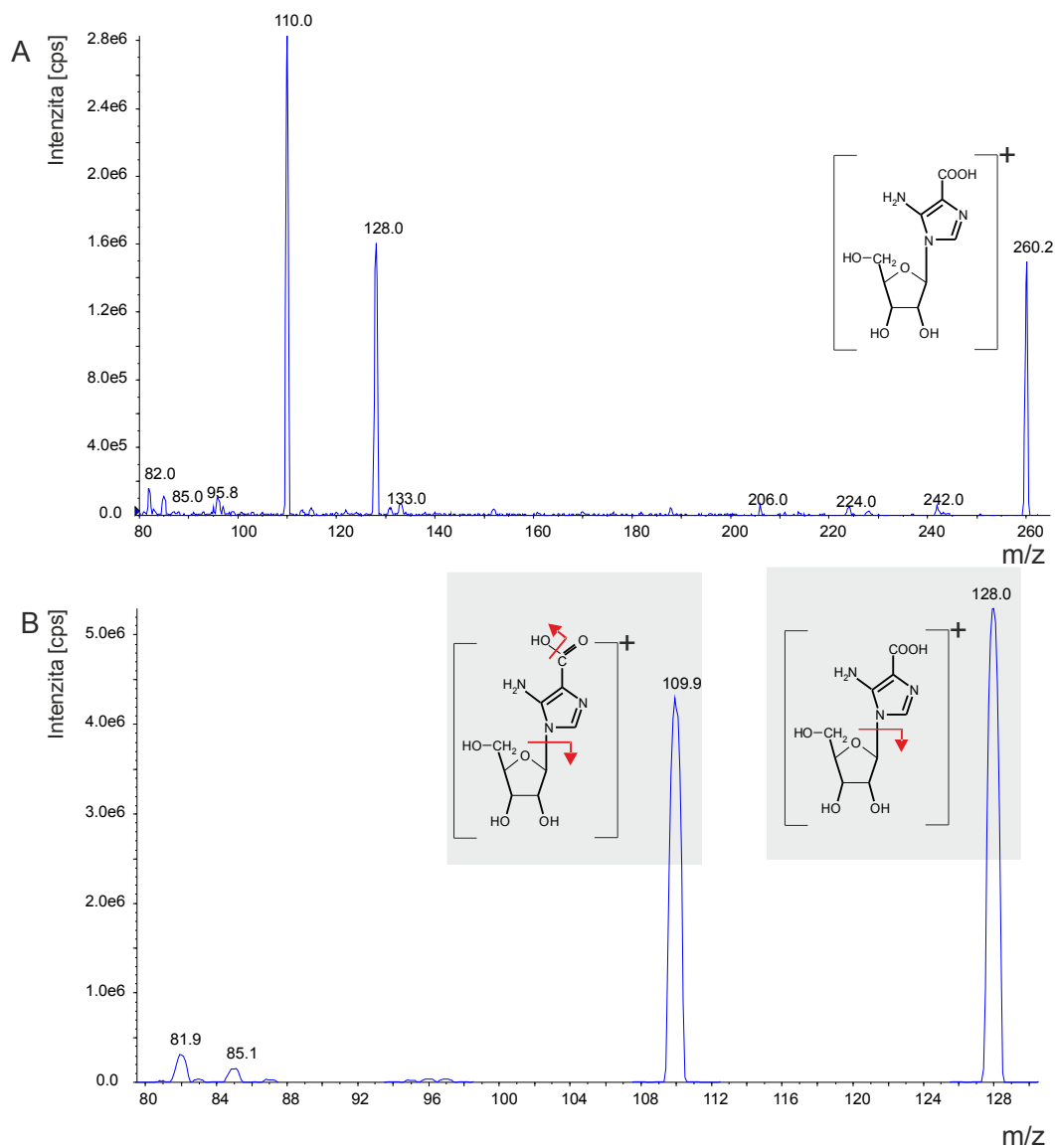
Na základě MS spekter byla potvrzena molekulová hmotnost analyzovaných ribosidů. Také fragmentace odpovídá teoretickým ztrátám skupin a zánikům vazeb v molekulách (Obr. 14 - 20). Stabilní fragment tvoří imidazolová část, fragment odpovídající ribosovému zbytku ve spektrech nebyl nalezen (je přítomen pouze ve spektru FGAr).

Z níže uvedených záznamů je zřejmé, že molekuly obsahující imidazolový kruh fragmentují podobnou cestou. Vazba mezi N imidazolu a C ribosy zaniká a ve spektrech se objevují stabilní fragmenty imidazolové části. Nestabilní je aminoskupina na imidazolovém kruhu, která se z molekuly odštěpí jako NH_3 . Pík s hodnotou m/z 110 je s největší pravděpodobností fragment imidazolového jádra s karboxylem. Čím je molekulová hmotnost menší, tím hůře jsou spektra interpretovatelná. FGAr fragmentuje velmi podobně jako látky druhé poloviny PDNS. Ve spektru GAR je mnoho píků, která nelze snadno a jednoduše vysvětlit. Nicméně molekulární pík a dva vzniklé fragmenty identitu sloučeniny potvrzují.

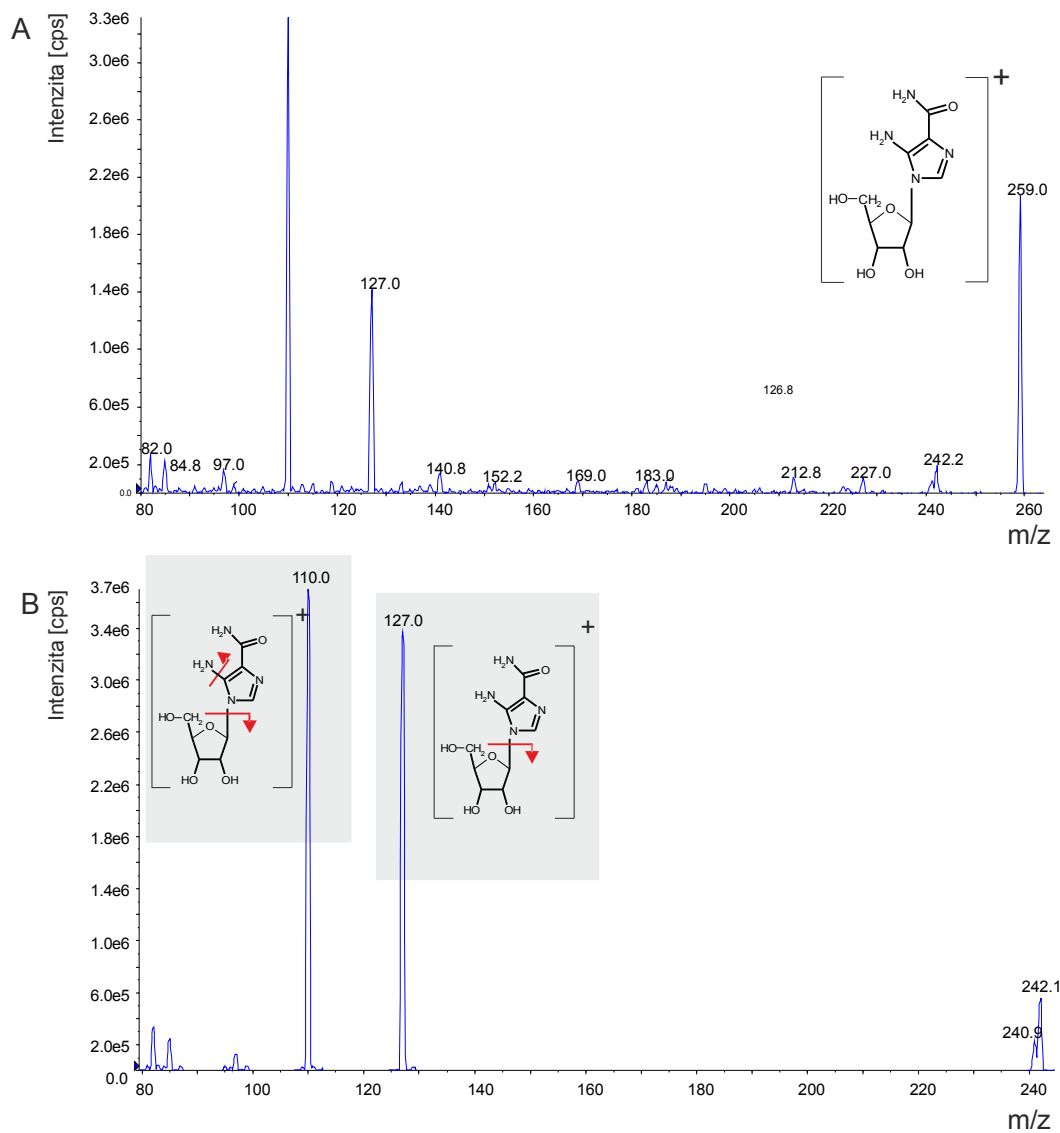
MS spektra jsou užitečná pro diagnostiku enzymových defektů separační technikou ve spojení s MS detekcí. Zvláště pak u ribosidů analogických první polovině PDNS, kde jiná technika není možná.



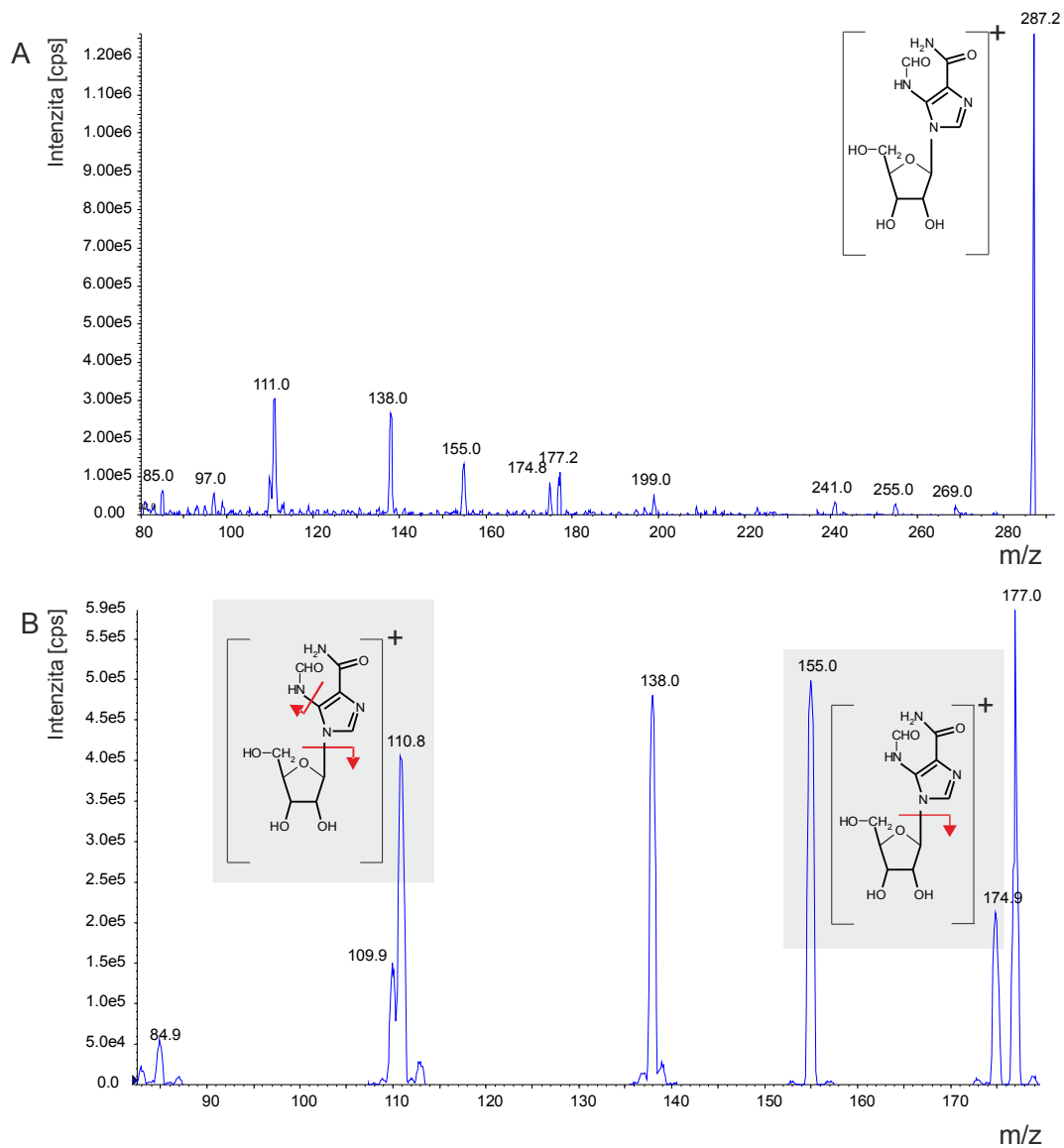
Obrázek 14: Hmotnostní spektrum Alr. Molekulární pík Alr v iniciálním spektru (A) má hodnotu m/z 216. Pík s m/z 84 v produktovém spektru (B) odpovídá aminoimidazolové části molekuly.



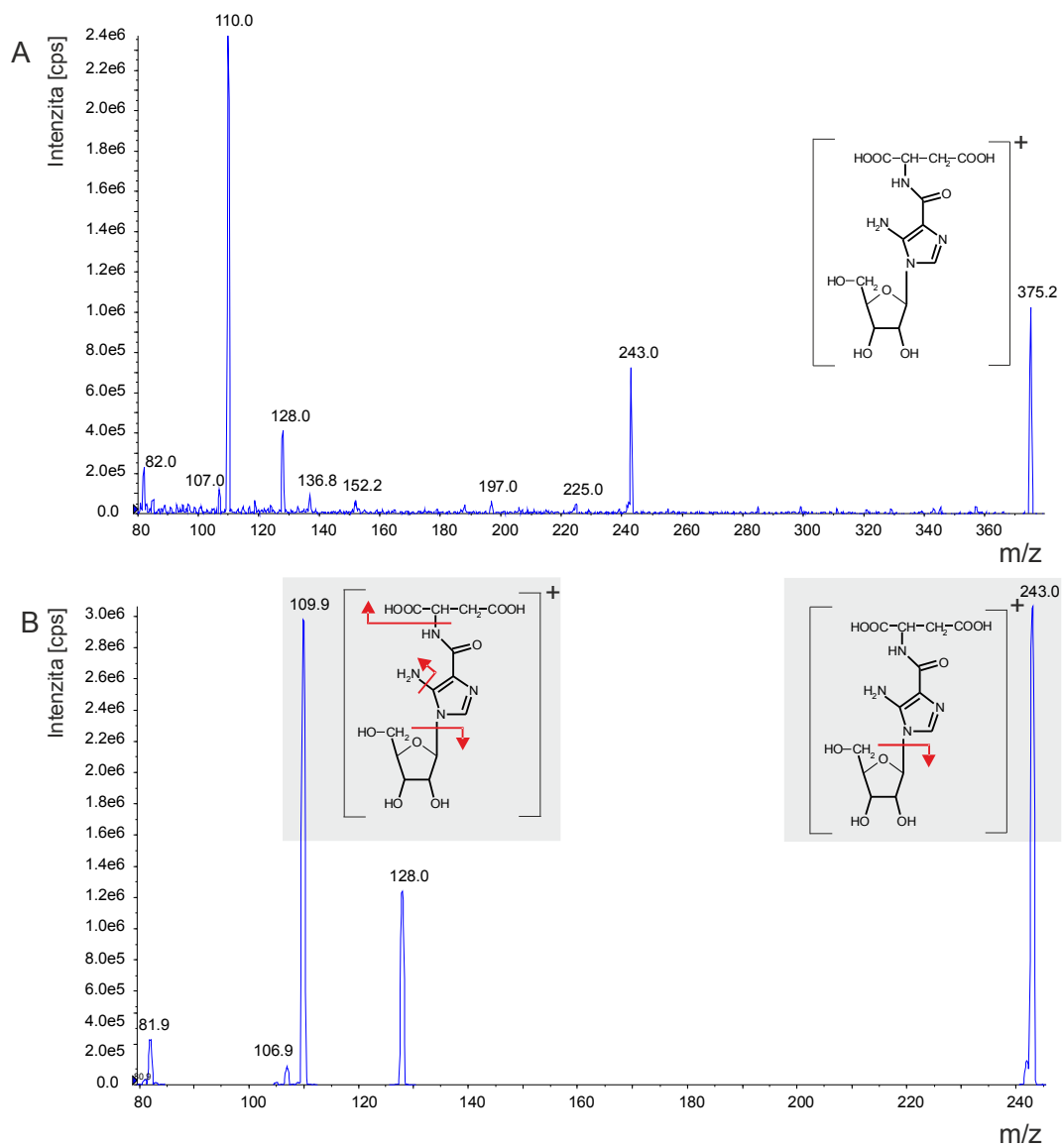
Obrázek 15: Hmotnostní spektrum CAIr. Molekulární pík CAIr má v iniciálním spektru (A) hodnotu m/z 260. Pík s m/z 128 v produktovém spektru (B) odpovídá aminoimidazolové části molekuly po přerušení vazby mezi ribosou a imidazolovým jádrem. m/z 110 pak odpovídá imidazolové části molekuly bez hydroxy skupiny, která se odštěpí jako molekula vody.



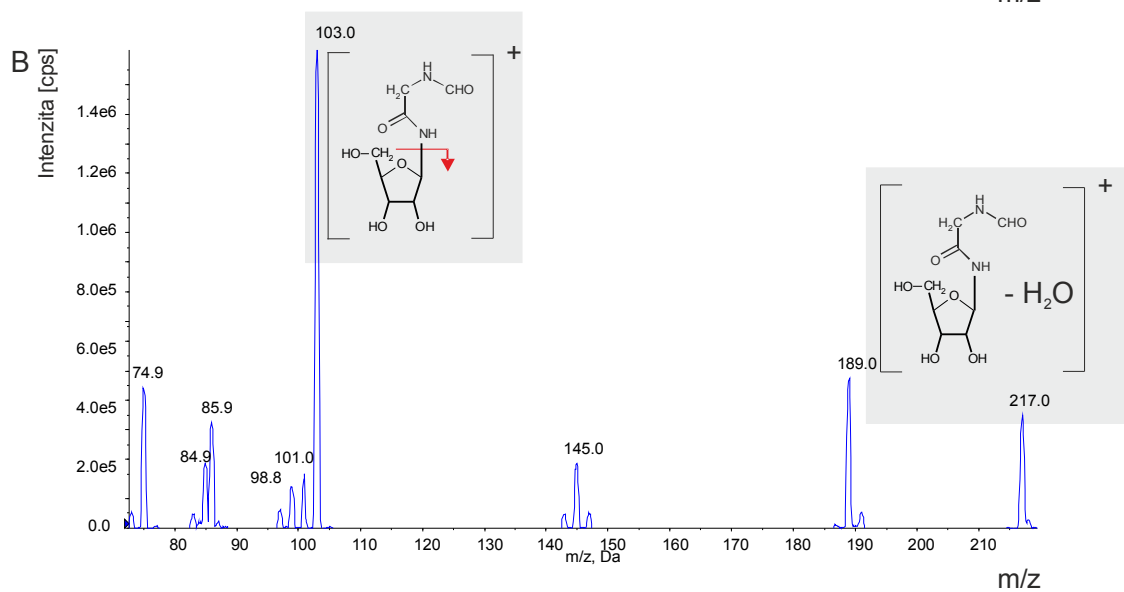
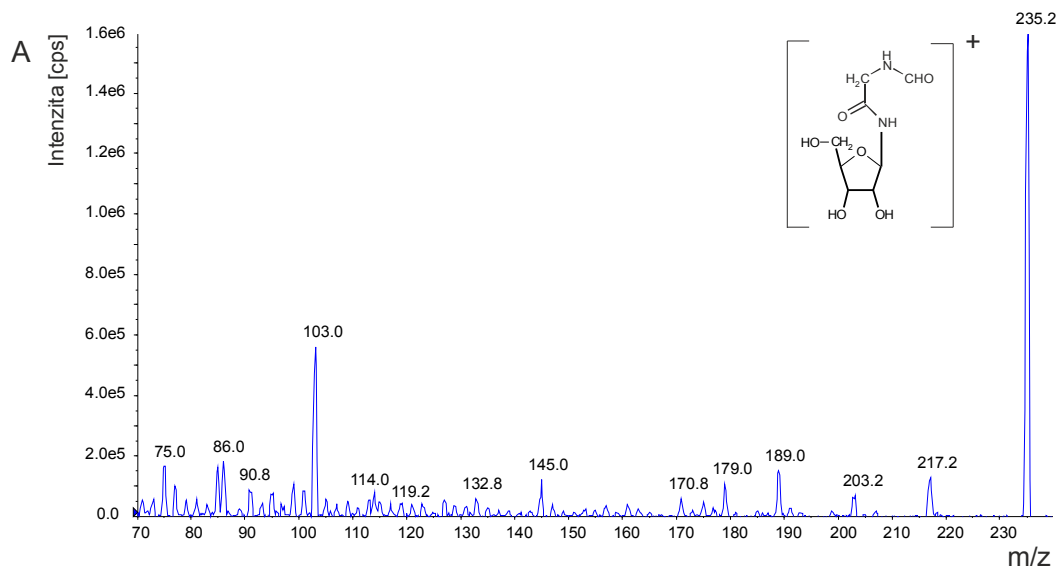
Obrázek 16: Hmotnostní spektrum AICAr. Molekulární pík AICAr v iniciálním spektru (A) má hodnotu m/z 259. Pík s m/z 242 v produktovém spektru (B) odpovídá AICAr bez aminoskupiny, která se odštěpí jako NH_3 . m/z 126,8 odpovídá aminoimidazolovému zbytku molekuly, která se odštěpí jako NH_3 . m/z 110 pak odpovídá imidazolové části molekuly bez amino skupiny, která se odštěpí jako NH_3 .



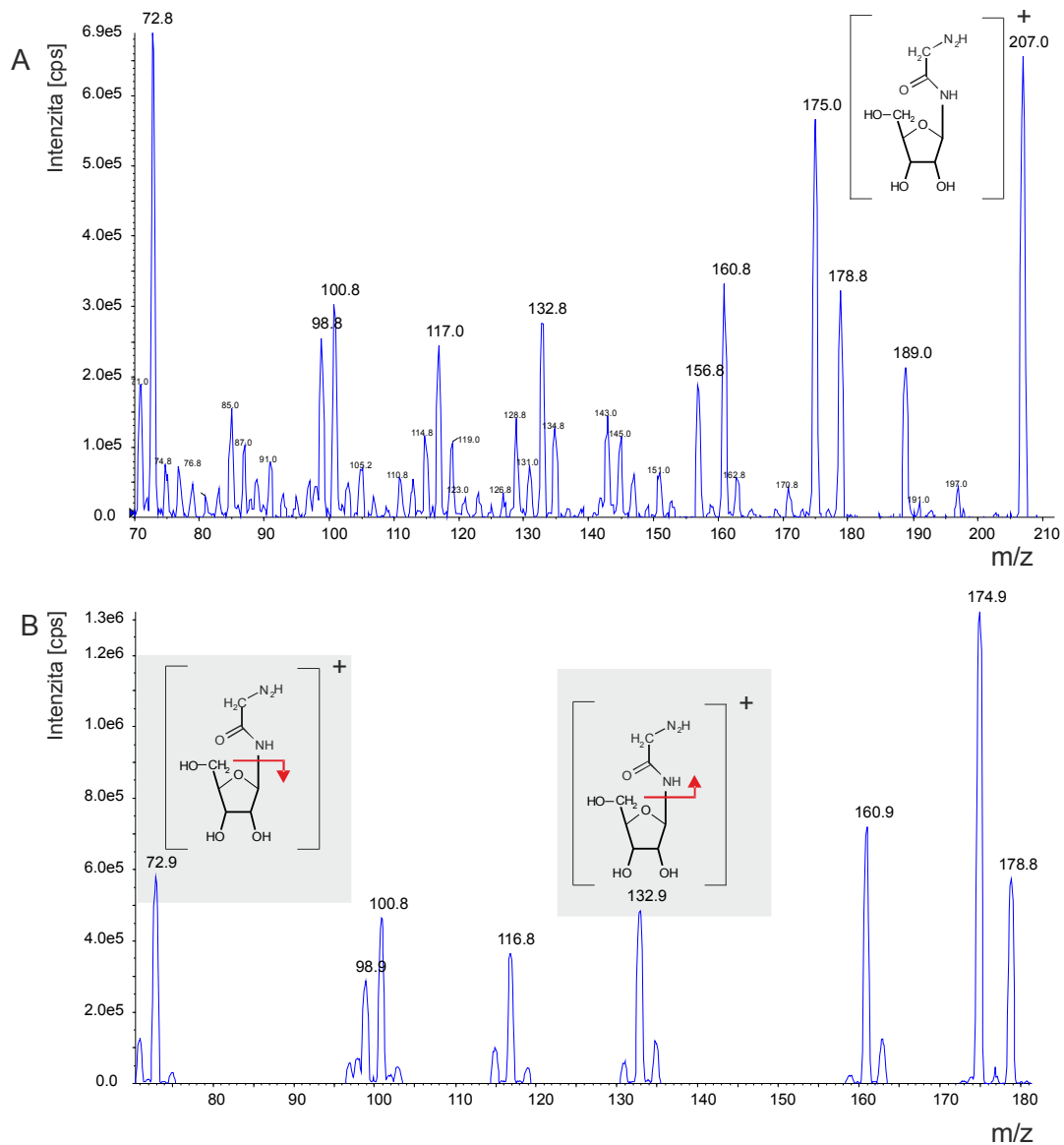
Obrázek 17: Hmotnostní spektrum FAICAr. Molekulový pík FAICAr má v iniciálním spektru (A) hodnotu m/z 287. Pík s m/z 155 v produktovém spektru (B) odpovídá aminoimidazolovému zbytku molekuly. m/z 138 je pravděpodobně fragment FAICAr bez amidoskupiny, která se odštěpí jako NH₃. m/z 110 pak odpovídá imidazolové části molekuly bez amino skupiny, která se odštěpí jako NH₃.



Obrázek 18: Hmotnostní spektrum SAICAr. Molekulový pík SAICAr má v iniciálním spektru (A) hodnotu m/z 375. Pík s m/z 243 v produktovém spektru (B) odpovídá aminoimidazolovému zbytku molekuly. m/z 110 pak odpovídá imidazolové části molekuly bez aminoskupiny, která se odštěpí jako NH_3 .



Obrázek 19: Hmotnostní spektrum FGAr. Molekulový pík **FGAr** má v iniciálním spektru (A) hodnotu m/z 235. Pík s m/z 217 v produktovém spektru (B) odpovídá FGAr bez molekuly vody. Fragment s m/z 103 je alifatický řetězec po odštěpení ribosy.



Obrázek 20: Hmotnostní spektrum GAR. Molekulový pík **GAr** má v iniciálním spektru (A) hodnotu m/z 207. Pík s m/z 133 v produktovém spektru (B) odpovídá ribosovému zbytku, 73 pak zbývající části molekuly.

10.2.2 Elektromigrační a spektrální charakteristiky aminoimidazolových ribosidů

Pro vývoj diagnostické metody je nezbytné analyzovanou látku z pohledu použité techniky charakterizovat. Všechny meziprodukty druhé poloviny PDNS jsou schopny za určitých podmínek nést náboj a tedy být stanoveny technikou HPCE, která se v laboratoři dědičných metabolických poruch používá, mimo jiné, k diagnostice enzymových defektů purinového metabolismu.

V této kapitole bude popsáno, jak pH prostředí ovlivňuje disociaci a protonizaci ionogenních skupin analytu (při kterém pH se látky chovají jako nabitě molekuly). Míru ionizace a velikost náboje vyjadřují hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí analytů, které jsou prezentovány v tabulce 5.

Tabulka 5: Efektivní pohyblivosti ($\mu_{ef} \cdot 10^9 [m^2V^{-1}s^{-1}]$) imidazolových ribosidů v závislosti na pH při teplotě 30 °C.

Ribosid	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
Alr	22,2	15,9	0	0
CAIr	4,9	0	-15,3	-15,5
SAICAr	0	0	-23,4	-22,8
AICAr	5,5	0	0	0
FAICAr	0	0	0	-3,0

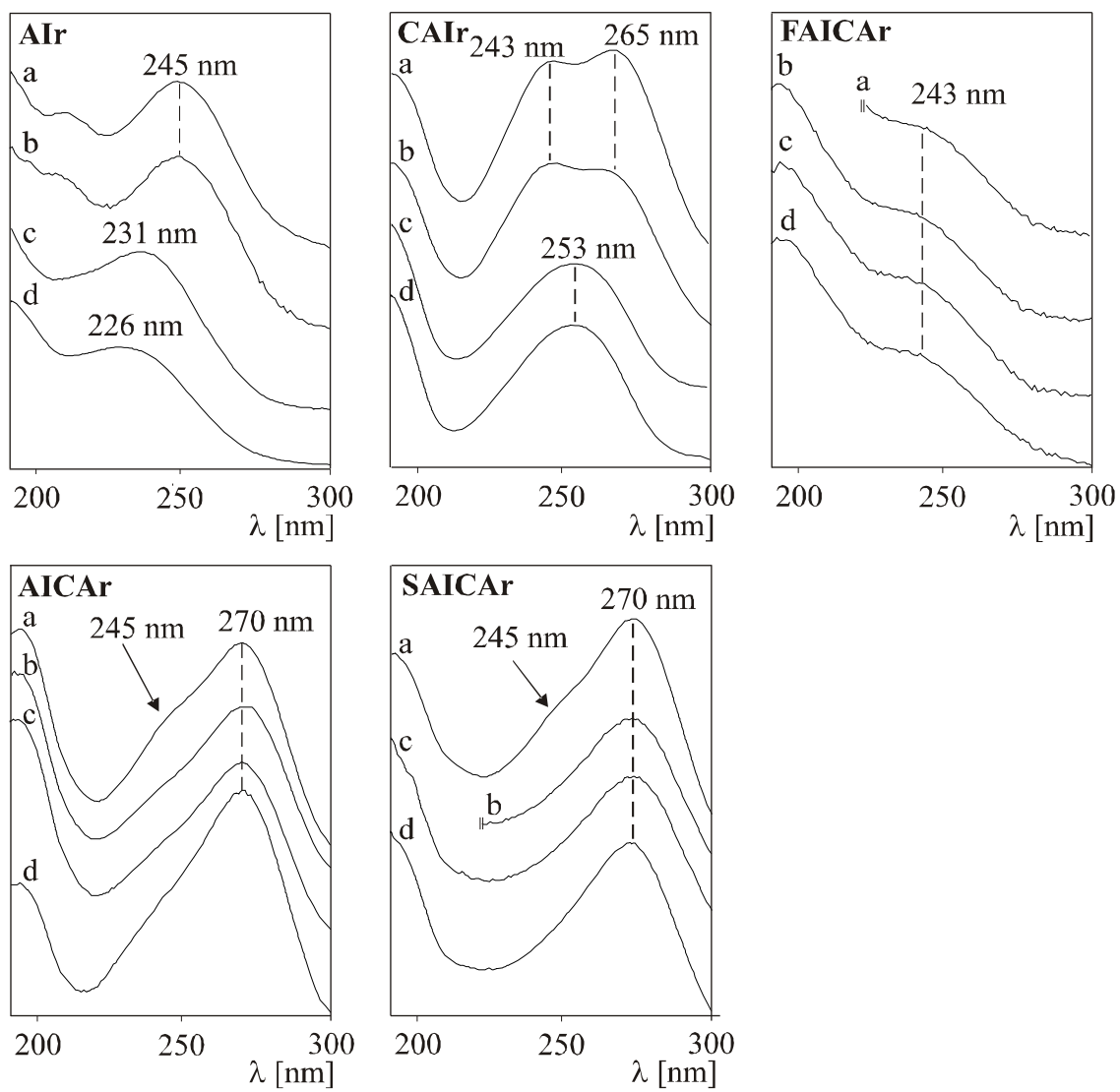
Ve struktuře Alr se při pH < 5 protonizuje aminoskupina vázaná na imidazolovém kruhu a v této oblasti pH se tedy Alr chová jako kationt. CAIr má ve své struktuře kromě aminoskupiny také karboxylovou skupinu. Při pH 3 se chová jako kationt, ale při pH 5 je nenabitý (migruje s elektroosmotickým tokem). Při pH > 5 se chová jako aniont, neboť karboxylová skupina je plně disociována a aminoskupina není protonizována. Další zvyšování pH disociaci neovlivňuje. SAICAr má ve své struktuře dvě karboxylové skupiny a při pH > 7 se prokazatelně chová jako aniont. AICAr obsahuje aminoskupinu a amidovou skupinu. Při pH < 3 se chová jako kationt, při vyšším pH již nenese žádný náboj. Jinak je tomu u FAICAr, kde je aminoskupina chráněná formylovou skupinou, a proto se neprotonizuje. Při pH ≥ 9 disociuje enolforma aldehydové skupiny a FAICAr se chová jako aniont.

Kromě elektromigračních vlastností se mění i vlastnosti spektrální. Hodnoty molárních absorpčních koeficientů ve spektrálních maximech ribosidů analyzovaných při různém pH jsou uvedeny v tabulce 6. Na obrázku 21 jsou uvedena UV spektra studovaných ribosidů při použitých pH. U SAICAr a AICAr se při pH < 3 zvyšuje absorbance v oblasti 245 nm. U CAIr se významně měnila UV spektra v závislosti na pH. Při pH 3 jsou zřejmá dvě absorpční maxima. Se snižujícím se pH se zvyšuje absorbance v oblasti 243 nm. Při pH 7 splývají obě maxima do jednoho v oblasti 253 nm, které se s rostoucím pH nemění. U Alr se projevuje absorpční maximum směrem k nižším vlnovým délkám s rostoucím pH. Naopak spektra FAICAr zůstávají při všech hodnotách pH stejná.

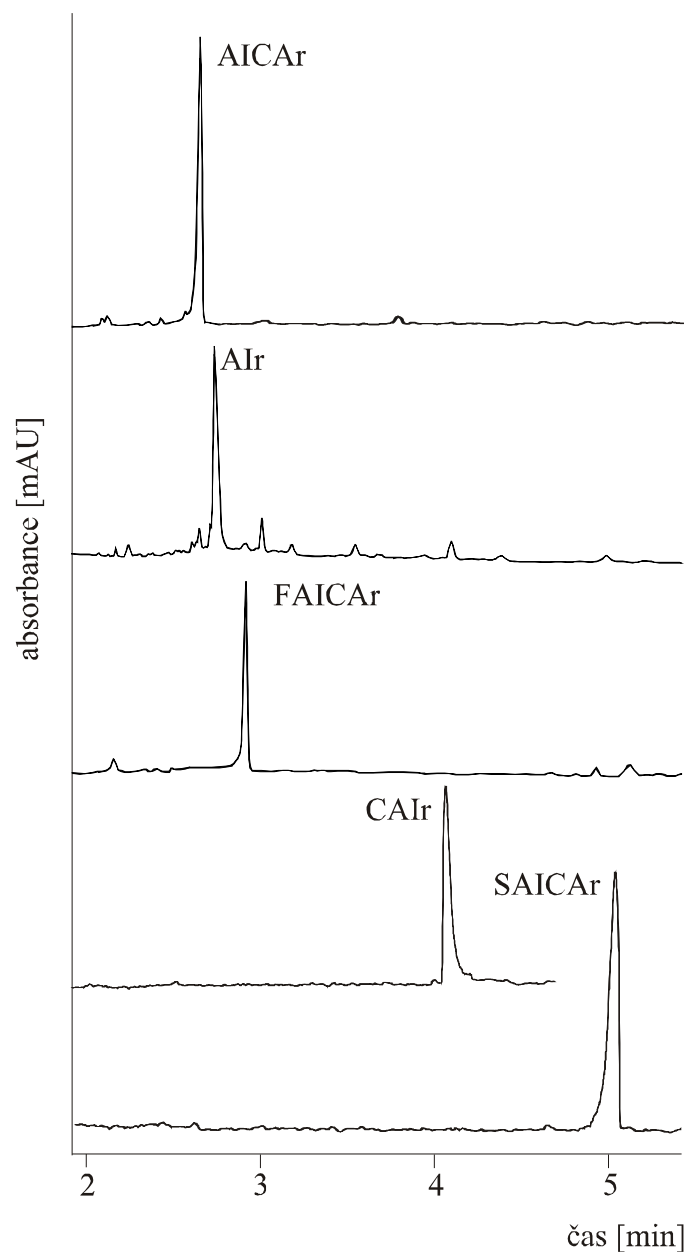
Tabulka. 6: Molární absorpční koeficienty ϵ [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$] imidazolových ribosidů.

Ribosid	λ [nm]	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
Alr	260	5969	4735	2400	7769
CAIr	260	7531	8281	10080	8912
SAICAr	270	24605	32180	13300	30347
AICAr	267	9844	11270	12600	9557
FAICAr	248	4798	4216	6590	4477

Spektrální charakteristiky ribosidů jsou užitečné pro všechny diagnostické nástroje moderních laboratoří, které využívají UV detekci (CE, HPLC, spektrofotometrie, CE/MS, HPLC/MS).



Obr. 21. Závislost spektrálních vlastností imidazolových ribosidů na pH; a: pH 3, b: pH 5, c: pH 7, d: pH 9.



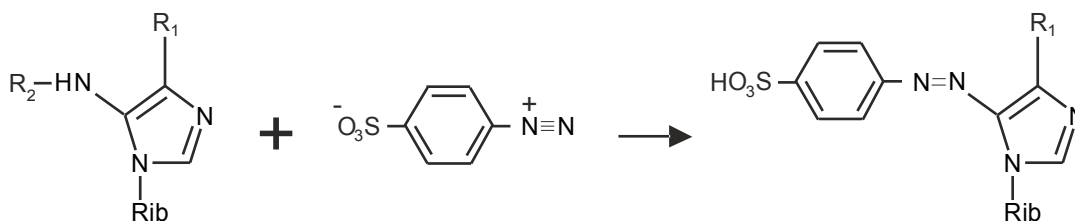
Obrázek 22: Analýza přečištěných imidazolových ribosidů kapilární micelární elektrokinetickou chromatografií. Základní elektrolyt: $60 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ + $80 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ SDS, upraveno na pH 9,6 přidavkem 2-amino-2-methyl-propan-1-olu; vnitřní/vnější průměr křemenné kapiláry 50/375 μm , efektivní/celková délka 20/27 cm, napětí 10 kV, proud $45 \mu\text{A}$, teplota $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

10.2.3 Klinické aplikace pro diagnostiku enzymových defektů v PDNS

10.2.3.1 Tenkovrstevná chromatografie

Ve druhé polovině PDNS jsou doposud diagnostikovány 2 enzymové defekty (ADSL, ATIC). Tyto se projevují akumulací substrátů defektních enzymů v tělních tekutinách v ribosidické formě. Na základě předpokladu, že mechanismus enzymových defektů je identický u doposud neobjevených, byla vyvinuta TLC diagnostická metoda.

Princip detekce Paulyho činidlem je reakce azo-skupiny diazotovaná kyseliny sulfanylové s volnou amino-skupinou aminoimidazolových ribosidů. Kyselá hydrolyza byla použita z důvodu negativní odezvy FAICAr (amino-skupina není volná, je blokována). Důkladné odpaření HCl z chromatogramu před detekcí Paulyho činidlem je velmi důležité, protože barvicí reakce neprobíhá v kyselém prostředí. Studované ribosidy jsou zbarveny v odstínech modré barvy, zatímco ostatní složky nativní moči jsou zbarveny do žluta, oranžova a červené (histidin, tyrosin).



Obrázek 23.: Schéma detekce ribosidů Paulyho činidlem. R₁ je CONH₂ (pro FAICAr a AICAr), COOH (pro CAI_r), CONHCHCOOHCH₂COOH (pro SAICAr), H (pro Al_r); R₂ = COH (pro FAICAr) a H (pro AICAr, SAICAr, Al_r, CAI_r); Rib znamená ribosa.

Na jednorozměrném chromatogramu, s výjimkou FAICAr, mají velmi podobný retenční faktor (Obr. 24), což nedovoluje ribosidy vzájemně odlišit. Tato metoda je však vhodná jako screeningová. Ačkoliv se jedná o řekněme "nemoderní" separační techniku, je jednoduchá, finančně nenáročná a umožňuje novorozenecký screening. Dvourozměrná TLC (Obr. 25) látky od sebe separuje a je možné je jednoznačně identifikovat. Retenční faktory jsou uvedeny v tabulce 7.

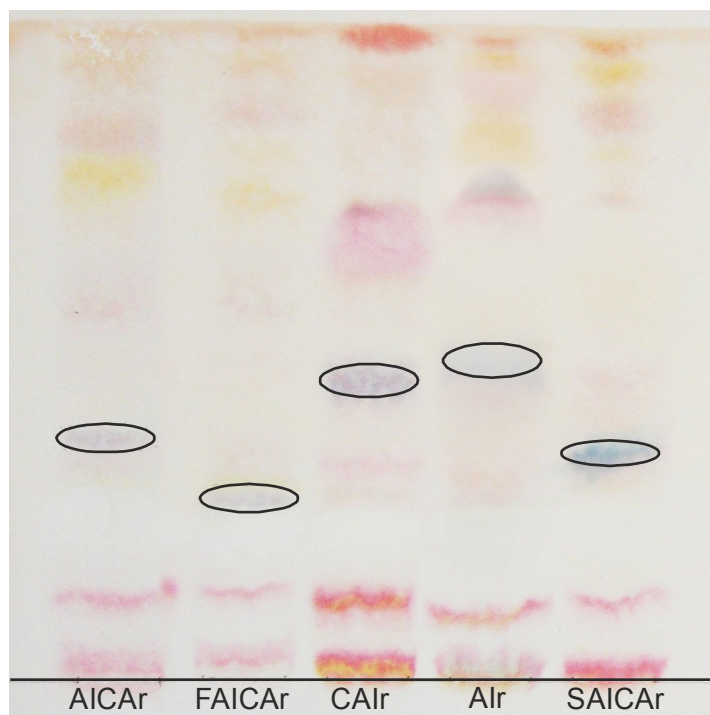
Vhodnější než spojení jednorozměrné TLC s dvourozměrnou je spojit ji s analytickou technikou (CE, HPLC, MS), kde na základě UV (MS) spekter je možné

látku jednoznačně identifikovat a stanovit pro potřeby diagnostiky. TLC pojme velký objem analyzovaných vzorků a analytická technika se pak dále zabývá pozitivním, případně podezřelým vzorkem.

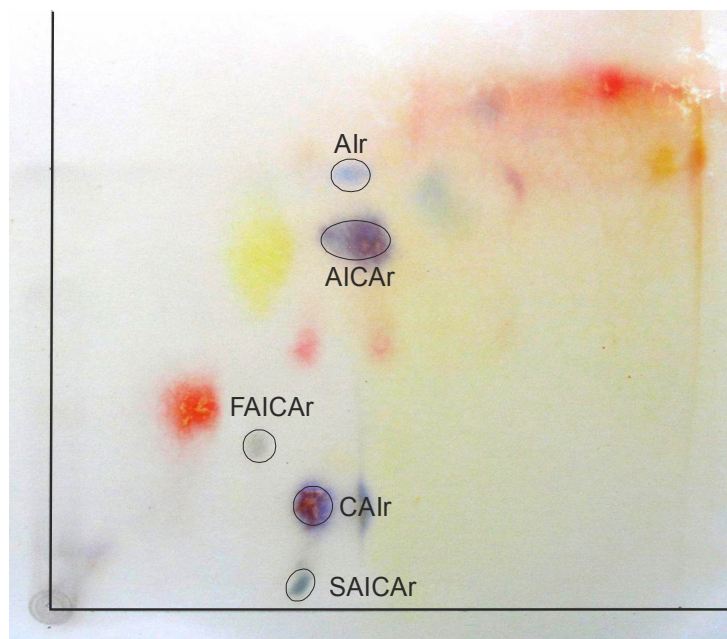
Tabulka 7: Retenční faktory studovaných látek.

Ribosid	1D	2D	
		1.směr	2.směr
Alr	0.50	0,75	0,31
CAIr	0.45	0,11	0,27
SAICAr	0.32	0,05	0,43
AICAr	0.56	0,5	0,48
FAICAr	0.35	0,1	0,28

1D je jednorozměrná TLC a 2D je dvourozměrná TLC.



Obrázek 24: Chromatogram jednorozměrné TLC.

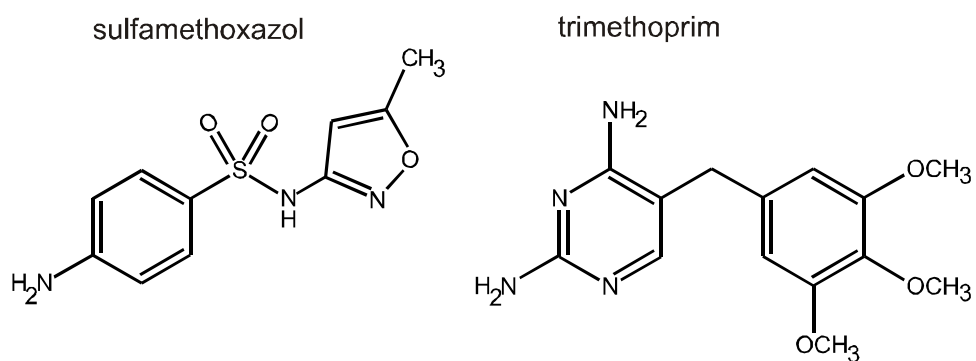


Obrázek 25: Chromatogram dvourozměrné TLC.

10.2.3.2 Fotometrie s využitím Bratton-Marshall reakce

Bratton-Marshall reakce byla v minulosti používána pro stanovení SAICAr u pacientů s ADSL deficitem. Metoda je založena na stejném reakčním principu, jako je tomu u detekce ribosidů na tenké vrstvě pomocí Paulyho činidla. To znamená diazotace v prvním stupni a ve druhém kopulace s vhodným činidlem. V případě Bratton-Marshallovy reakce se jedná o NEDA (N-1-naftylethylendiamin) (Obr. 4).

Před provedením této metody je třeba věnovat pozornost pacientově nasazené léčbě. V případě, že užívá léky s obsahem sulfonamidů, musí být Bratton-Marshallově reakci předřazena acetylace provedená přidavkem acetanhydridu do reakční směsi. Acetylace blokuje aminoskupiny sulfonamidů a potlačí jejich pozitivní odezvu na NEDA.



Obrázek 26: Strukturní vzorce hlavních složek Sumetrolimu.

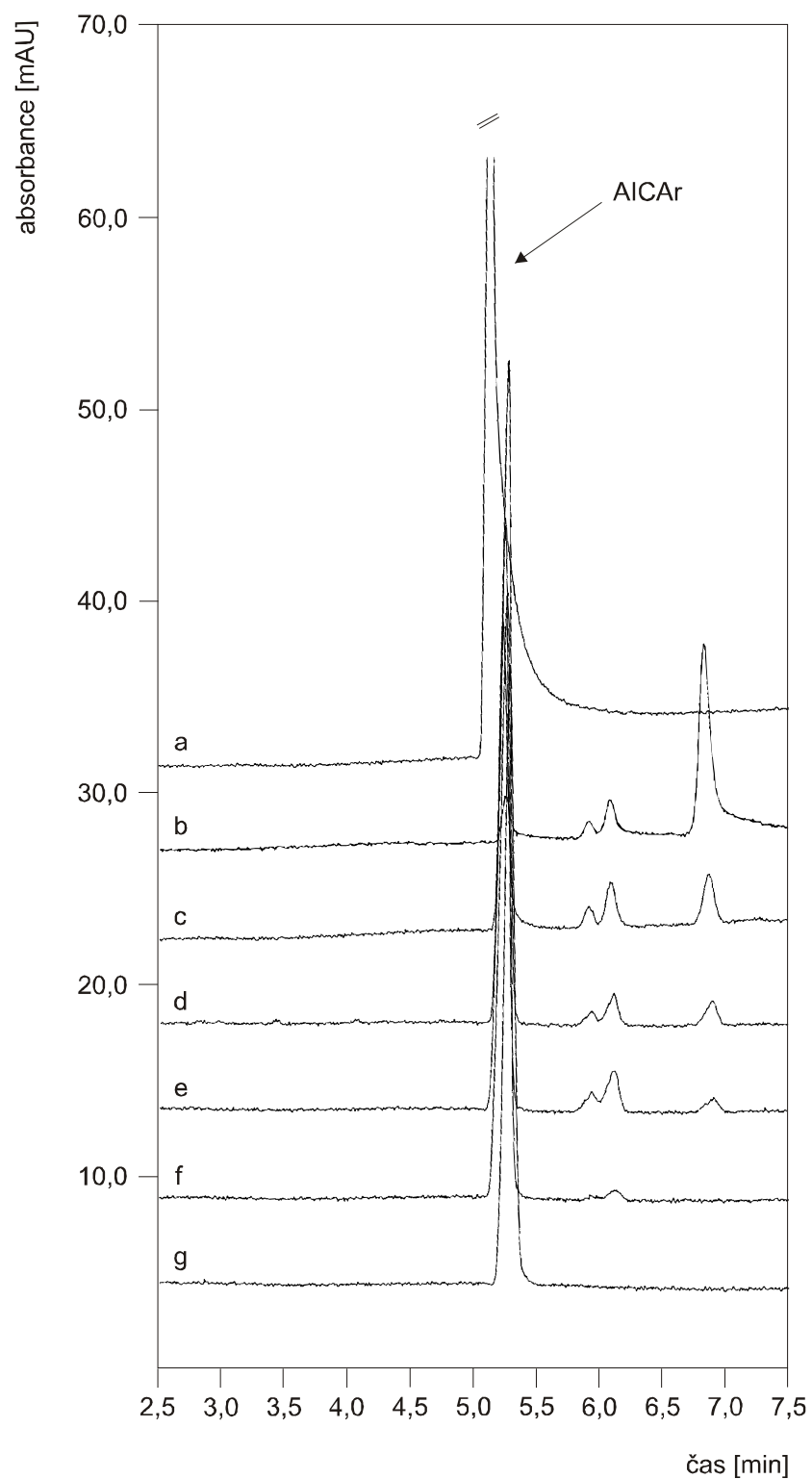
V této kapitole bude popsáno použití této metody pro stanovení aminoimidazolových ribosidů první poloviny PDNS.

Experiment byl rozdělen do dvou částí. V první byla ověřena stabilita ribosidů v prostředí acetanhydridu a ve druhé použitelnost metody pro všechny syntetizované ribosidy.

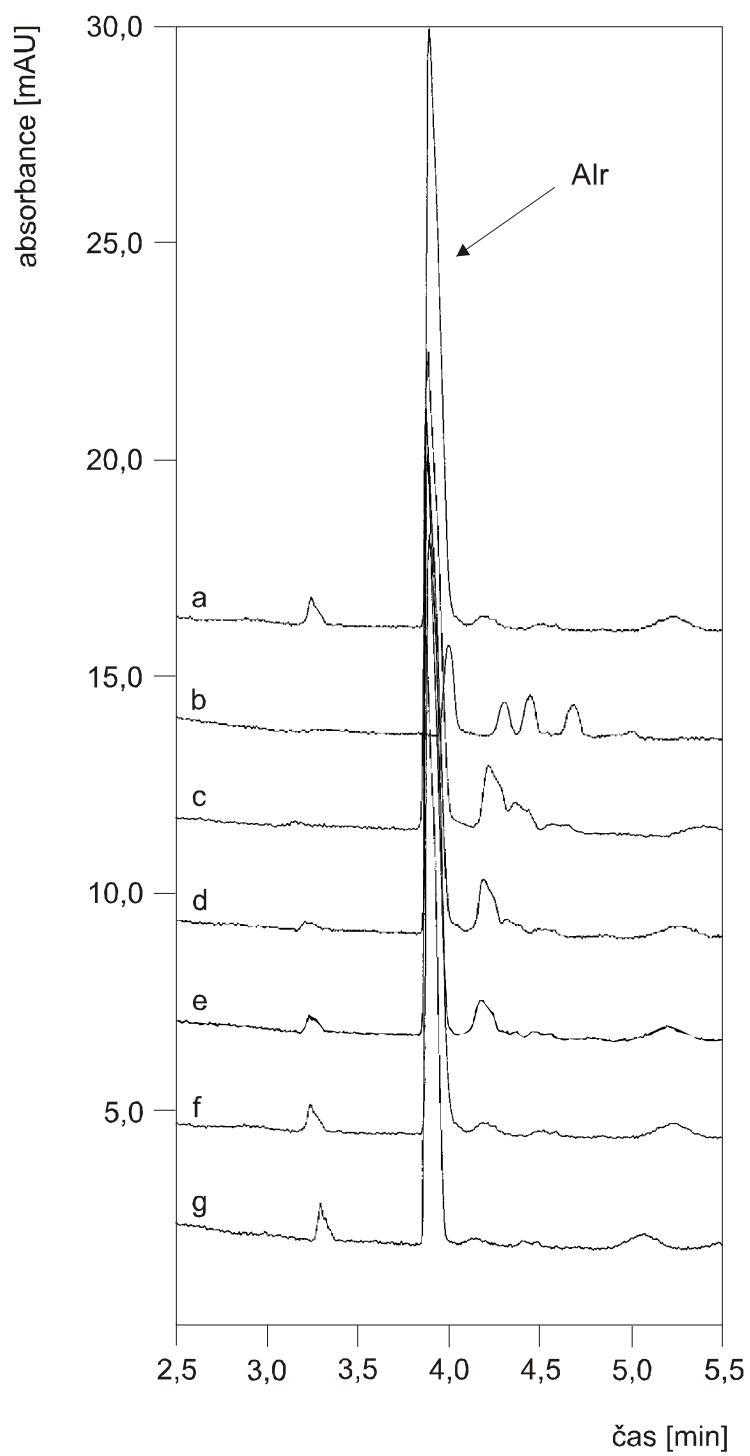
Stabilita syntetizovaných ribosidů byla ověřována kapilární elektroforézou. Během 60 min, kdy byly ribosidy inkubovány s acetanhydridem, byla pozornost zaměřena na posun elektromigračního času, absorpčního maxima a změně tvaru spektra. U AICAr nedochází v kyselém prostředí k zániku žádné vazby a acetylace jej

nikterak neovlivňuje (Obr. 27). CAI_r v kyselém prostředí podléhá rozkladu na AI_r, který se je v prostředí acetanhydridu stabilní (Obr. 28 a 29). U FAICAr by se dalo očekávat, že se odštěpí karboxylová skupina a vznikne AICAr, v záznamu se však pík AICAr neobjevil.

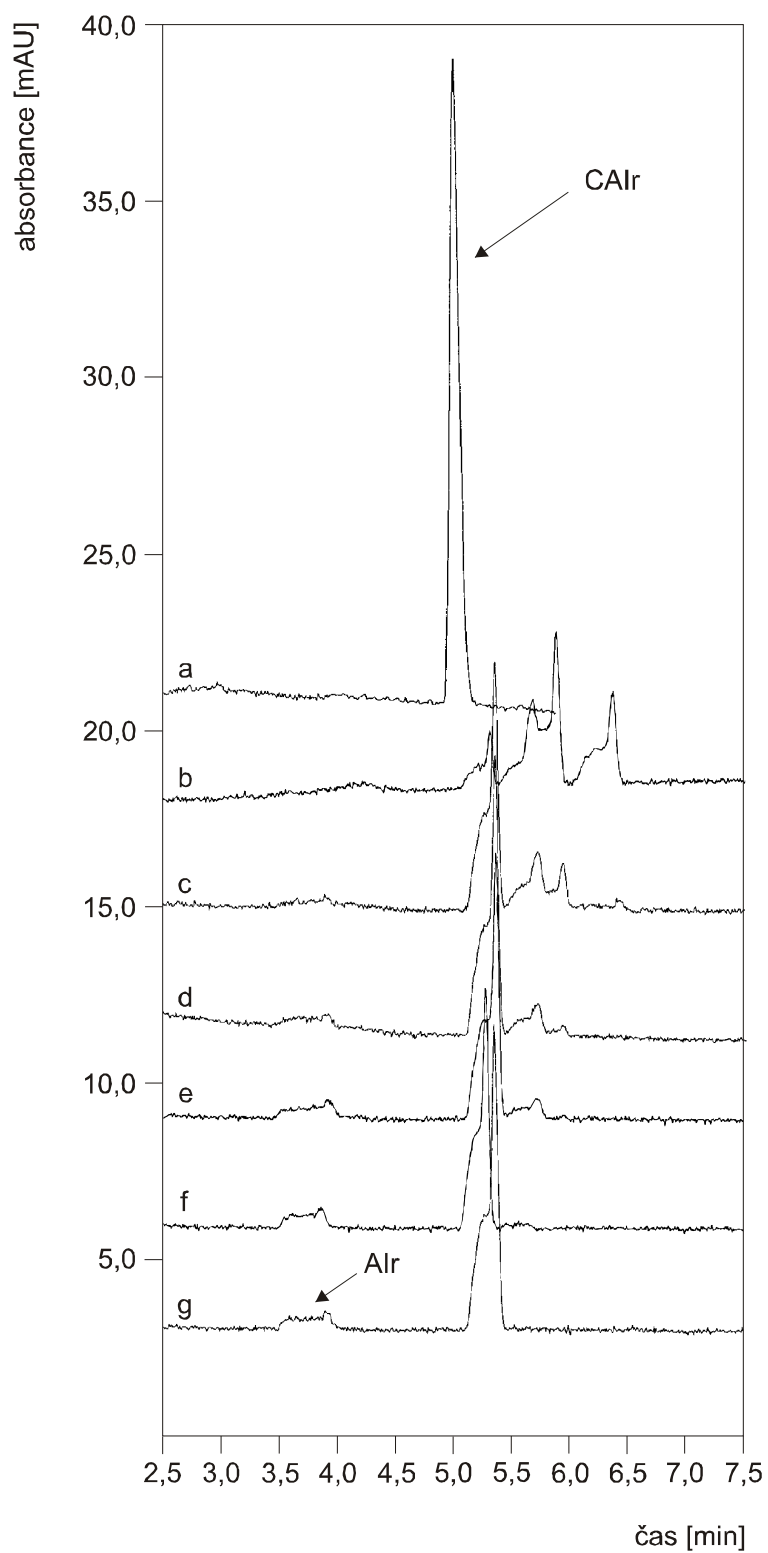
Metoda byla odzkoušena na všech zmiňovaných ribosidech (AICAr, FAICAr, CAI_r, AI_r) a léku Sumetrolim, jehož součástí je interferující sulfonamid. Ve všech případech, s výjimkou FAICAr, byla reakce s NEDA pozitivní. AICAr a sulfonamidy reagovali za vzniku purpurového zbarvení, což nasvědčuje, že absorbují světlo o stejné vlnové délce. CAI_r se barví oranžově, AI_r téměř žlutě. Předřazení acetylce potlačuje reakci NEDA se sulfonamidy (Obr. 31) a přitom ponechává výsledky reakcí ribosidů beze změny, pouze u CAI_r se prohloubí žlutý odstín (Obr. 32, 33, 34). Příčinou je částečná dekarboxylace CAI_r vlivem kyselého prostředí a vznik směsi CAI_r + AI_r. Absorpční maxima studovaných látek shrnuje tabulka 8.



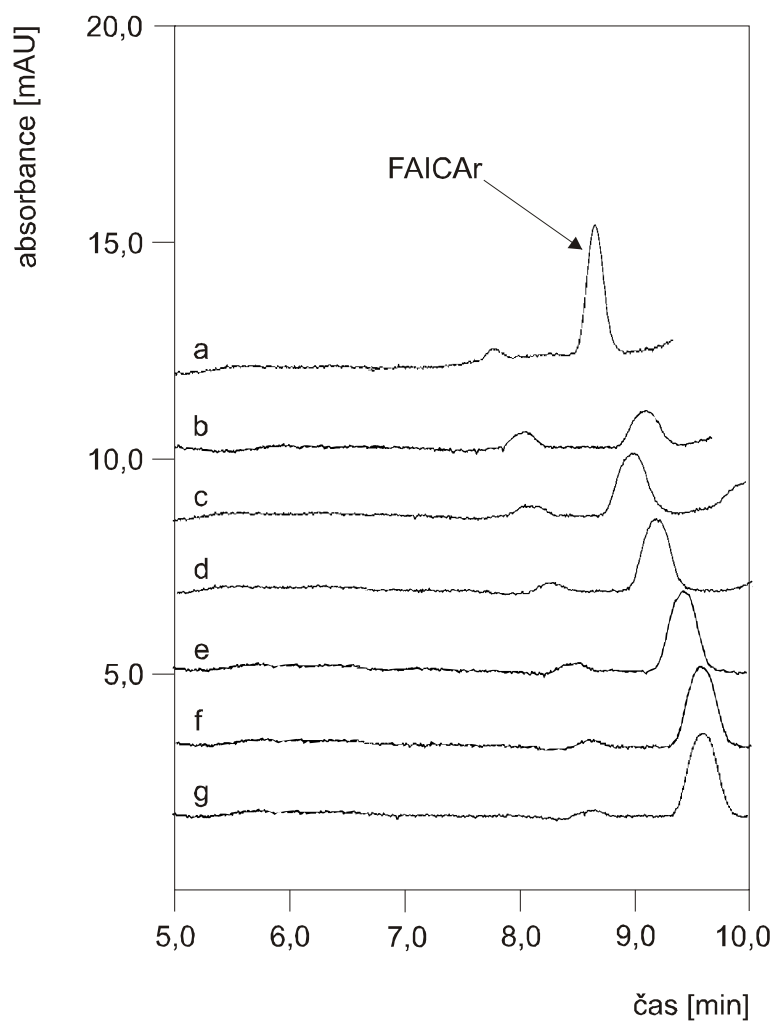
Obrázek 27: Průběh acetylace AICAr v čase. (a) kontrolní vzorek, (b) 0 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 20 min, (f) 30 min a (g) 60 min v prostředí acetanhydridu.



Obrázek 28: Průběh acetylace Alr v čase. (a) kontrolní vzorek, (b) 0 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 20 min, (f) 30 min a (g) 60 min v prostředí acetanhydridu.



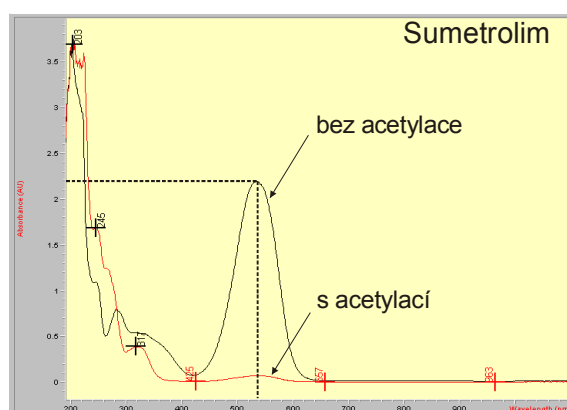
Obrázek 29: Průběh acetylace CAIr v čase. (a) kontrolní vzorek, (b) 0 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 20 min, (f) 30 min a (g) 60 min v prostředí acetanhydridu.



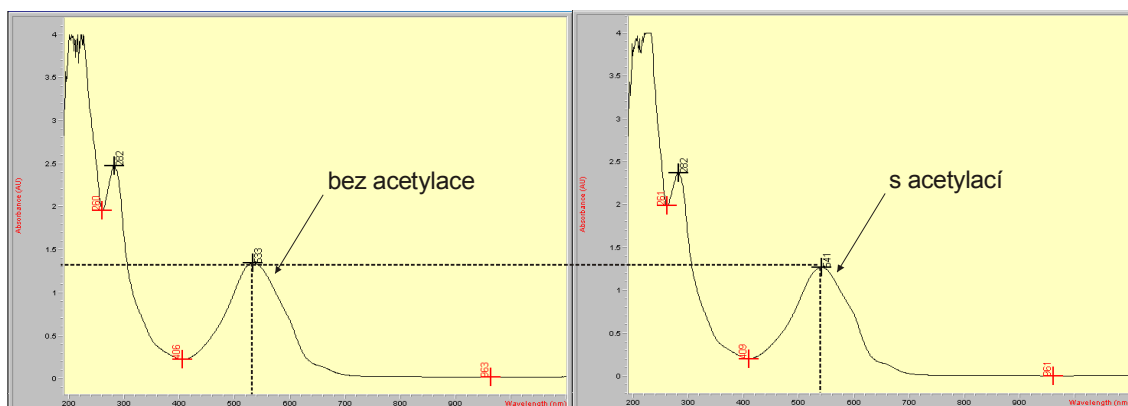
Obrázek 30: Průběh acetylace FAICAr v čase. (a) kontrolní vzorek, (b) 0 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 20 min, (f) 30 min a (g) 60 min v prostředí acetanhydridu.

Tabulka 8: Absorpční maxima produktů B-M reakce.

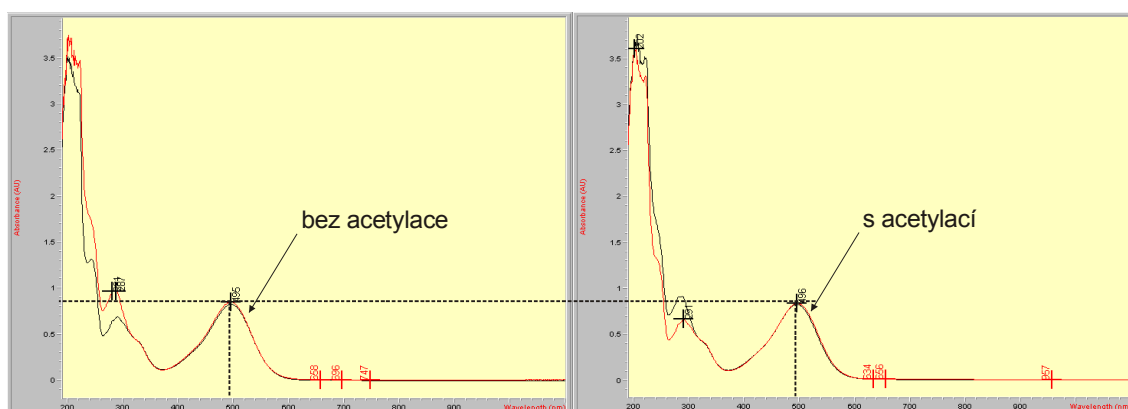
stanovovaná látka	λ_{\max} [nm]	
	bez acetylace	s acetylací
Alr	495	495
CAIr	545	520
AICAr	540	540
FAICAr	-	-
Sumetrolim	540	540



Obrázek 31: Záznam spektrofotometrického stanovení Sumetrolimu. Na obrázku je vidět potlačení odezvy analytu vlivem acetylace.



Obrázek 32: Záznam spektrofotometrického stanovení AICAr. Černá křivka - AICAr, červená křivka - AICAr s močí.



Obrázek 33: Záznam spektrofotometrického stanovení Alr. Černá křivka - Alr, červená křivka - Alr s močí.



Obrázek 34: Záznam spektrofotometrického stanovení CAIr. Černá křivka - CAIr, červená křivka - CAIr s močí.

Na základě zkušeností z optimalizace TLC metody pro FAICAr bylo uvažováno o kyselé hydrolyze látek prostřednictvím HCl. Acetanhydrid není dostatečně silnou kyselinou na to, aby se odštěpila karboxylová skupina FAICAr. Bylo uvažováno o provedení zkoušky analogicky tenké vrstvě. To znamená na filtrační papír nanést vzorek studované látky, suchý papír ponechat v parách HCl a po vyluhování provést Bratton-Marshall reakci.

Z pohledu laboranta (či zdravotního personálu) by měla být manipulace se vzorkem co nejsnazší. Objem vzorku naneseného na papírek musí být co možná největší, neboť bude zpětně vyluhován, což znamená jeho naředění. Vzhledem k tomu, že se jedná o vodný roztok, je sušení poměrně zdlouhavé. Proto jsme zvolili následující způsob nanesení - filtrační papír ponořit do roztoku a usušit. Tímto způsobem se na papír nanese přibližně 300 g moči. Způsob nanášení vzorku na papír vzlínáním měl za následek velký rozptyl v koncentracích ribosidů.

Pro analýzu je nutné, abychom testovali vždy stejný vzorek. Na testovaném vzorku AICAr jsme došli k závěru, že pokud jsou koncentrace ostatních ribosidů v případě enzymového defektu v koncentracích řádově $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pak bude dostačující použití min 3 terčků. Po vyluhování byla jistěna koncentrace řádově $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, přičemž meze detekce pro AICAr stanovený Bratton-Marshall reakcí jsou řádově $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

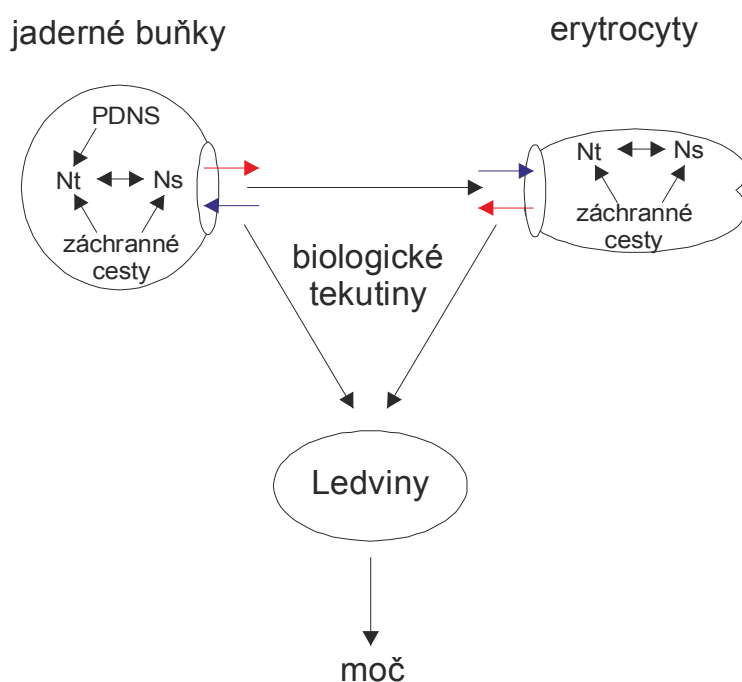
Také působení par HCl způsobovalo velký rozptyl v koncentracích. U vzorku FAICAr sice byla pozitivní odezva, nicméně u Alr, ve srovnání s původním vzorkem, byla odezva nesrovnatelně nižší. To opět potvrzuje fakt, že Alr je v kyselém prostředí nestabilní a napovídá tomu, že nelze vyvinout stejný postup pro všechny testované ribosidy.

Provedení analýzy moči pacienta uchované na papírku může sloužit jako orientační screeningový test, pro přesné stanovení ribosidů v moči je však nevyhovující.

Z tohoto důvodu se naše úvahy ubíraly směrem převést kyselou hydrolyzu ribosidů pomocí HCl do roztoku. Tato metoda je podrobně popsána a validována v diplomové práci mé diplomantky Hany Krätschmerové z roku 2009.

10.2.3.3 Diagnostika enzymových defektů s využitím erytrocytů.

Dříve zmíněné možnosti diagnostiky předpokládaných i potvrzených enzymových defektů byly navrženy pro vzorky moči pacientů. V následující kapitole je studováno, zda krev (erytrocyty) pacienta jistě vhodným materiálem pro diagnostiku. Předpokládaný mechanismus transportu analytů do erytrocytů je znázorněn na Obr. 35).



Obrázek 35: Schéma transportu analytů do erytrocytů. Nt jsou nukleotidy, Ns pak nukleosidy. Pomocí nukleotidových transportérů jsou schopny defosforylované metabolity přecházet do tělních tekutin a následně jsou z organismu vylučovány močí.

V této kapitole bude popsána simulace patofyziologické situace známých i dosud nepopsaných enzymových defektů inkubací erytrocytů s defosforylovanými meziprodukty druhé poloviny PDNS - Alr, CAIr, SAICAr, AICAr a FAICAr.

Experiment byl rozdělen do tří dílčích částí. V první byly ribosidy inkubovány s erytrocytárními membránami a analyzován jejich intracelulární obsah. Cílem bylo zjistit, zda jsou ribosidy schopny prostoupit membránou. Z analýz vyplynulo, že pouze AICAr

a FAICAr jsou schopny prostoupit přes erytrocytární membránu (u membrán inkubovaných s CAI_r, AI_r a SAICAr nebyly tyto látky detekovány).

Ve druhé části experimentu byly ribosidy inkubovány s erytrocytárními lyzáty a tato směs byla poté analyzována. Cílem bylo zjistit, jak enzymy nativních erytrocytů transformují ribosidy, které jsou schopny membránou prostoupit. Pouze v analýzách erytrocytárních lyzátů inkubovaných s AICAr byl kromě samotného ribosidu detekován také jeho monofosfát. AICAr podléhá fosforylaci.

Tabulka 9: Koncentrace AICAR, AICAR(DP) a AICAR(TP) v intracelulárním obsahu erytrocytů.

prostupující látka	koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
AICAR	239
AICAR(DP)	66,5
AICAR(TP)	36,1

Ve třetí části experimentu byl analyzován intracelulární obsah nativních erytrocytů inkubovaných s jednotlivými aminoimidazolovými ribosidy. Analýza intracelulárního obsahu nativních erytrocytů inkubovaných s AICAr ukázala na přítomnost samotného ribosidu i jeho monofosfátu (stejně jako u lyzátů). Kromě toho byl ve vzorku detekován také difosfát a trifosfát. V erytrocytech inkubovaných s FAICAr byl nalezen pouze AICAr. Vysvětlením pro tento nálezn může být buď přítomnost AICAr jako nečistoty ve vzorku FAICAr a jeho preferenční transport nebo možná enzymatická konverze FAICAr na AICAr. V analýzách erytrocytů inkubovaných s CAI_r, AI_r a SAICAr nebyla detekována žádná z těchto látek ani jejich fosforylované formy.

Z těchto zjištění vyplývá, že analýza erytrocytů je užitečná pouze pro AICA-Ribosidurii. Na rozdíl od AICAr, který prochází membránou erytrocytů a uvnitř je fosforylován na di a tri fosfát, ostatní ribosidy nejsou schopny membránou prostoupit. Proto, pokud bychom uvažovali screeningový test, který by postihl co nejvíce možných defektů, je bezesporu je nejvýhodnější jej provést z moče (v závislosti na dostupném laboratorním vybavení od TLC až po MS).

11 ZÁVĚR

Tato práce shrnuje poznatky o defektech PDNS, meziproduktech této metabolické dráhy a možnostech jejich diagnostiky. Z první poloviny PDNS byl připraven FGAr a jeho kyselou hydrolýzou GAr. Pro látky druhé poloviny PDNS jsou v práci uvedeny postupy jejich syntéz, podrobně popsána jejich hmotová spektra, spektrální a elektromigrační charakteristiky.

Výše zmíněné poznatky byly využity při vývoji jednoduchých metod vhodných pro screening případných enzymových defektů. Metoda tenkovrstevná chromatografie umožňuje postihnout případné enzymové defekty 2. poloviny PDNS. Předložená práce také popisuje diagnostiku enzymových defektů PDNS analýzou červených krvinek.

12 LITERATURA

Adam T, Friedecký D, Fairbanks LD, Sevcík J, Barták P. Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem.* 1999;45(12):2086-93.

Aimi J, Qiu H, Williams J, Zalkin H, Dixon JE. De novo purine nucleotide biosynthesis: cloning of human and avian cDNAs encoding the trifunctional glycinamide ribonucleotide synthetase-aminoimidazole ribonucleotide synthetase-glycinamide ribonucleotide transformylase by functional complementation in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(22):6665-72.

An S, Kumar R, Sheets ED, Benkovic SJ. Reversible Compartmentalization of de Novo Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells. *Science* 2008;4:103 - 106.

Arts W. F., Loonen M. C., Sengers R. C., Slooff J. L. X-linked ataxia, weakness, deafness, and loss of vision in early childhood with a fatal course. *Ann. Neurol.* 1993; 33:535-539.

Becker M. A., Heidler S. A., Bell G. I., Seino S., Le Beau M. M., Westbrook C. A., Neuman W., Shapiro L. J., Mohandas T. K., Roessler B. J., Palella T. D. Cloning of cDNAs for human phosphoribosylpyrophosphate synthetases 1 and 2 and X chromosome localization of PRPS1 and PRPS2 genes. *Genomics* 1990;8:550-561.

Becker M. A., Losman M. J., Kim M. Mechanisms of accelerated purine nucleotide synthesis in human fibroblasts with superactive phosphoribosylpyrophosphate synthetases. *J. Biol. Chem.* 1987;262:5596-5602.

Becker M. A., Puig J. G., Mateos F. A., Jimenez M. L., Kim M., Simmonds H. A. Inherited superactivity of phosphoribosylpyrophosphate synthetase: association of uric acid overproduction and sensorial deafness. *Am. J. Med.* 1988;85:383-390.

Becker M. A., Smith P. R., Taylor W., Mustafi R., Switzer R. L. The genetic and functional basis of purine nucleotide feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity. *J. Clin. Invest.* 1995;96:2133-2141.

Becker M. A., Taylor W., Smith P. R., Ahmed M. Overexpression of the normal phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 isoform underlies catalytic superactivity of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 1996;271:19894-19899.

Boschelli DH, Powell D, Sharky V, Semmelhack MF. An Improved Synthesis of Glycinamide Ribonucleotide. *Tetrahedron Lett.* 1989;30(13):1599-1600.

Boyle JA, Raivio KO, Becker MA, Seegmiller JE. Effects of nicotinic acid on human fibroblast purine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1972 May 10;269(2):179-83.

Camarasa MJ, Alonso R, de las Heras FG. 2,3,5-Tri-O-acetyl-b-D-ribofuranosyl azide and 2,3-O-isopropylidene-5-O-trityl-a-D-ribofuranosyl azide. *Carbohydrate Research.* 1980;83:152-156.

Carrington R, Shaw G, Wilson DV. Use of 5-phospho-b-D-ribosyl azide in a new direct synthesis of nucleotides. *Tetrahedron Letters.* 1964;38:2861-2865.

Cronstein BN, Kamen BA. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICA-riboside) as a targeting agent for therapy of patients with acute lymphoblastic leukemia: are we there and are there pitfalls? *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(12):805-807.

de Bree PK, Wadman SK, Duran M, Fabery de Jonge H. Diagnosis of inherited adenylosuccinase deficiency by thin-layer chromatography of urinary imidazoles and by automated cation exchange column chromatography of purines. *Clinica Chimica Acta* 1986;156:279-288.

de Brouwer A. P., Williams K. L., Duley J. A., van Kuilenburg A. B., Nabuurs S. B., Egmont-Petersen M., Lugtenberg D., Zoetekouw L., Banning M. J., Roeffen M., Hamel B. C., Weaving L., Ouvrier R. A., Donald J. A., Wevers R. A., Christodoulou J., van Bokhoven H. Arts syndrome is caused by loss-of-function mutations in PRPS1. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:507-518.

Fischer E, Warburg O. *Berichte.* 1905;38:3997-4005.

Flaks J, Lukens L. Intermediates in purine Nucleotide Sythesis. In *Methods Enzymology*, Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Eds; Academic Press: London, 1963;6:52-95.

Friedecký D, Tomková J, Maier V, Janost'áková A, Procházka M, Adam T. Capillary electrophoretic method for nucleotide analysis in cells: application on inherited metabolic disorders. *Electrophoresis*. 2007;28(3):373-80.

Garcia-Gil M, Pesi R, Perna S, Allegrini S, Giannecchini M, Camici M, Tozzi MG. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience* 2003;117(4):811-820.

Gnirke A, Barnes TS, Patterson D, Schild D, Featherstone T, Olson MV. Cloning and in vivo expression of the human GART gene using yeast artificial chromosomes. *EMBO J*. 1991;10(7):1629-34.

Gross M, Gathof BS, Kölle P, Gresser U. Capillary electrophoresis for screening of adenylosuccinate lyase deficiency. *Electrophoresis*. 1995;16(10):1927-9.

Groziak MP, Huan ZW, Ding H, Meng Z, Stevens WC, Robinson PD. Effect of a chemical modification on the hydrated adenosine intermediate produced by adenosine deaminase and a model reaction for a potential mechanism of action of 5-aminoimidazole ribonucleotide carboxylase. *J Med Chem*. 1997;40(21):3336-45.

Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 23):5479-87.

Hards RG, Patterson D. Resolution of the intermediates of de novo purine biosynthesis by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1988;455:217-24.

Hartmann S, Okun JG, Schmidt C, Langhans CD, Garbade SF, Burgard P, Haas D, Sass JO, Nyhan WL, Hoffmann GF. Comprehensive detection of disorders of purine

and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52:1127-37.

Henin N, Vincent MF, Van den Berghe G. Stimulation of rat liver AMP-activated protein kinase by AMP analogues. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1290(2):197-203.

Hornik P, Vyskocilová P, Friedecký D, Adam T. Diagnosing AICA-ribosiduria by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006; 843(1):15-19.

Chettur G, Benkovic SJ. A new chemical synthesis of 2-amino-(N-D-ribofuranosyl)acetamide 5'-phosphate. *Carbohydr Res*. 1977; 56 (1): 75-86.

Christopherson RI, Szabados E (1997) Nucleotide biosynthesis in mammals. In L Agius, HAS Sherratt, eds, *Channeling in Intermediary Metabolism*. Portland Press, London, pp 315–335.

Chu SY, Henderson JF. New chemical synthesis of 5'-phosphoribosyl-N-formylglycinamide. *Canadian journal of chemistry*. 1970;48:2306-2309.

Ito T, van Kuilenburg AB, Bootsma AH, Haasnoot AJ, van Cruchten A, Wada Y, van Gennip AH. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin Chem* 2000;46:445-52.

Jaeken J, Van den Berghe G. A n infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet*. 1984;2 (8411):1058-1061.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005;(1):15-25.

Kim H. J., Hong S. H., Ki C. S., Kim B. J., Shim J. S., Cho S. H., Park J. H., Kim J. W. A novel locus for X-linked recessive CMT with deafness and optic neuropathy maps to Xq21.32-q24. *Neurology* 2005;64:1964-196.

Kim H. J., Sohn K. M., Shy M. E., Krajewski K. M., Hwang M., Park J. H., Jang S. Y., Won H. H., Choi B. O., Hong S. H., Kim B. J., Suh Y. L., Ki C. S., Lee S. Y., Kim S. H., Kim J. W. Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosylpyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (CMTX5). *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:552-558.

Kim JE, Ahn MW, Baek SH, Lee IK, Kim YW, Kim JY, Dan JM, Park SY. A MPK activator, AICAR, inhibits palmitate-induced apoptosis in osteoblast. *Bone.* 2008;43(2):394-404.

Kim JE, Kim YW, Lee IK, Kim JY, Kang YJ, Park SY. AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(3):394-403.

Kmoch S, Hartmannová H, Stibůrková B, Krijt J, Zikánová M, Sebesta I. Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients. *Hum Mol Genet.* 2000;9(10):1501-1513.

Laikind PK, Seegmiller JE, Gruber HE. Detection of 5'-phosphoribosyl-4-(N-succinylcarboxamide)-5-aminoimidazole in urine by use of the Bratton-Marshall reaction: identification of patients deficient in adenylosuccinate lyase activity. *Anal Biochem.* 1986;156(1):81-90.

La Marca G, Casetta B, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples. *J Mass Spectrom* 2006;41:1442-52.

Levenberg B, Buchnan JM. Structure, enzymatic synthesis and metabolism of (α-N-formyl)-glycinamide ribotide in Biosynthesis of purines. pp 1019-1027.

Liu DS, Caperelli CA. Carbocyclic substrates for de novo purine biosynthesis. *J Biol Chem.* 1991;266(25):16699-702.

Lukens L, Flaks J. Intermediates in purine Nucleotide Sythesis. In *Methods Enzymology*, Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Eds; Academic Press: London, 1963;6, 671-703.

Marie S, Flipsen JW, Duran M, Poll-The BT, Beemer FA, Bosschaart AN, Vincent MF, Van den Berghe G. Prenatal diagnosis in adenylosuccinate lyase deficiency. *Prenat Diagn.* 2000;20(1):33-6.

Marie S, Heron B, Bitoun P, Timmerman T, Van Den Berghe G, Vincent MF. AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *Am J Hum Genet.* 2004;74(6):1276-81.

McGeer PL, Sen NP, Grant DA. Excretion of 4(5)-amino-5(4)-imidazolecarboxamide and formimino-L-glutamic acid in folic acid and vitamin B12 deficient rats. *Canadian journal of biochemistry.* 1965;43:1367-1374.

Mueller WT, Benkovic SJ. On the purification and mechanism of action of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleotide transformylase from chicken liver. *Biochemistry.* 1981;20(2):337-44.

Neychev VK, Mitev VI. The biochemical basis of the neurobehavioral abnormalities in the Lesch-Nyhan syndrome: a hypothesis. *Med Hypotheses.* 2004;63(1):131-4.

Nierlich DP, Magasanik B. Alternative first steps of purine biosynthesis. *J Biol Chem.* 1961;236:PC32-3.

Race V, Marie S, Vincent MF, Van den Berghe G. Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in adenylosuccinate lyase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2000;9(14):2159-65.

Reem GH. Enzymatic synthesis of phosphoribosylamine in human cells. *J Biol Chem.* 1974;249(6):1696-703.

Sabina RL, Patterson D, Holmes EW. 5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-ribose) metabolism in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 1985;260(10):6107-14.

Sebesta I, Krijt J, Kmoch S, Hartmannová H, Wojda M, Zeman J. Adenylosuccinase deficiency: clinical and biochemical findings in 5 Czech patients. *J Inher Metab Dis.* 1997;20(3):343-4.

Šebesta I, Shobowale M, Krijt J, Simmonds HA. Screening tests for adenylosuccinase deficiency. *Screening,* 1995;4:117-124.

Sengupta TK, Leclerc GM, Hsieh-Kinser TT, Leclerc GJ, Singh I, Barredo JC. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol Cancer.* 2007;6:46.

Schendel FJ, Mueller E, Stubbe J, Shiau A, Smith JM. Formylglycinamide ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli*: cloning, sequencing, overproduction, isolation, and characterization. *Biochemistry.* 1989 Mar 21;28(6):2459-71.

Schendel FJ, Stubbe J. Substrate specificity of formylglycinamide synthetase. *Biochemistry.* 1986 Apr 22;25(8):2256-64.

Schrimsher JL, Schendel FJ, Stubbe J, Smith JM. Purification and characterization of aminoimidazole ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1986;25(15):4366-71.

Sidi Y, Mitchell BS. Z-nucleotide accumulation in erythrocytes from Lesch-Nyhan patients. *J Clin Invest.* 1985;76(6):2416-9.

Simmonds HA, Duley JA, Davies PM. Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine and other physiological fluids. In: Hommes F, ed. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual.* Wiley-Liss, New York: 1991; 397–424

Simmonds HA. Adenin phosphoribosyltransferase deficiency. 2003, Orphanet encyclopedia (<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-APRT.pdf> 26.5.2011)

Sperling O., Boer P., Persky-Brosh S., Kanarek E., de Vries A. Altered kinetic property of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate synthetase in excessive purine production. *Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.* 1972;17:703-706.

Spiegel EK, Colman RF, Patterson D. Adenylosuccinate lyase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2006; 89 (1-2):19-31.

Spivey HO, Ovádi J. Substrate Channeling. *Methods* 1999; 19: 306-321.

Srivastava PC, Mancuso RW, Rousseau RJ, Robins RK. Nucleoside peptides. 6. Synthesis of certain N-(5-amino-1-(beta-D-ribofuranosyl)imidazole-4-carbonyl)amino acids related to naturally occurring intermediates in the purine biosynthetic pathway. *J Med Chem.* 1974;17(11):1207-11.

Stone RL, Zalkin H, Dixon JE. Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase. *J Biol Chem.* 1993;268(26):19710-19716.

Szabados E, Hindmarsh EJ, Phillips L, Duggleby RG, Christopherson RI. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase-IMP cyclohydrolase from human CCRF-CEM leukemia cells: purification, pH dependence, and inhibitors. *Biochemistry.* 1994 29;33(47):14237-45.

Taira M., Iizasa T., Yamada K., Shimada H., Tatibana M. Tissue-differential expression of two distinct genes for phosphoribosyl pyrophosphate synthetase and existence of the testis-specific transcript. *Biochim. Biophys. Acta* 1989;1007: 203-208.

Tipson RS. Acetylation of D-Ribosylamine. *J. Org. Chem.*, 1961;26 (7):2462-246.

Torres R. J., Mateos F. A., Puig J. G., Becker M. A. Determination of phosphoribosylpyrophosphate synthetase activity in human cells by a non-isotopic, one step method. *Clin. Chim. Acta* 1996;245,105-112.

Torres RJ, Puig JG. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:48.

Ubik, Karel, a Ústav organické chemie a biochemie (Akademie věd ČR). *Fyzikálně-chemické Metody*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, 2000.

van Gennip AH, van Noordenburg-Huistra DY, de Bree PK, Wadman SK. Two-dimensional thin-layer chromatography for the screening of disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chim Acta.* 1978;16;86(1):7-20.

Vergis JM, Bullock KG, Fleming KG, Beardsley GP. Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity. *J Biol Chem.* 2001;276 (11): 7727-7733.

Zikánová M, Krijt J, Hartmannová H, Kmoč S. Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside, compound usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2005; 28: 493-499.

13 PUBLIKACE

13.1 Práce související s disertační prací

13.1.1 Původní vědecké publikace v časopisech s IF

Vyskočilová P, Hornik P, Friedecký D, Adam T. UV spektrální a elektromigrační charakteristiky imidazolových ribosidů. Chem. Listy. 2007;101:250-254. IF₂₀₀₇ = 0,683

Vyskocilová P, Hornik P, Friedecký D, Frycák P, Lemr K, Adam T. Synthesis and mass spectrometric fragmentation characteristics of imidazole ribosides-analogs of intermediates of purine de novo synthetic pathway. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2006;25(9-11):1237-40. IF₂₀₀₆ = 0,671

Hornik P, Vyskocilová P, Friedecký D, Janostáková A, Adamová K, Adam T. Analysis of aminoimidazole ribosides by capillary electrophoresis--diagnosing defects in second part of purine biosynthetic pathway. Clin Chim Acta. 2007;376(1-2):184-9. IF₂₀₀₇ = 2,601

13.1.2 Původní vědecké publikace v recenzovaných časopisech

Vyskočilová P, Kuchyňová H, Opluštilová L, Friedecký D, Hornik P, Adamová K, Adam T. Analýza erytrocytů v diagnostice defektů PDNS. Klin. Biochem. Metab., 2007;15 (36):222–224.

Friedecký D., Vyskočilová P., Frycák P., Hornik P., Lemr K., Adam T. Hmotově-spektrometrické vlastnosti imidazolových ribosidů. KBM 2007;4:212-215.

13.1.3 Seznam posterů/přednášek přednesených na veřejných odborných fórech.

7. celostátní sjezd klinické biochemie, 11.9.-13.9.2005, Olomouc, Česká republika, ISBN 80-239-5267-6.

Jednoduchá screeningová metoda pro defekty purinové biosyntetické dráhy.

P. Vyskočilová, P. Hornik, D. Friedecký a T. Adam (poster)

Ribosidy purinové biosyntézy – syntéza, spektrální vlastnosti a HPLC analýza.

P. Vyskočilová, P. Hornik, E. Hlídková, D. Friedecký, T. Adam (poster)

21. pracovní dny, Dědičné metabolické poruchy, 17.5.-19.5.2006, Sliač, Slovensko.

Membrane transport and metabolism of aminoimidazole ribosides

Vyskočilová P., Kuchyňová H., Opluštilová L., Hornik P., Adamová K., Friedecký D., Adam T. (poster)

Konference vědeckých prací studentů DSP UP Olomouc, 11.-12. 10. 2006, Olomouc, ČR.

Vyskočilová P, Hornik P, Friedecký D, Lemr K, Adam T. Analýza meziproductů purinové de novo syntézy. Abstracts, p 52, ISBN 80-244-1447-3 (přednáška).

12th international Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, 24.-28. 6. 2007, Chicago, USA.

Membrane transport and metabolism of aminoimidazole ribosides in erythrocytes.

Vyskočilová P, Kuchyňová H, Opluštilová L, Hornik P, Adamová K, Friedecký D, Adam T. (poster).

VIII. Celostátní sjezd ČSKB, 23.-25.9. 2007, České Budějovice, ČR

TLC for screening of purine de novo synthesis enzyme defects Klinická biochemie a metabolismus.

Vyskočilová P, Friedecký D, Hornik P, Adam T. (poster).

23. pracovní dny, Dědičné metabolické poruchy, 14.-16. května 2008, Senec, Slovensko.

Synthesis and mass spectrometric characterization of FGAr.

P Vyskočilová, V Ranc, M Grepl, T Adam and P Hradil (poster)

Determination of adenylysuccinate lyase activity in cultured cells by capillary electrophoresis.

P Vyskočilová, V Tisoňová, L Žídková, L Kittlová, D Friedecký and T Adam (poster)

13.2 Ostatní publikace

Tomkova J, Friedecky D, Vyskocilova P, Adam T. ITPase activity in dry blood spots is comparable with that in fresh erythrocytes. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008;27(6):656-60. IF₂₀₀₈ = 0,571

Hornik P, Vyskocilová P, Friedecký D, Adam T. Diagnosing AICA-ribosiduria by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;843(1):15-9.

IF₂₀₀₆ = 2,647

Krätschmerová H, Vyskočilová P, Adam T. Screening dědičných metabolických poruch purinové de novo syntézy. *Chem. Listy*. 2009;103:172-174. IF₂₀₀₉ = 0,717

VIII. Celostátní sjezd ČSKB, 23.-25.9. 2007, České Budějovice, ČR

Bratton-Marschall reaction - a useful screening test for enzyme defects of the second part of purine de novo synthesis.

Vyskočilová P, Krätschmerová H, Adam T (poster).