

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Metabolomická analýza HeLa buněk defektních v purinové *de novo* syntéze

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Dana Dobešová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Mádrová
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne: 29. dubna 2019

.....

Chtěla bych poděkovat především své vedoucí diplomové práce Mgr. Lucii Mádrové za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost, podporu a snahu mi ve všem pomoci. Poděkování patří mimo jiné i kolektivu pracovníků Laboratoře metabolomiky Ústavu molekulární a translační medicíny a Ústavu dědičných metabolických poruch v Olomouci za oporu, cenné rady, diskuze a pomoc s provedením experimentů i statistickým zpracováním dat. Další poděkování náleží zaměstnancům Ústavu dědičných metabolických poruch v Praze za poskytnutí CRISPR/Cas9 editovaných HeLa buněčných linií pro experiment.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Dana Dobešová
Název práce	Metabolomická analýza HeLa buněk defektních v purinové <i>de novo</i> syntéze
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř metabolomiky
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Mádrová
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu metabolomického profilu HeLa buněčných linií upravených technikou CRISPR/Cas9 v rámci jednotlivých kroků purinové *de novo* syntézy (PDNS). Jedná se o první modely lidských buněk pro studium jak známých, tak i potenciálních poruch této metabolické dráhy. Dosud byly popsány dvě dědičné metabolické poruchy PDNS – deficit ADSL a AICA-ribosidurie. Pro experiment byla zvolena kombinace necílené a cílené metabolomické analýzy, která byla provedena pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a biochemicky interpretována. K významným metabolitům všech defektních linií v porovnání s kontrolou se řadily především meziproducty PDNS. Dále byly pozorovány změny v hladinách purinů, pyrimidinů, acylovaných karnitinů a metabolitů účastnících se jednovuhličkového metabolismu.

Klíčová slova	metabolismus a transport purinů, technika CRISPR/Cas9, metabolomika, statistická analýza, identifikace metabolitů
Počet stran	90
Počet příloh	1
Jazyk	český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Dana Dobešová
Title	Metabolomic analysis of HeLa cells defective in purine <i>de novo</i> synthesis
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacký University Olomouc, Laboratory of metabolomics
Supervisor	Mgr. Lucie Mádrová
The year of presentation	2019

Abstract

This diploma thesis was focused on the analysis of metabolomic profile of CRISPR/Cas9 genome edited HeLa cell lines deficient in individual steps of purine *de novo* synthesis (PDNS). These are the first human cell models for the study of both known and potential disorders of this metabolic pathway. To date, two inherited metabolic disorders of PDNS have been identified – ADSL deficiency and AICA-ribosiduria. Combination of non-targeted and targeted metabolomic analysis was performed using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. The obtained data were statistically evaluated and biochemically interpreted. Compared to controls, PDNS intermediates were among the most significant metabolites of all defective cell lines. Furthermore, changes were found in the levels of purines, pyrimidines, acylcarnitines and metabolites involved in one-carbon metabolism.

Keywords	purine metabolism and transport, CRISPR/Cas9 technique, metabolomics, statistical analysis, metabolite identification
Number of pages	90
Number of appendices	1
Language	czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Puriny	3
2.1.1	Metabolismus purinů a tkáňová specifita	3
2.2	Transport purinů	6
2.2.1	Nukleosidové transportéry	6
2.2.1.1	Koncentrační nukleosidové transportéry	7
2.2.1.2	Ekvilibrační nukleosidové transportéry	9
2.2.2	Purinové receptory	10
2.2.2.1	P ₁ receptory	10
2.2.2.2	P ₂ receptory	11
2.2.3	Analoga nukleosidů a bází používaná v lékařství	12
2.2.3.1	Purinová analoga	12
2.2.3.2	Pyrimidinová analoga	13
2.3	System CRISPR/Cas9	14
2.3.1	Mechanismus techniky CRISPR/Cas9	15
2.3.2	Opravné mechanismy DNA	17
2.3.3	Předchůdci techniky CRISPR/Cas9 a jejich porovnání	18
2.3.4	Aplikace techniky CRISPR/Cas9	19
2.4	Metabolomika	20
2.4.1	Vícerozměrná statistická analýza	22
2.4.1.1	Nesupervizované metody	23
2.4.1.2	Supervizované metody	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Materiál a chemikálie	28
3.1.1	Biologický materiál	28
3.1.2	Chemikálie	28
3.2	Přístrojové vybavení	28
3.3	Metody	29
3.3.1	Kultivace a sklizení HeLa buněk	29
3.3.2	Příprava HeLa buněk pro analýzu	29
3.3.3	Příprava mobilních fází	29
3.3.4	LC-MS necílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií	30
3.3.4.1	Fragmentační analýza vybraných „features“	31
3.3.5	LC-MS cílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií	32
3.3.6	Statistické zpracování dat	32
3.3.7	Identifikace metabolitů a jejich biochemická interpretace	33
4	VÝSLEDKY	34
4.1	Necílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií	34
4.1.1	Statistická analýza všech linií	35
4.1.2	Statistická analýza jednotlivých defektních linií	36
4.2	Cílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií	53
4.2.1	Statistická analýza všech linií	54
4.2.2	Statistická analýza jednotlivých defektních linií	55
5	DISKUZE	67

6	ZÁVĚR	74
7	LITERATURA	76
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	85
9	PŘÍLOHY	88
9.1	Seznam metabolitů z tabulek OPLS-DA VIP a vulkánových grafů	88

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše na téma metabolismus a transport purinů, CRISPR/Cas9 technika úpravy genů a statistická analýza v metabolomice.

Experimentální část:

- Provést LC-MS necílenou a cílenou metabolomickou analýzu HeLa buněčných linií editovaných technikou CRISPR/Cas9 v rámci purinové *de novo* syntézy.
- Získaná data statisticky vyhodnotit a biochemicky interpretovat.

1 ÚVOD

Předložená diplomová práce navazuje na bakalářskou práci (Dobešová, 2017), která byla zaměřena na vývoj metody kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií a získání fragmentačních spekter standardů meziproductů purinové *de novo* syntézy (PDNS). Tato metoda může v budoucnu sloužit ke stanovení diagnózy pacientů trpících dědičnými metabolickými poruchami PDNS (Mádrová *et al.*, 2018). Cílem této diplomové práce byla analýza metabolomického profilu HeLa buněčných linií, které byly upraveny molekulárně biologickou technikou CRISPR/Cas9. Díky tomu byly získány buněčné linie defektní v jednotlivých krocích PDNS. Jedná se o první modely lidských buněk pro studium jak známých, tak i potenciálních poruch této metabolické dráhy (Barešová *et al.*, 2016).

V rámci PDNS byly zatím popsány dvě dědičné metabolické poruchy. Jedná se o deficit enzymu adenylosukcinátlyasy (ADSL, EC 4.3.2.2, OMIM 103050), který katalyzuje osmý krok PDNS odštěpením fumarátu z 5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)ribotidu (SAICAR) za vzniku 5-aminoimidazol-4-karboxamidribotidu (AICAR). ADSL však katalyzuje i přeměnu sukcinyl-adenosinmonofosfátu (S-AMP) na adenosinmonofosfát (AMP) (van den Berghe a Jaeken, 1986). Druhý defekt (AICA ribosidurie, OMIM 608688) se týká bifunkčního enzymu ATIC, který zahrnuje fosforibosylaminoimidazolkarboxamidformyltransferasu (AICART, EC 2.1.2.3) a inosinmonofosfátcyklohydrolasu (IMPCH, EC 3.5.4.10). ATIC katalyzuje poslední dvě reakce PDNS, kdy dochází k přenosu formylové skupiny pomocí tetrahydrofolátu na AICAR za vzniku 5-formylamidimidazol-4-karboxamidribotidu (FAICAR), který je za eliminace vody spojen do inosinmonofosfátu (IMP) (Marie *et al.*, 2004). Zmíněné poruchy se projevují neurologickými problémy jako jsou mentální retardace, epileptické záchvaty, slepota, autistické chování a jiné symptomy (Balasubramaniam *et al.*, 2014).

Pro komplexní analýzu metabolomického profilu buněčných linií byla použita kombinace necíleného a cíleného přístupu metabolické analýzy. Oba přístupy byly provedeny pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla vyhodnocena metodami jedno- a vícerozměrné

statistické analýzy. V rámci vícerozměrné statistiky byly aplikovány nesupervizované a supervizované metody. Následně byla provedena biochemická interpretace dat.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Puriny

Purinové nukleosidy (adenosin a guanosin) a jejich nukleotidová analoga - adenosintrifosfát (ATP), guanosintrifosfát (GTP), adenosindifosfát (ADP), guanosindifosfát (GDP), adenosinmonofosfát (AMP) a guanosinmonofosfát (GMP) jsou v lidském organismu všudypřítomné. Nejvyšší koncentrace purinů se u savců nachází v oběhové (Drury a Szent-Györgyi, 1929) a centrální nervové soustavě (Berne *et al.*, 1974). V šedesátých letech minulého století bylo prokázáno, že koncentrace adenosinu a jeho degradačních meziproductů inosinu a hypoxantinu se výrazně zvyšuje při nedostatečném prokrvení tkání – ischemii. Tento stav je charakteristický pro pacienty s ischemickou chorobou srdeční, kdy dochází ke stažení koronárních cév myokardu (Berne, 1963) nebo při cévní mozkové příhodě, způsobené zúžením mozkových cév (Berne *et al.*, 1974). Při ischemii srdce i mozku mají adenosin a jeho analoga tlumící a vasodilatační účinky, proto jsou používána pro léčbu těchto onemocnění. Mimo jiné se puriny a jejich analoga uplatňují při terapii mnoha neurologických problémů. Jedná se například o psychické poruchy, poruchy chování, motoriky a spánku (Stone a Simmonds, 1991). Purinová analoga jsou rovněž používána při léčbě virových (Furman *et al.*, 1986) a nádorových onemocnění (Rosen, 2002; Demir *et al.*, 2015), (viz kapitola 2.2.3).

2.1.1 Metabolismus purinů a tkáňová specifita

Hladina purinů „purinový pool“ je v buňkách udržována pomocí endogenního metabolismu purinů, který zahrnuje purinovou *de novo* syntézu (PDNS), recyklační „záchrannou“ dráhu a katabolismus purinů. Mezi další dráhy metabolismu purinů se řadí adeninový a guaninový nukleotidový cyklus, kdy je inosinmonofosfát (IMP) přeměňován na AMP a GMP nebo je IMP vytvářen deaminací AMP a redukcí GMP. Monofosfáty jsou dále fosforylovány adenylátkinasou (EC 2.7.4.3) a guanylátkinasou (EC 2.7.4.8) na difosfátová analoga a nukleosiddifosfátkinasou (EC 2.7.4.6) na trifosfátová analoga. Metabolismus purinů také zahrnuje defosforylaci nukleotidů (viz kapitola 2.2). Na intracelulární purinový pool má mimo jiné vliv i membránový transport purinových nukleosidů a bází (Stone a Simmonds, 1991), (viz kapitola 2.2.1).

Dráhy purinového metabolismu jsou na sobě závislé. Například při nedostatku ATP nebo GTP jsou aktivovány enzymy PDNS nebo záchranné dráhy s následnou stimulací adeninového nebo guaninového nukleotidového cyklu (Stone a Simmonds, 1991).

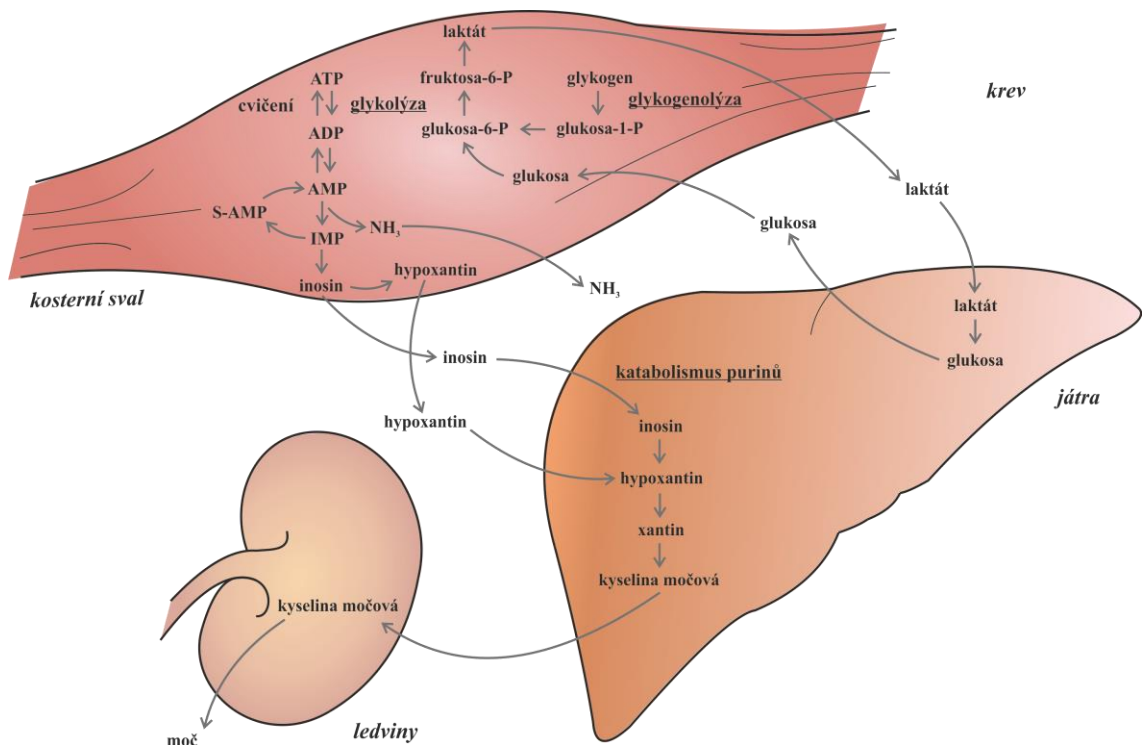
Jednotlivé tkáně upřednostňují některé z drah metabolismu purinů. Jedná se o tzv. tkáňovou specifitu. Tkáně preferují některé dráhy na úkor jiných z důvodu odlišných funkcí nebo nároků na purinové metabolity. Dále může být jedna z drah upřednostňována kvůli nedostatku enzymu jedné dráhy nebo na základě propojení s jinými drahami primárního metabolismu. Metabolismus purinů je nejpatrnější u tkání kostní dřene, kosterního svalstva, srdce, mozku, jater, ledvin, plic a střev (Stone a Simmonds, 1991).

Erytrocyty ztrácejí během dozrávání v kostní dřeni jádro a membránové organely, proto nejsou schopny syntetizovat vlastní DNA, RNA ani proteiny. Enzymy podílející se PDNS a adeninovém nebo guaninovém nukleotidovém cyklu se v erytrocytech nevyskytují. Erytrocyty jsou závislé na transmembránovém přenosu purinů a jejich následném metabolismu. Hladina nukleotidů, především ATP, je u erytrocytů udržována pro ATP-dependentní přenašeče a pro zvýšení elasticity erytrocytu při transportu drobnými cévami. Stálá hladina purinů je zachovávána pomocí záchranné dráhy, která je spojená s inosintrifosfátový cyklem (ITP cyklus). Podstatou ITP cyklu je jednokroková defosforylace ITP na IMP a dvoukroková fosforylace IMP přes IDP na ITP. Oproti erytrocytům některé leukocyty – T a B lymfocyty kombinují záchrannou dráhu s PDNS pro rychlou tvorbu purinových nukleotidů, které slouží především k syntéze DNA. Tento proces je důležitý pro neustálé dělení T a B lymfocytů v rámci aktivního imunitního systému (Stone a Simmonds, 1991; del Velasco-Martinez *et al.*, 2016).

Tkáň kosterního svalstva využívá PDNS, záchrannou dráhu a nukleotidový cyklus s následnou fosforylací. Purinové dráhy jsou v kosterním svalstvu propojeny s glykolýzou a glykogenolýzou (Obr. 1). Při svalové kontrakci je vysoká spotřeba ATP, které je nutno doplňovat. ATP je opakovaně vytvářen rozkladem krevní glukosy během glykolýzy. Při hypoglykemii získávají svalové buňky glukosu pomocí glykogenolýzy. Při anaerobních podmínkách dochází v kosterním svalstvu k přeměně pyruvátu na laktát pomocí laktátdehydrogenasy (EC 1.1.1.27) (Stone a Simmonds, 1991; Hellsten *et al.*, 1999).

Akumulace laktátu je nežádoucí, proto je přenášen krví do jater, kde je metabolizován na glukosu, která může být transportována zpět do kosterního svalstva. Protože je spotřeba ATP při intenzivním cvičení vyšší než schopnost regenerace, dochází k hromadění ADP a AMP. Akumulovaný AMP je deaminován na IMP, který je následně defosforylován na inosin. Inosin je přenášen do jater nebo je převáděn na hypoxantin, který je také transportován do jater. Inosin nebo hypoxantin jsou v játrech degradovány na odpadní produkt kyselinu močovou, která je poté transportována do ledvin a vyloučena močí (Stone a Simmonds, 1991; Hellsten *et al.*, 1999).

Buňky srdeční a mozkové tkáně kombinují pro tvorbu IMP záchrannou dráhu a PDNS. Syntéza purinů je spojena s adeninovým nukleotidovým cyklem (vznik AMP) a fosforylačními reakcemi (vznik ATP). Obě tkáně mají stejně jako kosterní svalstvo rychlou spotřebu ATP s následnou akumulací AMP, který je po defosforylaci na adenosin přenášen do mezibuněčných prostor. Zmíněné tkáně upřednostňují v období embryogeneze a prenatálního vývoje PDNS před záchrannou dráhou. V období postnatálního vývoje převažuje naopak efektivnější záchranná dráha nad PDNS (Stone a Simmonds, 1991).



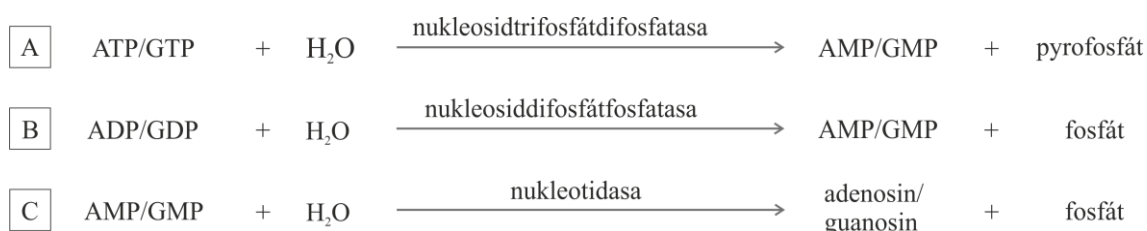
Obr. 1 Tkáňová specifita metabolismu purinů v kosterním svalu a játrech (Stone a Simmonds, 1991).

2.2 Transport purinů

Nukleotidy mají hydrofilní charakter, proto nemohou volně přecházet přes fosfolipidovou membránu. Jejich transport je zprostředkován pomocí nukleosidových přenašečů (Berlin a Oliver, 1975) a receptorů (Burnstock, 1976). Před transportem jsou nukleotidy postupně defosforylovány na nukleosidy. ATP/GTP jsou hydrolyzovány membránovým enzymem nukleosidtrifosfátdifosfatasa (EC 3.6.1.9) za vzniku AMP/GMP a pyrofosfátu (Obr. 2A) a ADP/GDP jsou rozkládány nukleosiddifosfátfosfatasa (EC 3.6.1.6) na AMP/GMP a fosfát (Obr. 2B). AMP/GMP jsou následně štěpeny za přítomnosti vody nukleotidasou (EC 3.1.3.5) na adenosin/guanosin a fosfát (Obr. 2C) (Stone a Simmonds, 1991).

2.2.1 Nukleosidové transportéry

Transport purinových a pyrimidinových nukleosidů a některých bází je umožněn membránovými nukleosidovými transportéry. Tyto transportéry jsou charakterizovány jako přenašeče poháněné elektrochemickým potenciálem. Nukleosidové transportéry se dělí do dvou hlavních skupin. Skupiny se odlišují především rozdílným zastoupením aminokyselin ve struktuře proteinů, dále ve směru a mechanismu transportu (Rosen, 2002). Jednosměrné koncentrační transportéry jsou řízeny gradientem kationtů (Vijayalakshmi a Belt, 1988) a obousměrné ekvilibrační transportéry využívají usnadněné difúze (Plagemann *et al.*, 1981). Nukleosidové transportéry se nejvíce vyskytují v plazmatických membránách buněk srdce, mozku, jater, ledvin a střev. Některé druhy přenašečů jsou specifické pro konkrétní typy membrán a orgánů, např.: v rámci ledvinových epitelových buněk jsou koncentrační transportéry lokalizovány v apikální části plazmatické membrány a ekvilibrační transportéry v bazální části (Rosen, 2002; Mangravite *et al.*, 2003).

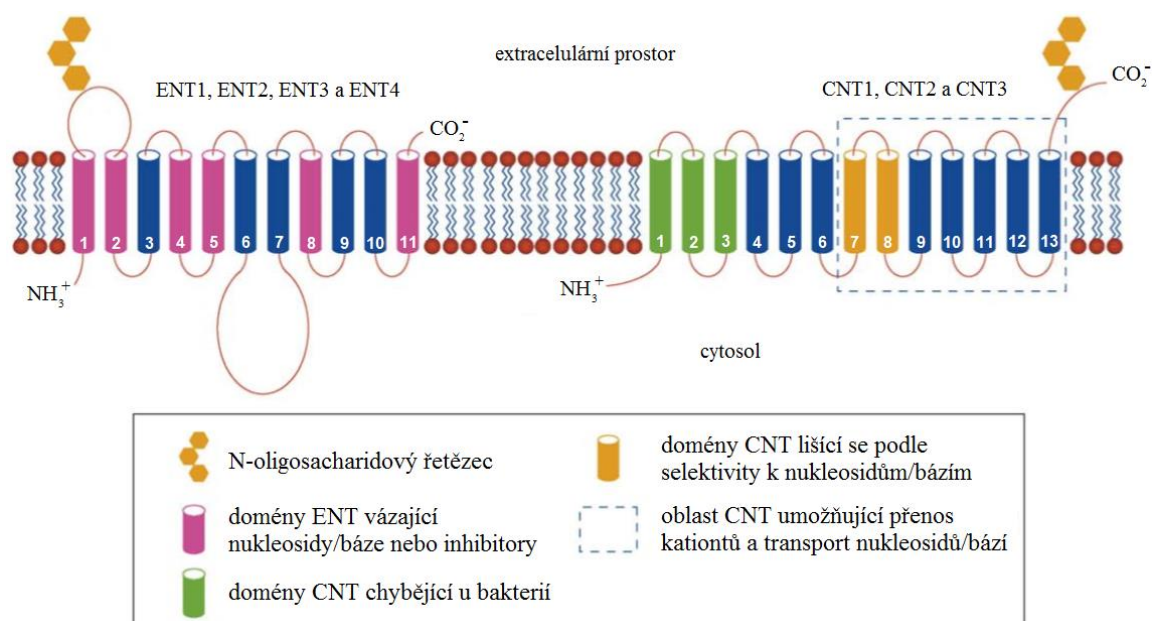


Obr. 2 Schéma hydrolýzy ATP/GTP (2A), ADP/GDP (2B) a AMP/GMP (2C).

Oba typy nukleosidových transportérů udržují v intracelulárním prostoru buněk stálou hladinu nukleosidů a bází, čímž ovlivňují řadu metabolických pochodů včetně energetické homeostázy a buněčné signalizace. Slouží jako zdroj purinů a pyrimidinů pro záchranné dráhy vedoucí k tvorbě nukleotidů. Tyto dráhy jsou upřednostňovány před energeticky náročnou syntézou *de novo*. Kromě transportu přirozeně se vyskytujících metabolitů, nukleosidové transportéry přenášejí i nukleosidová analoga, používaná jako léčiva při nádorových chemoterapiích, virových infekcích nebo k léčbě vysokého krevního tlaku (viz kapitola 1.1.3) (Rosen, 2002; Huang *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Koncentrační nukleosidové transportéry

Koncentrační nukleosidové transportéry „Concentrative Nucleoside Transporters“ – (CNT) jsou přenašeče vyskytující se u bakterií, archaeí i eukaryot. Jedná se o membránové proteiny ze *SLC28* rodiny. Transportéry jsou u archaeí a eukaryot složeny ze třinácti α -helixových domén, u bakterií pouze z deseti (domény 4 – 13). Aminokupinový N-konec první domény zasahuje do cytosolu, na rozdíl od karboxylové části, která je extracelulární. Protein je na jednom místě z vnější strany membrány glykosylován přes atom dusíku. Proteinové domény 7 – 13 (Obr. 3) spolu kooperují a umožňují symport nukleosidů a některých bází se sodnými nebo vodíkovými ionty. Jsou oklopeny doménami 4 – 6. První tři domény se na transportu nepodílejí (Rosen, 2002; King *et al.*, 2006; Stecula *et al.*, 2017).



Obr. 3 Struktura transmembránových nukleosidových transportérů ENT a CNT. Upraveno podle (King *et al.*, 2006).

Nukleosidy, případně báze jsou transportovány z extracelulárního prostoru do buňky proti svému koncentračnímu gradientu, zatímco Na^+ nebo H^+ jsou přenášeny ve směru membránového gradientu. Existují tři druhy CNT transportérů (CNT1, CNT2 a CNT3) s různou délkou aminokyselinového řetězce (CNT1 – 650, CNT2 – 658 a CNT3 - 691). CNT1, CNT2 a CNT3 jsou kódovány třemi různými geny (*SLC28A1*, *SLC28A2* a *SLC28A3*) (Tab. 1). Tyto transportéry se liší substrátovou specifitou k přenášenému nukleosidu/bázi. O typu přenášené molekuly rozhodují transmembránové domény 7 a 8 (Obr. 3). CNT1 preferuje pyrimidinové nukleosidy a adenosin, CNT2 upřednostňuje purinové nukleosidy a uridin, CNT3 přenáší jak purinové, tak pyrimidinové nukleosidy. CNT1 a CNT2 umožňují transport jednoho nukleosidu/báze s jedním sodným iontem, zatímco CNT3 přenáší obě komponenty v poměru 1:2 nebo nukleosid/bázi s protonem v poměru 1:1 (Tab. 1). Všechny druhy CNT jsou lokalizovány v plazmatických membránách jater, ledvin a střev. Některé transportéry jsou tkáňově specifické. CNT2 se kromě zmíněných orgánů vyskytují v srdci, mozku, slinivce, placentě a kosterním svalstvu. CNT3 byly mimo jiné nalezeny v mléčné žláze, kostní dřeni a v průdušnici (Loewen *et al.*, 1999; Rosen, 2002; Damaraju *et al.*, 2005; King *et al.*, 2006).

Tab. 1 Souhrn informací o CNT a ENT. Upraveno podle (Loewen *et al.*, 1999; Rosen, 2002; Damaraju *et al.*, 2005; Govindarajan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013a; Liu *et al.*, 2015).

protein	kódující gen	AMK sekvence	typ přenosu	specifita
CNT1	<i>SLC28A1</i>	650	symport s Na^+ (1:1)	Pyn, adenosin
CNT2	<i>SLC28A2</i>	658	symport s Na^+ (1:1)	Pun, uridin
CNT3	<i>SLC28A3</i>	691	symport s Na^+ (1:2) nebo symport s H^+ (1:1)	Nuc
ENT1	<i>SLC29A1</i>	456	usnadněná difúze	Nuc
ENT2	<i>SLC29A2</i>	456	usnadněná difúze	Nuc, adenin
ENT3	<i>SLC29A3</i>	475	domněnky o symportu s H^+	Nuc, adenin
ENT4	<i>SLC29A4</i>	530	domněnky o symportu s H^+	adenosin

Pozn.: AMK – aminokyselina, Pyn – pyrimidinové nukleosidy, Pun – purinové nukleosidy, Nuc – všechny nukleosidy

2.2.1.2 Ekvilibrační nukleosidové transportéry

Ekvilibrační nukleosidové transportéry „Equilibrative Nucleoside Transporter“ – (ENT) jsou membránové proteiny *SLC29* rodiny, vyskytující se pouze u eukaryot. Jsou tvořeny jedenácti transmembránovými doménami, jejichž sekundární sktruktura je stejně jako u CNT tvořena α -helixy. První doména proteinu zasahuje aminoskupinovým zakončením do cytosolu a jedenáctá doména je v extracelulárním prostoru zakončena karboxylovou skupinou. První dvě domény jsou na vnější části membrány spojeny smyčkou, slouženou ze 41 aminokyselin, na které je navázán N-oligosacharidový řetězec. Další smyčka (66 aminokyselin) se nachází na vnitřní straně membrány mezi šestou a sedmou doménou (Obr. 3) (Sundaram *et al.*, 2001; Rosen, 2002; Huang *et al.*, 2017).

ENT byly původně rozděleny na základě citlivosti k inhibičnímu adenosinovému analogu – nitrobenzylmerkaptopurinribosidu (NBMPR) do dvou skupin. Ekvilibrační senzitivní („equilibrative sensitive“ – *es*) transportéry jsou inhibovány již nízkou koncentrací NBMPR. Do této skupiny patří ENT1. Na inhibici se podílejí transmembránové domény 1, 2, 4, 5, 8 a 11, které zároveň transportují nukleosidy a báze (Obr. 3). ENT2 se řadí do skupiny ekvilibračních nesenzitivních („equilibrative insensitive“ – *ei*) transportérů, které nejsou ovlivňovány ani vysokou koncentrací NBMPR. Po objevení dalších dvou přenašečů byly ekvilibrační nukleosidové transportéry rozděleny do čtyř skupin na: ENT1, ENT2, ENT3 a ENT4. Skupiny ENT mají různé aminokyselinové složení (ENT1, 2 – 456, ENT3 – 475, ENT4 - 530) a jsou kódovány jinými geny (*SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* a *SLC29A4*) (Tab. 1). Všechny ekvilibrační nukleosidové transportéry jsou obousměrnými přenašeči, směr přenosu udává koncentrační gradient. ENT1 a ENT2 využívají pro transport usnadněné difúze (Tab. 1) (Sundaram *et al.*, 2001; Rosen, 2002; King *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2017).

Transport pomocí ENT3 a ENT4 není zcela jasný. ENT3 a ENT4 nevyužívají usnadněné difúze a nejsou závislé na koncentračním gradientu sodného kationtu. Bylo zjištěno, že mechanismus transportu ENT3 i ENT4 ovlivňuje pH, proto existují dohady o souvislosti s protonovým koncentračním gradientem (Baldwin *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2006). Nukleosidový transport pomocí ENT3 je maximální při hodnotě pH 5,5. Nejvyšší aktivita ENT4 přenašeče je v rozmezí pH 5,5 – 6,0. Se zvyšující se hodnotou pH, aktivita ENT3 a ENT4 transportérů klesá (Wang *et al.*, 2013a; Liu *et al.*, 2015).

Transportéry ENT se stejně jako v případě CNT, liší v substrátové specifitě přenášených nukleosidů a bází. Všechny typy ENT umožňují transport adenosinu. ENT1 přenáší kromě adenosinu i ostatní nukleosidy. ENT2 a ENT3 umožňují mimo jiné transport adeninu, který je však inhibován vyšší afinitou nukleosidů k těmto typům transportérů. Všechny čtyři typy ENT jsou lokalizovány v plazmatických membránách buněk různých orgánů a tkání. Specificky se ENT1 nacházejí v jaderné a mitochondriální membráně ledvinových, srdečních a mozkových buněk. ENT2 jsou přítomny v jaderné membráně buněk kosterního svalstva, mozku a srdce (Sundaram *et al.*, 2001; Rosen, 2002; Barnes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2017). ENT3 se nacházejí v endozomální, lysozomální (Baldwin *et al.*, 2005) a především v mitochondriální membráně jaterních buněk (Govindarajan *et al.*, 2009). ENT4 se hojně vyskytují v plazmatické membráně srdečních a mozkových buněk (Barnes *et al.*, 2006).

2.2.2 Purinové receptory

Na transportu purinových nukleosidů se kromě nukleosidových transportérů podílejí také purinové receptory, umístěné v plazmatických membránách (Burnstock, 1976). Purinové receptory jsou rozděleny do dvou kategorií na P₁ a P₂ receptory. Hlavním rozdílem mezi oběma skupinami je druh přenášeného metabolitu. Receptory první skupiny umožňují přenos nukleosidů, konkrétně adenosinu a P₂ receptory jsou zodpovědné za transport nukleotidů (Burnstock, 1978). Nukleosidové receptory jsou rozšířeny v plazmatických membránách buněk po celém těle. Nejvíce se však vyskytují v centrální nervové soustavě, kde se podílejí na přenosu nervového vzruchu mezi neurony a v kardiovaskulární soustavě, kde ovlivňují stah hladkého svalstva, a hrají tak roli při vazodilataci (Stone a Simmonds, 1991; Jennings *et al.*, 2001).

2.2.2.1 P₁ receptory

Původně existovali pouze dva zástupci adenosinových receptorů, umožňující transport adenosinu z extracelulárního prostoru do buňky – A₁ a A₂. Receptory byly charakterizovány na základě inhibice nebo stimulace enzymu adenylátcyklasy (EC 4.6.1.1). Tento enzym se podílí na tvorbě sekundárního posla – cyklického AMP (cAMP), který je nepostradatelným členem intracelulárních signálních drah. Receptor A₁ zamezuje tvorbu cAMP, zatímco receptor A₂ ji podporuje (van Calker *et al.*, 1979; Londos *et al.*, 1980).

V roce 1983 byly A_2 adenosinové receptory rozděleny podle afinity k adenosinovým analogům, jako je kofein a další příbuzné metylxanthiny (Daly *et al.*, 1983). Později bylo toto rozdělení charakterizováno na A_{2A} a A_{2B} receptory (Bruns *et al.*, 1986). Poslední identifikovanou skupinou P_1 receptorů jsou A_3 receptory snižující koncentraci cAMP v buňce (Zhou *et al.*, 1992). Všechny P_1 receptory jsou spojeny s regulačními G-proteiny, které jsou napojeny na adenylátcyklasu. Nejčastěji se v lidském těle vyskytuje A_1 receptor, který má k adenosinu největší afinitu z P_1 receptorů. Nižší schopnost přenášet adenosin mají oba receptory typu A_2 a nejmenší A_3 receptory (Burnstock *et al.*, 1984; Jennings *et al.*, 2001).

2.2.2.2 P_2 receptory

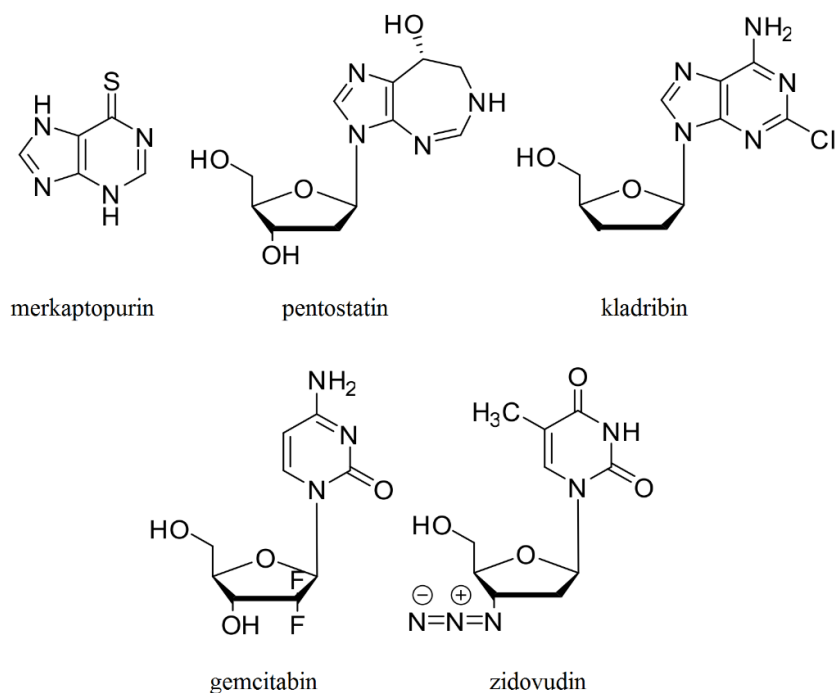
P_2 receptory zprostředkovávají transport adenosinových (ATP a ADP) a uracilových (UTP a UDP) nukleotidů. V roce 1985 byly v hladkém svalstvu králičí vrátnicové žíly objeveny dva druhy P_2 receptorů, které měly vliv na stah hladké svaloviny. Tato skupina byla rozdělena na P_{2X} receptory způsobující kontrakci a P_{2Y} receptory zodpovědné za relaxaci hladkého svalstva (Kennedy a Burnstock, 1985). P_{2X} a P_{2Y} receptory se dále liší mechanismem přenosu. P_{2X} jsou nejčastěji spojeny s vápenatými, sodnými nebo draselnými iontovými kanály. Zatímco P_{2Y} jsou stejně jako P_1 receptory spřaženy s G-proteiny. Dosud bylo objeveno 15 typů P_2 receptorů (Burnstock a King, 1996). Skupina P_{2X} obsahuje 7 typů receptorů – P_{2X1} - P_{2X7} a skupina P_{2Y} receptorů je charakterizována 8 typy P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} , P_{2Y6} , P_{2Y11} - P_{2Y14} . Všechny P_{2X} a některé P_{2Y} receptory (P_{2Y1} , P_{2Y11} - P_{2Y13}) umožňují transport ATP a ADP. Zbylí zástupci skupiny P_{2Y} receptorů (P_{2Y2} , P_{2Y4} , P_{2Y6} a P_{2Y14}) preferují transport UTP a UDP. Kromě plazmatických membrán buněk hladké svaloviny, srdce a centrální nervové soustavy byly některé receptory (P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X5} , P_{2X7} a P_{2Y2}) nalezeny specificky v osteoklastech a osteoblastech kostí a chondrocytech chrupavek (Hoebertz *et al.*, 2000; Abbracchio *et al.*, 2003).

2.2.3 Analoga nukleosidů a bází používaná v lékařství

Analoga nukleosidů a bází jsou synteticky vyráběné deriváty, odvozené od původních purinových a pyrimidinových forem. Jsou účinné proti virům, bakteriím a plísním. V medicíně našla nukleosidová analoga široké uplatnění jako terapeutika při léčbě nádorových onemocnění. V maligních buňkách omezují replikaci a opravu DNA nebo inhibují enzymy podílející se na syntéze purinů a pyrimidinů. To má za následek apoptózu nádorových buněk v průběhu jejich růstu i buněčného dělení. Dále jsou používány jako imunosupresiva a léky s vasodilatačními účinky proti vzniku krevních sraženin způsobených vysokým krevním tlakem. Nukleosidová léčiva jsou v organismu přenášena na místo určení nukleosidovými transportéry CNT a ENT (Stone a Simmonds, 1991; Rosen, 2002; Demir *et al.*, 2015; Friedman *et al.*, 2017; Coulthard *et al.*, 2018).

2.2.3.1 Purinová analoga

Do skupiny purinových analog používaných v lékařství patří cytotoxický thioderivát hypoxantinu – merkaptopurin (MP) (Obr. 4). Při jeho syntéze dochází k záměně atomu kyslíku na šestém uhlíku purinového skeletu za atom síry. Tento hypoxantinový derivát má imunosupresivní účinky a v organismu omezuje činnost imunitního systému. Jako imunosupresivum je MP používán od padesátých let minulého století u pacientů trpících autoimunitními chorobami. Například zánětlivá onemocnění střev, autoimunitní hepatitida, revmatická onemocnění, aj. Mimo jiné je MP užíván jako chemoterapeutikum při léčbě dětí s akutní lymfoblastickou leukémií a také je pacientům podáván pro snížení rizika odmítnutí transplantovaných orgánů nebo tkání (Friedman *et al.*, 2017; Coulthard *et al.*, 2018). MP je v maligních buňkách přetvářen v purinové záchranné dráze enzymem hypoxantinguaninfosforibosyltransferasou (HGPRT, EC 2.4.2.8) na 6-thioinosinmonofosfát, který je následně přeměněn na 6-thioguanosin. Tento nukleosidový analog je fosforylován na 6-thioguanosintrifostát (6-thioGTP), který je v nádorových buňkách zapojen do syntézy DNA. V roce 2018 bylo středem zájmu skupiny Coulthard *et al.*, syntetizovat z vysoce cytotoxického 6-thioGTP jeho derivát 6-metylthioguanosintrifostát (6-metylthioGTP). U toho derivátu byla prokázána výrazně nižší toxicita, což znamená slibnou budoucnost pro léčbu nádorových a autoimunitních onemocnění (Coulthard *et al.*, 2018).



Obr. 4 Vzorce purinových (merkaptopurin, pentostatin a kladribin) a pyrimidinových (gemcitabin a zidovudin) analogů používaných jako léčiva.

K dalším protinádorovým léčivům patří purinová analoga pentostatin a kladribin (Obr. 4). Mechanismem účinku je u obou léčiv inhibice enzymu adenosindeaminasy (EC 3.5.4.4), katalyzující deaminaci adenosinu na inosin. Jedná se o jednu z reakcí katabolismu purinů. Zablokování degradace adenosinu vede k akumulaci ATP, které se pro buňku stává toxickým (Stone a Simmonds, 1991; Demir *et al.*, 2015). Pentostatin a kladribin jsou zaměřeny na léčbu hematologických nádorů. Jedná se o různé druhy leukémií a lymfomů (Demir *et al.*, 2015).

2.2.3.2 Pyrimidinová analoga

Mezi nukleosidová chemoterapeutika patří kromě purinových analogů také pyrimidinové deriváty. Jedním z nich je například cytidinový analog gemcitabin (2,2-difluorodeoxycytidin) (Obr. 4), používaný při léčbě nádoru prsu, plic, slinivky a močového měchýře. Do nádorových buněk je transportován prostřednictvím CNT1, CNT3 a ENT1. Gemcitabin má v nádorových buňkách několik mechanismů účinku. Jedním z nich je zablokování replikace a oprav DNA. Dochází k začleněním gemcitabinového nukleotidu do vlákna DNA, což znemožňuje navázání následujícího nukleotidu. Dalším mechanismem účinku gemcitabinu je inhibice enzymů podílejících se na syntéze cytosinových nukleotidů (Kroep *et al.*, 2002; Rosen, 2002).

Tymidinový analog zidovudin (3-azido-3-deoxytymidin) (Obr. 4), dříve známý jako azidotymidin – AZT se používá jako antivirotikum při léčbě syndromu získané imunodeficiencie „Acquired ImmunoDeficiency Syndrome“ – (AIDS). AZT je do cytosolu přenášen pomocí CNT1, CNT2 a CNT3 koncentračních transportérů. Následně je fosforylován na nukleotidový analog tymidinu – azidotymidintrifosfát, který inhibuje reverzní transkriptasu (EC. 2.7.7.49) lidského viru imunodeficiencie „Human Immunodeficiency Virus“ – (HIV). Reverzní transkriptasa je DNA polymerasou, katalyzující syntézu DNA pomocí zpětného přepisu genetické informace z cizorodé RNA do hostitelské DNA. K zastavení procesu dochází navázáním nukleotidového analogu azidotymidintrifosfátu k narůstajícímu vláknu DNA, které je okamžitě degradováno (Furman *et al.*, 1986; de Miranda *et al.*, 1989).

2.3 Systém CRISPR/Cas9

V genovém inženýrství se od roku 2012 stala fenoménem technologie „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ and CRISPR associated system 9“ – CRISPR/Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Ve volném překladu se jedná o pravidelně se shlukující systém krátkých palindromických opakování.

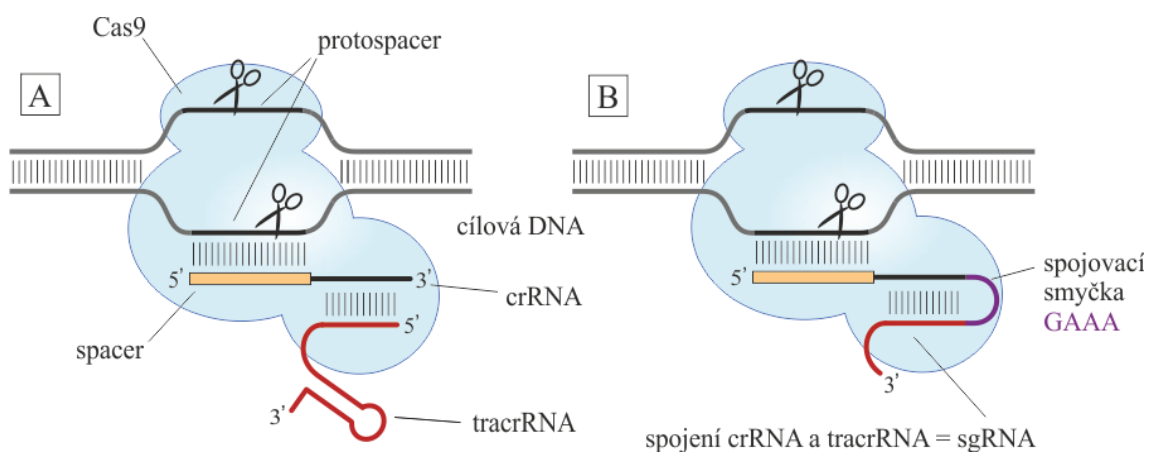
Technika je používána pro editaci genomu různých organismů. Princip úprav genomu spočívá v inzerci, deleci nebo záměně nukleotidů s cílem označit, aktivovat, deaktivovat, odstranit nebo zmutovat příslušné geny (Doudna a Charpentier, 2014).

Technika byla inspirována přizpůsobivou imunitní odpovědí CRISPR/Cas, vyskytující se u prokaryotických organismů – bakterií a archaeí. CRISPR/Cas brání prokaryotické buňky proti invazi cizorodého genetického materiálu. Je tedy zaměřena na cizorodé plazmidy a bakteriofágy, vůči kterým si bakterie a archea takto mohou vytvořit rezistenci (Barrangou *et al.*, 2007). Při infekci cizorodou DNA reaguje hostitelská buňka okamžitou syntézou speciální sekvence RNA – CRISPR RNA (crRNA) a proteinu Cas s endonukleasovou aktivitou. Vlákno crRNA o délce 42 nukleotidů slouží hostitelské buňce k prohledávání genomu s cílem nalézt konkrétní úsek cizorodé DNA, tzv. protospacer. Jedná se o sekvenci 20 nukleotidů. K protospaceru se následně komplementárně naváže sekvence crRNA – spacer. Enzym Cas je poté schopen z hostitelského genomu vystříhnout cizorodou DNA, která je následně degradována (Jinek *et al.*, 2012).

Existují tři druhy CRISPR/Cas systému, odlišné podle mechanismu imunitní odpovědi a typu Cas proteinu. Nejlépe prozkoumanou a popsanou je druhá skupina, pro kterou je charakteristická endonukleasa Cas9 „CRISPR-associated protein 9“ (EC 3.1.-.-), která se přirozeně vyskytuje u bakterie *Streptococcus pyogenes*. CRISPR/Cas9 systém využívá kromě crRNA další sekvenci RNA – transaktivující crRNA „trans-activating crRNA“ – (tracrRNA) dlouhou 75 nukleotidů, která přivádí endonukleasu Cas9 do místa působení. Na 3' konci crRNA je 22 nukleotidů komplementárně spárováno s 5' koncem tracrRNA. Obě vlákna RNA a Cas9 protein se v oblasti protospaceru shlukují do ribonukleoproteinového komplexu, který vytváří dvouvláknový zlom v cizorodé DNA (Obr. 5A) (Jinek *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2013).

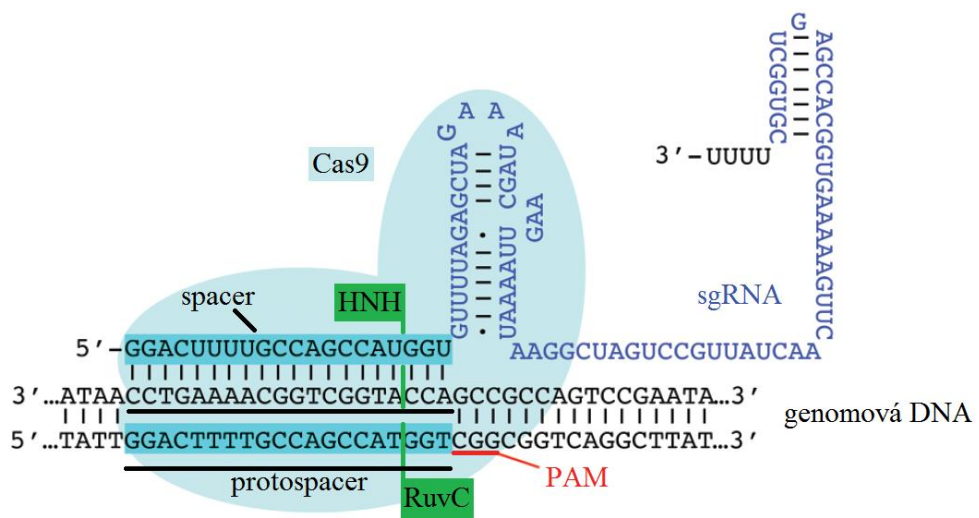
2.3.1 Mechanismus techniky CRISPR/Cas9

Technika CRISPR/Cas9 byla v porovnání s imunitním systémem prokaryotických buněk vylepšena vytvořením hybridního vlákna naváděcí RNA „single guide RNA“ – (sgRNA) (Obr. 5B). SgRNA zjednodušila mechanismus této molekulární techniky v *in vitro* podmínkách. Vlákno sgRNA vzniklo spojením 3' konce crRNA s 5' koncem tracrRNA pomocí čtyř nukleotidové smyčky guaninu a tří adeninů – GAAA (Jinek *et al.*, 2012).

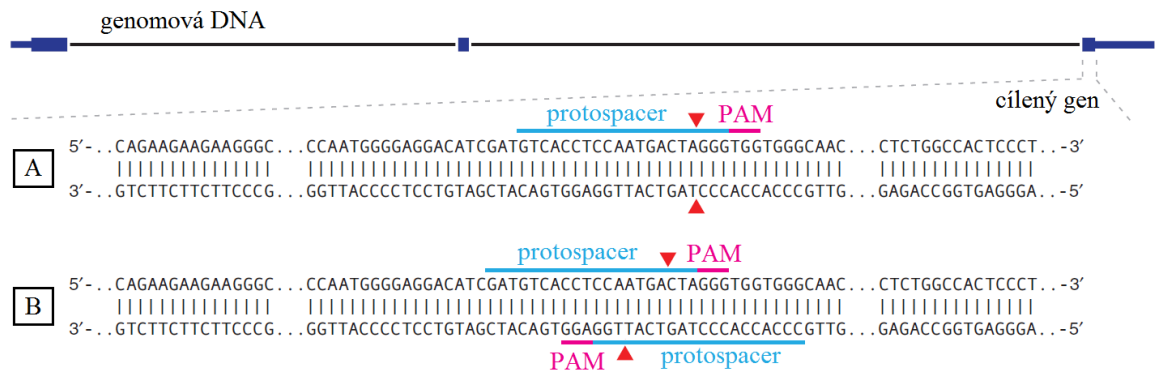


Obr. 5 Porovnání CRISPR/Cas9 používající crRNA a tracrRNA v buněčném systému (A) a techniky CRISPR/Cas9 s naváděcí sgRNA (B). Převzato a upraveno podle (Jinek *et al.*, 2012).

Cílová DNA obsahuje protospacer, ke kterému se komplementárně váže spacer vlákna sgRNA. SgRNA přivádí do místa editace genomu Cas9 protein. Endonukleasa Cas9 následně rozpoznává cílovou sekvenci DNA pomocí tzv. protospacer přilehlého motivu „Protospacer Adjacent Motif“ – (PAM). PAM je sekvence tří nukleotidů NGG odvozených od CRISPR/Cas9 bakterie *Streptococcus pyogenes*. Na první pozici PAM se může nacházet jakákoliv báze, zatímco na druhé a třetí pozici se vyskytuje guanin. Protein Cas9 má dvě na sobě nezávislé nukleasové domény HNH a RuvC (Obr. 6). Tyto domény jsou homologní a každá z nich štěpí jedno z vláken DNA. HNH nukleasová doména vytváří zlom na protospaceru, který se nachází na DNA komplementární ke spaceru sgRNA. Nukleasová doména RuvC stříhá protospacer, umístěný na druhém vlákně DNA, které je nekomplementární k sgRNA. Obě domény štěpí DNA v oblasti tří nukleotidů před sekvencí PAM. Vzniká dvouvláknový zlom DNA s tupými (Obr. 7A) nebo lepivými (Obr. 7B) konci (Jinek *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013a; Mali *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013).



Obr. 6 Mechanismus techniky CRISPR/Cas9. Převzato a upraveno podle (Li *et al.*, 2013a).

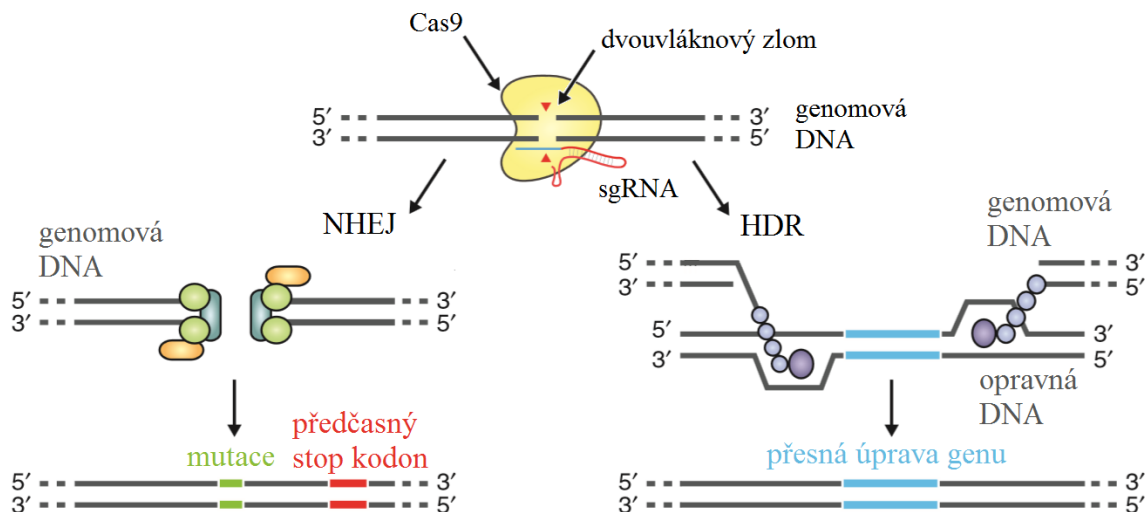


Obr. 7 Editace cílové DNA pomocí techniky CRISPR/Cas9 za vzniku tupých (A) a lepivých (B) konců vláken DNA. Převzato a upraveno podle (Ran *et al.*, 2013).

2.3.2 Opravné mechanismy DNA

Cílem techniky CRISPR/Cas9 je vznik dvouvláknových zlomů DNA, které se buňka přirozeně snaží zpracovat opravnými mechanismy. Prvním, jednodušším a rychlejším způsobem je nehomologní lepení konců „Non-Homologous End Joining“ – (NHEJ), kdy jsou konce rozlomeného vlákna DNA nepřirozeně spojována. To má za následek vznik inzercí, delecí a záměn nukleotidů, které vedou k mutacím. Opravný mechanismus NHEJ je organismy používán jako rychlá a dostupná možnost opravy porušeného vlákna DNA. V rámci genového inženýrství je NHEJ užíváno pro tvorbu náhodných editací genomu (Mali *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013).

Druhý opravný mechanismus – homologně řízené opravy „Homologous Directed Repair“ – (HDR) je sofistikovanější, ale pro buňku energeticky náročnější přístup. Průběh HDR vyžaduje vložení krátké sekvence opravné DNA, podle které je porušená genomová DNA komplementárně opravena (Obr. 8). Mechanismus HDR používají organismy pouze při buněčném dělení. Ve zbylých případech je aplikován NHEJ mechanismus. Přístup HDR je v genovém inženýrství používán pro vytvoření cílených editací příslušného genu (Mali *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013).



Obr. 8 Opravy dvouvláknového zlomu pomocí NHEJ a HDR. Převzato a upraveno podle (Ran *et al.*, 2013).

2.3.3 Předchůdci techniky CRISPR/Cas9 a jejich porovnání

Mezi předchůdce techniky CRISPR/Cas9 patří editace prováděné pomocí restrikčních endonukleas. Jedná se o proteinové domény, spojené s vláknem DNA na základě motivů zinkového prstu „Zinc Finger“ – (ZF) (Pavletich a Pabo, 1991) nebo efektoru podobného transkripčnímu aktivátoru „Transcription Activator Like Effector“ – (TALE) (Boch *et al.*, 2009; Moscou a Bogdanove, 2009). Proteinové domény obsahují v rámci obou motivů nukleasovou doménu *FokI*. Podle motivů umožňujících vazbu *FokI* k velkému zářezu vlákna DNA byly technologie pojmenovány jako ZF nukleasy (ZFNs) a TALEN nukleasy (TALENs) (Kim *et al.*, 1996; Christian *et al.*, 2010).

Struktura ZFNs je tvořena dvěma doménami, obsahující 30 aminokyselin. Domény jsou upřádané do dvou β -listů a jedné α -šroubovice, které jsou spojeny přes dvojice aminokyselin cystein a histidin zinečnatým kationtem. ZF nukleasa je v rámci postranních řetězců čtyř aminokyselin α -šroubovice spojena se třemi nebo čtyřmi páry bází vlákna DNA (Pavletich a Pabo, 1991; Kim *et al.*, 1996).

Struktura TALENs zahrnuje více opakujících se domén, složených z 34 aminokyselin, které jsou poskládány do dvou α -šroubovic. TALENs jsou pomocí postranních řetězců 12. a 13. aminokyseliny spojeny s jedním párem nukleotidů vlákna DNA, kde dochází ke vzniku dvouvláknového zlomu. Dvouvláknové zlomy vzniklé pomocí technik ZFNs a TALENs, jsou rovněž jako u techniky CRISPR/Cas9 opravovány mechanismy NHEJ nebo HDR (Boch *et al.*, 2009; Christian *et al.*, 2010).

Používání technik ZFNs a TALENs je omezeno nízkou účinností a specifitou. Mimo jiné také obtížnou syntézou nukleasových proteinů. Dnes jsou tyto techniky v rutinní praxi nahrazovány účinnější, jednodušší, rychlejší a cenově dostupnější technikou CRISPR/Cas9 (Ran *et al.*, 2013; Doudna a Charpentier, 2014). Technika CRISPR/Cas9 má však jednu nevýhodu. Umožňuje vznik nespecifických modifikací na základě úseků „off-target“, které jsou shodné s nepříliš unikátní sekvencí PAM (Fu *et al.*, 2013). V lidském genomu se úseky off-target nachází v průměru každých 8 – 12 nukleotidů (Hsu *et al.*, 2013). Dvouvláknové zlomy DNA proto mohou vznikat v jiných částech genomu mimo cílenou sekvenci protospaceru. Pokud je dvouvláknový zlom opraven přístupem NHEJ, dochází k tvorbě nežádoucích mutací, které mohou mít mutagenní účinky. Tyto změny v genomu detekované DNA sekvenací je možné odstranit působením různých endonukleas (Fu *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013).

2.3.4 Aplikace techniky CRISPR/Cas9

V roce 2012 se technika CRISPR/Cas9 začala používat v *in vitro* podmínkách pro úpravy genomu mnoha různých modelových organismů. Nejprve se jednalo o genové editace bakterií (Jiang *et al.*, 2013), následně byla technika aplikována na eukaryotické modelové organismy: kvasinky (DiCarlo *et al.*, 2013), červy (Friedland *et al.*, 2013), octomilky (Gratz *et al.*, 2013), savčí buněčné linie (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013), myši (Wang *et al.*, 2013b), krysy (Li *et al.*, 2013c,b), rostliny (Li *et al.*, 2013a; Nekrasov *et al.* 2013), plodiny jako je rýže a pšenice (Shan *et al.*, 2013) a mnoha dalších. V roce 2014 byla technika poprvé použita na úpravu genomu embrya opice jávské (Niu *et al.*, 2014) a o rok později k úpravě genomu lidského embrya (Liang *et al.*, 2015).

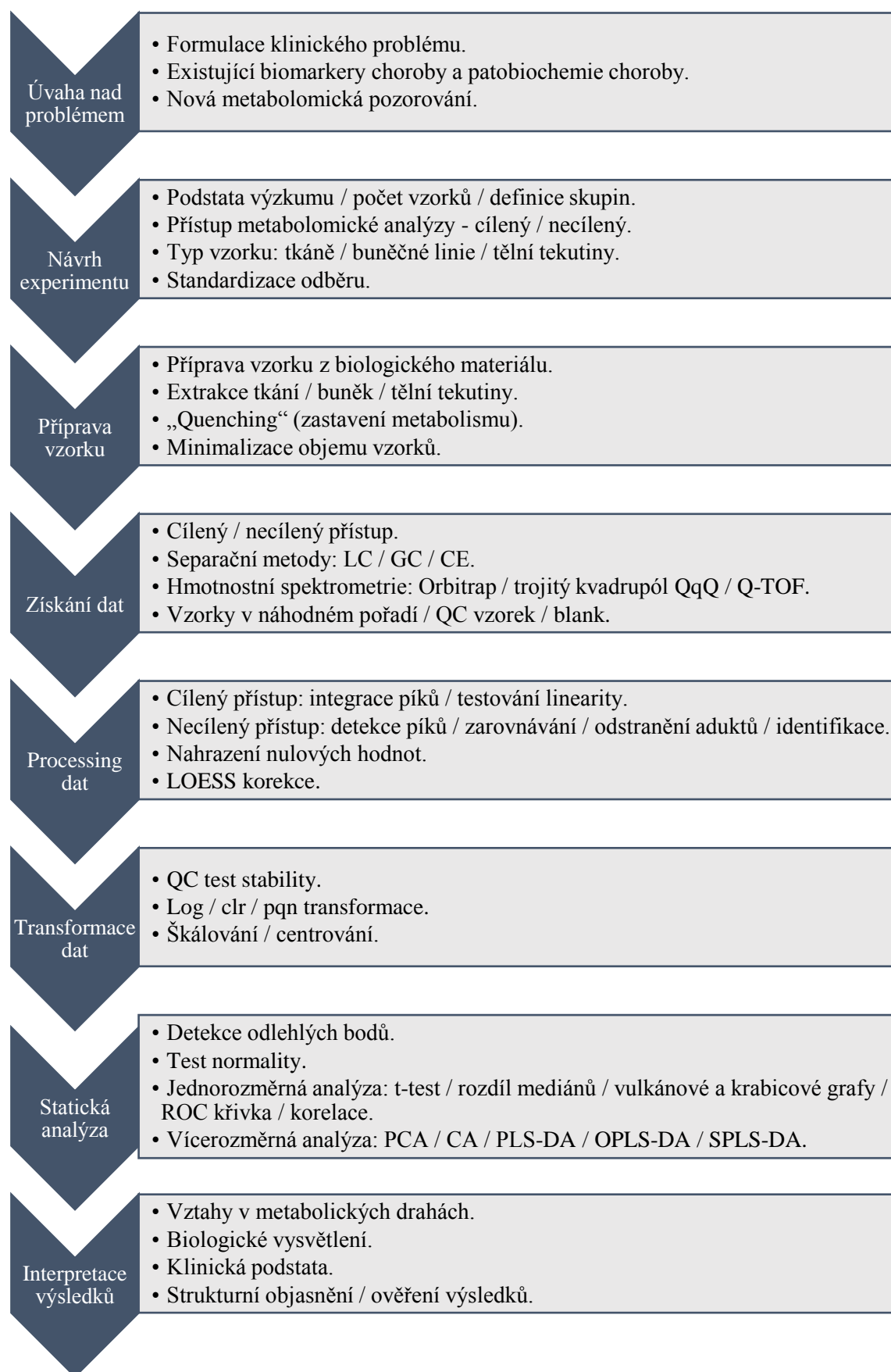
Aplikace techniky CRISPR/Cas9 je velmi rozmanitá. Kromě genového inženýrství, kde je používána k úpravě genomu zmíněných modelových organismů, je technika aplikována v syntetické biologii k manipulaci s DNA pro vytvoření nových modelových organismů (Katz *et al.*, 2018). Mimo jiné je tato technika uplatňována také ve farmakologii a medicíně k vývoji léčby různých onemocnění, jako jsou například ischemická choroba srdeční (Ding *et al.*, 2014), AIDS (Liao *et al.*, 2015), dědičná metabolická porucha tyrosinémie (blokace metabolismu tyrosinu) (Pankowicz *et al.*, 2016), rakovina (Platt *et al.*, 2014), aj. Dále je CRISPR/Cas9 v rámci biotechnologie a zemědělství používána pro zdokonalování geneticky modifikovaných plodin, např.: pro zvýšení obsahu proteinu v sóji a vyvinutí její resistance vůči herbicidům (Rojas Arias *et al.*, 2017).

2.4 Metabolomika

Metabolomika se jako samostatný vědní obor zabývá studiem nízkomolekulárních látek (metabolitů) přítomných v biologickém materiálu. Souhrnem všech extra- a intracelulárních metabolitů je metabolom (Dunn *et al.*, 2013). V klinické praxi jsou metabolomické experimenty často zaměřovány na identifikaci metabolitů, které jsou svou přítomností nebo hodnotou koncentrace daných látek specifické pro výskyt metabolických poruch a slouží jako biomarkery pro jejich stanovení (Václavík *et al.*, 2018).

Metabolomika využívá dvou hlavních přístupů – cílený a necílený (metabolomické profilování). Metabolomická analýza je vícestupňovým procesem (Obr. 9), který využívá poznatků z analytické chemie, biochemie, biologie, statistiky a dalších příbuzných oborů. Cílený a necílený přístup metabolomické analýzy je založen na aplikaci hmotnostní spektrometrie jako detekční techniky spojené se separačními chromatografickými metodami (Dunn *et al.*, 2013; Kirwan, 2013).

Pro zpracování dat používá metabolomika metody statistické analýzy. Jedná se o metody jednorozměrné, které nahlíží na soubor dat v rámci jedné dimenze a metody vícerozměrné analyzující data ve vícedimenzionálním prostoru. Grafickými interpretacemi jednorozměrných metod jsou například krabicové a vulkánové grafy, korelační mapy, aj. (Kirwan, 2013). Vícerozměrné statistické analýze je věnována následující kapitola.



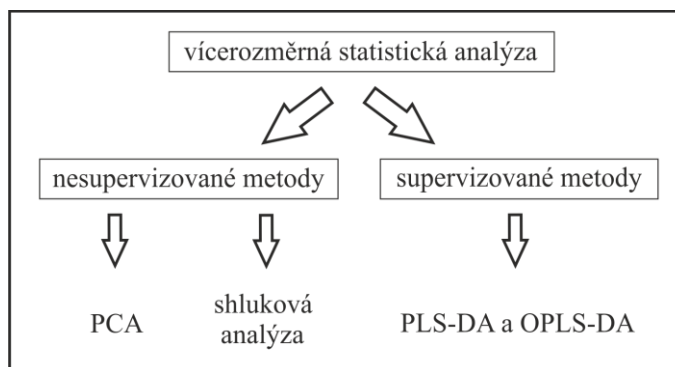
Obr. 9 Jednotlivé kroky metabolické analýzy. Význam všech zkratk je uveden jako příloha (viz kapitola 9.1). Převzato a upraveno podle (Kirwan, 2013).

2.4.1 Vícerozměrná statistická analýza

Cílem metod vícerozměrné statistické analýzy „MultiVariate Data Analysis“ (MVDA) v metabolomice je analýza rozsáhlých souborů dat. Mimo jiné slouží metody MVDA také k vizualizaci dat a zjednodušení jejich interpretace s co nejlepším zachováním variability mezi metabolity (proměnnými) (Kirdar *et al.*, 2008; Worley a Rowers, 2013).

Metody MVDA se dělí na nesupervizované a supervizované (Obr. 10). Cílem nesupervizovaných metod je rozdělit vzorky do shluků (skupin) bez předem známých informací o rozdělení (Worley a Rowers, 2016; Granato *et al.*, 2018). Mezi nesupervizované metody patří analýza hlavních komponent „Principal Component Analysis“ – (PCA) (Pearson, 1901) a klastrová neboli shluková analýza „Cluster Analysis“ – (CA) (Oliveri a Simonetti, 2016). Naopak supervizované metody dělí vzorky do skupin na základě informací o příslušnosti vzorků ke skupinám. Jedná se o předem známé informace, které se týkají například pohlaví, stavu nemoci, stravovacích návyků atd. (Liland, 2011; Worley a Rowers, 2016). K supervizovaným metodám se řadí například diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců „Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – (PLS-DA) (Barker a Rayens, 2003) a ortogonální diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců „Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – (OPLS-DA) (Trygg a Wold, 2002; Worley a Rowers, 2016).

Pro zvýšení spolehlivosti výsledků MVDA je vhodné kombinovat nesupervizované metody se supervizovanými. Nejpoužívanější kombinací v metabolomice je spojení metod PCA a OPLS-DA (Worley a Rowers, 2016; Granato *et al.*, 2018).

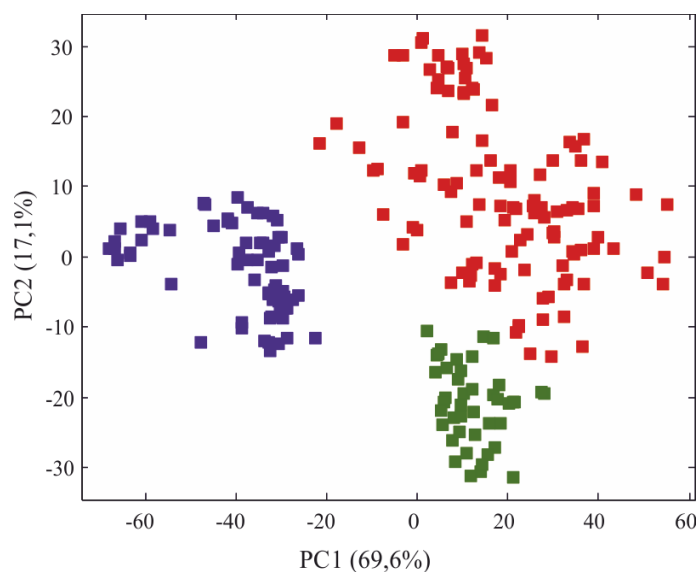


Obr. 10 Schéma rozdělení metod MVDA. Převzato a upraveno podle (Granato *et al.*, 2018).

2.4.1.1 Nesupervizované metody

Nesupervizovaná metoda PCA slouží k vizualizaci rozsáhlého souboru dat a k zobrazení vztahů mezi jednotlivými pozorováními (vzorky). Data jsou vyjadřována pomocí hlavních komponent „Principal Components“ – (PCs), které jsou konstruovány z původních proměnných se snahou zachovat co největší možnou variabilitu. Matematicky je každá PCs vyjádřena jako lineární kombinace všech původních proměnných. Počet PCs odpovídá počtu pozorování. V prostoru se PCs vzájemně neprolínají, protože jsou vůči sobě ortogonální. Díky PCs dochází k redukci dimenzionality, kdy počtu dimenzí odpovídá počet PCs. Pro reprezentaci dat a snazší vizualizaci jsou vybírány pouze první dvě nebo tři PCs. Výstupy PCA jsou tudíž vizualizovány ve dvou- nebo třírozměrném prostoru. Výhodou redukce dimenzionality pomocí PCA je, že téměř nemá vliv na ztrátu informací, které se týkají rozsáhlého souboru dat (Wold *et al.*, 1987; Oliveri a Simonetti, 2016; Granato *et al.*, 2018).

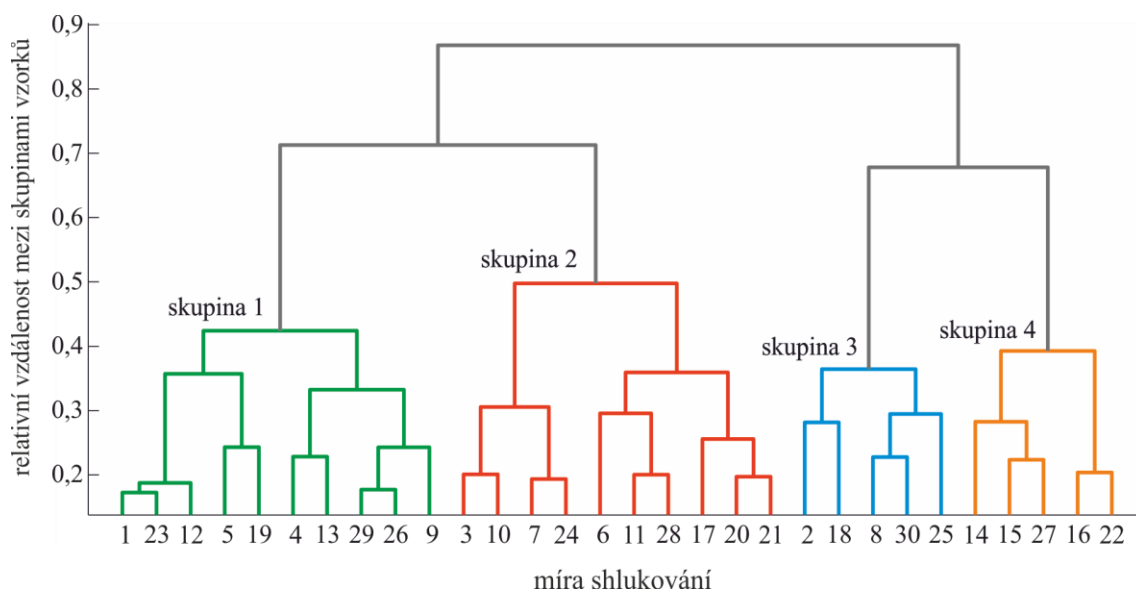
Grafickými reprezentacemi PCA jsou bodové diagramy – skórový (Obr. 11) a zátěžový graf (Wold *et al.*, 1987). Skórový graf ideálně zobrazuje oddělené skupiny vzorků, kdy každá skupina zahrnuje vzorky s podobným metabolomickým profilem. Naopak oddělené skupiny vzorků se v metabolomickém profilu liší. Na základě rozdílného metabolomického profilu je tedy možné rozlišit například vzorky pacientů a kontrol. Zátěžový graf zobrazuje proměnné, které jsou pro oddělení jednotlivých skupin vzorků nejvýznamnější. Jedná se o doplňující grafický výstup skórového grafu (Kirdar *et al.*, 2008; Oliveri a Simonetti, 2016; Worley a Rowers, 2016).



Obr. 11 Příklad skórového grafu PCA. Barevné body odpovídají vzorkům, rozděleným do jednotlivých skupin. Převzato a upraveno podle (Oliveri a Simonetti, 2016).

Ose x u obou grafů odpovídá PC1 a ose y PC2. Ve trojrozměrném prostoru odpovídá ose z PC3. Měřítkem os je tzv. skóre, které odpovídá hodnotě příslušných PCs u každého bodu v grafu. Do grafů se většinou přidává také informace o procentu variability vysvětlené kumulativně pomocí zobrazených PCs. Maximální hodnotě zachované variability odpovídá PC1, druhé nejvyšší PC2, případně třetí nejvyšší PC3 (Oliveri a Simonetti, 2016; Granato *et al.*, 2018).

Další nesupervizovanou metodou MVDA je CA. Jejím cílem je, stejně jako u PCA, vyhledávat závislosti mezi proměnnými a oddělit vzorky do skupin na základě podobností metabolomického profilu. Grafickou reprezentací CA je dendrogram. Dendrogram je diagram závislosti relativní vzdálenosti mezi jednotlivými skupinami vzorků (osa y) na míře shlukování (osa x). Metoda CA používá dva postupy pro dělení vzorků: hierarchický a nehierarchický. Hierarchický postup rozděluje vzorky do skupin, které mohou být dále děleny do podskupin (Obr. 12). Problematiku shlukování řeší v rámci hierarchické CA dva algoritmy – aglomerativní a divizivní. První algoritmus spojuje jednotlivé vzorky nejprve do menších skupin, ty poté do větších, až jsou nakonec všechny vzorky spojeny do jedné velké skupiny. Druhý algoritmus pracuje na opačném principu. Cílem obou algoritmů je identifikovat takový krok shlukování, ve kterém je dosaženo co nejideálnějšího rozdělení vzorků do skupin (Oliveri a Simonetti, 2016; Granato *et al.*, 2018).



Obr. 12 Příklad grafické reprezentace hierarchické CA – denrogram. Barevné čáry označují příslušnost vzorků k jednotlivým skupinám. Převzato a upraveno podle (Liland, 2011).

2.4.1.2 Supervizované metody

Supervizované metody slouží jako nástroj MVDA pro vizualizaci rozsáhlého souboru dat a vyhledávání závislostí mezi proměnnými. Supervizované metody jsou zpravidla kombinacemi regresní a diskriminační analýzy (Worley a Rowers, 2013; Oliveri a Simonetti, 2016).

Regresní analýza klasifikuje závislosti mezi proměnnými. Podle počtu proměnných, zahrnutých v regresním modelu, může být regrese buď jedno- nebo vícerozměrná. Z hlediska povahy modelovaného vztahu je možno regresi dále dělit na lineární a nelineární (Oliveri a Simonetti, 2016). Vícerozměrná lineární regrese „Multiple Linear Regression“ – (MLR) je základní statistickou metodou, která hledá lineární závislost mezi větším počtem závislých a nezávislých proměnných. Metodu MLR využívá PLS-regrese „Partial Least Squares-Regression“ – (PLS-R). Jedná se o kombinovanou metodu, která vznikla spojením MLR a PCA. PLS-R analyzuje v souboru dat kvantitativní závislosti mezi dvěma skupinami proměnných. Stejně jako PCA shrnuje PLS-R velký počet proměnných do menšího počtu komponent (PLS komponenty) s cílem snížit dimenzionalitu grafického výstupu (Wold *et al.*, 2001; Oliveri a Simonetti, 2016).

Diskriminační analýza „Discriminant Analysis“ – (DA) je supervizovaná metoda, která slouží k diskriminaci a klasifikaci vzorků do skupin. DA odhaduje pro každou skupinu vzorků hustotu pravděpodobnostního rozdělení podle výběrové charakteristiky střední hodnoty a rozptylu proměnných. Jedním z typů DA je lineární diskriminační analýza „Linear Discriminant Analysis“ – (LDA). Cílem LDA je nalézt lineární kombinace proměnných pomocí tzv. diskriminační funkce, která rozděluje vzorky do jednotlivých skupin podle podobnosti metabolického profilu. Skupiny jsou v grafickém výstupu od sebe separovány přímkou (Barker a Rayens, 2003; Oliveri a Simonetti, 2016).

LDA je často kombinována s regresními metodami. Například spojením LDA a PLS-R je kombinovaná supervizovaná metoda PLS-DA (Barker a Rayens, 2003). PLS-DA vyhledává kvantitativní závislosti mezi proměnnými (stejně jako PLS-R) a zároveň slouží k diskriminaci a klasifikaci vzorků do skupin (jako LDA). PLS-DA je mimo jiné používána pro redukci dimenzionality. Na rozdíl od PCA a PLS-R, které redukují dimenze na základě variability proměnných, PLS-DA snižuje počet dimenzí s využitím variability skupin vzorků (Wold *et al.*, 2001; Barker a Rayens, 2003).

Variantou metody PLS-DA je řídká diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců „Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – (SPLS-DA) (Chung a Keles, 2010). Metoda SPLS-DA má stejné použití jako PLS-DA. Její výhodou je však to, že pracuje pouze s proměnnými, které se pro každou PLS komponentu ukazují v interačním procesu jako významné. To má za následek zjednodušení interpretace souboru dat (Lê Cao *et al.*, 2011).

V metabolomice je namísto supervizované metody PLS-DA často používán analogický přístup – OPLS-DA. Oproti PLS-DA metodě OPLS-DA konstruuje PLS komponenty tak, aby byly vůči sobě ortogonální (stejně jako v PCA). OPLS-DA používá navíc v porovnání se zmíněnými metodami spektrální techniku korekce ortogonálního signálu „Orthogonal Signal Correction“ – (OSC). OSC je používána v rámci OPLS-DA metody jako první úprava souboru dat. OSC funguje jako filtr, který při konstrukci druhé, ortogonální PLS komponenty systematicky odstraňuje takovou část variability, která původně souvisela s první PLS komponentou. Stejný princip je aplikován při tvorbě dalších PLS komponent. Cílem OPLS-DA metody je tedy snížit komplexnost vícerozměrného modelu v prostoru a zlepšit jeho interpretaci (Trygg a Wold, 2002; Worley a Rowers, 2016).

Pro ověření kvality a správnosti výstupních modelů metod PLS-DA a OPLS-DA je používán permutační test. Permutační test je založen na aplikaci dvou parametrů – Q^2 a R^2 , které jsou vztaženy k ose y. Parametr R^2_y testuje správnost rozdělení vzorků do skupin (pokud $R^2_y = 1$, dochází k ideálnímu rozdělení) a parametr Q^2_y popisuje prediktivní schopnost modelů ($Q^2_y = 1$ značí ideální předvídatelnost modelu pro rozdělení vzorků do skupin). O statistické významnosti permutačního testu rozhoduje p-hodnota obou parametrů z t-testu (Triba *et al.*, 2015).

Základními grafickými reprezentacemi metod PLS-DA, SPLS-DA a OPLS-DA jsou stejně jako u nesupervizované metody PCA skórový a zátěžový graf. Dalším grafickým výstupem metody OPLS-DA je graf významnosti proměnných v projekci „Variable Importance for the Projection“ – (VIP graf). VIP graf je sloupcový diagram, který shrnuje výsledky ze skórového a zátěžového grafu pro zobrazení nejvýznamnějších proměnných, které nejlépe rozdělují dvě porovnávané skupiny vzorků. Pořadí proměnných je určeno podle relativní významnosti (Wold *et al.*, 2001; Kirdar *et al.*, 2008).

Pro statistické zpracování dat této diplomové práce byly použity metody jedno- a vícerozměrné statistické analýzy. Výsledky byly vizualizovány pomocí jednorozměrných reprezentací (vulkánové a krabicové grafy) a vícerozměrných reprezentací (skórové grafy metod PCA, PLS-DA a OPLS-DA a VIP grafy metody OPLS-DA).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Biologický materiál

V experimentální části této diplomové práce byly použity HeLa buněčné linie, editované pomocí molekulární techniky úpravy genomu CRISPR/Cas9. Buněčné linie byly po úpravě genomu deficitní pro jednotlivé enzymy PDNS: trifunkční enzym GART – glycinamidribonukleotidsyntetasa (GARS, EC 6.3.4.13), glycinamidribonukleotid-transformylasa (GART, EC 2.1.2.2) a fosforibosylaminoimidazolsyntetasa (AIRS, EC 6.3.3.1); monofunkční enzym fosforibosylformylglycinamidinsyntetasa (PFAS, EC 6.3.5.3), bifunkční enzym PAICS – fosforibosylaminoimidazolkarboxylasa (CAIRS, EC 4.1.1.21) a fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamidysyntetasa (SAICARS, EC 6.3.2.6); monofunkční enzym adenylosukcinátlyasa (ADSL, EC 4.3.2.2) a bifunkční enzym ATIC – fosforibosylaminoimidazolkarboxamidformyltransferasa (AICART, EC 2.1.2.3) a inosinmonofosfátcyklohydrolasa (IMPCH, EC 3.5.4.10). Jako kontrola posloužila linie HeLa buněk bez editace genomu. Každá linie byla kultivována v hexaplikátu. Buněčné linie byly získány z Ústavu dědičných metabolických poruch Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

3.1.2 Chemikálie

Kyselina octová a hydroxid amonný (LC-MS); acetonitril (LC-MS); 60% a 80% metanol (LC-MS); voda (LC-MS), byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2 Přístrojové vybavení

Sonikátor (Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole and Palmer); chlazená centrifuga (Rotina 410, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo); vortex (V-1 plus, Biosan, Riga, Lotyšsko); ultrazvuková lázeň (PS-40A, Jeken, Guangdong, Čína); pH metr (Cyberscan pH 510, Thermo scientific, Waltham, MA, USA); lyofilizátor (Freezone, Labconco, USA); kapalinový chromatograf UHPLC UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA) a tandemový hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (Sciex, Framingham, MA, USA).

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace a sklizení HeLa buněk

Defektní a kontrolní HeLa buňky byly kultivovány v buněčném médiu „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ – (DMEM), které obsahovalo 10% fetální hovězí sérum a 1% penicilin/streptomycin. Médium defektních buněčných linií bylo obohaceno o adenin ($3 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$). Den před sklizením byly všechny buněčné linie přeneseny do bezpurinového média „Minimum Essential Medium“ – (MEM). MEM bylo obohaceno o 10% dialyzovaného fetálního hovězího séra a 1% penicilinu/streptomycinu.

Sklizení HeLa buněk bylo provedeno podle (Wojtowicz *et al.*, 2012). Pracovní postup byl upraven s ohledem na použitý kultivační materiál. Nejprve bylo z kultivační lahve odstraněno buněčné médium. Pro zastavení metabolismu buněk a oplach veškerého kultivačního média bylo do kultivační lahve přidáno 2 x 20 ml 60% metanolu (-50 °C). Pro extrakci byl přidán 1 ml 80% metanolu (-50 °C), poté byly buňky mechanicky seškrábány. Extrakt buněk byl dále přepipetován do zkumavky. Zbylé buňky byly z kultivační lahve opět extrahovány přidáním 2 ml 80% metanolu (-50 °C). Extrakty buněk byly spojeny a následně sonikovány (2 x po 30 s) a centrifugovány (5 min, 1 800g, 4 °C). Supernatanty buněčných lyzátů byly přeneseny do nových zkumavek a lyofilizovány.

3.3.2 Příprava HeLa buněk pro analýzu

Všechny lyofilizáty byly za použití vortexu rozpuštěny v 200 µl 80% metanolu (-50 °C). Poté byly centrifugovány (15 min, 15 000g, 4 °C) a odebrané supernatanty byly přepipetovány do vialek a použity k analýze. Pro vzorek kontroly kvality (QC) bylo z každého vzorku odebráno 5 µl.

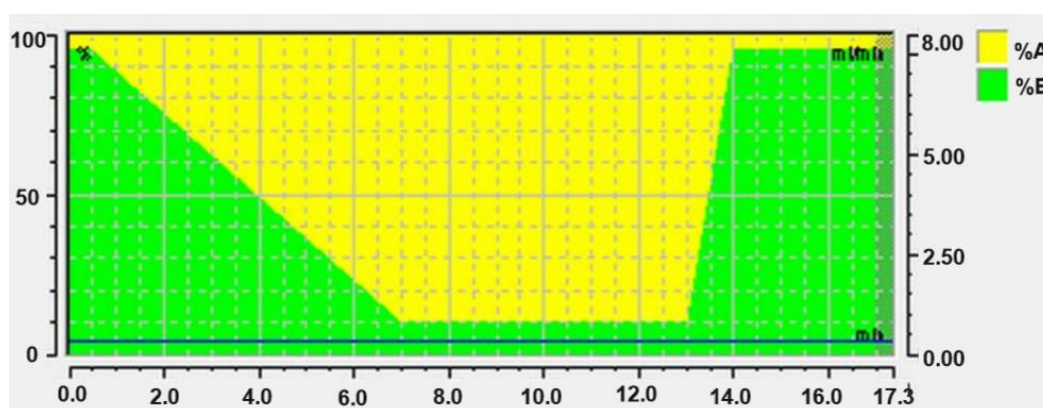
3.3.3 Příprava mobilních fází

Mobilní fázi A tvořil octan amonný o koncentraci $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$ a pH 9,75. Nejprve byl připraven zředěný roztok kyseliny octové, smísením 1000 ml vody s 1,14 ml koncentrované kyseliny octové. Octan amonný byl vytvořen titrací zředěného roztoku kyseliny octové hydroxidem amonným. Mobilní fáze B byla složena pouze z acetonitrilu.

3.3.4 LC-MS necílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií

Pro LC-MS necílenou metabolomickou analýzu defektních HeLa buněčných linií byl použit kapalinový chromatograf Ultimate 3000 RS spojený s vysoko rozlišujícím hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite.

Pro chromatografickou separaci byla použita ultraúčinná kapalinová chromatografie „Ultra-High Performance Liquid Chromatography“ – (UHPLC). Separace byla provedena na koloně Luna NH₂ 3 μm, 100 Å, 100 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA) s aminopropylovou stacionární fází. Kolona byla vyhřívána na teplotu 35 °C. Separace probíhala v systému normálních fází hydrofilní interakční chromatografie „Hydrophilic Interaction Chromatography“ – (HILIC). Jako mobilní fáze A byl použit roztok octanu amonného (0,02 mol.l⁻¹; pH 9,75) a mobilní fáze B byl acetonitril. Gradientová eluce probíhala následujícím způsobem (Obr. 13): první minutu analýzy byl poměr mobilních fází – 5 % A a 95 % B. Následně od 2 – 7 min tento podíl rostl ve prospěch mobilní fáze A. V rozmezí 7 – 13 min analýzy byl podíl mobilních fází konstantní – 90 % A a 10 % B. Poté v průběhu 1 min poklesl podíl zpět do původního poměru. Od 14 min byl až do konce separace zachován stálý podíl mobilních fází – 5 % A a 95 % B. Během separace byl konstantní průtok mobilních fází 0,3 ml.min⁻¹. Analýza probíhala 17 min a pro nástřik bylo použito vždy 5 μl vzorku.



Obr. 13 Záznam průběhu gradientové eluce.

Po separaci byla provedena detekce pomocí hybridního hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite. Pro ionizaci byla použita měkká ionizační technika elektrosprej (ESI) v pozitivním módu s následujícími parametry: teplota kapiláry 350 °C, teplota iontového zdroje 300 °C, napětí spreje 3,00 kV, pomocný plyn 10 Arb, zmlžovací plyn 35 Arb. Analýza byla provedena při rozlišení 60 000 FWHM. V průběhu hmotnostní detekce byl měřen plný sken spektrum v hmotnostním rozsahu 70 – 1500 m/z . Přesnost měření byla zajištěna metodou interní kalibrace (Lock mass) do 1 ppm. Pro ovládání systému a sběr dat byl použit program Xcalibur 2.2TM. Detekce píků byla provedena programem Compound Discoverer 3.0.0.294 (Thermo ScientificTM).

3.3.4.1 Fragmentační analýza vybraných „features“

Součástí necílené metabolomické analýzy bylo provést fragmentační analýzu vybraných „features“ s cílem jejich identifikace. Fragmentační analýza byla provedena pomocí zmíněné LC-MS analýzy necíleného metabolomického přístupu. Podmínky separace a parametry detekce byly stejné (viz kapitola 3.3.4). Metoda se lišila pouze v hodnotě rozlišení, které bylo sníženo na 15 000 FWHM a ve hmotnostním rozsahu, který byl upraven vždy dle měřené hodnoty m/z . Ionizace byla provedena v pozitivním i negativním módu ESI.

Fragmentační spektra byla získána na základě data dependentní analýzy „Data Dependent Analysis“ – (DDA). Bylo fragmentováno pět nejintenzivnějších hodnot m/z ve skenu z tzv. Parent listu (seznam vybraných hodnot m/z ; viz kapitola 3.3.6). Pro fragmentaci byla zvolena technika kolizí indukované disociace („Collision Induced Dissociation“) – CID s normalizovanou kolizní energií „Normalized Collision Energy“ – (NCE) o hodnotě 35. Izolační šířka fragmentace byla nastavena na 2 Da, minimální signál byl 1000. Přesnost měření byla do 3 ppm.

3.3.5 LC-MS cílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií

Necílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií byla doplněna o LC-MS cílenou metabolomickou analýzu, která byla provedena pomocí zmíněné separační metody UHPLC (viz kapitola 3.3.4) spojené s tandemovým hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500. Nástřik vzorků byl 3 μ l. Za účelem dosažení identifikace komplexního metabolomu bylo aplikováno přepínání polarit („polarity switching“) ESI v rámci jedné analýzy. Teplota v iontovém zdroji byla nastavena na 400 °C, napětí na kapiláře v iontovém zdroji bylo od -4500 V do 5500 V. Tlak zmlžovacího, sušícího plynu a „curtain gas“ byl 40 psi. Detekce probíhala v scheduled MRM módu „Scheduled Multiple Reaction Monitoring“ (sMRM), kdy docházelo ke sledování produktu rozpadu vybraného molekulárního iontu v časovém okně 5 min příslušného metabolitu. Naměřená data byla zpracována v programu MultiQuantTM 3.0 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

3.3.6 Statistické zpracování dat

Naměřená data z necíleného a cíleného přístupu metabolomické analýzy byla statisticky zpracována v programu „R“ (www.r-project.org, 2019, verze 3.5.0). Nejdříve byla provedena interpolace dat metodou LOESS „locally weighted regression“, která slouží k odstranění systematické chyby. Poté byl z QC vzorků spočítán variační koeficient (CV). Všechny metabolity, které měly CV nad 30 %, byly vyloučeny. Na data byla následně aplikována tzv. „clr“ transformace (Centered Log-Ratio) a centrování na nulu. Pro co největší objektivnost významnosti získaných výsledků z naměřených dat bylo aplikováno více statistických metod, zahrnující jednorozměrnou statistiku a vícerozměrnou statistiku s nesupervizovaným i supervizovaným přístupem. Grafickými výstupy byly: skórový graf metod PCA, PLS-DA, OPLS-DA, VIP graf metody OPLS-DA, krabicový a vulkánový graf.

Na základě VIP grafu metody OPLS-DA bylo z obou analýz vybráno vždy 20 „features“/metabolitů, které byly nejvíce významné v rámci jednotlivých defektních HeLa linií v porovnání s kontrolou.

Jako „features“ jsou označovány všechny nalezené m/z signály. Jedná se například protonované a deprotonované molekuly, fragmenty, vícenásobně nabitě ionty, izotopové isomery, sodné či draselné adukty atd. „Features“ jednoho metabolitu mají stejný retenční čas, ale jinou hodnotu m/z (Dunn *et al.*, 2013).

3.3.7 Identifikace metabolitů a jejich biochemická interpretace

Identifikace metabolitů byla provedena na základě porovnávání přesné hodnoty m/z a příslušného fragmentačního spektra v různých internetových databázích: mzCloud (www.mzcloud.org), Metlin (<https://metlin.scripps.edu>), LIPID MAPS „Lipid Metabolites And Pathways Strategy“ (<https://www.lipidmaps.org>) a HMDB „Human Metabolome DataBase“ (<http://www.hmdb.ca>). Vybrané lipidy byly identifikovány pomocí programu LipidSearch (verze 4.2.21). Meziprodukty PDNS byly identifikovány porovnáním MS² spekter publikovaných dříve (Mádrová *et al.*, 2018). K biochemické interpretaci dat byly využity výše zmíněné internetové databáze, dále KEGG „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (<https://www.genome.jp/kegg>) a zejména řešerše odborných publikací týkajících se významných metabolitů.

Pro názornou interpretaci některých metabolitů cílené metabolomické analýzy byly použity metabolické mapy, které byly z internetové databáze KEGG upraveny v „R“ programu balíčkem „Pathview“ (Luo a Brouwer, 2013) pro barevnou vizualizaci.

4 VÝSLEDKY

4.1 Necílená metabolomická analýza HeLa buněčných linií

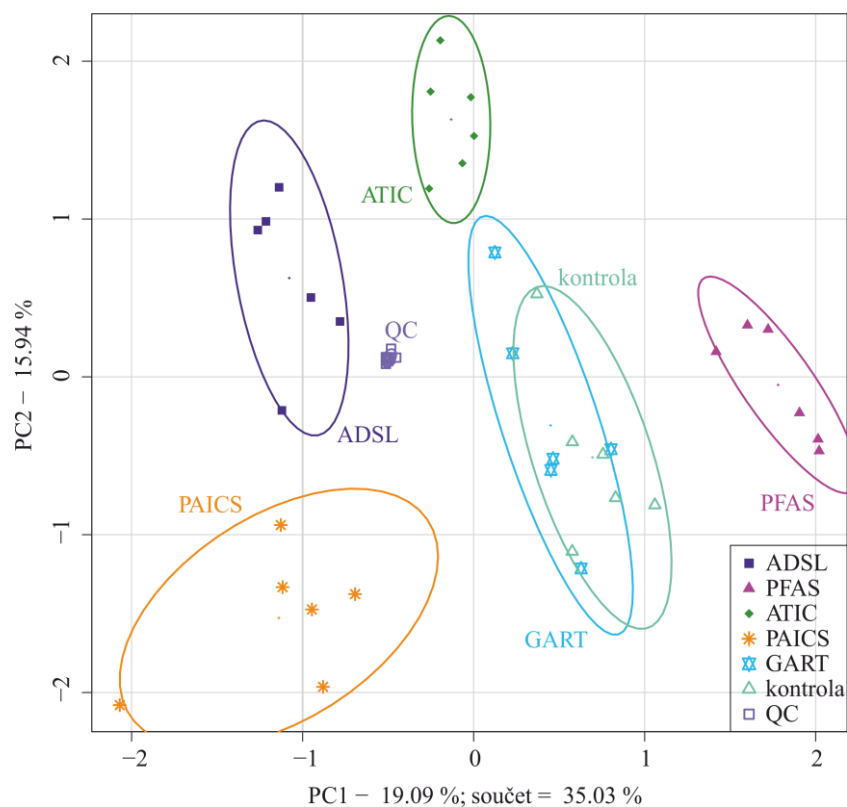
Pomocí programu Compound Discoverer 3.0.0.294 (Thermo Scientific™) bylo v rámci měřeného hmotnostního rozsahu m/z 70 – 1500 detekováno celkem 11729 „features“ v retenčním čase 0 – 17 min. Pro redukci počtu „features“ bylo v tomto programu aplikováno několik filtrů (Tab. 2). Dále byla na datech provedena korelační analýza, která sloužila k odstranění fragmentů a různých aduktů. Po následném statistickém zpracování dat byl konečný počet „features“ 739.

Tab. 2 Souhrn filtrů použitých k redukci počtu „features“ získaných necílenou metabolomickou analýzou HeLa buněčných linií.

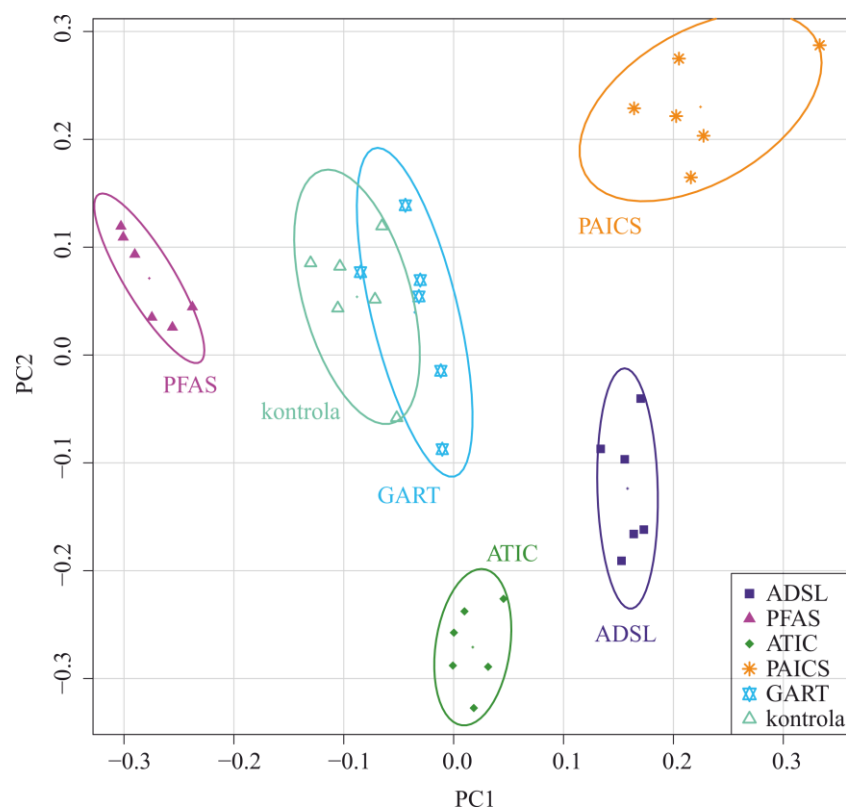
druh filtru	nastavení
přítomnost v pozadí (Background)	nepovoleno
velikost píků (Area)	větší než 4000
variační koeficient ve skupině (Group CV)	menší než 150 %
relativní směrodatná odchylka velikosti píků QC vzorků (RSD QC Areas)	menší než 30 %

4.1.1 Statistická analýza všech linií

Pomocí nesupervizované metody PCA došlo k rozdělení vzorků do skupin, které odpovídaly příslušným defektům PDNS – PFAS, PAICS, ADSL a ATIC. Naopak vzorky linie GART a kontroly nebyly separovány, částečně se překrývaly (Obr. 14).



Obr. 14 PCA vzorků HeLa buněčných linií, které byly změřeny necíleným metabolickým přístupem. Barevné body odpovídají jednotlivým vzorkům defektních linií a kontrolních buněk. V grafu jsou zobrazeny také QC vzorky znázorňující reprezentativnost měření.



Obr. 15 PLS-DA analýza vzorků HeLa buněčných linií měřených necíleným metabolickým přístupem. Barevné body odpovídají jednotlivým vzorkům rozděleným do skupin defektních linií a kontroly.

Skórovým grafem supervizované metody PLS-DA byl potvrzen výsledek metody PCA. Opět došlo k oddělení vzorků do skupin defektních linií PFAS, PAICS, ADSL a ATIC. Vzorky defektní linie GART a kontroly se částečně překrývaly (Obr. 15).

4.1.2 Statistická analýza jednotlivých defektních linií

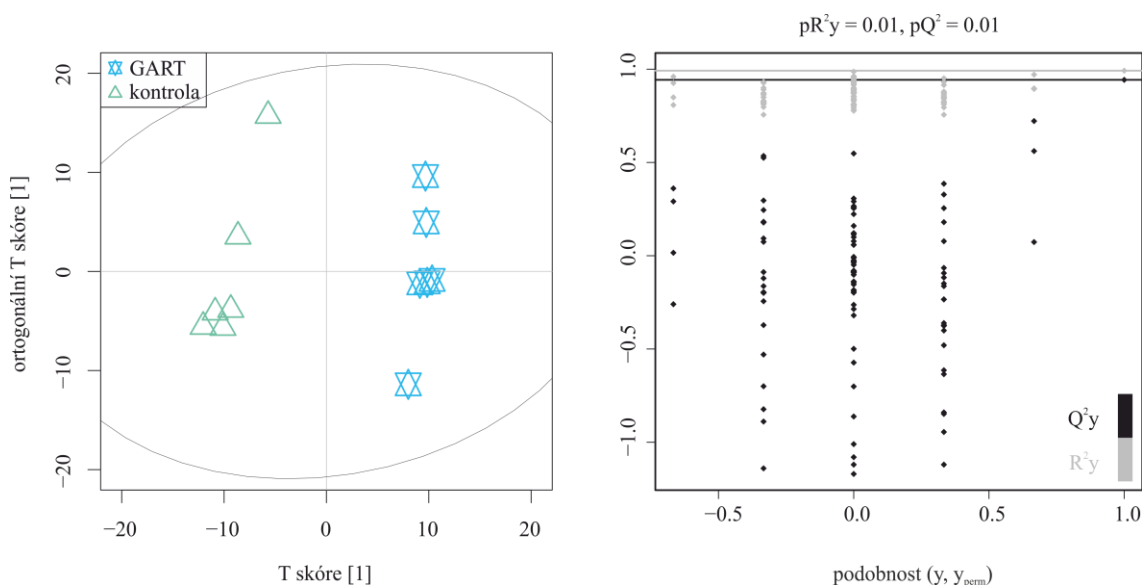
Vzorky jednotlivých defektních linií byly v rámci necíleného přístupu metabolické analýzy vyhodnocovány samostatně porovnáním s kontrolou pomocí supervizované metody OPLS-DA. Kvalita a správnost výsledků OPLS-DA skórových grafů byly ověřeny na základě permutačního testu (Obr. 16, 19, 22, 25 a 28). Permutační testy OPLS-DA modelů všech defektních linií byly vyhodnoceny jako statisticky významné na základě p-hodnot parametrů R^2_y a Q^2_y , které byly nižší než 0,05 (Tab. 3).

Tab. 3 Souhrn parametrů permutačního testu s příslušnými p-hodnotami z t-testu.

defektní linie	R ² y	Q ² y	p-hodnota R ² y	p-hodnota Q ² y
GART	0,992	0,943	0,01	0,01
PFAS	0,998	0,965	0,03	0,03
PAICS	0,993	0,948	0,01	0,01
ADSL	0,996	0,961	0,01	0,01
ATIC	0,996	0,958	0,01	0,01

Pro nalezení diskriminujících features mezi kontrolní a defektní linií byly vytvořeny VIP grafy metody OPLS-DA. Z těchto grafů bylo 20 nejvíce diskriminujících „features“ fragmentováno s cílem jejich identifikace. (Tab. 4 – 8). Byly detekovány akumulované meziproducty PDNS, jejich defosforylovaná analoga, případně i di- a trifosfátové formy PDNS ribosidů, pro které byly vytvořeny krabicové grafy (Obr. 17, 20, 23, 26 a 29). K dalším identifikovaným „features“ patřily látky z metabolismu aminokyselin, sacharidů, pyrimidinů, fosfolipidů, peptidů, aj. Vulkánové grafy byly použity pro zobrazení nejvíce diskriminujících „features“ na základě p-hodnot vypočítaných z t-testu a rozdílů mediánů. Tyto „features“ byly porovnávány s nejvýznamnějšími „features“ OPLS-DA VIP grafů. Shody byly ve vulkánových grafech barevně vyznačeny (Obr. 18, 21, 24, 27 a 30). Hladina významnosti ($\alpha = 6.77 \text{ E-}05$) byla u vulkánových grafů korigována na počet „features“ – 739 (Bonferroniho korekce).

Pomocí metody OPLS-DA došlo k rozdělení vzorků defektní linie GART a kontroly. Správnost rozdělení do příslušných skupin byla ověřena permutačním testem (Obr. 16).



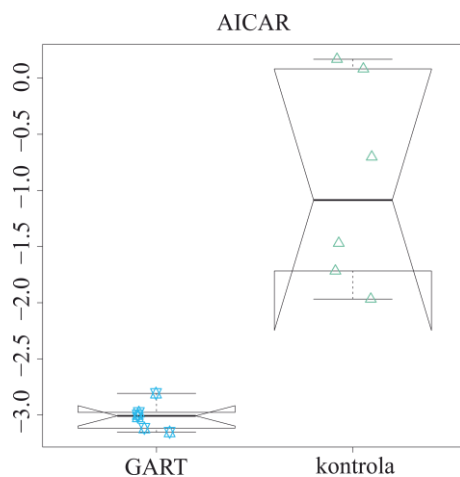
Obr. 16 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie GART a kontroly s příslušným permutačním testem.

Tab. 4 Dvacet nejvýznamnějších „features“ OPLS-DA VIP grafu u defektní linie GART v porovnání s kontrolou. V posledních dvou sloupcích tabulky jsou výsledky náležící k vulkánovým grafům.

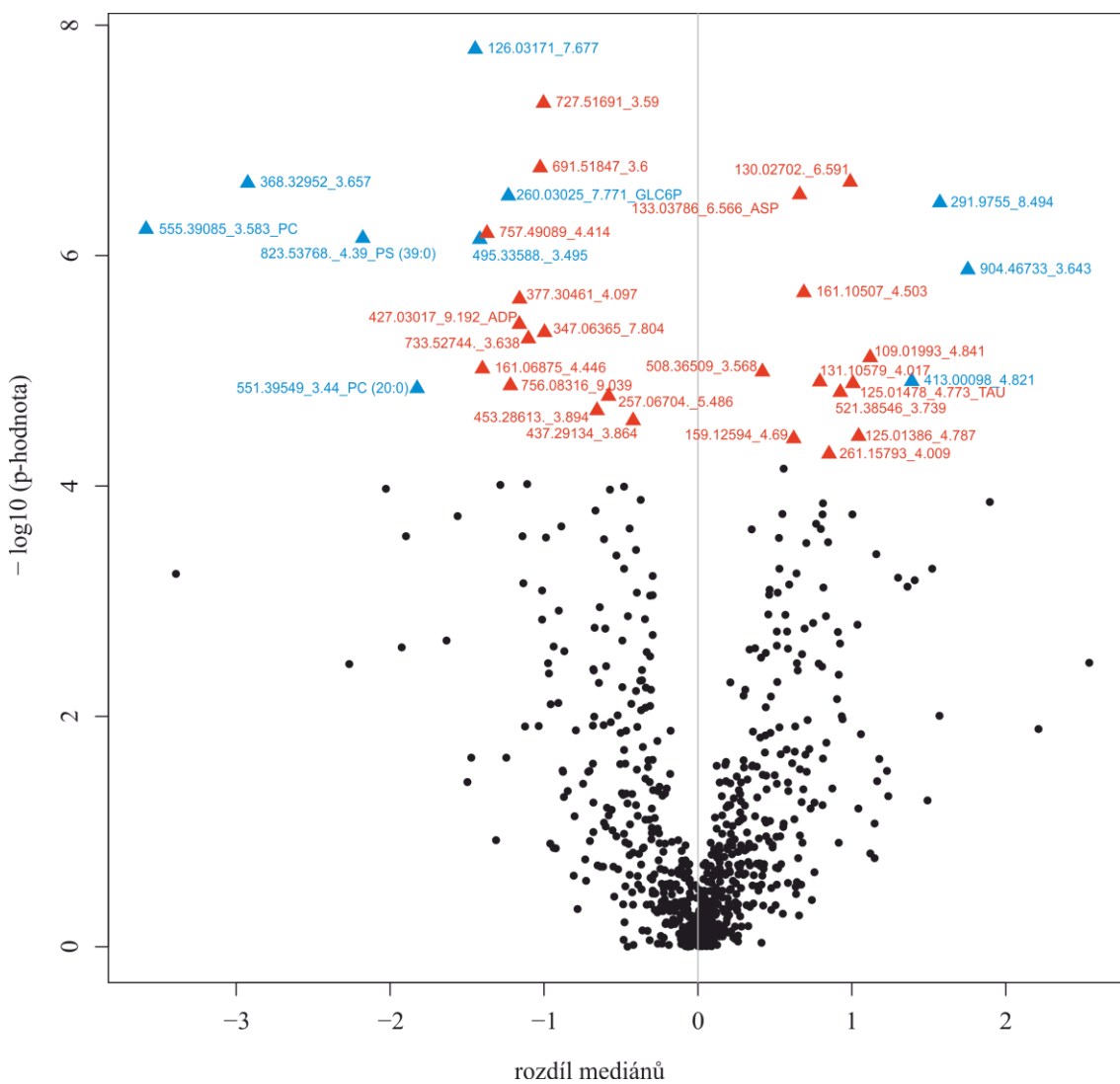
	RT (min)	naměřená MI	teoretická MI	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	3,58	555,3909	-	PC	3,72	0,09	-3,59	5,70 E-07
2	3,66	368,3295	-	neurčeno	3,18	0,06	-2,92	2,35 E-07
3	5,23	375,1219	-	neurčeno	2,87	0,13	-2,26	3,52 E-03
4	7,25	141,0191	-	neurčeno	2,85	0,13	-2,02	1,06 E-04
5	4,39	823,5377	823,5363	PS (39:0)	2,84	0,08	-2,18	7,07 E-07
6	7,78	338,0632	338,0628	AICAR	2,71	0,10	-1,92	2,53 E-03
7	3,64	904,4673	-	neurčeno	2,57	0,07	1,75	1,33 E-06
8	5,00	149,0064	-	neurčeno	2,55	0,22	2,55	3,44 E-03
9	3,44	551,3955	551,3951	PC (20:0)	2,52	0,12	-1,82	1,42 E-05
10	4,14	278,0409	-	neurčeno	2,47	0,14	-1,56	1,83 E-04
11	3,50	495,3359	-	neurčeno	2,43	0,08	-1,42	7,22 E-07
12	7,68	126,0317	-	neurčeno	2,40	0,08	-1,45	1,61 E-08
13	4,21	165,0651	165,0651	7-mG	2,40	0,12	-1,89	2,73 E-04
14	8,49	291,9755	-	neurčeno	2,38	0,10	1,57	3,47 E-07
15	6,00	287,0681	-	neurčeno	2,37	0,09	1,90	1,38 E-04
16	4,82	413,0010	-	neurčeno	2,27	0,09	1,39	1,23 E-05
17	3,79	863,5916	-	neurčeno	2,26	0,17	2,22	1,30 E-02
18	7,77	260,0303	260,0297	GLC6P	2,22	0,07	-1,23	3,03 E-07
19	3,60	675,5240	-	neurčeno	2,21	0,08	-1,28	9,78 E-05
20	3,48	142,1106	-	neurčeno	2,19	0,11	1,41	6,62 E-04

Pozn.: SD – směrodatná odchylka, MI – monoizotopická hmotnost

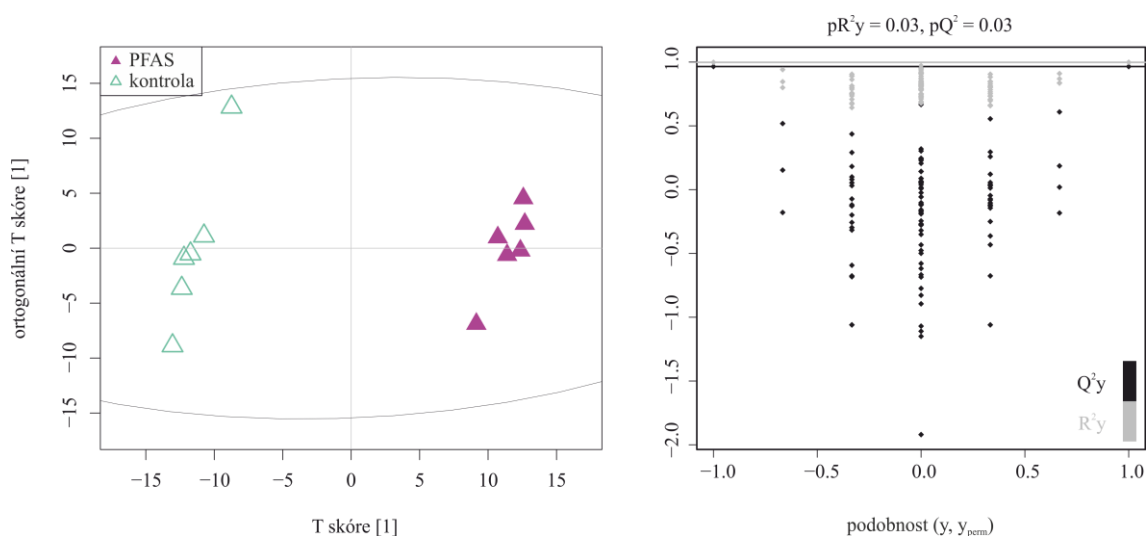
Z 20 nejvýznamnějších „features“ VIP grafu metody OPLS-DA se podařilo u defektní linie GART identifikovat 6 metabolitů (Tab. 4). Mezi nimi byly dva fosfolipidy ze skupiny fosfatidylcholinů (PC), fosfatidylserin (PS), modifikovaná purinová báze 7-metylguanin (7-mG), glukosa-6-fosfát (GLC6P) a meziproduct PDNS – 5-aminoimidazol-4-karboxamidribotid (AICAR), který měl ve vzorcích defektní linie GART sníženou hladinu vůči kontrole (Obr. 17).



Obr. 17 Krabicový graf meziproduktu PDNS – ribotid AICAR.



Obr. 18 Vulkánový graf zobrazující „features“ signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie GART v porovnání s kontrolou. Modře jsou označeny „features“, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími u OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 19 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie PFAS a kontroly s příslušným permutačním testem.

OPLS-DA skórový graf defektní linie PFAS a kontroly stejně jako permutační test jsou uvedeny na (Obr. 19).

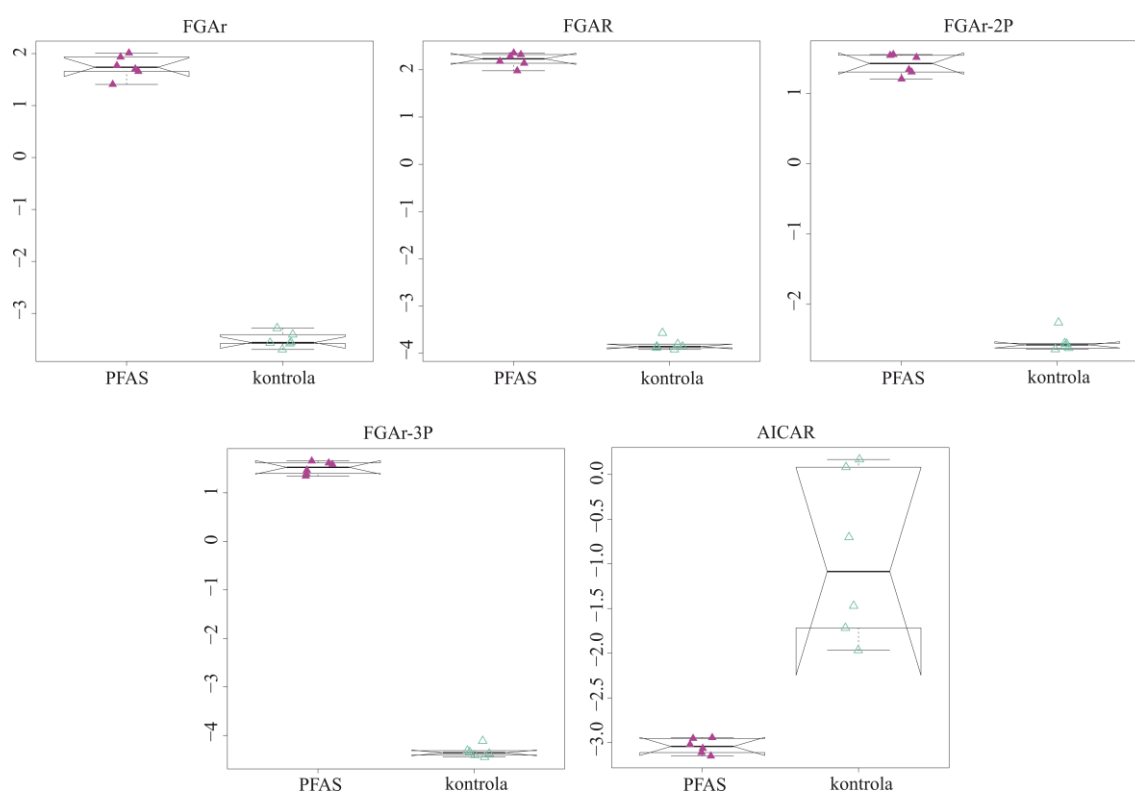
Tab. 5 Dvacet nejvýznamnějších „features“ OPLS-DA VIP grafu u defektní linie PFAS v porovnávání s kontrolou. V posledních dvou sloupcích tabulky jsou výsledky náležící k vulkánovým grafům.

	RT (min)	naměřená MI	teoretická MI	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	7,76	314,0520	314,0515	FGAR	4,02	0,07	6,09	4,00 E-15
2	9,69	473,9849	473,9842	FGAr-3P	3,96	0,07	5,89	1,82 E-15
3	3,81	234,0855	234,0852	FGAr	3,76	0,07	5,30	4,57 E-12
4	8,56	394,0186	394,0178	FGAr-2P	3,25	0,06	4,00	4,06 E-13
5	3,66	368,3295	-	neurčeno	2,73	0,04	-3,12	1,51 E-07
6	4,45	161,0688	-	neurčeno	2,63	0,07	-2,79	1,06 E-06
7	5,23	375,1219	-	neurčeno	2,52	0,12	-2,69	1,91 E-03
8	4,30	755,4238	-	neurčeno	2,50	0,05	2,31	1,08 E-05
9	7,25	141,0191	-	neurčeno	2,46	0,08	-2,17	1,01 E-04
10	4,39	823,5377	823,5363	PS (39:0)	2,43	0,04	-2,42	2,35 E-06
11	4,41	757,4909	-	neurčeno	2,41	0,04	-2,37	2,67 E-07
12	3,60	675,5240	-	neurčeno	2,39	0,04	-2,17	7,26 E-11
13	4,27	783,4562	-	neurčeno	2,36	0,06	2,08	1,20 E-07
14	3,50	495,3359	-	neurčeno	2,23	0,06	-1,74	4,68 E-07
15	5,56	217,1069	217,1063	ALA-GLN	2,22	0,12	-1,92	1,82 E-04
16	7,78	338,0632	338,0628	AICAR	2,21	0,10	-1,96	2,46 E-03
17	6,52	488,1085	-	neurčeno	2,16	0,06	-1,85	9,32 E-05
18	7,68	96,0211	96,0211	fragment FGAR	2,13	0,05	1,69	1,56 E-08
19	4,69	159,1259	-	neurčeno	2,10	0,05	1,63	6,13 E-08
20	7,68	126,0317	-	neurčeno	2,03	0,04	-1,55	1,36 E-08

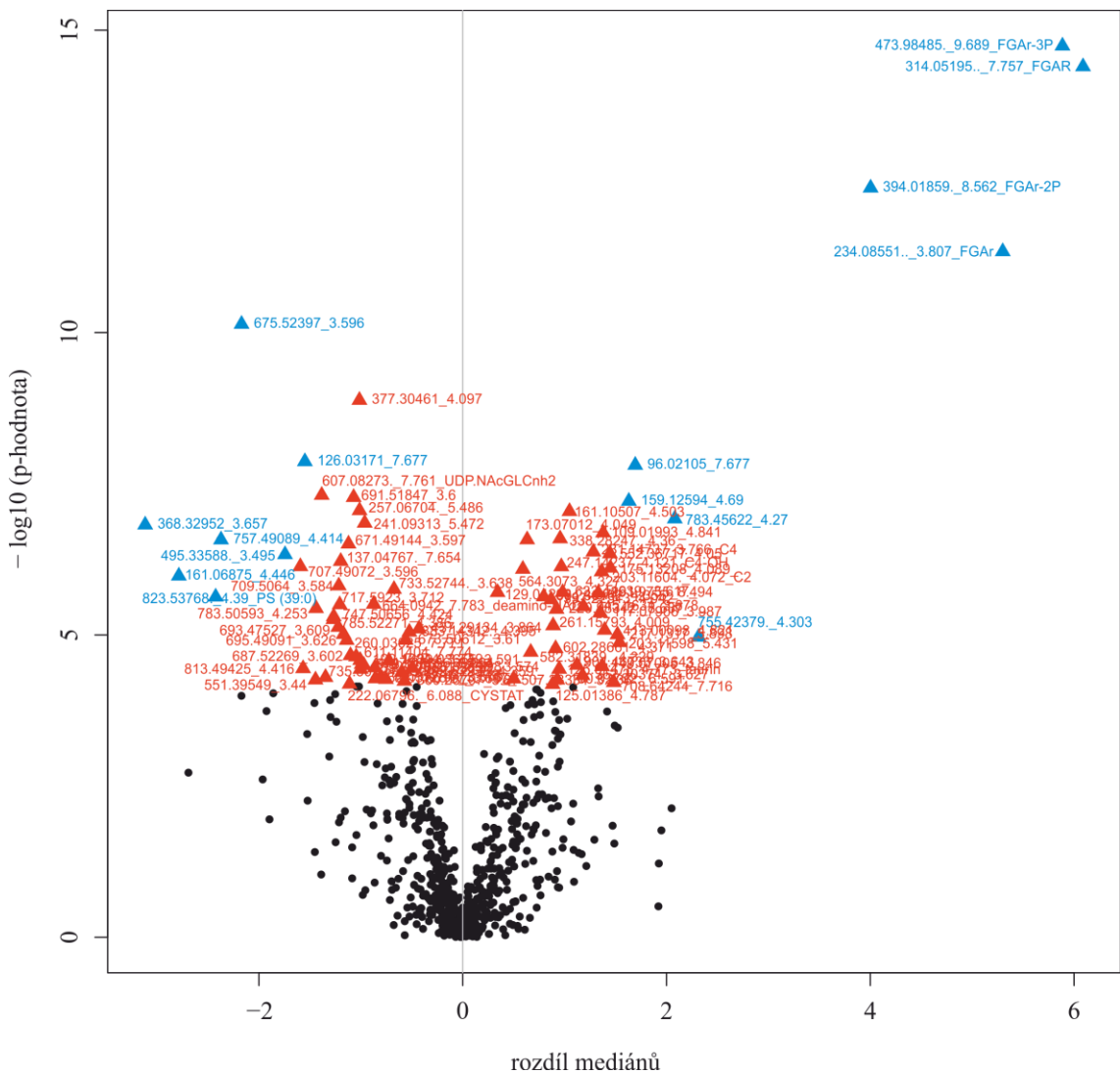
Pozn.: SD – směrodatná odchylka, MI – monoizotopická hmotnost

Z prvních dvaceti významných „features“ VIP grafu metody OPLS-DA bylo u defektní linie PFAS identifikováno 8 metabolitů (Tab. 5). Jednalo se o meziproducty PDNS: N-formylglycinamidribosid (FGAr), AICAR, N-formylglycinamidribotid (FGAR) a jeho fragment, analog N-formylglycinamidribosid difosfát (FGAr-2P) a analog N-formylglycinamidribosid trifosfát (FGAr-3P). Dále byl identifikován fosfatidylserin (PS) a dipeptid alanyl-glutamin (ALA-GLN).

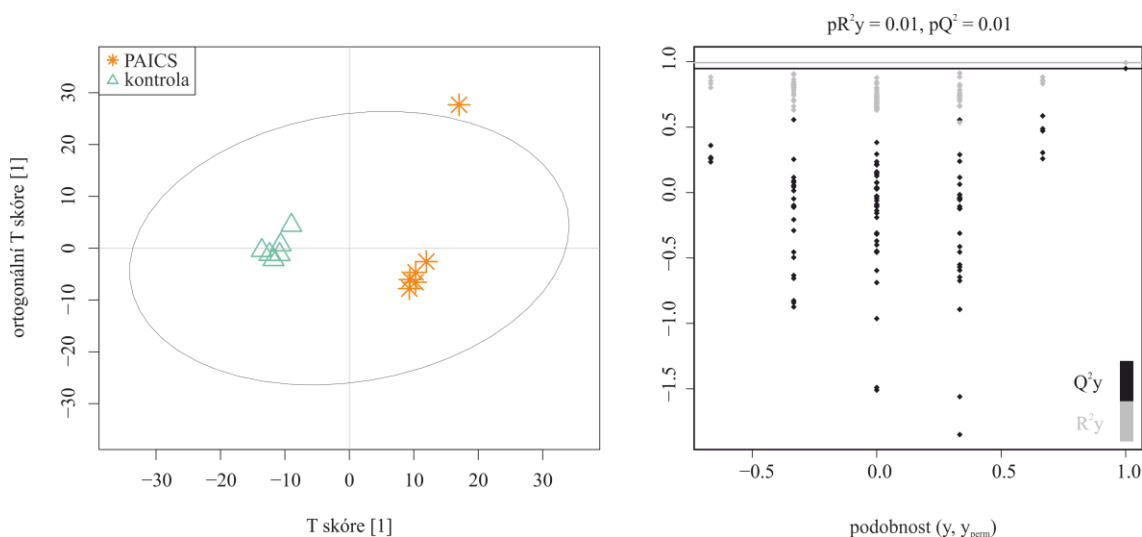
Hladiny ribosidu FGAr, ribotidu FGAR a jeho di- a trifosfátu byly zvýšené u defektní linie PFAS v porovnání se vzorky kontroly. Naopak ribotid AICAR byl u tohoto defektu snížený (Obr. 20).



Obr. 20 Krabicové grafy meziproductů PDNS – ribosid FGAr, ribotid FGAR, difosfátový analog (FGAr-2P), trifosfátový analog (FGAr-3P) a ribotid AICAR.



Obr. 21 Vulkánový graf zobrazující „features“ signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie PFAS vůči kontrolám. Modře jsou označeny „features“, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 22 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie PAICS a kontroly s příslušným permutačním testem.

Metoda OPLS-DA oddělila vzorky defektní linie PAICS a kontroly. Rozdělení vzorků bylo ověřeno pomocí permutačního testu (Obr. 22).

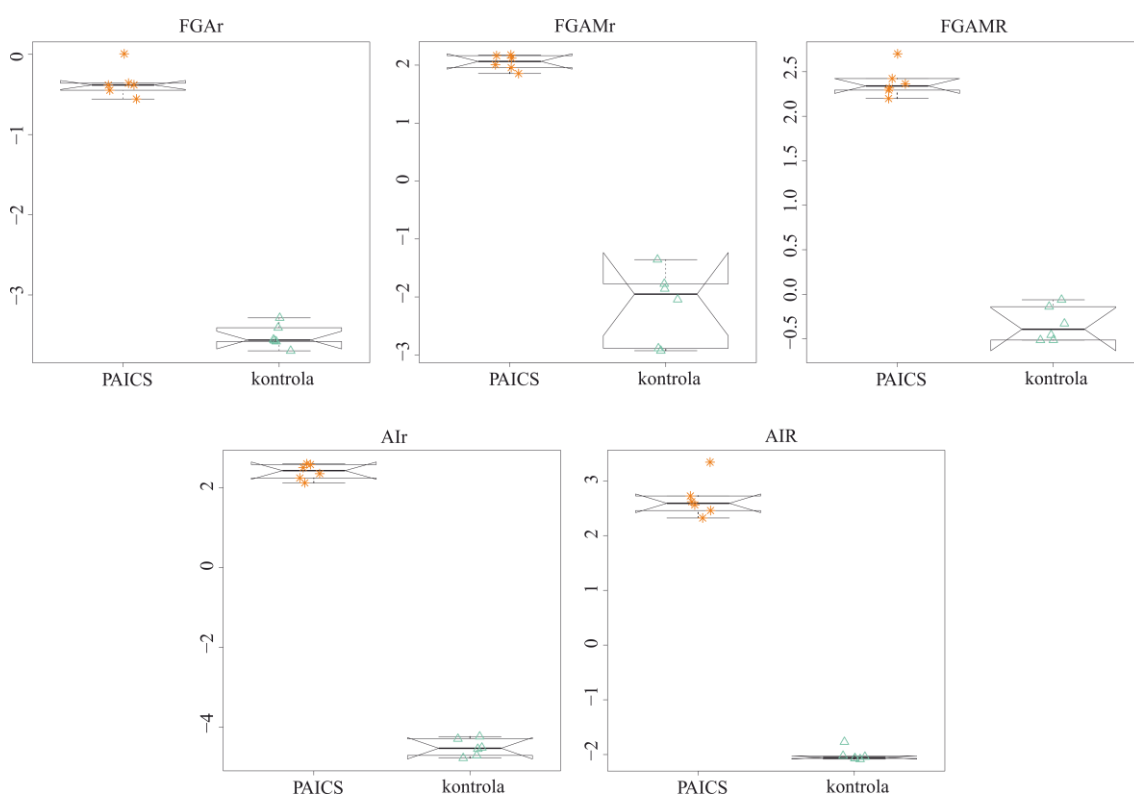
Tab. 6 Dvacet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA VIP grafu u defektní linie PAICS v porovnávání s kontrolou. V posledních dvou sloupcích tabulky jsou výsledky náležící k vulkánovým grafům.

	RT (min)	naměřená MI	teoretická MI	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	3,74	215,0908	215,0906	Alr	4,32	0,07	6,96	7,23 E-14
2	7,80	295,0575	295,0569	AIR	3,54	0,06	4,64	6,53 E-08
3	4,05	173,0701	-	neurčeno	3,44	0,06	4,41	3,74 E-07
4	4,15	233,1016	233,1012	FGAMr	3,33	0,06	4,01	9,72 E-06
5	8,49	715,1900	-	neurčeno	3,13	0,05	3,62	2,58 E-12
6	3,58	257,1015	257,1012	5-mC	3,11	0,06	3,69	3,39 E-08
7	3,58	555,3909	-	PC	3,09	0,06	-3,72	2,77 E-08
8	4,31	454,1822	-	neurčeno	3,08	0,07	3,58	4,13 E-08
9	3,81	234,0855	234,0852	FGAr	2,91	0,05	3,18	6,52 E-11
10	7,25	141,0191	-	neurčeno	2,83	0,09	-2,97	7,34 E-06
11	3,66	368,3295	-	neurčeno	2,75	0,03	-3,09	1,33 E-07
12	7,33	313,0682	313,0675	FGAMR	2,70	0,04	2,73	2,60 E-10
13	4,71	328,1392	-	neurčeno	2,70	0,12	3,12	3,66 E-04
14	3,84	539,4194	-	neurčeno	2,60	0,05	2,53	4,32 E-10
15	4,10	377,3046	-	neurčeno	2,47	0,06	-2,36	6,74 E-06
16	4,21	165,0651	165,0651	7-mG	2,41	0,06	-2,41	2,04 E-06
17	4,86	528,3024	-	neurčeno	2,34	0,06	2,00	6,95 E-07
18	3,44	551,3955	551,3951	PC (20:0)	2,27	0,08	-2,07	6,04 E-06
19	4,39	823,5377	823,5363	PS (39:0)	2,24	0,05	-2,04	1,44 E-06
20	5,23	375,1219	-	neurčeno	2,19	0,18	-2,39	5,10 E-03

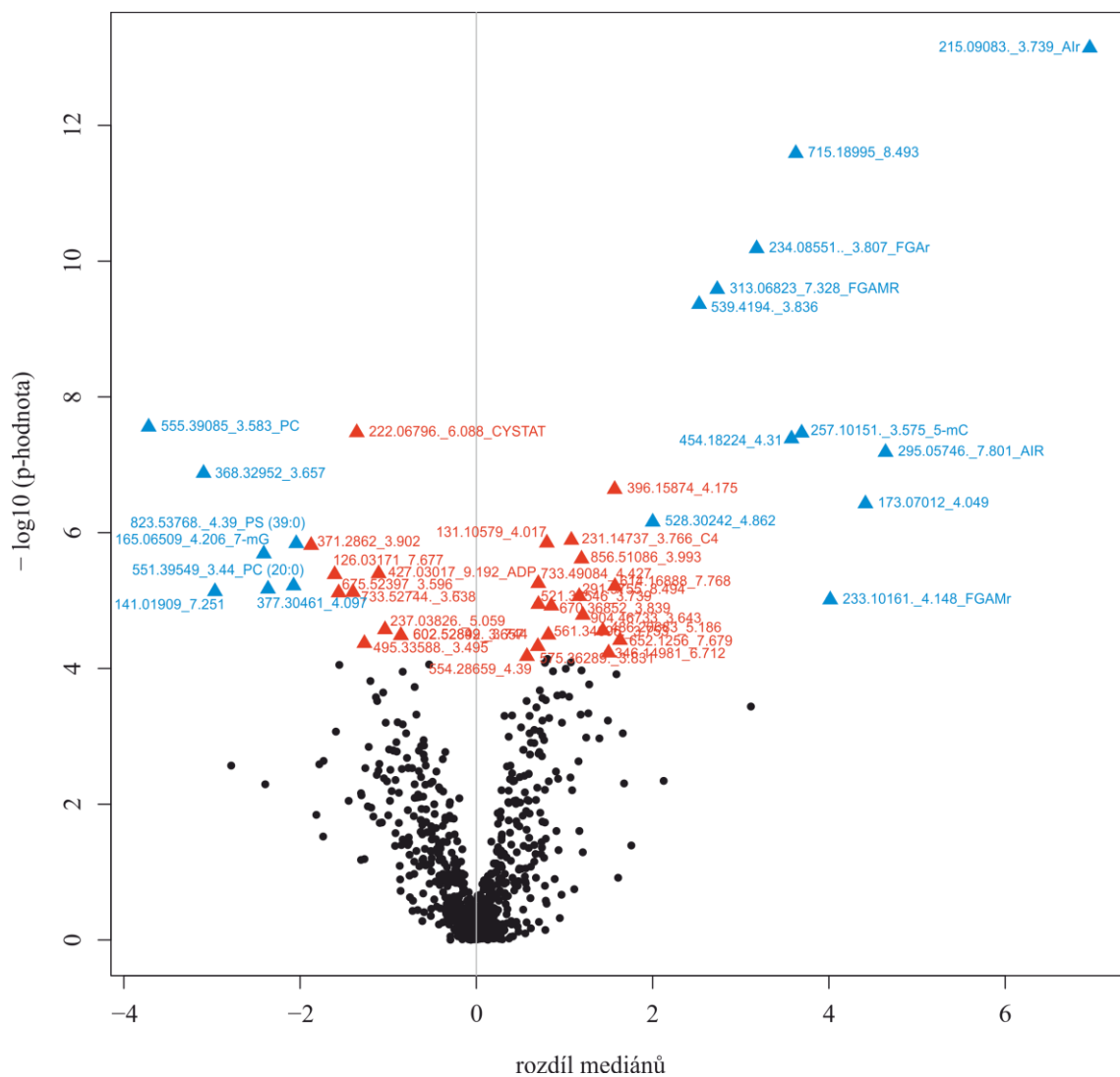
Pozn.: SD – směrodatná odchylka, MI – monoizotopická hmotnost

Z 20 nejvýznamnějších metabolitů VIP grafu metody OPLS-DA bylo v rámci defektní linie PAICS identifikováno 10 metabolitů (Tab. 6). Mezi identifikovanými metabolity byly meziproducty PDNS: ribosid FGAr, N-formylglycinamidinribosid (FGAMr), 5-aminoimidazolribosid (AIr), N-formylglycinamidinribotid (FGAMR) a 5-aminoimidazolribotid (AIR), dále dva PC, jeden PS, 7-mG a modifikovaný pyrimidinový nukleosid 5-metylcytidin (5-mC).

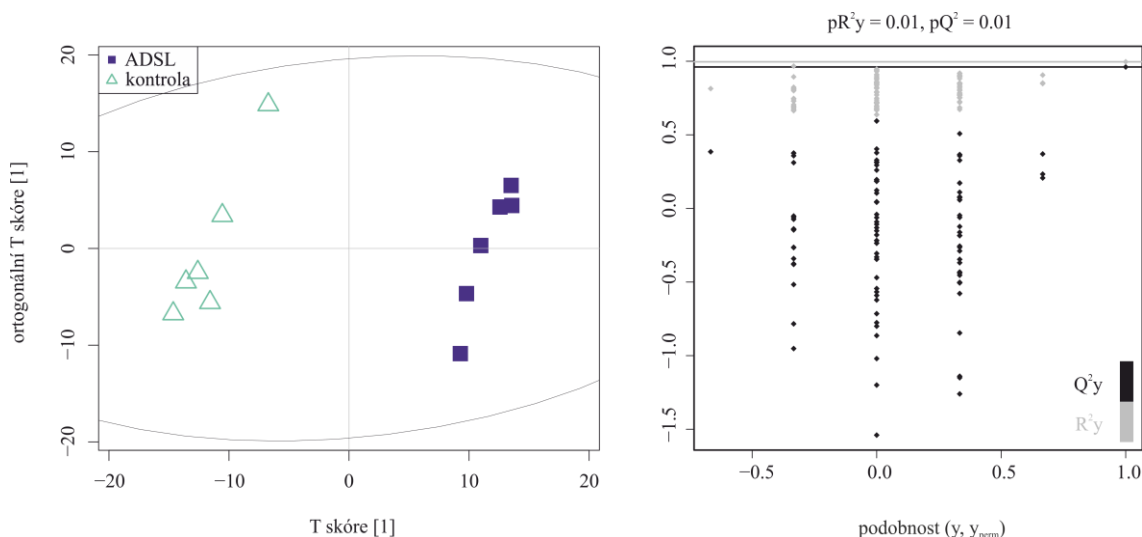
Ribosid FGAr, ribotid FGAMR a jeho ribosid FGAMr, ribotid AIR a jeho ribosid AIr byly zvýšené ve vzorcích defektní linie PAICS oproti vzorkům kontroly (Obr. 23).



Obr. 23 Krabicové grafy meziproductů PDNS – ribosid FGAr, ribotid FGAMR a jeho ribosid FGAMr, ribotid AIR a jeho ribosid AIr.



Obr. 24 Vulkánový graf zobrazující „features“ signifikantní podle p-hodnot a rozdílů mediánů u vzorků defektní linie PAICS vůči kontrole. Modře jsou označeny „features“, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 25 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie ADSL a kontroly s příslušným permutačním testem.

Skórový graf metody OPLS-DA zobrazuje rozdělení 12 vzorků do 2 skupin: defektní linie ADSL a kontroly. Správnost rozdělení vzorků bylo ověřeno permutačním testem (Obr. 25).

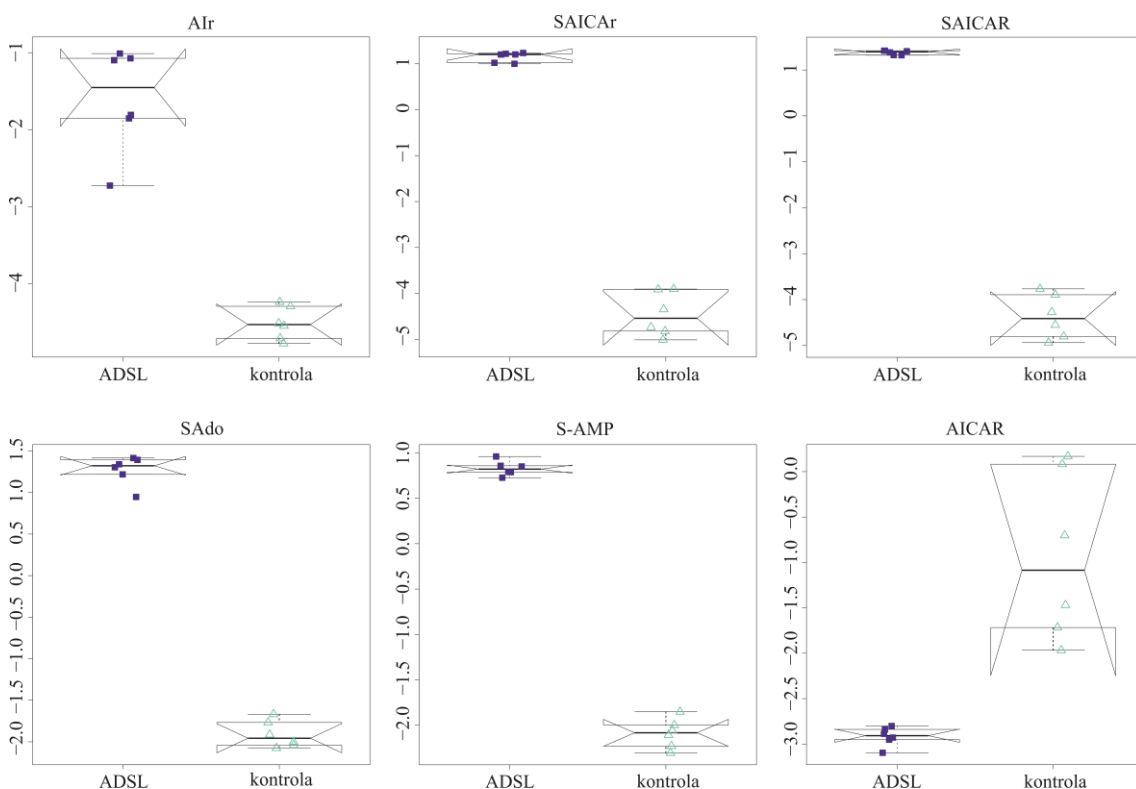
Tab. 7 Dvacet nejvýznamnějších „features“ OPLS-DA VIP grafu u defektní linie ADSL v porovnání s kontrolou. V posledních dvou sloupcích tabulky jsou výsledky náležící k vulkánovým grafům.

	RT (min)	naměřená MI	teoretická MI	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	9,44	454,0744	454,0737	SAICAR	3,84	0,12	5,81	7,06 E-07
2	7,76	374,1079	374,1074	SAICAr	3,79	0,12	5,74	3,72 E-07
3	3,58	555,3909	-	PC	3,03	0,08	-3,52	1,21 E-08
4	7,76	383,1079	383,1077	SAdo	2,86	0,07	3,28	1,72 E-11
5	9,43	463,0745	463,0740	S-AMP	2,75	0,07	2,90	8,90 E-10
6	3,74	215,0908	215,0906	AIr	2,70	0,12	3,08	5,20 E-05
7	3,66	368,3295	-	neurčeno	2,56	0,04	-2,74	9,93 E-07
8	5,23	375,1219	-	neurčeno	2,47	0,10	-2,54	2,37 E-03
9	3,76	564,5127	-	neurčeno	2,42	0,06	-2,32	1,47 E-06
10	6,00	287,0681	-	neurčeno	2,33	0,04	2,49	2,01 E-05
11	4,21	165,0651	165,0651	7-mG	2,33	0,06	-1,52	4,72 E-06
12	3,44	551,3955	551,3951	PC (20:0)	2,29	0,08	-2,12	7,69 E-06
13	6,03	379,1599	-	neurčeno	2,23	0,09	2,56	3,37 E-04
14	4,39	823,5377	823,5363	PS (39:0)	2,22	0,05	-2,23	1,57 E-06
15	4,06	538,2708	-	neurčeno	2,17	0,05	1,83	8,58 E-05
16	3,64	904,4673	-	neurčeno	2,16	0,06	1,82	6,79 E-07
17	7,78	338,0632	338,0628	AICAR	2,16	0,08	-1,82	3,16 E-03
18	5,00	149,0064	-	neurčeno	2,16	0,13	2,56	3,20 E-03
19	3,47	509,3853	509,3845	PC (18:0)	2,14	0,07	-1,89	9,40 E-07
20	4,10	377,3046	-	neurčeno	2,13	0,07	-1,82	1,59 E-06

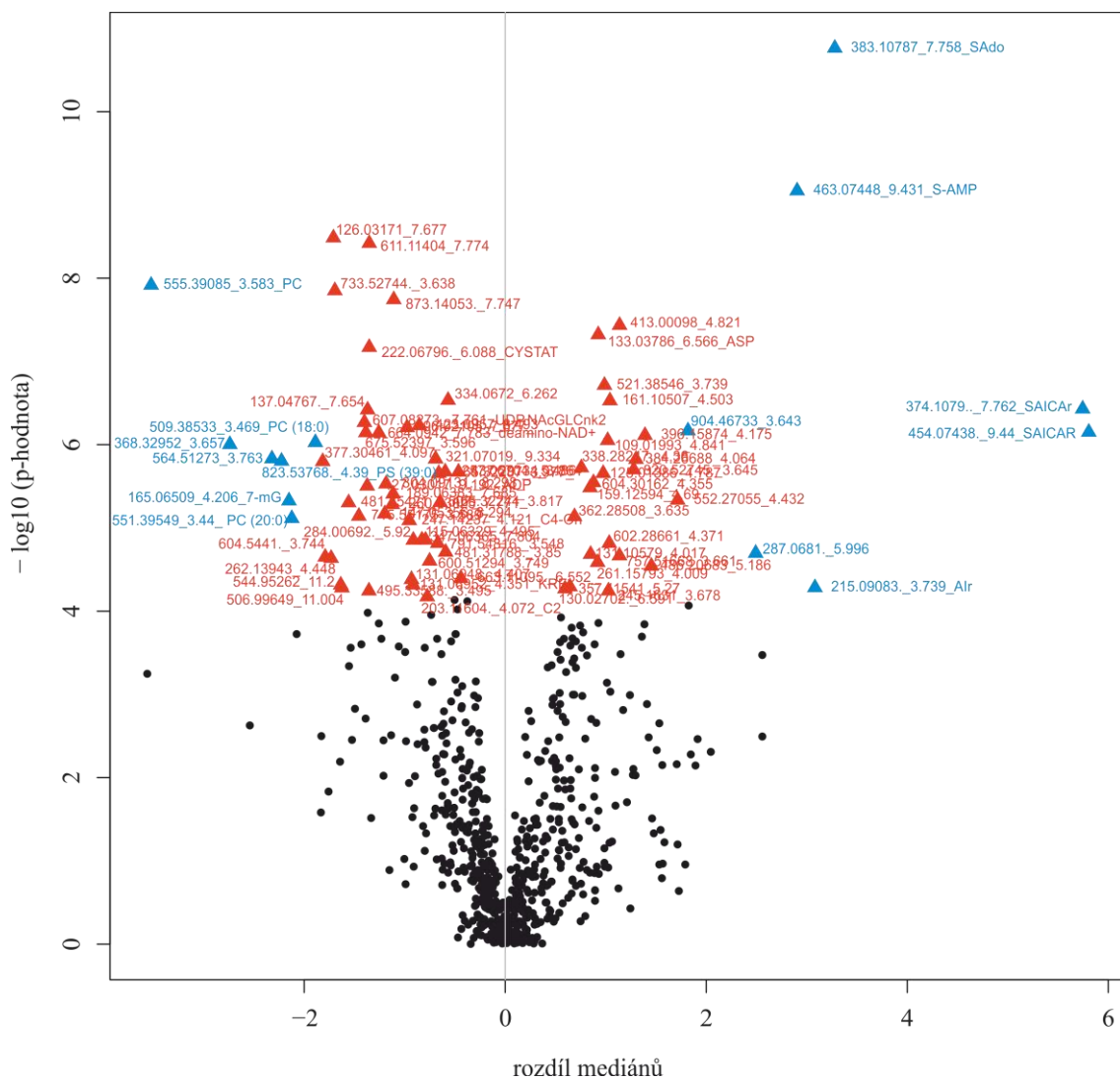
Pozn.: SD – směrodatná odchylka, MI – monoizotopická hmotnost

Z prvních dvaceti „features“ OPLS-DA VIP grafu bylo u defektní linie ADSL identifikováno 11 metabolitů (Tab. 7). Jednalo se o tři PC, jeden PS, 7-mG a meziprodukty PDNS – ribosid AIr, 5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)-ribosid (SAICAr), sukcinyladenosin (SAdo), 5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)-ribotid (SAICAR), adenylylsukcinát (S-AMP) a AICAR.

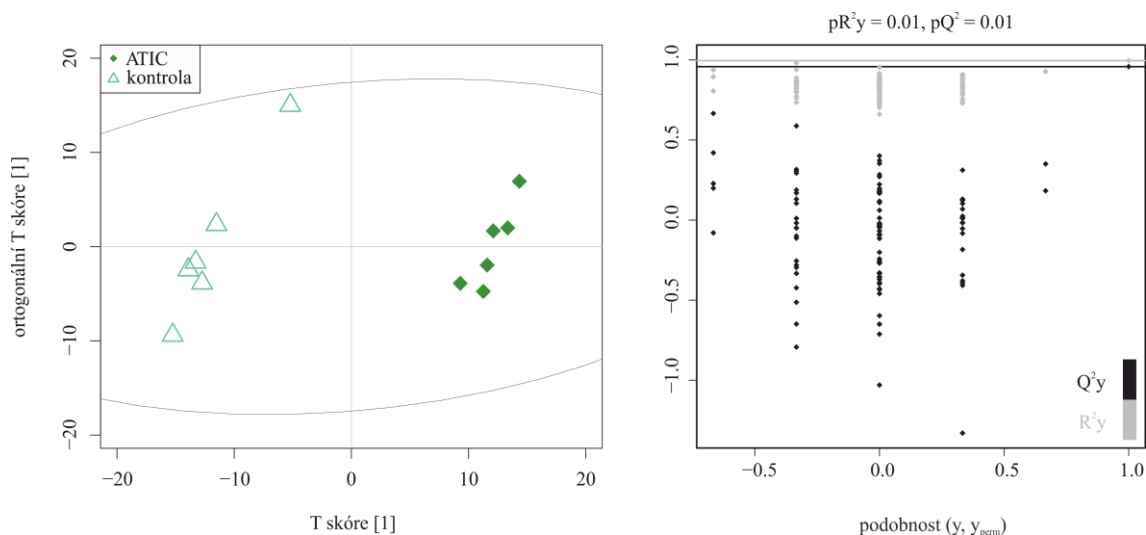
Ribosidy AIr a SAICAr, ribotid SAICAR, ribosid SAdo a jeho ribotid S-AMP byly ve vzorcích defektní linie ADSL oproti kontrole zvýšené. Naopak ribotid AICAR měl u vzorků tohoto defektu sníženou hladinu v porovnání s kontrolou (Obr. 26).



Obr. 26 Krabicové grafy meziproduktů PDNS – ribosidy AIr a SAICAr, ribotid SAICAR, ribosid SAdo a jeho ribotid S-AMP, a ribotid AICAR.



Obr. 27 Vulkánový graf zobrazující „features“ signifikantní podle p-hodnot a rozdílů mediánů u vzorků defektní linie ADSL vůči kontrole. Modře jsou označeny „features“, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími u OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 28 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie ATIC a kontroly s příslušným permutačním testem.

Metodou OPLS-DA byly vzorky rozděleny do skupin defektní linie ATIC a kontroly. Správnost separace vzorků byla ověřena pomocí permutačního testu (Obr. 28).

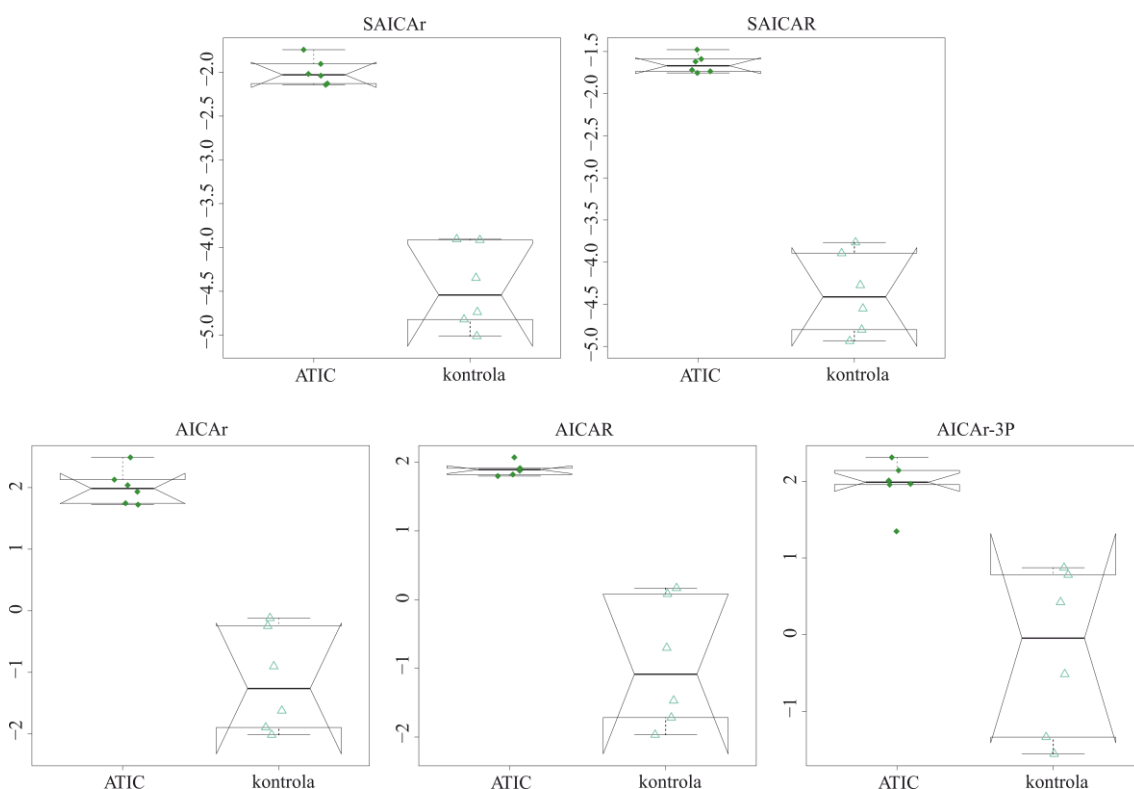
Tab. 8 Dvacet nejvýznamnějších „features“ OPLS-DA VIP grafu metody OPLS-DA u defektní linie ATIC v porovnání s kontrolou. V posledních dvou sloupcích tabulky jsou výsledky náležící k vulkánovým grafům.

	RT (min)	naměřená MI	teoretická MI	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	3,58	555,3909	-	PC	3,01	0,08	-3,75	2,80 E-07
2	6,09	222,0680	222,0674	L-cystathionin	2,96	0,07	-3,75	1,22 E-07
3	6,03	379,1599	-	neurčeno	2,78	0,03	3,57	2,52 E-05
4	3,91	258,0966	258,0964	AICAr	2,68	0,12	3,25	1,07 E-04
5	3,66	368,3295	-	neurčeno	2,59	0,05	-3,00	3,10 E-07
6	9,44	454,0744	454,0737	SAICAR	2,54	0,09	2,74	1,91 E-05
7	7,78	338,0632	338,0628	AICAR	2,52	0,13	2,98	6,19 E-04
8	4,18	396,1587	-	neurčeno	2,41	0,08	2,53	2,06 E-07
9	7,76	374,1079	374,1074	SAICAr	2,41	0,09	2,51	1,95 E-05
10	5,56	217,1069	217,1063	ALA-GLN	2,39	0,06	2,78	1,48 E-05
11	4,21	165,0651	165,0651	7-mG	2,36	0,07	-2,43	1,28 E-05
12	3,48	142,1106	-	neurčeno	2,33	0,11	-2,68	8,13 E-05
13	5,00	149,0064	-	neurčeno	2,31	0,09	2,77	4,04 E-04
14	4,05	179,0793	-	neurčeno	2,27	0,08	2,56	4,04 E-04
15	3,84	539,4194	-	neurčeno	2,27	0,07	2,10	3,06 E-05
16	4,39	823,5377	823,5363	PS (39:0)	2,17	0,03	-2,03	2,71 E-06
17	4,10	377,3046	-	neurčeno	2,17	0,07	-1,95	2,57 E-06
18	7,78	664,0942	664,0931	deamino- NAD ⁺	2,16	0,06	-1,88	6,77 E-07
19	6,15	308,1226	-	neurčeno	2,13	0,08	2,32	6,68 E-04
20	10,81	497,9963	497,9954	AICAr-3P	2,10	0,16	2,03	3,21 E-03

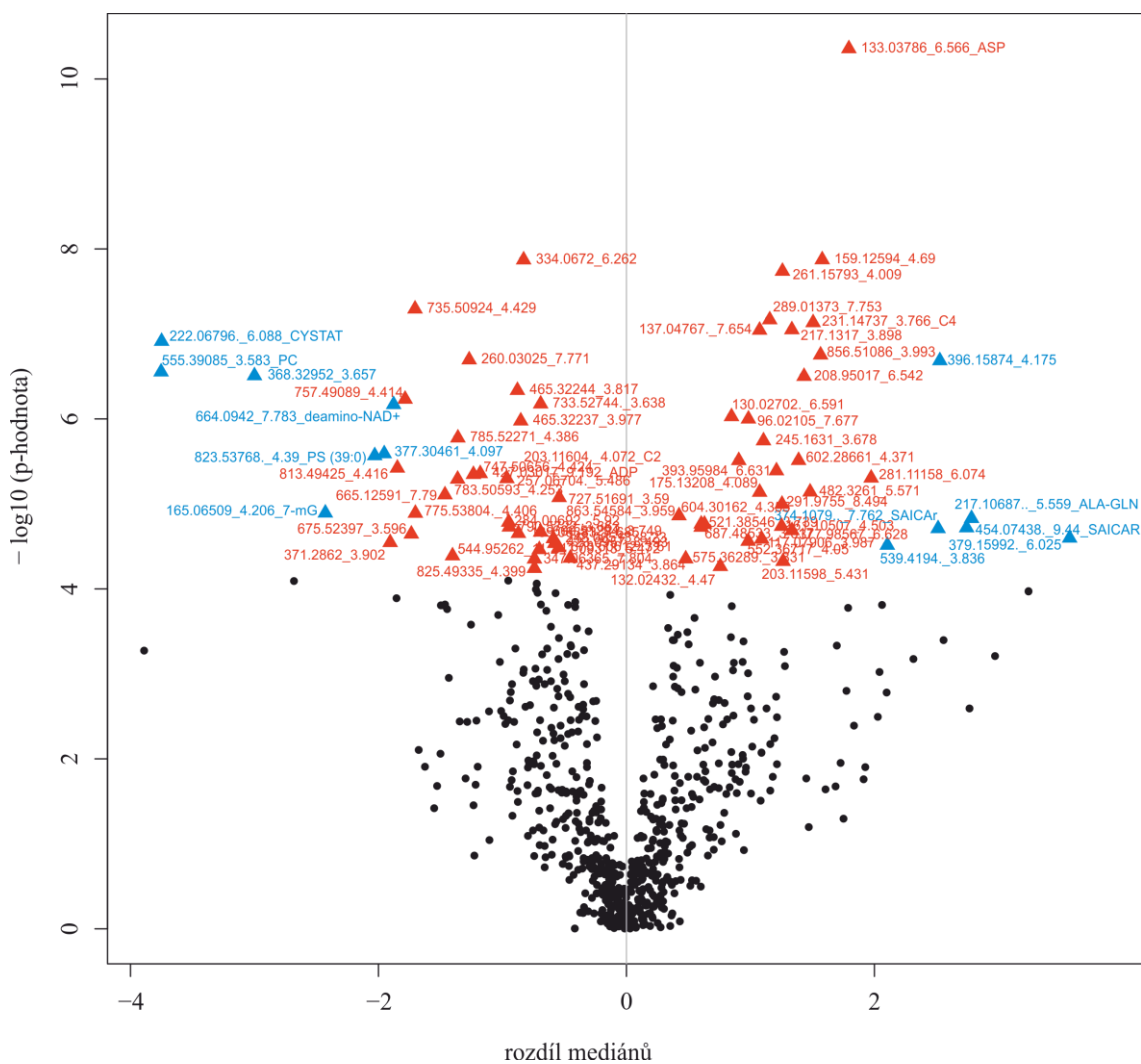
Pozn.: SD – směrodatná odchylka, MI – monoizotopická hmotnost

Z 20 nejvýznamnějších „features“ VIP grafu metody OPLS-DA bylo v rámci defektní linie ATIC identifikováno 11 metabolitů (Tab. 8). K identifikovaným metabolitům patřily: jeden PC, jeden PS, ALA-GLN, 7-mG, L-cystathionin, deamino-NAD⁺ a meziproducty PDNS: ribosidy SAICAr a AICAr, ribotidy SAICAR a AICAR, a trifosfátový analog 5-aminoimidazol-4-karboxyamidribosidu (AICAr-3P).

Ribosid SAICAr a jeho ribotid SAICAR, ribosid AICAr a jeho ribotid AICAR a AICAr-3P měly ve vzorcích defektní linie ATIC zvýšenou hladinu v porovnání se vzorky kontroly (Obr. 29).



Obr. 29 Krabicové grafy meziproductů PDNS – ribosid SAICAr a jeho ribotid SAICAR, ribosid AICAr a jeho ribotid AICAR a trifosfátový analog AICAr-3P.



Obr. 30 Vulkánový graf zobrazující „features“ signifikantní podle p-hodnot a rozdílů mediánů u vzorků defektní linie ATIC vůči kontrole. Modře jsou označeny „features“, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.

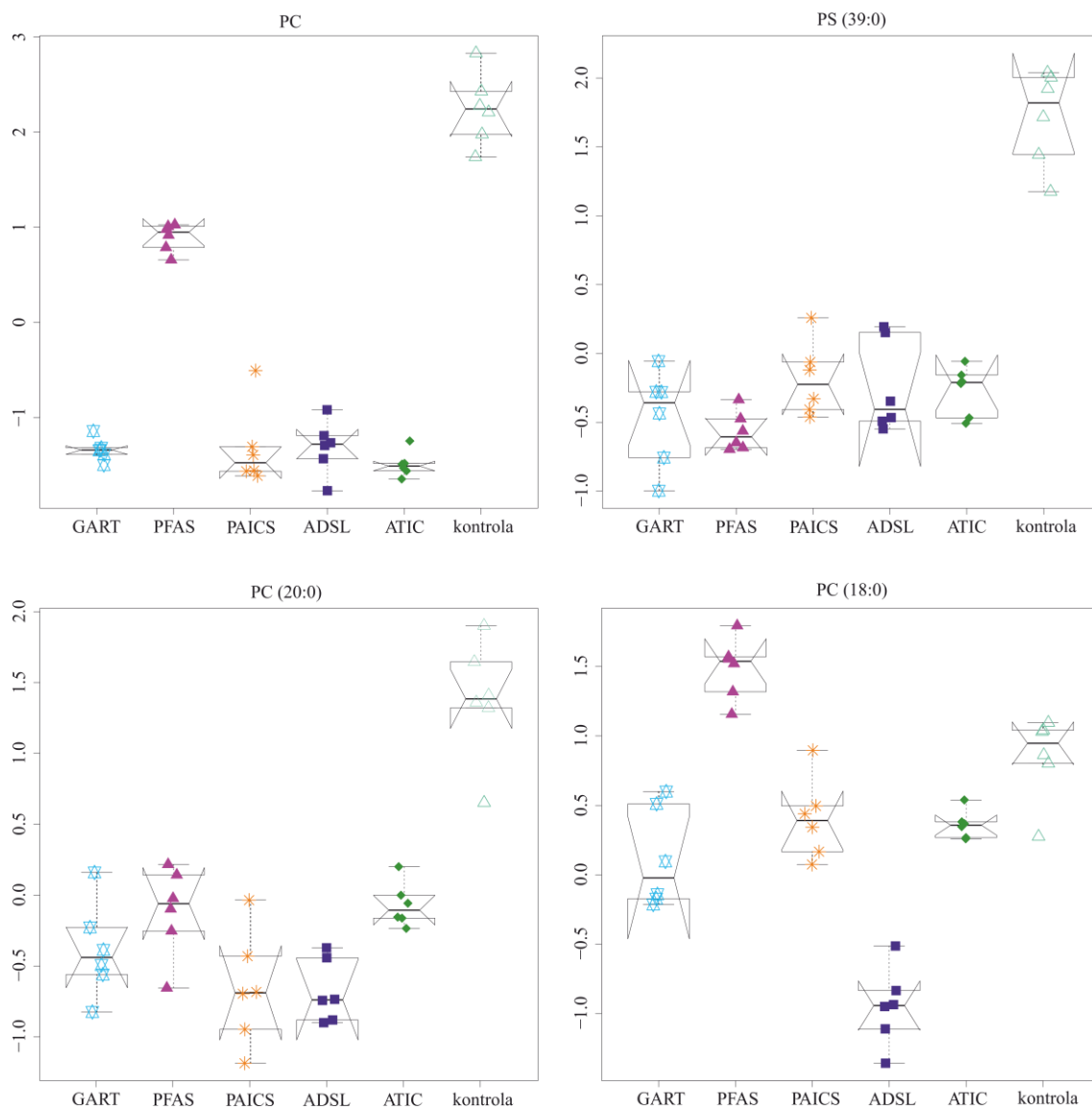
V tabulkách 20 nejvýznamnějších „features“ VIP grafů metody OPLS-DA se u některých defektních linií vyskytovaly dle identifikace také lipidy. Jednalo se zejména o fosfolipidy. Informace o těchto látkách jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 9) a jejich hladiny v příslušných liniích jsou znázorněny pomocí krabicových grafů (Obr. 31).

Tab. 9 Souhrn lipidů, které se vyskytovaly v tabulkách 20 nejvýznamnějších „features“ OPLS-DA VIP grafů u všech defektních linií v porovnání s kontrolou.

identifikace	sumární vzorec	RT (min)	naměřená MI	teoretická MI	chyba (ppm)
PC	C27H59NO8P	3,58	555,3909	-	-
PS (39:0)	C45H77NO10P	4,39	823,5377	823,5363	1,68
PC (20:0)	C28H58NO7P	3,44	551,3955	551,3951	0,71
PC (18:0)	C28H58NO7P	3,47	509,3853	509,3845	1,63

Pozn.: MI – monoizotopická hmotnost

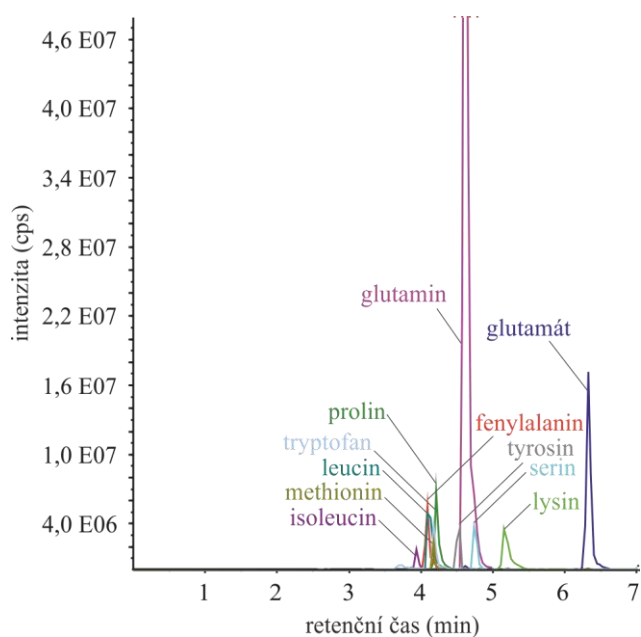
PC s blíže neurčenou délkou řetězce měl podle krabicového grafu zvýšenou hladinu u vzorků defektní linie PFAS a kontroly. Hladiny PS (39:0) a PC (20:0) byly výrazně zvýšeny pouze v kontrolních vzorcích. PC (18:0) vykazoval zvýšenou hladinu u vzorků defektní linie PFAS a kontroly, naopak u vzorků defektní linie ADSL byla zaznamenána snížená hladina vůči všem ostatním vzorkům (Obr. 31).



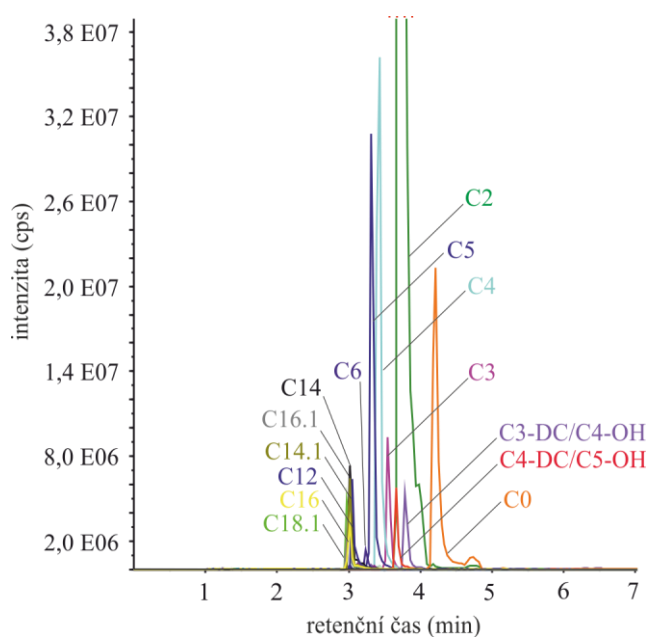
Obr. 31 Krabicové grafy lipidů, které se opakovaně vyskytovaly mezi 20 nejvýznamnějšími „features“ OPLS-DA VIP grafů všech defektních linií (viz Tab. 9).

4.2 Cílená metabolická analýza HeLa buněčných linií

Pomocí cílené metabolické analýzy bylo ve vzorcích buněčných linií identifikováno celkem 214 metabolitů, které náležely do různých skupin: aminokyseliny (Obr. 32), acylkarnitiny (Obr. 33), organické kyseliny, sacharidy, puriny, pyrimidiny, aminy, peptidy a další.



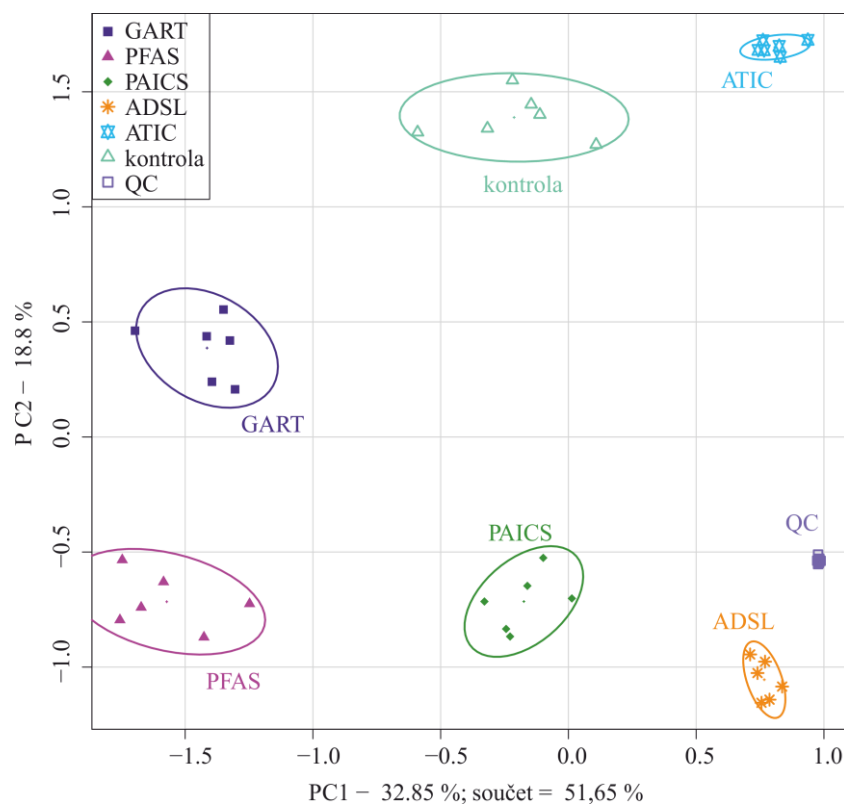
Obr. 32 Chromatogram zobrazující dělení aminokyselin v rámci cílené metabolické analýzy.



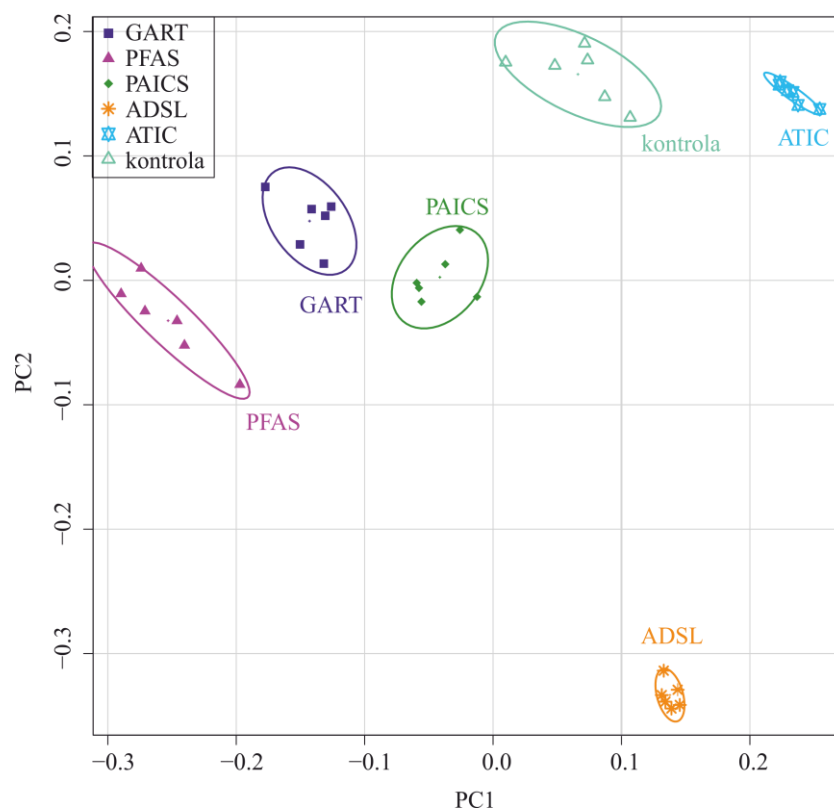
Obr. 33 Chromatogram zobrazující dělení acylkarnitinů v rámci cílené metabolické metody. Seznam zkratk metabolitů je uveden jako příloha v kapitole 9.1.

4.2.1 Statistická analýza všech linií

Nesupervizovanou metodou PCA byly všechny vzorky rozděleny do jednotlivých skupin defektních linií GART, PFAS, PAICS, ADSL, ATIC a kontroly. Došlo k separaci všech vzorků do příslušných skupin bez překryvů (Obr. 34).



Obr. 34 PCA analýza metabolického profilu vzorků HeLa buněčných linií, které byly získány cíleným přístupem. Barevné body odpovídají jednotlivým vzorkům rozděleným do skupin defektních linií a kontroly. V grafu jsou zobrazeny i QC vzorky znázorňující reprezentativnost měření.



Obr. 35 PLS-DA analýza vzorků HeLa buněčných linií cíleného přístupu. Barevné body odpovídají jednotlivým vzorkům, rozděleným do skupin defektních linií a kontroly.

Výsledek supervizované metody PLS-DA potvrdil výstup metody PCA. Došlo k oddělení vzorků do skupin defektních linií GART, PFAS, PAICS, ADSL a ATIC a kontroly (Obr. 35).

4.2.2 Statistická analýza jednotlivých defektních linií

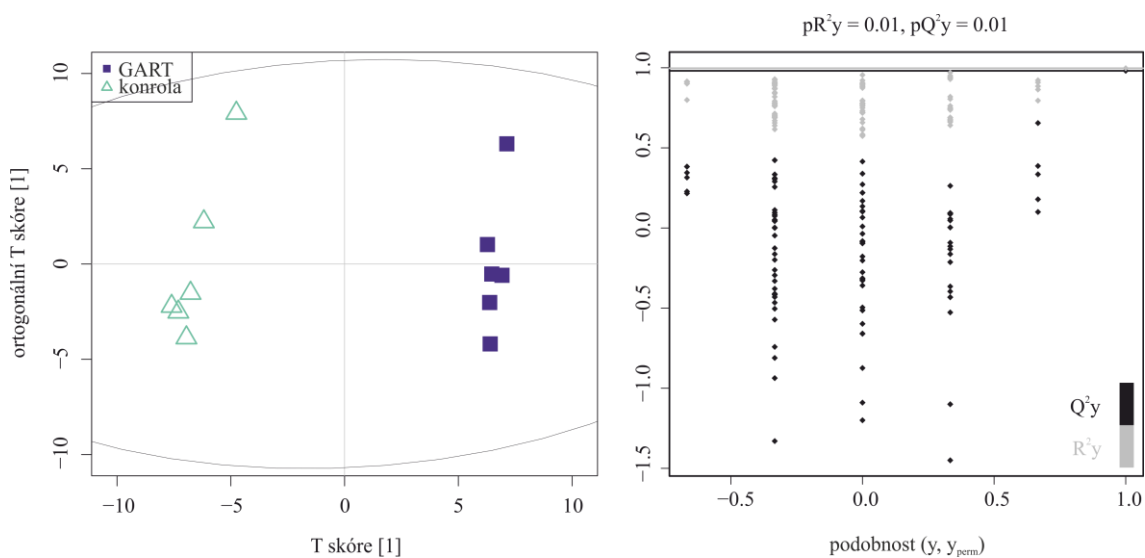
Stejně jako u necíleného přístupu byly u cílené metabolické analýzy vzorky jednotlivých defektů vyhodnoceny nezávisle na sobě metodou OPLS-DA s grafickou reprezentací skórových grafů, které byly ověřeny permutačními testy (Obr. 36, 38, 40, 42 a 44). Statistická významnost permutačních testů byla ověřena pomocí p-hodnot parametrů R^2y a Q^2y (Tab. 10).

Tab. 10 Souhrn parametrů permutačního testu s příslušnými p-hodnotami z t-testu.

defektní linie	R^2y	Q^2y	p-hodnota R^2y	p-hodnota Q^2y
GART	0,997	0,981	0,01	0,01
PFAS	0,999	0,986	0,01	0,01
PAICS	0,996	0,980	0,02	0,02
ADSL	0,997	0,990	0,02	0,02
ATIC	0,994	0,975	0,01	0,01

Pomocí OPLS-DA VIP grafů bylo u každé defektní linie v porovnání s kontrolou určeno 20 nejvýznamnějších metabolitů, které byly s příslušnými parametry shrnuty do tabulek (Tab. 11 – 15). Vzorky defektních linií byly podrobeny také jednorozměrné statistické analýze. Výsledky byly vizualizovány pomocí vulkánových grafů. Hladina významnosti ($\alpha = 2.34 \text{ E-}04$) byla u vulkánových grafů korigována na počet metabolitů – 214 (Bonferroniho korekce). Dvacet nejvýznamnějších metabolitů VIP grafů bylo v rámci defektů porovnáváno s významnými metabolity vulkánového grafu. Shody byly v grafech barevně vyznačeny (Obr. 37, 39, 41, 43 a 45).

Metodou OPLS-DA došlo k oddělení vzorků defektní linie GART a kontroly. Rozdělení vzorků bylo ověřeno pomocí permutačního testu (Obr. 36).



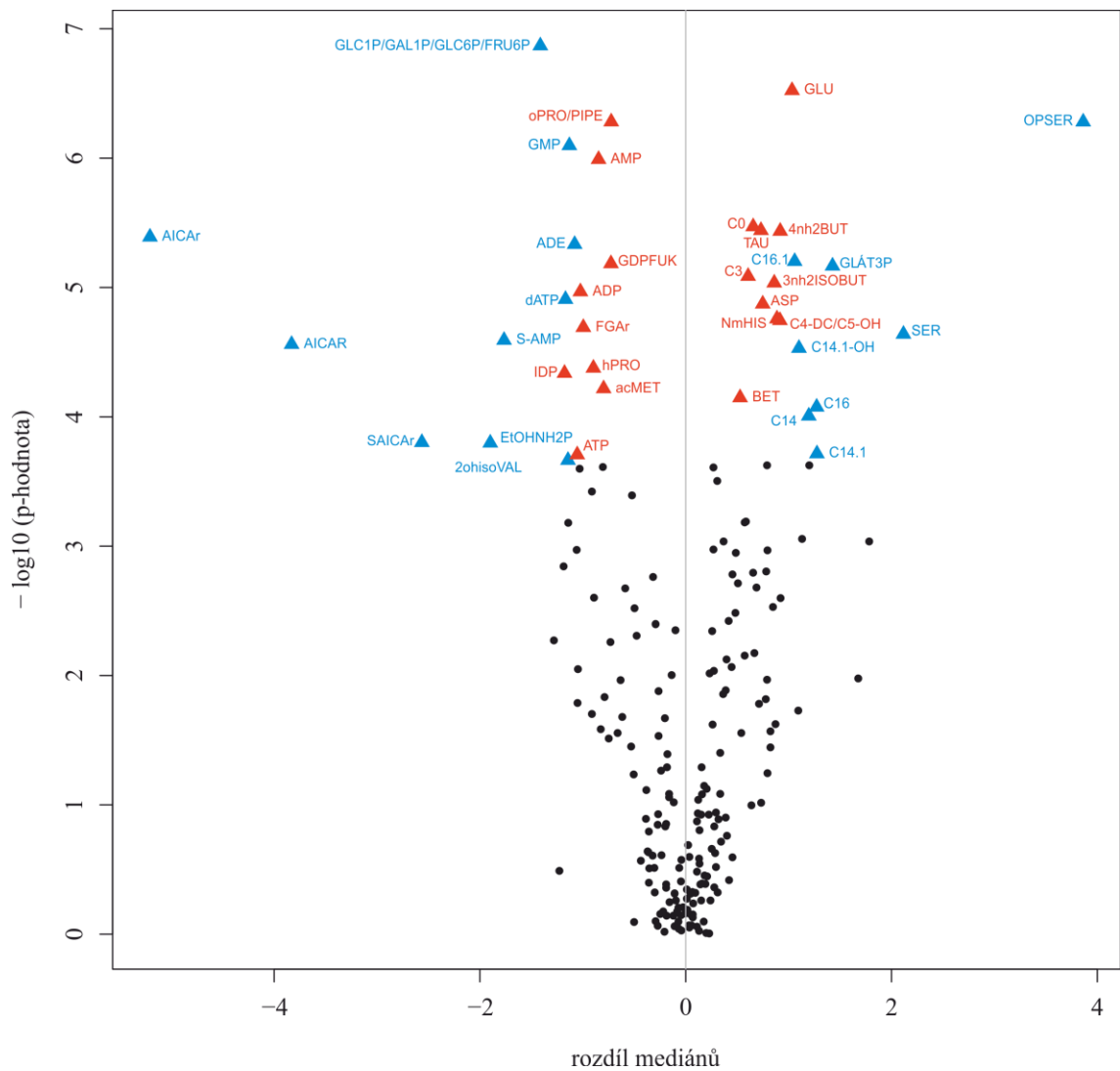
Obr. 36 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie GART a kontroly s příslušným permutačním testem.

Tab. 11 Dvacet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA VIP grafu u defektní linie GART porovnávané s kontrolou. Seznam zkratk metabolitů je uveden jako příloha v kapitole 9.1. V posledním sloupci tabulky je výsledek náležící k vulkánovým grafům.

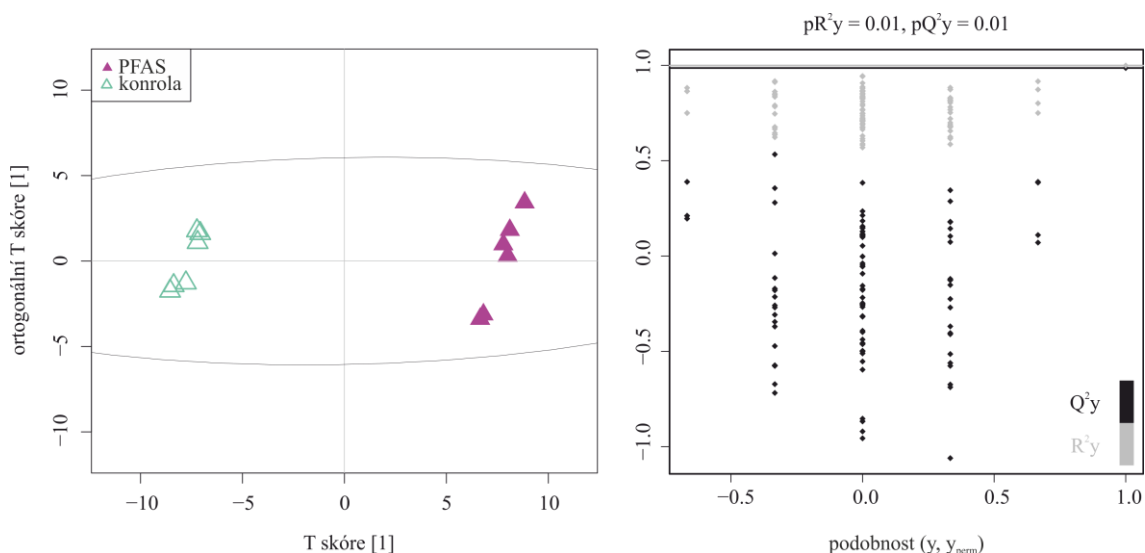
	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	AICAr	3,49	0,08	-5,21	4,07 E-06
2	OPSER	2,98	0,07	3,86	5,25 E-07
3	AICAR	2,91	0,10	-3,83	2,75 E-05
4	SAICAr	2,23	0,12	-2,56	1,58 E-04
5	SER	2,09	0,07	2,12	2,29 E-05
6	EtOHNH2P	2,08	0,06	-1,90	1,59 E-04
7	S-AMP	1,99	0,06	-1,77	2,56 E-05
8	NAcPut	1,84	0,12	1,79	9,23 E-04
9	GLC1P/GAL1P/GLC6P/FRU6P	1,80	0,03	-1,41	1,35 E-07
10	GLÁT3P	1,76	0,06	1,43	6,82 E-06
11	C22.1	1,68	0,20	1,68	1,05 E-02
12	2ohisoVAL	1,64	0,05	-1,14	2,17 E-04
13	dATP	1,63	0,04	-1,17	1,23 E-05
14	C16	1,60	0,08	1,27	8,40 E-05
15	C14.1	1,60	0,08	1,28	1,93 E-04
16	ADE	1,58	0,03	-1,08	4,64 E-06
17	C14	1,57	0,09	1,20	9,85 E-05
18	C14.1-OH	1,56	0,05	1,10	2,95 E-05
19	C16.1	1,56	0,06	1,13	8,78 E-04
20	GMP	1,56	0,03	-1,13	7,99 E-07

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Na základě VIP grafu metody OPLS-DA bylo reprezentováno 20 nejvýznamnějších metabolitů ve vzorcích defektní linie GART (Tab. 11). Mezi tyto metabolity patřily meziprodukty a produkty purinového metabolismu (včetně meziproduktů PDNS), nasycené, nenasycené a hydroxylované acylkarnitiny s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem, dále látky z metabolismu fosfolipidů, aminokyselin a monosacharidů.



Obr. 37 Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie GART v porovnání s kontrolou. Modře jsou označeny metabolity, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 38 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie PFAS a kontroly s příslušným permutačním testem.

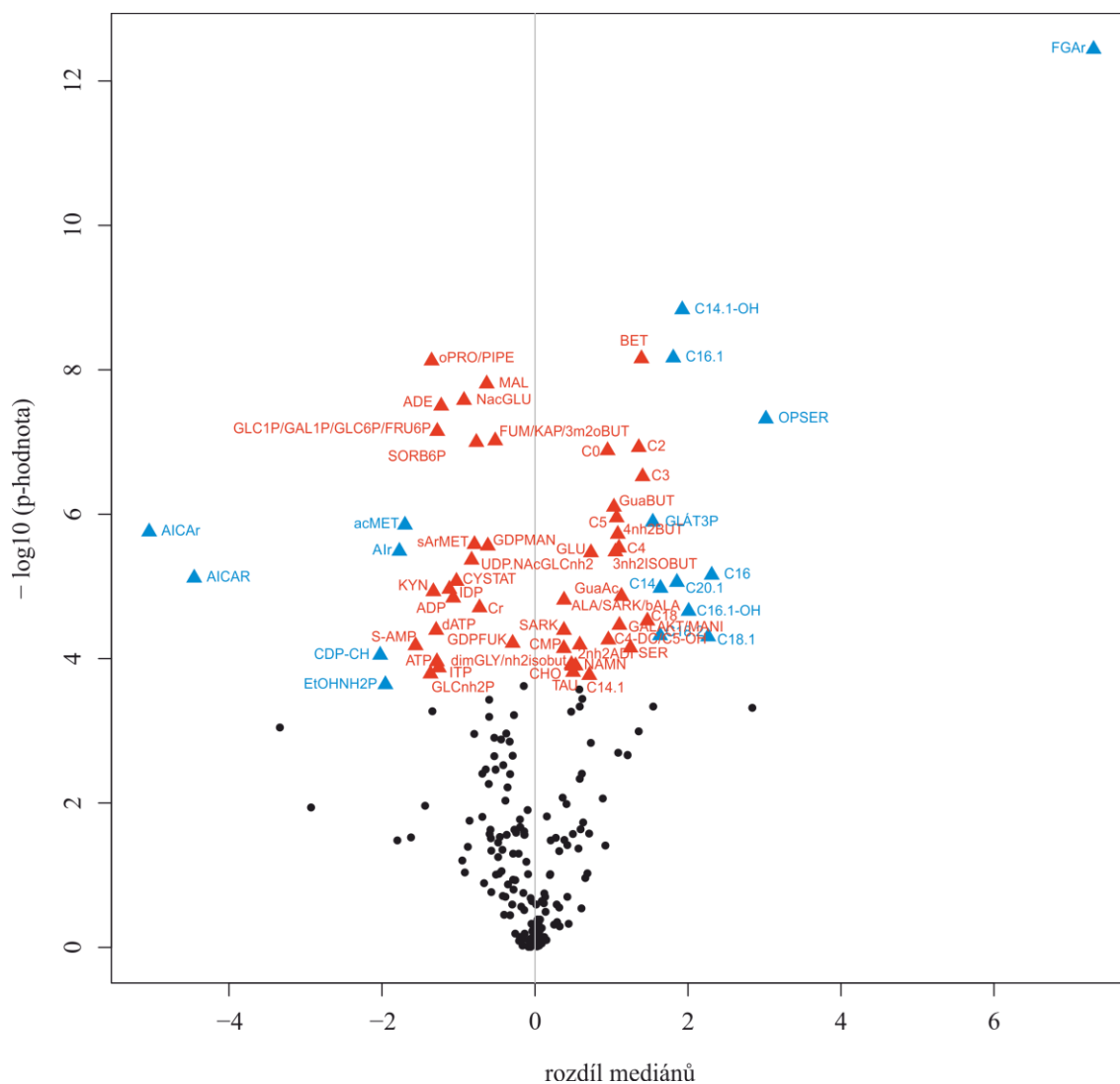
Skórový graf metody OPLS-DA zobrazuje rozdělení 12 vzorků do skupiny defektní linie PFAS a kontroly. Správnost oddělení vzorků byla ověřena permutačním testem (Obr. 38).

Tab. 12 Dvacet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA VIP grafu u defektní linie PFAS porovnané s kontrolou. Seznam zkratk metabolitů je uveden jako příloha v kapitole 9.1. V posledním sloupci tabulky je výsledek náležící k vulkánovým grafům.

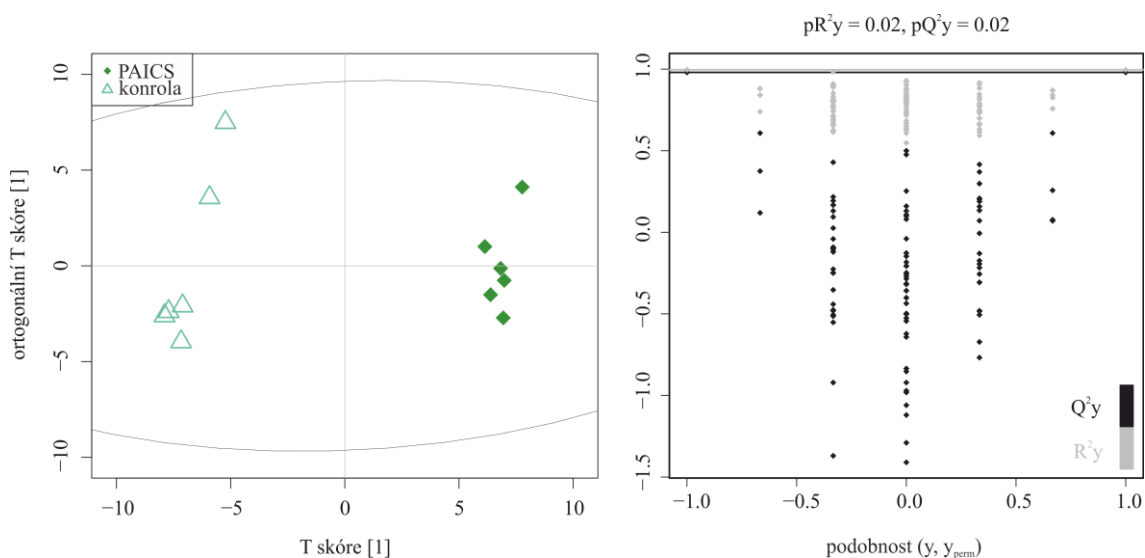
	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	FGAr	3,56	0,04	7,30	3,63 E-13
2	AICAr	2,91	0,07	-5,04	1,75 E-06
3	AICAR	2,73	0,08	-4,46	7,63 E-06
4	C22.1	2,22	0,08	2,85	4,79 E-04
5	OPSER	2,21	0,04	3,02	4,78 E-08
6	SAICAr	2,16	0,12	-3,33	9,02 E-04
7	C18.1	1,91	0,05	2,26	4,97 E-05
8	C16	1,90	0,04	2,31	6,95 E-06
9	C14.1-OH	1,87	0,03	1,92	1,47 E-09
10	EtOHNH2P	1,85	0,04	-1,96	2,28 E-04
11	C16.1-OH	1,83	0,04	2,01	2,20 E-05
12	C16.1	1,79	0,03	1,81	6,81 E-09
13	C20.1	1,77	0,05	1,86	8,74 E-06
14	CDP-CH	1,76	0,07	-2,02	8,92 E-05
15	C18.2	1,73	0,04	1,63	4,80 E-05
16	acMET	1,69	0,04	-1,70	1,41 E-06
17	AIr	1,66	0,06	-1,77	3,24 E-06
18	C14	1,65	0,04	1,64	1,06 E-05
19	PEP	1,61	0,05	1,55	4,64 E-04
20	GLÁT3P	1,61	0,03	1,54	1,28 E-06

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Pomocí VIP grafu metody OPLS-DA bylo reprezentováno 20 nejvýznamnějších metabolitů vyskytujících se ve vzorcích defektní linie PFAS (Tab. 12). Jednalo se o meziproducty metabolismu PDNS, aminokyselin, monosacharidů, fosfolipidů a dále nasycené, nenasycené a hydroxylované acylkarnitiny s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem.



Obr. 39 Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie PFAS v porovnání s kontrolou. Modře jsou označeny metabolity, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 40 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie PAICS a kontroly s příslušným permutačním testem.

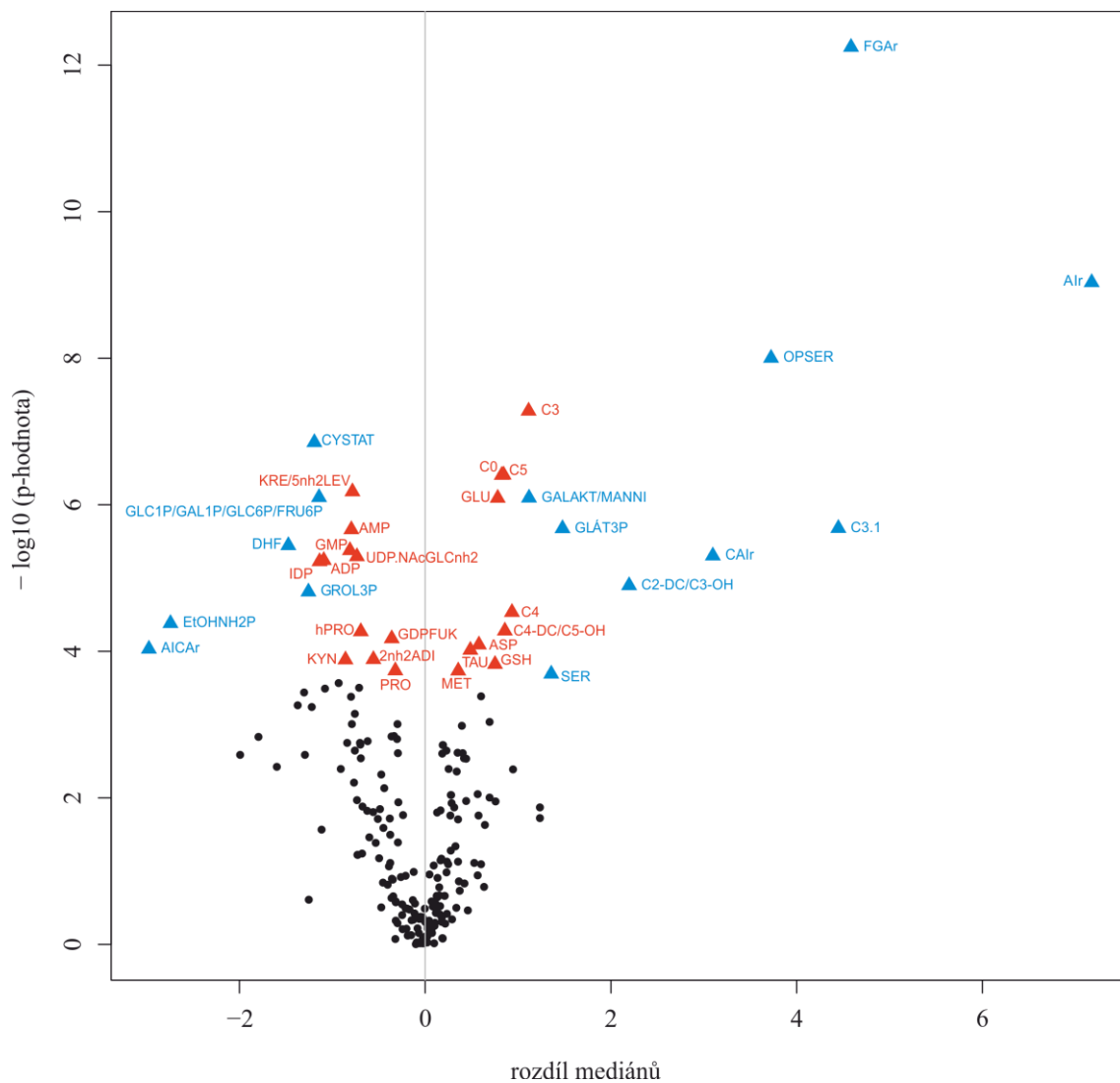
Na základě metody OPLS-DA byly vzorky rozděleny do skupin defektní linie PAICS a kontroly. Správnost separace vzorků byla ověřena pomocí permutačního testu (Obr. 40).

Tab. 13 Dvacet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA VIP grafu u defektní linie PAICS porovnávané s kontrolou. Seznam zkratk metabolitů je uveden jako příloha v kapitole 9.1. V posledním sloupci tabulky je výsledek náležící k vulkánovým grafům.

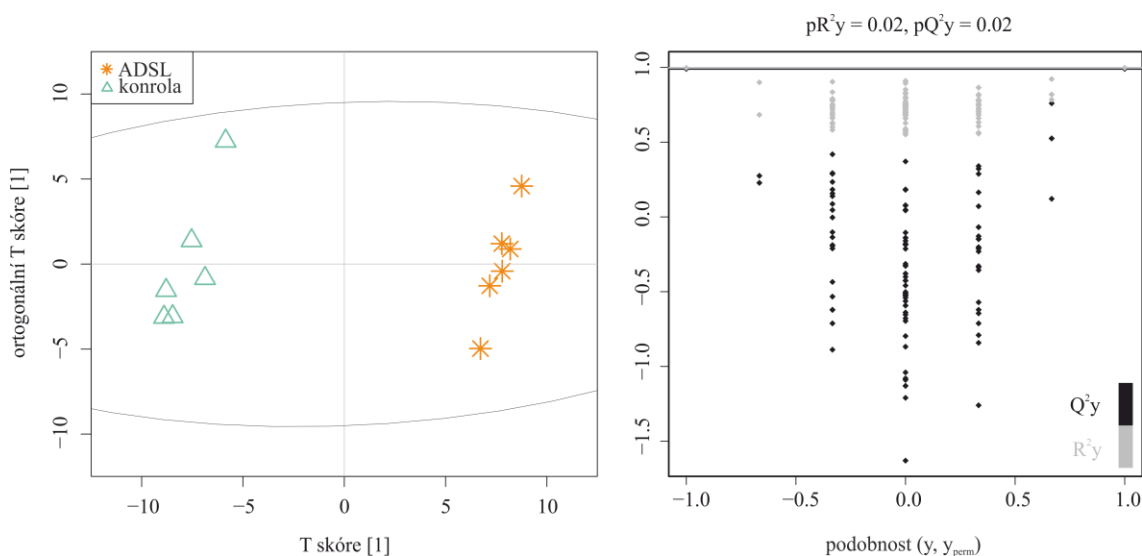
	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	AIr	3,92	0,06	7,18	9,24 E-10
2	FGAr	3,16	0,04	4,59	5,69 E-13
3	C3.1	3,03	0,07	4,45	2,09 E-06
4	OPSER	2,75	0,05	3,72	9,96 E-09
5	CAIr	2,61	0,05	3,10	4,96 E-06
6	EtOHNH2P	2,47	0,05	-2,74	4,15 E-05
7	AICAr	2,46	0,10	-2,98	9,29 E-05
8	C2-DC/C3-OH	2,18	0,03	2,20	1,26 E-05
9	AICAR	1,86	0,14	-1,99	2,60 E-03
10	DHF	1,78	0,05	-1,47	3,59 E-06
11	GLÁT3P	1,76	0,05	1,48	2,10 E-06
12	SAICAr	1,75	0,13	-1,79	1,48 E-03
13	CDP-CH	1,66	0,09	-1,37	5,44 E-04
14	GuaAc	1,64	0,12	-1,59	3,77 E-03
15	GROL3P	1,61	0,04	-1,26	1,54 E-05
16	GALAKT/MANNI	1,60	0,04	1,12	8,05 E-07
17	FUK	1,60	0,13	1,24	1,35 E-02
18	CYSTAT	1,57	0,03	-1,19	1,41 E-07
19	GLC1P/GAL1P/GLC6P/FRU6P	1,57	0,03	-1,14	7,93 E-07
20	SER	1,57	0,07	1,36	2,03 E-04

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Z VIP grafu metody OPLS-DA bylo reprezentováno 20 nejvýznamnějších metabolitů přítomných ve vzorcích defektní linie PAICS (Tab. 13). K těmto metabolitům se řadily: nenasycené a hydroxylované acylkarnitiny s krátkým řetězcem, meziprodukty metabolismu fosfolipidů, monosacharidů, aminokyselin a purinového metabolismu (včetně meziproduktů PDNS).



Obr. 41 Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie PAICS v porovnání s kontrolou. Modře jsou označeny metabolity, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 42 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie ADSL a kontroly s příslušným permutačním testem.

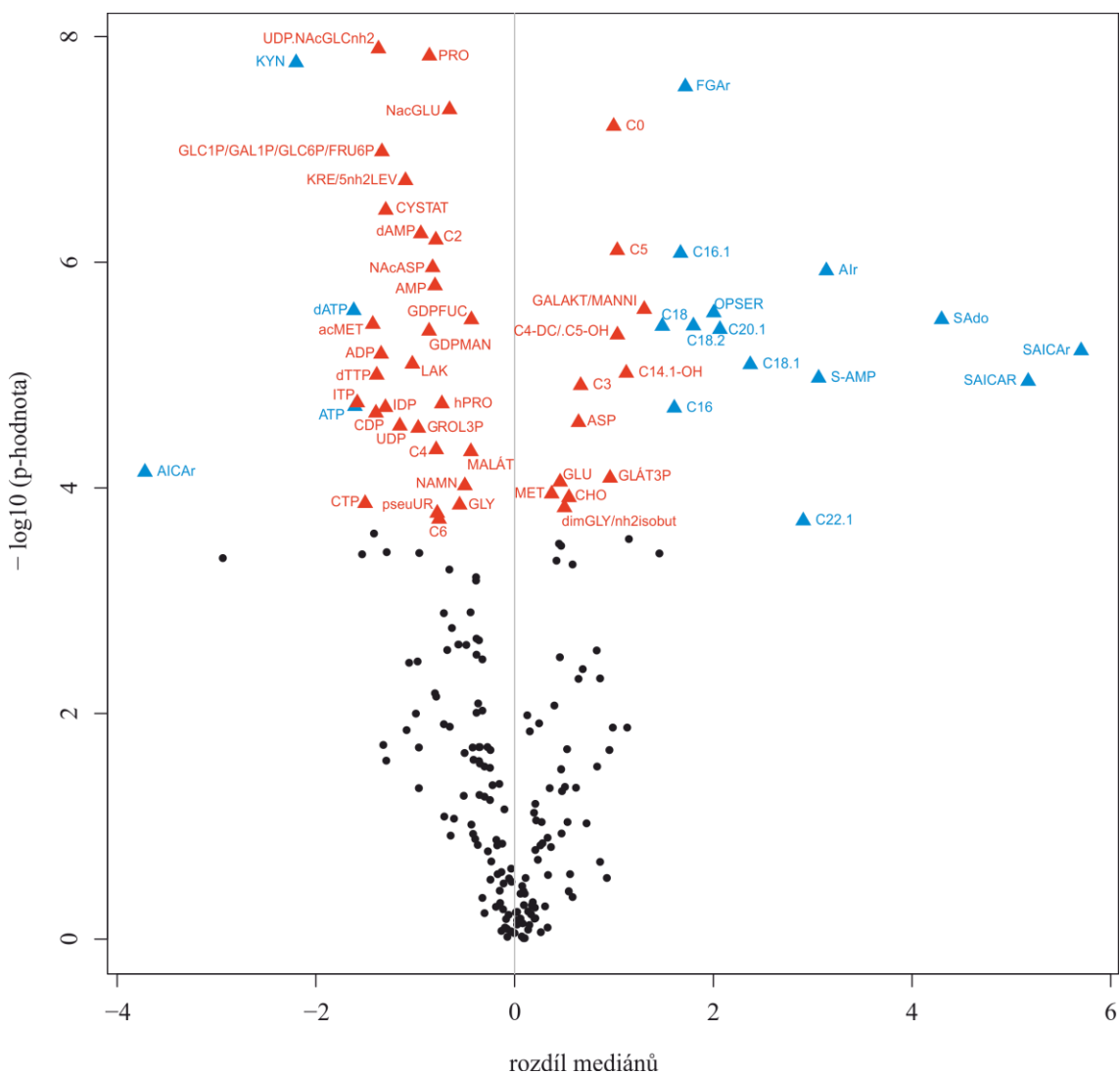
OPLS-DA skórový graf zobrazuje vzorky rozdělené do skupin defektní linie ADSL a kontroly. Správnost rozdělení vzorků byla ověřena permutačním testem (Obr. 42).

Tab. 14 Dvacet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA VIP grafu u defektní linie ADSL porovnané s kontrolou. Seznam zkratk metabolitů je uveden jako příloha v kapitole 9.1. V posledním sloupci tabulky je výsledek náležící k vulkánovým grafům.

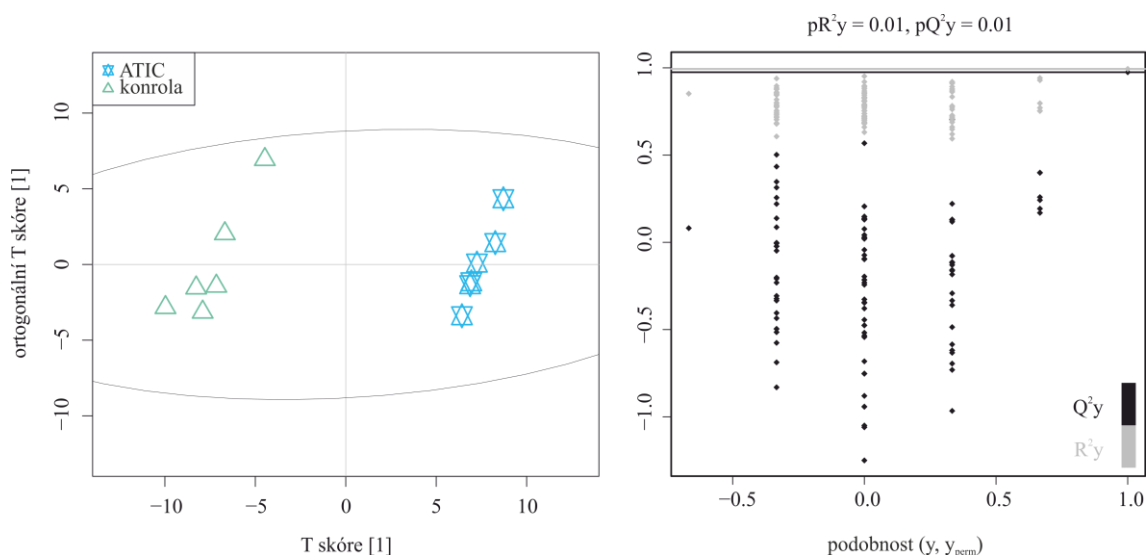
	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	SAICAr	3,12	0,06	5,70	6,07 E-06
2	SAICAR	2,95	0,04	5,17	1,13 E-05
3	SAdo	2,73	0,04	4,30	3,22 E-06
4	AICAr	2,46	0,07	-3,72	7,25 E-05
5	S-AMP	2,27	0,05	3,06	1,06 E-05
6	C22.1	2,27	0,08	2,91	1,96 E-04
7	AIr	2,25	0,06	3,14	1,19 E-06
8	AICAR	2,14	0,09	-2,93	4,22 E-04
9	C18.1	1,93	0,05	2,37	8,07 E-06
10	C20.1	1,86	0,06	2,07	3,93E-06
11	KYN	1,85	0,02	-2,20	1,70 E-08
12	C18.2	1,78	0,04	1,80	3,66 E-06
13	FGAr	1,70	0,03	1,72	2,78 E-08
14	OPSER	1,70	0,06	2,00	2,80 E-06
15	C16.1	1,66	0,04	1,67	8,31 E-07
16	dATP	1,63	0,03	-1,62	2,68 E-06
17	C18	1,58	0,04	1,49	3,69 E-06
18	C16	1,56	0,05	1,61	1,96 E-05
19	ATP	1,55	0,04	-1,61	1,89 E-05
20	2ohisoVAL	1,55	0,07	-1,28	3,72 E-04

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Na základě VIP grafu metody OPLS-DA bylo vybráno prvních 20 nejvýznamnějších metabolitů pro defektní linii ADSL (Tab. 14). Jednalo se o meziprodukty a produkty metabolismu purinů (včetně meziproduktů PDNS) a aminokyselin, nasycené i nenasycené acylkarnitiny s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem.



Obr. 43 Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie ADSL v porovnání s kontrolou. Modře jsou označeny metabolity, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.



Obr. 44 Skórový graf metody OPLS-DA rozdělující vzorky defektní linie ATIC a kontroly s příslušným permutačním testem.

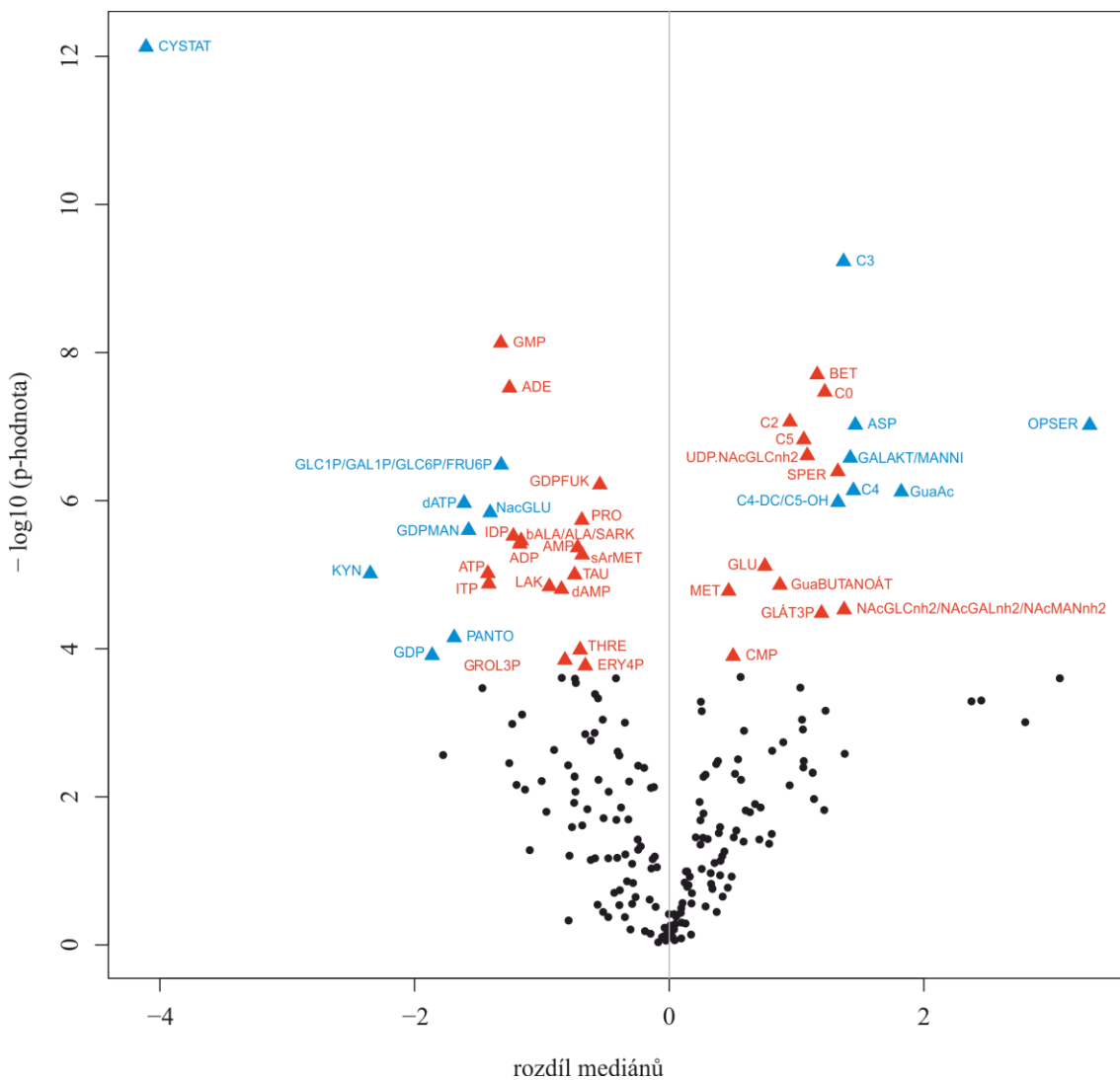
Pomocí metody OPLS-DA byly rozděleny vzorky do skupin defektní linie ATIC a kontroly. Správnost separace vzorků byla ověřena permutačním testem (Obr. 44).

Tab. 15 Dvacet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA VIP grafu u defektní linie ATIC porovnané s kontrolou. Seznam zkratk metabolitů je uveden jako příloha v kapitole 9.1. V posledním sloupci tabulky je výsledek náležící k vulkánovým grafům.

	identifikace	průměr VIP	SD VIP	rozdíl mediánů	p-hodnota
1	CYSTAT	2,74	0,05	-4,11	7,50 E-13
2	AICAr	2,35	0,09	3,07	2,52 E-04
3	OPSER	2,32	0,07	3,30	9,58 E-08
4	AICAR	2,21	0,10	2,80	9,79 E-04
5	SAICAr	2,12	0,07	2,46	4,98 E-04
6	KYN	2,05	0,04	-2,35	9,68 E-06
7	SAICAR	2,05	0,06	2,38	5,12 E-04
8	GuaAc	1,83	0,03	1,82	7,61 E-07
9	GDP	1,75	0,06	-1,86	1,23 E-04
10	dATP	1,70	0,02	-1,61	1,08 E-06
11	PANTO	1,68	0,04	-1,69	7,05 E-05
12	GALAKT/MANNI	1,66	0,04	1,42	2,66 E-07
13	GDPMAN	1,66	0,04	-1,58	2,51 E-06
14	acMET	1,65	0,04	-1,46	3,40 E-04
15	ASP	1,62	0,04	1,46	9,52 E-08
16	NAcGLU	1,61	0,04	-1,41	1,45 E-06
17	C3	1,60	0,03	1,37	5,89 E-10
18	C4	1,59	0,04	1,45	7,29 E-07
19	C4-DC/C5-OH	1,58	0,03	1,33	1,05 E-06
20	GLC1P/GAL1P/GLC6P/FRU6P	1,56	0,02	-1,32	3,29 E-07

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Pomocí VIP grafu metody OPLS-DA bylo reprezentováno 20 nejvýznamnějších metabolitů vyskytujících se ve vzorcích defektní linie ATIC (Tab. 15). Jednalo se o nasycené a hydroxylované acylkarnitiny s krátkým řetězcem, meziprodukty a produkty metabolismu aminokyselin, monosacharidů a purinů (včetně meziproduktů PDNS).



Obr. 45 Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot u vzorků defektní linie ATIC v porovnání s kontrolou. Modře jsou označeny metabolity, které byly mezi 20 nejvýznamnějšími OPLS-DA VIP grafu.

5 DISKUZE

Předložená diplomová práce byla zaměřena na sledování změn metabolomických profilů HeLa buněčných linií defektních v jednotlivých krocích PDNS pomocí necíleného a cíleného přístupu metabolomické analýzy.

V rámci PDNS byla doposud popsána pouze dvě onemocnění – deficit adenylosukcinátlyasy (ADSL) (van den Berghe a Jaeken, 1986) a AICA ribosidurie (deficit ATIC) (Marie *et al.*, 2004). Obě poruchy se projevují neurologickými symptomy, jako jsou epilepsie, mentální retardace, slepota, autistické chování, aj. (Balasubramaniam *et al.*, 2014). Je pravděpodobné, že defekty ostatních enzymů PDNS jsou také spjaty s neurologickými symptomy. Buněčné linie, použité pro experimentální část této práce byly publikovány v roce 2016 (Barešová *et al.*, 2016) a představují první lidské modely pro známé a potenciální dědičné metabolické poruchy související s PDNS.

Necílenou metabolomickou analýzou bylo ve všech buněčných liniích detekováno celkem 739 „features“, u kterých byla provedena statistická analýza. Jednotlivé defektní linie byly porovnávány s kontrolními buňkami. Na základě VIP grafů metody OPLS-DA bylo v rámci každého defektu prvních dvacet nejvýznamnějších „features“, podrobena fragmentační analýze s cílem jejich identifikace.

Vzorky defektních linií PFAS, PAICS, ADSL a ATIC byly metodami PCA a PLS-DA rozděleny do skupin dle odpovídajících defektů na základě rozdílného metabolomického profilu, který byl ovlivněn zejména akumulací meziproduktů PDNS charakteristických pro dané linie. U defektní linie GART došlo k částečnému překryvu s kontrolními buňkami. Na rozdíl od ostatních defektních linií totiž u linie GART nebyla pozorována akumulace žádného meziproduktu PDNS. V buňkách defektních pro trifunkční enzym GART by měl být akumulován fosforibosylamin (PRA). Tento metabolit však nebyl detekován, pravděpodobně z důvodu jeho vysoké nestability (poločas rozpadu 5 s *in vivo* (Schendel *et al.*, 1988).

S výjimkou defektní linie GART byly u všech ostatních linií akumulovány meziprodukty PDNS (v podobě ribosidů a ribotidů), které jsou charakteristické pro daný defekt a také metabolity nacházející se dále od defektního enzymu (Mádrová *et al.*, 2018). Nicméně AICAR byl detekován ve snížené hladině v liniích GART, PFAS a ADSL.

Pozorovaná akumulace meziproductů PDNS nacházejících se dále od defektního enzymu pravděpodobně značí posun v rovnováze enzymových reakcí. U linií PFAS, PAICS a ATIC byla identifikována di- a trifosfátová analoga akumulovaných meziproductů PDNS. Tyto metabolity (AICAr-2P a AICAr-3P) byly doposud identifikovány pouze u defektu ATIC (Marie *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že za tvorbu AICAr-3P je zodpovědná fosforibosylpyrofosfátsyntetasa (PRPPS, EC 2.7.6.1). AICAr-2P nejspíš pochází z degradace AICAr-3P nebo vzniká v průběhu extrakce metabolitů (Sabina *et al.*, 1984; Daignan-Fornier a Pinson, 2012). V analýze byla nalezena také di- a trifosfátová analoga GAR, FGAr, a AIr, která zatím nebyla popsána v literatuře. Je však pravděpodobné, že by tyto metabolity mohly vznikat stejnými mechanismy jako analogické formy AICAr. V rámci meziproductů PDNS byl u linií GART, PFAS a ADSL mezi významnými metabolity identifikován AICAR, jehož hladiny jakožto přímého (ADSL) či nepřímého (GART, PFAS) produktu enzymových reakcí PDNS byly u zmíněných linií sniženy.

U všech defektů s výjimkou linie PFAS byl ve snížené hladině pozorován 7-metylguanin, nejspíš z důvodu ovlivnění methioninového cyklu (podrobněji diskutováno níže v rámci cílené metabolické analýzy). Tato modifikovaná purinová báze je produktem degradace metylovaných nukleových kyselin, který vzniká přenosem metylové skupiny z S-adenosylmethioninu na GMP nukleotidového vlákna (Mariller *et al.*, 2009; Tomikawa, 2018).

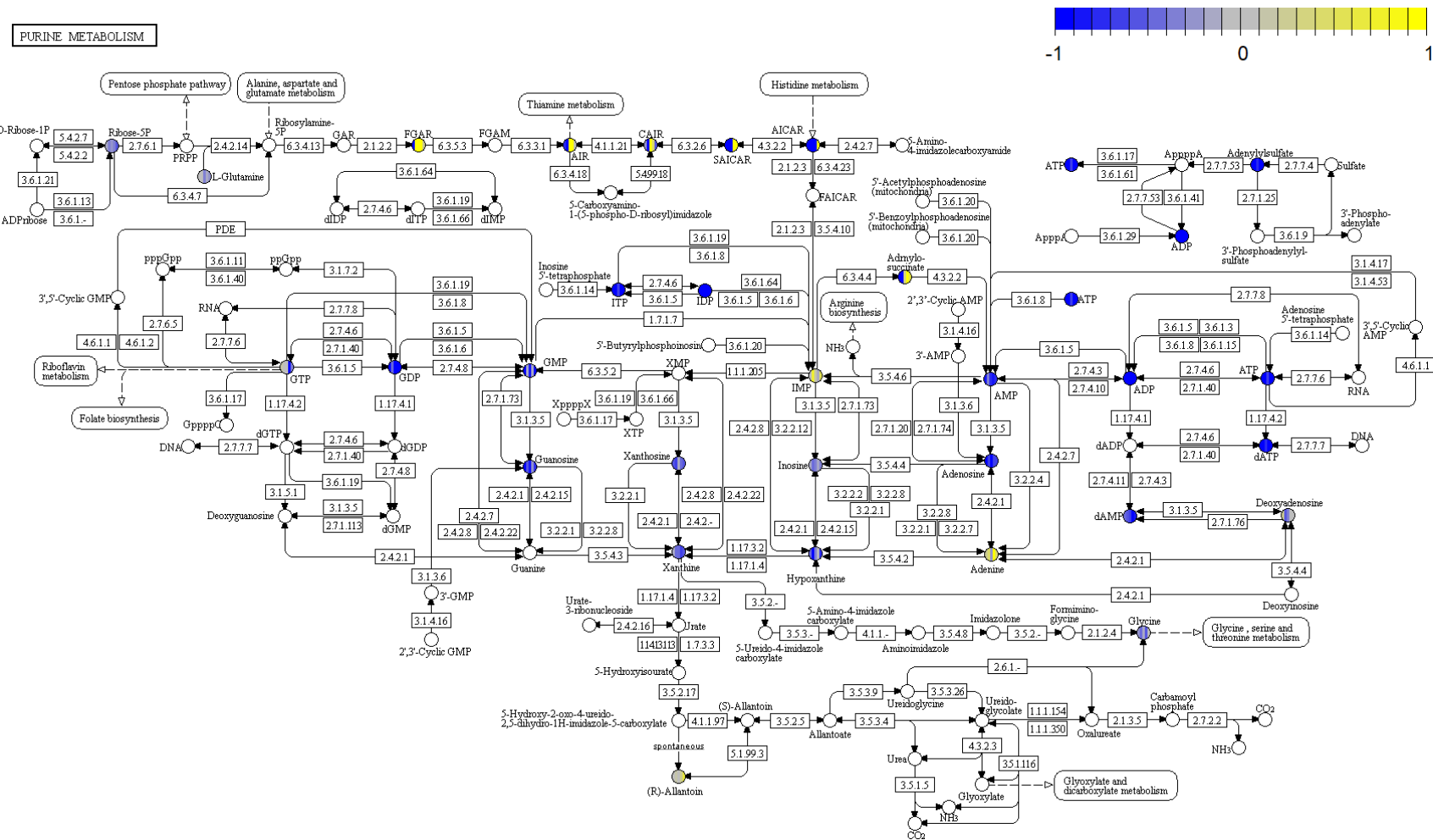
V rámci všech defektních linií byly detekovány 4 lipidy, u kterých byly obecně pozorovány snížené hladiny v porovnání s kontrolou. Jednalo se zejména o tři fosfolipidy ze skupiny fosfatidylcholinů (PC) a jeden fosfolipid ze skupiny fosfatidylserinů (PS). Podařilo se provést pouze částečnou identifikaci založenou na přítomnosti fragmentu specifického pro rozlišení základních skupin fosfolipidů (PS a PC). Z tohoto důvodu není možné diskutovat významnost těchto metabolitů.

Pomocí cílené metabolomické analýzy bylo detekováno celkem 214 metabolitů, které byly stejně jako v případě necíleného přístupu podrobeny statistické analýze. Nejvýznamnější metabolity u jednotlivých defektních linií byly určeny z VIP grafů metody OPLS-DA.

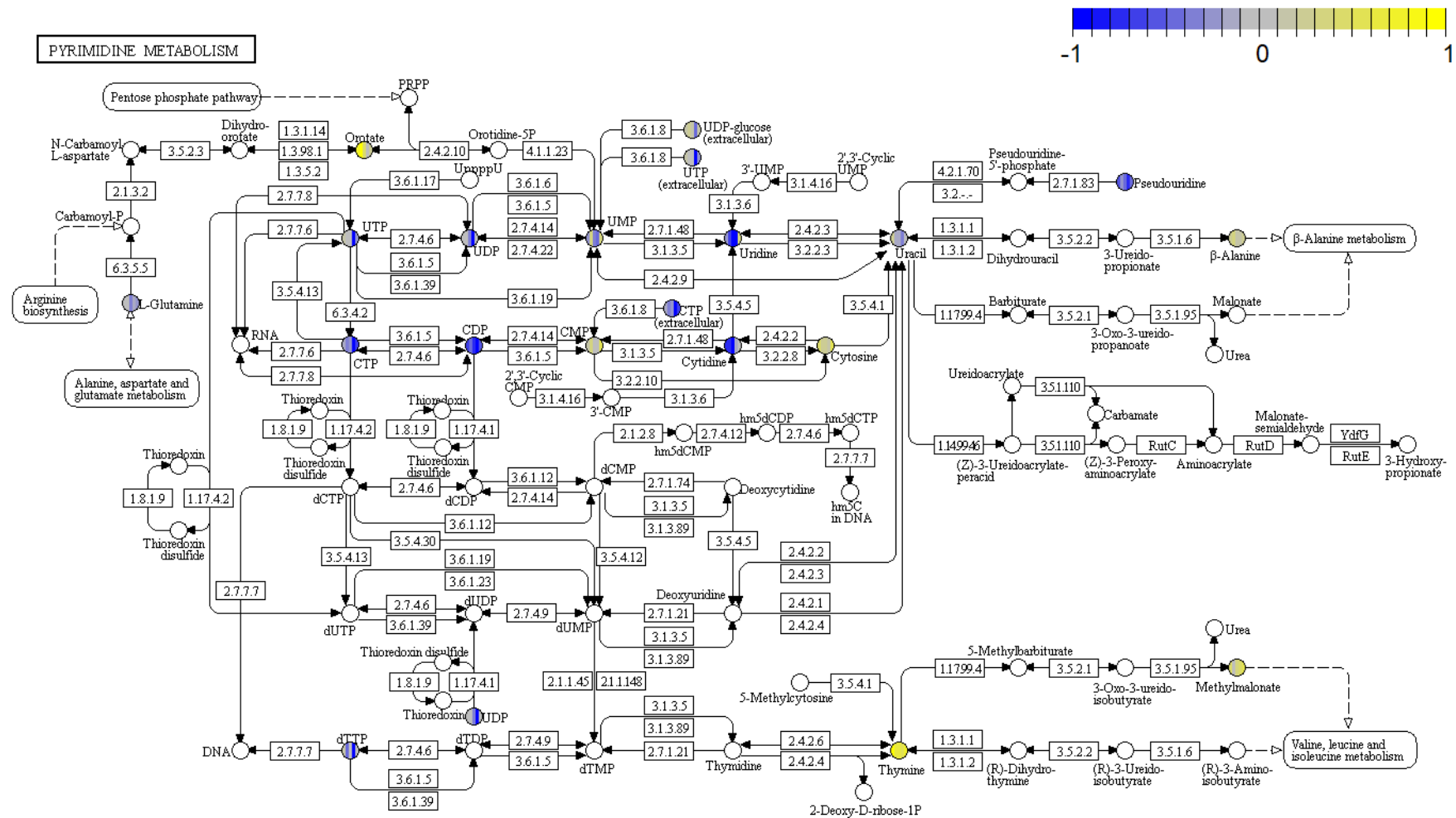
Pomocí metod PCA a PLS-DA bylo na rozdíl od statistické analýzy necíleného metabolomického přístupu pozorováno rozdělení všech vzorků do samostatných skupin.

Všechny defektní linie vykazovaly oproti kontrolním buňkám několik společných trendů. Tím prvním bylo obecné snížení hladin adeninových a guaninových metabolitů (Obr. 46), způsobené defekty v rámci PDNS a současné zamezení extracelulárního příjmu purinů do buněk (bezpurinové médium, 24 h před sklizením). Jelikož u použitých buněčných modelů vykazovaly mutované enzymy nulové aktivity vůči příslušným substrátům, nebyla zde možnost zachování fluxu PDNS dráhou pomocí zbytkových aktivit, jako je běžné u pacientů ADSL (van den Bergh et al., 1993). Na obrázku (Obr. 46) lze také pozorovat akumulace meziproduktů PDNS v jednotlivých defektních liniích. V rámci metabolismu pyrimidinů byly rovněž pozorovány snížené hladiny většiny metabolitů (Obr. 47). To mohlo být způsobeno energetickou náročností biosyntézy pyrimidinových nukleotidů, zejména ve spojení se sníženou hladinou ATP u všech defektních linií. ATP je nezbytný pro fosforylace pyrimidinových mono- a dinukleotidů. Dalším důvodem může být nedostatek substrátu biosyntézy pyrimidinů – 5-fosforibosylpyrofosfátu (PRPP) – kvůli snížené hladině jeho prekurzoru glukosy-6-fosfátu.

U všech defektních linií byly pozorovány různé trendy v hladinách nasycených, nenasycených a hydroxylovaných acylkarnitinů s různě dlouhým řetězcem. U linie ATIC byl vlivem akumulace AICAR zaznamenán obecný trend, kdy se acylkarnitiny s krátkým řetězcem vyskytovaly ve zvýšené hladině a acylkarnitiny dlouhým řetězcem ve snížené hladině. Experimentálně bylo zjištěno, že AICAR v buňkách aktivuje AMP-aktivovanou proteinkinasu (AMPK), která podporuje katabolické dráhy, a naopak inhibuje anabolické reakce (Hardie, 2008; Daignan-Fornier a Pinson, 2012). Je možné, že k aktivaci AMPK došlo i u ostatních defektních linií, například sníženou hladinou ATP, jelikož AMPK je ovlivňována změnou poměru AMP/ATP (Hardie, 2008).



Obr. 46 Metabolická mapa purinového metabolismu. Modře jsou označeny metabolity snížené a žlutě zvýšené v rámci jednotlivých defektních linií. Převzato a upraveno podle (<https://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00230.png>).



Obr. 47 Metabolická mapa pyrimidinového metabolismu. Modře jsou označeny metabolity snížené a žlutě zvýšené v rámci jednotlivých defektních linií. Převzato a upraveno podle (<https://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00240.png>).

Mezi významnými metabolity se vyskytoval fosfoserin, meziproduct biosyntézy serinu. Enzym fosfoserinfosfataza (EC 3.1.3.3) katalyzuje jeho přeměnu na serin. Zvýšené hladiny serinu a fosfoserinu byly pozorovány u všech defektních linií. Stejný trend byl zaznamenán i u výchozího metabolitu z této dráhy 3-fosfoglycerátu. Serin je významnou látkou v tzv. jednouhlíkovém metabolismu, který poskytuje jednouhlíkové jednotky pro syntézu nukleotidů, metylační reakce a redoxní metabolismus (Newman a Maddocks, 2017). Je známo, že mnoho typů rakovinných buněk, např. buňky rakoviny prsu či kůže (Possemato *et al.*, 2011; Locasale *et al.*, 2011) využívají tyto jednouhlíkové jednotky pocházející z metabolismu serinu pro zajištění vysoké míry buněčné proliferace. Hladiny serinu jsou ovlivňovány buď zvýšeným transportem z extracelulárního prostředí, nebo podporou biosyntézy serinu zvýšenou regulací SSP genů (Maddocks *et al.*, 2013). Také bylo popsáno, že inhibice SSP genů snižuje rychlost růstu tumoru (Possemato *et al.*, 2011). V této diplomové práci byly použity linie rakovinných HeLa buněk, lze proto předpokládat podobné metabolické chování jako u tumorové tkáně, včetně zvýšené biosyntézy serinu. Serin přispívá významným podílem k syntéze formyl-tetrahydrofolát (formyl-THF), který vstupuje do PDNS v kroku 3 a 9 (Obr. 46) a poskytuje tak dva uhlíky vznikajícímu purinovému jádru. Buňky byly na 24 h před sklizením vloženy do bezpurinového média, tudíž došlo ke stimulaci PDNS, která byla však vlivem defektních enzymů v jednotlivých krocích zastavena. Velký podíl serinu tak nemohl být v podobě formyl-THF využit v této dráze, proto nejspíš docházelo k akumulaci serinu a jeho prekurzorů. Rozdíl oproti kontrolním vzorkům (needitovaná HeLa buněčná linie) byl tedy dán především přítomností enzymových defektů v rámci PDNS. Mezi další donory jednotek pro jednouhlíkový metabolismus patří cholin a jeho metabolity betain, dimetylglycin a sarkosin (Newman a Maddocks, 2017). U těchto metabolitů bylo také pozorováno zvýšení oproti kontrolám, což mohlo být také způsobeno neschopností uplatnit jednouhlíkový metabolismus při anabolických reakcích.

Serin se mimo jiné účastní methioninového cyklu – adicí adenosinu z ATP na methionin vzniká S-adenosylmethionin (SAM), který je univerzálním donorem metylové skupiny pro metylace DNA, RNA (7-metylguanin, viz výše) a posttranslační modifikace proteinů. V buněčných liniích byly pozorovány zvýšené hladiny methioninu, naopak snížené hladiny SAM a S-adenosylhomocysteinu. Tato situace byla nejspíš vyvolána nedostatkem ATP. Fyziologicky serin podporuje syntézu SAM poskytováním formyl-THF do PDNS (tzn. produkcí ATP) nebo regenerací methioninu. Vlivem defektů

v PDNS ovšem docházelo k poklesu ATP. Ovlivnění methioninového cyklu může mít za následek také snížené hladiny cystathioninu, dipeptidu tvořeného ze serinu a homocysteinu.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provést komplexní interpretaci metabolomu HeLa buněčných linií, které byly editovány pomocí molekulárně biologické techniky CRISPR/Cas9 v rámci jednotlivých kroků PDNS.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše. První kapitola se zabývala metabolismem purinů a tkáňovou specifitou jednotlivých drah. Navazující kapitola byla zaměřena na transport purinů pomocí koncentračních a ekvilibračních nukleosidových transportérů spojených s purinovými receptory a zmíněna byla také nukleosidová analoga používaná jako léčiva. Dále byl popsán mechanismus a aplikace techniky úpravy genomu CRISPR/Cas9. Poslední kapitola byla věnována statistické analýze v metabolomice, kde byly charakterizovány nesupervizované a supervizované metody vícerozměrné statistické analýzy.

Pro komplexní LC-MS analýzu defektních HeLa buněk byla zvolena kombinace dvou přístupů metabolomické analýzy – necílený a cílený. Pro oba přístupy byla aplikována separační metoda UHPLC spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla podrobena statistické analýze. Pro zvýšení objektivnosti výsledků byly aplikovány metody jednorozměrné statistiky v kombinaci s nesupervizovanými a supervizovanými metodami vícerozměrné statistiky.

Necíleným přístupem metabolomické analýzy bylo ve všech buněčných liniích detekováno celkem 739 „features“. Statistickými přístupy byly zjištěny významné „features“ jednotlivých defektních linií v porovnání s kontrolou. Mezi identifikovanými metabolity se nacházely především meziprodukty PDNS – ribosidy a ribotidy a jejich di- a trifosfátová analoga. Dále byly identifikovány čtyři fosfolipidy a 7-metylguanin. Cílenou metabolomickou analýzou bylo detekováno celkem 214 metabolitů. K významným metabolitům všech defektních linií v porovnání s kontrolou se řadily meziprodukty PDNS, podobně jako v případě necílené analýzy. Dále byly pozorovány obecně snížené hladiny většiny meziproduktů metabolismu purinů a pyrimidinů. Byl zaznamenán trend zvýšených hladin acylkarnitinů s krátkým řetězcem a naopak snížených hladin acylkarnitinů s dlouhým řetězcem, vyvolaný nejspíše aktivací AMPK. Také byly zaznamenány významné změny v hladinách řady metabolitů souvisejících s tzv. jednouhlíkatým metabolismem.

Mezi některými skupinami metabolitů z necíleného a cíleného přístupu metabolomické analýzy byly u jednotlivých linií nalezeny souvislosti a společné trendy, které byly diskutovány v rámci biochemické interpretace. Celkový metabolom se však u daných defektních linií lišil zejména akumulací meziproduktů příslušných reakcí PDNS, ve kterých byly buňky deficitní.

7 LITERATURA

- Abbracchio M. P., Boeynaems J. M., Barnard E. A., Boyer J. L., Kennedy C., Miras-Portugal M. T., King B. F., Gachet C., Jacobson K. A., Weisman G. A., Burnstock G. (2003): Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in Pharmacological Sciences* **24**, 52-55.
- Balasubramaniam S., Duley J. A., Christodoulou J. (2014): Inborn errors of purine metabolism: clinical update and therapies. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **37**, 669-686.
- Baldwin S. A., Yao S. Y. M., Hyde R. J., Ng A. M. L., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M. W. L., Cass C. E., Young J. D. (2005): Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 15880-15887.
- Barešová V., Krijt M., Skopová V., Součková O., Kmoch S., Zikanová M. (2016): CRISPR-Cas9 induced mutations along *de novo* purine synthesis in HeLa cells result in accumulation of individual enzyme substrates and affect purinosome formation. *Molecular Genetics and Metabolism* **119**, 270-277.
- Barker M., Rayens W. (2003): Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics* **17**, 166-173.
- Barnes K., Dobrzynski H., Foppolo S., Beal P. R., Ismat F., Scullion E. R., Sun L. J., Tellez J., Ritzel M. W. L., Claycomb W. C., Cass C. E., Young J. D., Billeter-Clark R., Boyett M. R., Baldwin S. A. (2006): Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circulation Research* **99**, 510-519.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712.
- Berlin R. D., Oliver J. M. (1975): Membrane transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides in animal cells. *International Review of Cytology* **42**, 287-336.
- Berne R. M. (1963): Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *American Journal of Physiology* **204**, 317-322.
- Berne R. M., Rubio R., Curnish R. R. (1974): Release of adenosine from ischemic brain: Effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides. *Circulation Research* **35**, 262-271.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512.
- Bruns R. F., Lu G. H., Pugsley T. A. (1986): Characterization of the A₂ adenosine receptor labeled by [³H] NACA in rat striatal membranes. *Molecular Pharmacology* **29**, 331-346.
- Burnstock G. (1976): Purinergic receptors. *Journal of Theoretical Biology* **62**, 491-503.
- Burnstock G. (1978): A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach*, 1st ed., (Straub R. W., Bolis L., eds), Raven Press, New York, USA, 107-118.

- Burnstock G., Hills J. M., Hoyle Ch. H. V. (1984): Evidence that the P₁-purinoceptor in the guinea-pig taenia coli in an A₂-sybtype. *British Journal of Pharmacology* **81**, 533-541.
- Burnstock G., King B. F. (1996): Numbering of cloned P₂ purinoceptors. *Drug Development Research* **38**, 67-71.
- Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S. L., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X. B., Jiang W. Y., Marraffini L. A., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science* **339**, 819-823.
- Coulthard S. A., McGarrity S., Sahota K., Berry P., Redfern C. P. F. (2018): Three faces of mercaptopurine cytotoxicity *in vitro*: Methylation, nucleotide homeostasis and deoxythioguanosine in DNA. *Drug Metabolism and Disposition* **46**, 1191-1199.
- Daignan-Fornier B., Pinson B. (2012): 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects. *Metabolites* **2**, 292-302.
- Daly J. W., Butts-Lamb P., Padgett W. (1983): Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: Interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cellular and Molecular Neurobiology* **3**, 69-80.
- Damaraju S., Zhang J., Visser F., Tackaberry T., Dufour J., Smith K. M., Slugoski M., Ritzel M. W. L., Baldwin S. A., Young J. D., Cass C. E. (2005): Identification and functional characterization of variants in human concentrative nucleoside transporter 3, hCNT3 (*SLC28A3*), arising from single nucleotide polymorphisms in coding regions of the hCNT3 gene. *Pharmacogenetics and Genomics* **15**, 173-182.
- del Velasco-Martinez I., Hernández-Camacho C. J., Méndez-Rodríguez L. C., Zenteno-Savín T. (2016): Purine metabolism in response to hypoxic conditions associated with breath-hold diving and exercise in erythrocytes and plasma from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **191**, 196-201.
- Demir Z., Guven E. B., Ozbey S., Kazak C., Atalay R. C., Tuncbilek M. (2015): Synthesis of novel substituted purine derivatives and identification of the cell death mechanism. *European Journal of Medicinal Chemistry* **89**, 701-720.
- de Miranda P., Good S. S., Yarchoan R., Thomas R. V., Blum M. R., Myers C. E., Broder S. (1989): Alteration of zidovudine pharmacokinetics by probenecid in patients with AIDS or AIDS-related complex. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **46**, 494-500.
- DiCarlo J. E., Norville J. E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G. M. (2013): Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* **41**, 4336-4343.
- Ding Q., Strong A., Patel K. M., Ng S. L., Gosis B. S., Regan S. N., Cowan Ch. A., Rader D. J., Musunuru K. (2014): Permanent alteration of *PCSK9* with *in vivo* CRISPR-Cas9 genome editing. *Circulation Research* **115**, 488-492.
- Dobešová D. (2017): *Studium metabolických změn u defektů purinové de novo syntézy*. Bakalářská práce, PŘF UPOL Olomouc, Česká republika.
- Doudna J. A., Charpentier E. (2014): The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1078-1086.

- Drury A. N., Szent-Györgyi A. (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology* **68**, 213-237.
- Dunn W. B., Erban A., Weber R. J. M., Creek D. J., Brown M., Breitling R., Hankemeier T., Goodacre R., Neumann S., Kopka J., Viant M. R. (2013): Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics* **9**, 44-66.
- Friedland A. E., Tzur Y. B., Esvelt K. M., Colaiácovo M. P., Church G. M., Calarco J. A. (2013): Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature Methods* **10**, 741-753.
- Friedman S., Larsen M. D., Magnussen B., Jølvig L. R., de Silva P., Nørgard B. M. (2017): Paternal use of azathioprine/6-mercaptopurine or methotrexate within 3 months before conception and long-term health outcomes in the offspring – A nationwide cohort study. *Reproductive Toxicology* **73**, 196-200.
- Fu Y., Foden J. A., Khayter C., Maeder M. L., Reyon D., Joung J. K., Sander J. D. (2013): High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* **31**, 822-827.
- Furman P. A., Fyfe J. A., Stclair M. H., Weinhold K., Rideout J. L., Freeman G. A., Lehrman S. N., Bolognesi D. P., Broder S., Mitsuya H., Barry D. W. (1986): Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America-Biological Sciences* **83**, 8333-8337.
- Govindarajan R., Leung G. P. H., Zhou M. Y., Tse C. M., Wang J., Unadkat J. (2009): Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **296**, 910-922.
- Granato D., Santos J. S., Escher G. B., Ferreira B. L., Maggio R. M. (2018): Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology* **72**, 83-90.
- Gratz S. J., Cummings A. M., Nguyen J. N., Hamm D. C., Donohue L. K., Harrison M. M., Wildonger J., O'Connor-Giles K. M. (2013): Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* **194**, 1029-1035.
- Hardie D. G. (2008): AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International Journal of Obesity* **32**, 7-12.
- Hellsten Y., Richter E. A., Kiens B., Bangsbo J. (1999): AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *The Journal of Physiology* **520**, 909-920.
- Hoebertz A., Townsend-Nicholson A., Glass R., Burnstock G., Arnett T. R. (2000): Expression of P₂ receptors in bone and cultured bone cells. *Bone* **27**, 503-510.
- Hsu P. D., Scott D. A., Weinstein J. A., Ran F. A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E. J., Wu X., Shalem O., Cradick T. J., Marraffini L. A., Bao G., Zhang F. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* **31**, 827-834.
- Huang W., Zeng X., Shi Y., Liu M. (2017): Functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter 1. *Protein & Cell* **8**, 284-295.

- Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voytas D. F., (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Chung D., Keles S. (2010): Sparse partial least squares classification for high dimensional data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, **9**:17
<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2861314&blobtype=pdf>.
- Jennings L. L., Hao Ch, Cabrita M. A., Vickers M. F., Baldwin S. A., Young J. D., Cass C. E. (2001): Distinct regional distribution of human equilibrative nucleoside transporter proteins 1 and 2 (hENT1 and hENT2) in the central nervous system. *Neuropharmacology* **40**, 722-731.
- Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L. A. (2013): RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology* **31**, 233-239.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- Katz L., Chen Y. Y., Gonzalez R., Peterson T. C., Zhao H., Baltz R. H. (2018): Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **45**, 449-461.
- Kennedy C., Burnstock G. (1985): Evidence for two types of P₂-purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *European Journal of Pharmacology* **111**, 49-56.
- Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: Zincfinger fusions to *FokI* cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1156-1160.
- King A. E., Ackley M. A., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (2006): Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**, 416-425.
- Kirdar A. O., Green K. D., Rathore A. S. (2008): Application of multivariate data analysis for identification and successful resolution of a root cause for a bioprocessing application. *Biotechnology Progress* **24**, 720-726.
- Kirwan J. (2013): Metabolomics for the practising vet. *In Practice* **35**, 438-445.
- Kroep J. R., Loves W. J. P., van der Wilt C. L., Alvarez E., Talianidis L., Boven E., Braakhuis B. J. M., van Groeningen C. J., Pinedo H. M., Peters G. J. (2002): Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict *in vivo* gemcitabine sensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 371-376.
- Lê Cao K. A., Boitard S., Besse P. (2011) Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*, **12**:253
<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2105-12-253>.
- Li J.-F., Norville J. E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G. M., Sheen J. (2013a): Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology* **31**, 688-691.
- Li D., Qiu Z., Shao Y., Chen Y., Guan Y., Liu M., Li Y., Gao N., Wang L., Lu X., Zhao Y., Liu M. (2013b): Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31**, 681-683.

- Li W., Teng F., Li T., Zhou Q. (2013c): Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology* **31**, 684-686.
- Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding Ch., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. (2015): CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell* **6**, 363-372.
- Liao H. K., Gu Y., Diaz A., Marlett J., Takahashi Y., Li M., Suzuki K., Xu R., Hishida T., Chang C. J., Esteban C. R., Young J., Belmonte J. C. I. (2015): Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nature Communications*, **6**:6413 <https://www.nature.com/articles/ncomms7413.pdf>.
- Liland K. H. (2011): Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **30**, 827-841.
- Liu B., Czajka A., Malik A. N., Hussain K., Jones P. M., Persaud S. J. (2015): Equilibrative nucleoside transporter 3 depletion in β -cells impairs mitochondrial function and promotes apoptosis: Relationship to pigmented hypertrichotic dermatosis with insulin-dependent diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* **1852**, 2086-2095.
- Locasale J. W., Grassian A. R., Melman T., Lyssiotis C. A., Mattaini K. R., Bass A. J., Heffron G., Metallo C. M., Muranen T., Sharfi H., Sasaki A. T., Anastasiou D., Mullarky E., Vokes N.I., Sasaki M., Beroukhim R., Stephanopoulos G., Ligon A. H., Meyerson M, Richardson A. L., Chin L., Wagner G., Asara J. M., Brugge J. S., Cantley L. C., Vander Heiden M. G. (2011): Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature Genetics* **43**, 869-874.
- Loewen S. K., Ng A. M. L., Yao S. Y. M., Cass C. E., Baldwin S. A., Young J. D. (1999): Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransporters hCNT1 and hCNT2. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 24475-24484.
- Londos C., Cooper D. M. F., Wolff J. (1980): Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America-Biological Sciences* **77**, 2551-2554.
- Luo W., Brouwer C. (2013): Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* **29**, 1830-1831.
- Maddocks O. D., Berkers C. R., Mason S. M., Zheng L., Blyth K., Gottlieb E., Vousden K. H. (2013): Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* **493**, 542-546.
- Mádrová L., Krijt M., Barešová V., Václavík J., Friedecký D., Dobešová D., Součková O., Škopová V., Adam T., Zikánová M. (2018): Mass spectrometric analysis of purine *de novo* biosynthesis intermediates. *Plos One*, **13**:e0208947 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208947>.
- Mali P., Yang L. H., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-826.
- Mangravite L. M., Badagnani I., Giacomini K. M. (2003): Nucleoside transporters in the disposition and targeting of nucleoside analogs in the kidney. *European Journal of Pharmacology* **479**, 269-281.

- Marie S., Heron B., Bitoun P., Timmerman T., van den Berghe G., Vincent M. F. (2004): AICA-ribosiduria: A novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *American Journal of Human Genetics* **74**, 1276-1281.
- Mariller Ch., Hardivillé S., Hoedt E., Benaissa M., Mazurier J., Pécot A. (2009): Proteomic approach to the identification of novel delta-lactoferrin target genes: Characterization of DcpS, an mRNA scavenger decapping enzyme. *Biochimie* **91**, 109-122.
- Moscou M. J., Bogdanove A. J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501-1501.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J. D. G., Kamoun S. (2013): Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* **31**, 691-693.
- Newman A. C., Maddocks O. D. K. (2017): One-carbon metabolism in cancer. *British Journal of Cancer* **116**, 1499-1504.
- Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang A. P., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si Ch., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. (2014): Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* **156**, 836-843.
- Oliveri P., Simonetti R. (2016): Chemometrics for food authenticity applications. In: *Advances in food authenticity testing*, 1st ed., (Downey G. ed), Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom, 701-728.
- Pankowicz F. P., Barzi M., Legras X., Hubert L., Mi T., Tomolonis J. A., Ravishankar M., Sun Q., Yang D., Borowiak M., Sumazin P., Elsea S. H., Bissig-Choisat B., Bissig K. D. (2016): Reprogramming metabolic pathways *in vivo* with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nature Communications*, **7**:12642 <https://www.nature.com/articles/ncomms12642.pdf>.
- Pavletich N. P., Pabo C. O. (1991): Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817.
- Pearson K. (1901): On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* **2**, 559-572.
- Plagemann P. G. W., Wohlhueter R. M., Erbe J. (1981): Facilitated transport of inosine and uridine in cultured mammalian cells is independent of nucleoside phosphorylases. *Biochimica et Biophysica Acta* **640**, 448-462.
- Platt R. J., Chen S., Zhou Y., Yim M. J., Swiech L., Kempton H. R., Dahlman J. E., Parnas O., Eisenhaure T. M., Jovanovic M., Graham D. B., Jhunjhunwala S., Heidenreich M., Xavier R. J., Langer R., Anderson D. G., Hacohen N., Regev A., Feng G., Sharp P. A., Zhang F. (2014): CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* **159**, 440-455.
- Possemato R., Marks K. M., Shaul Y. D., Pacold M. E., Kim D., Birsoy K., Sethumadhavan S., Woo H.K., Jang H. G., Jha A.K., Chen W.W., Barrett F.G., Stransky N., Tsun Z. Y., Cowley G. S., Barretina J., Kalaany N. Y., Hsu P. P., Ottina K., Chan A.M., Yuan B., Garraway L. A., Root D. E., Mino-Kenudson M., Brachtel E. F., Driggers E. M., Sabatini D. M. (2011): Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer *Nature* **476**, 346-350.

- Ran F. A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., Zhang F. (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* **8**, 2281-2308.
- Rojas Arias A. C., Liliana Palacio J., Chaparro-Giraldo A., López-Pazos S. A. (2017): Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance. *World Patent Information* **48**, 47-51.
- Rosen S. T. (2002): The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. In: *Clinically relevant resistance in cancer chemotherapy*, 1st ed., (Andersson B., Murray D., eds.), Springer, New York, USA, 27-47.
- Sabina R. L., Holmes E. W., Becker M. A. (1984): The enzymatic synthesis of 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside triphosphate (ZTP). *Science* **223**, 1193-1195.
- Shan Q. W., Wang Y. P., Li J., Zhang Y., Chen K. L., Liang Z., Zhang K., Liu J. X., Xi J. J., Qiu J. L., Gao C. X. (2013): Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31**, 686-688.
- Schendel F. J., Cheng Y. S., Otvos J. D., Wehrli S., Stubbe J. (1988): Characterization and chemical properties of phosphoribosylamine, an unstable intermediate in the *de novo* purine biosynthetic pathway. *Biochemistry* **7**, 261-2623.
- Stecula A., Schlessinger A., Giacomini K. M., Sali A. (2017): Human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3, *SLC28A3*) forms a cyclic homotrimer. *Biochemistry* **56**, 3475-3483.
- Stone T. W., Simmonds H. A. (1991): *Purines: Basic and clinical aspects*. 1st ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 257 stran.
- Sundaram M., Yao S. Y. M., Ingram J. C., Berry Z. A., Abidi F., Cass C. E., Baldwin S. A., Young J. D. (2001): Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 45270-45275.
- Tomikawa Ch. (2018): 7-Methylguanosine modifications in transfer RNA (tRNA). *International Journal of Molecular Sciences* **19**:4080 <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/4080>.
- Triba M. N., Le Moyec L., Amathieu R., Goossens C., Bouchemal N., Nahon P., Rutledge D. N., Savatin P. (2015): PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular Biosystems* **11**, 13-19.
- Trygg J., Wold S. (2002): Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics* **16**, 119-128.
- Václavík J., Coene K. L. M., Vrobel I., Najdekr L., Friedecký D., Karlíková R., Mádrová L., Petsalo A., Engelke U. F. H., van Wegberg A., Kluijtmans L. A. J., Adam T., Wevers R. A. (2018): Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage fragmentation mass spectra. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **41**, 407-414.
- van Calker D., Müller M., Hamprecht B. (1979): Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of Neurochemistry* **33**, 999-1005.
- van den Berghe G., Jaeken J. (1986): Adenylosuccinase deficiency. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **195**, 27-33.

- van den Bergh F., Vincent M. F., Jaeken J., van den Berghe G. (1993): Residual adenylosuccinase activities in fibroblasts of adenylosuccinase-deficient children: Parallel deficiency with adenylosuccinate and succinyl-AICAR in profoundly patients and non-parallel deficiency in a mildly retarded girl. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **16**, 415-424.
- Vijayalakshmi D., Belt J. A. (1988): Sodium-dependent nucleoside transport in mouse intestinal epithelial cells – Two transport systems with differing substrate specificities. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 19419-19423.
- Wang Ch., Lin W., Playa H., Sun S., Cameron K. (2013a): Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). *Biochemical Pharmacology* **86**, 1531-1540.
- Wang H., Yang H., Shivalila C. S., Dawlaty M. M., Cheng A. W., Zhang F., Jaenisch R. (2013b): One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**, 910-918.
- Wojtowicz P., Zrostlíková J., Štastná V., Dostálová E., Žídková L., Bruheim P., Adam T. (2012): Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry in human metabolomics. In: *Gas Chromatography – Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*, (Salih B., çelikbiçak Ö. eds.), InTech, Rijeka, Croatia, 29-50.
- Wold S., Esbensen K., Geladi P. (1987): Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**, 37-52.
- Wold S., Sjöström M., Eriksson L. (2001): PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **58**, 109-130.
- Worley B., Powers R. (2013): Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics* **1**, 92-107.
- Worley B., Powers R. (2016): PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Current Metabolomics* **4**, 97-103.
- Zhou Q. Y., Li C. Y., Olah M. E., Johnson R. A., Stiles G. L., Civelli O. (1992): Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A₃ adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America-Biological Sciences* **89**, 7432-7436.

Seznam internetových zdrojů:

Advanced Mass Spectral Database mzCloud home page: <https://www.mzcloud.org>
(citováno 4. 3. 2019).

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) home page: <https://www.genome.jp/kegg>
(citováno 15. 4. 2019).

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) – Purine metabolism Reference pathway:
<https://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00230.png> (citováno 20. 4. 2019).

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) – Pyrimidine metabolism Reference
pathway: <https://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00240.png> (citováno 20. 4. 2019).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) home page: <https://www.omim.org>
(citováno 27. 4. 2019).

The Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) home page:
<https://www.lipidmaps.org> (citováno 2. 4. 2019).

The Human Metabolome Database (HMDB) home page: <http://www.hmdb.ca>
(citováno 25. 3. 2019).

The METLIN Metabolomics Database (METLIN) home page: <https://metlin.scripps.edu>
(citováno 21. 3. 2019).

The R Project for Statistical Computing („R“) home page: <https://www.r-project.org>
(citováno 14. 1. 2019).

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

6-methylthioGTP	6-methylthioguanosin-trifostát
6-thioGTP	6-thioguanosin trifostát
ADSL	adenylosukcinátlyasa – monofunkční enzym PDNS
AICART	Fosforibosylaminoimidazolkarboxamidformyltransferasa
AIDS	„Acquired ImmunoDeficiency Syndrome“ – syndrom získané imunodeficience
AIRS	fosforibosylaminoimidazolsyntetasa
AMK	aminokyselina
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkinasa
ATIC	bifunkční enzym PDNS (AICART a IMPCH)
AZT	3-azido-3-deoxythymidin – zidovudin
CA	„Cluster Analysis“ – klastrová (shluková) analýza
CAIRS	fosforibosylaminoimidazolkarboxylasa
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CE	kapilární elektroforéza
CID	„Collision Induced Dissociation“ – technika kolizí indukované disociace
clr	„Centered Log-Ratio“ – typ transformace dat
CNT	„Concentrative Nucleoside Transporters“ – koncentrační nukleosidový transportér
CRISPR/Cas9	„Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ and CRISPR Associated System 9“ – technika úpravy genomu
crRNA	CRISPR RNA
CV	„Coefficient of Variation“ – variační koeficient
DA	„Discriminant Analysis“ – diskriminační analýza
DDA	„Data Dependent Analysis“ – data dependentní analýza
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ – buněčné kultivační médium
<i>ei</i>	„equilibrative insensitive“ – ekvilibrační nesenzitivní ENT2 transportér
ENT	„Equilibrative Nucleoside Transporters“ – ekvilibrační nukleosidový transportér
<i>es</i>	„equilibrative sensitive“ – ekvilibrační senzitivní ENT1 transportér
ESI	elektrosprej
FGAMS	fosforibosylformylglycinamidinsyntetasa
FWHM	„Full Width at Half Maximum“ – šířka píku v polovině jeho výšky
GARS	glycinamidribonukleotidsyntetasa
GART	Glycinamidribonukleotidtransformylasa – trifunkční enzym PDNS (GARS, GART a AIRS)
GC	plynová chromatografie
HDR	„Homologous Directed Repair“ – homologně řízené opravy
HeLa	„Henrietta Lacks“ – první lidská rakovinná buněčná linie
HGPRT	hypoxantinguaninfosforibosyltransferasa
HILIC	„Hydrophilic Interaction Chromatography“ – hydrofilní interakční chromatografie

HIV	„Human Immunodeficiency Virus“ – virus lidské imunodeficiency
HMDB	„Human Metabolome DataBase“ – online databáze
HNH	nukleasová doména Cas proteinu
IMPCH	inosinmonofosfácyklohydrolasa
KEGG	„Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ – online databáze
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí
LDA	„Linear Discriminant Analysis“ – lineární diskriminační analýza
LOESS	statistická regresní metoda
LIPID MAPS	„Lipid Metabolites And Pathways Strategy“ – online databáze
MEM	„Minimum Essential Medium“ – buněčné kultivační médium
MI	„MonoIsotopic mass“ – monoizotopická hmotnost
MLR	„Multiple Linear Regression“ – vícerozměrná lineární regrese
MP	merkaptopurin
MVDA	„MultiVariate Data Analysis“ – vícerozměrná statistická analýza
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
NBMPR	nitrobenzylmerkaptopurinribosid
NCE	„Normalized Collision Energy“ – normalizovaná kolizní energie
NHEJ	„Non-Homologous End Joining“ – nehomologní lepení konců
Nuc	nukleosid
OMIM	„Online Mendelian Inheritance in Man“ – online databáze dědičných genetických poruch
OPLS-DA	„Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců
OSC	„Orthogonal Signal Correction“ – korekce ortogonálního signálu
PAICS	bifunkční enzym PDNS (CAIRS a SAICARS)
PAM	„Protospacer Adjacent Motif“ – sekvence protospacer přilehlého motivu
PCA	„Principal Component Analysis“ – analýza hlavních komponent
PCs	„Principal Components“ – hlavní komponenty
PDNS	„Purine <i>De Novo</i> Synthesis“ – purinová <i>de novo</i> syntéza
PFAS	fosforibosylformylglycinamidinsyntetasa – monofunkční enzym PDNS
PLS-DA	„Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – diskriminační analýza nejmenších čtverců
PLS-R	„Partial Least Squares-Regression“ – PLS-regrese
pqn	„Probabilistic Quotient Normalization“ – typ transformace dat
PRPPS	fosforibosylpyrofosfátsyntetasa
Pun	purinové nukleosidy
Pyn	pyrimidinové nukleosidy
QC vzorek	„Quality Control“ – vzorek kontroly kvality
QqQ	tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem
Q-TOF	tandemový hmotnostní spektrometr s kvadrupólem a analyzátozem doby letu
ROC křivka	„Receiver Operating Characteristic“ – nástroj posuzující diagnostické testy
RT	„Retention Time“ – retenční čas
RuvC	nukleasová doména Cas proteinu
SAICARS	fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxyamidsyntetasa

SD	„Standard Deviation“ – směrodatná odchylka
sgRNA	„single guide RNA“ – naváděcí RNA
sMRM	„Scheduled Multiple Reaction Monitoring“ – MRM přechod
SPLS-DA	„Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis“ – rozptýlená diskriminační analýza nejmenších čtverců
SSP geny	„Serine Synthesis Pathway“ – geny ovlivňující syntézu serinu
TALE	„Transcription Activator Like Effector“ – motiv efektoru podobného transkripčnímu aktivátoru
TALENs	„Transcription Activator Like Effector Nucleases“ – nukleasy motivu efektoru podobného transkripčnímu aktivátoru
tracrRNA	„trans-activating crRNA“ – transaktivační crRNA
UHPLC	„Ultra-High Performance Liquid Chromatography“ – ultraúčinná kapalinová chromatografie
VIP graf	„Variable Importance for the Projection“ – graf významnosti proměnných v projekci
ZF	„Zinc Finger“ – motiv zinkového prstu
ZFNs	„Zinc Finger Nucleases“ – nukleasy motivu zinkového prstu

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam metabolitů z tabulek OPLS-DA VIP a vulkánových grafů

2nh2ADI	2-aminoadipát
2ohisoVAL	2-hydroxyisovalerát
3m2oBUT	3-metyl-2-oxobutanoát
3nh2ISOBUT	3-aminoisobutyrate
4nh2BUT	4-aminobutanoát
5-mC	5-metylcytidin
5nh2LEV	5-aminolevulinát
7-mG	7-metylguanin
acMET	N-acetylmethionin
ADE	adenylylsulfát
ADP	adenosindifosfát
AICAr	5-aminoimidazol-4-karboxyamidribosid
AICAr-3P	5-aminoimidazol-4-karboxyamidribosid trifosfát
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxyamidribotid
AIr	5-aminoimidazolribosid
AIR	5-aminoimidazolribotid
ALA	alanin
ALA-GLN	alanylglutamin
AMP	adenosinmonofosfát
ASP	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
BET	betain
bALA	beta-alanin
C0	karnitin
C2	acetylkarnitin
C2-DC/C3-OH	oxalylkarnitin/hydroxypropionylkarnitin
C3	propionylkarnitin
C3.1	propenoylkarnitin
C3-DC/C4-OH	malonylkarnitin/hydroxybutyrylkarnitin
C4	butyrylkarnitin
C4-OH	hydroxybutyrylkarnitin
C4-DC/C5-OH	sukcinylkarnitin/hydroxyvalerylkarnitin
C5	valerylkarnitin
C6	hexanoylkarnitin
C12	dodekanoylkarnitin
C14	tetradekanoylkarnitin
C14.1	tetradecenoylkarnitin
C14.1-OH	hydroxytetradecenoylkarnitin
C16	hexadekanoylkarnitin (palmitoylkarnitin)
C16.1	hexadecenoylkarnitin
C16.1-OH	hydroxyhexadecenoylkarnitin
C18	oktadekanoylkarnitin (stearoylkarnitin)
C18.1	oktadecenoylkarnitin (oleoylkarnitin)
C18.2	oktadekadienylkarnitin (linoleoylkarnitin)
C20.1	eikosenoylkarnitin

C22.1	dokosadecenylkarnitin
CAIr	karboxyaminoimidazolribosid
CDP	cytidindifosfát
CDP-CH	CDP-cholin
CMP	cytidinmonofosfát
Cr	cytidin
CTP	cytidintrifosfát
CYSTAT	L-cystathionin
dAMP	deoxyadenosinmonofosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
deamino-NAD ⁺	deamino-NAD ⁺
DHF	dihydrofolát
dimGLY	N,N-dimetylglucin
dTTP	deoxythymidintrifosfát
ERY4P	erytroza-4-fosfát
EtOHNH2P	etanolaminfosfát
FAICAR	5-formylamidinimidazol-4-karboxyamidribotid
FGAr	N-formylglucinamidribosid
FGAr-2P	N-formylglucinamidribosid difosfát
FGAr-3P	N-formylglucinamidribosid trifosfát
FGAR	N-formylglucinamidribotid
FGAMr	N-formylglucinamidinribosid
FGAMR	N-formylglucinamidinribotid
FRU6P	fruktosa-6-fosfát
FUK	fukosa
FUM	fumarát
GALAKT	galaktitol
GAL1P	galaktosa-1-fosfát
GAr	glycinamidribosid
GAR	glycinamidribotid
GDP	guanosindifosfát
GDPFUK	GDP-L-fukosa
GDPMAN	GDP-mannosa
GLÁT3P	3-fosfoglycerát
GLC1P	glukosa-1-fosfát
GLC6P	glukosa-6-fosfát
GLCnh2	glukosamin
GLY	glycin
GLU	kyselina glutamová
GMP	guanosinmonofosfát
GROL3P	glycerol-3-fosfát
GSH	glutation
GTP	guanosintrifosfát
GuaAc	guanidinoacetát
GuaBUT	4-guanidinobutanoát
hPRO	hydroxyprolin
CHO	cholin
IDP	inosindifosfát
IMP	inosinmonofosfát
ITP	inosintrifosfát

KAP	kyselina kaprová
KRE	kreatin
KYN	kynurenát
LAK	laktát
MAL	malát
MANNI	mannitol
MET	methionin
NAcASP	N-acetylaspartát
NAcGALnh2	N-acetylgalaktosamin
NAcGLCnh2	N-acetylglukosamin
NacGLU	N-acetylglutamát
NAcMANnh2	N-acetylmannosamin
NacPut	N-acetylputrescin
NAMN	nicotinamidmononukleotid
nh2isobut	kyselina 2-aminoisobutanová
NmHIS	N-metylhistamin
oPRO	5-oxoprolin
OPSER	O-fosfo-L-serin
PANTO	pantothenát
PC	fosfatidylcholin
PEP	fosfoenolpyruvát
PIPE	pipekolát
PRA	fosforibosylamin
PRO	prolin
PRPP	5-fosforibosylpyrofosfát
PS	fosfatidylserin
pseuUR	pseudouridin
SAdo	sukcinyladenoin
SAICAr	5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxyamid)ribosid
SAICAR	5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxyamid)ribotid
S-AMP	adenylsukcinát
SARK	sarkosin
sArMET / SAM	S-adenosyl-L-methionine
SER	serin
SORB6P	sorbitol-6-fosfát
SPER	spermin
TAU	taurin
THF	tetrahydrofolát
THRE	threonát
UDP	uridindifosfát
UDP.NAcGLCnh2	UDP-N-acetyl-D-glukosamin