

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



STRUKTURNÍ METABOLOMICKÁ ANALÝZA
VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH PORUCH
METABOLISMU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2023

Mgr. Lucie Mádrová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Mgr. Lucie Mádrová

STRUKTURNÍ METABOLOMICKÁ ANALÝZA
VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH PORUCH
METABOLISMU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během presenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2015 – březen 2023.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 31. 3 2023

.....

Lucie Mádrová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při sepisování odborných publikací a disertační práce. Děkuji mu za jeho nadhled v každé situaci a za důvěru ve zdárné dokončení mého doktorského studia.

Nesmírné poděkování věnuji všem kolegům z Laboratoře metabolomiky a Laboratoře dědičných metabolických poruch za jejich ochotu vždy pomoci a vytváření opravdu pohodového pracovního prostředí. Mé poděkování patří také pracovníkům Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu v Praze za spolupráci.

Děkuji všem členům méj rodiny za podporu během studia. Největší díky náleží mému partnerovi Jendovi za lásku, trpělivost, motivaci a pomoc s našimi dvěma dětmi Julinkou a Matýskem.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Lucie Mádrová
Název disertační práce:	Strukturní metabolomická analýza vybraných dědičných poruch metabolismu.
Název disertační práce anglicky:	Structural metabolomic analysis of selected inborn errors of metabolism.
Studijní program:	Lékařská chemie a klinická biochemie
Školitel:	prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023
Klíčová slova v češtině:	metabolomika, hmotnostní spektrometrie, fragmentace, strukturní identifikace, spektrální stromy, purinová <i>de novo</i> syntéza, HeLa buňky, dědičné metabolické poruchy
Klíčová slova v angličtině:	metabolomics, mass spectrometry, fragmentation, structural elucidation, spectral trees, purine <i>de novo</i> synthesis, HeLa cells, inherited metabolic disorders

SOUHRN

Dědičné metabolické poruchy purinové *de novo* syntézy (PDNS) tvoří skupinu onemocnění s raritním výskytem. Počet pacientů se pohybuje v jednotkách, maximálně desítkách, a to celosvětově. Komplikovanost diagnostiky je dána jednak nespecifickými klinickými příznaky, ale zejména neexistencí analytických metod vzhledem k nedostupnosti standardů metabolitů PDNS.

První část disertační práce je věnována využití techniky hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením k charakterizaci doposud nepopsaného fragmentačního chování meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem. Tyto látky byly připraveny pomocí bakteriálních rekombinantních proteinů či chemickou syntézou. Bylo zjištěno, že u většiny těchto metabolitů dochází v prvním stupni fragmentace (MS^2) ke štěpení glykosidové vazby. Výjimku tvořily první čtyři ribotidy dráhy PDNS, u nichž docházelo přednostně ke ztrátě vody, fosfátové skupiny nebo štěpení vznikajícího purinového skeletu. Fragmentace byla provedena do 3.-6. stupně a získaná hmotnostní spektra byla uspořádána do formy spektrálních stromů. Dále byla vyvinuta metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí, která byla aplikována na CRISPR-Cas9 editované HeLa buňky deficitní v jednotlivých enzimech PDNS. Identita syntetizovaných meziproductů PDNS byla ověřena porovnáním jejich fragmentačních spekter se spektry analogických metabolitů, které byly produkovány buňkami. K potvrzení fragmentačního chování metabolitů PDNS bylo použito izotopové značení během kultivace buněk. Přístup může být uplatněn při diagnostice poruch PDNS, studiu purinosomu, výzkumu rakoviny, enzymových kinetických studiích a dalších.

V rámci druhé části disertační práce byly studovány změny v metabolomickém profilu CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buněk, deficitních v jednotlivých enzimech PDNS. Pro komplexní charakterizaci metabolomického profilu buněčných linií byla použita kombinace necíleného a cíleného přístupu metabolomické analýzy. Obě byly provedeny pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla vyhodnocena metodami jedno- a vícerozměrné statistické analýzy. Data z cílené analýzy byla zpracována programem Cytoscape pro jejich lepší vizualizaci. Identita významných metabolitů

z necílené analýzy byla potvrzena fragmentací. Ke statisticky významným metabolickým změnám všech PDNS-deficitních linií v porovnání s kontrolou patřily především meziprodukty PDNS. Navzdory významným změnám v purinovém metabolismu nedošlo u PDNS-deficitních buněk k posunu energetického náboje mimo fyziologické rozmezí. Dále byly pozorovány změny v hladinách pyrimidinů, acylovaných karnitinů a metabolitů jednouhlíkového metabolismu. Zjištěné změny v metabolomu PDNS-deficitních buněk mohou představovat obdobné změny nastávající u pacientů trpících poruchami PDNS, a mohou pomoci při studiu těchto nepříliš prozkoumaných chorob.

Klíčová slova: metabolomika, hmotnostní spektrometrie, fragmentace, strukturní identifikace, spektrální stromy, purinová *de novo* syntéza, HeLa buňky, dědičné metabolické poruchy.

SUMMARY

Defects in purine *de novo* synthesis are a group of rare inherited metabolic disorders. In total, number of patients does not exceed one hundred worldwide. Diagnosis is complicated due to nonspecific clinical signs but especially because of analytical reasons (sensitivity) and commercial unavailability of standards of PDNS metabolites.

The first part of the dissertation was devoted to the characterization of fragmentation behavior of intermediates of PDNS and their dephosphorylated analogues by means of mass spectrometry which has not been described so far. These compounds were synthesized with the use of bacterial recombinant enzymes or by chemical synthesis. Except for four initial ribotide PDNS intermediates that preferred losing water, phosphate or cleave forming base of purine ring, all the other metabolites studied cleaved the glycosidic bond in the first fragmentation stage. Fragmentation was possible to 3th-6th stages and acquired mass spectra were organized into spectral trees. Liquid-chromatography-high resolution mass spectrometric method was developed and applied in the analysis of CRISPR-Cas9 genome-edited HeLa cells deficient in individual steps of PDNS and salvage pathway. Fragmentation patterns of synthesized metabolites of PDNS were compared with those produced by the cells to confirm the identity of newly synthesized metabolites forming during pathological conditions of both known and theoretical defects of PDNS. Use of stable isotope labelling enabled confirmation of fragmentation mechanisms. The approach might be applicable in diagnosing PDNS deficits, enzyme kinetic studies, formation of purinosomes, cancer research and others.

The second part of the dissertation describes metabolic changes of CRISPR-Cas9 genome-edited HeLa cells which were also used in the first study. High performance liquid chromatography coupled with high resolution tandem mass spectrometry were used for both targeted and untargeted metabolomic analyses. Data from the targeted analysis were processed in Cytoscape to better visualize metabolic pathways that were affected the most. Fragmentation analysis was conducted for statistically significant features from the untargeted analysis. The most statistically

significant metabolites found in the deficient cell lines compared to controls were the intermediates of PDNS preceding the defective enzyme. Cellular adenylate energy charge of PDNS deficient cells was not deviated out of physiological range compared to controls despite altered pool of adenine and guanine nucleotides. Changes were detected also in the levels of pyrimidines, acylcarnitines, and metabolites of one carbon metabolism. Metabolic changes found in HeLa cells deficient in PDNS represents a model of changes that might be analogical in the cells of patients, and it could be beneficial in understanding these still not well-known enzyme defects.

Keywords: metabolomics, mass spectrometry, fragmentation, structural elucidation, spectral trees purine *de novo* synthesis, HeLa cells, inherited metabolic disorders.

OBSAH

1	ÚVOD.....	- 1 -
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 3 -
2.1	Metabolomika	- 3 -
2.1.1	Metabolomické přístupy.....	- 4 -
2.1.2	Metabolomická analýza	- 6 -
2.1.3	Strukturní identifikace.....	- 8 -
2.2	Role purinových nukleotidů v organismu.....	- 11 -
2.2.1	Biosyntéza a degradace	- 11 -
2.2.2	Purinová <i>de novo</i> syntéza.....	- 14 -
2.2.3	Purinosom	- 15 -
2.2.4	Regulace PDNS.....	- 16 -
2.2.5	Enzymové defekty PDNS	- 17 -
2.2.5.1	Deficit ADSL	- 17 -
2.2.5.2	Deficit ATIC (AICA-ribosidurie)	- 22 -
2.2.5.3	Deficit PAICS.....	- 26 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 29 -
3.1	Analýza meziproductů purinové <i>de novo</i> syntézy pomocí hmotnostní spektrometrie	- 29 -
3.1.1	Materiál a metody	- 29 -
3.1.1.1	Chemikálie.....	- 29 -
3.1.1.2	Příprava a čištění meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných analogů -	29 -
3.1.1.3	Fragmentační analýza meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných analogů (HPLC-HRMS ⁿ)	- 32 -

3.1.1.4	Kultivace a sklizení buněk.....	- 33 -
3.1.1.5	Analýza buněčných lyzátů a kultivačního média	- 34 -
3.1.2	Výsledky	- 35 -
3.1.2.1	Příprava a čištění meziproduktů PDNS a jejich defosforylovaných analogů -	35 -
3.1.2.2	Vícestupňová fragmentační analýza pomocí Orbitrapu Elite... -	36 -
3.1.2.2.1	Analýza meziproduktů PDNS v CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buňkách -	52 -
3.1.3	Diskuze	- 55 -
3.1.3.1	Fragmentační analýza meziproduktů PDNS a jejich defosforylovaných analogů.....	- 55 -
3.1.3.2	Analýza meziproduktů PDNS v CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buňkách -	58 -
3.2	Kombinovaná cílená a necílená metabolomická analýza HeLa buněk deficitních v purinové <i>de novo</i> syntéze.....	- 62 -
3.2.1	Materiál a metody	- 62 -
3.2.1.1	Chemikálie	- 62 -
3.2.1.2	Kultivace, sklizení buněk a příprava vzorků	- 62 -
3.2.1.3	Necílená metabolomická analýza	- 63 -
3.2.1.4	Cílená metabolomická analýza	- 64 -
3.2.1.5	Zpracování dat	- 64 -
3.2.1.6	Statistická analýza.....	- 65 -
3.2.2	Výsledky	- 66 -
3.2.2.1.1	Necílená metabolomická analýza.....	- 66 -
3.2.2.1.2	Cílená metabolomická analýza.....	- 74 -
3.2.3	Diskuze	- 78 -

3.2.3.1	Necílená metabolomika.....	- 79 -
3.2.3.2	Cílená metabolomika.....	- 80 -
4	ZÁVĚR.....	- 86 -
4.1	Analýza meziproduktů purinové <i>de novo</i> syntézy pomocí hmotnostní spektrometrie	- 86 -
4.2	Kombinovaná cílená a necílená metabolomická analýza HeLa buněk deficitních v purinové <i>de novo</i> syntéze	- 87 -
5	VÝHLEDY	- 88 -
6	LITERATURA	- 89 -
7	SEZNAM PRACÍ.....	- 106 -
7.1	Publikace s IF vztahující se k disertaci	- 106 -
7.2	Publikace v recenzovaných časopisech vztahující se k disertaci.....	- 106 -
7.3	Ostatní publikace	- 106 -
7.4	Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci	- 107 -
7.5	Ostatní příspěvky na konferencích.....	- 108 -
8	PŘÍLOHA.....	- 111 -
8.1	PCA biploty jednotlivých PDNS-deficitních linií z necílené metabolomické analýzy.....	- 111 -

SEZNAM ZKRATEK

ADSL	adenylosukcinátlyasa
ADSS	adenylsukcinátsynthasa
AICAR	aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
AICARTF	5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidformyltransferasa
AIR	aminoimidazol ribonukleotid
AIRS	fosforibosylaminoimidazolsynthetasa
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkinasa
APRT	adeninfosforibosyltransferasa
ATIC	bifunkční enzym AICARTF+IMPCH
ATP	adenosintrifosfát
CAIR	karboxyaminoimidazol ribonukleotid
CAIRS	fosforibosylaminoimidazolkarboxylasa
CE	kapilární elektroforéza
CID	kolizi indukovaná disociace
CK2	kaseinkinasa 2
CSF	cerebrospinální tekutina
CV	variační koeficient
DI	přímý nástřik do hmotnostního spektrometru
DMP	dědičné metabolické poruchy
ESI	elektrosprejová ionizace
FAICAR	5'-fosforibosyl-5-formamido-4-imidazolkarboxamid
FGAMR	N-formylglycinamidin ribonukleotid
FGAMS/PFAS	fosforibosylformylglycinamidinsynthasa
FGAR	formylglycinamid ribonukleotid
FIA	průtoková injekční analýza
FWHM	šířka píku v polovině výšky
GAR	N-glycinamid ribonukleotid
GARS	fosforibosylglycinamidsynthetasa

GART	fosforibosylglycinamidformyltransferasa/ trifunkční enzym (GARS+AIRS+GART)
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát
HCD	disociace velkou kolizní energií
HGPRT	hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasa
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HRMS ⁿ	HRMS, která umožňuje měření vícestupňových fragmentačních spekter
Hsp90	proteiny tepelného šoku 90
IMP	inosinmonofosfát
IMPCH	IMP cyklohydrolasa
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
MRM	sledování produktů rozpadu molekulového iontu
MS/MS	tandemová hmotností spektrometrie
MSI	Metabolomics Standards Initiative
mTOR	savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců
PCA	analýza hlavních komponent
PD médium	médium bez obsahu purinů
PDNS	purinová <i>de novo</i> syntéza
PIF	Precursor Ion Fingerprinting

PNP	purinnukleosidfosforylase
PPAT	fosforibosylpyrofosfátamidotransferase
PQD	pulzní disociace
PRA	fosforibosylamin
PRPP	fosforibosylpyrofosfát
QC	vzorek kontroly kvality
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor
RPLC	chromatografie na reverzní fázi
SAdo	sukcinyladenosen
SAICAR	N-sukcinokarboxamid-5-aminoimidazol-4-ribonukleotid
SAICARS	fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamidsynthetase
SAMP	sukcinyladenosenmonofosfát
SD	směrodatná odchylka
SRM	sledování produktu rozpadu molekulového iontu
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
t_R	retenční čas
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
VIP	graf významnosti proměnných v projekci
XO	xantioxidase

1 ÚVOD

Purinová *de novo* syntéza (PDNS) je jednou z nejstarších a stěžejních metabolických drah, která z evolučního hlediska vykazuje vysoký stupeň konzervace. U savců je PDNS sledem deseti enzymových reakcí, kdy postupně dochází k přeměně fosforibosylpyrofosfátu (PRPP) na inosinmonofosfát (IMP) pomocí šesti enzymů (tři enzymy jsou multifunkční). Purinové nukleotidy jsou nezbytnou součástí informačních molekul (DNA, RNA), podílí se na buněčné signalizaci, jsou hlavním zdrojem buněčné energie (fosforylované nukleotidy), fungují jako substráty a koenzymy naprosté většiny metabolických reakcí. Vzhledem k energetické náročnosti PDNS je potřebné množství purinových nukleotidů preferenčně zajišťováno pomocí záchranné (salvage) dráhy purinů. Hlavní roli převezme PDNS v G1/S-fázi buněčného cyklu a při buněčném dělení.

Doposud byly popsány tři geneticky podmíněné metabolické poruchy PDNS s raritním výskytem. Jedná se o deficit enzymu adenylosukcinátlyasy (ADSL, EC 4.3.2.2, OMIM 103050), AICA ribosidurii (deficitATIC, EC 2.1.2.3 a 3.5.4.10, OMIM 608688) a nedávno popsaný deficit PAICS (EC 4.1.1.21 a 6.3.2.6, OMIM 619859). Tyto poruchy se projevují neurologickými problémy, jako jsou mentální retardace, epileptické záchvaty, slepota, autistické chování a jiné. Existence dalších geneticky podmíněných poruch této metabolické dráhy zatím nebyla potvrzena, ale je vysoce pravděpodobná. Nízký počet diagnostikovaných pacientů může být dán tím, že 1) enzymový defekt nezpůsobí závažné klinické projevy 2) enzymový defekt je naopak neslučitelný s embryonálním vývojem 3) diagnostické/screeningové metody jsou náročné a drahé, což znemožňuje jejich běžné použití.

Tato práce byla věnována hmotnostně-spektrometrické charakterizaci meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem. Získané informace byly využity při kombinované (cílené a necílené) metabolické analýze CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buněčných liniích, defektních v jednotlivých krocích PDNS, které představují první lidské buněčné modely lidské modely pro známá

i potenciální onemocnění PDNS. Nalezené rozdíly v metabolickém profilu jednotlivých PDNS deficitních buněčných linií jsou popsány a diskutovány.

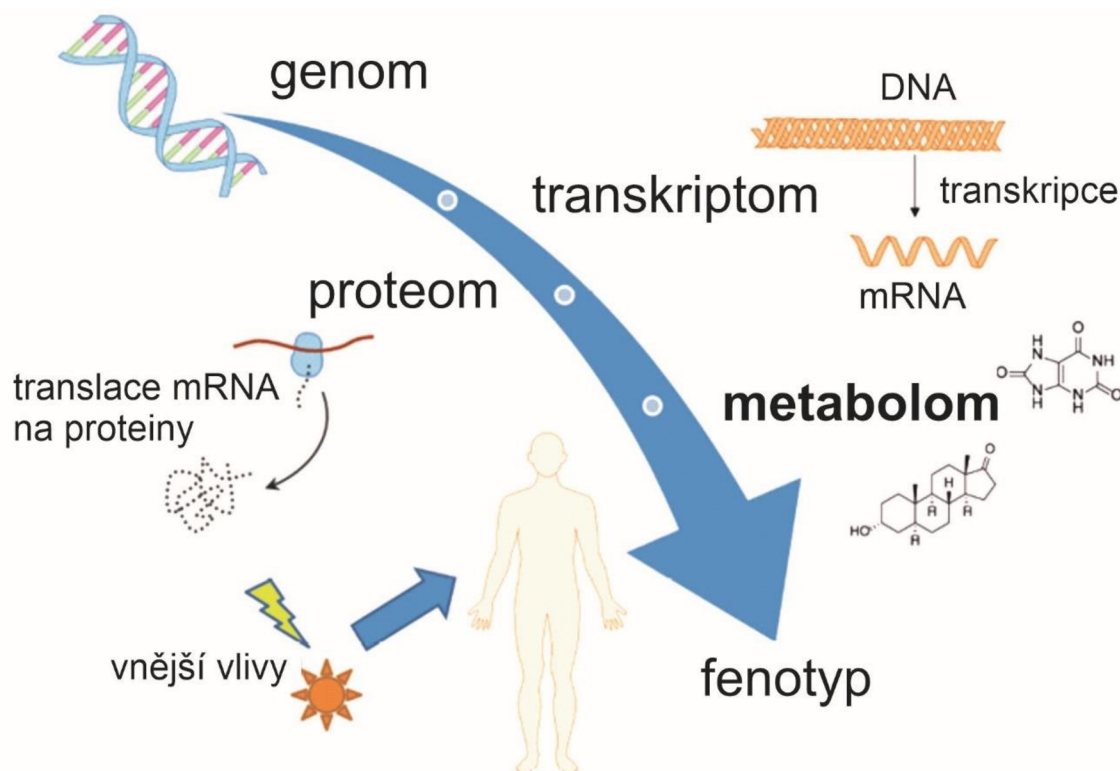
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metabolomika

Metabolomika je vědní disciplína, která se zabývá studiem nízkomolekulárních látek v biologických systémech. Tento soubor malých molekul (do molekulové hmotnosti 1500 Da) v biologickém systému (např. buňce, tkáni, orgánu či organismu) v daném čase se nazývá metabolom a byl poprvé definován v roce 1998 [1].

Metabolom je tvořen jednak endogenními metabolity, které vznikají v rámci anabolických a katabolických metabolických drah v organismu, a také exogenními metabolity, které pochází z vnějšího prostředí (např. polutanty, léčiva). Složení metabolomu je tedy velice komplexní, mimo genotypu odráží také vliv životního prostředí, mikrobiomu a příjmu cizorodých látek (např. doplňky stravy, léčiva, kosmetika). Lidský metabolom je tvořený více jak 30 000 látkami (např. nukleotidy, aminokyseliny, sacharidy), a téměř 100 000 látkami, pokud započítáme i exogenní metabolity [2].

Metabolomika společně s genomikou, transkriptomikou, proteomikou a lipidomikou tvoří soubor tzv. „omických“ věd (Obr. 1). Genom je poměrně stálý soubor kódujících a nekódujících sekvencí DNA, transkriptom vzniká přepisem částí DNA (z DNA do mediátorové RNA – mRNA), a překladem (translací) mRNA vznikají proteiny, které společně tvoří proteom. Aktivitou části proteomu (enzymů) vznikají metabolity. Lipidomika byla původně součástí metabolomiky, dnes již tvoří samostatnou vědní disciplínu, zabývající se studiem lipidů. Na rozdíl od transkriptomu a proteomu dokáže metabolom (společně s lipidomem) přesněji charakterizovat aktuální změny v metabolických drahách [3].



Obrázek 1. Schéma propojení různých „omických“ věd jako je genomika, transkriptomika, proteomika a metabolomika (upraveno podle [4]).

2.1.1 Metabolomické přístupy

V dnešní době se v metabolomice rozlišují tři přístupy: cílená, „semi-targeted“ a necílená analýza. Hlavní rozdíly spočívají zejména v počtu analyzovaných metabolitů, stupni kvantifikace či náročnosti přípravy vzorku.

Cílená a „semi-targeted“ metabolomika

Tyto dva typy metabolomických přístupů lze obecně charakterizovat jako kvantitativní (v případě „semi-targeted“ analýzy semikvantitativní) analýzy zaměřené na menší skupiny metabolitů (aminokyseliny, acylkarnitiny, nukleotidy aj.), které jsou předem vybrány a hledány ve vzorku. Na základě znalosti chemických vlastností měřených metabolitů bývá příprava vzorku přizpůsobena tak, aby extrakční účinnost byla co nejvyšší a také aby docházelo k co nejmenšímu vlivu matrice. Informací o analyzovaných metabolitech se dále využívá při výběru nejvhodnější analytické metody k dosažení vysoké selektivity, citlivosti a přesnosti. Analýza vybraných metabolitů je nejčastěji prováděna s pomocí

hmotnostních spektrometrů s trojitým kvadrupólem (QqQ) ve spojení s vysokouúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC – Ultrahigh Performance Liquid Chromatography) nebo kapilární elektroforézou. Trojitý kvadrupólový analyzátor většinou pracuje v módu „multiple-reaction monitoring“ (MRM). První kvadrupól slouží k výběru mateřského molekulového iontu (metabolitu), ve druhém kvadrupólu dochází k jeho fragmentaci, a ve třetím kvadrupólu je vybrán fragment s nejvyšší intenzitou, který je poté detekován. Každý metabolit vyžaduje jiné nastavení kvadrupólů. Změnou těchto parametrů pro jednotlivé metabolity vzniká cyklus MRM přechodů, během kterého jsou postupně měřeny všechny metabolity. Optimální nastavení kvadrupólů pro konkrétní metabolit je získáno analýzou certifikovaného standardu. Vysokou selektivitu, přesnost a absolutní kvantifikaci poskytují metody kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS), které využívají izotopově značených interních standardů představující analoga měřených metabolitů. Výhodou cílené a semi-targeted metabolomiky je rychlost zpracování dat, jelikož je identita metabolitů předem známá. Nevýhoda spočívá v omezeném počtu měřených metabolitů [5], [6].

Necílená metabolomika

Necílená analýza je nejvhodnějším nástrojem k nalezení nových metabolitů či biomarkerů onemocnění, jelikož je založena na měření širokého spektra látek daného biologického systému. Informace o specifických metabolitech a jejich biologické významnosti není *a priori* známa, čemuž odpovídá volba přípravy vzorku i použité analytické metody. Příprava vzorku často spočívá pouze v prostém naředění a/nebo vysrážení proteinů vhodným rozpouštědlem, protože při náročnější vícekrokové přípravě vzorku by mohlo docházet k nechtěné ztrátě metabolitů. K nejpoužívanější analytické metodě patří LC-MS díky schopnosti detekce širokého spektra analytů. K detekci jsou nejčastěji používány hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením (např. Orbitrap, analyzátor doby letu - TOF) nebo nukleární magnetická rezonance (NMR). Oproti cílené a „semi-targeted“ metabolomice je přesnost a správnost měření nižší, ale tento fakt je kompenzován

výhodou detekce velkého počtu metabolitů. Ve výsledku jsou získána semikvantitativní data. Nejnáročnější částí necílené metabolomiky je identifikace metabolitů, která představuje hlavní limitující faktor celé analýzy [5], [7], [8].

2.1.2 Metabolomická analýza

Vzhledem ke komplexnosti metabolomu je nezbytné definovat cíl studie tak, aby mohl být zvolen co nejvhodnější analytický přístup. Neexistuje žádná analytická metoda, která by ve studovaném biologickém systému byla schopna detekovat celý metabolom, z důvodu jak fyzikálně-chemické variability metabolitů, tak jejich výskytu v širokém koncentračním rozmezí. Tento problém je často řešen vícestupňovou extrakcí vzorku nebo použitím různých analytických přístupů [9]. V metabolomice jsou v současné době nejvíce používané separační metody kapalinové chromatografie (LC), plynové chromatografie (GC) a kapilární elektroforézy (CE) spojené s hmotnostní detekcí. Analýzou pomocí LC-MS lze detekovat široké spektrum metabolitů (např. aminokyseliny, organické kyseliny, nukleotidy, acylkarnitiny, sacharidy aj.), proto patří k nejpoužívanější kombinaci v metabolomických studiích [10]. Pro separaci polárních metabolitů je vhodná hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), méně polární a nepolární metabolity bývají separovány chromatografií na reverzní fázi (RPLC) [11]. GC je vhodná pro analýzu těkavých metabolitů, spíše polárních [12]. Nabitě látky lze separovat metodou CE [13].

Po chromatografickém rozdělení jsou metabolity analyzovány ve hmotnostním spektrometru ve formě pozitivních a/nebo negativních molekul (iontů) a jsou separovány na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Vzorek lze do hmotnostního spektrometru aplikovat i bez předchozí chromatografické separace, např. metodou přímé infuze (DI – Direct Infusion) nebo průtokovou injekční analýzou (FIA – Flow Injection Analysis). Pro vznik iontů bylo vyvinuto několik ionizačních technik, které se liší mírou dodané energie pro ionizaci (tvrdé a měkké techniky) a podmínkami pro vznik iontů (vakuum nebo atmosferický tlak) [14].

V metabolomice je nejvíce používaná technika ionizace elektrosprejem (ESI - Electrospray Ionization), představená v roce 1989 [15]. Vzhledem k nízké molekulové hmotnosti metabolitů vznikají při ESI většinou jednonásobně nabité ionty (protonované molekuly, adukty, fragmenty, artefakty atd.). Všechny tyto formy jednoho metabolitu jsou označovány jako „features“ a náleží jednomu chromatografickému píku. ESI ionizací je tedy vytvořeno velké množství features, ovšem počet detekovaných metabolitů je reálně nižší. Proto existují programy, které redukuje objem dat díky sdružování features jednotlivých metabolitů. Patří mezi ně např. Compound Discoverer (Thermo Fisher Scientific, USA), mzMine [16], CAMERA [17]. Features jsou poté prohledávány a přiřazovány pomocí metabolomických databází jako je například HMDB [2], Metlin [18], mzCloud (<https://mzcloud.org/>), LipidMaps (www.lipidmaps.org), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>). Na tomto místě se významně projevuje role použití hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením (HRMS). Se zvyšujícím se rozlišením klesá počet přiřazovaných molekul z databáze. S rostoucí hodnotou m/z počet přiřazených možností naopak roste. I při měření s odchylkou nižší jak 1 ppm lze vždy dosáhnout pouze 2. - 4. úrovně identifikace (úrovně identifikace jsou detailně popsány v následující kapitole). Existují sice hmotnostní spektrometry na principu orbitální pasti s Fourierovou transformací signálu, které dosahují rozlišení až 500 000 FWHM (Full Width at Half Maximum – šířka píku v polovině výšky), ovšem vždy je to na úkor delšího času skenování a nižšího počtu bodů na pík. To následně působí potíže při detekci a kvantifikaci píků [19]. Počet metabolitů, které nabízí databáze ke každé m/z lze také snížit díky znalostem enzymových přeměn studovaného metabolomu, které představují definovaný zisk či ztrátu atomů mezi substrátem a produktem enzymové reakce. Dále mohou být filtrovány metabolity, které z chemického hlediska při ionizaci nemohou vznikat [20].

V roce 2007 bylo definováno tzv. sedm zlatých pravidel pro identifikaci metabolitů, které pracují např. s maximálním počtem atomů uhlíku dle velikosti molekuly, izotopovým zastoupením, definovaným poměrem vodíku a uhlíku, informací vycházející z počtu vazeb v molekule a dalšími [21]. Šance

na identifikaci struktury neznámého metabolitu se také zvyšuje použitím vícestupňových fragmentačních spekter. Relativní zastoupení dceřiných iontů a jejich m/z tvoří otisk molekulární struktury prekurzoru. Tyto informace lze využít k identifikaci prekurzoru i dceřiných iontů buď na základě porovnání s daty ve spektrálních databázích nebo s pomocí programů umožňující *in silico* fragmentaci molekul (např. MassFrontier) [7], [22].

2.1.3 Strukturní identifikace

Jak už bylo zmíněno dříve, strukturní analýza a identifikace metabolitů jsou hlavním limitujícím faktorem necílené metabolomické studie. V roce 2007 představila Metabolomic Standard Initiative (MSI) pravidla pro určování čtyř úrovní identifikace látek v metabolomice s cílem třídít a publikovat i látky, u kterých je možná pouze částečná identifikace nebo které zatím identifikovat nelze vůbec (Tab. 1) [23]. Pro jednoznačnou identifikaci látky (úroveň 1) je zapotřebí porovnat dvě nebo více nezávislých ortogonálních vlastností, jako je retenční čas (t_R) s přesnou hodnotou m/z nebo s fragmentačním spektrem (MS/MS), se standardem dané látky, analyzovaným za stejných analytických podmínek. Pokud se pro porovnání použijí data standardu měřeného v jiné laboratoři, spolehlivost identifikace se sníží na úroveň 2. Pro analýzu izomerů je nutné aplikovat vhodnou separační metodu, která zajistí jejich jednoznačnou identifikaci, jelikož jsou výše uvedená pravidla v tomto případě nedostačující. Limitací identifikace na úrovni 1 je tedy dostupnost standardu studované látky [23].

Ve druhé a třetí úrovni je látka identifikována na základě porovnání jedné či více vlastností (t_R , m/z , MS/MS) s daty naměřenými v jiných laboratořích za odlišných podmínek měření. U látek analyzovaných metodou GC ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) lze látku jednoduše identifikovat porovnáním s daty ze spektrálních knihoven (např. NIST) vzhledem k reprodukovatelnosti dat. Používaná metoda ionizace nárazem elektronů u této analytické techniky totiž poskytuje vysoce uniformní (reprodukovatelná) fragmentační spektra. V případě LC-MS dat je porovnávána přesná hodnota m/z

v kombinaci s t_R a MS/MS s experimentálními/ *in silico* daty ve spektrálních databázích (např. HMDB, Metlin, mzCloud, LipidMaps)[23].

Ve čtvrté úrovni se neznámé (neidentifikovatelné) látky rozdělují na dvě skupiny, tzv. „known unknowns“ a „unknown unknowns“. Pokud je látka nazvána jako „known unknown“, její spektra se nachází v databázi, ovšem látka není identifikována. V případě „unknown unknown“ látky se jedná o nový metabolit, který doposud nebyl popsán. Fragmentační spektra nelze porovnat, protože se v databázích nenachází. I přes nemožnost identifikace látek zařazených do úrovně 4 je přínosné data publikovat a sdílet nově v databázích [23].

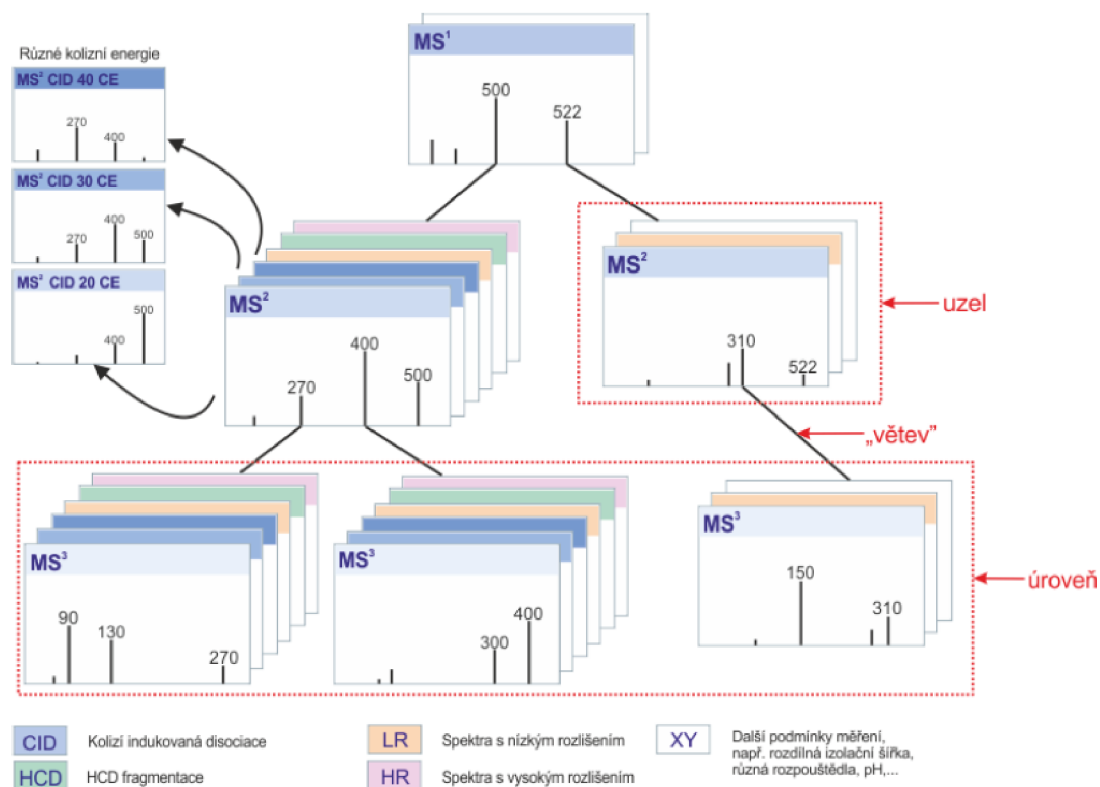
Tabulka 1. Úrovně identifikace látek dle Metabolomic Standard Initiative.

Úroveň	Spolehlivost identifikace	Charakteristika
1	Identifikovaná látka	Porovnání minimálně dvou nezávislých ortogonálních vlastností se standardem (např. t_R a hmotnostní spektrum, NMR spektrum a t_R , přesná hmota a izotopové složení).
2	Domněle identifikovaná látka	Neexistuje standard, porovnání na základě fyzikálně-chemických vlastností a strukturní podobnosti s dostupnými spektry (ve spektrálních databázích, odborných publikacích atd.).
3	Domněle identifikovaná skupina látek	Porovnání fyzikálně-chemických vlastností a strukturní podobnosti se známými látkami náležící do stejné chemické skupiny.
4	Neznámá látka	Látku nelze identifikovat ani klasifikovat.

Spektrální stromy

Při procesu identifikace neznámé molekuly můžeme pracovat také s informacemi obsaženými v tzv. spektrálních stromech. Jedná se o intuitivně organizované soubory víceúrovňových tandemových hmotnostních spekter (www.mzcloud.org, HighChem, SK). Každá molekula vytváří různá hmotnostní spektra v závislosti na technice fragmentace a použité kolizní energii. Spektrální strom obsahuje tři části (Obr. 2). První část je úroveň fragmentace, která odpovídá úrovni fragmentace (MS^n). Další je „větev“, která představuje hodnotu m/z prekurzorového iontu a spojuje úroveň s uzlem. Třetí částí je uzel, který obsahuje všechna spektra dceřiných iontů, pocházející z prekurzorového iontu. Tato spektra jsou měřena při různém rozlišení, různými fragmentačními technikami (HCD – vysokoenergetická kolizní disociace, CID – kolizí indukovaná disociace, PQD – pulzní disociace) a bývá aplikováno také široké spektrum kolizních energií pro získání co nejbohatších spekter. Díky tomu, že jsou při měření spekter používány různé podmínky měření (nastavení instrumentace), eliminuje se problém s reprodukovatelností dat.

Vůbec největší výhodou spektrálních stromů spočívá v možnosti částečné/úplné identifikace látek, které se v databázi nenachází. Mechanismus byl nazván „Precursor Ion Fingerprinting (PIF)“, a vychází z faktu, že strukturně podobné látky obsahují identické části svých molekul (substruktury). Jedinečným spojením substruktur vzniká unikátní molekula. Kromě dalších parametrů je vznik fragmentového iontu závislý na jeho struktuře, ale naopak vůbec nezávisí na struktuře prekurzorového iontu ani na ionizační technice. Tímto způsobem k sobě mohou být přiřazena identická spektra fragmentových iontů, aniž by sdílela stejnou strukturu iontu prekurzorového (původní molekuly). Přiřazení je dále nezávislé na úrovni MS, ale pravděpodobnost identifikace výrazně stoupá ve vyšších MS úrovních [24]–[26].



Obrázek 2. Schéma spektrálního stromu. Větve spojují prekurzorové ionty s uzly dceřiných spekter, měřených při různých podmínkách fragmentace. Zobrazena je fragmentace do úrovně MS³ (upraveno podle www.mzcloud.org, HighChem, SK).

2.2 Role purinových nukleotidů v organismu

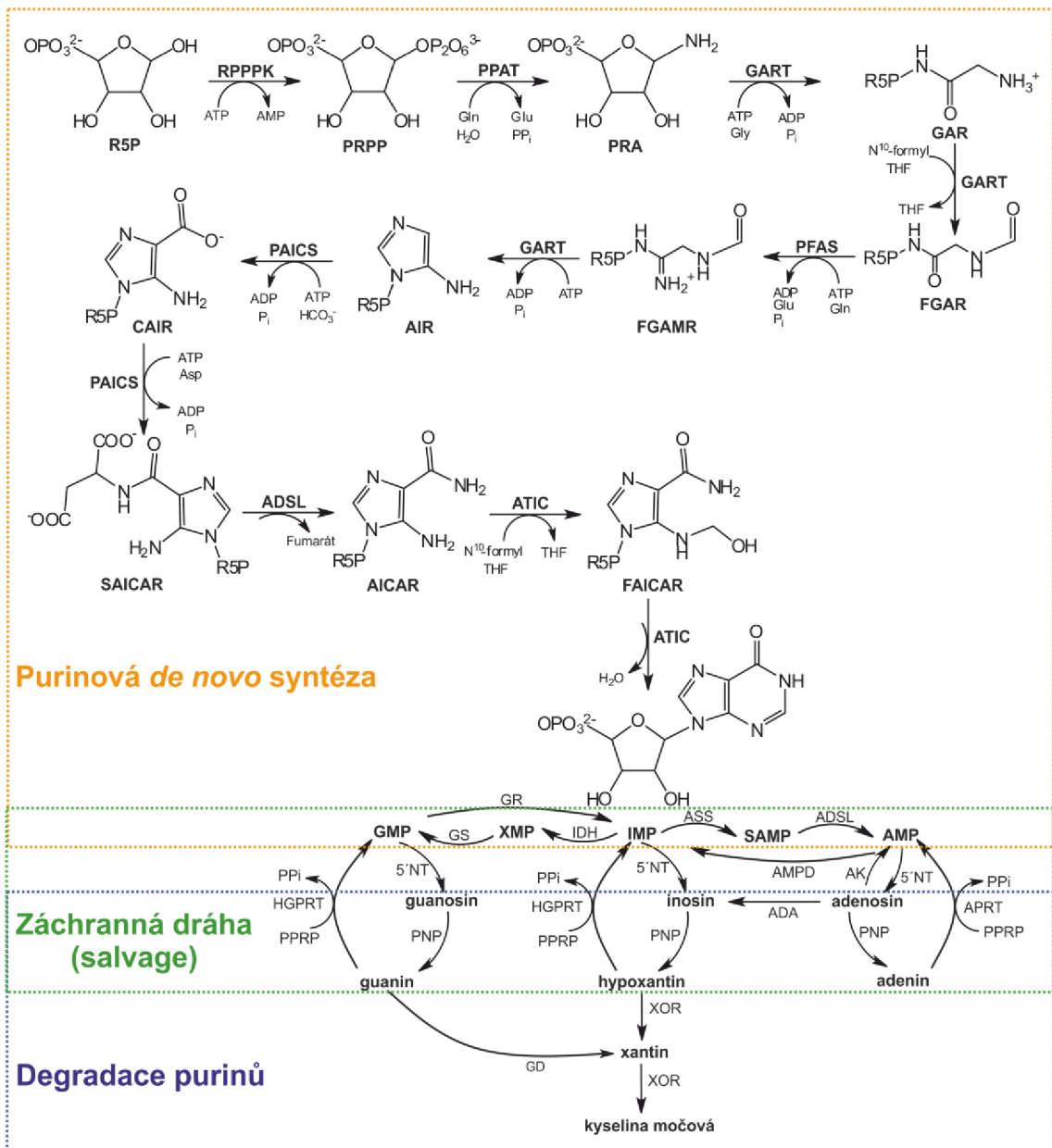
Purinové nukleotidy se řadí k jedné z nejpočetnějších skupin metabolitů v savčích buňkách, zejména díky poskytování základních stavebních jednotek pro syntézu DNA a RNA. Mimo to jsou purinové nukleotidy, jako adenosintrifosfát (ATP) či guanosintrifosfát (GTP), nezbytné pro udržování energetické homeostázy buňky a při procesech buněčné signalizace (např. ve formě cyklického adenosinonofosfátu, cAMP). Puriny mohou být také začleněny do komplexních biomolekul a mít funkci kofaktorů (nikotinamidadenindinukleotid - NADH, koenzym A a jiné).

2.2.1 Biosyntéza a degradace

Metabolismus purinů udržuje adenylátový a guanylátový pool v buňce syntézou a degradací purinových nukleotidů. V lidských buňkách jsou puriny

syntetizovány dvěma rozdílnými cestami: tzv. záchrannou (salvage) dráhou a purinovou *de novo* syntézou (Obr. 3). Záchranná dráha pokrývá naprostou většinu buněčné potřeby purinů recyklací degradovaných bází pomocí hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasy (HGPRT, EC 2.4.2.8) a adeninfosforibosyltransferasy (APRT, EC 2.4.2.7) a to z důvodu menší energetické náročnosti, na rozdíl od PDNS. HGPRT je Mg^{2+} dependentní enzym, který katalyzuje přenos fosforibosylové skupiny PRPP na hypoxantin a guanin za vzniku IMP a guanosinmonofosfátu (GMP). APRT katalyzuje přenos fosforibosylové skupiny PRPP na adenin za vzniku IMP a pro svou aktivitu taktéž potřebuje hořečnaté ionty. Volné báze mohou být do buňky přeneseny také z extracelulárního prostoru s následnou enzymatickou přeměnou na příslušné nukleotidy. Pokud dojde v buňce ke stavu zvýšené potřeby purinových nukleotidů, např. u dělicí se či rakovinné buňky, syntézu purinů většinou převeze PDNS.

Při degradaci purinových nukleotidů je inosin přeměněn na hypoxantin purinnukleosidfosforylasou (PNP, EC 2.4.2.1). Xantinoxidoreduktasa (XOR) poté katalyzuje oxidaci hypoxantinu na xantin a konečný produkt kyselinu močovou.



Obrázek 3. Schéma purinového metabolismu. Zkratky: 5'NT, 5'-nukleotidasa; ADA, adenosindeaminasa; AK, adenosinkinasa; ADP, adenosindifosfát; ADSL, adenylosukcinátlyasa; AMP, adenosinmonofosfát; AMPD, adenylátdeaminasa; APRT, adeninfosforibosyltransferasa; ASS, adenylosukcinátsynthetasa; ATP, adenosintrifosfát; GD, guanindeaminasa; GDP, guanosindifosfát; GMP, guanosinmonofosfát; GR, GMP reduktasa; GS, GMP synthasa; GTP, guanosintrifosfát; HGPRT, hypoxantinguaninfosforibosyltransferasa; IDH, IMP dehydrogenasa; IMP, inosinmonofosfát; PPi, anorganický pyrofosfát; S-AMP, adenylosukcinát; XMP, xantinmonofosfát; XOR, xantinoxidoreduktasa.

2.2.2 Purinová *de novo* syntéza

Purinová *de novo* syntéza je z evolučního hlediska vysoce konzervovaná a regulovaná metabolická dráha, která slouží k produkci IMP z PRPP za velké spotřeby buněčné energie. V lidských buňkách tato dráha představuje deset po sobě jdoucích reakcí katalyzovaných šesti enzymy (Obr. 3). První reakcí je vznik 5-fosforibosylaminu (PRA) z PRPP katalyzovanou fosforibosylpyrofosfátamidotransferasou (PPAT, EC 2.4.2.14). Tato reakce je považovaná za rychlost určující. Fosforibosylglycinamidsynthetasa (GARS, EC 6.3.4.13) katalyzuje přenos glycylové skupiny na PRA za vzniku N-glycinamid ribonukleotidu (GAR). Adicí formylové skupiny na GAR fosforibosylglycinamidformyltransferasou (GART, EC 2.1.2.2) vzniká formylglycinamid ribonukleotid (FGAR). Ve čtvrté reakci je FGAR přeměněn na N-formylglycinamidin ribonukleotid (FGAMR) fosforibosylformylglycinamidinsynthasou (FGAMS/PFAS, EC 6.3.5.3). Poté následuje vznik aminoimidazol ribonukleotidu (AIR) pomocí fosforibosylaminoimidazolsynthetasy (AIRS, EC 6.3.3.1). GARS, GART a AIRS společně tvoří domény trifunkčního enzymu GART, který v PDNS katalyzuje tři nezávislé reakce. Bifunkční enzym PAICS, tvořený fosforibosylaminoimidazolkarboxylasou (CAIRS, EC 4.1.1.21) a fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamidsynthetasou (SAICARS, EC 6.3.2.6), katalyzuje vznik N-sukcinokarboxamid-5-aminoimidazol-4-ribonukleotidu (SAICAR) z AIR (a poté z CAIR - karboxyaminoimidazol ribonukleotidu) v šesté a sedmé reakci PDNS. SAICAR je potom přeměněn na aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid (AICAR) enzymem adenylosukcinátlyasou (ADSL, EC 4.3.2.2). Tento enzym je bifunkční, zajišťuje ještě katalýzu AMP ze sukcinyladenosinmonofosfátu (SAMP) v cyklu purinových nukleotidů (viz Obr. 3). Je také zatím jediným enzymem PDNS, u kterého byla nalezena schopnost reverzibilní reakce. V posledních dvou reakcích dochází k přeměně AICAR na IMP přes meziproduct 5'-fosforibosyl-5-formamido-4-imidazolkarboxamid (FAICAR) pomocí bifunkčního enzymu ATIC složeného

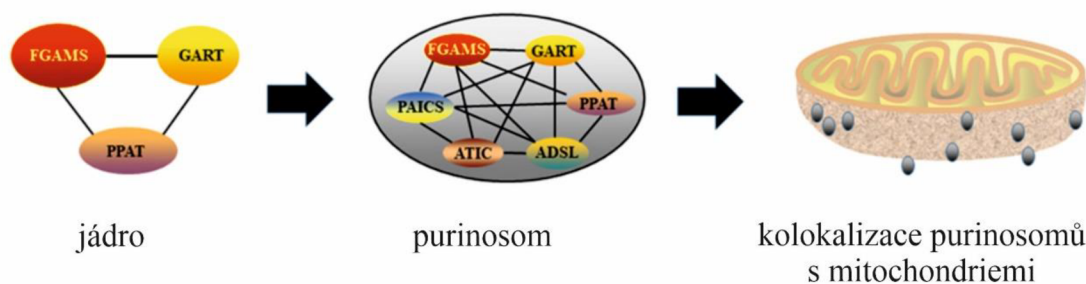
z 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidformyltransferasy (AICART, EC 2.1.2.3)/ IMP cyklohydrolasy (IMPCH, EC 3.5.4.10).

K syntéze jedné molekuly IMP je potřeba pět molekul ATP, dvou molekul glutaminu, dvou molekul formiátu a po jedné molekule glycinu, aspartátu a oxidu uhličitého [27], [28]. Jedná se tedy o energeticky vysoce náročnou syntézu, proto je využívána pouze v případech vysoké spotřeby purinů, jako je například G1 a S fáze buněčného dělení [29]. Enzymy PDNS jsou přítomné ve většině tkáních, ovšem jejich aktivita se výrazně liší. Nejvyšší aktivita PDNS byla naměřena v kosterním svalstvu, přesahující i aktivitu této dráhy v játrech. Vyšší aktivitu lze nalézt také v tkáních s velkou mírou obnovy, jako jsou střeva, kůže či kostní dřev. Naopak minimální aktivita byla nalezena v srdci a mozku (s výjimkou vyvíjejícího se mozku). Erytrocyty nemají všechny enzymy PDNS a nejsou tedy schopné produkovat puriny *de novo*. Chybí jim také některé enzymy záchranné a degradační dráhy, takže jsou závislé na extracelulárním příjmu adeninu [27].

2.2.3 Purinosom

V roce 2008 byla s pomocí fluorescenční mikroskopie provedena studie, která odhalila, že všech šest enzymů PDNS je schopno v podmínkách nedostatku purinů vytvářet metabolon – makromolekulární komplex sekvenčních enzymů a jiných buněčných komponent. Tento metabolon byl nazván purinosom [29]. Funkce purinosomu spočívá ve zvýšení rychlosti (fluxu) PDNS díky blízkosti enzymů, rychlém transportu meziproductů (zejména nestabilních) mezi enzymy a jejich aktivaci. U HeLa buněk kultivovaných v bezpurinovém médiu (PD médium) bylo pozorováno zvýšení fluxu PDNS o 50 %, vedoucí k trojnásobné produkci IMP [30]. Změnou složení kultivačního média HeLa buňkám bylo zjištěno, že dochází ke tvorbě purinosomů při nedostatku purinových nukleotidů a naopak k jejich rozpadu při dodání purinů do média, jedná se tedy o reverzibilní proces. Jádro purinosomu je tvořeno enzymy PPAT, GART a PFAS (Obr. 4). Trojice multifunkčních enzymů PAICS, ADSL a ATIC působí na periferii [28]. Enzymy spolu interagují, mutace v jednotlivých enzimech vedou buď ke snížené

tvorbě purinosomů nebo purinosomy nevznikají vůbec [31], [32]. Studie založené na analýzách fluorescence mikroskopii dále prokázaly kolokalizaci purinosomů s mikrotubuly a mitochondriemi [33], [34]. Mitochondrie mohou pro enzymy PDNS poskytovat několik výhod, např. vysoké koncentrace ATP potřebné k syntéze purinů, výměna ADP za ATP přes mitochondriální přenašeče (PDNS vyprodukuje mnoho ADP) či využití přenosu některých aminokyselin a formiátu z mitochondrie do cytosolu [28].



Obrázek 4. Vznik purinosomu a jeho interakce s mitochondriemi. Enzymy PPAT, GART a FGAMS tvoří jádro purinosomu. PAICS, ADSL a ATIC interagují na periferii. Složené purinosomy jsou lokalizovány zejména v blízkosti mitochondrií, kde dochází k vzájemné interakci (upraveno podle [35]).

2.2.4 Regulace PDNS

První enzym PDNS, PPAT, je považován za rychlost určující pro celou dráhu. V jeho struktuře se nachází dvě vazebná místa pro nukleotidy (AMP, GMP) blízko aktivního místa enzymu, které slouží ke zpětnovazebné alosterické inhibici [36]. Aktivita PPAT může být také ovlivněna dostupností glutaminu jako substrátu reakce [27]. Oligomerní struktura enzymů PDNS ovlivňuje jejich aktivitu. Příkladem je bifunkční ATIC, který existuje v monomerní-dimerní rovnováze, ale dimerní forma je nezbytná pro transformylasovou aktivitu [37]. PPAT a PFAS jsou regulovány také pomocí proteinů tepelného šoku 90 (HSP90) [38]. Regulace PDNS byla prokázána v rámci fosfoinositol-3-kinasové signální dráhy (PI3K)/AKT. Aktivace AKT vedla ke zvýšené expresi fosforibosylpyrofosfátsynthetasy (PRSP, enzym zodpovědný za vznik PRPP)

a ADSL v lidských keratinocytech [39]. Inhibice AKT v HeLa buňkách způsobila snížení produkce purinů o 73 % [40].

Meziprodukty PDNS mohou sloužit jako další stupeň regulace jak samotné biosyntézy purinů, tak ostatních metabolických drah. ADSL může katalyzovat reverzibilní reakci vzniku SAICAR z AICAR. Důsledky schopnosti reverzibilní katalýzy u jediného enzymu PDNS zatím nejsou známy, ale mohou představovat novou úroveň regulace [28]. AICAR je známým alosterickým aktivátorem AMP-aktivované proteinkinasy (AMPK) – energetického senzoru buňky s mnoha metabolickými účinky [41]. Aktivace AMPK pomocí AICAR způsobila v HeLa buňkách vznik cytoplasmatických granulí FGAMS, a tedy zastavení PDNS, jelikož nemohlo dojít ke vzniku purinosomů [42].

K dalším regulačním mechanismům PDNS patří savčí cíl rapamycinu (mTOR) a kaseinkinasa 2 (CK2) [43], [44]. Regulaci podléhá také část syntézy purinů z IMP a to: adenylylsukcinátsynthasa (ADSS), která je inhibována AMP, a IMP dehydrogenasa regulovaná pomocí GMP. K zachování nukleotidové rovnováhy slouží aktivační účinek ATP na GMP synthasu a rovněž aktivační účinek GTP na ADSS [27].

2.2.5 Enzymové defekty PDNS

Fungující PDNS je nezbytná pro správný vývoj organismu, jelikož enzymové defekty v této biochemické dráze působí závažné vývojové poruchy. U člověka byly doposud identifikovány tři deficity enzymů ADSL, ATIC a PAICS, jejichž důsledky jsou popsány v následujících kapitolách. Deficit GART a PAICS způsobuje u dáňá pruhovaného (*Danio rerio*) úmrtí embryí, mikroftalmii (zmenšení očí) a poruchy pigmentace u dospělých jedinců [45]. Neslučitelnost se životem v souvislosti s deficitem PAICS byla prokázána na myších modelech [46].

2.2.5.1 Deficit ADSL

Deficit ADSL (OMIM 103050) je vzácná porucha PDNS, kterou poprvé popsali Jaeken a Van den Berghe v roce 1984, kdy našli zvýšené hladiny

sukcinylpurinů v různých tělních tekutinách tří dětí s autismem a výrazně opožděným psychomotorickým vývojem [47]. Od té doby bylo po celém světě diagnostikováno asi 80 pacientů [48].

Struktura a funkce enzymu ADSL

Adenylosukcinátlyasa (adenylosukcinasa, ADSL; EC 4.3.2.2) je homotetramerní enzym tvořený 484 aminokyselinami, který katalyzuje dvě reakce v rámci metabolismu purinů: přeměnu SAICAR na AICAR v PDNS a dále přeměnu SAMP na AMP (Obr. 3). Aktivní místo enzymu je jedno, slouží tedy současně pro SAICAR i SAMP [49].

Genetika

Deficit ADSL se řadí k onemocněním s autosomálně recesivním typem dědičnosti. Gen kódující lidskou ADSL se nachází na 22. chromozomu, je dlouhý 23 kb, má celkem 13 exonů a je exprimován ve většině tkání [50]. Doposud bylo identifikováno více než 50 různých mutací genu *ADSL*. Většina pacientů jsou složeni heterozygoti. R426H missense mutace byla identifikována u přibližně jedné třetiny všech pacientů, jedná se o nejčastější typ mutace. Mezi další typy patří mutace vytvářející nové místo sestřihu vedoucí k deleci 39 párů bází, mutace regulační oblasti, mutace c.774_778insG působící předčasné zavedení stop kodonu a mutace c.889_891dupAAT vedoucí ke zdvojení Asn297 zbytku aktivního místa enzymu [48]. Všechny výše zmíněné mutace vedou k významnému snížení aktivity ADSL.

Klinické projevy

Pacienti s deficitem ADSL mají velmi široké spektrum klinických projevů, zejména neurologického původu. Naprostá většina dětí s touto chorobou je narozena po nekomplikovaném těhotenství i porodu, a také bez zátěže rodinnou anamnézou. Nejčastějším klinickým projevem u novorozenců je akutní encefalopatie, vyvíjející se typicky několik dní po porodu. Nejprve se jedná o nespecifické symptomy jako je zvracení, podráždění, nechutenství, později

přechází do hypotonie, křečí až komatu. Chronická encefalopatie se projevuje opožděným psychomotorickým vývojem ve všech sférách, od opožděného začátku mluvení až po agresivitu, hyperaktivitu a těžké formy mentální retardace. K dalším klinickým projevům se řadí křeče (i epileptického původu), změny chování (neschopnost očního kontaktu, repetitivní zvuky a pohyby), hypo/hypertonie a dysmorfní znaky (mikrocefalus, úzký ret, výrazná dolní čelist atd.) [48].

Korelace mezi genotypem a klinickými projevy zatím nebyla prokázána. Pacienti jsou klasifikováni na základě poměru koncentrací akumulovaných sukcinylpurinů v tělních tekutinách (sukcinyladenosin – SAdo, sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribosid – SAICAr) u něhož existuje korelace se závažností symptomů [51]. U pacientů s fatální neonatální formou se onemocnění projevuje brzy po porodu těžkou encefalopatií, selháním dýchání a křečemi neznámého původu, vedoucí k úmrtí během prvních týdnů života. Byly popsány také případy s prenatálními klinickými projevy (mikrocefalus, ztráta variability srdečního rytmu). Laboratorní nález u těchto pacientů je charakteristický poměrem SAdo/SAICAr nižším jak 1 [52], [53]. Pacienti s deficitem ADSL typu 1 (těžká forma) mají poměr SAdo/SAICAr blízký 1. Analýza zbytkových aktivit ve fibroblastech těchto pacientů ukázala, že aktivita enzymu vůči SAICAR i SAMP je ekvivalentně snížena na 30 % oproti fyziologickému stavu [54]. Těžká forma onemocnění se vyvíjí v prvních měsících života, typicky těžkou psychomotorickou retardací, mikrocefalií a křečemi. Deficit ADSL typu 2 je poslední formou onemocnění, označovanou jako střední či lehká. Projevuje se rozvojem lehké či střední psychomotorické retardace v prvních letech života. Pokud se objeví křeče, zpravidla je to také později, v řádu několika let. Poměr koncentrací metabolitů SAdo/SAICAr je větší jak 2 (v rozmezí 2-4) [48]. Van den Bergh *et al.* pozorovali snížení aktivity ADSL vůči SAICAR ve fibroblastech na 30 % (stejně jako u onemocnění typu 1), ale aktivita vůči SAMP byla snížena na pouhé 3 % normální aktivity enzymu. Analýza ovšem byla provedena pouze u jednoho pacienta [54]. Studie rekombinantních forem ADSL nenalezla souvislost mezi fenotypem pacientů a disproporční katalytickou aktivitou enzymu vůči jednomu substrátu. Byla pozorována korelace mezi

závažností klinických projevů a zbytkovou aktivitou společně se strukturální stabilitou mutovaného enzymu [55].

Diagnostika a léčba

Deficit ADSL způsobuje hromadění SAICAR a SAMP v buňkách a významně zvýšené hladiny jejich defosforylovaných analogů (SAICAr a SAdo) v tělních tekutinách (plazma, mozkomíšni mok, moč). Koncentrace hromaděných sukcinylpurinů v mozkomíšním moku je o dva řády vyšší než v krvi. Důvodem je vysoká produkce těchto metabolitů oligodendroglie v mozku [56]. V dnešní době diagnostika deficitu ADSL vyžaduje stanovení SAICAr a SAdo v tělních tekutinách pomocí UV detekce nebo HPLC-MS. Dále se provádí genomické a/ nebo cDNA sekvenování *ADSL* genu a charakterizace zmutovaného proteinu [48]. K dalším selektivním diagnostickým metodám patří například spektrofotometrické stanovení Bratton-Marshallovým testem [57], tenkovrstvá chromatografie [58], kapilární [59] či protonová magnetická spektroskopie s vysokým rozlišením [60]. Ke stanovení diagnózy jsou brány v úvahu samozřejmě klinické projevy, lze provést i analýzu enzymové aktivity ADSL ve fibroblastech pacientů. Prenatální diagnostiku lze provést molekulární analýzou choriových klků, krevních skvrn nebo kultivovaných buněk plodové vody. Tyto testy se ovšem provádí pouze v rodinách, které už mají jedno dítě s deficitem ADSL [61], [62].

Délka života se u pacientů s deficitem ADSL podstatně liší. Při neonatální formě novorozenci často umírají v řádech měsíců, pokud se onemocnění projeví později, pacienti se dožívají dospělosti. I přes narůstající počet pacientů však doposud neexistuje léčba. Pro prevenci epileptických záchvatů jsou pacientům podávána antikonvulziva, ale často dochází k lékové rezistenci [48]. Antikonvulzivní efekt má i ketonová dieta, ale pacienti musí být důkladně sledováni z důvodu nežádoucích účinků této diety [63]. Werkhoven a kol. vyzkoušeli podávání S-adenosylmethioninu jako exogenního zdroje ATP (alternativní zdroj adenosinu pro AMP), ale ani po devíti měsících nezaznamenali žádné změny v biochemických parametrech či symptomech [64]. Podávání

D- ribosy zlepšilo koordinaci a kontrolu nad křečemi u jedné 13leté pacientky, výsledky ovšem nebyly ověřeny v dalších studiích [65].

Biochemie a toxicita akumulovaných metabolitů

Za nejvíce patogenní metabolity deficitu ADSL jsou považovány sukcinylpuriny SAdo a SAICAr. Neurotoxicita SAICAr byla prokázána ve studii jeho účinku na specifické oblasti krysího mozku [66]. Neurotoxický účinek na lidský organismus doposud nebyl dokázán. Absolutní koncentrace SAdo a SAICAr nekorelují se závažností stavu pacientů, ovšem na základě poměru těchto dvou metabolitů jsou pacienti kategorizováni do tří skupin dle závažnosti klinických projevů [53]. Pacienti, kteří mají poměr SAdo/SAICAr větší jak 2, mají méně závažné symptomy. Proto vznikla hypotéza, že SAICAr je původcem neurotoxického účinku, kdežto SAdo by mohl před účinkem SAICAr bránit [48].

Dále bylo zjištěno, že SAICAR stimuluje pyruvátkinasu (isoformu PKM2) v rakovinných buňkách. Při nízkých hladinách glukosy koncentrace SAICAR roste, dochází ke stimulaci PKM2, což vede ke změnám hladiny buněčné energie, příjmu glukosy a produkci laktátu. Alosterickou regulací PKM2 pomocí zvýšené hladiny SAICAR si rakovinné buňky optimalizují fungování ostatních metabolických drah ve prospěch svého růstu v podmínkách omezeného množství živin. U zdravých buněk epitelu či plicních fibroblastů stimulace PKM2 vlivem SAICAR pozorována nebyla [67]. V kvasinkách SAICAR funguje jako signální molekula a reguluje genovou expresi na úrovni transkripce [68].

Metabolomické profilování buněk slinivky břišní (buněčná linie 832/13) ukázalo, že dochází k významným změnám v purinovém metabolismu, vyvolaných změnou hladiny glukosy. Jednou z nich byla zvýšená hladina SAMP. Účinek SAMP byl poté studován na β -buňkách pacienta s diabetem typu 2. Stimulací sekrece insulinu dokázal SAMP zvrátit dysfunkci pacientových buněk [69].

2.2.5.2 Deficit ATIC (AICA-ribosidurie)

Deficit ATIC je raritní onemocnění zasahující konec *de novo* biosyntetické dráhy purinů. V roce 2004 byl poprvé identifikován deficit enzymu ATIC u jediné pacientky a onemocnění bylo pojmenováno AICA-ribosidurie [70]. V polovině roku 2020 byla publikována studie, která popisuje další tři pacienty [71].

Struktura a funkce enzymu ATIC

AICAR transformylasa (AICARTF, EC 2.1.2.3) a IMP cyklohydrolasa (IMPCH, EC 3.5.4.10) společně tvoří ATIC – bifunkční enzym katalyzující poslední dva kroky PDNS (Obr. 3). C-terminální doména AICARTF katalyzuje přenos formylové skupiny redukovaného folátového kofaktoru (N¹⁰-formyltetrahydrofolát) na amino skupinu AICAR za tvorby FAICAR. N-terminální doména IMPCH katalyzuje uzavření pyrimidinového kruhu a vznik IMP a molekuly vody. Enzym ATIC existuje v monomerní a dimerní formě. Aktivní místo AICARTF vzniká na rozhraní dvou interagujících molekul ATIC. Homodimerizace je tedy podmínkou pro AICARTFasovou aktivitu ATIC. Strukturní studie popisují poměrně velké rozhraní protein-proteinových interakcí o rozměru 5000Å. IMPCH je katalyticky aktivní v obou formách (vyšší aktivita v dimerní formě). Struktura ATIC byla během evoluce zachována. Jako jediný enzym PDNS je bifunkční a to ve všech dosud studovaných organismech [37], [72].

Genetika

AICA-ribosidurie má autosomálně recesivní typ dědičnosti. U tří ze čtyř doposud nalezených pacientů byla identifikována substituční mutace adeninu za guanin, vedoucí k náhradě lysinu za arginin v proteinu (c.1277A>G p.(Lys426Arg)). Mutace je lokalizována v doméně AICARTF. Studie enzymové aktivity odhalila celkovou ztrátu transformylasové aktivity, ale aktivita IMPCH byla do určité míry zachována. Poslední dosud diagnostikovaný pacient je složený heterozygot. Jedná se o mutace substitucí na obou alelách, zděděných od každého

rodiče: c.406G>A p.(Ala136Thr) a c.1654A>T p.(Lys552*). Nachází se v cyklohydrolasové doméně ATIC.

Klinické projevy

První případ tohoto onemocnění byl popsán v roce 2004 u tehdy 4leté pacientky, dcery zdravých rodičů, kteří už měli zdravého syna. Po narození se u pacientky postupně začala projevovat těžká psychomotorická retardace, vrozená slepota, epilepsie, mírné poškození srdce, dysmorfní rysy (výrazné čelo, obrácené nosní dírky, brachycefalus, nízko posazené uši, široká ústa s tenkým horním rtem a jiné). Nyní má pacientka 18 let. V důsledku těžké hypotonie není schopna chodit ani stát, dokáže se posadit. Nemluví (ani jednotlivá slova), má skoliózu, poruchu příjmu potravy (neváží více než 30 kg) a 1-2 epileptické záchvaty denně [70], [71].

Druhá pacientka je dcerou zdravých rodičů, narozena po vícečetném těhotenství. Její dvojče zemřelo v novorozeneckém období nejspíše v důsledku zúžené aorty. U dívky se rozvinul Westův syndrom (epilepsie, mentální retardace, porucha srdečního rytmu), nekontrolované zvracení, má těžké poškození zraku, skoliózu, růstovou retardaci a dysmorfní rysy (tzv. *coarse facies*, obrácené nosní dírky, srostlé obočí). V současné době má 19 let, nemluví, nechodí, je schopná se posadit [71].

Třetí pacientka je sestra druhé popisované pacientky, narozená o 10 let později. Trpí hypotonií, růstovou retardací, skoliózou, má podobné dysmorfní rysy jako její sestra, těžké poškození zraku. Má několik epileptických záchvatů denně, objevuje se rezistence na jejich léčbu. Nechodí, nesedí, ani nemluví [71].

Posledním pacientem je sedmiletý chlapec zdravých rodičů. Růstová retardace byla odhalena již během nitroděložního vývoje. Po porodu vykazoval střední hypotonii s oboustrannou dislokací kyčlí. Posadí se, ale není schopný nezávislé chůze. Komunikuje pomocí několika slov, stále se učí. Trpí růstovou retardací, skoliózou, velmi opožděným vývojem kostí, vidí jen na pár metrů. Má stejné či podobné dysmorfní rysy, jako ostatní pacientky. Má zvětšená játra, steatózu a chronickou jaterní nedostatečnost. Nekontrolovaně zvrací v souvislosti s běžnými infekcemi [71].

Diagnostika a léčba

AICA-ribosidurie je charakteristická vysokou koncentrací AICAr v moči a mozkomíšním moku [70]. AICAr je fyziologicky přítomný ve stopovém množství v moči. Jeho zvýšená koncentrace je detekována také při nedostatku vitamínu B12 a kyseliny listové, u dětí s akutní leukémií a pacientů s deficitem HGPRT [70], [73]. Koncentrace AICAr je ovšem v případě AICA-ribosidurie o několik řádů vyšší, než při výše zmíněných onemocněních. Zvýšená je také koncentrace SAICAr a SAdo, ale ne tolik, jako u deficitu ADSL. Důvodem jejich akumulace je pravděpodobně inhibice ADSL vysokou koncentrací AICAR [74]. K detekci akumulovaných metabolitů se používá Bratton-Marshallův test, tenkovrstvá chromatografie, HPLC s detekcí fotodiodového pole [57], [58], [61].

U první pacientky byla provedena i analýza erytrocytů a fibroblastů. V erytrocytech byla detekována enormní akumulace AICAR (také známého jako ZMP), která významně převyšovala koncentraci ATP. Ta byla naopak snížena o 60 % oproti kontrole. Byla detekována také di- a trifosfátová analoga AICAR (ZDP a ZTP). Kultivace fibroblastů s AICAr odhalila také akumulaci ZMP, potvrzující poškození metabolismu AICAR. Analýza enzymových aktivit ve fibroblastech dále ukázala těžký deficit aktivity AICARTF, na rozdíl od aktivity IMPCH, která byla 40% ve srovnání s kontrolou [70].

Většina rutinních biochemických parametrů byla u pacientů v normě, u některých byla pouze detekována snížená hladina HDL cholesterolu, triglyceridů a volných mastných kyselin.

Léčba doposud neexistuje.

Biochemie a toxicita akumulovaných metabolitů

Při AICA-ribosidurii způsobí vysoká koncentrace AICAR porušení rovnováhy přeměny SAICAR na AICAR pomocí ADSL a dochází k tomu, že enzym spustí reverzibilní katalýzu, tedy syntézu SAICAR. ADSL je zatím jediným enzymem PDNS, u kterého byla prokázána reverzibilita, která může představovat další úroveň regulace této metabolické dráhy, jak již bylo uvedeno [28]. Zvýšená hladina SAICAR vyvolá inhibici ADSL, proto během AICA-ribosidurie dochází

také k akumulaci SAICAR a SAMP v buňce, které jsou následně defosforylovány a vylučovány do tělních tekutin ve formě ribosidů (SAICAr a SAdo) [75].

AICAR dokáže vyvolat mnoho dalších změn v metabolismu díky schopnosti alosterické aktivace AMP-aktivované proteinkinasy (AMPK). AMPK je hlavním regulátorem buněčné energie. V buňce monitoruje poměr AMP/ATP a odpovídá na jeho změny. K aktivaci dochází při poklesu hladiny ATP, kdy naopak roste koncentrace AMP. Podstata aktivace AMPK je tedy v inhibici anabolických metabolických drah, které spotřebovávají ATP (např. glukoneogeneze, lipogeneze, proteosyntéza), a aktivaci drah katabolických (např. zvýšení příjmu glukosy do buněk, aktivace β -oxidace mastných kyselin), aby byla obnovena fyziologická hladina ATP [41]. Existuje mnoho studií, které popisují účinky aktivace AMPK pomocí AICAR: stimulace insulinové sekrece v β buňkách slinivky břišní [76], inhibice hormon-senzitivní lipasy vedoucí k redukci lipolýzy v adipocytech [77], inhibice syntézy sterolů a mastných kyselin v hepatocytech [77], inhibice syntézy fosfocholinů a fosfoetanolaminů v hepatocytech [78], redukce syntézy glykogenu v játrech a svazech [79], snížení hladiny fosfokreatinu a kreatinu v endoteliálních buňkách pupečnickové žíly [80] a mnoho dalších. AICAR má také účinky nezávislé na AMPK, např. inhibuje cholinkinasu a syntézu fosfatidylcholinů v játrech, dokáže vyvolat programovanou nekrózu buněk rakoviny prostaty pomocí cytotoxického efektu reaktivních forem kyslíku, v lidských buňkách osteosarkomu, osteoblastech a endoteliálních buňkách spouští apoptózu, je schopen zmenšit nádory ledvin u myších modelů [81]–[85]. Bylo studováno možné využití AICA-ribosidu v léčbě akutní lymfoblastické leukemie, tento metabolit byl také použit v první a druhé fázi klinické studie pro léčbu chronické lymfatické leukemie [86], [87].

Díky těmto účinkům, zejména cytotoxickým, je podobně jako u deficitu ADSL patologický mechanismus AICA-ribosidurie přisuzován spíše akumulovanému intermediátu PDNS, než samotnému rozpadu purinosomu, jelikož záchranná dráha je teoreticky schopna kompenzovat nefunkční PDNS [32]. U čtvrtého pacienta trpícího AICA-ribosidurií byl několikrát pozorován stav přechodné hypoglykemie s neznámou příčinou a u první pacientky se vyskytla

přechodná neonatální hypoglykemie [71]. Bylo prokázáno, že AICAR inhibuje glukoneogenezi v krysích hepatocytech a vyvolává hypoglykémii u myši [88], [89]. U pacientů 1, 2 a 4 byl pozorován pokles sérového cholesterolu, který může být způsoben akumulací AICAR. Analýza účinku AICAR (s následnou intracelulární fosforylací na AICAR) na krysí hepatocyty ukázala inhibiční efekt na syntézu mastných kyselin a cholesterolu vyvolaný stimulací AMPK [71], [90].

2.2.5.3 Deficit PAICS

Deficit PAICS je zatím poslední identifikovanou DMP v rámci PDNS. Onemocnění bylo popsáno v roce 2019 u dvou sourozenců z Faerských ostrovů, kteří oba zemřeli krátce po porodu [91].

Struktura a funkce enzymu PAICS

Bifunkční enzym PAICS je tvořen 5-aminoimidazolribonukleotid karboxylasou (AIRC, EC 4.1.1.21) katalyzující přeměnu FGAMR na AIR a 4-(N-succinylkarboxamid)-5-aminoimidazolribonukleotid synthasou (SAICARS; EC 6.3.2.6), která katalyzuje vznik SAICAR z AIR (Obr. 3). PAICS vytváří homooktamerní strukturu složenou z oktamerního karboxylasového jádra a čtyř symetrických dimerů synthetasy na periférii. Strukturní analýza enzymu navíc odhalila čtyři oddělené tunelové systémy v oktameru PAICS, které zajišťují spojení mezi aktivními místy AIRC a SAICARS, a nasvědčují existenci tzv. „intermediate channeling“ mechanismu. Vytvoření oktamerní struktury enzymu je nezbytné pro aktivitu AIRC [92].

Genetika

Deficit PAICS je autosomálně recesivní DMP. Onemocnění je způsobeno missense mutací na chromozomu 4 (c.158A>G), která vede k záměně lysinu 53 za arginin (p.Lys53Arg). Přítomnost argininu v pozici 53 nejspíš ovlivňuje katalytickou aktivitu SAICARS destabilizací struktury enzymu [91].

Klinické projevy

Prvním pacientem je chlapec spontánně narozený v 36. týdnu těhotenství (tt). Matce byl ve 20 tt diagnostikován polyhydramnion (nadbytek plodové vody) a u chlapce byla odhalena nespecifická malformace nohy. Po porodu trpěl středně těžkou asfyxií a byla u něj identifikována řada tělesných malformací: krátké tělo a krk, brachycefalus, zploštělý obličej, obrácené nosní dírky, hypertelorismus očí, nízko usazené uši, zdvojený palec levé nohy, malý penis, absence varlat, jícnová atrezie a mnoho dalších. Chlapec měl dobrý svalový tonus i reflexy. Dvě a půl hodiny po porodu mu selhalo dýchání a byl intubován. Přesto došlo k rozvoji hypoxie a hypotenze, které vedly k úmrtí třetí den života [91].

Druhým pacientem je sestra výše popsaného pacienta, narozená spontánně ve 34 tt. U matky byl znovu diagnostikován polyhydramnion. Dívka měla řadu stejných či podobných tělesných malformací, jako její bratr. Zemřela 28 hodin po porodu na následky progresivní hypotenze a hypoxie [91].

Rodiče těchto dvou pacientů jsou příbuzní a mají další čtyři zdravé děti (tři chlapce a jednu dívku), jedno těhotenství bylo ukončeno spontánním potratem ve 13 tt v důsledku polyhydramnionu [91].

Diagnostika

Předpokládaná akumulace AIR nemohla být potvrzena, jelikož tělní tekutiny pacientů nebyly pro stanovení dostupné. Od prvního pacienta byly získány fibroblasty. LC-MS/MS analýza neprokázala akumulaci AIR či jeho ribosidu ve fibroblastech (nebo médiu) kultivovaných v PD médiu, na rozdíl od CHO nebo HeLa buněk deficitních pro PAICS, u nichž byla akumulace těchto metabolitů detekována v dřívějších studiích [93][94]. Analýza enzymové aktivity v lyzátech fibroblastů pacienta ukázala, že aktivita PAICS je snížena na přibližně 10 % (u obou heterozygotních rodičů snížena na 50 %) [91].

Toxicita AIR

U deficitu ADSL a ATIC jsou za nejvíce toxické metabolity považovány sukcinylpuriny, zejména SAICAr [66]. Jelikož existuje předpoklad akumulace AIR

v tělních tekutinách pacientů s deficitem PAICS, byl studován cytotoxický účinek tohoto metabolitu na Cath-a-diferencované katecholaminergní buňky (CAD 5) a fibroblasty. U obou typů buněk vykazoval AIr větší cytotoxický účinek v porovnání se SAICAr [91].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Analýza meziproduktů purinové *de novo* syntézy pomocí hmotnostní spektrometrie

Cílem této studie byla charakterizace fragmentačního chování syntetizovaných meziproduktů PDNS a potvrzení jejich identity na základě porovnání fragmentačních spekter analogů produkovaných HeLa buňkami defektními pro jednotlivé enzymy této metabolické dráhy. Odborná publikace s názvem „Mass spectrometric analysis of purine *de novo* biosynthesis intermediates“ byla publikována v roce 2018 v časopise PLOS ONE [94].

3.1.1 Materiál a metody

3.1.1.1 Chemikálie

Isotopově značený glycin byl zakoupen u Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). AICAR, AICAr a SAMP byly zakoupeny u Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Kanada). SAICAR, SAICAr, SAdo, AIR, AIr, CAIR, CAIr a N¹⁰-formyl-THF byly připraveny podle předchozí studie [31], [95]. Telecí střevní alkalická fosfatasa (CIP) a NEB3 pufr byly zakoupeny u New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA). Minimální základní médium Dulbecco's (DMEM), médium F12 a fetální bovinní sérum (FBS) byly zakoupeny od firmy Life Technologies (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Minimální základní médium (MEM) bylo zakoupeno u Biosera (Nuaille, Francie). Všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.1.1.2 Příprava a čištění meziproduktů PDNS a jejich defosforylovaných analogů

GAR, FGAR a FGAMR byly syntetizovány biochemicky pomocí bakteriálních rekombinantních enzymů. FAICAR byl připraven organickou syntézou. PRA nebyl syntetizován, jelikož je velmi nestabilní *in vivo* (poločas

rozpadu 5 s). AICAR, AICAr a SAMP byly zakoupeny, protože se jedná o komerčně dostupné standardy. Ostatní meziprodukty PDNS a jejich defosforylovaná analoga byla připravena dle předchozí studie [31], [95]. Výchozí koncentrace všech meziproduktů PDNS shrnuje Tab. 2.

Tabulka 2. Výchozí koncentrace metabolitů PDNS, které byly podrobeny HRMSⁿ analýze.

Metabolit	Koncentrace (μM)
GAr	124
FGAr	82
FGAMr	57
AIr	110
CAIr	50
AICAr	100
SAICAr	100
FAICAr	73
SAdo	100
GAR	124
FGAR	82
FGAMR	57
AIR	110
CAIR	50
SAICAR	100
AICAR	100
FAICAR	73
IMP	100
SAMP	100

Bakteriální rekombinantní enzymy GARS a GARTF byly exprimovány a přečištěny ve formě fúzních proteinů vázajících maltózu (MBP-GARS a MBP-GARTF) pomocí pMALTM Protein Fusion a Purification System (New England Biolabs Inc., USA) [96].

Produkce enzymu FGAMS zahrnovala vnesení příslušného genu do p6H vektoru, jeho expresi v *Escherichia coli* a následné přečištění na afinitní chromatografické koloně s Co²⁺ vázanými ionty (GE Healthcare).

Příprava GAR/r

Reakční směs pro přípravu GAR obsahovala: 5,7 mM ribosa-5-fosfát, 0,7 mM ATP, 10 mM glycin, 10 mM hydroxid amonný, 12,7 mM chlorid hořečnatý, 20 mM fosfátový pufr (pH 7.4) a 0,4 µg/µL přečištěné MBP-GARS. Směs byla inkubována čtyři hodiny při 37 °C. Výsledek reakce byl analyzován metodou HPLC-MS. Ribosidová forma metabolitu byla připravena defosforylací GAR pomocí 1 U CIP.

Příprava FGAR/r

Pro přípravu FGAR reakční směs obsahovala: 5,7 mM ribosa-5-fosfát, 0,7 mM ATP, 10 mM glycin, 10 mM hydroxid amonný, 12,7 mM chlorid hořečnatý, 0,1 mM N¹⁰-formyl-THF, 20 mM fosfátový pufr (pH 7,4), 0,4 µg/µL přečištěné MBP-GARS a 0,4 µg/µL přečištěné MBP-GARTF. Směs byla inkubována čtyři hodiny při 37 °C. Další kroky byly stejné jako při přípravě GAR/r.

Příprava FGAMR/r

Pro přípravu FGAMR bylo použito 200 µL reakční směsi z přípravy FGAR, která byla inkubována s 2 mM glutaminu, 2 mM ATP a 0,25 µg/µL přečištěného 6H-PurL po dobu čtyř hodin při 37 °C. Následoval stejný postup jako při přípravě GAR/r.

Příprava FAICAR

FAICAR byl připraven dle dříve publikovaného postupu [97]. FAICAR byl připraven upravením postupu pro syntézu FAICAR. Reakční směs obsahující 10 mg AICAR, 11 mg hydroxidu sodného, 136 μL kyseliny mravenčí a 250 μL anhydridu kyseliny octové byla inkubována jednu hodinu při 37 °C a produkt byl poté analyzován metodou HPLC-MS.

3.1.1.3 Fragmentační analýza meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných analogů (HPLC-HRMSⁿ)

Analýza meziproductů PDNS byla provedena pomocí kapalinové chromatografie (UltiMate 3000 RS, Dionex Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, USA). Během analýz byl systém ovládán a kontrolován programy Chromeleon Xpress 6.80, Dionex DCMSLink 2.12, Thermo Tune Plus 2.7.0.1103 SP1 (Thermo Fischer Scientific) a Xcalibur 2.2 SP1 (Thermo Fischer Scientific).

Chromatografická separace probíhala na aminopropylvé koloně Luna (3 μm NH₂ 100 Å, 2 × 100 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) vyhříváné na 35 °C. Mobilní fáze A obsahovala 20 mM acetát amonný o pH 9,75, mobilní fáze B byla acetonitril. Gradientová eluce probíhala podle následujícího schématu: 0–7 min, 95 % → 10 % B, 7–13 min 10 % B, 13–13,5 min, 95 % B, 13,5–17,0 min, 95 % B. Průtok mobilní fáze byl 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, objem nastříkovaného vzorku byl 2 μL .

Vícetupňová fragmentační analýza probíhala na Orbitrapu Elite pracujícím v pozitivním módu ionizace elektrosprejem. Teplota iontového zdroje byla 300 °C, teplota přenosové trubice byla 350 °C, průtok přídavného plynu („sheath gas“) 10 arbitrárních jednotek, průtok pomocného plynu („auxiliary gas“) 35 arbitrárních jednotek, průtok čistícího plynu („sweep gas“) 0 arbitrárních jednotek, napětí elektrospreje +3 kV. Fragmentační analýza iontů s intenzitou vyšší, jak 1E4 probíhala buď automaticky pomocí programu TreeRobot

(HighChem, SK) nebo s použitím datově závislé analýzy. Nejvíce pět iontů s nejvyšší intenzitou z MS² bylo izolováno a fragmentováno. Poté následoval výběr a fragmentace 1-6 iontů s nejvyšší intenzitou z každého MS³ spektra. Výsledný počet úrovní fragmentace (MSⁿ) byl závislý na intenzitách vznikajících fragmentů, v úrovni MS⁴/MS⁵ byla obvykle produkována fragmentační spektra 1-2 iontů s nejvyšší intenzitou (vyšší jak 1E4). V případě méně intenzivních fragmentů byl jejich výběr proveden manuálně. Fragmentační spektra byla produkována metodou CID s aplikací 30 jednotek normalizované kolizní energie (NCE). Izolační šířka byla nastavena na 2 Da, maximální doba sběru iontů byla 200 ms. Hmotnostní spektrometr pracoval s rozlišením 120 000 FWHM. Použitím externí kalibrace a interní *m/z* kalibrace („lock mass“; kontinuální kalibrace na ion *m/z* 391,2843, diisooktylfталát, v pozadí) byla zajištěna přesnost měření hmot do 3 ppm. Z víceúrovňových fragmentačních hmotnostních spekter každého metabolitu byl sestaven spektrální strom. Struktura všech fragmentů byla navržena s pomocí prediktivního fragmentačního programu MassFrontier 7.0.5.09 SP3 (HighChem, SK).

3.1.1.4 Kultivace a sklizení buněk

Pro tuto studii byly použity CRISPR-Cas9 editované HeLa buňky deficitní pro mono- i multifunkční enzymy pokrývající celou dráhu PDNS (crGART, crPFAS, crPAICS, crADSL, crATIC), které připravila Barešová a kol. v roce 2016 [31]. HeLa buňky deficitní pro HGPRT (crHGPRT) byly připraveny analogicky [98]. Buňky byly kultivovány ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5 % CO₂ při 37 °C. Všechny buňky (deficitní i kontrolní) byly kultivovány v médiu DMEM/F12 s obsahem 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin. Kultivační médium deficitních buněk bylo navíc obohaceno o 3x10⁻⁵ M adenin. Po dosažení konfluence (80-90%) byly všechny buňky 24 h před sklizením umístěny do kultivačního média DMEM s obsahem 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin, které ale neobsahovalo glycin ani puriny. Dvě hodiny před sklizením byly buňky omyty PBS a následně kultivovány v médiu DMEM bez obsahu glycinu a purinů, ovšem do média bylo přidáno 500 μM izotopově značeného glycinu (U-¹³C₂, ¹⁵N).

Každá deficitní linie buněk byla kultivována v hexaplikátu v 75cm² kultivačních lahvích (přibližně 5 milionů adherentních buněk).

Sklízení buněk bylo provedeno dle upravené metody Wojtowitz a kol. [99]. Nejprve bylo kultivační médium přemístěno do 15mL plastových zkumavek, které byly zpracovány později. Buněčný metabolismus byl zastaven sprejováním 40 mL 60% ledového methanolu (v/v, -50 °C) pomocí injekční stříkačky s ohnutou jehlou na dno kultivační lahve, která byla držena v nakloněné pozici. Tímto způsobem bylo zamezeno odloučení adherentních buněk přímým proudem methanolu. Kultivační láhve byly umístěny na led a následovala extrakce 1 mL 80% methanolu (v/v, -50 °C) a mechanické odloučení buněk ze dna kultivační lahve pomocí škrabky na buňky. Buňky byly odsáty pipetou do 15mL plastové zkumavky. Poté byly do kultivační lahve přidány další 2 mL methanolu (v/v, -50 °C) pro další extrakci. Methanолоvé extrakty byly smíchány, sonikovány (30 s) a centrifugovány (1800 x g, 5 min, 4 °C). Posledním krokem byla jejich lyofilizace.

Zpracování buněčných lyzátů

Ke každému lyofilizátu bylo přidáno 500 µL ledového 80% methanolu a směs byla důkladně promíchána. Vzorky byly centrifugovány 15 min při 15 000 x g a 4 °C. Supernatanty byly poté odebrány a analyzovány.

Zpracování kultivačního média

Každá zkumavka s médiem byla nejprve důkladně promíchána, poté bylo odebráno 100 µL média, ke kterému bylo přidáno 300 µL 80% methanolu. Vzorky byly umístěny přes noc do mrazáku na -80 °C. Extrakty byly centrifugovány 15 min při 15 000 x g a 4 °C, poté následovalo odebrání supernatantů a jejich analýza.

3.1.1.5 Analýza buněčných lyzátů a kultivačního média

Podmínky chromatografické separace byly použity stejné, jako v kapitole 3.1.1.3 Fragmentační analýza meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem (HPLC-HRMSn). Detekce metabolitů byla provedena na Orbitrapu Elite,

pracujícím v pozitivním módu ionizace (ostaní parametry byly stejné jako v kapitole 3.1.1.3). Metoda pro detekci metabolitů byla rozdělena na čtyři časové úseky. V prvním (0-3 min) a čtvrtém (12-17 min) úseku probíhala analýza v tzv. full scan módu s hmotnostním rozsahem m/z 70-1000. Ve druhém úseku (3-7 min) byla aplikována metoda selektivního monitorování iontu (SIM) pro zvýšení citlivosti detekce ribosidů PDNS (m/z 177-417). Ve třetím časovém úseku (7-12 min) byla metoda SIM použita ke zvýšení citlivosti detekce ribotidů PDNS v hmotnostním rozsahu m/z 257-497. Výjimkou byla analýza sukcinylpurinů, které byly měřeny v samostatných hmotnostních rozsazích m/z (SAdo 379-389 a SAMP 459-469). Hmotnostní spektrometr pracoval při rozlišení 60 000 FWHM, přesnost měření hmot byla do 3 ppm. Každá buněčná linie byla měřena v hexaplikátu, hodnoty intenzit metabolitů představují jejich průměr. Identita akumulovaných metabolitů v buňkách i kultivačním médiu byla potvrzena fragmentační analýzou (MS^2), která byla provedena metodou CID s 30 jednotkami normalizované kolizní energie.

3.1.2 Výsledky

3.1.2.1 Příprava a čištění meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných analogů

Ribosidy AIr, CAIr, SAICAr, AICAr, FAICAr, SAdo a ribotidy AIR, CAIR a SAICAR byly připraveny podle dříve publikovaných postupů [31], [95]. AICAR a SAMP byly komerčně dostupné.

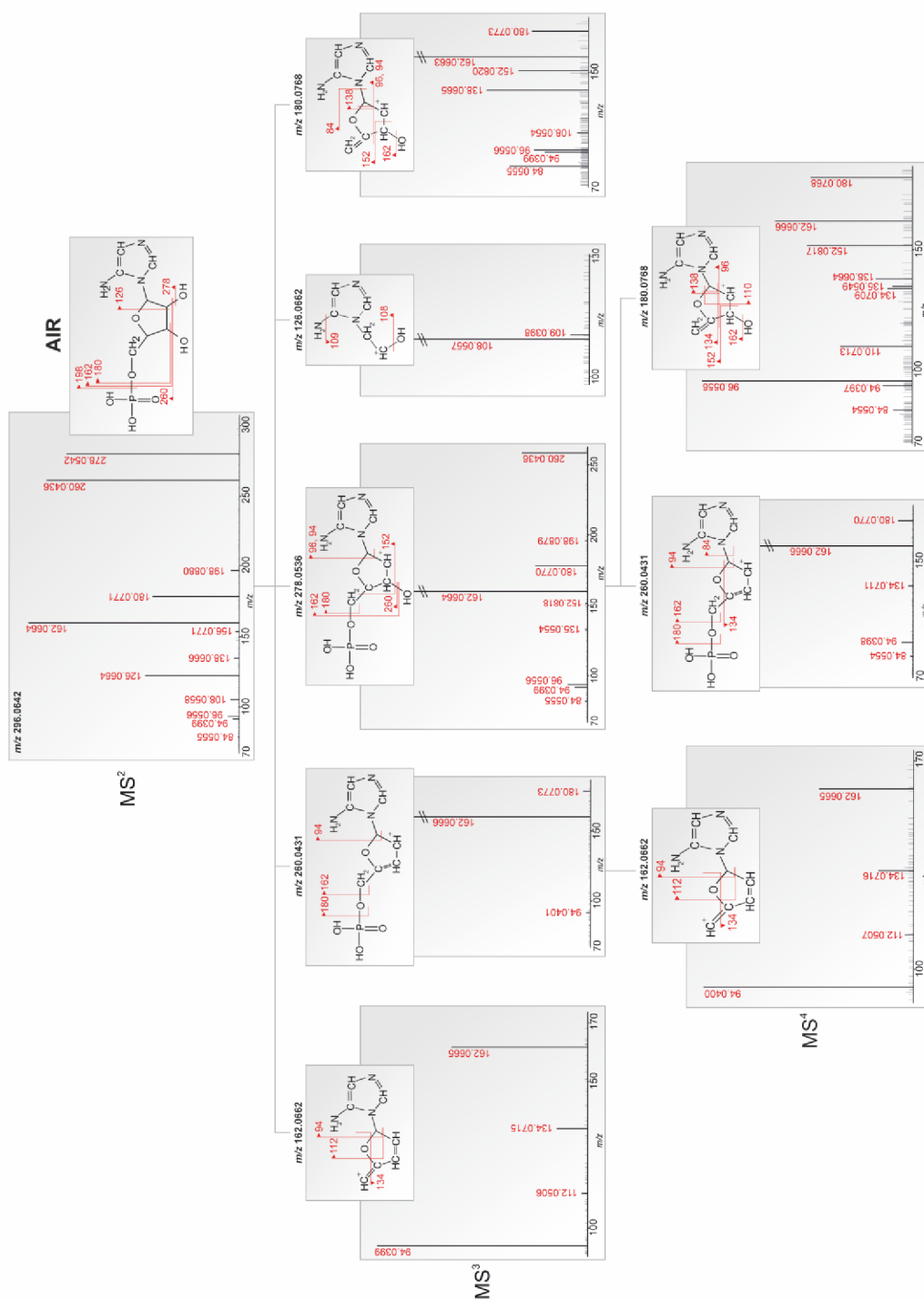
Pro přípravu GAR, FGAR a FGAMR byly vyvinuty nové postupy syntézy, založené na přípravě a využití bakteriálních rekombinantních enzymů MBP-GARS, MBP-GARTF a 6H-PurL. Syntéza GAR probíhala ve dvou reakcích. V první reakci vznikl PRA z ribosa-5-fosfátu a hydroxidu amonného [31], ve druhém kroku byl PRA enzymaticky přeměněn na GAR pomocí MBP-GARS s výtěžností 10 %. Příprava FGAR byla provedena stejným postupem jako GAR s přidáním N^{10} -formyl-THF a MBP-GARTF do reakční směsi. FGAMR byl

připraven z FGAR v reakci katalyzované enzymem 6H-PurL. Pro přípravu ribosidových forem byly všechny ribotidy defosforylovány pomocí CIP. FAICAR/r byly připraveny organickou syntézou z AICAR/r ve formylačních podmínkách reakce (kyselina mravenčí, anhydrid kyseliny octové, NaOH), která probíhala 1 hodinu při 37 °C.

3.1.2.2 Vícestupňová fragmentační analýza pomocí Orbitrapu Elite

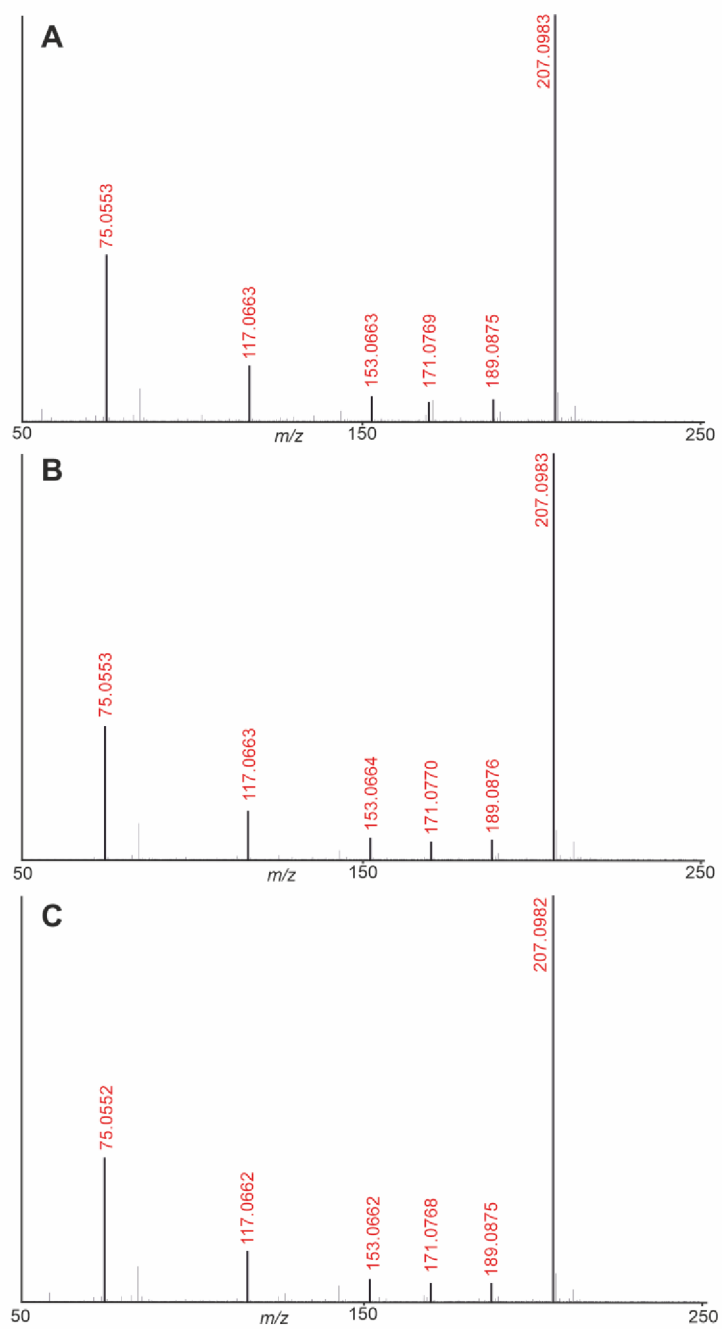
HRMSⁿ fragmentační analýza byla provedena u osmi biologicky stabilních meziproductů PDNS (GAR, FGAR, FGAMR, AIR, CAIR, AICAR, SAICAR a FAICAR) a jejich defosforylovaných forem (GAR, FGAR, FGAMr, AIR, CAIr, AICAr, SAICAr a FAICAr). Dále byl měřen produkt PDNS – IMP, a také metabolity související s PDNS – SAMP a SAdo. Celkově byla fragmentační analýza provedena u 19 metabolitů.

Metabolity byly postupně fragmentovány až do úrovně MS⁶ a poté byly sestaveny jejich spektrální stromy. Příkladem je spektrální strom AIR na Obrázku 5. Struktura metabolitu a jednotlivých fragmentů je zobrazena v každém hmotnostním spektru. Ve struktuře je vždy znázorněno maximálně šest fragmentů s nejvyšší intenzitou. Spektrální stromy všech ostatních metabolitů jsou součástí externí přílohy v PDF formátu (část E1).

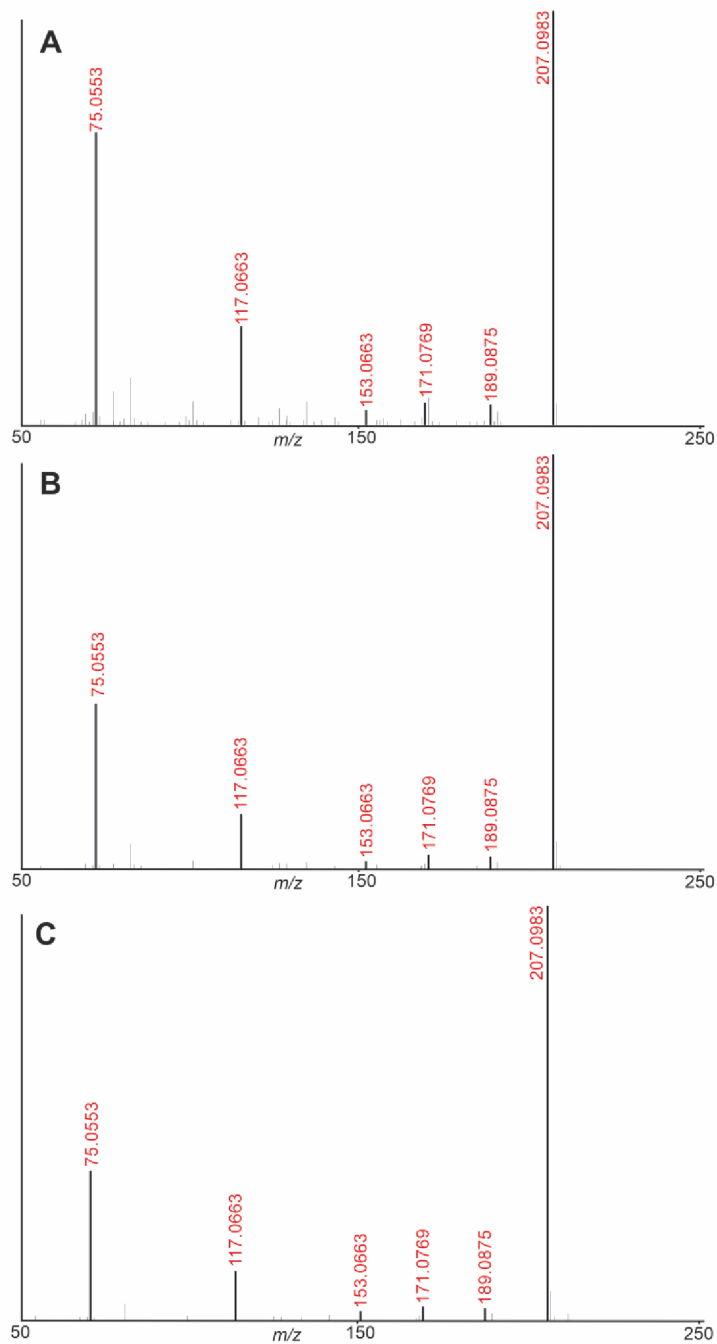


Obrázek 5. Spektrální strom AIR. Hodnoty m/z zobrazené červeně náleží fragmentované struktuře. Ostatní m/z představují koelující látky nebo hmoty fragmentované struktury, které se nepodařilo daným způsobem identifikovat.

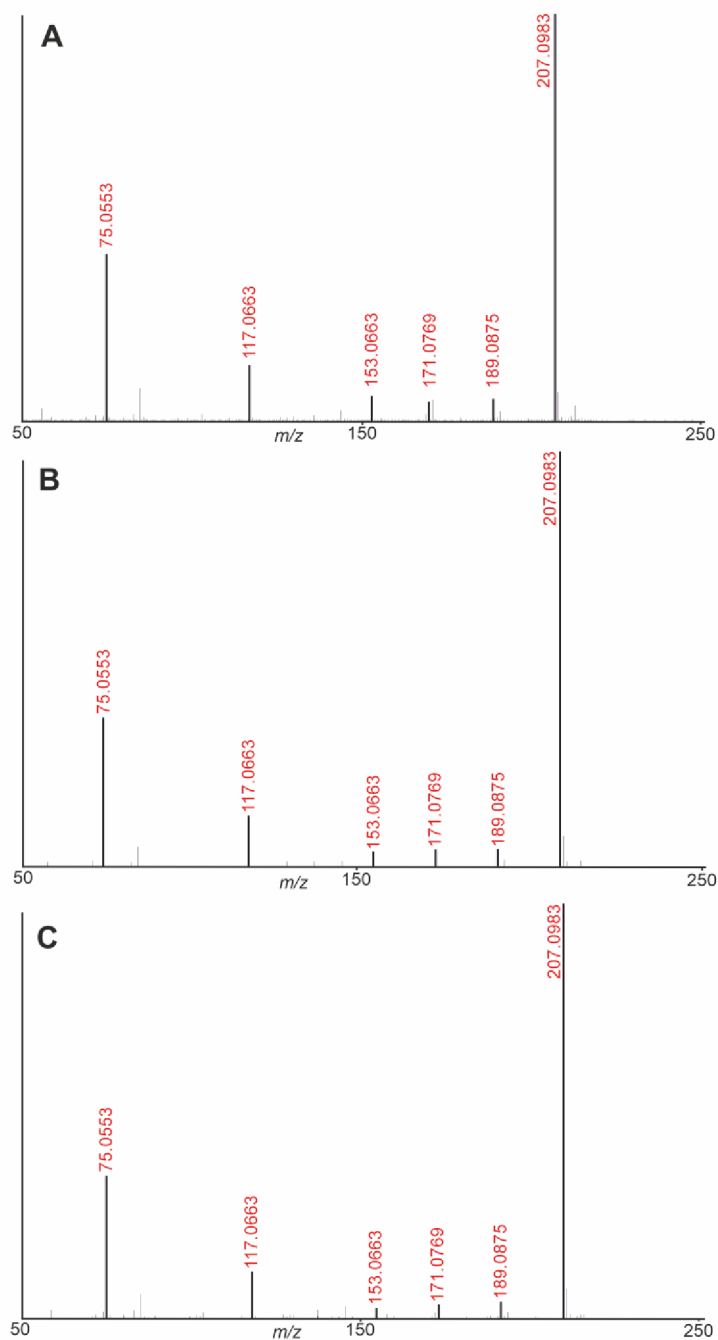
Více jak polovina všech metabolitů byla fragmentována do úrovně MS⁴. Počet dosažených úrovní fragmentace (MSⁿ) byl závislý zejména na výchozí koncentraci metabolitu (57-124 μM), dále na molekulové hmotnosti, účinnosti ionizace a iontové supresi (relativně malý vliv vzhledem k podmínkám měření). U většiny ribotidů a ribosidů byla pozorována jejich značná míra fragmentace ve zdroji. MS² fragmenty byly viditelné ve full MS skenech téměř všech měřených metabolitů, jejich intenzita většinou nepřesahovala 5 % intenzity molekulového iontu. V některých případech ovšem intenzita MS² fragmentů ve full MS spektru dosahovala 17, 20 a 540 % intenzity molekulového iontu. Pro snížení míry fragmentace ve zdroji byla provedena optimalizace podmínek měření na metabolitu GAR (Obrázky 6-8). Výchozí parametry pro ESI byly: napětí +3 kV, teplota iontového zdroje 300 °C, teplota přenosové trubice 350 °C, úroveň RF 60 % S-Lens. Byla provedena měření s upravenými parametry: napětí iontového zdroje sníženo na 2,5 a 2 kV, teplota iontového zdroje snížena na 250 °C, teplota přenosové trubice 300 °C, parametr S-Lens snižen na 10, 20 a 40 %.



Obrázek 6. Příklad fragmentace ve zdroji. MS^2 spektra GAR byla měřena se snižujícím se napětím elektrospreje: 3 kV (A), 2,5 kV (B), 2 kV (C). Se změnami podmínek měření nedošlo k významné změně intenzit zobrazených fragmentů.

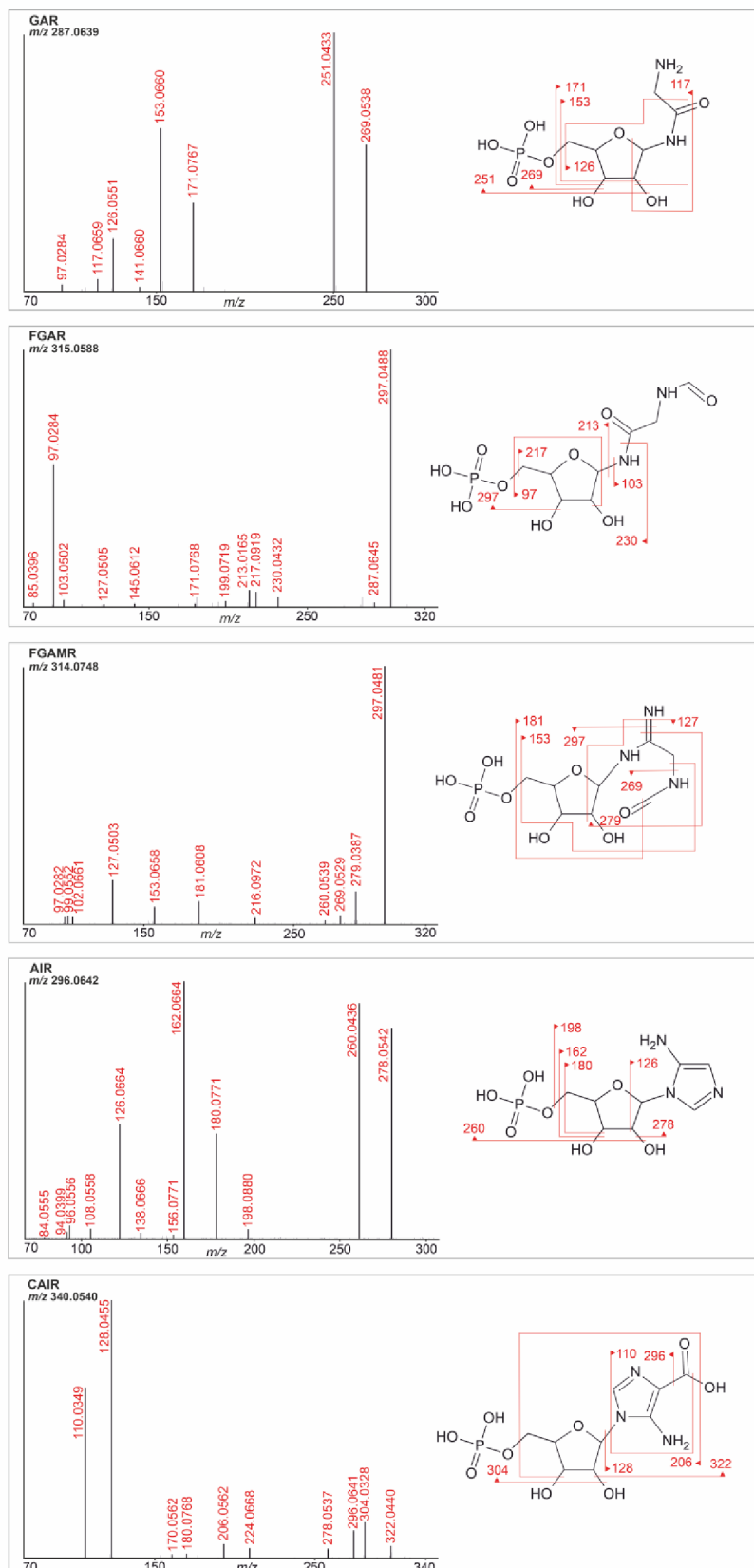


Obrázek 7. Příklad fragmentace ve zdroji. MS² spektra GAR byla měřena se zvyšujícím se parametrem S-lens: 10 % (A), 20 % (B), 40 % (C). Se změnami podmínek měření nedošlo k významné změně intenzit zobrazených fragmentů.

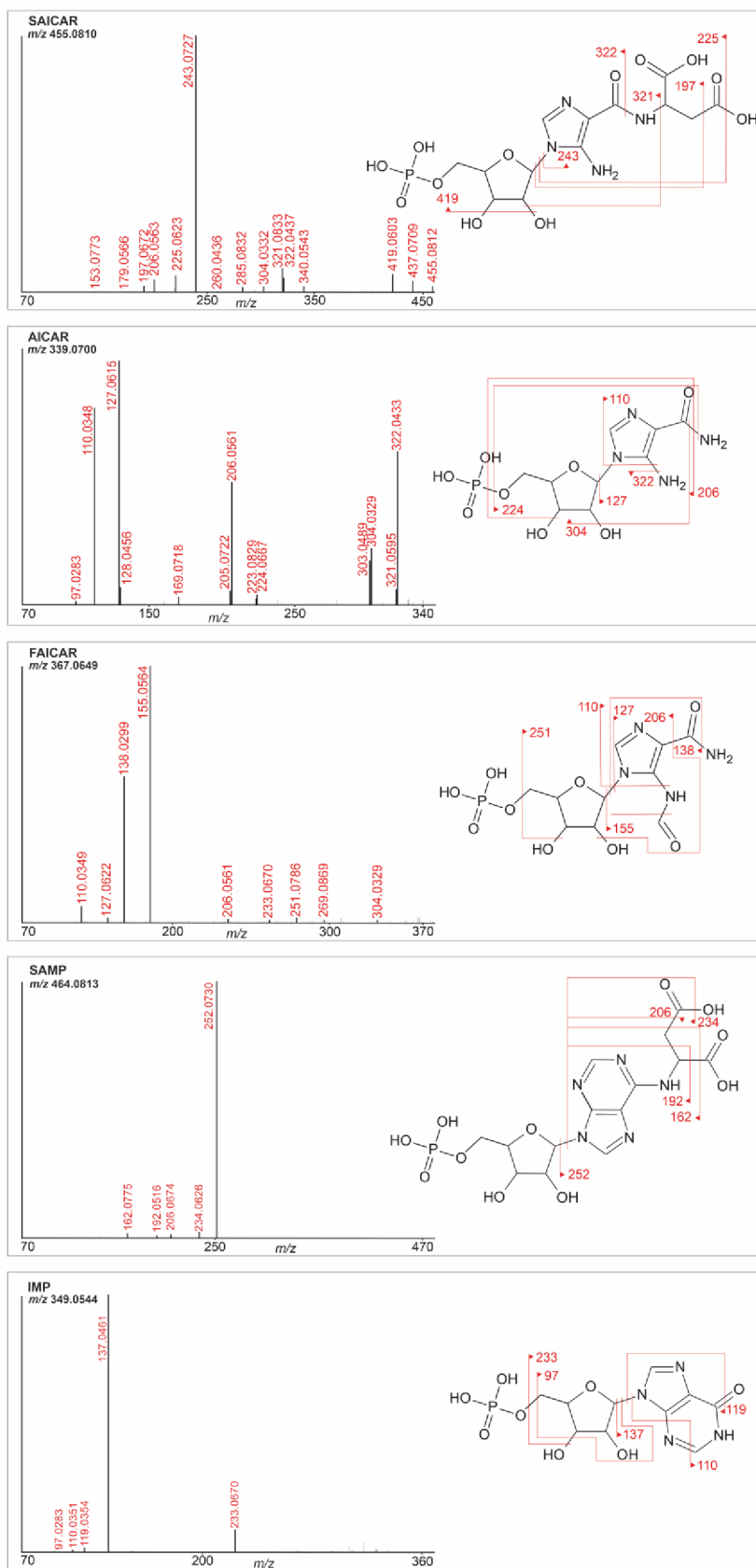


Obrázek 8. Příklad fragmentace ve zdroji. MS^2 spektra GAR byla měřena při různých teplotách iontového zdroje (H) a přenosové trubice (CA): H 300 °C CA 350 °C (A), H 300 °C CA 300 °C (B), H 250 °C CA 250 °C (C). Se změnami podmínek měření nedošlo k významné změně intenzit zobrazených fragmentů.

Za účelem nalezení společných rysů fragmentace byla zvlášť porovnána MS² spektra všech ribotidů (Obr. 9-10) a ribosidů (Obr. 11-12). U meziproductů první poloviny PDNS (po AIR) odpovídal fragment s nejvyšší intenzitou ztrátě vody či fosfátové skupiny z ribosy. Pro meziproducty druhé poloviny PDNS byla typická fragmentace v místě glykosidové vazby a ztráta amino skupiny ze vznikajícího purinového jádra.

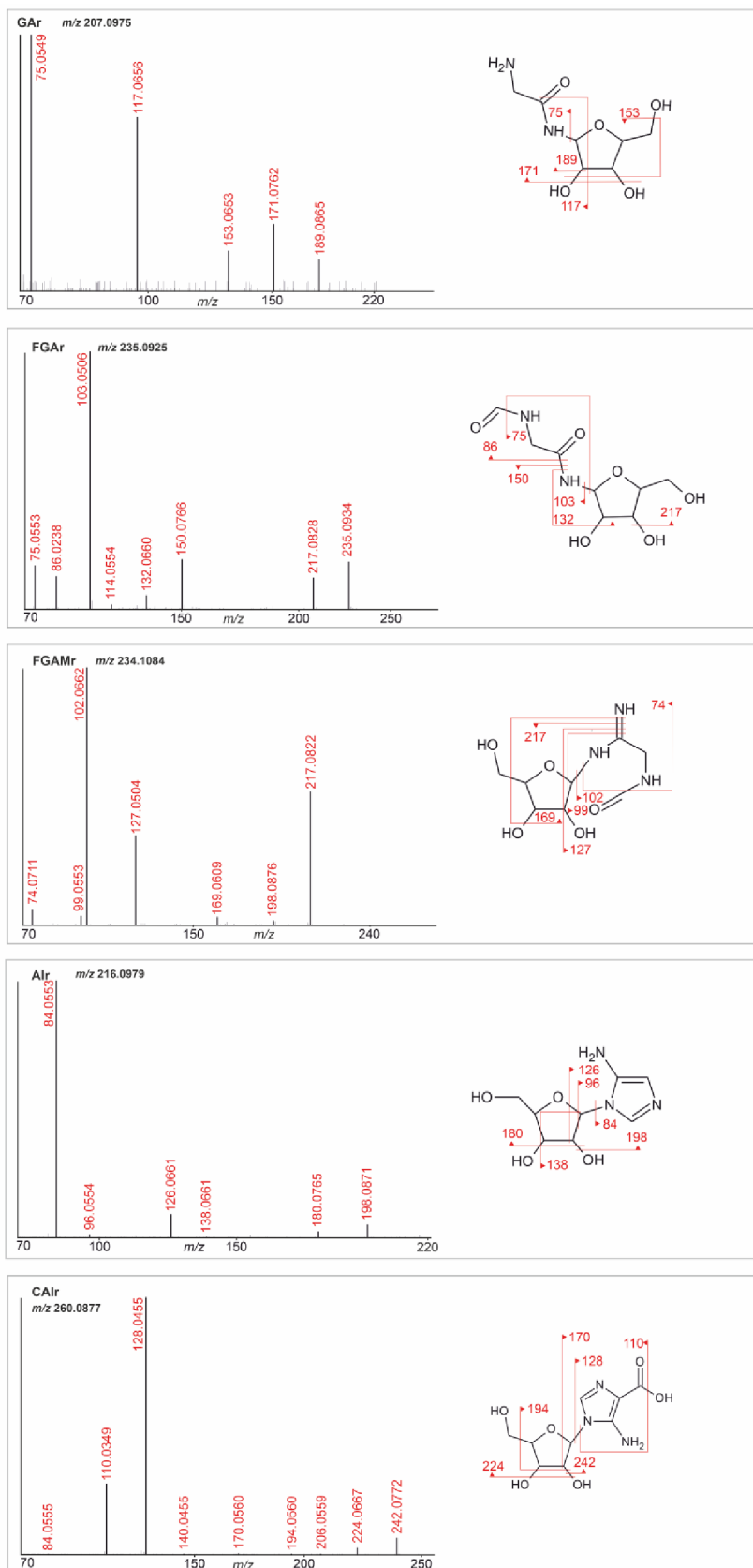


Obrázek 9. MS² fragmentační spektra ribotidů GAR, FGAR, FGAMR, AIR a CAIR. Struktura fragmentované molekuly je znázorněna vedle každého hmotnostního spektra a je v ní zobrazeno nejvýše 6 fragmentů s nejvyšší intenzitou.

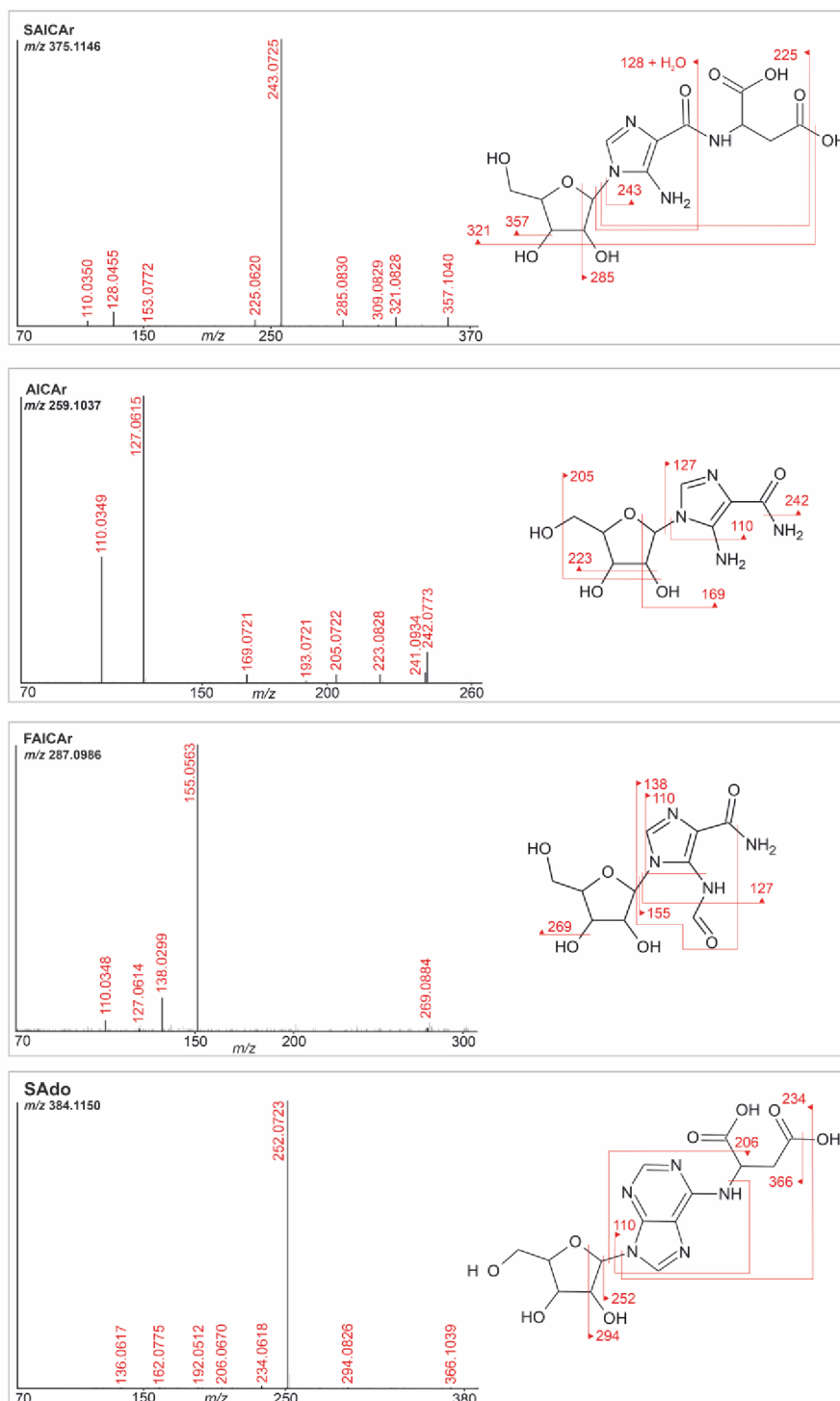


Obrázek 10. MS² fragmentační spektra ribotidů SAICAR, AICAR, FAICAR, SAMP a IMP. Struktura fragmentované molekuly je znázorněna vedle každého hmotnostního spektra a je v ní zobrazeno nejvýše 6 fragmentů s nejvyšší intenzitou.

V případě ribosidů (Obr. 11-12) byl fragment s nejvyšší intenzitou tvořen vždy částí vznikajícího purinového jádra, fragmentace tedy probíhala na místě glykosidové vazby. U některých ribosidů (FAICAr a SAdo) tento fragment významně dominoval a všechny ostatní fragmenty byly nalezeny s intenzitou nižší jak 1 % dominantního fragmentu, ale stále nad limitem detekce. Další fragmenty odpovídaly bazické části molekuly se ztrátou amino/hydroxylové skupiny nebo ztrátě jedné/dvou molekul vody z ribosy.

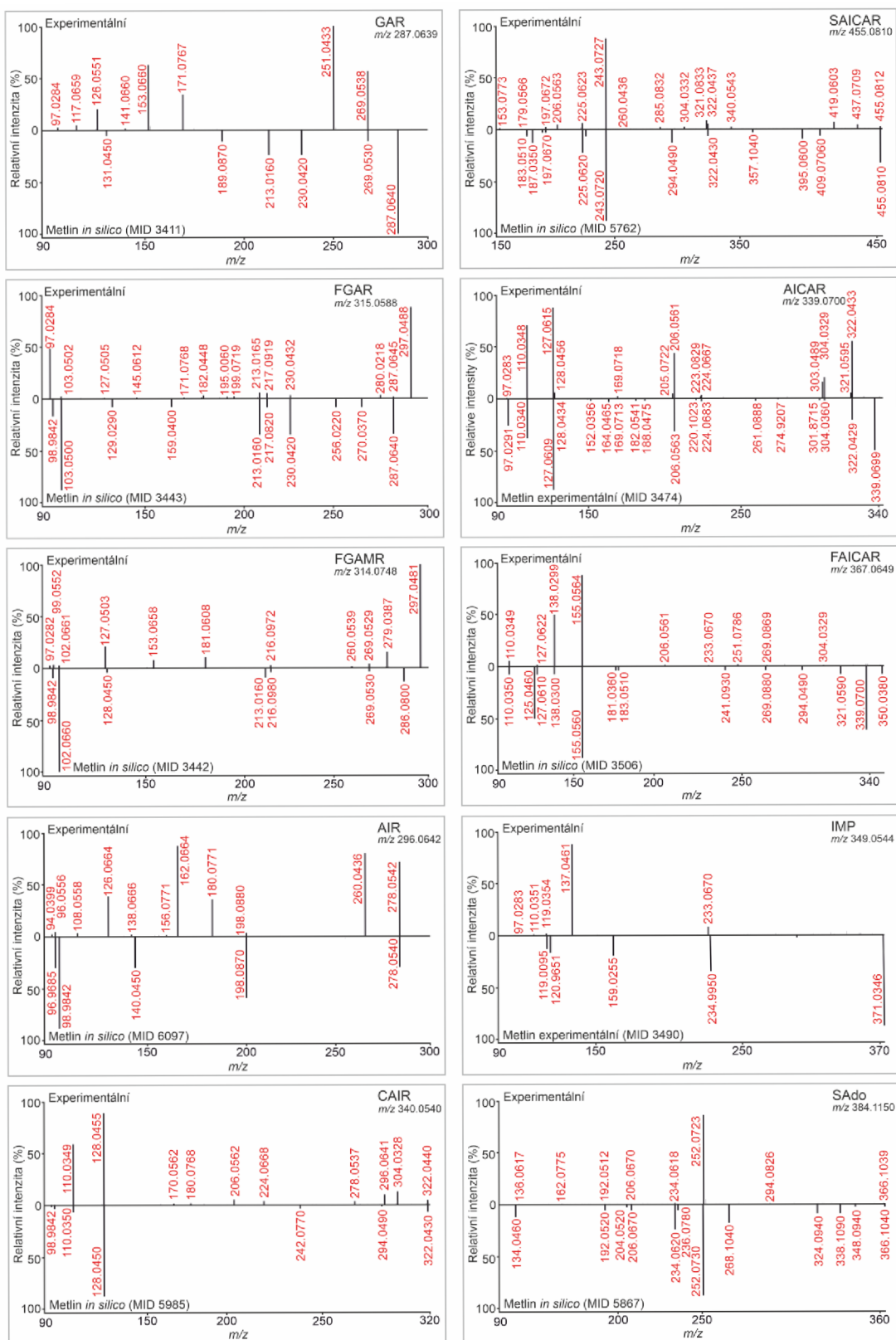


Obrázek 11. MS² fragmentační spektra ribosidů GAR, FGAr, FGAMr, Alr a CAIr. Struktura fragmentované molekuly je znázorněna vedle každého hmotnostního spektra a je v ní zobrazeno nejvýše 6 fragmentů s nejvyšší intenzitou.



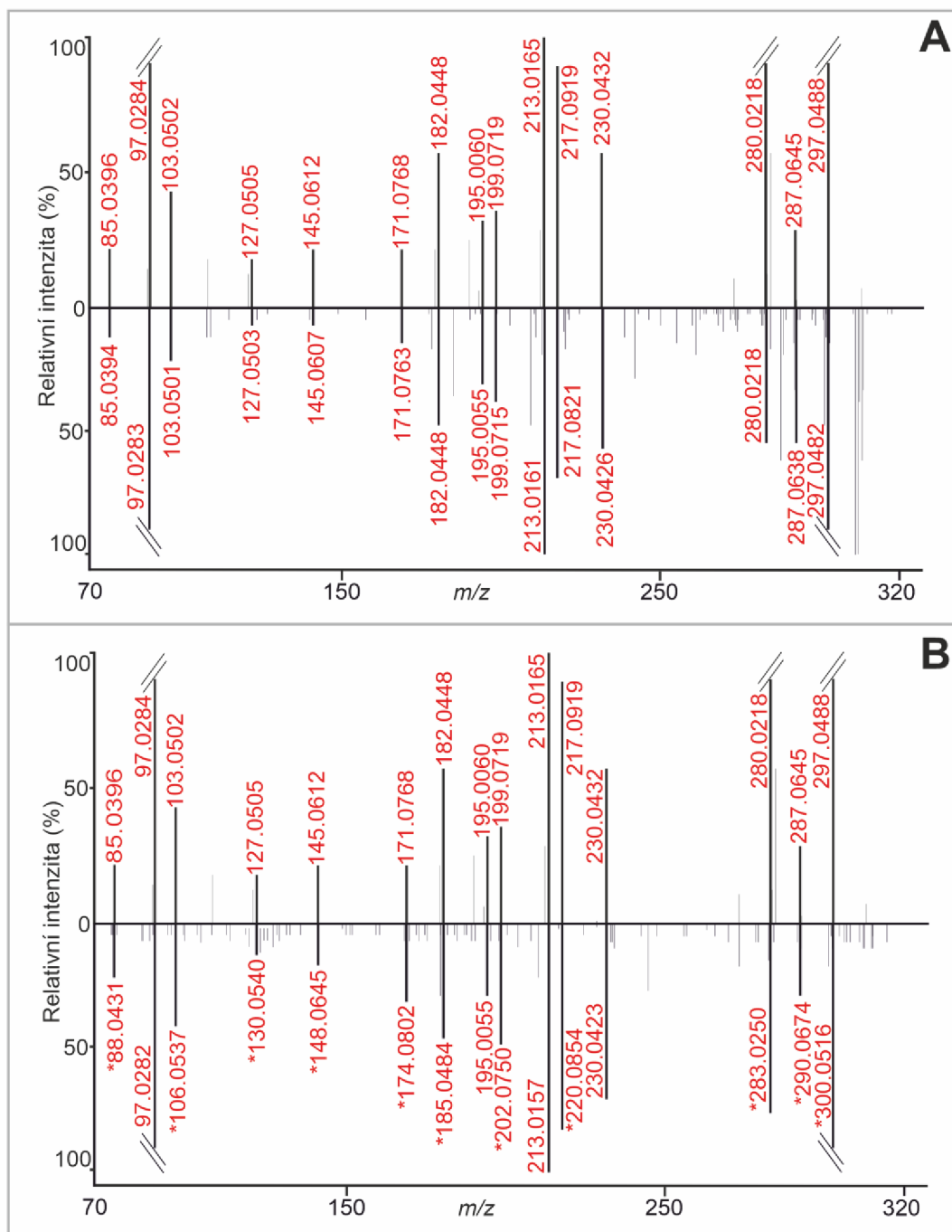
Obrázek 12. MS² fragmentační spektra ribosidů SAICAr, AICAr, FAICAr a SAdo. Struktura fragmentované molekuly je znázorněna vedle každého hmotnostního spektra a je v ní zobrazeno nejvýše 6 fragmentů s nejvyšší intenzitou.

Dále bylo provedeno porovnání MS² spekter ribotidů PDNS z této studie s *in silico* spektry databáze Metlin s výjimkou AICAR a IMP, které mají v databázi spektra experimentální (Obrázek 13). Shoda mezi spektry byla nalezena přibližně z jedné třetiny, konkrétní porovnání s příklady je uvedeno v Kapitole 4.1.3 - Diskuze. Fragmentační spektra ribosidů porovnávána nebyla, jelikož se v databázi jejich odpovídající *in silico* spektra nenachází.



Obrázek 13. Porovnání MS² fragmentačních spekter metabolitů PDNS měřených v této studii s odpovídajícími spektry nalezenými v databázi Metlin (in silico nebo experimentální). Hmotnostní rozsah fragmentačních spekter z databáze byl přizpůsoben hmotnostnímu rozsahu spekter z této studie.

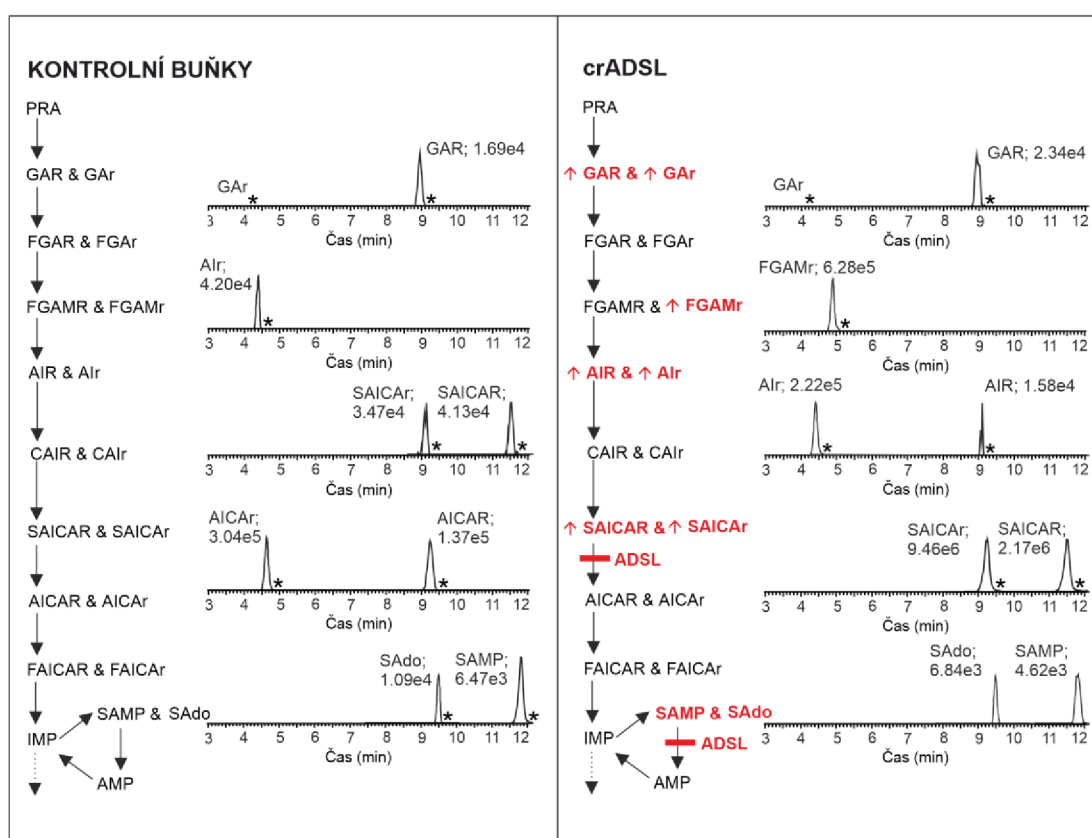
Díky analýze HeLa buněk deficitních pro jednotlivé enzymy PDNS byla získána data pro potvrzení struktury připravených meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem. Fragmentační spektra připravených látek byla porovnána s fragmentačními spektry metabolitů PDNS produkovaných buňkami. HeLa buňky (deficitní i kontrolní) byly kultivovány v přítomnosti izotopově značeného glycinu, který byl začleněn do produkovaných metabolitů PDNS. Většina metabolitů PDNS detekovaných v buněčných lyzátech a kultivačním médiu byla nalezena také v izotopově značené formě. Při porovnávání fragmentačních spekter byl brán v úvahu posun hmot (+3,0038 Da) v závislosti na pozici začlenění glycinu a fragmentaci. Příklad porovnání těchto spekter na metabolitu FGAR je na Obrázku 14. K meziproductům PDNS, které nebyly detekovány, patřil PRA a FAICAR.



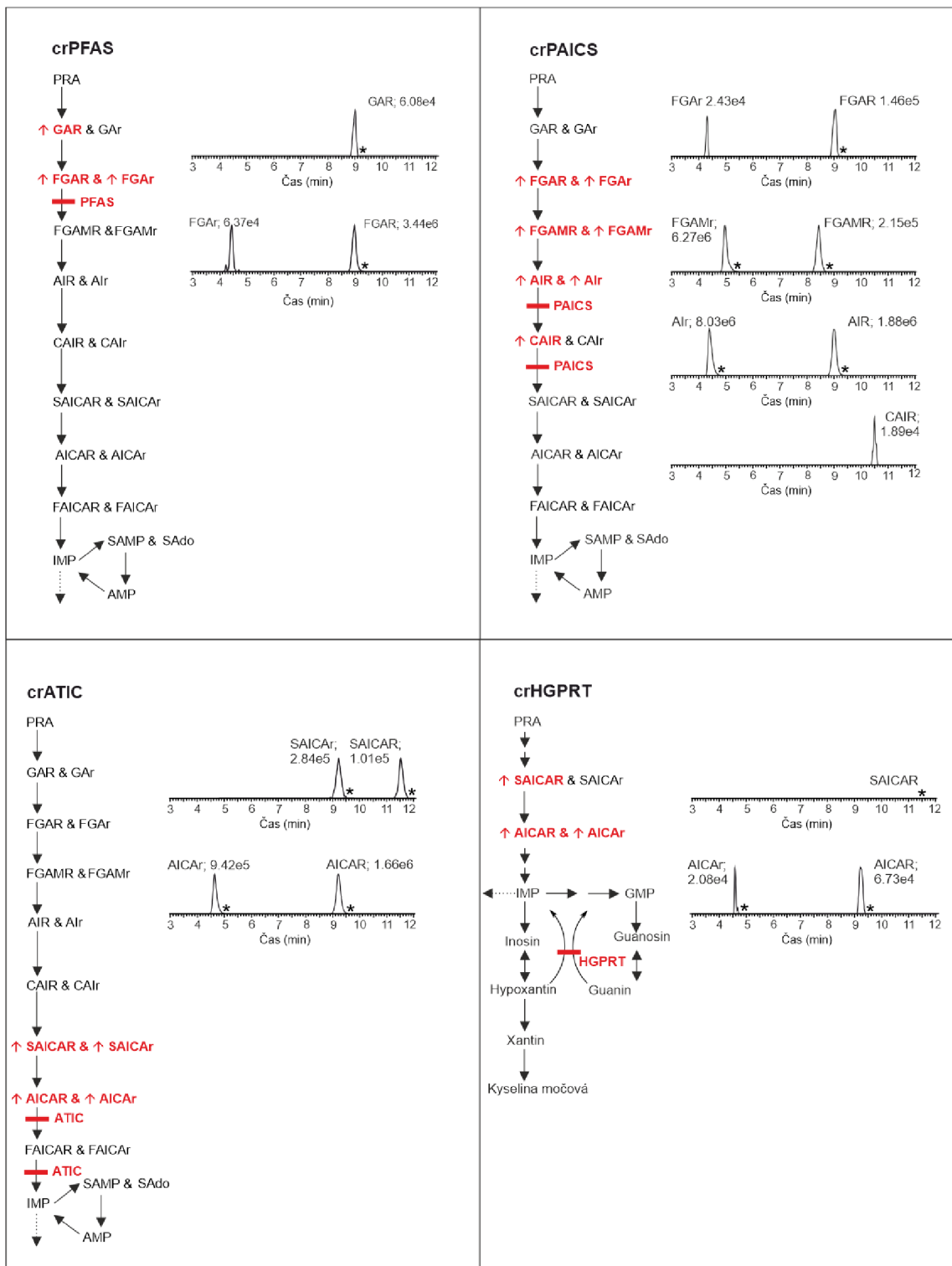
Obrázek 14. Potvrzení identity FGAR. MS² spektrum syntetizovaného FGAR bylo porovnáno s MS² spektry FGAR (A) a izotopově značeného FGAR (B), které byly oba produkovány a hromaděny v crPFAS buňkách. Na obrázku B jsou hvězdičkou označeny fragmenty s hmotnostním posunem 3,0038 Da, daným použitím U-¹³C₂, ¹⁵N izotopově značeného glycinu při kultivaci buněk.

3.1.2.2.1 Analýza meziproduktů PDNS v CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buňkách

Kromě potvrzení identity připravených metabolitů PDNS v první části této studie sloužila analýza buněk rovněž k simulaci stavu, který mají/mohou mít pacienti se známými/potenciálními poruchami PDNS. Celkem bylo analyzováno šest HeLa buněčných linií (crGART, crPFAS, crPAICS, crADSL, crATIC, crHGPRT + kontrolní buňky). Všechny ribotidy a ribosidy PDNS detekované v kontrolních a deficitních buněčných liniích jsou zobrazeny na Obrázcích 15-16.



Obrázek 15. Metabolity PDNS detekované v lyzátech crADSL a kontrolních HeLa buňkách. Hromaděné metabolity jsou označeny červeným tučným písmem a šipkou, enzymový blok je značen červeným obdélníkem. Buněčné linie byly měřeny v hexaplikátu a hodnota intenzity píku metabolitu představuje průměr. Chromatografické píky, které byly detekovány také v izotopově značené formě, jsou zobrazeny hvězdičkou. Poznámka: Schopnost ionizace metabolitů se může výrazně lišit, z toho důvodu nejsou jejich intenzity přímo porovnatelné.



Obrázek 16. Metabolity PDNS detekované v lyzátech crPFAS, crPAICS, crATIC a crHGPRT buněk. Enzymový blok v dráze deficitní buněčné linie je označen červeným obdélníkem. Hromaděné metabolity jsou označeny červeným tučným písmem a šipkou. Buněčné linie byly měřeny v hexaplikátu a hodnota intenzity píku metabolitu představuje průměr. Chromatografické píky, které byly detekovány

také v izotopově značené formě, jsou zobrazeny hvězdičkou. Poznámka: Schopnost ionizace metabolitů se může výrazně lišit, z toho důvodu nejsou jejich intenzity přímo porovnatelné.

V cytoplasmě kontrolních HeLa buněk, kultivovaných v bezpurinovém médiu, byl detekován AICAR a SAICAR, stejně jako jejich defosforylované formy. Dále zde byl detekován GAR/r, AIr a metabolity záchranné dráhy purinového metabolismu SAMP a SAdo. Ribosidy AICAr a AIr byly vylučovány do kultivačního média.

V crPFAS buňkách bylo zjištěno hromadění FGAR a jeho ribosidu. Bylo nalezeno také měřitelné množství GAR. FGAR i GAR byly detekovány také v izotopově značených formách. FGAr byl vylučován do kultivačního média.

V crPAICS buňkách bylo zaznamenáno hromadění AIR, CAIR a také dvou ribotidů, nacházejících se předešlých reakcích PDNS (před enzymovým blokem PAICS). Jednalo se o FGAMR a FGAR. Hojně se vyskytující ribosidy byly detekovány v kultivačním médiu.

Hromaděním metabolitů SAICAR a SAICAr se vyznačovaly crADSL buňky. Metabolity SAMP a SAdo byly také detekovány, ale v porovnání s kontrolními buňkami se nejednalo o předpokládanou akumulaci. Z dalších metabolitů PDNS byly detekovány AIR, AIr, GAR, GAr a FGAMr. Kultivační médium obsahovalo ribosidy SAICAr, AIr a FGAMr.

V crATIC buňkách bylo detekováno hromadění AICAR a SAICAR, odpovídající ribosidy byly vylučovány také do kultivačního média.

V buňkách deficitních pro enzym HGPRT byl detekován AICAR a jeho ribosid, který byl vylučován do kultivačního média. Stanovena byla také izotopově značená forma SAICAR.

3.1.3 Diskuze

3.1.3.1 Fragmentační analýza meziproduktů PDNS a jejich defosforylovaných analogů

Obecným porovnáním a zhodnocením spektrálních stromů studovaných látek lze konstatovat, že nejvíce informací o fragmentačním chování poskytují MS^3 a MS^4 hmotnostní spektra. V těchto úrovních fragmentace docházelo k nejvyššímu výskytu fragmentačních událostí vedoucí ke vzniku bohatých hmotnostních spekter. Ve vyšších úrovních fragmentace (MS^5 a MS^6) docházelo obvykle ke vzniku jednoho či dvou dalších fragmentů, přispívajících do výsledné podoby spektrálního stromu (např. FAICAR, SAdo, SAICAr). Se zvyšující se úrovní fragmentace klesala intenzita analyzovaného metabolitu. Hladina šumu naopak rostla a způsobovala nižší spolehlivost interpretace hmotnostních spekter. I přesto je přínosné popsat a sdílet tato spektra ve spektrálních databázích (např. mzCloud), jelikož mohou pomoci v procesu identifikace neznámých látek. Největší výhodou spektrálních stromů totiž spočívá v možnosti částečné/úplné identifikace látky, která se v databázi nenachází, a to díky mechanismu PIF (Precursor Ion Fingerprinting). Ten je založen na porovnání substruktur (tj. fragmentů z vyšších úrovní MS), které jsou u podobných látek identické, a jedinečnost látky je dána způsobem, jakým jsou substruktury kombinovány [24]–[26].

Během měření fragmentačních spekter byla u většiny metabolitů detekována fragmentace ve zdroji, která poukazuje na jejich nestabilitu. Intenzita některých MS^2 fragmentů dosahovala desítek až stovek procent intenzity molekulárního iontu. Fragmentace ve zdroji byla jako první detekována při analýze GAr, proto byly s tímto metabolitem provedeny další analýzy se změnou parametrů měření s cílem minimalizovat tento jev. Optimalizace podmínek měření ovšem nevedla k významně vyšší stabilitě metabolitů PDNS a omezení jejich fragmentace již ve zdroji. Postup získávání MS^n spekter byl u metabolitů s významnou mírou fragmentace ve zdroji a nízkou intenzitou molekulárního iontu upraven. Byla provedena MS^2 analýza fragmentů

pocházejících ze zdroje z full MS spektra, která ve skutečnosti odpovídala úrovni MS³.

Jako další bylo provedeno porovnání fragmentačních spekter (MS²) ribotidů s ribosidy, nebo v rámci jednotlivé skupiny (ribotidy/ribosidy). Fragmentační spektra ribotidů vykazovala vyšší variabilitu, než tomu bylo u ribosidů. Bylo detekováno odlišné fragmentační chování ribotidů první a druhé poloviny PDNS. U meziproductů první poloviny PDNS docházelo k fragmentaci na ribosylové části molekuly, jednalo se o ztrátu vody nebo fosfátové skupiny. K tvorbě dalších fragmentů docházelo s postupným vznikem purinového jádra. Pro ribotidy druhé poloviny PDNS byla charakteristická fragmentace v místě glykosidové vazby a také ztráta amino skupiny z báze. Vznik těchto fragmentů byl charakteristický také pro ribosidy, glykosidová vazba je tedy v případě těchto molekul místem snadno podléhající fragmentaci. Fragmentace v ribosylové části molekuly se vyskytovaly s nižší četností.

Spektrální databáze (např. Metlin, HMDB, mzCloud) až na výjimky (např. AICAR, IMP) neobsahují experimentální fragmentační spektra meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem, jelikož tyto látky neexistují jako komerčně dostupné standardy. Místo toho v nich nalezneme *in silico* prediktivní spektra, ovšem pouze pro ribotidy. Při porovnání MS² spekter ribotidů z této studie s odpovídajícími *in silico* spektry z databáze Metlin byly shodné fragmenty nalezeny přibližně z jedné třetiny. Prvním důvodem tak značné rozdílnosti je upřednostňování nízkomolekulárních iontů ($m/z < 100$) při všech třech testovaných podmínkách fragmentace v pozitivním módu (10, 20 a 40 eV), které vzniká „machine learning“ přístupem používaným pro získání *in silico* spekter. Naproti tomu experimentální spektra obsahovala mnoho iontů s $m/z > 100$, ale vznik nízkomolekulárních iontů byl potlačen vzhledem k mechanismu CID fragmentace. Velkou rozmanitost iontů v experimentálních spektrech lze přisuzovat kombinovaným místům fragmentace, vedoucí ke vzniku konkrétního iontu. Pokud se například podíváme na MS² experimentální spektrum GAR (Obr. 13), fragment s nejvyšší intenzitou odpovídá ztrátě jedné/dvou molekul vody z ribosy (m/z 269 a 251) nebo ztrátě jedné/dvou molekul vody z ribosy v kombinaci se ztrátou

fosfátové skupiny (m/z 171 a 153). Z těchto čtyř fragmentů s nejvyšší intenzitou v experimentálním MS^2 spektru GAR nalezneme v odpovídajícím *in silico* spektru pouze fragment s m/z 269. To naznačuje, že je v případě *in silico* fragmentací upřednostněno pouze jedno místo fragmentace pro vznik iontu, ne jejich kombinace. Dalším důvodem pro odlišnosti mezi experimentálními a *in silico* spektry může být fakt, že *in silico* spektra obsahují ionty, které by v daném módu ionizace (v našem případě pozitivním) pravděpodobně vůbec nevznikly. Příkladem je iont s m/z 98,9842 označovaný jako pozitivně nabitá fosfátová skupina (pro anotaci iontu byl použit program MassFrontier). Tento iont se nachází napříč všemi *in silico* spektry ribotidů PDNS, nicméně v pozitivním módu ESI pravděpodobně vznikat nebude. Pro predikci fragmentace komerčně nedostupné látky využívají často programy pro *in silico* fragmentaci molekul experimentální data strukturně podobných molekul. V případě meziproductů PDNS je takovouto molekulou AICAR, jehož experimentální spektra v databázi Metlin nalezneme. Obecně se dá říct, že při porovnání fragmentačních spekter měřených v této studii se spektra v databázi (*in silico*) byla nalezena větší shoda u molekul strukturně podobných AICAR, tedy metabolitů druhé poloviny PDNS (Obr. 13). Fragmentační spektra metabolitů první poloviny PDNS (GAR, FGAR) se oproti tomu významně lišila ve srovnání s odpovídajícími *in silico* spektry v databázi. I přes tato omezení mohou *in silico* spektra významně pomáhat při procesu identifikace neznámých struktur či potvrzení struktur navrhovaných.

Pro potvrzení identity připravených meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem bylo třeba tyto metabolity získat *in vivo* v buněčné kultuře. K tomuto účelu posloužily HeLa buněčné linie geneticky upravené metodou CRISPR-Cas9 tak, aby byly deficitní v aktivitě jednotlivých enzymů PDNS. Buňky (deficitní i kontrolní) byly 24 h před sklizením vloženy do bezpurinového média, aby došlo k aktivaci PDNS. Tato biochemická dráha totiž zůstává neaktivní, pokud je v kultivačním médiu dostatek purinů. Zároveň byly využity znalosti o biochemii PDNS z hlediska vstupujících látek k obohacení analýzy o izotopové značení. Dvě hodiny před sklizením byly buňky umístěny do kultivačního média bez purinů a glycinu, do kterého byl přidán izotopově

značený glycin. Tato aminokyselina vstupuje do PDNS již ve druhé enzymové reakci katalyzované trifunkčním GART, izotopové značení tak bylo začleněno do vznikajícího purinového jádra. Tímto způsobem byly získány přirozeně izotopově značené metabolity PDNS, které představovaly další způsob potvrzení identity pro syntetizované formy. Většina metabolitů PDNS byla detekovaná i ve značené formě jak v buněčných lysátech, tak v kultivačním médiu. Identita připravených PDNS metabolitů byla potvrzena porovnáním jejich MS² spekter s fragmentačními spektry jejich analogů (izotopově značených i neznačených), které byly produkovány buňkami. U MS² spekter izotopově značených metabolitů byl při porovnávání fragmentů započítán hmotnostní posun až o 3 Da (glycin U ¹³C₂, ¹⁵N), v závislosti na struktuře fragmentu. PRA nebyl detekován z důvodu jeho chemické nestability [100]. Nepodařilo se detekovat ani FAICAR, nejspíš díky specifickým kinetickým vlastnostem enzymu ATIC, který katalyzuje jeho vznik. ATIC je bifunkční enzym, který katalyzuje poslední dva kroky PDNS – transformylaci AICAR na FAICAR a cyklizaci FAICAR za vzniku IMP. FAICAR téměř není schopen difúze do okolního prostředí, jelikož jsou dvě aktivní místa ATIC prostorově velmi blízká. Formylační reakce navíc upřednostňuje zpětný směr, kdežto cyklohydrolasa katalyzuje jednosměrnou reakci vzniku IMP [72].

3.1.3.2 Analýza meziproductů PDNS v CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buňkách

Regulace PDNS je studována od 50. let minulého století. Na základě enzymových kinetických studií a teoretických výpočtů bylo navrženo, že první reakce PDNS je rychlost určující pro celou dráhu a změna v dalších krocích nemá vliv na celkový flux dráhou [101]–[103]. AICAr a SAICAr patří k jediným metabolitům PDNS, detekovaným v tělních tekutinách zdravých jedinců pomocí současných analytických metod [56], [96], [104], [105]. Tato pozorování naznačují, že existují další místa regulace v dráze PDNS.

V této studii byly použity buněčné linie HeLa, geneticky upravené metodou CRISPR-Cas9 tak, aby byly deficitní pro jednotlivé enzymy PDNS. Buňky

připravila Barešová a kol. v roce 2016 [31] a představují první lidský buněčný model známých i potenciálních geneticky podmíněných poruch PDNS. Jak už bylo zmíněno v kapitole 4.1.3.1, buňky byly 24 h před sklizením kultivovány v bezpurinovém médiu vedoucí k aktivaci PDNS. Dvě hodiny před sklizením bylo kultivační médium opět vyměněno, tentokrát neobsahovalo puriny a glycin, ale glycin byl přidán v izotopově značené formě. Glycin je jedním ze substrátů PDNS, vstupuje do dráhy již ve druhé reakci, tudíž byl využit pro produkci značených metabolitů PDNS. Buněčné lyzáty a kultivační média byly analyzovány metodou HPLC-HRMS s cílem detekovat a fragmentovat akumulované metabolity PDNS. Ve všech buněčných liniích byly detekovány intracelulární i extracelulární metabolity, většina z nich byla detekována v izotopově značené formě. Výjimkou byly crGART buňky, u kterých nebyl nalezen PRA, jelikož se jedná o velmi nestabilní látku s poločasem rozpadu 5 s za fyziologických podmínek [100], [106]. U jednotlivých deficitních buněčných linií bylo pozorováno nejen hromadění meziprojektu PDNS (ribotidu) přímo předcházejícímu enzymový blok, ale také hromadění ribotidů nacházejících se až pět enzymových reakcí před blokem. Vysoká koncentrace ribotidu přímo před enzymovým blokem totiž působí změnu v rovnováze předchozích enzymových reakcí. Většinou nebylo pozorováno hromadění všech (po sobě jdoucích) ribotidů v opačném směru (před enzymovým blokem). Důvodem může být chemická nestabilita metabolitů, odlišná enzymová kinetika napříč dráhou PDNS, nebo také různá účinnost ionizace metabolitů. Nami použitá metoda pro analýzu buněk je obecně vhodnější pro detekci ribosidů než ribotidů nesoucí negativní náboj. Zřejmě i z toho důvodu nebyly v buňkách v některých případech detekovány ribotidy, ale jejich odpovídající defosforylované formy (ribosidy) byly přítomny. Řada ribosidů byla detekována jak v buněčných lyzátech, tak v kultivačním médiu. Jedná se o běžný způsob, kterým se buňky nesoucí deficit záchranné dráhy zbavují nahromaděných toxických metabolitů pomocí rovnovážných nukleosidových přenašečů [107]. Stejný mechanismus nejspíš funguje i v rámci známých defektů PDNS, jelikož v tělních tekutinách pacientů s deficitem ADSL nebo ATIC byly detekovány pouze ribosidové formy hromaděných substrátů [55], [70]. Role tohoto

mechanismu je velice významná pro diagnostiku DMP purinového metabolismu, založenou na detekci extracelulárních nukleosidů v tělních tekutinách [107]. Rovnovážné přenašeče nukleotidů mají v lidském těle různou katalytickou aktivitu vůči svým substrátům soutěžícím o aktivní místo [108]. Jedním z dalších aspektů je neznámá specifita purinnukleosidfosforylasy pro metabolity měřené v této studii. Výše zmíněná fakta komplikují interpretaci detekovaných PDNS metabolitů v přirozené a izotopově značené formě.

V kontrolních buňkách byly detekovány jednak metabolity publikované v dřívějších studiích (AICAR a SAICAR) [104], [105], tak metabolity detekované vůbec poprvé – GAR/r a AIR. Toto pozorování je pravděpodobně výsledkem vyšší citlivosti použité analytické metody. První reakce PDNS je považována za rychlost určující pro celkový flux touto metabolickou dráhou. Dalo by se tedy předpokládat, že se jednotlivé substráty budou vyskytovat v nízkých, vzájemně souvisejících koncentracích. Jejich detekce je nicméně ovlivněna schopností ionizace jednotlivých meziproduktů PDNS. Doposud byla publikována pouze jedna studie popisující částečnou detekci meziproduktů PDNS ve stopovém množství autoradiografickou metodou [109].

Analýza crPFAS buněk prokázala hromadění GAR, FGAR a FGAR. FGAR zřejmě způsobil již diskutovanou změnu rovnováhy předchozí enzymové reakce vzniku GAR, proto byl tento metabolit také detekován.

Dříve provedená studie na ovariálních buňkách křečka čínského nesoucí mutaci v enzymu PAICS (AdeD) ukazuje hromadění AIR a také druhého metabolitu, který autoři nebyli schopni identifikovat [110]. V naší studii byly kromě AIR detekovány další dva ribotidy, FGAMR a FGAR. Rovnováha enzymových reakcí mohla být tedy pozměněna až k enzymu PFAS, katalyzující přeměnu FGAR na FGAMR. V roce 2019 byli identifikováni první dva pacienti s deficitem PAICS. V LC-MS/MS analýze pacientových fibroblastů kultivovaných v bezpurinovém médiu ovšem nebyl detekován AIR ani jeho ribosid [91].

Deficit bifunkčního enzymu ADSL je charakterizován přítomností sukcinylpurinů SAICAr a SAdo v tělních tekutinách pacientů [48]. Při naší analýze

bylo v crADSL buňkách detekováno hromadění SAICAR a SAICAr. Metabolity SAMP a SAdo byly detekovány také, ale v porovnání s kontrolními buňkami se nejednalo o hromadění. Toto pozorování lze odůvodnit experimentálními podmínkami. Kultivací v bezpurinovém médiu byly buňky nuceny ve vysoké míře využívat PDNS, naopak využití cyklu purinových nukleotidů bylo z důvodu snížené míry proliferace buněk omezeno. Detekce AIR a GAR v buňkách opět ukazuje na změnu rovnováhy enzymových reakcí. Hromadění AIR/r v buněčných lyzátech i kultivačním médiu je v souladu s výsledky dřívější analýzy ADSL-deficitních ovarialních buněk křečka čínského (AdeI) [110].

U doposud čtyř identifikovaných pacientů s deficitem ATIC (AICA-ribosidurie) byla naměřena enormní koncentrace AICAr a SAICAr v tělních tekutinách [70], [71], zvýšená byla i koncentrace SAdo, ale ne tolik, jako v případě deficitu ADSL. V crATIC buňkách bylo detekováno hromadění AICAR a SAICAR i jejich odpovídajících ribosidů (AICAr, SAICAr), které byly vylučovány do kultivačního média. Metabolity SAMP a SAdo nebyly detekovány.

Pacienti trpící částečným (Kelley-Seegmillerův syndrom) nebo úplným deficitem HGPRT (Lesch-Nyhanův syndrom) mají zvýšenou hladinu AICAR v erytrocytech a AICAr v moči [73], [111]. Jak bylo zmíněno dříve, erytrocyty nemají enzymy celé dráhy PDNS, ale jsou schopné metabolizovat exogenní ribosidy na jejich příslušné mono-, di- a trifosfátové formy a hromadit je [111]. Několik studií popisuje zvýšenou hladinu AICAR v mozkové tkáni myši s deficitem HGPRT [112], [113]. V naší studii byl v crHGPRT buňkách detekován AICAR a AICAr, který byl také vylučován do kultivačního média. U pacientů s Lesch-Nyhanovým syndromem totiž vzniká velké množství xantosin-5-monofosfátu (XMP) vzhledem k masivní produkci kyseliny močové, a tento metabolit (XMP) je silným inhibitorem bifunkčního enzymu ATIC v dráze PDNS [114]. V souvislosti s hromaděním AICAR se spekuluje rovněž o zvýšené biosyntéze histidinu (AICAR je meziproduktem této metabolické dráhy), ale tato hypotéza zatím nebyla potvrzena experimentálními daty [113], [115]. Detekován byl také SAICAR v izotopově značené formě, nejspíš v souvislosti se změnou enzymové rovnováhy.

3.2 Kombinovaná cílená a necílená metabolická analýza HeLa buněk deficitních v purinové *de novo* syntéze

Tato studie byla zaměřena na kombinovanou (cílenou a necílenou) metabolickou analýzu CRISPR-Cas9 editovaných HeLa buněk defektních v jednotlivých enzymech PDNS. Cílem bylo popsat a objasnit změny v metabolickém profilu buněk způsobené enzymovými defekty této stěžejní metabolické dráhy. Práce s názvem „Combined targeted and untargeted profiling of HeLa cells deficient in purine *de novo* synthesis“ byla publikována v roce 2022 v časopise *Metabolites* [116].

3.2.1 Materiál a metody

3.2.1.1 Chemikálie

Voda, methanol a acetonitril byly v LC-MS kvalitě zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydroxid amonný byl zakoupen u stejné firmy. Médium MEM bylo získáno od firmy BioSera (Nuaille, France). Pufr NEB3 a CIP byly zakoupeny u New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA). Kultivační média DMEM a F12, a FBS byly zakoupeny od firmy Life Technologies, ThermoFischer Scientific (MA, USA).

3.2.1.2 Kultivace, sklizení buněk a příprava vzorků

V této studii byly použity CRISPR-Cas9 editované HeLa buňky deficitní v jednotlivých enzymech PDNS (crGART, crPFAS, crPAICS, crADSL, crATIC), které byly použity také v první studii. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM/F12 s obsahem 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin. Kultivační médium PDNS deficitních buněk obsahovalo navíc 30 μ M adeninu. V čase 24 hodin před sklizením byly buňky přemístěny do PD média DMEM s obsahem 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin. Kultivace buněk probíhala v 25 cm² kultivačních lahvích (tj. přibližně 1 milion buněk v době 80-90% konfluence) ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5 % CO₂ při 37 °C. Každá buněčná linie byla kultivována v hexaplikátu.

Sklízení buněk bylo provedeno stejným postupem, jaký byl uveden v první studii (viz kapitola 3.1.1.4 Kultivace a sklízení buněk). Rozdílný byl pouze objem methanolu pro oplach buněk (20 mL) a objem extrakčního methanolu (1 a 2 mL). Po lyofilizaci bylo ke každému vzorku přidáno 200 μ L 80% methanolu, vzorky byly centrifugovány (15 000 x g, 15 min, 4 °C) a supernatanty byly pipetou přeneseny do skleněných vialek pro následnou analýzu.

3.2.1.3 Necílená metabolomická analýza

Vzorky byly analyzovány v jedné sérii v náhodném pořadí. Vzorek kontroly kvality (QC) byl připraven smícháním 10 μ L každého vzorku PDNS deficitních i kontrolních buněk a byl použitý pro prvních 10 nástřiků analýzy k ustálení podmínek měření a dále jako každý pátý vzorek pro kontrolu podmínek v průběhu analýzy celé série. Podmínky chromatografické separace a nastavení systému byly stejné jako u první studie (viz kapitola – 3.1.1.3 Fragmentační analýza meziproduktů PDNS a jejich defosforylovaných analogů (HPLC-HRMSⁿ)). Nástřik vzorků byl 5 μ L.

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite pracoval v pozitivním módu ESI při rozlišení 60 000 FWHM v rozmezí m/z 70-1500. Teplota iontového zdroje byla 300 °C, teplota přenosové trubice byla 350 °C, průtok přidavného plynu („sheath gas“) 10 arbitrárních jednotek, průtok pomocného plynu („auxiliary gas“) 35 arbitrárních jednotek, průtok čistícího plynu („sweep gas“) 0 arbitrárních jednotek, napětí elektrospreje +3 kV. Chyba měření byla pod 5 ppm. Data byla měřena v profilovém módu.

Statisticky významné m/z signály byly podrobeny fragmentační analýze. Fragmentační spektra byla naměřena při rozlišení 15 000. Fragmentace byly provedeny technikou CID s použitím 35 jednotek normalizované kolizní energie. Aktivační čas byl 10 ms, aktivační parametr Q 0,25. Analýza probíhala v pozitivním i negativním módu ESI. Nastavení parametrů iontového zdroje a chromatografická metoda separace byly obdobné, jako v necílené metabolomické analýze (popis je součástí této kapitoly). Měřené m/z signály byly poté identifikovány na základě MSI pravidel.

3.2.1.4 Cílená metabolomická analýza

Cílená metabolomická analýza byla provedena pomocí kapalinové chromatografie (UltiMate 3000 RS, Dionex Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (Triple Quad 6500, SCIEX, Framingham, MA, USA). Parametry pro chromatografickou separaci byly stejné jako v necílené analýze (viz kapitola 3.2.1.3 – Necílená metabolomická analýza). Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním i negativním módu ionizace v režimu MRM. Oba kvadrupóly byly nastaveny na jednotkové rozlišení. Nastavení iontového zdroje bylo následující: napětí na kapiláře +5500 V/- 4500 V, tlak sušícího, zamlžujícího plynu a „curtain gas“ byl 40 psi, teplota v iontovém zdroji byla 400 °C. Hodnoty kolizních energií a deklasteračních potenciálů byly pro jednotlivé metabolity optimalizovány dříve (při vývoji metody) na komerčně dostupných standardech. Po celou dobu analýz byl systém kontrolován programy Analyst (verze 1.6.2, Sciex, Foster City, CA, USA) a Chromeleon Xpress 6.80 (Thermo Fisher Scientific).

3.2.1.5 Zpracování dat

Data z necílené metabolomické analýzy byla zpracována v programu Compound Discoverer™ 3 verze 3.0.0.294 (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Proces zpracování dat zahrnoval integraci píků, zarovnání retenčních časů, nahrazení nulových hodnot, spojení aduktů, odstranění píků na úrovni šumu a také nástroje pro usnadnění identifikace molekul (např. odhad elementárního složení molekuly, prohledávání spekter v online dostupných databázích). Detailní nastavení parametrů pro zpracování dat je uvedeno v externí příloze v PDF formátu (část E2). Pro spojení fragmentů vznikajících ve zdroji a odstranění dalších multiplicit v datech byla provedena korelační analýza, která byla úspěšně aplikována v naší další studii týkající se diagnostiky deficitu 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu [117], [118].

Data získaná z cílené analýzy byla zpracována v programu MultiQuant 3.0 (AB SCIEX, Foster City, CA, USA).

3.2.1.6 Statistická analýza

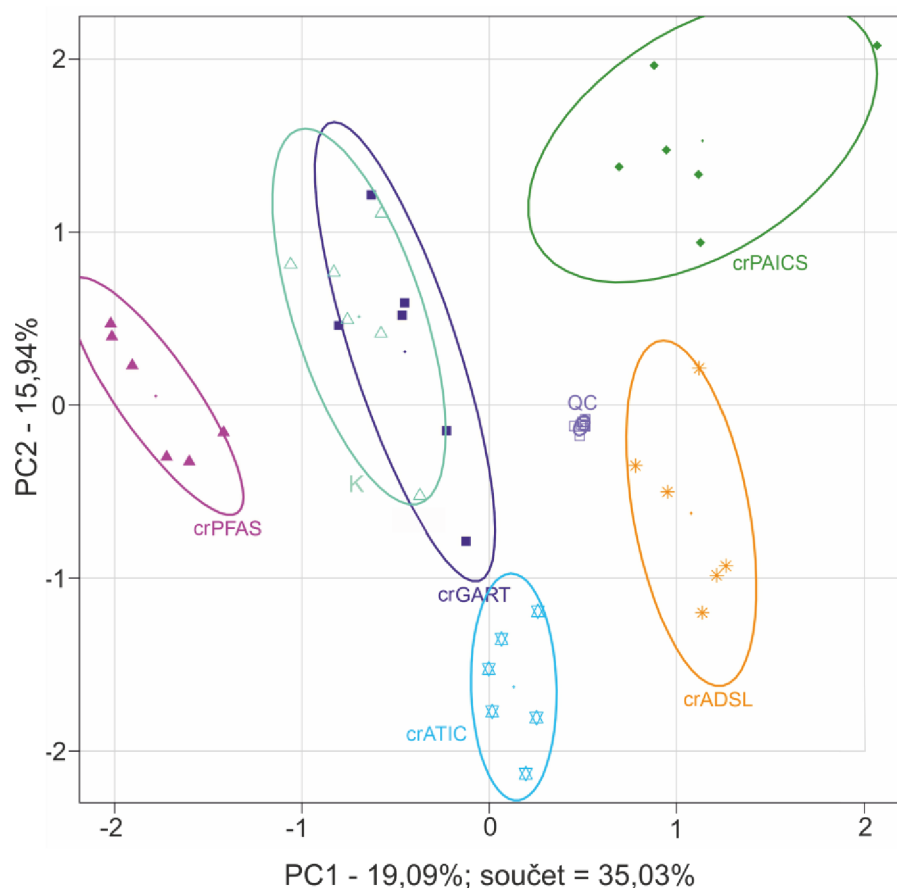
Data z cílené i necílené metabolomické analýzy byla zpracována a statisticky vyhodnocena v programu R (verze 3.5.0, www.r-project.com) s použitím balíčku Metabol (<https://github.com/AlzbetaG/Metabol>). Interpolace dat byla provedena metodou LOESS [119], [120]. Na základě vzorků kontroly kvality byly spočítány variační koeficienty (CV) a features nebo metabolity mající CV vyšší jak 30 % byly vyloučeny z následného zpracování. Na datech byla dále provedena clr transformace (Centered Log Ratio) [121] a centrování na nulu. P-hodnoty byly spočítány na základě t-testu se zahrnutím Bonferroniho korekce ($\alpha = 0,05 / \text{počet features nebo metabolitů}$). K vizualizaci dat byly použity metody jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýzy: krabicové grafy (box plots), nesupervizovaná metoda hlavních komponent (PCA - Principal Component Analysis) a supervizovaná ortogonální varianta metody nejmenších dílčích čtverců (OPLS - DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis). Pro určení nejvíce významných features/metabolitů byl použit graf významnosti proměnných (VIP – Variable Importance in Projections) metody OPLS-DA. V necílené analýze bylo vždy vybráno prvních 20 features s nejvyšším skóre OPLS-DA VIP grafu z každé buněčné linie, které byly podrobeny fragmentační analýze s cílem jejich identifikace. Metabolity z cílené analýzy, jejichž skóre OPLS-DA VIP bylo vyšší jak 1, byly dále zpracovány v programu Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) ve snaze zobrazit metabolické dráhy, které nejvíce ovlivnily rozdělení jednotlivých skupin PDNS deficitních buněk a kontrol.

3.2.2 Výsledky

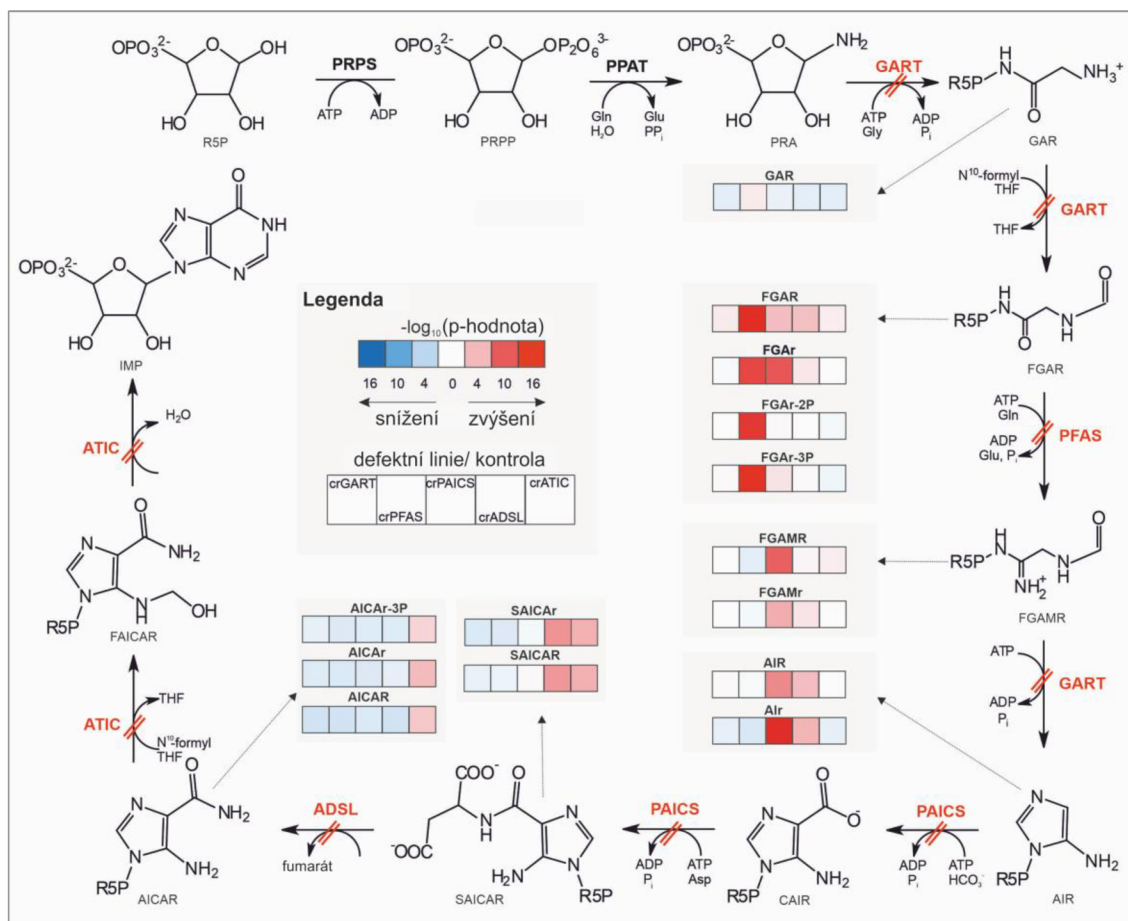
3.2.2.1.1 Necílená metabolická analýza

Pomocí programu Compound Discoverer bylo detekováno celkem 11729 features ve všech studovaných skupinách (tj. kontrolní a jednotlivé PDNS deficitní buňky), které byly definovány hmotnostním rozsahem (m/z 70-1500) a retenčním časem (1,5-17 min). Pro snížení počtu features bylo v programu aplikováno několik filtrů (externí příloha, část E2) a poté byla provedena korelační analýza (korelační koeficient 0,95, velikost retenčního okna 0,06 min) vedoucí k odstranění fragmentů a aduktů. Po statistickém zpracování dat byl výsledný počet features 739.

Nesupervizovaná metoda PCA ukazuje zřetelné oddělení crPFAS, crPAICS, crADSL a crATIC buněk od kontrol (Obr. 17). Výjimku tvořily crGART buňky, u kterých rozdíl v metabolickém profilu oproti kontrolním buňkám nebyl významný pro dělení v PCA. Součet vysvětlené variability komponent PC1 a PC2 byl 35,03 %. Klastrování vzorků QC vyjadřuje opakovatelnost analýz. PCA biploty jednotlivých deficitních linií jsou zobrazeny v Příloze 8.1. Hromadění metabolitů PDNS napříč dráhou způsobené jednotlivými enzymovými bloky je znázorněno na Obrázku 18.



Obrázek 17. PCA nečilené metabolické analýzy PDNS deficitních a kontrolních (K) HeLa buněk. Elipsy představují 75% konfidenční interval. K oddělení crGART a kontrolních buněk nedochází, jelikož crGART buňky nehromadí primární metabolit dráhy PDNS z důvodu jeho chemické nestability. Symboly: crGART buňky (tmavě modré čtverce), crPFAS buňky (fialové trojúhelníky), crPAICS buňky (tmavě zelené kosočtverce), crADSL buňky (oranžové hvězdy), crATIC buňky (světle modré hvězdy), kontrolní buňky (světle zelené trojúhelníky), QC vzorky (šedé čtverce).



Obrázek 18. Hromadění metabolitů PDNS (a jejich de-/fosforylovaných forem), způsobené enzymovými bloky v dráze (znázorněny dvojitou červenou čarou přes příslušnou metabolickou přeměnu v dráze). Červená barva čtverců označuje zvýšenou koncentraci metabolitu PDNS deficitní linie v porovnání s kontrolními buňkami dle \ln (fold change), modrá barva označuje sníženou koncentraci metabolitu deficitní linie v porovnání s kontrolou (dle \ln (fold change)). Odstíny červené/modré barvy představují $-\log_{10}$ p-hodnoty (světlejší/tmavší odstín označuje menší/větší statisticky významný rozdíl na základě t-testu).

Pro porovnání každé deficitní buněčné linie a kontrol byly vytvořeny OPLS-DA VIP skórové grafy, ze kterých bylo vybráno vždy prvních 20 nejvýznamnějších features (s nejvyšším VIP skóre), u nichž byla provedena fragmentační analýza s cílem jejich identifikace. K nejvýznamnějším metabolitům identifikovaným v jednotlivých deficitních buněčných liniích v porovnání s kontrolou patřily meziproducty PDNS, jejich defosforylované formy a ojediněle také di- a trifosfátové formy (Tab. 3-7).

Tabulka 3. Dvacet nejvýznamnějších features dle OPLS-DA VIP detekovaných při necílené analýze crGART buněk v porovnání v kontrolními buňkami. Použité zkratky: PC – fosfatidylcholin, 7-mG – 7-methylguanin, PS – fosfatidylserin, GLC-6P – glukosa-6-fosfát, PV – pořadí významnosti, t_R – retenční čas.

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

Tabulka 4. Dvacet nejvýznamnějších features dle OPLS-DA VIP detekovaných při necílené analýze crPFAS buněk v porovnání v kontrolními buňkami. Použité zkratky: PS – fosfatidylserin, ala-gln – alanylglutamin, PV – pořadí významnosti, t_R – retenční čas.

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

Tabulka 5. Dvacet nejvýznamnějších features dle OPLS-DA VIP detekovaných při necílené analýze crPAICS buněk v porovnání v kontrolními buňkami. Použité zkratky: PC – fosfatidylcholin, PS – fosfatidylserin, 5-mC – 5-methylcytidin, PV – pořadí významnosti, t_R – retenční čas.

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

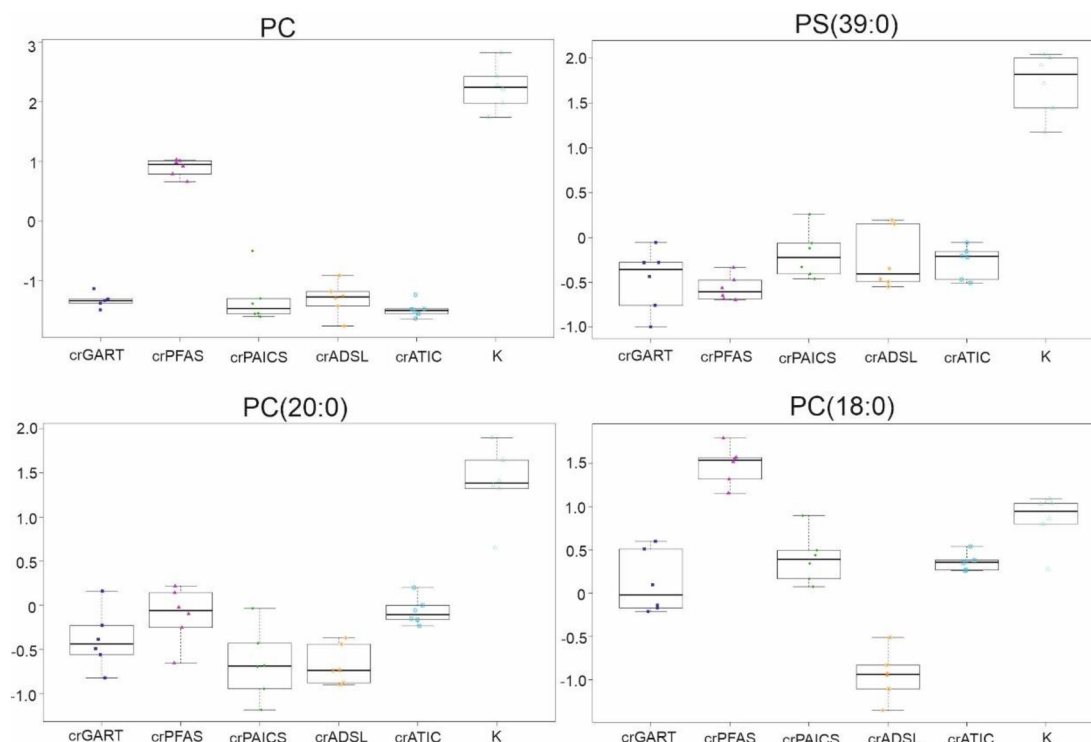
Tabulka 6. Dvacet nejvýznamnějších features dle OPLS-DA VIP detekovaných při necílené analýze crADSL buněk v porovnání v kontrolními buňkami. Použité zkratky: PC – fosfatidylcholin, 7-mG – 7-methylguanin, PV – pořadí významnosti, t_R – retenční čas.

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

Tabulka 7. Dvacet nejvýznamnějších features dle OPLS-DA VIP detekovaných při necílené analýze crATIC buněk v porovnání v kontrolními buňkami. Použité zkratky: PC – fosfatidylcholin, 7-mG – 7-methylguanin, PS – fosfatidylserin, ala - gln – alanylglutamin, NAD⁺ – nikotinamidadeninukleotid, PV – pořadí významnosti, t_R – retenční čas.

PV	t _R (min)	detekovaná m/z	teoretická m/z	metabolit	průměr VIP	SD VIP	fold change	p-hodnota
1	3,58	555,3909	-	PC	3,01	0,08	-3,75	2,80E-07
2	6,09	222,0680	222,0674	L- cystathioni n	2,96	0,07	-3,75	1,22E-07
3	6,03	379,1599	-	neznámý	2,78	0,03	3,57	2,52E-05
4	3,91	258,0966	258,0964	AICAr	2,68	0,12	3,25	1,07E-04
5	3,66	368,3295	-	neznámý	2,59	0,05	-3,00	3,10E-07
6	9,44	454,0744	454,0737	SAICAR	2,54	0,09	2,74	1,91E-05
7	7,78	338,0632	338,0628	AICAR	2,52	0,13	2,98	6,19E-04
8	4,18	396,1587	-	neznámý	2,41	0,08	2,53	2,06E-07
9	7,76	374,1079	374,1074	SAICAr	2,41	0,09	2,51	1,95E-05
10	5,56	217,1069	217,1063	ala-gln	2,39	0,06	2,78	1,48E-05
11	4,21	165,0651	165,0651	7-mG	2,36	0,07	-2,43	1,28E-05
12	3,48	142,1106	-	neznámý	2,33	0,11	-2,68	8,13E-05
13	5,00	149,0064	-	neznámý	2,31	0,09	2,77	4,04E-04
14	4,05	179,0793	-	neznámý	2,27	0,08	2,56	4,04E-04
15	3,84	539,4194	-	neznámý	2,27	0,07	2,10	3,06E-05
16	4,39	823,5377	823,5363	PS (39:0)	2,17	0,03	-2,03	2,70E-06
17	4,10	377,3046	-	neznámý	2,17	0,07	-1,95	2,56E-06
18	7,78	664,0942	664,0931	deamino- NAD ⁺	2,16	0,06	-1,88	6,77E-07
19	6,15	308,1226	-	neznámý	2,13	0,08	2,32	6,68E-04
20	10,81	497,9963	497,9954	AICAr-3P	2,10	0,16	2,03	3,21E-03

Na MSI úrovni 2 byly identifikovány tři lipidy – dva fosfatidylcholin a jeden lipid náležící do skupiny fosfatidylserinů. Dále byl identifikován jeden fosfatidylcholin na MSI úrovni 3. Většina lipidů byla u deficitních buněk nalezena ve snížené koncentraci ve srovnání s kontrolou (Obr. 19). Úspěšnost identifikace fragmentovaných features se pohybovala v rozmezí 25-50 %.

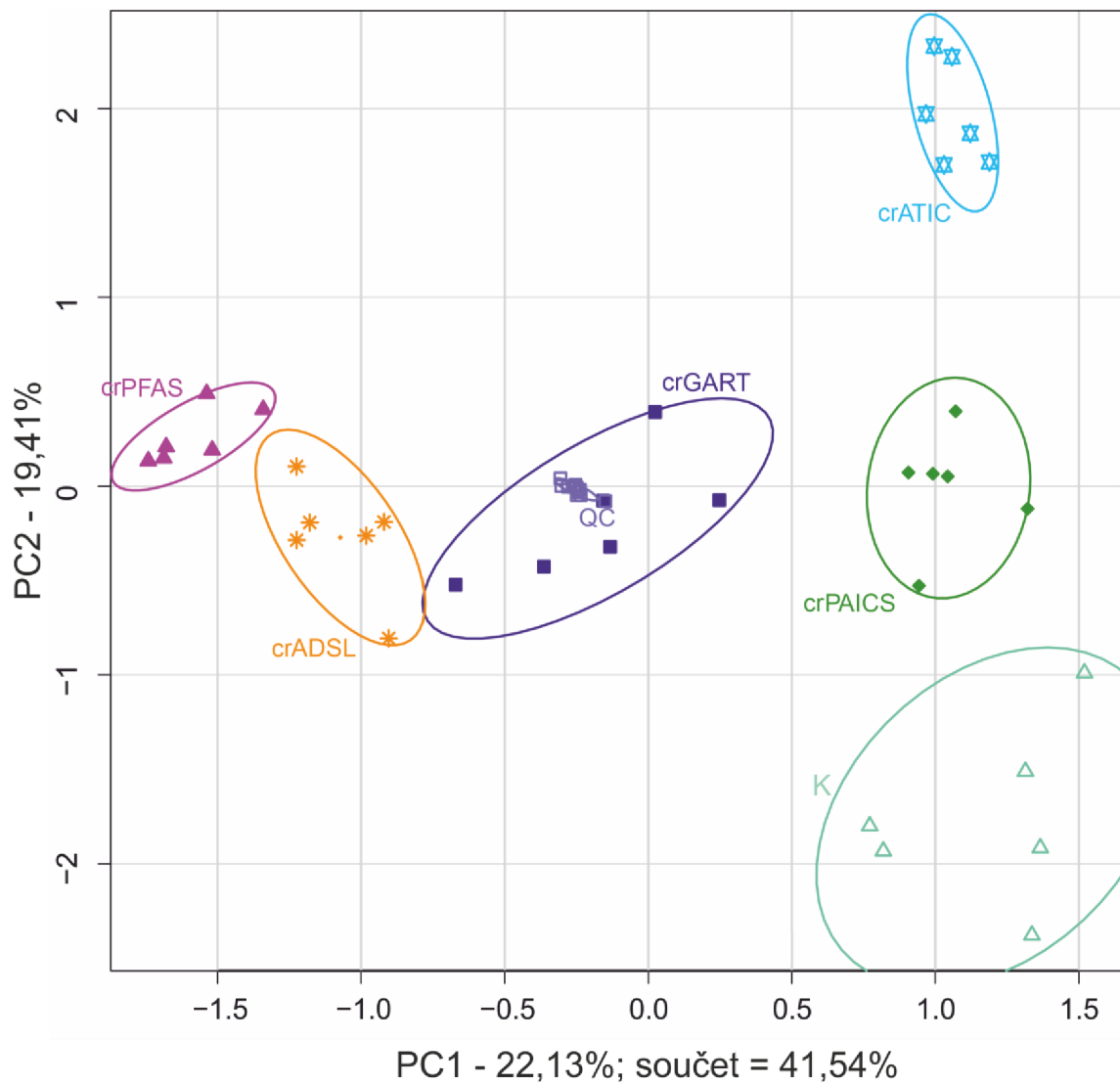


Obrázek 19. Krabicové grafy statisticky významných lipidů, identifikovaných v PDNS-deficitních buněčných liniích a kontrolních buňkách. Symboly: crGART buňky (tmavě modré čtverce), crPFAS buňky (fialové trojúhelníky), crPAICS buňky (tmavě zelené kosočtverce), crADSL buňky (oranžové hvězdy), crATIC buňky (světle modré hvězdy), kontrolní buňky (světle zelené trojúhelníky).

3.2.2.1.2 Cílená metabolická analýza

V PDNS deficitních HeLa buňkách a kontrolních buňkách bylo pomocí cílené LC-MS/MS metabolomiky nalezeno celkem 183 metabolitů. Na základě rozdílů v metabolických profilech došlo v PCA k rozdělení PDNS-deficitních

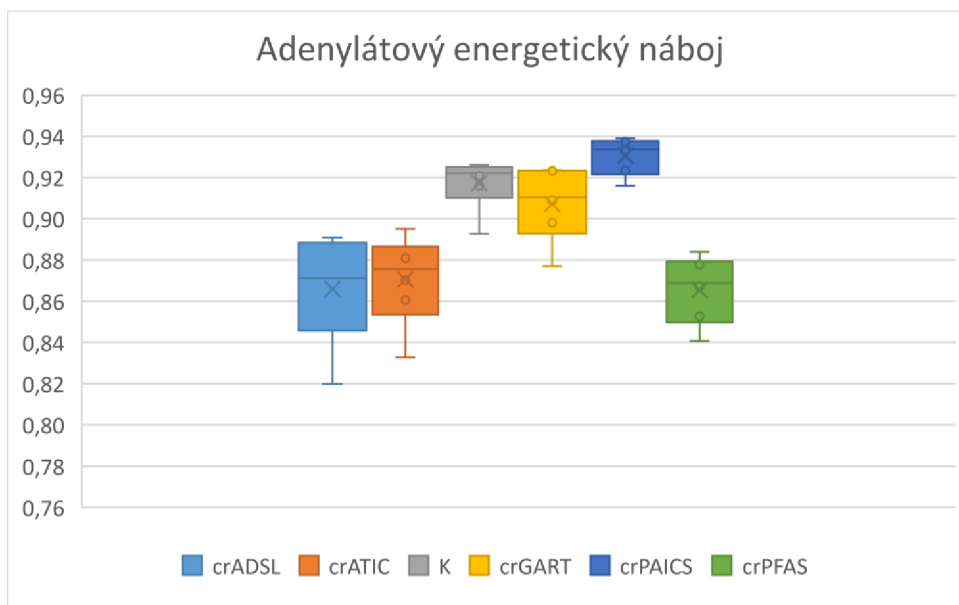
a kontrolních buněk (Obr. 20). Vysvětlená variabilita prvních dvou dimenzí PCA byla 41,54 %.



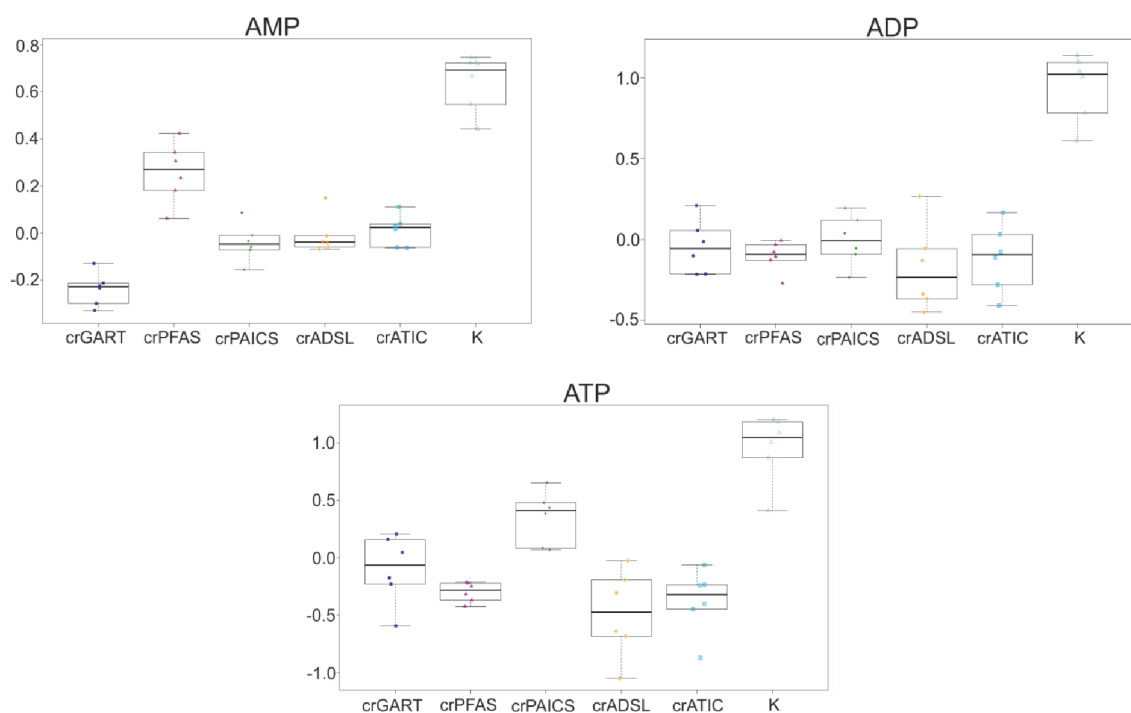
Obrázek 20. PCA cílené metabolické analýzy PDNS-deficitních a kontrolních (K) HeLa buněk. Elipsy představují 75% konfidenční interval. Symboly: crGART buňky (tmavě modré čtverce), crPFAS buňky (fialové trojúhelníky), crPAICS buňky (tmavě zelené kosočtverce), crADSL buňky (oranžové hvězdy), crATIC buňky (světle modré hvězdy), kontrolní buňky (světle zelené trojúhelníky), QC vzorky (šedé čtverce).

Pro každou dvojici deficitní linie-kontrola byl vytvořen OPLS-DA VIP skórový graf pro zobrazení statisticky nejvýznamnějších metabolitů, které odlišovaly deficitní linii buněk od kontrolních. Z každého OPLS-DA VIP skórového grafu byly vybrány metabolity s VIP skóre vyšším jak 1 (viz externí příloha ve formátu PDF, Tabulky 1-5 v části E3), které byly vloženy do programu Cytoscape pro snadnější vizualizaci, zejména pak pro zobrazení významných analytů v rámci metabolických drah, které byly nejvíce zasaženy enzymovými bloky v PDNS. Výsledek analýzy dat z programu Cytoscape je na Obrázku 1 v externí příloze ve formátu PDF (část E4). Barevný přechod od modré po červenou je dán rozdílem mediánů v clr koeficientech mezi PDNS deficitními buňkami a kontrolní skupinou. Velikost kruhů představuje statistickou významnost na základě $-\log_{10}$ p-hodnoty.

Adenylátový energetický náboj (AEC – Adenylate Energy Charge) buněk byl vypočítán dle rovnice: $[ATP] + \frac{1}{2} [ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$ [122]. Hladina energetických rezerv byla nalezena nižší u PFAS, ADSL a ATIC-deficitních linií v porovnání s PAICS-deficitními buňkami a kontrolou (Obr. 21). Rozdíly v hladinách nukleotidů AMP, ADP a ATP u PDNS-deficitních buněk v porovnání s kontrolními buňkami ukazují krabicové grafy na Obrázku 22.



Obrázek 21. Energetický náboj PDNS-deficitních buněčných linií v porovnání s kontrolními buňkami. Experimentální variabilita byla testována pomocí Wilcoxonova dvouvýběrového testu s oboustrannou alternativou, zatímco biologický vliv defektů PDNS byl ověřen pomocí jednostranného Wilcoxonova dvouvýběrového testu, kde alternativní hypotéza předpokládala nižší AEC u deficitních buněčných linií (než u kontrol). Pro testování byl použitý neparametrický přístup, jelikož normalita vzorků kontrolních buněk byla zamítnuta. Energetický náboj crADSL, crATIC a crPFAS buněk byl významně snížený v porovnání s kontrolními buňkami ($p < 0,01$; vzhledem k mnohonásobnému testování hypotéz byla na hladinu významnosti použita Bonferroniho korekce).



Obrázek 22. Boxploty adenosinových nukleotidů PDNS-deficitních buněčných linií a kontrolních buněk. Zkratky: adenosinmonofosfát (AMP), adenosindifosfát (ADP), a adenosin trifosfát (ATP). Symboly: crGART buňky (tmavě modré čtverce), crPFAS buňky (fialové trojúhelníky), crPAICS buňky (tmavě zelené kosočtverce), crADSL buňky (oranžové hvězdy), crATIC buňky (světle modré hvězdy), kontrolní buňky (světle zelené trojúhelníky).

3.2.3 Diskuze

V této studii byl pomocí kombinace necílené a cílené metabolické analýzy získán obecný přehled změn metabolického profilu HeLa buněk deficitních pro jednotlivé enzymy PDNS. Genom buněk byl upraven metodou CRISPR-Cas9 a její úspěšnost byla ověřena analýzou mutací, detekcí proteinů a analýzou enzymových aktivit [31]. Cílem studie bylo sledování změn metabolomu PDNS-deficitních buněk při kultivaci bez přítomnosti purinů v médiu. Důsledky hromadění patologických substrátů neovlivňují pouze biologickou (enzymovou) rovnováhu, ale mohou být zahrnuty další faktory např.

signalizační kaskády, které budou zodpovědné za výslednou buněčnou odpověď. Statická povaha experimentu představuje limitaci studie, neboť výsledky poukazují na nutnost použití kinetických analýz (fluxu), které by dokázaly lépe vysvětlit sledované změny a principy jejich regulace. Navzdory některým omezením představují buněčné linie použité v této studii nejbližší dostupný lidský model metabolických poruch PDNS, které mohou pomoci při zkoumání podstaty těchto enzymových deficitů. Změny v metabolomu těchto buněk mohou být užitečné také při studiu terapeutických cílů rakoviny.

3.2.3.1 Necílená metabolomika

Účelem necílené metabolomické analýzy buněčných linií crGART, crPFAS, crPAICS, crADSL a crATIC bylo sledování metabolomické odpovědi mimo rozsah cílené analýzy. Pomocí fragmentační analýzy (založené na přesné hmotě, fragmentaci a chromatografickém chování dle strukturní predikce) bylo potvrzeno hromadění meziproductů PDNS, jejich defosforylovaných forem a dále analýza sloužila ke zjištění dalších statisticky významných metabolitů (na základě OPLS-DA VIP skóre), které nebyly součástí cílené analýzy. Pomocí vícerozměrné statistické analýzy bylo zjištěno, že největší vliv na dělení PDNS-deficitních buněčných linií od kontrolních buněk měly meziproducty PDNS. Z toho důvodu byla později provedena cílená metabolomická analýza bez zahrnutí těchto látek za účelem studia významných změn v základních metabolických drahách (Kapitola 3.2.3.2).

Metoda nesupervizované PCA ukazuje oddělení crPFAS, crPAICS, crADSL a crATIC buněk od kontrol, zatímco crGART buňky se shlukují s kontrolami (Obrázek 17). S výjimkou crGART buněk bylo u všech ostatních buněčných linií zaznamenáno hromadění substrátu blokové enzymové reakce PDNS (Obrázek 18). U crGART buněk nedocházelo ke hromadění PRA z důvodu jeho nestability *in vivo* (poločas rozpadu 5 s) [100], jak již bylo ukázáno v první studii této disertační práce. V rámci dráhy PDNS nebyly u crGART buněk detekovány jiné metabolity, jelikož tato deficitní linie nese mutaci trifunkčního enzymu GART, který není exprimován.

Vysoké procento vysvětlené variability PCA biplotů jednotlivých dvojic (deficitní linie vs. kontrolní buňky, Příloha 8.1) naznačuje, že meziprodukty PDNS měly největší vliv na rozdělení všech buněčných linií v 2D PCA zahrnující všechny skupiny (Obr. 17). Posun rovnováhy enzymových reakcí v rámci PDNS byl nejspíš důvodem ke hromadění PDNS metabolitů nacházejících se více kroků před defektním enzymem (Obrázek 18). Toto chování bylo zmíněno v první studii této disertační práce [94] i v dalších studiích [51], [55], [71]. U crATIC buněk bylo zaznamenáno hromadění mono-, di- a trifosfátové formy AICAr, což je v souladu s výsledky analýzy erytrocytů pacientky trpící AICA-ribosidurií [70]. AICAr-3P vzniká přímo z AICAR aktivitou fosforibosylpyrofosfátsynthetasy (PRPS, EC 2.7.6.1) [123], narozdíl od adeninových nukleotidů, jejichž syntézu katalyzují nukleosidmonofosfátkinasy a nukleosiddifosfátkinasy. Hlavní cesta syntézy adeninových nukleotidů neprobíhá katalýzou PRPS, což může být důvodem k pozorování odlišných poměrů mezi těmito dvěma typy nukleotidů (poměr AICAR/AICAr-2P/AICAR vs. AMP/ADP/ATP) [123]. Existuje předpoklad, že AICAr-2P není meziproduktem syntézy AICAR-3P, ale je nejspíš produktem intracelulárního rozpadu AICAR-3P, nebo vzniká během extrakce metabolitů [124]. Dále byly detekovány FGAr-2P a FGAR-3P v crPFAS buňkách a AICr-3P v crPAICS buňkách. V obou případech je předpokládán obdobný původ vzniku jako v případě fosfátových analogů AICAr. V živých buňkách nebyla s výjimkou AICAr doposud zaznamenána žádná di-, nebo trifosfátová forma meziproduktů PDNS.

Metabolity PDNS (zahrnující přímé meziprodukty, defosforylované formy a dále di- a trifosfátové formy) vykazovaly největší statistickou významnost (p-hodnoty v rozmezí $1E-7$ – $1E-15$), zatímco p-hodnota metabolitů z jiných metabolických drah dosahovala maximálně $1E-7$.

3.2.3.2 Cílená metabolomika

Pomocí LC-MS/MS cílené analýzy bylo detekováno celkem 183 metabolitů, které byly statisticky zpracovány. Pro posouzení metabolických změn mimo dráhu dráhu PDNS nebyly její meziprodukty (a příslušné ribosidové

formy) zahrnuty do analýzy. Vizualizace významných změn metabolismu PDNS-deficitních buněčných linií v porovnání s kontrolními buňkami byla provedena v programu Cytoscape. Statisticky nejvýznamnější změny (založené na VIP skóre) byly zaznamenány v metabolismu nukleotidů, sacharidů, acylkarnitinů a také v jednovláčkovém metabolismu (Obrázek 1 v externí příloze ve formátu PDF, část E4). Výsledky jsou diskutovány v jednotlivých kapitolách níže.

Centrální energetický metabolismus nukleotidů

Biosyntéza purinů *de novo* je energeticky náročný proces, proto buňky v přítomnosti dostatečného množství externích purinů preferují spíše jejich recyklaci [27]. V této studii byly buňky vzhledem k experimentálním podmínkám (kultivace v bezpurinovém médiu 24 h před sklizením) nuceny využívat PDNS a tím pádem projevit metabolické důsledky enzymových bloků v této dráze. Pro všechny deficitní buněčné linie bylo společné snížení hladin adeninových a guaninových nukleotidů vzhledem k enzymovým defektům a také kultivačním podmínkám. Dřívější studie pacientů s deficitem ADSL ukázala, že pro udržení fluxu PDNS je dostatečná zbytková aktivita ADSL v rozmezí 3-40 % [54], [125]. PDNS-deficitní buněčné linie v naší studii byly vytvořeny metodou CRISPR-Cas9, kdy byly vytvořeny inserce a delece nejméně jednoho nukleotidu v cílovém genu, vedoucí k posunu čtecího rámce a nedetekovatelné expresi proteinu. Zbytková enzymová aktivita byla nalezena pouze v případě crADSL buněk (2,6 % pro SAICAR) [31].

Adenylátový energetický náboj (Adenylate Energy Charge - AEC) je ukazatelem energetického stavu buňky a je počítán dle rovnice $(ATP + \frac{1}{2} ADP)/(ATP + ADP + AMP)$ [122]. AEC buňky kolísá v úzkém intervalu a pokud dojde například k jeho zvýšení, převládou metabolické procesy vedoucí ke snížení zásob ATP a dalších důležitých meziproduktů biosyntézy, zejména díky inhibici fosfofruktokinasy a pyruvátkinasy. Metabolické procesy, které spotřebovávají ATP, jsou naopak aktivovány vzhledem ke zvýšeným aktivitám citrátlyasy (lipogeneze) a PRPPS (syntéza nukleotidů) [122], [126]. Energetický stav PDNS-deficitních buněčných linií v porovnání s kontrolou v této studii byl

zachován ve fyziologickém rozmezí navzdory značnému kolísání v hladinách adeninových nukleotidů (Obrázky 22 a 23). Jiné studie ukazují, že adenylátový pool může klesnout až o 30 % své normální hodnoty, než dojde k měřitelné změně AEC [127], [128]. Jelikož AEC PDNS deficitních buněk zůstal během experimentu ve fyziologickém rozmezí (Obrázek 22) a hladiny AMP, ADP a ATP byly sniženy u všech deficitních buněk v porovnání s kontrolou (Obrázek 23), mohlo docházet ke snížené dostupnosti ATP pro metabolické přeměny vyžadující tento metabolit ve formě substrátu či kofaktoru. Důvodem tohoto chování mohou být podmínky kultivace buněk, které kombinovaly deficit v PDNS s auxotrofními kultivačními podmínkami. Jako příklad důsledku tohoto jevu lze zmínit snížené hladiny pyrimidinových nukleotidů (např. cytidin di/trifosfát) u deficitních buněk ve srovnání s kontrolními buňkami, které mohly být způsobeny nízkou hladinou ATP. Protože podobně jako PDNS, i biosyntéza pyrimidinů spotřebovává velké množství ATP. U deficitních buněk byly dále pozorovány snížené hladiny ribosa-5-fosfátu (prekurzor PRPP) a glukosa-6-fosfátu, které mohou být dalším důvodem snížené biosyntézy pyrimidinů.

Metabolismus sacharidů

U všech deficitních buněčných linií byly naměřeny snížené hladiny fosforylovaných hexos a zvýšená hladina glukosy. Tento intracelulární nepoměr může být způsoben sníženou hladinou ATP v deficitních buňkách a také přímou spotřebou v související hexokinasové reakci (EC 2.7.1.1). U pacientů s deficitem ADSL nebyla hyperglykemie nikdy zaznamenána [51], u pacientů s AICArifosidurií byly hlášeny pouze stavy přechodné hypoglykemie, které souvisely se zvýšenou aktivitou dráhy syntézy insulinu v jaterních buňkách [71], [129]. V deficitních buňkách byly dále pozorovány zvýšené hladiny glykolytických meziproductů 3-fosfoglycerátu a fosfoenolpyruvátu. V řadě studií rakovinných buněk bylo zjištěno, že flux glykolýzy může být odkloněn přes 3-fosfoglycerátu ve směru biosyntézy serinu, která je pro mnoho typů rakovinných buněk stěžejní pro jejich proliferaci [42], [130], [131]. Prvním a zároveň rychlost určujícím enzymem biosyntézy serinu (SSP – Serine Synthesis Pathway) je

fosfoglycerátdehydrogenasa (EC 1.1.11.95), která je inhibována zvýšenou hladinou serinu. Jednouhlíkové jednotky (1C) vznikající ze serinu nemohly být využity v PDNS, proto nejspíš docházelo ke hromadění této aminokyseliny (více je popsáno níže v kapitole Jednouhlíkový metabolismus). Ve všech deficitních buňkách byla detekována snížená hladina laktátu v porovnání s kontrolními buňkami. Studie účinků AICAR na metabolismus HUVEC buněk pomocí nukleární magnetické rezonance ukázala trojnásobné snížení hladiny laktátu, jelikož u těchto buněk docházelo k upřednostnění oxidace mastných kyselin před glykolysou (podrobněji vysvětleno v následující kapitole Metabolismus acylkarnitinů) [80]. Toto pozorování je souladu s našimi daty naměřenými u crATIC buněk, nicméně u pacientů s AICA-ribosidurií nebyly změny v laktátu dosud zaznamenány [70], [71].

Metabolismus acylkarnitinů

Acylkarnitiny tvoří velkou skupinu esterů L-karnitinu s mastnými kyselinami, které se účastní mnoha metabolických procesů, například oxidace mastných kyselin, metabolismu větvených aminokyselin, vzniku ketonových látek a dalších [132]. Profil acylkarnitinů rozdělených dle délky postranního řetězce (krátké, středně dlouhé a dlouhé) vykazoval nejvyšší variabilitu u jednotlivých PDNS-deficitních linií v porovnání s kontrolními buňkami (v rámci všech měřených metabolitů, Obrázek 1 v externí příloze ve formátu PDF, část E4). Některé změny v metabolismu vedoucí ke změnám hladin acylkarnitinů mohly být tedy vyvolány zejména hromadícími se meziprodukty PDNS, než vlivem obecných změn souvisejících s PDNS.

S výjimkou crADSL buněk byly u ostatních PDNS deficitních buněk pozorovány zvýšené hladiny acylkarnitinů s krátkým řetězcem, zatímco hladina acylkarnitinů se středně dlouhým řetězcem byla ovlivněna jen minimálně. V crADSL buňkách byla detekována snížená hladina acylkarnitinů s krátkým řetězcem se sudým počtem uhlíků (C2 a C4), ostatní acylkarnitiny z této skupiny byly zvýšené jako u ostatních PDNS-deficitních linií. Dále byla u crADSL buněk nalezena snížená hladina ostatních meziproduktů mitochondriální b-oxidace (C6,

C8, C10 a C12) v porovnání s kontrolními buňkami. Thai *et al.* popsal zvýšené koncentrace některých metabolitů (glutamát, alanin, C3 a C5) v souvislosti se zvýšeným katabolismem větvených aminokyselin u obézních osob s insulinovou rezistencí [133]. V crADSL buňkách nebyly zaznamenány zvýšené hladiny větvených aminokyselin, ale hladina glutamátu a alaninu byla zvýšená. V případě crATIC buněk může být za zvýšené hladiny acylkarnitinů s krátkým řetězcem zodpovědný hromadící se AICAR, který aktivuje β -oxidaci mastných kyselin. AICAR je totiž dobře známým aktivátorem AMPK [134]. Díky podobnosti s AMP je schopen inhibice acetyl-CoA-karboxylasy vedoucí ke snížení hladiny malonyl-CoA. Jelikož je tento metabolit inhibitorem karnitinpalmitoyltransferasy 1 (CPT1), dochází k vyšší míře oxidace mastných kyselin. Zvýšená míra oxidace mastných kyselin aktivací AMPK vlivem účinku AICAR byla ukázána ve studii s HUVEC buňkami [80].

U crGART, crPFAS a crADSL buněk bylo detekováno značné zvýšení hladin acylkarnitinů s dlouhým řetězcem se sudým počtem uhlíků (nasyčené i nenasycené), které ukazuje na neúplnou oxidaci mastných kyselin, jak bylo popsáno ve studii zabývající se insulinovou rezistencí myších myocytů [135]. V této studii autoři popisují, že velký podíl mastných kyselin vstupujících do mitochondrií je odbouráván pouze částečně, což vede ke zvýšeným hladinám acylkarnitinů s dlouhým řetězcem se sudým počtem uhlíků (C6-C22). Metabolické profilování pacientů s deficitem ADSL ovšem neodhalilo žádné diagnosticky významné acylkarnitiny v plasmě [136].

Jednouhlíkový metabolismus

Ve všech PDNS-deficitních buňkách byla pozorována zvýšená hladina serinu a meziproductů jeho biosyntézy (glycerát-3-fosfát, fosfoserin) v porovnání s kontrolními buňkami. Nižší hladina glycinu, který je produktem transmethylace serinu (reakce katalyzovaná serinhydroxymethyltransferasou; EC 2.1.2.1), byla naměřena v crGART, crPFAS a crADSL buňkách. V roce 2019 popsal Subedi a kol. vyšší bazální hladiny enzymů SSP v HeLa buňkách [137]. Při studiu NCI60 buněčného panelu bylo zjištěno, že přeměna serinu na glycin zvyšuje míru růstu

buněk a významně přispívá do PDNS [131], což jsou oba metabolické procesy významně ovlivněné v naší studii vzhledem k použitým experimentálním podmínkám a buněčnému modelu. Na základě analýz s izotopovým značením existuje předpoklad, že právě serin přispívá nejvíce do jednováhlíkového metabolismu [138]. Změny pozorované v koncentraci serinu a glycinu mohou být způsobeny sníženou spotřebou jednováhlíkových jednotek pocházejících z těchto aminokyselin v PDNS vlivem enzymových deficitů.

Změny v cyklu methioninu (součást jednováhlíkového metabolismu) byly charakterizovány sníženými hladinami S-adenosylhomocysteinu (SArhCYS) a S-adenosylmethioninu (SAM) a naopak zvýšenou hladinou methioninu ve všech PDNS deficitních buňkách v porovnání s kontrolou. Změny mohou být způsobeny nižší hladinou ATP v PDNS deficitních buňkách (diskutováno v kapitole Nukleotidový metabolismus), kdy pravděpodobně dochází k inhibici S-adenosylmethioninsynthasy (EC 2.5.1.6), vyžadující ATP pro svou reakci. Jelikož je SAM významným donorem methylové skupiny při methylaci lysinu, argininu, histonů, DNA a RNA, může docházet k významnému ovlivnění těchto methylačních procesů v PDNS deficitních buňkách.

Ve všech deficitních buňkách (nejvíce crATIC) bylo pozorováno významné snížení hladiny cystathioninu, které může být způsobeno nízkou hladinou SAM a SArhCYS. Tyto dva metabolity jsou totiž allosterické aktivátory cystathionin-beta-synthasy (EC 4.2.1.22), která katalyzuje syntézu cystathioninu ze serinu a homocysteinu.

V případě crATIC buněk může být jednováhlíkový metabolismus ovlivněn také hromaděním AICAR či AICAr-3P, které jsou schopné regulovat expresi genů jednováhlíkového metabolismu mechanismem riboswitchové aktivace u celé řady bakterií [139]. Existuje hypotéza, že AICAR může být hlavním regulátorem jednováhlíkového metabolismu u eukaryot vzhledem ke konzervaci této dráhy u všech domén života [140].

4 ZÁVĚR

V této disertační práci jsou popsána fragmentační spektra metabolitů PDNS, metoda pro jejich analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, a také aplikace této metody na vzorky HeLa buněčných linií deficitních pro jednotlivé enzymy PDNS. Na základě získaných výsledků byly stanoveny tyto závěry:

4.1 Analýza meziproductů purinové *de novo* syntézy pomocí hmotnostní spektrometrie

Tato práce jako první poskytuje souhrnnou fragmentační analýzu syntetizovaných meziproductů PDNS a jejich defosforylovaných forem pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Fragmentace jednotlivých metabolitů byla provedena do třetí až šesté úrovně. Ukázalo se, že nejvíce fragmentů vzniká v úrovních MS³ a MS⁴. Dále byly identifikovány společné charakteristiky fragmentace pro skupinu ribotidů a ribosidů PDNS. Získaná spektra ribotidů PDNS byla porovnána s jejich *in silico* spektry v online dostupné databázi Metlin a vzhledem k nízké shodě byly popsány limitace *in silico* fragmentace komerčně nedostupných látek, tedy většiny těch z naší studie. Získaná data sloužila k vývoji metody pro detekci těchto metabolitů v HeLa buňkách deficitních pro jednotlivé enzymy PDNS, které představují první lidský model pro známé i potenciální dědičné metabolické poruchy biosyntézy purinů. Metodu lze aplikovat v různých odvětvích výzkumu PDNS jako je studium purinosomu, buněčného cyklu a enzymové kinetiky. Metoda může být také uplatněna při vývoji diagnostických metod známých/potenciálních metabolických poruch PDNS a pro pochopení jejich patobiochemie.

4.2 Kombinovaná cílená a necílená metabolická analýza HeLa buněk deficitních v purinové *de novo* syntéze

Nalezené metabolické změny byly velmi podobné u všech linií HeLa buněk deficitních v enzimech PDNS v porovnání s kontrolními buňkami. Statisticky nejvýznamnější metabolity odlišující PDNS-deficitní linie od kontrol byly meziprodukty PDNS předcházející danému enzymovému bloku. Narušení PDNS mělo za následek snížení hladin adeninových a guaninových nukleotidů, přesto adenylátový energetický náboj buňky zůstal ve fyziologickém rozmezí. Ve všech PDNS-deficitních buňkách byly nalezeny změny v jednouhlíkovém metabolismu, které mohou vést k nižší methylační aktivitě buněk a významně tak ovlivňovat buněčné procesy modifikace RNA, DNA a proteinů. Největší rozdíly mezi jednotlivými PDNS-deficitními buněčnými liniemi byly pozorovány v hladinách acylkarnitinů. Tyto metabolické změny mohly být způsobeny hromadícími se meziprodukty PDNS.

Změny nalezené v metabolismu PDNS-deficitních buněk představují vhodný model obdobných změn, které mohou nastat u pacientů s deficity PDNS. I když je samozřejmě velmi obtížné přenést změny pozorované *in vitro* na pacienty, tato studie může být přínosná při odhalování patologie těchto ne příliš prozkoumaných enzymových deficitů.

5 VÝHLEDY

V posledních letech stoupá zájem o výzkum purinové *de novo* syntézy, zejména mechanismy vzniku a regulace purinosomů a jejich vliv na ostatní buněčné procesy. V oblasti dědičných metabolických poruch PDNS dochází k přelomu v jejich studiu díky vytvoření prvního (a zároveň doposud jediného) lidského buněčného modelu těchto chorob metodou editace genomu CRISPR-Cas9 (buněčné linie použité v této disertační práci). PDNS-deficitní HeLa buněčné linie jsou nyní intenzivně studovány. Již byly publikovány analýzy transkriptomu crGART, crADSL a crATIC HeLa buněk, které popisují vliv daného deficitu PDNS na genovou expresi. Společně s metabolomickou analýzou získáme komplexní pohled na buněčné procesy ovlivněné a regulované nefungující PDNS a to nejen v oblasti DMP, ale například některých typů rakoviny či Downova syndromu. Výsledky výše uvedených analýz ovšem mohou představovat pouze fenotyp specifický pro použité HeLa linie. V budoucnu je tedy třeba vyvíjet nové buněčné modely pro ověření obecných závěrů a také provádět fluxomické metabolomické analýzy, abychom získali pohled na dynamiku PDNS v reálném čase.

6 LITERATURA

- [1] S. G. Oliver, M. K. Winson, D. B. Kell, and F. Baganz, “Systematic functional analysis of the yeast genome.,” *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 9, pp. 373–378, 1998, doi: 10.1016/S0167-7799(98)01214-1.
- [2] D. S. Wishart *et al.*, “HMDB: the Human Metabolome Database.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Database issue, pp. D521-6, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl923.
- [3] R. Goodacre, “Metabolomics of a superorganism.,” *J. Nutr.*, vol. 137, no. 1 Suppl, pp. 259S-266S, 2007, doi: 137/1/259S [pii].
- [4] A. E. Steuer, L. Brockbals, and T. Kraemer, “Metabolomic strategies in biomarker research-new approach for indirect identification of drug consumption and sample manipulation in clinical and forensic toxicology?,” *Front. Chem.*, vol. 7, no. MAY, 2019, doi: 10.3389/fchem.2019.00319.
- [5] W. B. Dunn, D. I. Broadhurst, H. J. Atherton, R. Goodacre, and J. L. Griffin, “Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 387–426, 2011, doi: 10.1039/B906712B.
- [6] J. M. Buescher, S. Moco, U. Sauer, and N. Zamboni, “Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 11, pp. 4403–4412, 2010, doi: 10.1021/ac100101d.
- [7] W. B. Dunn *et al.*, “Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics,” *Metabolomics*, vol. 9, no. SUPPL.1, pp. 44–66, 2013, doi: 10.1007/s11306-012-0434-4.
- [8] J. M. Büscher, D. Czernik, J. C. Ewald, U. Sauer, and N. Zamboni, “Cross-Platform comparison of methods for quantitative metabolomics of primary metabolism,” *Anal Chem*, vol. 81, no. 6, pp. 2135–43, 2009, doi: 10.1021/ac8022857.
- [9] O. Yanes, R. Tautenhahn, G. J. Patti, and G. Siuzdak, “Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling.,” *Anal. Chem.*, vol. 83,

- no. 6, pp. 2152–61, 2011, doi: 10.1021/ac102981k.
- [10] B. Zhou, J. F. Xiao, L. Tuli, and H. W. Resson, “LC-MS-based metabolomics,” *Mol. BioSyst.*, vol. 8, no. 2, pp. 470–481, 2012, doi: 10.1039/C1MB05350G.
- [11] K. Contrepois, L. Jiang, and M. Snyder, “Optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (HILIC) and reverse-phase liquid chromatography (RPLC)-mass spectrometry,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 14, no. 6, pp. 1684–1695, 2015, doi: 10.1074/mcp.M114.046508.
- [12] M. M. Koek, R. H. Jellema, J. van der Greef, A. C. Tas, and T. Hankemeier, “Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives,” *Metabolomics*, vol. 7, no. 3, pp. 307–328, 2011, doi: 10.1007/s11306-010-0254-3.
- [13] J. Musilová and Z. Glatz, “Metabolomika - Základní pojmy, strategie a metodologie,” *Chem. List.*, vol. 105, no. 10, pp. 745–751, 2011.
- [14] G. SIUZDAK, “An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005,” *J. Assoc. Lab. Autom.*, vol. 9, no. 2, pp. 50–63, 2004, doi: 10.1016/j.jala.2004.01.004.
- [15] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. A. I. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, “Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules,” *Science (80-.)*, vol. 246, pp. 64–71, 1989.
- [16] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, and M. Orešič, “MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data,” *BMC Bioinformatics*, vol. 11, 2010, doi: 10.1186/1471-2105-11-395.
- [17] C. Kuhl, R. Tautenhahn, C. Böttcher, T. R. Larson, and S. Neumann, “CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 283–289, 2012, doi: 10.1021/ac202450g.
- [18] T. R. Sana, J. C. Roark, X. Li, K. Waddell, and S. M. Fischer, “Molecular

- formula and METLIN personal metabolite database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 19, no. 4, pp. 258–266, 2008.
- [19] L. Najdekr, D. Friedecky, R. Tautenhahn, J. Wang, and T. Adam, “Influence of Mass Resolving Power in Orbital Ion-Trap Mass Spectrometry-Based Metabolomics,” 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02319.
- [20] J. Draper *et al.*, “Metabolite signal identification in accurate mass metabolomics data with MZedDB, an interactive m/z annotation tool utilising predicted ionisation behaviour ‘rules,’” *BMC Bioinformatics*, vol. 10, no. 1, p. 227, 2009, doi: 10.1186/1471-2105-10-227.
- [21] T. Kind and O. Fiehn, “Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 105, 2007, doi: 10.1186/1471-2105-8-105.
- [22] M. Rojas-Cherto *et al.*, “Metabolite identification using automated comparison of high resolution MS(n) spectral trees.,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 13, pp. 5524–5534, 2012, doi: 10.1021/ac2034216.
- [23] L. W. Sumner *et al.*, “Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI),” *Metabolomics*, vol. 3, no. 3, pp. 211–221, 2007, doi: 10.1007/s11306-007-0082-2.
- [24] P. T. Kasper, M. Rojas-Chertó, R. Mistrik, T. Reijmers, T. Hankemeier, and R. J. Vreeken, “Fragmentation trees for the structural characterisation of metabolites,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 26, no. 19, pp. 2275–2286, 2012, doi: 10.1002/rcm.6340.
- [25] L. Ridder, J. J. J. van der Hooft, S. Verhoeven, R. C. H. de Vos, R. van Schaik, and J. Vervoort, “Substructure-based annotation of high-resolution multistage MSⁿ spectral trees,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 26, no. 20, pp. 2461–2471, 2012, doi: 10.1002/rcm.6364.
- [26] M. T. Sheldon, R. Mistrik, and T. R. Croley, “Determination of ion structures in structurally related compounds using precursor ion fingerprinting,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 3, pp. 370–376,

- 2009, doi: 10.1016/j.jasms.2008.10.017.
- [27] T. W. Stone and H. A. Simmonds, *Purines: Basic and Clinical Aspects*. Kluwer Academic Publishers, 1991.
- [28] A. M. Pedley and S. J. Benkovic, “A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 141–154, 2017, doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.009.
- [29] S. An, R. Kumar, E. D. Sheets, and S. J. Benkovic, “Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells,” *Science*, vol. 320, no. 5872, pp. 103–106, 2008, doi: 10.1126/science.1152241.
- [30] H. Zhao *et al.*, “Quantitative Analysis of Purine Nucleotides Indicates That Purinosomes Increase *de Novo* Purine Biosynthesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 11, pp. 6705–6713, 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.628701.
- [31] V. Baresova, M. Krijt, V. Skopova, O. Souckova, S. Kmoch, and M. Zikanova, “CRISPR-Cas9 induced mutations along de novo purine synthesis in HeLa cells result in accumulation of individual enzyme substrates and affect purinosome formation,” *Mol. Genet. Metab.*, pp. 4–11, 2016, doi: 10.1016/j.ymgme.2016.08.004.
- [32] V. Baresova *et al.*, “Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 7, pp. 1534–43, 2012, doi: 10.1093/hmg/ddr591.
- [33] S. An, Y. Deng, J. W. Tomsho, M. Kyoung, and S. J. Benkovic, “Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 29, pp. 12872–12876, 2010, doi: 10.1073/pnas.1008451107.
- [34] J. B. French *et al.*, “Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria,” *Science (80-.)*, vol. 351, no. 6274, pp. 733–737, 2016, doi: 10.1126/science.aac6054.
- [35] J. Yin, W. Ren, X. Huang, J. Deng, T. Li, and Y. Yin, “Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy,” *Front. Immunol.*, vol.

- 9, no. July, p. 1697, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01697.
- [36] T. Yamaoka *et al.*, “Feedback Inhibition of Amidophosphoribosyltransferase Regulates the Rate of Cell Growth via Purine Nucleotide, DNA, and Protein Syntheses,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 24, pp. 21285–21291, 2001, doi: 10.1074/jbc.M011103200.
- [37] J. M. Vergis, K. G. Bullock, K. G. Fleming, and G. P. Beardsley, “Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 11, pp. 7727–7733, 2001, doi: 10.1074/jbc.M009940200.
- [38] J. B. French *et al.*, “Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 7, pp. 2528–33, 2013, doi: 10.1073/pnas.1300173110.
- [39] M. G. Gassmann, A. Stanzel, and S. Werner, “Growth factor - Regulated expression of enzymes involved in nucleotide biosynthesis: A novel mechanism of growth factor action,” *Oncogene*, vol. 18, no. 48, pp. 6667–6676, 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1203120.
- [40] A. Saha *et al.*, “Akt phosphorylation and regulation of transketolase is a nodal point for amino acid control of purine synthesis,” *Mol. Cell*, vol. 55, no. 2, pp. 264–276, 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.028.
- [41] M. M. Mihaylova and R. J. Shaw, “The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1016–1023, 2011, doi: 10.1038/ncb2329.The.
- [42] D. L. Schmitt, Y. J. Cheng, J. Park, and S. An, “Sequestration-Mediated Downregulation of de Novo Purine Biosynthesis by AMPK,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 1917–1924, 2016, doi: 10.1021/acscchembio.6b00039.
- [43] I. Ben-Sahra, G. Hoxhaj, S. J. H. Ricoult, J. M. Asara, and B. D. Manning, “mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial

- tetrahydrofolate cycle,” *Science* (80-.), vol. 351, no. 6274, pp. 728–733, 2016, doi: 10.1126/science.aad0489.
- [44] S. An, M. Kyoung, J. J. Allen, K. M. Shokat, and S. J. Benkovic, “Dynamic regulation of a metabolic multi-enzyme complex by protein kinase CK2,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 15, pp. 11093–11099, 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.101139.
- [45] A. Ng, R. A. Uribe, L. Yieh, R. Nuckels, and J. M. Gross, “Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development,” *Development*, vol. 136, no. 15, pp. 2601–2611, 2009, doi: 10.1242/dev.038315.
- [46] M. E. Dickinson *et al.*, “High-throughput discovery of novel developmental phenotypes,” *Nature*, vol. 537, no. 7621, pp. 508–514, 2016, doi: 10.1038/nature19356.
- [47] J. J. Georges and V. Den Berghe, “an Infantile Autistic Syndrome Characterised By the Presence of Succinylpurines in Body Fluids,” *Lancet*, vol. 324, no. 8411, pp. 1058–1061, 1984, doi: 10.1016/S0140-6736(84)91505-8.
- [48] A. Jurecka, M. Zikanova, S. Kmoch, and A. Tyłki-Szymańska, “Adenylosuccinate lyase deficiency,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 38, no. 2, pp. 231–242, 2015, doi: 10.1007/s10545-014-9755-y.
- [49] R. L. Stone, H. Zalkin, and J. E. Dixon, “Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase,” *J Biochem*, vol. 268, no. 26, pp. 19710–19716, 1993, [Online]. Available: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8366112&retmode=ref&cmd=prlinks>.
- [50] E. Fon, S. Demczuk, O. Delattre, G. Thomas, and G. Rouleau, “Mapping of the human adenylosuccinate lyase (ADSL) gene to chromosome 22q13.1->q13.2,” *Cytogenet Cell Genet*, vol. 64, no. (3-4), pp. 201–203, 1993.
- [51] A. Jurecka *et al.*, “Clinical, biochemical and molecular findings in seven Polish patients with adenylosuccinate lyase deficiency,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 94, no. 4, pp. 435–442, 2008, doi: 10.1016/j.ymgme.2008.04.013.

- [52] A. Jurecka, V. Opoka-Winiarska, D. Rokicki, and A. Tylki-Szymańska, “Neurologic presentation, diagnostics, and therapeutic insights in a severe case of adenylosuccinate lyase deficiency,” *J. Child Neurol.*, vol. 27, no. 5, pp. 645–649, 2012, doi: 10.1177/0883073811424465.
- [53] K. Mouchehgh *et al.*, “Lethal Fetal and Early Neonatal Presentation of Adenylosuccinate Lyase Deficiency: Observation of 6 Patients in 4 Families,” *J. Pediatr.*, vol. 150, no. 1, 2007, doi: 10.1016/j.jpeds.2006.09.027.
- [54] F. van den Bergh, M. F. Vincent, J. Jaeken, and G. van den Berghe, “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,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 16, pp. 415–424, 1993.
- [55] M. Zikanova, V. Skopova, A. Hnizda, J. Krijt, and S. Kmoch, “Biochemical and structural analysis of 14 mutant ADSL enzyme complexes and correlation to phenotypic heterogeneity of adenylosuccinate lyase deficiency,” *Hum. Mutat.*, vol. 31, no. 4, pp. 445–455, 2010, doi: 10.1002/humu.21212.
- [56] L. Žídková *et al.*, “Oligodendroglia from ADSL-deficient patient produce SAICARibotide and SAMP,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 101, no. 2–3, pp. 286–288, 2010, doi: 10.1016/j.ymgme.2010.06.014.
- [57] P. Laikind, J. Seegmiller, and H. Gruber, “Detection of 5'-phosphoribosyl-4-(N-succinylcarboxamide)-5-aminoimidazole in urine by use of the Bratton-Marshall reaction: Identification of patients deficient in adenylosuccinate lyase activity,” *Anal Biochem.*, vol. 156, no. (1), pp. 81–90, 1986.
- [58] P. K. de Bree, S. K. Wadman, M. Duran, and H. F. de Jonge, “Diagnosis of inherited adenylosuccinase deficiency by thin-layer chromatography of urinary imidazoles and by automated cation exchange column chromatography of purines,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 156, no. 3, pp. 279–287, 1986, doi: 10.1016/0009-8981(86)90071-9.

- [59] P. Hornik, P. Vyskocilová, D. Friedecký, A. Janostáková, K. Adamová, and T. Adam, “Analysis of aminoimidazole ribosides by capillary electrophoresis--diagnosing defects in second part of purine biosynthetic pathway.,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 376, no. 1–2, pp. 184–9, 2007, doi: 10.1016/j.cca.2006.08.020.
- [60] R. A. Wevers, U. Engelke, U. Wendel, J. G. N. De Jong, F. J. M. Gabreels, and A. Heerschap, “Standardized method for high-resolution 1H-NMR of cerebrospinal fluid,” *Clin. Chem.*, vol. 41, no. 5, pp. 744–751, 1995, doi: 10.1093/clinchem/41.5.744.
- [61] S. Marie *et al.*, “Prenatal diagnosis in adenylosuccinate lyase deficiency,” *Prenat. Diagn.*, vol. 20, no. 1, pp. 33–36, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0223(200001)20:1<33::AID-PD751>3.0.CO;2-3.
- [62] V. Race, S. Marie, M.-F. Vincent, and G. Van den Berghe, “Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in adenylosuccinate lyase deficiency,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, no. 14, pp. 2159–2165, 2000.
- [63] A. Jurecka, E. Jurkiewicz, and A. Tylki-Szymanska, “Magnetic resonance imaging of the brain in adenylosuccinate lyase deficiency: A report of seven cases and a review of the literature,” *Eur. J. Pediatr.*, vol. 171, no. 1, pp. 131–138, 2012, doi: 10.1007/s00431-011-1503-9.
- [64] M. A. van Werkhoven, J. A. Duley, I. McGown, T. Munce, J. L. Freeman, and J. J. Pitt, “Early Diagnosis Of Adenylosuccinate Lyase Deficiency Using A High-Throughput Screening Method And A Trial Of Oral S-Adenosyl-L-Methionine As A Treatment Method,” *Dev. Med. Child Neurol.*, vol. 55, no. 11, pp. 1060–1064, 2013, doi: 10.1111/dmcn.12244.
- [65] C. Salerno, M. Celli, and R. Finocchiaro, “Effect of D-Ribose Administration to a Patient with Inherited Deficit of Adenylosuccinase,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 431, pp. 177–180, 1998.
- [66] G. Stone, T.W., Roberts, L.A., Morris, B.J., Jones, P.A., Ogilvy, H.A., Behan, W.M., Duley, J.A., Simmonds, H.A., Vincent, M.F. and van den Berghe, “Succinylpurines Induce Neuronal Damage in the Rat Brain,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 431, pp. 185–189, 1998.

- [67] K. KE, T. IS, and L. Y-S, “SAICAR Stimulates Pyruvate Kinase Isoform M2 and Promotes Cancer Cell Survival in Glucose -Limited Conditions,” *Science* (80-), vol. 338, no. 6110, pp. 1069–1072, 2012, doi: 10.1126/science.1224409.
- [68] B. Pinson, S. Vaur, I. Sagot, F. Couplier, S. Lemoine, and B. Daignan-Fornier, “Metabolic intermediates selectively stimulate transcription factor interaction and modulate phosphate and purine pathways,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 12, pp. 1399–1407, 2009, doi: 10.1101/gad.521809.
- [69] J. R. Gooding *et al.*, “Adenylosuccinate Is an Insulin Secretagogue Derived from Glucose-Induced Purine Metabolism,” *Cell Rep.*, vol. 13, no. 1, pp. 157–167, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.072.
- [70] S. Marie, B. Heron, P. Bitoun, T. Timmerman, G. Van Den Berghe, and M.-F. Vincent, “AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC.,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 74, no. 6, pp. 1276–1281, 2004, doi: 10.1086/421475.
- [71] F. Ramond *et al.*, “AICA-ribosiduria due to ATIC deficiency: Delineation of the phenotype with three novel cases, and long-term update on the first case,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2020, doi: 10.1002/jimd.12274.
- [72] K. G. Bullock, G. Peter Beardsley, and K. S. Anderson, “The kinetic mechanism of the human bifunctional enzyme ATIC (5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase). A surprising lack of substrate channeling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 25, pp. 22168–22174, 2002, doi: 10.1074/jbc.M111964200.
- [73] D. Newcombe, “Urinary excretion of aminoimidazolecarboxamide in the Lesch-Nyhan syndrome,” *Pediatrics*, vol. 46, no. 4, pp. 508–12, 1970.
- [74] R. L. Sabina, K. H. Kernstine, R. L. Boyd, E. W. Holmes, and J. L. Swain, “Metabolism of 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in cardiac and skeletal muscle. Effects on purine nucleotide synthesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 17, pp. 10178–10183, 1982, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7107599>.

- [75] R. L. Sabina, D. Patterson, and E. W. Holmes, “5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside (Z-riboside) metabolism in eukaryotic cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 10, pp. 6107–6114, 1985.
- [76] M. A. Lorenz, M. A. El Azzouny, R. T. Kennedy, and C. F. Burant, “Metabolome response to glucose in the β -cell line INS-1832/13,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 15, pp. 10923–10935, 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.414961.
- [77] J. M. Corton, J. G. Gillespie, S. A. Hawley, and D. G. Hardie, “5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside. A Specific Method for Activating AMP-Activated Protein Kinase in Intact Cells?,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 229, no. 2, pp. 558–565, 1995, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.0558k.x.
- [78] M. Houweling, W. Klein, and M. J. H. Geelen, “Regulation of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine synthesis in rat hepatocytes by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR),” *Biochem. J.*, vol. 362, no. 1, pp. 97–104, 2002, doi: 10.1042/0264-6021:3620097.
- [79] D. G. Hardie, F. A. Ross, and S. A. Hawley, “AMP-activated protein kinase: A target for drugs both ancient and modern,” *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 10, pp. 1222–1236, 2012, doi: 10.1016/j.chembiol.2012.08.019.
- [80] N. Martínez-Martín, A. Blas-García, J. M. Morales, M. Marti-Cabrera, D. Monleón, and N. Apostolova, “Metabolomics of the effect of AMPK activation by AICAR on human umbilical vein endothelial cells,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 29, no. 1, pp. 88–94, 2012, doi: 10.3892/ijmm.2011.802.
- [81] R. L. Jacobs, S. Lingrell, J. R. B. Dyck, and D. E. Vance, “Inhibition of hepatic phosphatidylcholine synthesis by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -4-ribofuranoside is independent of AMP-activated protein kinase activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 7, pp. 4516–4523, 2007, doi: 10.1074/jbc.M605702200.
- [82] M. Morishita *et al.*, “AICAR induces mitochondrial apoptosis in human osteosarcoma cells through an AMPK-dependent pathway,” *Int. J. Oncol.*,

- vol. 50, no. 1, pp. 23–30, 2017, doi: 10.3892/ijo.2016.3775.
- [83] J. E. Kim *et al.*, “AMPK activator, AICAR, inhibits palmitate-induced apoptosis in osteoblast,” *Bone*, vol. 43, no. 2, pp. 394–404, 2008, doi: 10.1016/j.bone.2008.03.021.
- [84] J. E. Kim, Y. W. Kim, K. L. In, J. Y. Kim, J. K. Young, and S. Y. Park, “AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression,” *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 106, no. 3, pp. 394–403, 2008, doi: 10.1254/jphs.FP0071857.
- [85] S. Liang, E. A. Medina, B. Li, and S. L. Habib, “Preclinical evidence of the enhanced effectiveness of combined rapamycin and AICAR in reducing kidney cancer,” *Mol. Oncol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1917–1934, 2018, doi: 10.1002/1878-0261.12370.
- [86] T. K. Sengupta, G. M. Leclerc, T. T. Hsieh-Kinser, G. J. Leclerc, I. Singh, and J. C. Barredo, “Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -4-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: Implication for targeted therapy,” *Mol. Cancer*, vol. 6, no. June 2014, 2007, doi: 10.1186/1476-4598-6-46.
- [87] E. Van Den Neste *et al.*, “Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): A multicenter phase I/II study,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 71, no. 3, pp. 581–591, 2013, doi: 10.1007/s00280-012-2033-5.
- [88] M. F. Vincent, F. Bontemps, and G. Van Den Berghe, “Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes,” *Biochem. J.*, vol. 281, no. 1, pp. 267–272, 1992, doi: 10.1042/bj2810267.
- [89] M. F. Vincent, M. D. Erion, H. E. Gruber, and G. Van Den Berghe, “Hypoglycaemic effect of AICARiboside in mice,” *Diabetologia*, vol. 39, no. 10, pp. 1148–1155, 1996, doi: 10.1007/BF02658500.
- [90] N. Henin, M. -François. Vincent, H. E. Gruber, and G. Van Den Berghe,

- “Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase,” *FASEB J.*, vol. 9, no. 7, pp. 541–546, 1995, doi: 10.1096/fasebj.9.7.7737463.
- [91] A. Pelet *et al.*, “PAICS deficiency, a new defect of de novo purine synthesis resulting in multiple congenital anomalies and fatal outcome,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 28, no. 22, pp. 3805–3814, 2019.
- [92] S. X. Li *et al.*, “Octameric Structure of the Human Bifunctional Enzyme PAICS in Purine Biosynthesis,” *J. Mol. Biol.*, vol. 366, no. 5, pp. 1603–1614, 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.027.
- [93] N. Duval *et al.*, “Genetic and metabolomic analysis of AdeD and AdeI mutants of de novo purine biosynthesis: Cellular models of de novo purine biosynthesis deficiency disorders,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 108, no. 3, pp. 178–189, 2013, doi: 10.1016/j.ymgme.2013.01.002.
- [94] L. Mádrová *et al.*, “Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis intermediates,” *PLoS One*, vol. 13, no. 12, pp. 1–19, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0208947.
- [95] M. Zikánová, J. Krijt, H. Hartmannová, and S. Kmoč, “Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 28, no. 4, pp. 493–499, 2005, doi: 10.1007/s10545-005-0493-z.
- [96] S. Kmoč, H. Hartmannová, B. Stibůrková, J. Krijt, M. Zikánová, and I. Sebesta, “Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, no. 10, pp. 1501–1513, 2000.
- [97] L. L and F. J, “Intermediates in purine nucleotide synthesis,” *Methods Enzymol.*, vol. 6, pp. 671–702, 1963.
- [98] V. Baresova, V. Skopova, O. Souckova, M. Krijt, S. Kmoč, and M. Zikanova, “Study of purinosome assembly in cell-based model systems with

- de novo purine synthesis and salvage pathway deficiencies,” *PLoS One*, vol. 13, no. 7, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0201432.
- [99] P. Wojtowicz *et al.*, “Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry in Human Metabolomics,” p. 23, 2008.
- [100] F. J. Schendel, Y. S. Cheng, J. D. Otvos, S. Wehrli, and J. Stubbe, “Characterization and chemical properties of phosphoribosylamine, an unstable intermediate in the de novo purine biosynthetic pathway.,” *Biochemistry*, vol. 27, no. 7, pp. 2614–23, 1988, doi: 10.1021/bi00407a052.
- [101] M. A. Becker and M. Kim, “Regulation of purine synthesis de novo in human fibroblasts by purine nucleotides and phosphoribosylpyrophosphate.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 30, pp. 14531–14537, 1987.
- [102] R. Curto, E. O. Voit, a Sorribas, and M. Cascante, “Mathematical models of purine metabolism in man.,” *Math. Biosci.*, vol. 151, no. 1, pp. 1–49, 1998, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-5564\(98\)10001-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-5564(98)10001-9).
- [103] H. SC and B. JM, “Biosynthesis of the Purines,” vol. 233, pp. 451–455, 1958.
- [104] A. Thomas *et al.*, “Quantification of AICAR-ribotide concentrations in red blood cells by means of LC-MS/MS Anti-doping Analysis,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 30, pp. 9703–9709, 2013, doi: 10.1007/s00216-013-7162-0.
- [105] M. Zikanova, J. Krijt, V. Skopova, M. Krijt, V. Baresova, and S. Kmoch, “Screening for adenylosuccinate lyase deficiency using tandem mass spectrometry analysis of succinylpurines in neonatal dried blood spots,” *Clin. Biochem.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 2–7, 2015, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.10.004.
- [106] J. Rudolph and J. Stubbe, “Investigation of the Mechanism of Phosphoribosylamine Transfer from Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase to Glycinamide Ribonucleotide Synthetase,” *Biochemistry*, vol. 34, no. 7, pp. 2241–2250,

- 1995, doi: 10.1021/bi00007a019.
- [107] H. FA, “No Title,” in *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*, Wiley-Liss, Inc., 1991, pp. 414–415.
- [108] W. Huang, X. Zeng, Y. Shi, and M. Liu, “Functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter 1,” *Protein Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 284–295, 2017, doi: 10.1007/s13238-016-0350-x.
- [109] M. E. Sant, A. Poiner, M. C. Harsanyi, S. D. Lyons, and R. I. Christopherson, “Chromatographic Analysis of Purine Precursors in Mouse L1210 Leukemia,” *Anal. Biochem.*, vol. 182, pp. 121–128, 1989.
- [110] N. Duval *et al.*, “Genetic and metabolomic analysis of AdeD and Adel mutants of de novo purine biosynthesis: cellular models of de novo purine biosynthesis deficiency disorders.,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 108, no. 3, pp. 178–89, 2013, doi: 10.1016/j.ymgme.2013.01.002.
- [111] Y. Sidi and B. S. Mitchell, “Z-Nucleotide accumulation in erythrocytes from Lesch-Nyhan patients,” *J. Clin. Invest.*, vol. 76, no. 6, pp. 2416–2419, 1985, doi: 10.1172/JCI112255.
- [112] H. A. Jinnah, T. Page, and T. Friedmann, “Brain Purines in a Genetic Mouse Model of Lesch-Nyhan Disease,” *J. Neurochem.*, vol. 60, no. 6, pp. 2036–2045, 1993, doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03488.x.
- [113] S. K. Tschirner, H. Bähre, A. Kaefer, E. H. Schneider, R. Seifert, and V. Kaefer, “Non-targeted metabolomics by high resolution mass spectrometry in HPRT knockout mice,” *Life Sci.*, vol. 156, pp. 68–73, 2016, doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.031.
- [114] J. M. López, “Is ZMP the toxic metabolite in Lesch-Nyhan disease?,” *Med. Hypotheses*, vol. 71, no. 5, pp. 657–663, 2008, doi: 10.1016/j.mehy.2008.06.033.
- [115] V. K. Neychev and V. I. Mitev, “The biochemical basis of the neurobehavioral abnormalities in the Lesch-Nyhan syndrome: A hypothesis,” *Med. Hypotheses*, vol. 63, no. 1, pp. 131–134, 2004, doi: 10.1016/j.mehy.2004.01.019.
- [116] L. Mádrová *et al.*, “Combined Targeted and Untargeted Profiling of HeLa

- Cells Deficient in Purine De Novo Synthesis,” *Metabolites*, vol. 12, no. 3, pp. 1–17, 2022, doi: 10.3390/metabo12030241.
- [117] Š. Kouřil, J. de Sousa, J. Václavík, D. Friedecký, and T. Adam, “CROP: Correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data,” *Bioinformatics*, 2020, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa012.
- [118] J. Václavík *et al.*, “A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency,” *JIMD Rep.*, p. přijato, 2020.
- [119] W. S. Cleveland, “Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots,” *J. Am. Stat. Assoc.*, vol. 74, no. 368, pp. 829–836, 1979, doi: 10.1080/01621459.1979.10481038.
- [120] W. B. Dunn *et al.*, “Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 7, pp. 1060–1083, 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.335.
- [121] V. Pawlowsky-Glahn, J. J. Egozcue, and R. Tolosana-Delgado, *Modeling and Analysis of Compositional Data*. 2015.
- [122] D. E. Atkinson and G. M. Walton, “Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation,” *Enzyme*, pp. 3239–3241, 1967.
- [123] R. L. Sabina, E. W. Holmes, and M. A. Becker, “The Enzymatic Synthesis of 5-Amino-4-Imidazolecarboxamide Riboside Triphosphate (ZTP),” *Science (80-.)*, vol. 223, no. 4641, pp. 1193–1195, 1984.
- [124] B. Daignan-Fornier and B. Pinson, “5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR), a highly conserved purine intermediate with multiple effects,” *Metabolites*, vol. 2, no. 2, pp. 292–302, 2012, doi: 10.3390/metabo2020292.
- [125] J. Jaeken *et al.*, “Adenylosuccinase deficiency: an inborn error of purine nucleotide synthesis,” *Eur. J. Pediatr.*, vol. 148, no. 2, pp. 126–131, 1988, doi: 10.1007/BF00445919.
- [126] L. C. Shen, L. Fall, G. M. Walton, and D. E. Atkinson, “Interaction between Energy Charge and Metabolite Modulation in the Regulation of Enzymes of

- Amphibolic Sequences. Phosphofructokinase and Pyruvate Dehydrogenase,” *Biochemistry*, vol. 7, no. 11, pp. 4041–4045, 1968, doi: 10.1021/bi00851a035.
- [127] J. S. Swedes, R. J. Sedo, and D. E. Atkinson, “Relation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine requiring mutant of *Escherichia coli*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 17, pp. 6930–6938, 1975, doi: 10.1016/S0021-9258(19)41021-1.
- [128] I. M. De La Fuente *et al.*, “On the dynamics of the adenylate energy system: Homeorhesis vs homeostasis,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108676.
- [129] M. Boutchueng-Djidjou *et al.*, “The last enzyme of the de novo purine synthesis pathway 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ATIC) plays a central role in insulin signaling and the golgi/endosomes protein network,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 14, no. 4, pp. 1079–1092, 2015, doi: 10.1074/mcp.M114.047159.
- [130] S. Kit, “The Biosynthesis of Free Glycine and Serine by Tumors,” *Cancer Res.*, vol. 15, no. 11, pp. 715–718, 1955.
- [131] P. M. Tedeschi *et al.*, “Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells,” *Cell Death Dis.*, vol. 4, no. 10, p. e877, 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.393.
- [132] S. Li, D. Gao, and Y. Jiang, “Function, detection and alteration of acylcarnitine metabolism in hepatocellular carcinoma,” *Metabolites*, vol. 9, no. 2, 2019, doi: 10.3390/metabo9020036.
- [133] E. S. Tai *et al.*, “Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men,” *Diabetologia*, vol. 53, no. 4, pp. 757–767, 2010, doi: 10.1007/s00125-009-1637-8.
- [134] J. M. Corton, J. G. Gillespie, S. A. Hawley, and D. G. Hardie, “5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside: A Specific Method for Activating AMP-Activated Protein Kinase in Intact Cells?,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 229, no. 2, pp. 558–565, 1995, doi: 10.1111/j.1432-

1033.1995.tb20498.x.

- [135] T. R. Koves *et al.*, “Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance,” *Cell Metab.*, vol. 7, no. 1, pp. 45–56, 2008, doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.013.
- [136] T. R. Donti *et al.*, “Diagnosis of adenylosuccinate lyase deficiency by metabolomic profiling in plasma reveals a phenotypic spectrum,” *Mol. Genet. Metab. Reports*, vol. 8, pp. 61–66, 2016, doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.07.007.
- [137] A. Subedi *et al.*, “A novel inhibitor of tumorspheres reveals the activation of the serine biosynthetic pathway upon mitochondrial inhibition,” *FEBS Lett.*, vol. 593, no. 8, pp. 763–776, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13361.
- [138] C. F. Labuschagne, N. J. F. van den Broek, G. M. Mackay, K. H. Vousden, and O. D. K. Maddocks, “Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells,” *Cell Rep.*, vol. 7, no. 4, pp. 1248–1258, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.045.
- [139] P. B. Kim, J. W. Nelson, and R. R. Breaker, “An ancient riboswitch class in bacteria regulates purine biosynthesis and one-carbon metabolism,” *Mol. Cell*, vol. 57, no. 2, pp. 317–328, 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.001.
- [140] G. S. Ducker and J. D. Rabinowitz, “ZMP: A master regulator of one-carbon metabolism,” *Mol. Cell*, vol. 57, no. 2, pp. 203–204, 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.012.

7 SEZNAM PRACÍ

7.1 Publikace s IF vztahující se k disertaci

- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, V. Škopová, T. Adam a M. Zikánová “Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis intermediates,” *PLoS One*, vol. 13, no. 12, pp. 1–19, 2018 (IF = 2,776).
- L. Mádrová, R. Brumarová, D. Dobešová, J. Václavík, Š. Kouřil, J. de Sousa, D. Friedecký, V. Barešová, M. Zikánová a T. Adam, “Combined targeted and untargeted profiling of HeLa cells deficient in purine de novo synthesis,” *Metabolites*, vol. 12, no. 3, pp. 1–17, 2022 (IF 5,581), doi: 10.3390/metabo12030241.

7.2 Publikace v recenzovaných časopisech vztahující se k disertaci

- J. Václavík, L. Mádrová, Š. Kouřil, J. de Sousa, R. Brumarová, H. Janečková, J. Jáčová, D. Friedecký, M. Knapková, L.A.J. Kluijtmans, S.C. Grünert, F.M. Vaz, N. Janzen, R.J.A. Wanders, R. A. Wevers a T. Adam, „A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency“ *JIMD Reports*, vol.54, no. 1, pp. 79-86, 2020.

7.3 Ostatní publikace

- R. Karlíková, J. Šířoká, M. Mech, D. Friedecký, H. Janečková, L. Mádrová, F. Hrdinová, Z. Drábková, O. Dobešová, T. Adam, P. Jahn, “Newborn foal with atypical myopathy“, *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 32, no. 5, pp. 1768-1772, DOI:10.1111/jvim.15236, 2018 (IF = 2,016).
- J. Václavík, K.L.M. Coene, I. Vrobel, L. Najdekr, D. Friedecký, R. Karlíková, L. Mádrová, A. Petsalo, U.F.H. Engelke, A. van Wegberg, L. A. J. Kluijtmans, T. Adam a R. A. Wevers, “Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage

fragmentation mass spectra”, *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 41, no. 3, pp. 407–414, 2018 (IF = 3,970).

7.4 Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci

- L. Mádrová, E. Hlídková, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, T. Adam, M. Zikánová, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ 33. Pracovní dny dědičné metabolické poruchy, Košice, Slovensko, 23.-25.5.2018. Program, s. 25.
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, M. Zikánová, T. Adam, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ *Metabolomics 2018*, 14th Annual Conference of the Metabolomics Society, Seattle, Washington, USA, 24.-28.6.2015, Abstract book, P210.
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, T. Adam, M. Zikánová, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ *Metabomeeting*, 17.-19.12.2017 University of Nottingham, UK. Book of abstracts, p. 88
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, M. Zikánová, T. Adam, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ *Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS)*, 9.-12.9.2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 23.
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, M. Zikánová, T. Adam, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ *Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM)*, Athens, Greece, 4.-7.9.2018. *J Inherit Metab Dis* (2018) 41 (Suppl 1): S162. DOI: 10.1007/s10545-018-0233-9.
- L. Mádrová, R. Karlíková, D. Dobešová, J. Václavík, D. Friedecký, V. Barešová, M. Zikánová, T. Adam, „Metabolomická analýza HeLa buněčných linií defektních v jednotlivých krocích purinové de novo

syntézy,“ 34. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Olomouc, Česká republika, 29.–31. 5. 2019. Program a sborník abstrakt a posterů.

- D. Friedecký, R. Karlíková, L. Mádrová, Š. Kouřil, H. Janečková, J. Václavík, J. Rendlová, K. Mičová, A. Gardlo, J. Jáčová, D. Dobešová, A. Kvasnička, K. Zuzaňáková, T. Adam., „Význam metabolomiky v diagnostice dědičných metabolických poruch,“ 34. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Olomouc, Česká republika, 29.–31. 5. 2019. Program a sborník abstrakt a posterů.
- D. Friedecký, J. Václavík, K.L.M. Coene, L. Najdekr, R. Karlíková, J. Jáčová, L. Mádrová, A. an Wegberg, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „New LC-MS tools in diagnosing inherited metabolic diseases,“ 48th International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2019), Milan, Italy, 16.-20.6.2019, Final program, s. 56.

7.5 Ostatní příspěvky na konferencích

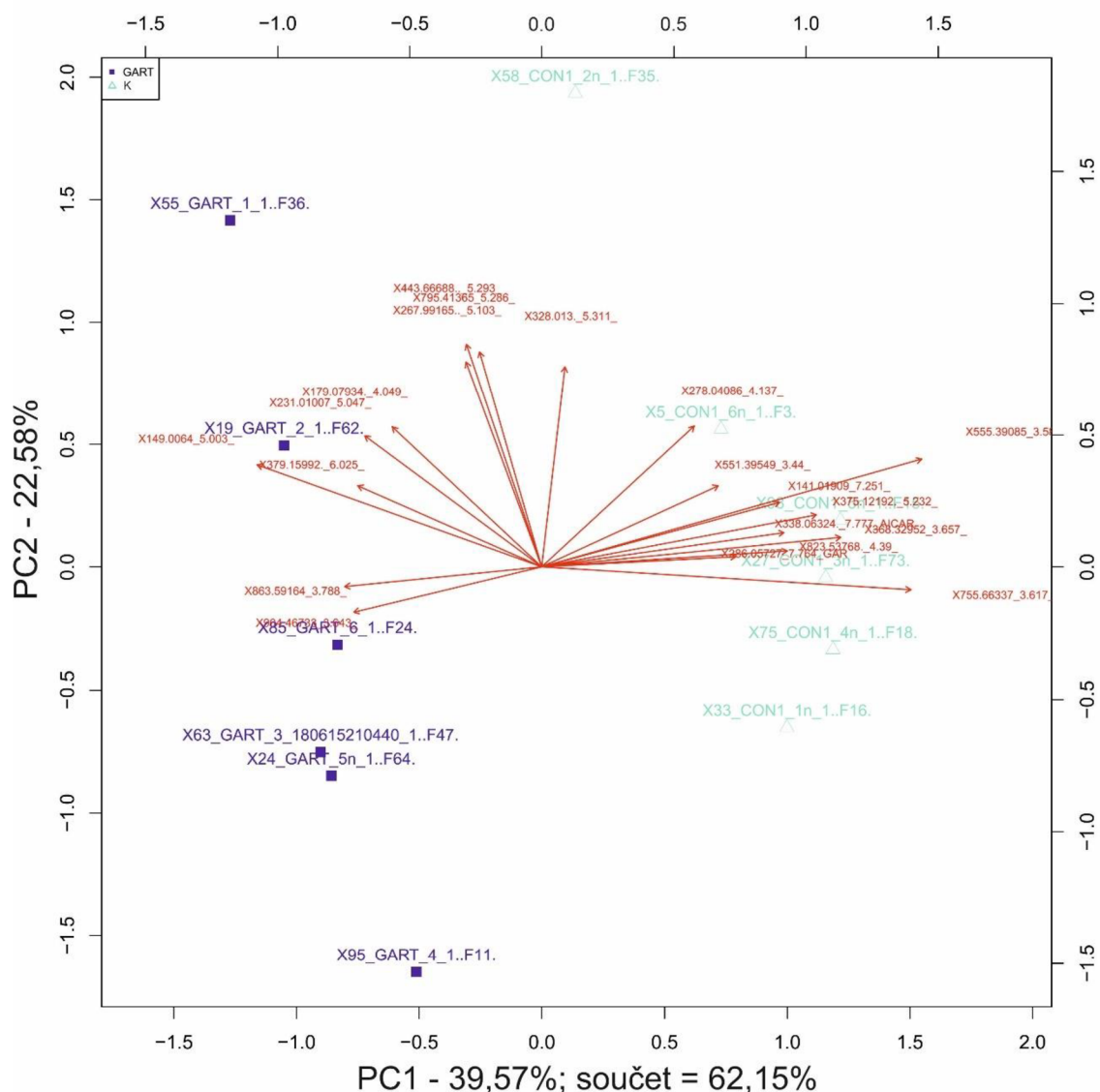
- D. Friedecký, R. Karlíková, K. Mičová, A. Gardlo, H. Janečková, I. Vrobel, L. Mádrová, J. Václavík, L. Najdekr, J. Jáčová, E. Faber, K. Hron, T. Adam, „Význam hmotnostní spektrometrie v hledání nových biomarkerů onemocnění,“ České společnosti klinické biochemie ČLS JEP s mezinárodní účastí; České Budějovice, Česká republika, 17.-19.9.2017. Klinická biochemie a metabolismus (2017), 3 (25), 140.
- J. Václavík, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ Metabomeeting, 17.-19.12.2017 University of Nottingham, UK. Book of abstracts, p. 111.
- J. Václavík, H. Janečková, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, T. Adam, R.A. Wevers, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ 33. Pracovní dny dědičné metabolické poruchy, Košice, Slovensko, 23.-25.5.2018. Program, s. 25-26.

- D. Friedecký, R. Karlíková, K. Mičová, A. Gardlo, H. Janečková, I. Vrobel, L. Najdekr, Š. Kouřil, J. Rendlová, L. Mádrová, J. Jáčová, T. Adam, „Pitfall and limitations of LC-MS clinical metabolomics,“ Chiranal, Olomouc, Česká republika, 29.1.-1.2.2018.
- J. Václavík, H. Janečková, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), Athens, Greece, 4.-7.9.2018. J Inherit Metab Dis (2018) 41 (Suppl 1):S37–S127. DOI: 10.1007/s10545-018-0233-9.
- J. Václavík, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS), 9.-12.9.2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 52.
- J. Šíroková, L. Mádrová, R. Karlíková, Š. Kouřil, R. Jorda, V. Kryštof, D. Friedecký, T. Adam, „Effect of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors on cellular metabolome regarding selectivity,“ Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS), 9.-12.9.2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 49.
- D. Friedecký, R. Karlíková, K. Mičová, A. Gardlo, H. Janečková, I. Vrobel, L. Najdekr, Š. Kouřil, J. Rendlová, L. Mádrová, J. Jáčová, T. Adam, „Jak kriticky hodnotit výsledky v metabolomice,“ 19. Škola hmotnostní spektrometrie, 9.-14.9.2018, Špindlerův Mlýn, Česká republika, Sborník 19. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, s. 198-203, ISBN 978-80-88195-07-8.
- D. Friedecký, R. Karlíková R, K. Mičová, A. Gardlo, H. Janečková, I. Vrobel, L. Najdekr, Š. Kouřil, J. Rendlová, L. Mádrová, J. Václavík, J. Jáčová, T. Adam T, „Advanced mass spectrometry for discovering new biomarkers of inborn errors of metabolism,“ 18th International Nutrition & Diagnostics Conference, Prague, Czech Republic, 22.-25.9.2018. Book of proceedings, s. 38, ISBN 978-80-7560-016-5.

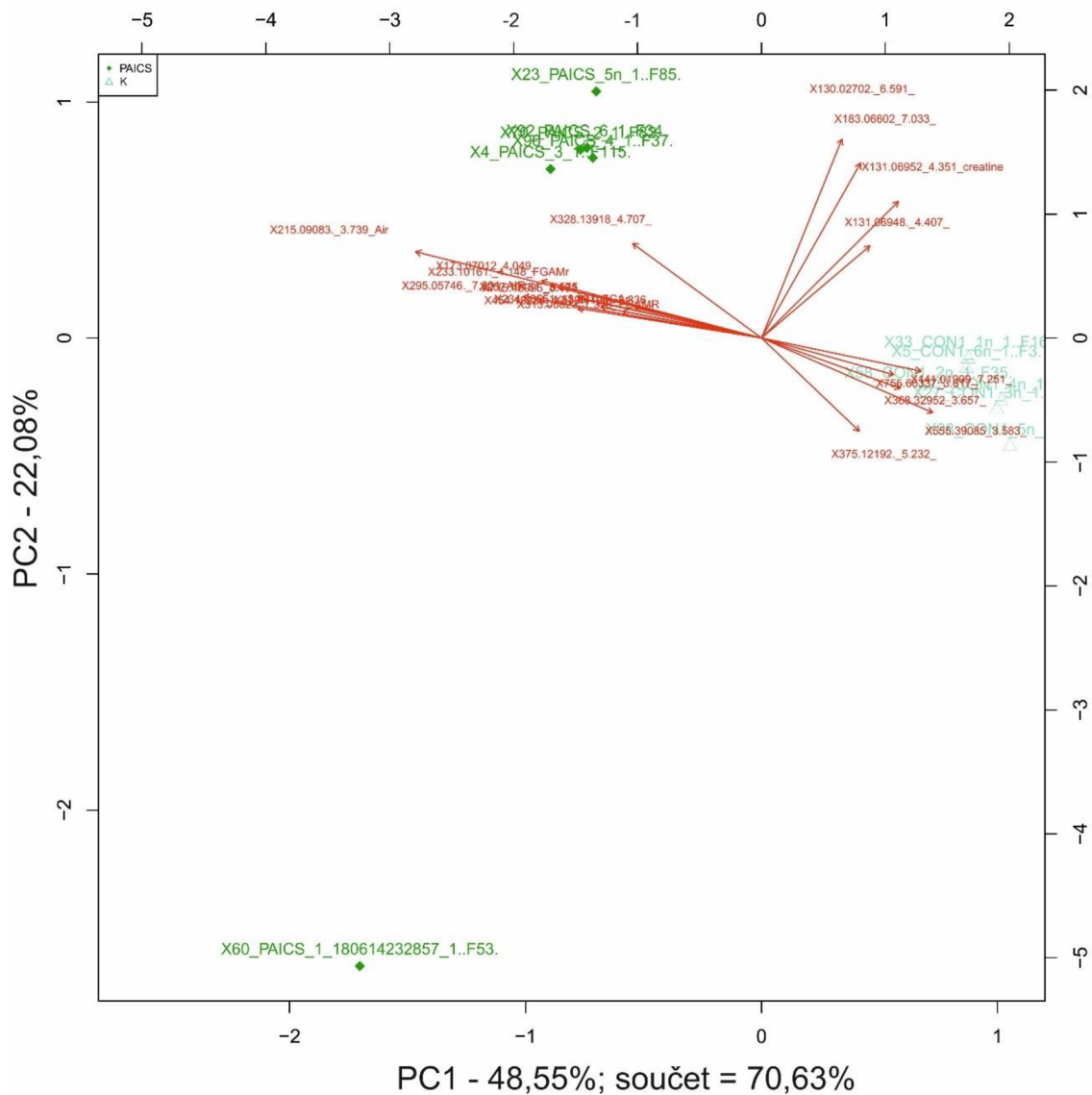
- D. Friedecký, J. Václavík, K.L.M Coene, L. Najdekr, R. Karlíková, L. Mádrová, A. van Wegberg, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, „Metabolomics in inherited metabolic diseases,“ Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.29, ISBN 978-80-905045-9-2.
- J. Václavík, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, Š. Kouřil, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „New biomarkers of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency,“ Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.37, ISBN ISBN 978-80-905045-9-2.
- R. Karlíková, P. Jahn, J. Šírká, D. Friedecký, M. Mech, L. Mádrová, H. Janečková, F. Hrdinová, T. Adam, „Equine atypical myopathy: A metabolic study,“ Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.63, ISBN 978-80-905045-9-2.
- J. Václavík, L. Mádrová, Š. Kouřil, J. Rendlová, R. Karlíková, D. Friedecký, F.M. Vaz, R.J.A. Wanders, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Nové potenciální biomarkery 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie,“ 34. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Olomouc, Česká republika, 29.–31. 5. 2019. Program a sborník abstrakt a posterů.

8 PŘÍLOHA

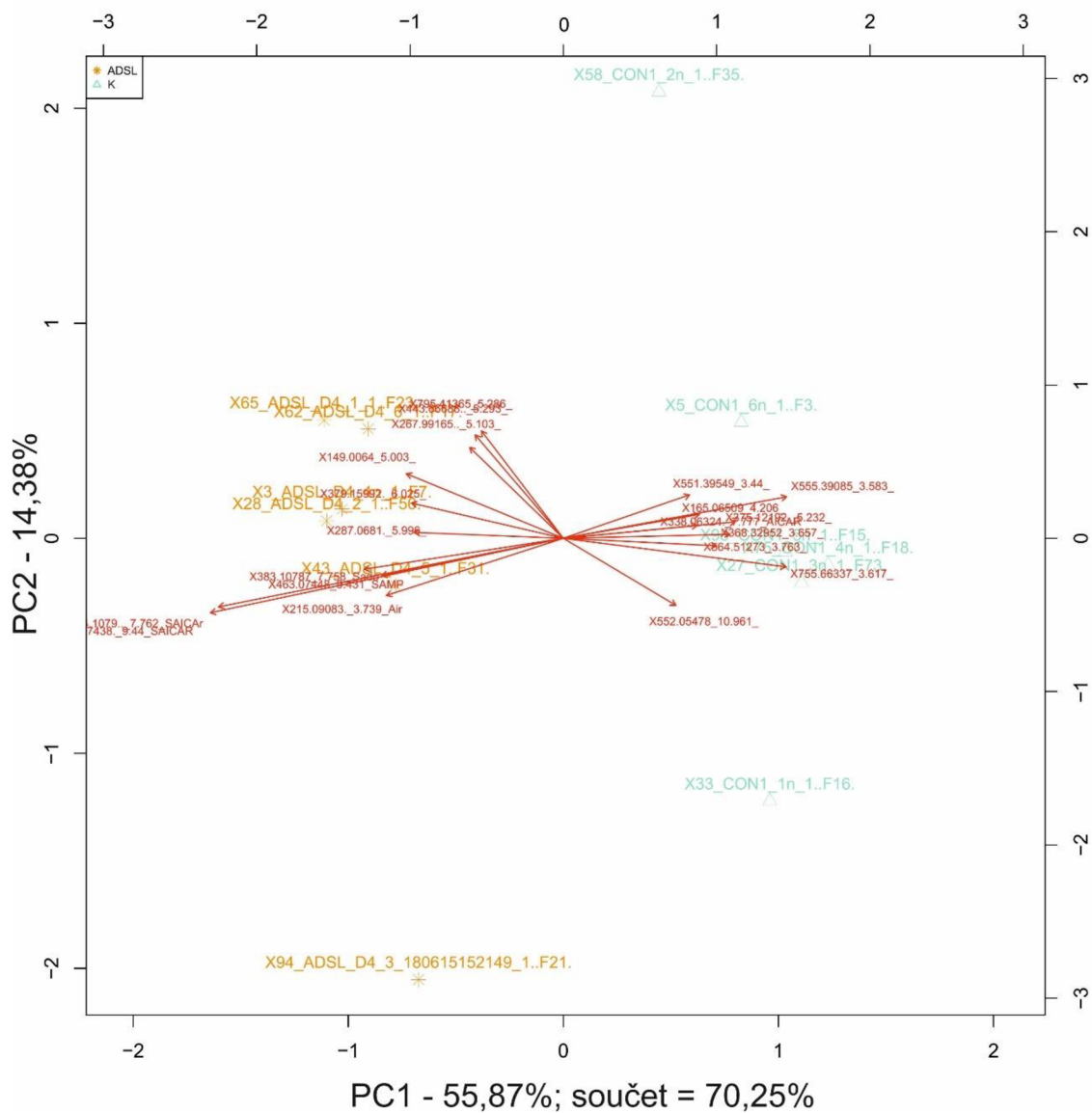
8.1 PCA biploty jednotlivých PDNS-deficitních linií z necílené metabolické analýzy.



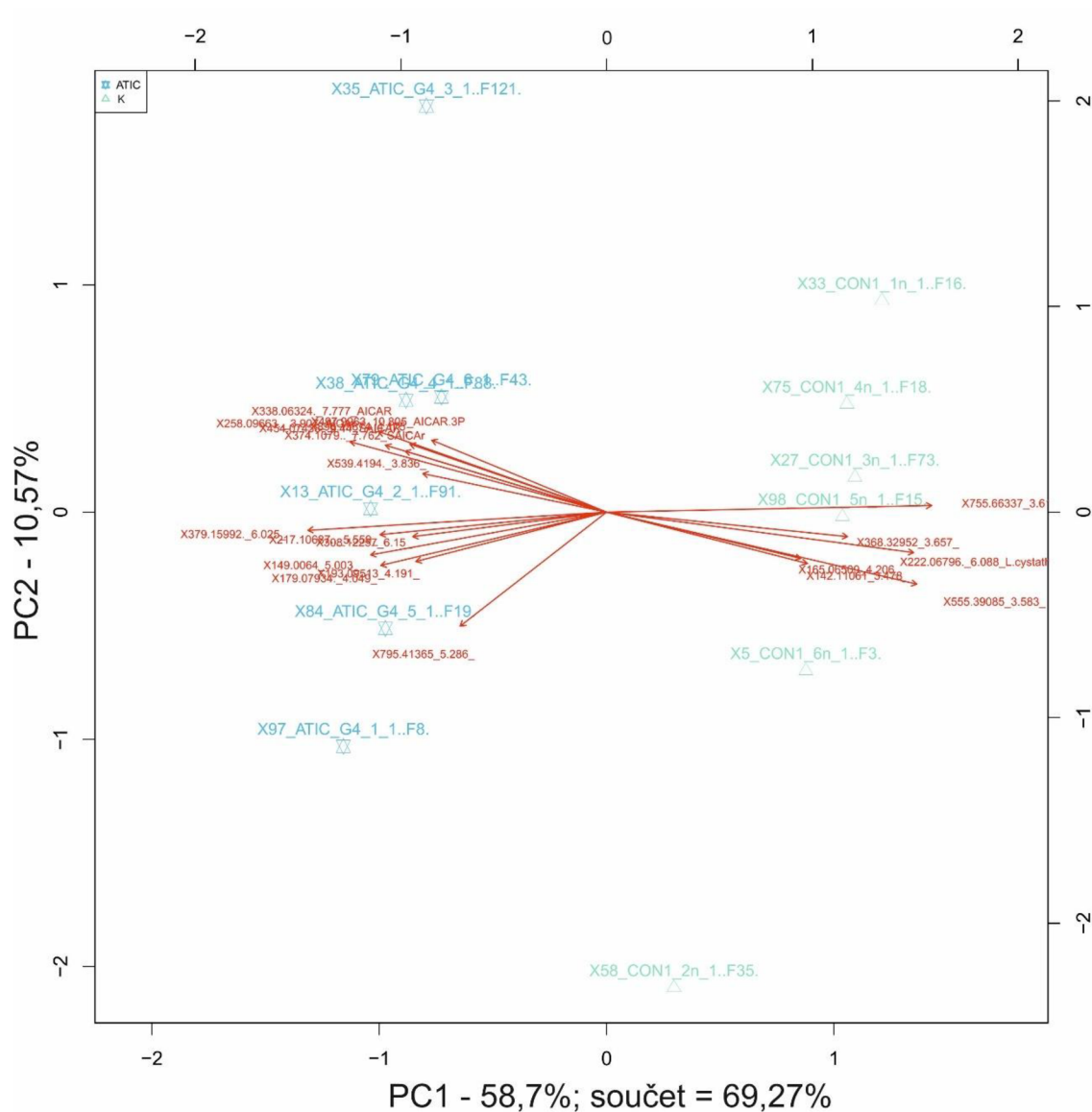
Obrázek 1: PCA biplot *crGART* buněk v porovnání s kontrolními buňkami z necílené metabolické analýzy. Délka a směr šipek je dána váhami metabolitů v prvních dvou komponentách. Název každého vzorku obsahuje informaci o pořadí v sekvenci, typu buněčné linie a identifikační číslo, které bylo automaticky přiřazeno programem Compound Discoverer. Zkratka CON v obrázku označuje kontrolní buňky.



Obrázek 3: PCA biplot crPAICS buněk v porovnání s kontrolními buňkami z necílené metabolické analýzy. Délka a směr šipek je dána váhami metabolitů v prvních dvou komponentách. Název každého vzorku obsahuje informaci o pořadí v sekvenci, typu buněčné linie a identifikační číslo, které bylo automaticky přiřazeno programem Compound Discoverer. Zkratka CON v obrázku označuje kontrolní buňky.



Obrázek 4: PCA biplot crADSL buněk v porovnání s kontrolními buňkami z necílené metabolické analýzy. Délka a směr šipek je dána váhami metabolitů v prvních dvou komponentách. Název každého vzorku obsahuje informaci o pořadí v sekvenci, typu buněčné linie a identifikační číslo, které bylo automaticky přiřazeno programem Compound Discoverer. Zkratka CON v obrázku označuje kontrolní buňky.



Obrázek 5: PCA biplot crATIC buněk v porovnání s kontrolními buňkami z necílené metabolické analýzy. Délka a směr šipek je dána váhami metabolitů v prvních dvou komponentách. Název každého vzorku obsahuje informaci o pořadí v sekvenci, typu buněčné linie a identifikační číslo, které bylo automaticky přiřazeno programem Compound Discoverer. Zkratka CON v obrázku označuje kontrolní buňky.

