

# Hmotově-spektrometrické vlastnosti imidazolových ribosidů

Friedecký D.<sup>1</sup>, Vyskočilová P.<sup>1</sup>, Fryčák P.<sup>2</sup>, Horník P.<sup>2</sup>, Lemr K.<sup>2</sup>, Adam T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie, Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice a Univerzita Palackého Olomouc

<sup>2</sup>Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého Olomouc

## SOUHRN

**Cíl:** V současné době byly identifikovány tři defekty v purinové de novo syntéze (PDNS). V případě deficitních enzymů jsou v tělních tekutinách pacientů akumulovány abnormální defosforylované substráty (aminoimidazolové ribosidy). Cílem této práce bylo studovat hmotově-spektrometrické vlastnosti aminoimidazolových ribosidů spojených s druhou polovinou PDNS.

**Metody:** Aminoimidazolové ribosidy byly syntetizovány a chemicky charakterizovány. Technika kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla aplikována pro strukturní identifikaci. MS analýza byla provedena na LCQ hmotnostním spektrometru s iontovou pastí (Finnigan MAT, San Jose, USA). Pro ionizaci byla zvolena chemická ionizace za atmosferického tlaku.

**Výsledky:** Účinnost syntézy ribosidů byla více než 90% a obdržená fragmentační spektra potvrdila jejich identitu. Při fragmentaci ztrácí imidazolový kruh substituenty ve formě malých molekul (NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> nebo CO). Succinylaminoimidazol karboxamid ribosidu (SAICAr) odštěpuje buď N-sukcinokarboxamid jako celek, nebo se z něj pouze odštěpují skupiny vody z karboxylových skupin. Otevření imidazolového kruhu nebylo sledováno u žádné látky.

**Závěr:** Výše popsaná charakteristika může být užitečná pro vývoj nových metod pro diagnostiku známých či zatím neodhalených defektů druhé poloviny PDNS.

**Klíčová slova:** purin, de novo syntéza, hmotnostní spektrometrie.

## SUMMARY

**Friedecký D., Fryčák P., Vyskočilová P., Horník P., Lemr K., Adam T.: Mass-spectrometric properties of imidazole ribosides**

**Objectives:** Three defects have been identified in purine de novo synthesis (PDNS). Dephosphorylated substrates (imidazole ribosides) of the deficient enzymes are accumulated in body fluids in affected patients. The aim of this work was to investigate mass spectrometric properties of aminoimidazole ribosides related to the second half of PDNS.

**Methods:** These aminoimidazole ribosides were synthesised and chemically characterised. Liquid chromatography-mass spectrometry technique was applied for structural identification. MS analysis was carried out using an LCQ ion trap mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, USA). Atmospheric pressure chemical ionization source was employed.

**Results:** Synthesis yielded ribosides with more than 90% purity and obtained fragmentation spectra confirmed their identity. The imidazole ring loses its substituents in the form of small molecules (NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> or CO) in mass spectrometry fragmentation. The N-succinocarboxamide group of succinylaminoimidazole carboxamide riboside (SAICAr) either loses water from the free carboxyl groups or breaks away as a whole. Opening of the imidazole ring was not observed for any compound.

**Conclusions:** Characteristics described above can be useful for development of new methods for diagnosing of known as well as unrevealed defects of second part of PDNS.

**Key words:** purine, de Novo synthesis, mass spectrometry.

## Úvod

V současné době jsou známy dva enzymové defekty v purinové de novo syntéze (obr. 1) – deficit adenylsukcinátlyázy (ADSL, EC 4.3.2.2) a AICA-ribosidurie (defekt bi-funkčního enzymu aminoimidazolkarboxamidribonukleotid formyltransferáza – IMP cyklohydroláza;ATIC, EC 4.1.1.21, 6.3.2.6). Oba defekty je možno diagnostikovat detekcí ribosidů analogických k enzymovým substrátům. Nukleosidy korespondující substrátům ostatních kroků metabolické cesty nejsou v současné době komerčně dostupné. Tato práce prezentuje syntézu a hmotově-spektrometrické fragmentace ribosidů odpovídajících nukleotidům druhé poloviny purinové de novo syntézy (PDNS).

## Metody

### Syntéza a přečištění aminoimidazolribosidů

5-amino-4-imidazolribosid (Alr, Mr 215) je analog k šestému intermediátu PDNS. Alr byl připraven z komerčně dostupného 5-amino-4-imidazolkarboxamidribosidu (AICAr, Toronto Research Chemicals Inc., North York, Canada, Mr 258) alkalickou hydrolýzou a následnou dekarboxylací [1]. Roztok AICAr (1 g) v NaOH (8 ml, 6 mol/l) byl zahříván na vodní lázni pod zpětným chladičem (90 °C, 24 h) v ochranné atmosféře za použití KOH pelety jako bariéry proti vzdušnému CO<sub>2</sub>. Směs byla ochlazená a za stálého míchání bylo pH upraveno na 4,7 ledovou kyselinou octovou. Směs pak byla probublávána argonem (18 h) a vysušena v rotačním vakuovém odpařovači (90 °C).

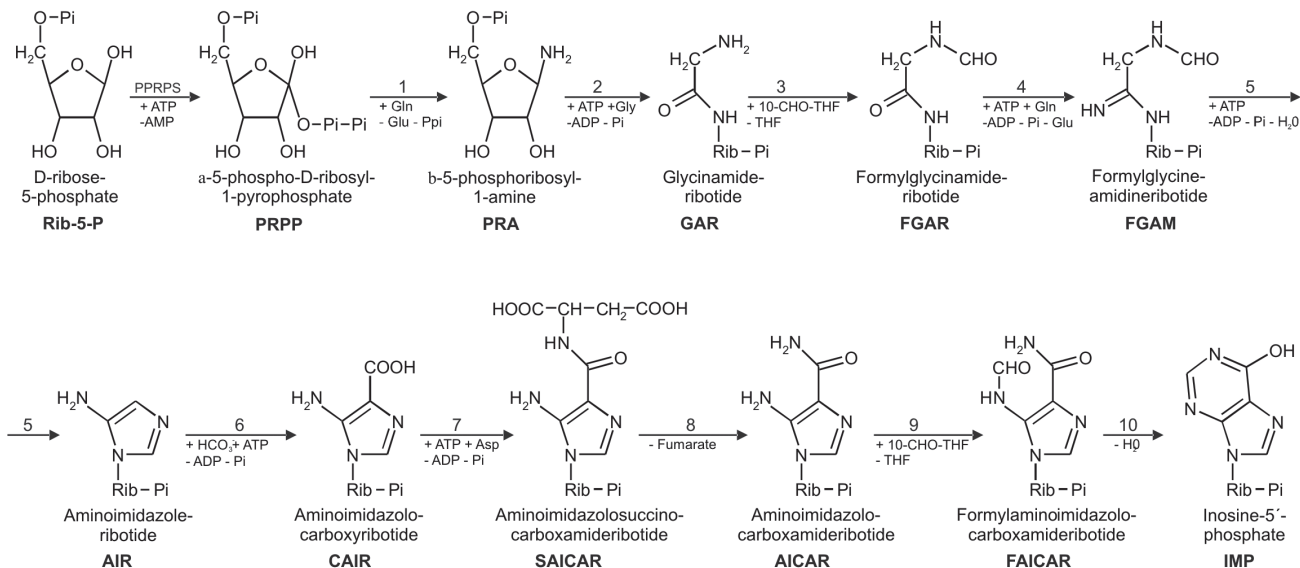


Fig 1. Purine de Novo synthesis pathway

5-amino-4-imidazolkarboxyribosid (CAIr, Mr 259) byl připraven alkalickou hydrolyzou AICAr v 6 mol/l NaOH bez následné dekarboxylace [2]. Syntéza je identická se syntézou Alr. Po ochlazení byl do směsi přidán etanol (8 ml) a získán hnědý roztok sirupovité konzistence. Produkt byl rozetřen s etanolem (3 . 2 ml a 3 . 1 ml), odpařen ve vakuovém odpařovači (24 h), opět rozetřen s metanolem (2 ml) a vysušen.

5-formylamino-4-imidazolkarboxamidribosid (FAICAr, Mr 286) byl připraven formylací AICAr [4]. K AICAr (0,25 g) byla přidána koncentrovaná kyselina mravenčí (13,6 ml), NaOH (1,1 g) a acetanhydrid (25 ml). Roztok byl zahřát na 60 °C (1 min) pro iniciaci reakce, ochlazen na 25 °C a po 10 minut opět zahřát na 50 °C (20 min). Produkt byl vysušen v lyofylizátoru.

5-amino-4-imidazolsukcinokarboxamidribosid (SAICAr, Mr 374) byl připraven rekombinantním enzymem - adenylosukcinátýlázou [3] (Dr. J. Krijt, Praha, ČR). Všechny syntetizované produkty byly analyzovány kapilární elektroforézou pro zjištění čistoty [5]. FAICAr a Alr byly přečištěny ionexovou chromatografií (DOWEX 50WX8).

### Hmotově-spektrometrická fragmentace syntetizovaných látek

MS analýza byla provedena na LCQ – spektrometru s detektorem iontová past (Finnigan MAT, San Jose, Kalifornie, USA). Jako iontový zdroj byla použita chemická ionizace za atmosférického tlaku v pozitivním modu. Proud na výbojové jehle v iontovém zdroji byl nastaven na 7  $\mu$ A při teplotě 300 °C. Průtok rozprašovacího plynu byl 40 arbitrárních jednotek a kapilára byla vyhřívána na teplotu 150 °C.

### Výsledky a diskuse

Byla provedena syntéza a purifikace látek s čistotou lepší než 90 %. Byla naměřena fragmentační spektra protonizovaných molekul studovaných látek aplikací kolizí indukované disociace v iontovém zdroji. Alr a AICAr byly

fragmentovány MS/MS experimenty a CAIr, SAICAr a FAICAr „in-source” MS experimenty, které jsou založeny na kolizi molekul s plynem v iontovém zdroji, anebo vysokou teplotou za současného odpaření. Hmotnostní spektrum a fragmentace AICAr jsou vyobrazeny na obrázku 2. Fragmenty ostatních látek uvádí tabulka 1.

Table 1. Fragmentation of imidazole ribosides – analogs of intermediates of purine de novo synthetic pathway

Compound	Parent $\rightarrow$ fragment ion masses and relative intensity
Alr	198 (55%), 180 (51%), 126 (100%), 108 (8%)
CAIr	232 (17%), 216 (100%), 128 (8%), 84 (46%)
SAICAr	357 (46%), 339 (7%), 321 (27%), 303 (24%), 243 (100%), 225 (45%), 216 (14%), 84 (31%)
AICAr	242 (12%), 241 (7%), 224 (5%), 223 (14%), 206 (8%), 205 (12%), 188 (3%), 169 (9%), 152 (5%), 127 (100%)
FAICAr	155 (100%), 138 (77%), 127 (12%), 110 (23%)

Struktury studovaných látek jsou relativně podobné a jsou tedy fragmentovány obdobně. Z imidazolového skeletu jsou při fragmentaci odštěpeny substituenty ve formě malých molekul ( $\text{NH}_3$  – Alr, AICAr, FAICAr;  $\text{CO}_2$  – CAIr;  $\text{CO}$  – CAIr, FAICAr). N-sukcinokarboxamidová skupina SAICAru buď odštěpí vodu z volné karboxylové skupiny, anebo je odštěpena celá. Rozštěpení a otevření imidazolového kruhu nebylo sledováno u žádné látky. Ribózový kruh odštěpuje buď 1, 2, nebo 3 molekuly vody, alternativně dochází v případě Alr a AICAr ke štěpení celého kruhu ribózy napříč. Častý způsob disociace všech látek je štěpení glykosylické C-N vazby. Imidazolový kruh si zachovává náboj a ribóza zůstává nenabitá.

### Závěr

Práce je zaměřena na fragmentační studii aminoimidazolových ribosidů purinové de novo syntézy. Výsledky

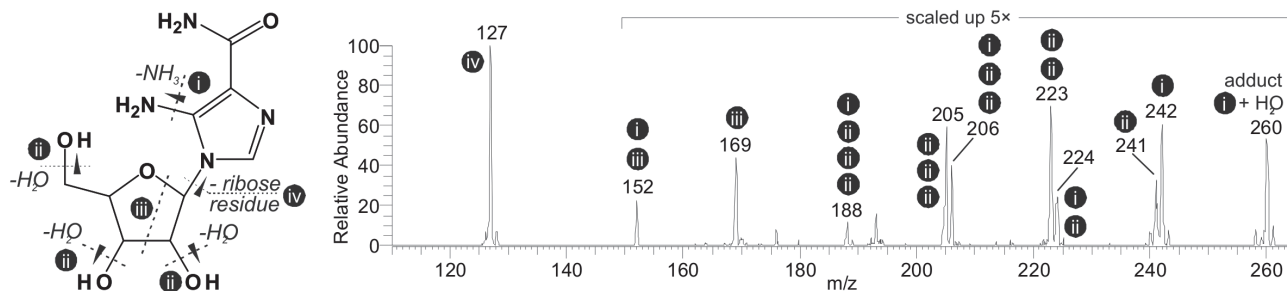


Fig. 2. Fragmentation of 5-amino-4-imidazolecarboxamideriboside

mohou být využity v diagnostice známých metabolických onemocnění a pro výzkum nových onemocnění této metabolické dráhy. Dále je možno data využít pro screeningové techniky tandemové hmotnostní spektrometrie.

## Literatura

1. Groziak, M. P., Huan, Z. W., Ding, H., Meng, Z. Y., Stevens, W. C., Robinson, P. D. Effect of a chemical modification on the hydrated adenosine intermediate produced by adenosine deaminase and a model reaction for a potential mechanism of action of 5-aminoimidazole ribonucleotide carboxylase. *J. Med. Chem.*, 1997, 40, p. 3336–3345.
2. Srivastava, P. C., Mancuso, R. W., Rousseau, R. J., Robins, R. K. Nucleoside peptides. 6. Synthesis of certain N-(5-amino-1-(beta-D-ribofuranosyl)imidazole-4-carbonyl)amino acids related to naturally occurring intermediates in the purine biosynthetic pathway. *J. Med. Chem.*, 1974, 17, p. 1207–1211.
3. Zikanova, M., Krijt, J., Hartmannova, H., Kmocho, S. 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.*, 2005, 28, p. 493–499.

4. Lukens, L., Flaks, J. Intermediates in purine nucleotide synthesis. In Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds) *Methods Enzymology*. Academic Press : London 1963, p. 671–703.
5. Adam, T., Friedecký, D., Fairbanks, L. D., Sevcik, J., Bartak, P. Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin. Chem.*, 1999, 45, p. 2086–2093.

Práce byla podpořena granty IGA MZČR NR/8578-3/2005 a MSM6198959205.

Prezentace práce byla podpořena cestovním grantem ČSKB.

Do redakce došlo 13. 5. 2007.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. David Friedecký, Ph.D.  
Laboratoř dědičných metabolických poruch  
Odělení klinické biochemie,  
FN Olomouc  
I. P. Pavlova 6  
775 20 Olomouc  
e-mail: friedecky@email.cz