

Analýza erytrocytů v diagnostice defektů PDNS

Vyskočilová P.^{*1,2}, Kuchyňová H.³, Opluštilová L.³, Friedecký D.¹, Horník P.^{1,4}, Adamová K.², Adam T.^{*1}

¹Oddělení klinické biochemie, Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice a Univerzita Palackého Olomouc

²Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Fakultní nemocnice a Univerzita Palackého Olomouc

³Katedra biochemie, Univerzita Palackého Olomouc

⁴Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého Olomouc

SOUHRN

Cíl studie: Analýza erytrocytárních nukleotidů je využívána k diagnostice defektů záchranných cest purinového metabolismu. Cílem této práce je objasnit, zda je toto vyšetření použitelné také v diagnostice defektů druhé poloviny purinové de novo syntézy (PDNS). Ke studiu membránového transportu a následné biotransformace byly použity defosforylované meziproducty druhé poloviny PDNS.

Materiál a metody: Patofyziologická situace u pacientů trpících deficitem PDNS byla simulována inkubací nativních erytrocytů, erytrocytárních membrán a lyzovaných erytrocytů s defosforylovanými meziproducty druhé poloviny PDNS: 5-aminoimidazolribosid (Alr), 5-amino-4-imidazolkarboxribosid (CAIr), 5-amino-4-imidazolsukcinokarboxamidribosid (SAICAr), 5-formamido-4-karboxamidribosid (FAICAr) a 5-amino-4-imidazolkarboxamidribosid (AICAr). Tyto sloučeniny byly chemicky syntetizovány a použity jako standardní látky. Inkubační směsi byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí pomocí tří separačních systémů, které dovolují analyzovat ribosidy i ribotidy.

Výsledky: Jen dva ze studovaných ribosidů (AICAr, FAICAr) prostoupily membránou erytrocytu v detekovatelném množství. Pouze AICAr je vhodným substrátem erytrocytárních kináz a je konvertován na odpovídající mono-, di- a trifosfáty.

Závěr: Výsledky ukazují, že analýza erytrocytů je použitelná pouze pro diagnostiku defektu bifunkčního enzymu AICAR-transformylázy/IMP-cyklohydrolázy.

Klíčová slova: aminoimidazolové ribosidy, purinová de novo syntéza, membránový transport.

SUMMARY

Vyskočilová P., Kuchyňová H., Opluštilová L., Friedecký D., Horník P., Adamová K., Adam T.: Analysis of erythrocytes in the diagnostics of PDNS defects

Objective: Analysis of erythrocyte nucleotides is useful for diagnosing defects in purine salvage pathways. The aim of this work was to elucidate whether the investigation could be used in diagnosing defects of a second part purine de novo synthesis (PDNS). Dephosphorylated intermediates of the second part of PDNS (aminoimidazolribosides) were used for membrane transport and biotransformation study.

Material and Methods: Pathophysiological situation in patients suffering from defects of PDNS was simulated by incubation of native erythrocytes, erythrocyte membranes and erythrocyte lysates with dephosphorylated intermediates of second part of PDNS: 5-amino-4-imidazolriboside (Alr), 5-amino-4-imidazolecarboxyriboside (CAIr), 5-amino-4-imidazolesuccinocarboxamideriboside (SAICAr), 5-formylamino-4-imidazolecarboxamideriboside (FAICAr) a 5-amino-4-imidazolecarboxamideriboside (AICAr). The compounds were synthesized and taken as standard compounds. Incubation mixtures were analyzed by capillary electrophoresis using three separation systems allowing analysis of both ribosides and ribotides.

Results: Two of all studied ribosides (AICAr a FAICAr) were able to permeate through the erythrocyte membrane in detectable amounts. AICAr is an acceptable substrate for erythrocyte kinases and is converted to mono-, di- and triphosphates.

Conclusions: The results suggest that erythrocytes are only useful for diagnosing AICAR-transformylase/IMP-cyclohydrolase deficiency.

Key words: aminoimidazolribosides, purine de novo synthesis, membrane transport.

Úvod

Purinové nukleotidy jsou v organismu syntetizovány dvěma způsoby. První je biochemická cesta zvaná purinová de novo syntéza. Výchozí látkou této metabolické dráhy je ribosa-5-fosfat a přes 9 meziproductů je produkován inosinmonofosfát (IMP). Purinový kruh IMP vzniká postupným přidáváním jednotlivých atomů na

ribózový kruh, což je ale velmi energeticky náročné. Organismus proto využívá převážně tzv. cest záchranných, kdy se puriny v těle recyklují. V záchranných cestách známe defekty osmnácti enzymů, zatímco v PDNS pouze tří: superaktivita/deficit fosforibosylpyrofosfátsyntetázy (PRPS; EC 2.7.6.1), deficit adenylosukcinátlyázy (ADSL, EC 4.3.2.2) a AICA-ribosidurie (defekt bifunkčního enzymu AICAR transformyláza –

*Autoři přispěli k práci rovnou měrou.

IMP cyklohydroláza; ATIC, EC 4.1.1.21, 6.3.2.6). Enzymový deficit se obvykle projevuje akumulací substrátu v buňce, která jej v defosforylované formě (jako ribosid) vyloučí do tělních tekutin (schéma 1).

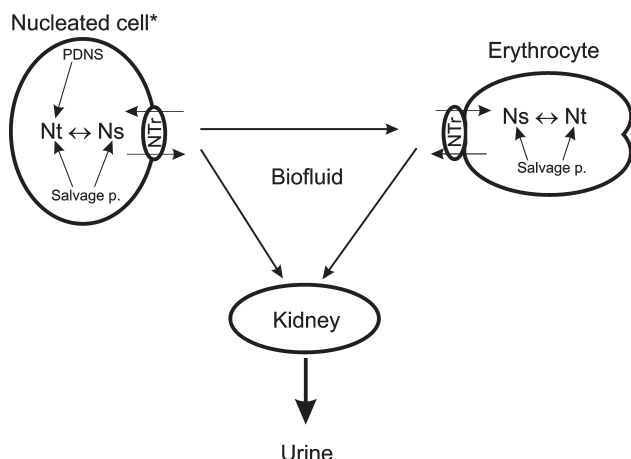


Fig. 1. Scheme of metabolic consequences in purine inherited metabolic deficiencies

PDNS = purine *de Novo* synthesis; Nt = nucleotides; Ns = nucleotides; NTr = nucleoside transporter; *Normal dividing nucleated cell which expresses PDNS.

Pro účely diagnostiky dědičných poruch purinového metabolismu jsou stanovovány hladiny těchto látek v tělních tekutinách (především v moči) různými analytickými technikami – TLC, HPLC a kapilární elektroforézou. Pro diagnostiku enzymových defektů záchranných cest se analyzují kromě moči pacienta také erythrocyty. V těchto krevních elementech jsou analyzovány hladiny nukleotidů.

Erythrocyty nejsou schopny purinové *de novo* syntézy a využívají pouze záchranných metabolických drah. Strukturální podobnost aminoimidazolových ribosidů druhé části PDNS s purinovým, respektive pyrimidinovým skeletem, by mohla umožňovat transport těchto látek v ribosidické formě z extracelulárního prostoru do erythrocytů za pomoci nukleosidových transporterů a jejich následnou konverzi na ribotidy. Z dosud známých defektů PDNS byla popsána diagnostická využitelnost analýzy nukleotidů v erythrocytech u deficitu ATIC, zatímco u pacientů s defektem ADSL a defekty PRPS abnormální hladiny zjištěny nebyly.

Cílem práce bylo zjistit, zda je analýza erythrocytů vhodná také pro diagnostiku enzymových defektů druhé poloviny PDNS. Experimentálně jsme simulovali patofyziologickou situaci u defektů druhé poloviny PDNS inkubací erythrocytů, erythrocytárních membrán a lyzátů se studovanými látkami.

Materiál a metody

Materiál

5-amino-4-imidazolribosid (AIr), 5-amino-4-imidazol-karboxyribosid (CAIr), 5-formylamino-4-imidazolkarboxamidribosid (FAICAr) byly chemicky syntetizovány z komerčně dostupného 5-amino-4-imidazolkarboxamid-

ribosidu (AICAr, Toronto Research Chemicals Inc., North York, Canada) [1]. 5-amino-4-imidazolsukcinkarboxamidribosid (SAICAr) byl připraven pomocí rekombinantní ADSL (autoři děkují Dr. M. Zikánové z Prahy za poskytnutí vzorku) [2]. NaCl, KCl, MgCl₂, Tris-HCl, glukóza, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, H₃BO₃, dodecylsulfát sodný (SDS), 2-amino-2-methylpropan-1-ol, H₃PO₄, NaOH, kyselina citronová, hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) a gama-aminomáselná kyselina (GABA) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Co. (St. Louis., USA).

Nativní erythrocyty, erythrocytární lyzáty a membrány

Krev zdravých jedinců byla centrifugována (900 g, 5 min). Po odstranění supernatantu byla peleta nativních erythrocytů promyta fyziologickým roztokem. Erythrocyty byly inkubovány v médiu (121 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl, 5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l glukózy) s příslušným ribosidem (1 mmol/l) při 37 °C po dobu 15 minut.

Lýza erythrocytů byla provedena zmrazením nativních erythrocytů na -50 °C a rozmrazením při pokojové teplotě. Lyzát byl inkubován stejně jako nativní erythrocyty.

Erythrocytární membrány byly připraveny hypotonickou lýzou nativních erythrocytů v 0,103 mol/l Na₂HPO₄, 0,2 mol/l NaH₂PO₄ (pH 7,6) a následnou centrifugací (10 min, 1000 g, 4 °C). Buněčná peleta byla rozpuštěna v médiu, které obsahovalo 6,24 mmol/l Na₂HPO₄, 12,1 mmol/l NaH₂PO₄ (pH 7,6), a jemně míchána 20 min na ledové lázni. Buněčná suspenze byla centrifugována (10 min, 20000 g, 4 °C). Vrstva membrán byla rozpuštěna v hypotonickém pufru (viz výše) a přidána do roztoku ribosidů tak, abych jejich výsledné koncentrace byly 5 · 10⁻³ mol/l, 5 · 10⁻⁴ mol/l, 2,5 · 10⁻³ mol/l, 1 · 10⁻³ mol/l, 5 · 10⁻⁴ mol/l, 1 · 10⁻⁴ mol/l. Roztoky byly inkubovány 19 hodin při laboratorní teplotě za mírného míchání.

Stanovení aminoimidazolových ribosidů a aminoimidazolových ribotidů

Před vlastní analýzou byly buňky 3krát promyty fyziologickým roztokem a deproteinovány 1 mol/l kyselinou trichloroctovou a 30 s sonifikovány. Po centrifugaci byl supernatant extrahován dietylerem do neutrální reakce.

Ribosidy byly stanovovány pomocí kapilární elektroforézy P/ACE 5510 s detektorem diodového pole. Pro analýzu byly použity tyto dva separační systémy: „Alkalický“ o složení 60 mmol/l H₃BO₃ – 80 mmol/l SDS – 2-amino-2-methylpropan-1-ol (pH 9,6) a „kyselý“ o složení 200 mmol/l H₃PO₄ – NaOH (pH 1,8) [3, 4].

Ribotidy byly stanovovány pomocí kapilární elektroforézy „home made“ s UV detektorem. Separace probíhala v pufru, který obsahoval 40 mmol/l kyseliny citronové - 0,8 mmol/l CTAB - GABA (pH 4,0) [5].

Výsledky a diskuse

Ve druhé polovině PDNS byly doposud diagnostikovány dva enzymové deficity z celkem pěti teoreticky možných. V této práci jsme simulovali patofyziologic-

kou situaci známých i dosud nepopsaných enzymových defektů inkubací erytrocytů s defosforylovanými meziproducty druhé poloviny PDNS: Alr, CAI_r, SAICAr, AICAr a FAICAr. Experiment byl rozdělen do tří částí. V první části byly ribosidy inkubovány s erytrocytárními membránami a analyzován jejich intracelulární obsah. Cílem bylo zjistit, zda jsou ribosidy schopny prostoupit membránou. Z analýz vyplynulo, že pouze AICAr a FAICAr prostupují přes erytrocytární membránu (u membrán inkubovaných s CAI_r, Alr a SAICAr nebyly tyto látky detekovány).

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

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

Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zda lze defekty PDNS diagnostikovat analýzou nukleotidů v erytrocytech, která se běžně používá pro diagnostiku defektů v záchranných cestách purinového metabolismu. Výsledky studie ukazují, že tento způsob diagnostiky je vhodný pro defekty bifunkčního enzymu ATIC, avšak nelze jej použít pro ostatní defekty druhé poloviny PDNS. Výsledky studie odpovídají nálezům u pacienta s AICArribosidurií, v jehož erytrocytech byly nalezeny vysoké hladiny AICArribotidů [6] a také nálezům u pacientů s deficitem ADSL, v jejichž erytrocytech nebyl nalezen žádný SAICArribotid [7].

Literatura

1. **Vyskočilová, P., Horník, P., Friedecký, D., Frycak, P., Lemr, K., Adam, T.** Synthesis and mass spectrometric fragmentation characteristics of imidazole ribosides-analogs of intermediates of purine de novo synthetic pathway. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006, 25, 9–11, p. 1237–1240.
2. **Zikanová, M., Krijt, J., Hartmannová, H., Kmoč, 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, 4, p. 493–499.
3. **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, 12, p. 2086–2093.
4. **Friedecký, D., Adam, T., Bartak, P.** Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism: a selective approach. *Electrophoresis*, 2002, 23, 4, p. 565–571.
5. **Friedecký, D., Tomkova, J., Maier, V., Janostakova, A., Prochazka, M., Adam, T.** Capillary electrophoretic method for nucleotide analysis in cells: application on inherited metabolic disorders. *Electrophoresis*, 2007, 28, 3, p. 373–380.
6. **Marie, S., Heron, B., Bitoun, P., Timmerman, T., Van Den Berghe, G., Vincent, M. F.** AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, 74, 6, p. 1276–1281.
7. **Jaeken, J., Van den Berghe, G.** An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet*, 1984, 2, 8411, p. 1058–1061.

Tato práce byla podpořena grantem IGA NR/7796-3.

Prezentace práce byla podpořena cestovním grantem ČSKB.

Do redakce došlo 10. 4. 2007.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Petra Vyskočilová

Oddělení klinické biochemie

Laboratoř dědičných metabolických poruch

I. P. Pavlova 6

775 20 Olomouc

e-mail: petvys@gmail.com