

Abstrakt

Puriny jsou organické sloučeniny s rozmanitými funkcemi, které se nacházejí ve všech živých organismech ve složitých molekulách, jako jsou nukleotidy, nukleosidy nebo jako purinové báze. Jejich přirozená rovnováha v organismu je udržována syntézou, recyklací a degradací. Přebytek purinů se vylučuje močí jako kyselina močová. Purinové nukleotidy mohou být recyklovány záchrannými cestami, které katalyzují reakci purinové báze s fosforibosylpyrofosfátem. Zcela nová ústřední molekula purinového metabolismu, inosinmonofosfát, může být syntetizována z prekurzorů při *de novo* purinové syntéze (DNPS), která je aktivována v případech zvýšené potřeby purinů jako je např. vývoj organismu. DNPS zahrnuje deset kroků katalyzovaných šesti enzymy, které formují multienzymový komplex purinosom umožňující tok substrátů skrz tuto dráhu.

Dosud byly popsány tři poruchy DNPS: deficit ADSL, AICA-ribosidurie a deficit PAICS. Všechny tři poruchy jsou způsobeny genetickými mutacemi vedoucími ke špatné funkci příslušného enzymu, které se dále projevují nedostatečnou aktivitou daného kroku DNPS. Biochemicky to znamená akumulaci substrátu poškozeného enzymu, biologicky narušení formování purinosomu a klinicky nespecifická neurologická postižení, což přispívá k problematické diagnostice poruch DNPS. Předpokládali jsme, že defekty ostatních DNPS enzymů zůstávají nepopsané z důvodu vzácnosti těchto pacientů a také malé míře rozšíření diagnostických metod způsobené komerční nedostupností většiny substrátů DNPS.

Naše hypotéza byla podpořena údaji z databáze gnomAD, které predikují existenci jedinců s mutacemi v pěti ze šesti možných genů kódující enzymy DNPS. Proto jsme přistoupili k biochemické a anorganické syntéze jednotlivých substrátů DNPS a jejich izotopicky značených analogů. Všechny připravené sloučeniny byly použity jako standardy pro vývoj diagnostických metod využívající techniku LC-MS/MS. Dále jsme vyvinuli modely lidských buněk simulující známé i teoreticky možné poruchy DNPS. Buněčné linie byly charakterizovány genetickým sekvenováním, proteinovými aktivními esejemi a stanovením hladin substrátů DNPS v buněčném médiu a lyzátech.

Naše výsledky umožnily iniciaci mezinárodní spolupráce vedoucí k popisu nové poruchy DNPS, deficitu PAICS, a dále podpořily screening vzorků moči a suchých krevních kapek (DBS) pacientů s nespecifickým neurologickým postižením bez určené diagnózy. Stanovili jsme fyziologické hodnoty substrátů DNPS detekovatelných v moči a DBS. Ve vzorcích DBS jsme nedekovali žádné významně odlehle hodnoty. Nicméně, ve vzorcích moči jsme identifikovali tři mírně a jednu extrémně zvýšenou hodnotu, což vedlo k dalšímu testování s cílem prokázat přítomnost poruchy v DNPS.

Klíčová slova: *De novo* syntéza purinů, Deficit Adenylosukcinátlyázy, AICA-ribosidurie, Deficit PAICS, Lidský buněčný model, Purinosom, Suchá krevní kapka (DBS), Screening, Tandemová hmotnostní spektrometrie, HPLC-MS/MS, Nespecifické neurologické symptomy.