

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Markéta Kráčmarová

Purinosom – multiproteinový komplex enzymů *de novo* syntézy purinů

The purinosome – a multi-enzyme complex involved in the *de novo* purine synthesis

Bakalářská práce

Školitelka: Ing. Marie Zikánová, Ph.D.

Praha, 2014

Poděkování:

Děkuji Ing. Marii Zikánové, Ph.D. a Mgr. Veronice Barešové, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při psaní této práce a za jejich vstřícnost a ochotu při konzultacích. Zvláštní poděkování patří mé rodině za podporu při studiu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5.8.2014

Podpis:

ABSTRAKT

Purinosom je multiproteinový komplex tvořený enzymy, které se účastní purinové *de novo* syntézy (DNPS). V této metabolické dráze dochází v několika krocích ke konverzi 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu na inosinmonofosfát, jenž je prekurzorem purinových nukleotidů. Purinové nukleotidy jsou syntetizovány také z inosinmonofosfátu získávaného skrze recyklační dráhy, které zpracovávají hypoxantin. Purinosom je dynamická struktura reagující svým formováním či rozpadem na aktuální potřebu či dostupnost purinů. Jeho tvorba je porušena u dědičných poruch DNPS - AICA-ribosidurie a deficitu adenylosukcinátlyázy.

Výzkum se zaměřuje na objasnění procesů formování a přestavby purinosomu, dále na identifikaci molekulárních změn spojených s tvorbou purinosomu za fyziologických i patologických stavů. Objevení a studium purinosomu přispívá nejen k lepšímu pochopení purinového metabolismu, ale mohlo by v budoucnu otevřít další možnosti rozvoje léčiv, zejména chemoterapeutik zaměřených na blokaci DNPS.

Klíčová slova: purinosom, purinová *de novo* syntéza, defekty enzymů, metabolismus, interakce purinosomu, buněčná regulace

ABSTRACT

The purinosome is a multiprotein complex involved in the *de novo* purine synthesis (DNPS). Through a several steps of this metabolic pathway 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate is converted to inosine monophosphate, the precursor of purine nucleotides. Purine nucleotides are also synthesized from inosine monophosphate via a salvage pathway that utilizes hypoxanthine. The purinosome is a dynamic multienzyme complex which is assembled and disassembled by actual need and availability of purines. The purinosome assembly is disrupted in the inherited disorders of the DNPS enzymes - AICA-ribosiduria and adenylosuccinate lyase deficiency.

Detailed studies of assembly and dynamics of purinosome and identification of molecular changes associated with the formation of purinosome under physiological and pathological conditions are object of research. Besides better understanding of purine metabolism, in the future, it can open up new possibilities of drug development especially of new use of chemotherapeutics that block DNPS.

Key words: purinosome, *de novo* purine synthesis, defects of enzymes, metabolism, purinosome interactions, cell control

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

10-f-THF	10-formyl-tetrahydrofolát
ADSL	adenylosukcinátlyáza
AICAR	aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid
AICAr	aminoimidazolkarboxamid ribosid
AICARDP	aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid difosfát
AICART	aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid transformyláza
AICARTP	aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid trifosfát
AIRS	aminoimidazol ribonukleotid syntetáza
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	adenosinmonofosfát kináza
ATIC	AICAR transformyláza/IMP cyklohydroláza
ATP	adenosintrifosfát
CAIRS	karboxyaminoimidazol ribonukleotid syntetáza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CK2	kaseinová kináza II
CoA	koenzym A
C3A	buněčná linie odvozená z hepatocelulárního karcinomu
dADSL	deficit adenylosukcinátlyázy
DMAT	2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNPS	purinová <i>de novo</i> syntéza
FAD	flavinadenindinukleotid
FAICAR	formylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid
FDG	fluorodeoxyglukóza
FGAMS	formylglycinamidin ribonukleotid syntetáza
FGAR	N-formylglycinamid ribonukleotid
GARS	glycinamid ribonukleotid syntetáza
GART	glycinamid ribonukleotid transformyláza

GMP	guanosinmonofosfát
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny
GTP	guanosintrifosfát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HEK293	embryonální buňky ledvin
HeLa	buněčná linie odvozená z karcinomu děložního hrdla
HepG2	buněčná linie odvozená z hepatocelulárního karcinomu
HGPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hsp 90/70	protein teplotního šoku (z ang. heat shock protein)
IMP	inosinmonofosfát
IMPCH	inosinmonofosfát cyklohydroláza
LPA	lysofosfatidová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z ang. messenger RNA)
MTHFS	methenyltetrahydrofolát syntetáza
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NH ₃	amoniak
NRF-2	transkripční faktor (z ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
PAICS	fosforibosylaminoimidazol sukcinylkarboxamid syntetáza/ fosforibosylaminoimidazol karboxyláza
PPAT	fosforibosylpyrofosfát amidotransferáza
PET	pozitronová emisní tomografie
PK	pyruvát kináza
PKM2	izoforma M2 pyruvát kinázy
PMR	psychomotorická retardace
PNC	purin – nukleotidový cyklus
PRPP	5-fosforibosyl-1-pyrofosfát
P2Y	purinergní receptor spřažený s G proteiny
RNA	ribonukleová kyselina
S-Ado	sukcinyladenosenin

SAICAr	sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribosid
SAICAR	sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid
SAICARS	sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid syntetáza
S-AMP	sukcinyladenosenmonofosfát
Saos-2	buněčná linie odvozená z osteogenního sarkomu
SF	kožní fibroblasty
siRNA	krátká interferující ribonukleová kyselina (z ang. small interfering RNA)
TBB	4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol
TBCA	tetrabromoskořicová kyselina
TBI	4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol
TEV	virus tabákové mozaiky (z ang. Tobacco Etch Virus)
TGART	glycinamid ribonukleotid syntetáza/glycinamid ribonukleotid transformyláza/aminoimidazol ribonukleotid syntetáza
XMP	xantosinmonofosfát

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. PURINY.....	3
2.1. Metabolismus purinů.....	3
2.2. <i>De novo</i> biosyntéza purinů.....	5
2.2.1. Regulace DNPS.....	6
2.3. Recyklační dráhy	6
3. PURINOSOM.....	8
3.1. Objevení purinosomu	9
3.2. Regulace a interakce purinosomu	11
3.3. Propojení purinové biosyntézy a jiných metabolických drah	13
4. DEFEKTY ENZYMŮ PURINOVÉ DE NOVO SYNTÉZY	16
4.1. AICA-ribosidurie.....	16
4.1.1. Genotyp.....	17
4.1.2. Fenotyp	17
4.2. Deficit ADSL	18
4.2.1. Genotyp.....	19
4.2.2. Fenotyp	19
4.2.3. Patogeneze a léčba onemocnění.....	20
4.3. Purinosom při defektech DNPS	22
5. ZÁVĚR	24
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	25

1. ÚVOD

Puriny jsou heterocyklické sloučeniny, jejichž deriváty v buňce zastávají mnoho různých funkcí, zejména stavební, signalizační, energetickou a katalytickou. Vznikají dvěma rozdílnými způsoby – *de novo* syntézou a recyklačními dráhami. Recyklační dráhy přeměňují hypoxantin, adenin či guanin na inosinmonofosfát (IMP). Ten buňce slouží jako výchozí látka pro syntézu purinových nukleotidů. Purinová *de novo* syntéza (DNPS) je metabolická dráha, v jejíchž deseti krocích je 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát (PRPP) přeměněn na výsledný produkt - IMP. U vyšších eukaryot jsou chemické reakce této syntetické dráhy katalyzovány šesti enzymy [1].

Purinosom je funkční proteinový komplex tvořený enzymy DNPS. Jeho asociace i disociace je pod přísnou buněčnou kontrolou. Za použití různých inhibitorů a krátkých interferujících ribonukleových kyselin (siRNA) bylo prokázáno, že regulace purinosomové formace se účastní kaseinové kinázy [2], heat shock proteiny (Hsp) [3], mikrotubulová filamenta [4] a G-proteiny [5]. Purinosom interaguje s několika enzymy – s methenyltetrahydrofolát syntetázou (MTHFS) [6], která má úlohu v jednouhlíkatém metabolismu, s pyruvát kinázou (PK) účastnící se glykolýzy a ovlivňující metabolické přeprogramování nádorových buněk [7] a s adenosinmonofosfát kinázou (AMPK), jež má roli v řízení energetického metabolismu [8]. Meziprodukty DNPS a jejich metabolity mají významné regulační vlastnosti, mohou se uplatnit jako farmakologická činidla a ve zvýšené koncentraci působit cytotoxicky [9]. Známé poruchy DNPS jsou nejčastěji způsobeny mutacemi v genech pro enzymy tvořící purinosom. Nesprávná funkce zasaženého enzymu má za následek akumulaci jeho substrátů v buňce a tělních tekutinách, což pacienty postihuje z hlediska biochemického i behaviorálního [10].

Tato práce shrnuje dosavadní znalosti o purinosomu, o regulaci jeho formování a interakcích s jinými buněčnými partnery. Popisuje se v ní struktura, funkce a metabolismus purinů. Dále se zaměřuje na dva odlišné mechanismy, jakými buňka purinové nukleotidy získává. Shrnuje dosavadní vědecké důkazy o existenci purinosomu, zabývá se metodami jeho detekce a buněčnými liniemi, v jejichž

cytoplazmě byl purinosom prokázán a detailně studován. Jsou zde popsány dva enzymové defekty DNPS – AICA-ribosidurie a deficit adenylosukcinátlyázy (dADSL), jejich genotyp, klinické projevy a možná léčba. Dále jsou v práci rozebírány metabolické vlastnosti, struktura a aktivita meziproduktů purinové syntézy a jejich vliv na metabolický tok skrze DNPS. Je zde nastíněný princip testu využívající transkripční faktor a proteázu viru tabákové mozaiky (TEV) pro detekci a kvantifikaci potenciálních protein-proteinových interakcí v purinosomu. Dále tato práce popisuje závislost proliferace nádorových buněk na koncentraci glukózy, serinu a glycinu v souvislosti se syntézou purinů.

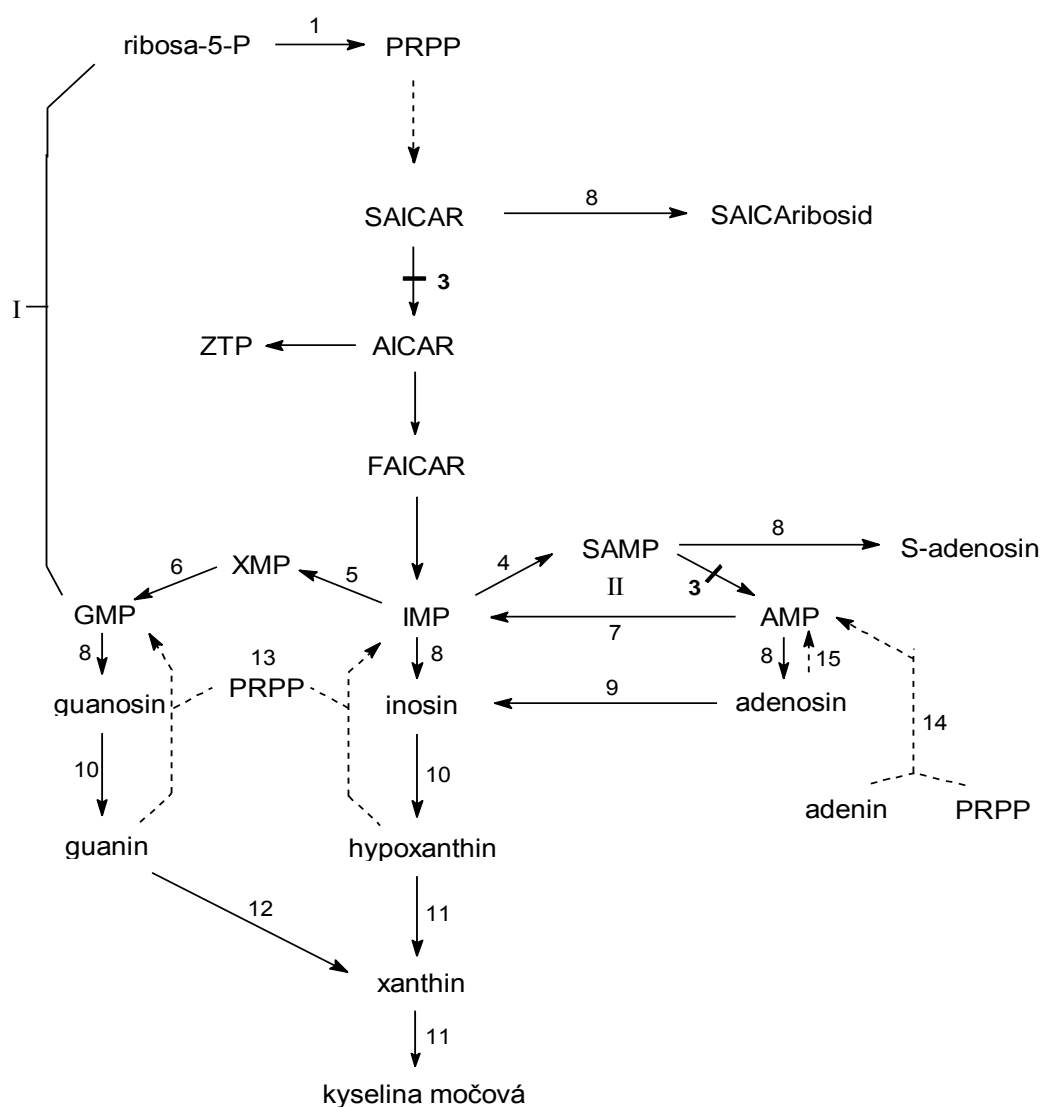
2. PURINY

Puriny jsou dusíkaté aromatické sloučeniny, které jsou tvořeny pyrimidinovým a imidazolovým kruhem - purinovou bází. Tyto báze jsou společně s bázemi pyrimidinovými základní složkou nukleových kyselin - deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA). Nukleové báze dohromady s pětiuhlíkatým sacharidem ribózou či deoxyribózou a jedním nebo více zbytky kyseliny fosforečné vytváří nukleotid. Purinové nukleotidy mají významnou úlohu v přenosu energie - např. makroergické sloučeniny adenosintrifosfát (ATP) a guanosintrifosfát (GTP), v buněčné komunikaci - např. cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), participují v řadě biologických procesů a metabolických reakcí – např. koenzym A (CoA), nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺), nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP⁺), flavinadenindinukleotid (FAD).

2.1. Metabolismus purinů

Jsou dva odlišné mechanismy, jakými buňky získávají purinové nukleotidy - *de novo* syntézou IMP z PRPP nebo recyklačními dráhami, které získávají IMP zpracováním hypoxantinu, adeninu či guaninu (obr. 1).

Schopnost různých tkání syntetizovat puriny *de novo* je odlišná. V buňkách mozku představuje aktivita enzymů DNPS pouze 25-30 % aktivity těchto enzymů v játrech, ve kterých je výskyt syntetizovaných purinů stejně jako v kosterním svalstvu poměrně vysoký [11,12,14]. Buňky některých tkání jako je kostní dřeň, mají zřejmě omezenou schopnost syntetizovat puriny *de novo* [11,12,13]. Je pravděpodobné, že jsou jim puriny dodávány recyklačními dráhami nebo z jiných tkání [14]. K pozorování změn v DNPS byl využit radioaktivní izotop uhlíku ¹⁴C, přičemž se změny i průběh DNPS odrazily v aktivitě fosforibosylpyrofosfát amidotransferázy (PPAT) [12]. Volné purinové báze, které nejsou zpracovány recyklačními dráhami a dále využity organismem, jsou degradovány na kyselinu močovou [15].



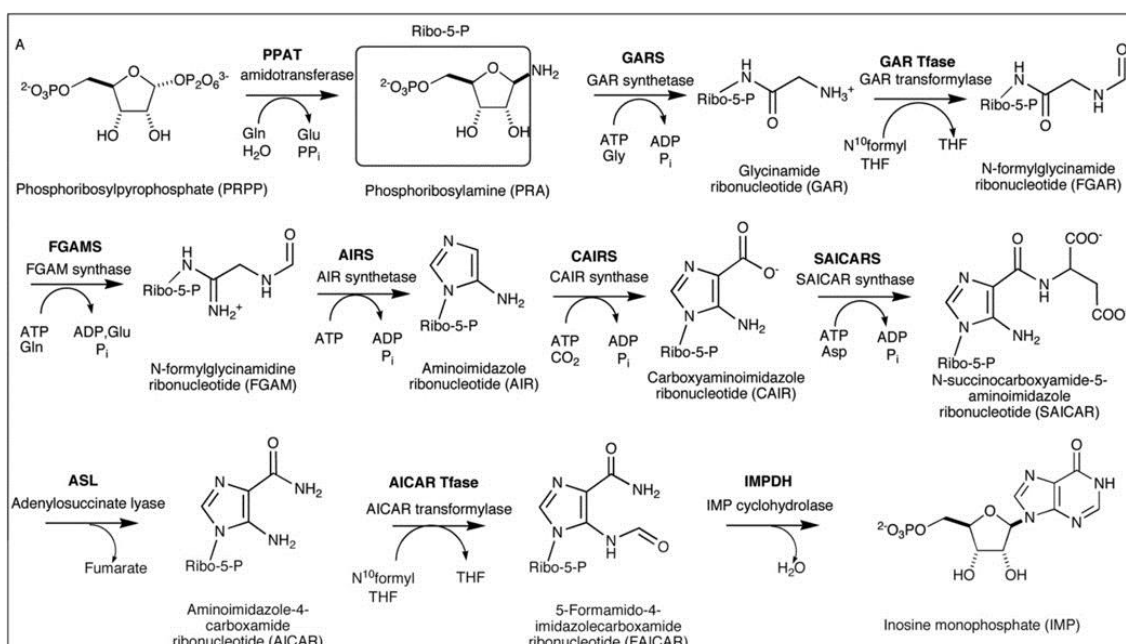
Obrázek č. 1.: *Metabolismus purinů* (převzato z [16])

I. de novo syntéza; II. purin - nukleotidový cyklus; PRPP - 5-fosforibosyl-1-difosfát; FAICAR - formylový derivát; AICAR - AICA-ribonukleotid; IMP - inosinmonofosfát; GMP - guaninmonofosfát; XMP - xantosinmonofosfát; 1. PRPP syntetáza; 3. adenylosukcinátlyáza; 4. adenylosukcinátsyntetáza; 5. IMP dehydrogenáza; 6. GMP syntetáza; 7. AMP deamináza; 8. cytoplasmatická 5' nukleotidáza; 9. adenosindeamináza; 10. purinnukleosidfosforyláza; 11. xanthinoxidáza; 12. guanindeamináza; 13. HGPRT - hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza; 14. adeninofosforibosyl-transferáza; 15. adenosinkináza

2.2. De novo biosyntéza purinů

Biosyntéza purinů je konzervovaná metabolická dráha, která probíhá v několika krocích. U vyšších eukaryot tato dráha probíhá v deseti chemických reakcích, ve kterých je PRPP prostřednictvím šesti enzymů postupně přeměněn na IMP (obr. 2), ze kterého je v dalších enzymových reakcích syntetizován adenosinmonofosfát (AMP) a guanosinmonofosfát (GMP) [1].

Mezi šest enzymů katalyzujících DNPS patří fosforibosylpyrofosfát amidotransferáza (PPAT), trifunkční enzym (TGART) složený z glycinamid ribonukleotid syntetázy (GARS), glycinamid ribonukleotid transformylázy (GART) a aminoimidazol ribonukleotid syntetázy (AIRS), formylglycinamidin ribonukleotid syntetáza (FGAMS), bifunkční enzym (PAICS) složený z karboxyaminoimidazol ribonukleotid syntetázy (CAIRS) a sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid syntetázy (SAICARS), adenylosukcinátlyáza (ADSL) a bifunkční enzym (ATIC) složený z aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid transformylázy (AICART) a inosinmonofosfát cyklohydrolázy (IMPCH) [1,14].



Obrázek č. 2.: De novo syntéza purinů u člověka (převzato z Zhao et al., 2013 [14])

2.2.1. Regulace DNPS

DNPS je regulována na dvou různých úrovních [17,46]. První z nich je negativní zpětnovazebná regulace. Jedná se o kontrolní mechanismus, ve kterém se obvykle konečný produkt sledu enzymatických reakcí váže na alosterické místo zpravidla prvního enzymu metabolické dráhy a působí na něj inhibičně. Druhý způsob regulace je na úrovni transkripce, kdy dochází k represi genů kódujících proteiny enzymového komplexu.

Na lidských kontrolních fibroblastech, na fibroblastech s deficitem hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázy (HGPRT) a fibroblastech se zvýšenou aktivitou PRPP syntetázy byla studována regulace biosyntézy purinů prostřednictvím PRPP, jehož rychlost syntézy je dána hlavně dostupností ribóza-5-fosfátu a aktivitou PRPP syntetázy. Při blokaci DNPS azaserinem byla měřena rychlost syntézy a koncentrace PRPP i konečných produktů DNPS. Byla též studována rychlost syntézy purinů a PRPP v médiu zbaveného glutaminu. Výsledky této studie ukázaly, že pozdější reakce DNPS jsou citlivější k malým změnám koncentrací purinových inhibitorů. Také se potvrdila klíčová role PRPP syntetázy a PRPP v regulaci rychlosti DNPS a zjistilo se, že aktivitu PPAT, dalšího regulačního enzymu DNPS, určuje interakce PRPP s nukleotidovými inhibitory. Dále bylo potvrzeno, že ve fibroblastech s katalytickými defekty v PRPP syntetáze dosahuje PPAT téměř maximální aktivace, a to prostřednictvím PRPP v přítomnosti purinových nukleotidů [17].

DNPS je regulována také purinovými ribonukleotidy. AMP inhibuje adenylosukcinát syntetázu a GMP inhibuje IMP dehydrogenázu. Zvýšená koncentrace GTP, který je substrátem pro syntézu AMP, může blokovat konverzi IMP na xantosinmonofosfát (XMP) a současně stimulovat přeměnu IMP na sukcinyladenosinmonofosfát, poněvadž GTP je kosubstrát pro adenylosukcinát syntetázu [18]. ATP, který je substrátem pro syntézu GMP, naopak může aktivovat GMP syntetázu [19].

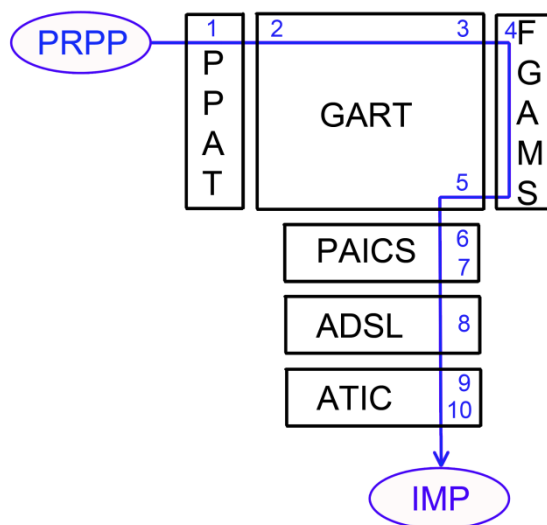
Důležitým enzymem ovlivňujícím a řídícím DNPS je PPAT. Kromě zpětnovazebné inhibice biosyntézy purinů tento enzym reguluje také syntézu DNA, proteinů a buněčný růst [20].

2.3. Recyklační dráha

V recyklační dráze vzniká IMP zpracováním hypoxantinu, meziprojektu vznikajícího odbouráváním purinů, a dusíkatých bází adeninu a guaninu. Má-li buňka pro svůj růst dostatečné množství hypoxantinu, jsou purinové nukleotidy získávány přednostně skrze recyklační dráhu, což je pro ni méně energeticky náročné [21]. Tato reakce, ve které je hypoxantin konvertován na IMP, je katalyzovaná enzymem HGPRT. Recyklační dráhy inhibují DNPS, a to dvěma různými mechanismy: zpětnovazebnou inhibicí PPAT purinovými nukleotidy syntetizovanými recyklačními dráhami a snížením aktivity DNPS spotřebou PRPP, který je pro obě metabolické dráhy výchozí látkou [20]. V porovnání s regulací recyklačních drah je schopnost řízení a usměrňování DNPS výrazně složitější. DNPS má také mnohem větší efekt na tempo buněčného růstu [20,21].

3. PURINOSOM

K prokázání protein-proteinových interakcí enzymů DNPS bylo prováděno *in vitro* mnoho pokusů a měření využívajících kinetické metody a vazebnou afinitu proteinů [1]. Mnoholetou hypotézu o funkčním komplexu tvořeném enzymy DNPS podporuje objev společné purifikace enzymů z přírodních zdrojů [14,22]. Některé enzymy DNPS jsou multifunkční, např. trifunkční protein TGART. Zadržení takového proteinu v genomu lze vysvětlit evoluční hnací silou, která podporuje vzájemné působení mezi tímto proteinem katalyzujícím 2., 3. a 5. krok DNPS a enzymem FGAMS, který katalyzuje 4. krok DNPS [14]. Kinetické studie vycházející z nestability a krátkého poločasu rozpadu 5-fosforibosylaminu, prvního meziprojektu DNPS, svědčí o existenci funkčního komplexu enzymů DNPS [14,23].

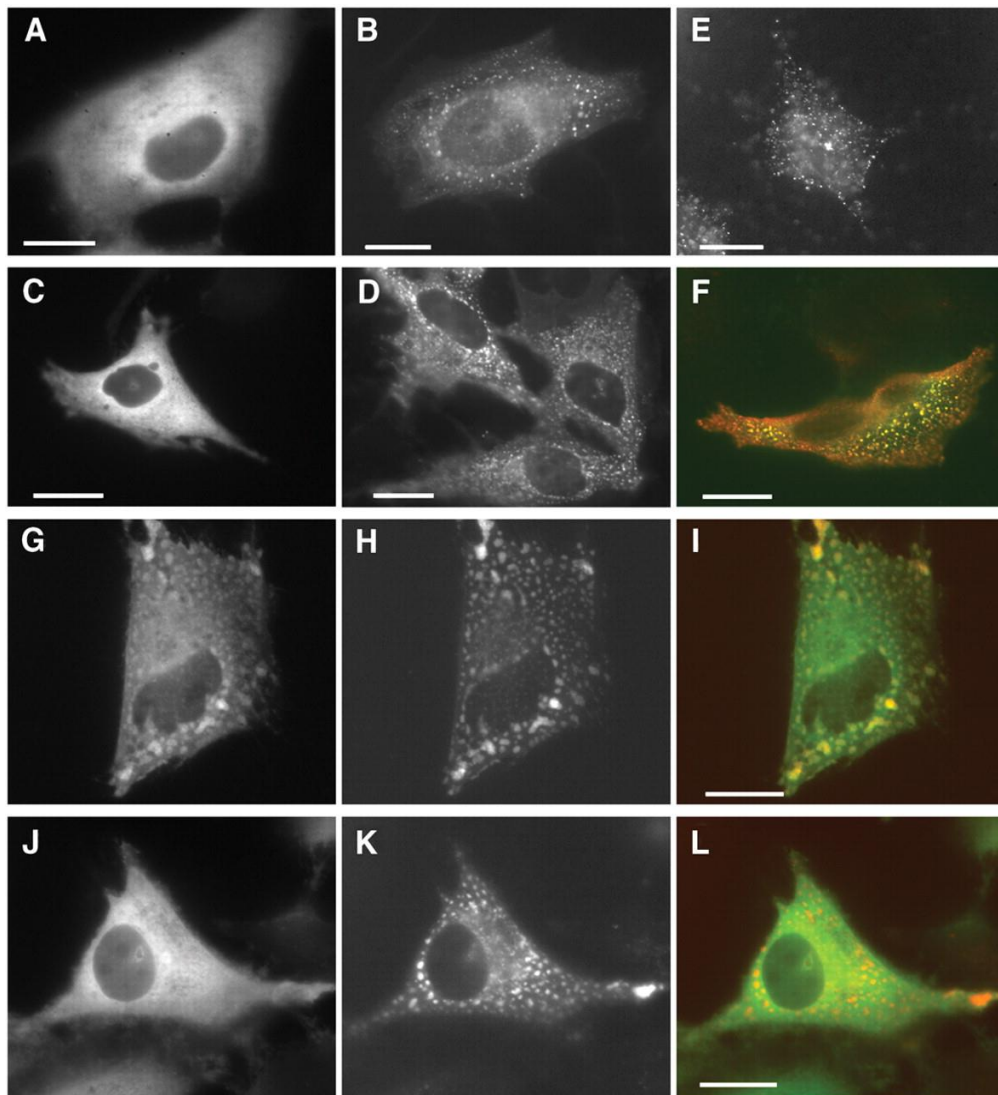


Obrázek č. 3.: Schéma šesti enzymů katalyzujících konverzi PRPP na IMP. Šipka naznačuje hypotetický metabolický tok meziprojektů skrze purinosom (převzato z Baresova et al., 2012 [24])

3.1. Objevení purinosomu

Teprve nedávno byla na základě studií *in vivo* potvrzena existence multienzymového komplexu proteinů DNPS – purinosomu. Poprvé byl popsán v cytoplasmě buněčných linií HeLa (buňky cervikálního karcinomu) a C3A (buňky hepatocelulárního karcinomu), které byly transientně transfekované fluorescenčně značenými DNPS proteiny [1]. Tyto proteiny vytvářely komplex, který reverzibilně a dynamicky reagoval na změny koncentrace purinů v médiu. Pokud byly transfekované buňky pěstovány v kultivačním médiu bohatém na puriny, zůstala jejich distribuce difúzní. V případě že byly tyto buňky pěstovány v médiu bez purinů, které byly odstraněny dialýzou přes 25 kDa membránu, začaly se proteiny v rozmezí 90 minut shlukovat do komplexů (obr. 3 a 4). Tato metoda detekce a zároveň existence purinosomu byla později zpochybněna popsáním agregátů, které obsahují proteiny DNPS a reagují na stres, který vzniká v důsledku nadprodukce transfekovaných proteinů [25]. Tvorba agregátů je podle autorů práce nejen závislá na koncentraci purinů v médiu, ale i na snížení nutriční hodnoty média bez purinů. Médium bez purinů připravené v původní studii An et al 2008 bylo prostřednictvím dialýzy proti 25 kDa membráně zbaveno i mnoha jiných složek než pouze purinů (o velikosti 100-500 Da) a množství séra bylo oproti médiu s puriny sníženo na polovinu. Podle Zhao et al 2014 nízká hladina purinů v médiu a omezená výživová schopnost v kombinaci s transfekcí proteinů indukuje stres, který vyvolává agregaci nadbytečných proteinů DNPS do struktur zvaných puncta, foci či stresová tělíska [25].

Dále byl purinosom studován pomocí imunodetekce endogenních enzymů DNPS specifickými protilátkami s využitím konfokální fluorescenční mikroskopie. Detekovány byly vždy dva rozdílné endogenní proteiny DNPS a vizualizovány druhově specifickými sekundárními protilátkami s odlišným fluoroforem. Po nasnímání vzorků byla v programu Huygens Professional provedena dekonvoluce obrazu a vypočítána kolokalizace proteinů. Tímto způsobem byla prokázána přítomnost purinosomu v HeLa buněčných liniích, v buněčných liniích lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2), v buňkách osteogenního sarkomu (Saos-2), v lidských embryonálních buňkách ledvin (HEK293), v lidských kožních fibroblastech (SF) a v primárních lidských keratocytech kultivovaných v médiu bez purinů [24].



Obrázek č. 4.: *Buněčná lokalizace enzymů účastnících se DNPS (převzato z An.,S et al, 2008 [1])*

(A – D) hTrifGART-GFP [(A) a (B)] a hFGAMS-GFP [(C) a (D)] přechodně exprimované v HeLa buňkách pěstovaných v médiu s puriny [(A) a (C)] a bez purinů [(B) a (D)] (E) Imunofluorescence endogenního proteinu hTrifGART exprimovaného v HeLa buňkách, které byly kultivovány v médiu bez purinů. (F) Překryv imunofluorescence proteinu hTrifGART-GFP (zelený) a endogenního proteinu hTrifGART (červený), které byly exprimovány v HeLa buňkách pěstovaných v médiu bez purinů. (G - I) Shluky hTrifGART-GFP [(G) a zelený v (I)] s hFGAMS-OFP [(H) a červený v (I)] v HeLa buňkách, které byly kultivovány v médiu bez purinů. (J - L) Kontrolní hC1THF-GFP [(J), zelený v (L)], který se přímo neúčastní DNPS, nevytváří shluky ani není lokalizován společně s hFGAMS-OFP [(K), červený v (L)] v HeLa buňkách, které byly kultivovány v médiu bez purinů. Měřítka: 10 μm .

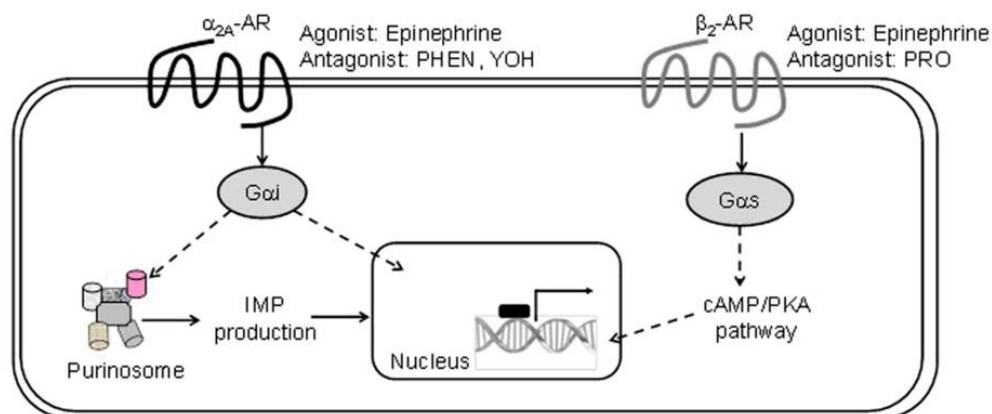
3.2. Regulace a interakce purinosomu

Cytoskeletární struktury hrají významnou roli v uspořádání enzymů do bílkovinných komplexů. Na základě výsledků fluorescenční zobrazovací techniky lze předpokládat, že se na utváření purinosomu a jeho umístění v cytoplazmě podílí mikrotubulová filamenta. Naproti tomu aktinová filamenta s purinosomem neinteragují [4]. Ošetření HeLa buněčných linií nocodazolem, který se váže na tubulin a brání tak jeho polymeraci, mělo za následek disociaci purinosomu. Zároveň došlo ke snížení metabolického toku skrze DNPS [4].

Kaseinové kinázy II (CK2) mají význam v různých buněčných procesech – ovlivňují především proliferaci buněk a jejich růst [26]. Použitím specifických inhibitorů CK2 bylo zjištěno, že několik efektorů lidských proteinových kináz ovlivňuje tvorbu purinosomu [2]. Většina inhibitorů CK2, např. 4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (TBI), 2-dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (DMAT), tetrabromoskořicová kyselina (TBCA) a kyselina ellagová, má na utváření enzymového komplexu stimulační účinky. Je známo, že inhibitory CK2, DMAT a 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB), indukují apoptózu, což se zdá být vhodnou metodou k zastavení růstu a dělení rakovinných buněk, které ve srovnání s buňkami zdravých jedinců obsahují zvýšené množství CK2 [27]. DMAT navíc vede k intracelulární produkci peroxidu vodíku (H_2O_2) a způsobuje tedy oxidativní stres a také dvouvláknové zlomy DNA [27,28]. Umlčením CK2 pomocí siRNA byla teorie o vlivu inhibice CK2 na formování purinosomu potvrzena. Zjištění, že inhibice CK2 pomocí TBB způsobí naopak disociaci purinosomu, je nicméně kontroverzní. Ačkoli víme, že CK2 a jimi zprostředkovaná signální kaskáda spouští asociaci či disociaci purinosomu, do dnešního dne není známo, zda jsou proteiny DNPS těmito kinázami skutečně fosforylovány [14].

Tvorba purinosomu může být regulována také membránovými receptory spřaženými s G-proteiny (GPCRs) [5]. Aktivace α_{2A} adrenergního receptoru a tedy aktivace G_{α_i} zprostředkované signální dráhy koreluje s formováním purinosomu (obr. 6). Tento mechanismus byl pozorován u několika endogenních G_{α_i} spřažených receptorů, jakými jsou např. purinergní P2Y receptory, LPA receptory a prostaglandinové receptory. G_{α_s} podjednotka β_2 adrenergního receptoru, která

ovlivňuje zejména aktivitu adenylát cyklázy, však tento účinek na sestavení purinosomu nemá [14]. Je známo, že GPCRs mají významnou roli při rozvoji rakoviny a šíření metastáz [29]. Proto lze předpokládat, že cílené působení na dynamiku purinosomu může ovlivňovat mitogenní GPCRs signalizace v rakovinných buňkách [5].

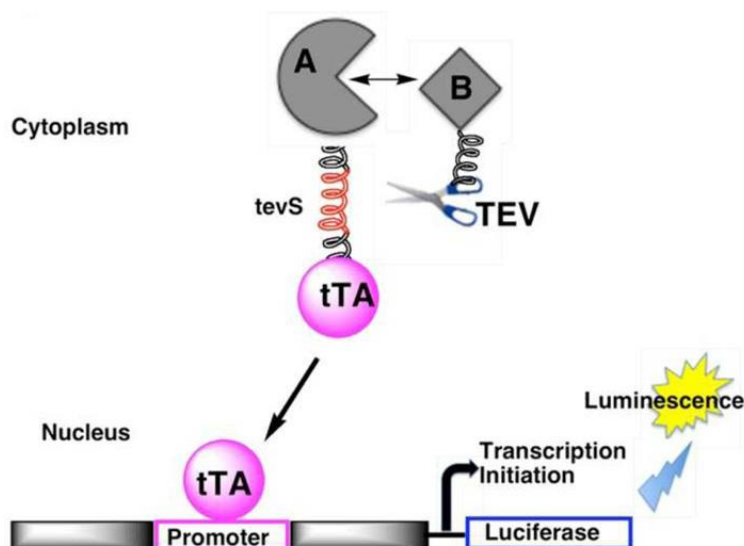


Obrázek č. 6.: Schéma α_{2A} a β_2 receptorů ve vztahu k sestavení purinosomu v HeLa buněčných liniích (převzato z Hong Zhao et al., 2013 [14])

Hmotnostní spektrometrií v kombinaci s fluorescenční mikroskopií bylo zjištěno, že s purinosomem reagují také chaperony Hsp90 a Hsp70 [3,14]. Použití různých inhibitorů Hsp90 a Hsp70 snižuje funkci těchto chaperonů a má za následek porušení tvorby purinosomu. Výsledky dále potvrdily, že inhibitory Hsp90 a Hsp70 synergicky posilují cytotoxický účinek methotrexátu, inhibitoru dihydrofolát reduktázy, která za normálních podmínek poskytuje folátové kofaktory enzymům účastnících se DNPS [30]. Tato skutečnost poskytuje purinosom jako možný cíl pro nová chemoterapeutika [14].

Pro detekci a kvantifikaci potenciálních protein-proteinových interakcí byla použita metoda využívající transkripční faktor navázaný na cílový protein skrze linker, který obsahuje sekvenci rozeznávanou specifickou virovou proteázou TEV, jež je spojena s jiným proteinem (obr. 5). Jestliže spolu proteiny interagují, TEV proteáza štěpí rozpoznávací místo na linkeru. Tím se uvolní transkripční faktor, který vstupuje

do jádra, kde aktivuje reportérový gen. Tímto způsobem byly detekovány interakce mezi šesti enzymy DNPS. Protože podstatou je interakce dvou proteinů, byla tato metoda nazvána Tango (z latinského tangere – dotýkat se) test [14,31].



Obrázek č. 5.: *Tango test detekující interakce mezi proteiny purinosomu* (převzato z Hong Zhao et al., 2013 [14])

A – cílový protein, B – interagující protein, TEV - virová proteáza, tevS – specifická sekvence linkeru rozeznávaná TEV proteázou, tTA – transkripční faktor

3.3. Propojení purinové biosyntézy a jiných metabolických drah

Foláty jsou kofaktory enzymů, které katalyzují chemické reakce v metabolismu purinových a pyrimidinových nukleotidů a aminokyselin. Kofaktory odvozené od tetrahydrofolátu jsou nezbytné pro aktivitu dvou enzymů DNPS – GART a AICART, které katalyzují připojení formylové skupiny k meziproductu. Tetrahydrofoláty jsou hydrogenované formy folátů. Mají důležitou roli v jednouhlíkatém metabolismu - působí jako donory či akceptory jednouhlíkatých funkčních skupin [6]. Antifoláty, jedny z prvních moderních chemoterapeutik, blokují dráhy folátového metabolismu a používají se tudíž jako protirakovinná činidla [32]. Enzym folátového metabolismu methenyltetrahydrofolát syntetáza, katalyzující přeměnu 5-

formyltetrahydrofolátu na 5, 10-methenyltetrahydrofolát, kolokalizuje s purinosomem [6] a je nezbytný pro metabolický tok skrze DNPS [14]. Nedostatečná aktivita enzymu MTHFS v *in vivo* experimentech na myších modelech vedla ke snížené syntéze purinů [6].

Rakovinné buňky nadměrně a rychle proliferují, k čemuž potřebují dostatek energie, kterou získávají štěpením glukózy. U nádorových buněk převažuje anaerobní glykolýza a výsledným produktem metabolismu glukózy je kyselina mléčná. Tento jev se nazývá po svém objeviteli Warburgův efekt [33,34]. Pyruvát kináza je enzym katalyzující poslední krok glykolýzy - vznik pyruvátu z fosfoenolpyruvátu. Onkofetální izoforma pyruvát kinázy (PKM2) je ve vysoké míře exprimována v zárodečných a rakovinných buňkách a má zásadní roli v jejich metabolickém přeprogramování a proliferaci [7]. Je alostericky regulována sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotidem (SAICAR), intermediátem purinové biosyntézy. Tato regulace umožňuje nádorovým buňkám v závislosti na dostupnosti živin a množství buněčné energie regulovat různé metabolické dráhy. Koncentrace SAICAR v buňce ovlivňuje nejen spotřebu a metabolismus glukózy, ale také růst a přežití rakovinných buněk. Při nedostatku glukózy dochází k akumulaci SAICAR, který stimuluje PKM2, a současně ke zvýšení purinové biosyntézy. To nasvědčuje možnému spojení DNPS a glykolýzy [7].

Dalším významným meziproductem DNPS, který má vliv na regulaci metabolismu, je aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid (AICAR) působící jako analog adenosinu [8]. AMP je aktivátor AMP kinázy, která má klíčovou úlohu v regulaci energetického metabolismu. AMPK funguje jako senzor stresu, který zvyšuje spotřebu ATP nebo inhibuje jeho produkci, čímž se mění poměr AMP:ATP. Tato změna aktivuje AMPK [35]. Dále je tento enzym regulován také řadou hormonů (např. leptinem, inzulínem či adiponektinem) a cytokinů (např. interleukinem-6) [36]. Vzhledem k tomu, že je AMPK aktivována také antidiabetickými léky jako je např. metformin, má tato kináza důležitou roli v rozvoji nových léčiv pro léčbu diabetu 2. typu [8]. Purinosom může skrze koncentraci AICAR ovlivňovat AMPK signalizaci a tím se podílet na energetické homeostáze [14].

Pro rychlé dělení rakovinných buněk je nezbytné jejich metabolické přeprogramování. Ačkoliv je glycin neesenciální aminokyselinou a může být tedy endogenně syntetizován, bylo zjištěno, že hladina glycinu a exprese enzymů jeho biosyntézy v mitochondriích nádorových buněk úzce souvisí s tempem proliferace těchto buněk [37]. Rychleji se dělící buňky potřebují mnohem více glycinu. Pomalu dělící se buňky ho naopak uvolňují. Značení glycinu izotopem uhlíku C¹³ ukázalo, že je v rychle se dělících buňkách inkorporován nejen do glutathionu, ale také do purinových nukleotidů, což svědčí o jeho podpůrné roli v DNPS [37]. Serin, prekurzor glycinu, působí jako alosterický aktivátor PKM2, jejíž exprese je v rakovinných buňkách zvýšena. Koncentrace serinu v nádorových buňkách tedy také může mít vliv na metabolismus purinů [38].

4. DEFEKTY ENZYMŮ PURINOVÉ DE *NOVO* SYNTÉZY

Za fyziologických podmínek jsou meziprodukty DNPS vzhledem ke svým cytotoxickým a regulačním vlastnostem přítomny v buněčných extraktech a v tělních tekutinách ve velmi nízkých nebo nedetekovatelných koncentracích [9]. Jsou známá dvě neurologická onemocnění, která vyplývají z genetických defektů DNPS - AICA-ribosidurie [39] a deficit adenylosukcinátlyázy [40,41].

4.1. AICA-ribosidurie

ATIC je bifunkční enzym katalyzující poslední dva kroky DNPS. Má dvojí aktivitu - aminoimidazolkarboxamid ribonukleotid transformylázovou a inosinmonofosfát cyklohydrolázovou. Může se vyskytovat jako monomer či dimer, přičemž AICART (C-terminální doména) má katalytickou aktivitu ve formě dimerní, zatímco IMPCH (N-terminální doména) je katalyticky aktivní v obou podobách s tím, že mírně preferuje formu dimerní [42]. AICART katalyzuje přenos formylové skupiny z redukovaného folátového substrátu 10-formyl-tetrahydrofolátu (10-f-THF) na AICAR a vzniká tak formylaminoimidazolkarboxamid ribonukleotid (FAICAR). Otevřený pyrimidinový kruh vytvořeného meziprojektu uzavírá za tvorby IMP enzym IMPCH [42].

Onemocnění způsobené mutací v genu pro ATIC se nazývá AICA-ribosidurie. Dosud byla tato vzácná metabolická porucha identifikována u jediné pacientky [39]. AICA-ribosidurie se projevuje hromaděním aminoimidazolkarboxamid ribosidu (AICAr), který vzniká defosforylací AICAR, jenž je substrátem enzymu ATIC. Stejně tak dochází v tělních tekutinách k akumulaci sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribosidu (SAICAr) a sukcinyladenosinu (S-Ado), což jsou defosforylované substráty enzymu ADSL. Tento enzym je hromadícím se AICAr inhibován, což je zřejmě důsledek zvýšené koncentrace jeho substrátů [9]. Ukázalo se, že se v pacientčinyých erythrocytech ukládá také AICAR, který pravděpodobně vzniká fosforylací cirkulujícího AICAr adenosin kinázou, dále také jeho difosfát (AICARDP) a trifosfát (AICARTP). Koncentrace AICARTP výrazně

převyšovala koncentraci ATP, což by mohlo být vysvětleno jeho využitím v procesech fosforylace AICAR na AICARDP a následně na AICARTP [39].

Zvýšená koncentrace AICAr, avšak řádově nižší než u pacientky s AICA-ribosidurií, se vyskytuje také u dětí s akutní leukémií [39,43] a též u jedinců s deficitem HGPRT [39,44,45], přičemž nadměrná exkrece AICAr může být vysvětlena zvýšenou DNPS [39]. Vyšší hladina AICAr bývá naměřena v moči člověka trpícího nedostatkem vitamínu B12 a kyseliny listové, kdy dochází k oslabení aktivity AICART v důsledku nedostatku folátového kofaktoru. I u těchto případů je však koncentrace AICAr řádově nižší než u pacienta s AICA-ribosidurií [39].

4.1.1. Genotyp

Gen *ATIC* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 2, je dlouhý téměř 38 kb, obsahuje 16 exonů a kóduje protein o velikosti 591 aminokyselin [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/471>]. Sangerovým sekvenováním byla u pacientky identifikována na jedné alele posunová mutace zapříčiněná duplikací a delecí v exonu 2. Tato mutace, která způsobuje nestabilitu mRNA, byla identifikována i v DNA matky. Na druhé alele, došlo v exonu 13 k substituci adeninu za guanin, čímž došlo ke změně aminokyselinového složení výsledného proteinu K426R. Tato mutace byla zjištěna také u otce pacientky [39].

4.1.2. Fenotyp

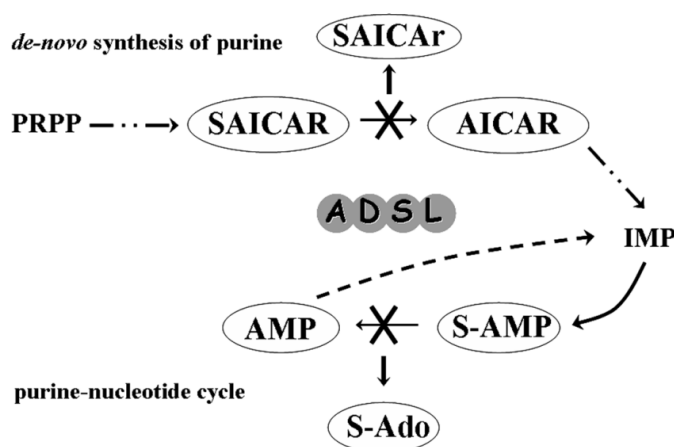
U postiženého dítěte se po narození projevila hypotonie, hypoglykemie a hyponatremie, srdeční šelest, později se začala projevovat psychomotorická retardace a dílčí okcipitální epileptické záchvaty. V půl roce byla pacientce diagnostikována vrozená slepota a v roce se začaly rozvíjet chorioretinální léze spolu s oční atrofií a patrnou pravou esotropií. Výrazným fenotypovým projevem byly dysmorfické rysy – prominentní čelo, brachycefalie, metopismus, široká ústa s úzkým

horním rtem, nízko posazené uši a nápadný klitoris v důsledku splynutí malých stydkých pysků [39].

4.2. Deficit ADSL

ADSL je jediný enzym DNPS, který katalyzuje reakce dvou odlišných metabolických drah – přeměnu SAICAR na AICAR v DNPS a vznik AMP z S-AMP v cyklu purinových nukleotidů. Enzym má jedno aktivní místo, kam se váže jak SAICAR, tak i S-AMP [46].

V roce 1984 byl na základě vyšetření mozkomíšního moku dětí s psychomotorickou retardací poprvé popsán deficit ADSL [47]. Jedná se o poruchu purinového metabolismu s různými klinickými příznaky, která postihuje pacienty nejen po stránce biochemické, ale ovlivňuje také jejich chování [10]. V tělních tekutinách postižených jedinců se hromadí defosforylované substráty ADSL – SAICAr a S-Ado, což svědčí o deficitu tohoto enzymu [47] (obr. 7).



Obrázek č. 7: Schéma působení enzymu ADSL v DNPS a v purin - nukleotidovém cyklu (PNC). Odpovídající enzymové defekty jsou znázorněny překříženou šipkou a alternativní metabolickou dráhou vedoucí k ukládání SAICAr a S-Ado (převzato z Zikanova et al., 2010 [48])

Dosud bylo celosvětově diagnostikováno téměř 80 pacientů trpících tímto onemocněním [<http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/adsl>]. Naprostá absence aktivity ADSL

není pravděpodobně slučitelná se životem, neboť u žádného postiženého jedince nebyla naměřena její nulová aktivita [40,41].

4.2.1. Genotyp

Gen *ADSL* umístěný na dlouhém raménku chromozomu 22 je dlouhý 23 kb, obsahuje 13 exonů a kóduje protein o velikosti 484 aminokyselin [49-52]. Mutace v genu *ADSL* jsou kromě pár výjimek substituční bodové, s různým dopadem na reziduální aktivitu enzymu *ADSL*, která koreluje se závažností fenotypu [53]. Mapováním 5' nepřekládané oblasti genu *ADSL* byla zjištěna mutace ve vazebném místě pro transkripční aktivátor NRF-2 [51]. Byla též identifikována mutace, která mění sestřihové místo, čímž dochází k delecí 39 párů bází [54]. Dědičnost je autosomálně recesivní, většina postižených jsou složení heterozygoti. Nejčastější mutací je záměna R426H, která se vyskytuje jak v homozygotním, tak v heterozytním stavu [53].

4.2.2. Fenotyp

Deficit *ADSL* má různé klinické projevy, které se obvykle rozvíjejí během prvních měsíců života. U většiny postižených porucha vede k různému stupni psychomotorické retardace (PMR), hypotonii, svalové atrofii, poruchám růstu, objevují se autistické rysy (neklid, absence očního kontaktu, záchvaty vzteku, autoagrese aj.) a epileptické záchvaty [55]. Korelace mezi genotypem a fenotypem zatím nebyla prokázána, je však známo, že míra závažnosti PMR koreluje s poměrem koncentrací substrátů S-Ado a SAICAr v mozkomíšním moku [16,56]. Podle rozsahu postižení jsou rozlišovány tři typy deficitu *ADSL*. Prvním typem je neonatální forma, pro kterou je charakteristická plicní hypoplázie, neonatální encefalopatie, prenatální hyperkineze a zástava růstu. V tomto případě je poměr koncentrací S-Ado/SAICAr menší než 1 [56]. Druhým typem je těžká dětská forma, mezi jejíž příznaky patří zejména těžká PMR a vývojové zpoždění. Poměr koncentrací S-Ado/SAICAr je u pacientů s tímto typem onemocnění okolo 1 [57,56]. Posledním typem je střední až lehká forma, pro kterou je příznačná přítomnost PMR, autismus a hypotonie. U jedinců s touto formou je poměr koncentrací S-Ado/SAICAr větší než 2 [56,58,59].

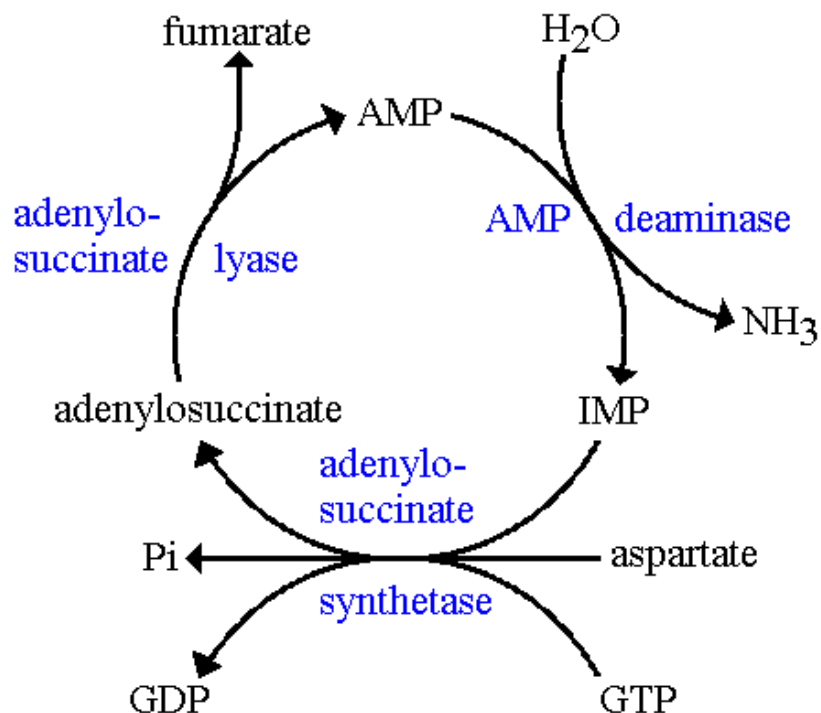
4.2.3. Patogeneze a léčba onemocnění

Patogeneze onemocnění může vyplývat z nedostatku purinových nukleotidů, z toxicity hromadících se substrátů ADSL či z poškození purin – nukleotidového cyklu [10,60]. Mechanismus a příčina vzniku nemoci tedy nejsou jednoznačné.

Jestliže uvažujeme o snížené dostupnosti nukleotidů, očekáváme u pacientů nízkou koncentraci purinů. Je však zajímavé, že ve vzorcích jater, ledvin a svalů postižených jedinců byly naměřeny normální koncentrace adeninových a guaninových nukleotidů [10,61]. Je možné, že je defekt ADSL v těchto tkáních kompenzován dodáním purinů syntetizovaných recyklační dráhou [10,55].

Pokud se přikláníme k hypotéze vysvětlující symptomy deficitu ADSL toxickým působením hromadících se sukcinylpurinů, nabízí se vzhledem ke strukturální podobnosti SAICAr a S-Ado s adenosinem možnost jejich interakce s adenosinovými receptory a zpětné vychytávání adenosinu [10,62]. Tato teorie však nebyla potvrzena na zvířecím modelu, kde byla studována membránová frakce mozkové kůry krys [10,63]. Na základě porovnání poměrů koncentrací S-Ado/SAICAr ve spojení s klinickými projevy u jednotlivých typů dADSL a dle zjištění, že krysám podaná infúze SAICAr poškozuje neurony [64], lze usuzovat, že SAICAr má účinky toxické, před kterými naopak S-Ado buňku chrání [10].

PNC se označuje funkční proteinový komplex složený ze tří enzymů purinového metabolismu – adenylosukcinát syntetázy, ADSL a AMP deaminázy. Tento cyklus přeměňuje IMP na AMP přes S-AMP a pak zpět na IMP. Zároveň dochází k produkci amoniaku (NH_3) a fumarátu. PNC je velmi aktivní ve svalech a má tedy zřejmě určitý význam v patogenezi svalové slabosti a opožděného růstového vývoje postižených jedinců [65].



Obrázek č. 8.: Purin – nukleotidový cyklus (převzato z <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/muscle/>)

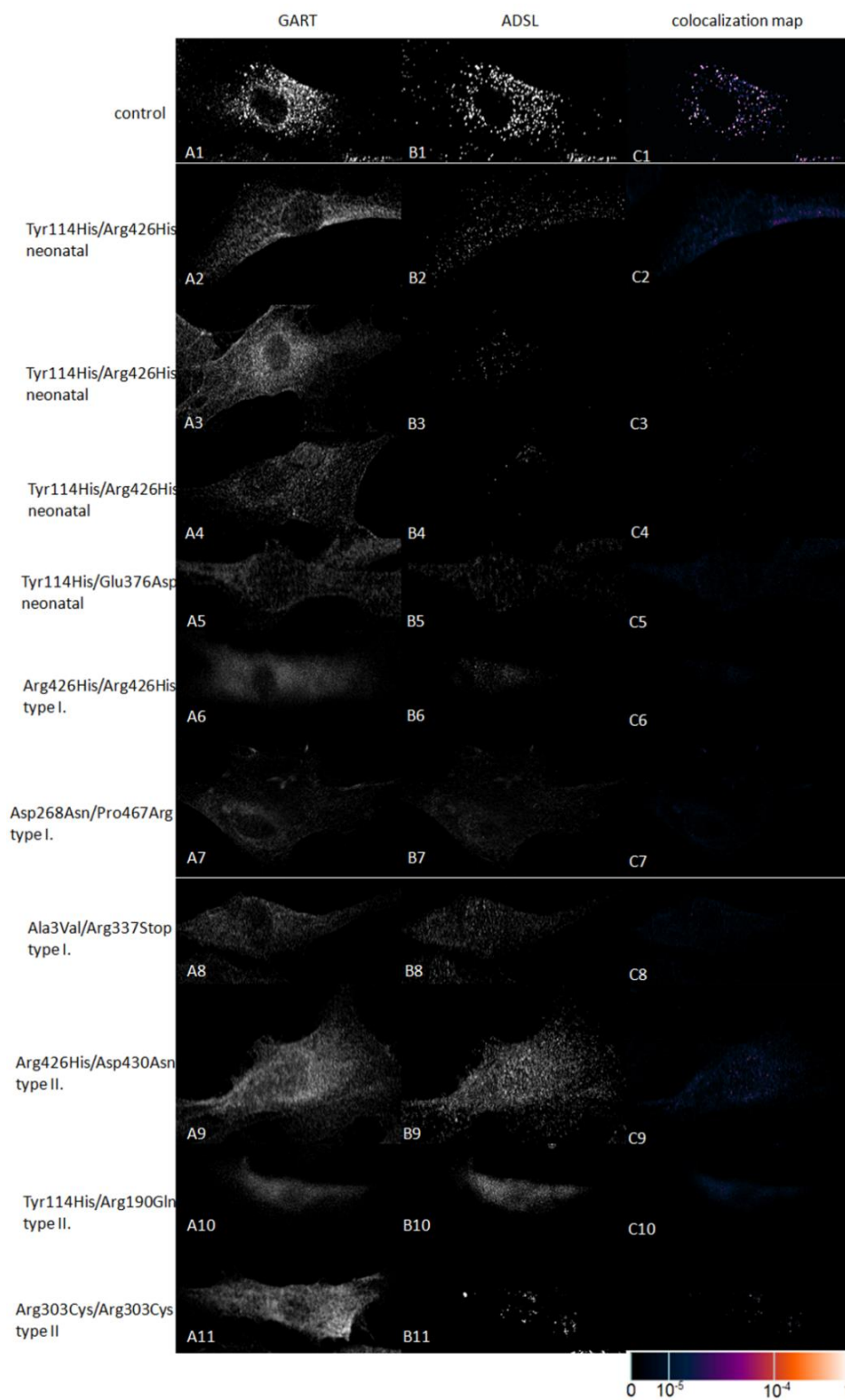
V současné době neexistuje způsob léčby, pacienti mohou podstupovat pouze terapii symptomatickou. Čtyřem pacientům byl orálně podáván adenin (10 mg/kg denně) a allopurinol (5-10 mg/kg denně), který brání oxidaci adeninu na 2,8-dihydroxyadenin [67]. Tato terapie trvala několik měsíců, avšak kromě urychlení růstu nebylo pozorováno jakékoliv další klinické nebo biochemické zlepšení [16]. Jinou poměrně levnou a jednoduchou terapií je podávání D-ribózy, která je v organismu ihned fosforylována na ribózu-5-fosfát [66,70]. Ta je dále přeměněna na PRPP –stimulátor DNPS a v pentózofosfátovém cyklu na glukózu [67]. Přesto však dochází k trvalému snížení glykemie, zřejmě v důsledku inhibice fosfoglukomutázy D-ribózou [67,68]. Tato terapie byla poprvé vyzkoušena u 13-ti letého pacienta a vedla k mírnému zlepšení projevů autistického chování a k postupnému snižování frekvence epileptických záchvatů [67,69]. Podávání ribózy u dalších čtyř pacientů ovšem nemělo žádný pozitivní efekt [70].

4.3. Purinosom při defektech DNPS

Pro zjištění zda mutace ATIC a ADSL ovlivňují formování purinosomu skrze endogenní enzymy DNPS byla sledována tvorba purinosomu v kožních fibroblastech jediného pacienta s AICA-ribosidurií a 9 pacientů se všemi typy dADSL. Dále bylo zkoumáno, do jaké míry koreluje proces formování tohoto enzymového komplexu s fenotypem pacientů s dADSL [24].

V kožních fibroblastech získaných od pacienta s AICA-ribosidurií byla v médiu s puriny dle předpokladu pozorována difúzní exprese proteinů ADSL, PPAT a GART, přičemž intenzita zbarvení byla srovnatelná s kontrolními fibroblasty. Protein ATIC byl téměř nedetekovatelný. V médiu bez purinů byla také pozorována difúzní exprese proteinů, nebyla tedy pozorována jejich kolokalizace, což naznačuje, že nedochází k tvorbě purinosomů [24].

Pokud byly dADSL fibroblasty pěstovány v médiu s puriny, zůstaly všechny testované proteiny stejně jako u AICA-ribosidurie difúzní. Signál proteinu ADSL pozorovaný v kožních fibroblastech pacientů s neonatální formou dADSL byl téměř nedetekovatelný a u jedinců s typem onemocnění I snížený. Ve fibroblastech pacientů s dADSL typu II intenzita signálu odpovídala kontrolním fibroblastům. V médiu bez purinů byla ve fibroblastech pacientů s dADSL typu II pozorována mírná agregace proteinu ADSL, u těžších forem také vzhledem k redukci množství proteinu nebyla agregace pozorována. U všech buněk jedinců s neonatální formou i typem onemocnění I a také u jednoho pacienta s formou II proteiny ADSL a ATIC, GART a ADSL, PPAT a ATIC nekolokalizovaly. Nebylo tedy pozorováno formování purinosomu. U dvou buněčných linií pacientů s formou onemocnění II byla zjištěna agregace s kolokalizací proteinů a tedy tvorba purinosomu, ale v podstatně nižší míře než v kontrolních buňkách (obr. 9). Závěrem lze konstatovat, že byla nalezena korelace mezi schopností formovat purinosom a závažností onemocnění [24].



Obrázek č. 9.: *Expres GART a ADSL a formování purinosomu v kožních fibroblastech pacientů s dADSL. Fibroblasty byly kultivovány v médiu bez purinů. (převzato z Baresova et al., 2012) [24]*

5. ZÁVĚR

Je nesporné, že díky objevení purinosomu byla lépe pochopena a popsána biosyntéza purinů a její regulace, katabolismus purinových nukleotidů a recyklační dráhy. Podrobné studium formování a dynamiky purinosomu a identifikace molekulárních změn spojených s tvorbou purinosomu za fyziologických i patologických stavů by v budoucnu mohlo otevřít další možnosti rozvoje léčiv, zejména chemoterapeutik, a přinést nové využití purinových antimetabolitů, které na základě strukturální podobnosti blokují enzymy účastnící se DNPS. Dalším z přínosů zkoumání purinosomu je odhalení, že jeho formování je porušeno u onemocnění způsobených vrozenými defekty v enzimech DNPS.

Úplnou funkci purinosomu a jeho vliv na různé buněčné procesy je třeba ještě objasnit stejně tak jako spojitost jeho asociace a disociace s regulací energetických a látkových přeměn. Dále zůstává nezodpovězená řada otázek týkajících se posttranslačních úprav proteinů purinové syntézy. Doposud se nikdo nezabýval postranslačními modifikacemi a jejich funkcí u konkrétních enzymů DNPS, pouze u nich byla na základě aminokyselinové sekvence či hmotnostní spektrometrie identifikována možná místa pro postranslační úpravy [<http://www.uniprot.org/>, <http://www.phosida.com/>, <http://www.ubpred.org/cgi-bin/ubpred/ubpred.cgi>]. Jelikož postranslační modifikace mění konformaci proteinů, jejich funkci a vlastnosti, lze očekávat, že v případě enzymů DNPS budou ovlivňovat např. schopnost být součástí purinosomu, jeho lokalizaci v buňce a interakce s jinými enzymy DNPS. K detailnějšímu výzkumu struktury purinosomu je možno využít metody analytické (např. rentgenová krystalografie, hmotnostní spektrometrie), fyzikálně – chemické (např. spektroskopie nukleární magnetické resonance) a mikroskopické.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. An, S., et al., *Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells*. Science, 2008. **320**(5872): p. 103-6.
2. An, S., et al., *Dynamic regulation of a metabolic multi-enzyme complex by protein kinase CK2*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11093-9.
3. French, J.B., et al., *Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(7): p. 2528-33.
4. An, S., et al., *Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(29): p. 12872-6.
5. Verrier, F., et al., *GPCRs regulate the assembly of a multienzyme complex for purine biosynthesis*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(12): p. 909-15.
6. Field, M.S., D.D. Anderson, and P.J. Stover, *Mthfs is an Essential Gene in Mice and a Component of the Purinosome*. Front Genet, 2011. **2**: p. 36.
7. Keller, K.E., I.S. Tan, and Y.S. Lee, *SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions*. Science, 2012. **338**(6110): p. 1069-72.
8. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
9. Sabina, R.L., et al., *Metabolism of 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in cardiac and skeletal muscle. Effects on purine nucleotide synthesis*. J Biol Chem, 1982. **257**(17): p. 10178-83.
10. Spiegel, E.K., R.F. Colman, and D. Patterson, *Adenylosuccinate lyase deficiency*. Mol Genet Metab, 2006. **89**(1-2): p. 19-31.
11. Brosh, S., et al., *De novo purine synthesis in skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 1982. **714**(1): p. 181-3.
12. Watts, R.W., *Some regulatory and integrative aspects of purine nucleotide biosynthesis and its control: an overview*. Adv Enzyme Regul, 1983. **21**: p. 33-51.
13. Murray, A.W., *The biological significance of purine salvage*. Annu Rev Biochem, 1971. **40**: p. 811-26.
14. Zhao, H., et al., *The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans*. Chem Commun (Camb), 2013.
15. Lee, I.R., et al., *Characterization of the complete uric acid degradation pathway in the fungal pathogen Cryptococcus neoformans*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64292.
16. Jaeken, J., et al., *Adenylosuccinase deficiency: an inborn error of purine nucleotide synthesis*. Eur J Pediatr, 1988. **148**(2): p. 126-31.
17. Becker, M.A. and M. Kim, *Regulation of purine synthesis de novo in human fibroblasts by purine nucleotides and phosphoribosylpyrophosphate*. J Biol Chem, 1987. **262**(30): p. 14531-7.
18. Hershfield, M.S. and J.E. Seegmiller, *Regulation of de novo purine biosynthesis in human lymphoblasts. Coordinate control of proximal (rate-determining) steps and the inosinic acid branch point*. J Biol Chem, 1976. **251**(23): p. 7348-54.
19. Welin, M., et al., *Substrate specificity and oligomerization of human GMP synthetase*. J Mol Biol, 2013. **425**(22): p. 4323-33.
20. Yamaoka, T., et al., *Feedback inhibition of amidophosphoribosyltransferase regulates the rate of cell growth via purine nucleotide, DNA, and protein syntheses*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21285-91.

21. Yamaoka, T., et al., *Amidophosphoribosyltransferase limits the rate of cell growth-linked de novo purine biosynthesis in the presence of constant capacity of salvage purine biosynthesis*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17719-25.
22. Kaminosono, S., et al., *Suppression of mutant Huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability*. J Neurosci, 2008. **28**(35): p. 8747-55.
23. Schendel, F.J., et al., *Characterization and chemical properties of phosphoribosylamine, an unstable intermediate in the de novo purine biosynthetic pathway*. Biochemistry, 1988. **27**(7): p. 2614-23.
24. Baresova, V., 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, 2012. **21**(7): p. 1534-43.
25. Zhao, A., et al., *Revisiting and revising the purinosome*. Mol Biosyst, 2014. **10**(3): p. 369-74.
26. Ahmad, K.A., et al., *Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis*. Adv Enzyme Regul, 2008. **48**: p. 179-87.
27. Schneider, C.C., et al., *DMAT, an inhibitor of protein kinase CK2 induces reactive oxygen species and DNA double strand breaks*. Oncol Rep, 2009. **21**(6): p. 1593-7.
28. Ahmad, K.A., G. Wang, and K. Ahmed, *Intracellular hydrogen peroxide production is an upstream event in apoptosis induced by down-regulation of casein kinase 2 in prostate cancer cells*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(5): p. 331-8.
29. Lappano, R. and M. Maggiolini, *G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(1): p. 47-60.
30. Allegra, C.J., et al., *Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate*. J Biol Chem, 1987. **262**(28): p. 13520-6.
31. Barnea, G., et al., *The genetic design of signaling cascades to record receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 64-9.
32. McGuire, J.J., *Anticancer antifolates: current status and future directions*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(31): p. 2593-613.
33. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
34. Kim, J.W. and C.V. Dang, *Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 8927-30.
35. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 251-62.
36. Kola, B., et al., *Expanding role of AMPK in endocrinology*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(5): p. 205-15.
37. Jain, M., et al., *Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation*. Science, 2012. **336**(6084): p. 1040-4.
38. Chaneton, B., et al., *Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 458-62.
39. Marie, S., et al., *AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(6): p. 1276-81.
40. Van den Bergh, F., et al., *Functional studies in fibroblasts of adenylosuccinase-deficient children*. J Inherit Metab Dis, 1993. **16**(2): p. 425-34.
41. Van den Bergh, F., et al., *Residual adenylosuccinase activities in fibroblasts of adenylosuccinase-deficient children: parallel deficiency with adenylosuccinate and succinyl-AICAR in profoundly retarded patients and non-parallel deficiency in a mildly retarded girl*. J Inherit Metab Dis, 1993. **16**(2): p. 415-24.

42. Vergis, J.M., et al., *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, 2001. **276**(11): p. 7727-33.
43. Lulenski, G., M. Donaldson, and D. Newcombe, *Urinary aminoimidazolecarboxamide levels in children with acute leukemia.* Pediatrics, 1970. **45**(6): p. 983-95.
44. Newcombe, D.S., *The urinary excretion of aminoimidazolecarboxamide in the Lesch-Nyhan syndrome.* Pediatrics, 1970. **46**(4): p. 508-12.
45. Sweetman, L. and W.L. Nyhan, *Detailed comparison of the urinary excretion of purines in a patient with the Lesch-Nyhan syndrome and a control subject.* Biochem Med, 1971. **4**(2): p. 121-34.
46. Stone, R.L., H. Zalkin, and J.E. Dixon, *Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase.* J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19710-6.
47. Jaeken, J. and G. Van den Berghe, *An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids.* Lancet, 1984. **2**(8411): p. 1058-61.
48. Zikanova, M., et al., *Biochemical and structural analysis of 14 mutant adsl enzyme complexes and correlation to phenotypic heterogeneity of adenylosuccinate lyase deficiency.* Hum Mutat, 2010. **31**(4): p. 445-55.
49. Delattre, O., et al., *Mapping of human chromosome 22 with a panel of somatic cell hybrids.* Genomics, 1991. **9**(4): p. 721-7.
50. Fon, E.A., et al., *Mapping of the human adenylosuccinate lyase (ADSL) gene to chromosome 22q13.1-->q13.2.* Cytogenet Cell Genet, 1993. **64**(3-4): p. 201-3.
51. Kmoch, S., et al., *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, 2000. **9**(10): p. 1501-13.
52. Van Keuren, M.L., et al., *A somatic cell hybrid with a single human chromosome 22 corrects the defect in the CHO mutant (Ade-I) lacking adenylosuccinase activity.* Cytogenet Cell Genet, 1987. **44**(2-3): p. 142-7.
53. Marie, S., et al., *Mutation of a nuclear respiratory factor 2 binding site in the 5' untranslated region of the ADSL gene in three patients with adenylosuccinate lyase deficiency.* Am J Hum Genet, 2002. **71**(1): p. 14-21.
54. Marie, S., et al., *Mutation analysis in adenylosuccinate lyase deficiency: eight novel mutations in the re-evaluated full ADSL coding sequence.* Hum Mutat, 1999. **13**(3): p. 197-202.
55. Van den Berghe, G., M.F. Vincent, and J. Jaeken, *Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency.* J Inherit Metab Dis, 1997. **20**(2): p. 193-202.
56. Mouchehgh, K., et al., *Lethal fetal and early neonatal presentation of adenylosuccinate lyase deficiency: observation of 6 patients in 4 families.* J Pediatr, 2007. **150**(1): p. 57-61 e2.
57. Maaswinkel-Mooij, P.D., et al., *Adenylosuccinase deficiency presenting with epilepsy in early infancy.* J Inherit Metab Dis, 1997. **20**(4): p. 606-7.
58. Krijt, J., et al., *Identification and determination of succinyladenosine in human cerebrospinal fluid.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. **726**(1-2): p. 53-8.
59. Valik, D., P.T. Miner, and J.D. Jones, *First U.S. case of adenylosuccinate lyase deficiency with severe hypotonia.* Pediatr Neurol, 1997. **16**(3): p. 252-5.
60. Ciardo, F., C. Salerno, and P. Curatolo, *Neurologic aspects of adenylosuccinate lyase deficiency.* J Child Neurol, 2001. **16**(5): p. 301-8.
61. Van den Berghe, G. and J. Jaeken, *Adenylosuccinase deficiency.* Adv Exp Med Biol, 1986. **195 Pt A**: p. 27-33.

62. De Volder, A.G., et al., *Regional brain glucose utilization in adenylosuccinase-deficient patients measured by positron emission tomography*. *Pediatr Res*, 1988. **24**(2): p. 238-42.
 63. Vincent, M.F. and G. Van den Berghe, *Influence of succinylpurines on the binding of adenosine to a particulate fraction of rat cerebral cortex*. *Adv Exp Med Biol*, 1989. **253B**: p. 441-5.
 64. Stone, T.W., et al., *Succinylpurines induce neuronal damage in the rat brain*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **431**: p. 185-9.
 65. Van den Berghe, G., et al., *The purine nucleotide cycle and its molecular defects*. *Prog Neurobiol*, 1992. **39**(5): p. 547-61.
 66. Segal, S. and J. Foley, *The metabolism of D-ribose in man*. *J Clin Invest*, 1958. **37**(5): p. 719-35.
 67. Salerno, C., et al., *Effect of D-ribose on purine synthesis and neurological symptoms in a patient with adenylosuccinase deficiency*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1453**(1): p. 135-40.
 68. Gross, M. and N. Zollner, *Serum levels of glucose, insulin, and C-peptide during long-term D-ribose administration in man*. *Klin Wochenschr*, 1991. **69**(1): p. 31-6.
 69. Salerno, C., et al., *Effect of D-ribose administration to a patient with inherited deficit of adenylosuccinase*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **431**: p. 177-80.
 70. Jurecka, A., et al., *D-ribose therapy in four Polish patients with adenylosuccinate lyase deficiency: absence of positive effect*. *J Inherit Metab Dis*, 2008. **31 Suppl 2**: p. S329-32.
-

Původní zdroje jsou označeny tučným písmem.