

## UV SPEKTRÁLNÍ A ELEKTRO-MIGRAČNÍ CHARAKTERISTIKY IMIDAZOLOVÝCH RIBOSIDŮ

PETRA VYSKOČILOVÁ<sup>a,b\*</sup>, PETR HORNÍK<sup>a,b</sup>,  
DAVID FRIEDECKÝ<sup>a</sup> a TOMÁŠ ADAM<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie FN Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, <sup>b</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc  
petrvyskocil@centrum.cz

Došlo 23.6.05, přepracováno 18.9.06, přijato 9.11.06.

Klíčová slova: purinová *de novo* syntéza, imidazolové ribosidy, efektivní elektroforetická pohyblivost, UV spektra, kapilární elektroforéza

### Úvod

Dědičné metabolické poruchy patří k velmi závažným onemocněním. Při chybné sekvenci DNA kódující určitý enzym se snižují jeho katalytické vlastnosti. To má za následek akumulaci substrátu enzymové reakce. Substrát může být pro buňku toxický, a proto se jej snaží eliminovat. Purinová *de novo* syntéza (PDNS) je metabolickou dráhou vedoucí ke vzniku purinových nukleotidů z fosforibosyldifosfátu. Probíhá v deseti stupních, jejichž konečným meziproduktem je inosinmonofosfát (Schéma 1). V současné době jsou známy pouze tři enzymové defekty v metabolické dráze PDNS. Superaktivita regulačního enzymu – fosforibosylpyrofosfátsynthetasy<sup>1</sup> – se projevuje nadměrnou produkcí kyseliny močové. Deficit bifunkční adenylosukcinátlyasy<sup>2</sup> (katalyzuje osmý stupeň PDNS a dále konverzi sukcinyladenosinmonofosfátu na AMP) se projevuje intracelulární akumulací [5-amino-4-(aspartát-*N*-karbamoyl)imidazol]ribotidu (SAICAR) a také sukcinyladenosinmonofosfátu. Odpovídající ribosidy [5-amino-4-(aspartát-*N*-karbamoyl)imidazol]ribosid (SAICAR) a sukcinyladenosin jsou jako metabolity vylučovány do tělních tekutin. Nedávno bylo objeveno<sup>3</sup>, že akumulace (5-amino-4-karbamoylimidazol)ribotidu (AICAR) v buňkách a příslušného ribosidu (AICAR) v tělních tekutinách je projevem defektu AICAR-transformylasy. Diagnostika metabolických defektů purinového a pyrimidinového metabolismu se provádí technikami vysokoúčinné kapalinové chro-

matografie (HPLC) nebo kapilární elektroforézy (CE).

Z analogie s doposud rozpoznávanými defekty PDNS lze předpokládat, že v případě defektu PDNS akumulované substráty prostupují přes buněčnou membránu jako ribosidy. Detekce těchto látek v tělních tekutinách slouží k jejich diagnostice. V této práci je popsána syntéza, čištění, základní elektromigrační a spektrální vlastnosti imidazolových ribosidů – defosforylovaných meziproductů PDNS. Tyto látky obsahují imidazolový kruh, což umožňuje provádět jejich identifikaci na základě absorpce záření v UV oblasti.

### Materiál a metody

#### Příprava a čištění ribosidů

Všechny ribosidy s výjimkou SAICAr byly připraveny chemicky, analogicky k popsaným syntézám ribotidů a analyzovány kapilární elektroforézou.

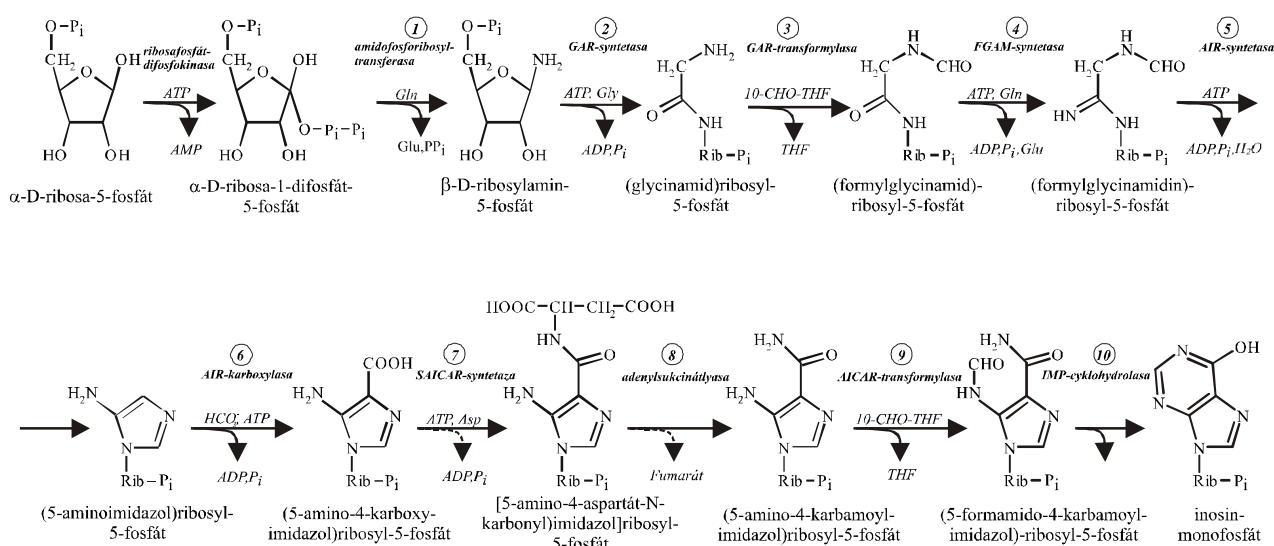
(5-Aminoimidazol)ribosid (AIR), odpovídající defosforylovanému šestému meziproductu PDNS, byl připraven z komerčně dostupného AICAr (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada) alkalickou hydrolyzou a následnou dekarboxylací<sup>4</sup>. 1 g AICAr byl zahříván v 6 mol l<sup>-1</sup> NaOH. Směs byla poté ochlazena a pH bylo nastaveno na 4,7 ledovou kyselinou octovou. Spontánní dekarboxylace probíhala za probublávání argonem po dobu 18 hodin. Po odpaření na rotační vakuové odparce byl vzorek uložen do exsikátoru. Výtěžek syntézy byl 80 %.

(5-Amino-4-karboxyimidazol)ribosid (CAIR), odpovídající sedmému defosforylovanému meziproductu PDNS, byl připraven alkalickou hydrolyzou<sup>5</sup> jako AIR. Produkt sirupovité konzistence byl opakovaně rozetřen a dekantován nejprve s ethanolem a následně s methanolem. Hnědý pevný produkt byl uložen do exsikátoru. Výtěžek provedené reakce byl 99 %.

[5-Amino-4-(aspartát-*N*-karbamoyl)imidazol]ribosid (SAICAr) byl připraven enzymaticky s použitím rekombinantní adenylosukcinátlyasy<sup>6</sup>. Autoři děkují Dr. J. Krijtovi a M. Zikánové (Ústav dědičných metabolických poruch v Praze, Všeobecná fakultní nemocnice Praha) za poskytnutí této látky.

Syntéza (5-formamido-4-karbamoylimidazol)ribosidu (FAICAr), odpovídajícího předposlednímu defosforylovanému intermediátu PDNS, byla popsána ve dvou publikacích<sup>7,8</sup>. Námí provedená příprava dle prvního postupu<sup>7</sup> nebyla úspěšná, během reakce neprobíhala formylace. Syntéza byla proto provedena podle druhého publikovaného postupu<sup>8</sup>. 1 g AICAr byl zahříván ve formylační směsi složené z 1,1 g NaOH, 13,6 ml kyseliny mravenčí a 25 ml acetanhydridu. Výsledné produkty byly lyofilizovány a uschovány v exsikátoru. Výtěžek syntézy byl 50 %.

\* Petra Vyskočilová se s touto prací úspěšně zúčastnila soutěže O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

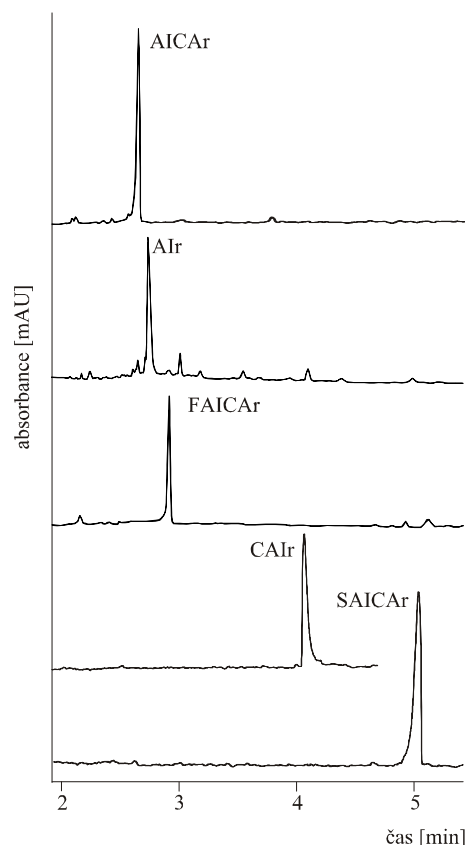
Schéma 1. Purinová *de novo* syntéza

CAIr a SAICAr neobsahovaly žádné vedlejší produkty. FAICAr byl znečištěn pouze výchozí látkou syntézy – AICAr. AIR obsahoval ze všech syntetizovaných ribosidů nejvíce nečistot. Oba tyto surové ribosidy jsme přečistili na katexu Dowex 50WX8 v  $\text{NH}_4^+$  – cyklu. Při jejich čištění byl žádaný produkt FAICAr získán na ionexové koloně jako nezadržený podíl elucí vodou. V případě AIR byl surový produkt nanesen na rekondiovanou kolonu, která byla promývána vodou a čistý AIR byl pak eluován 1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OH}$ . V obou případech byly jednotlivé frakce eluátů analyzovány kapilární elektroforézou a frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a lyofilizovány.

#### Kapilární elektroforéza, elektromigrační a spektrální vlastnosti analytů

Analýzy produktů syntéz a přečištěných ribosidů (obr. 1) byly prováděny na přístroji P/ACE 5510 vybaveném spektrofotometrickým detektorem s polem diod (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Separace byly prováděny za konstantního napětí s náběhovou napětíovou rampou 30 s ve vnitřně nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$  (Polymicro CE and CEC Technologies, Phoenix, AZ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 20 cm a celková délka 27 cm. Pro analýzy byla využita dříve publikovaná metoda<sup>9</sup>. Separace byly prováděny při napětí 10 kV a teplotě 30  $^\circ\text{C}$  v módu micelární elektroforetické chromatografie v alkalickém základním elektrolytu o složení 60  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 80  $\text{mmol l}^{-1}$  dodecylsulfát sodný (SDS). Hodnota pH 9,6 byla nastavena pomocí 2-amino-2-methyl-propan-1-olu. Přidavek micelotvorných činidel byl zvolen s ohledem na budoucí použití pro analýzu biologických tekutin s obsahem proteinů.

Při studiu elektromigračních vlastností ribosidů



Obr. 1. Analýza přečištěných imidazolových ribosidů kapilární micelární elektrokinetickou chromatografií; základní elektrolyt: 60  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 80  $\text{mmol l}^{-1}$  SDS, upraveno na pH 9,6 přidavkem 2-amino-2-methyl-propan-1-olu; vnitřní/vnější průměr křemenné kapiláry 50/375  $\mu\text{m}$ , efektivní/celková délka 20/27 cm, napětí 10 kV, proud 45  $\mu\text{A}$ , teplota 30  $^\circ\text{C}$

Tabulka I  
Přehled pufrů užitých při studiu vlastností imidazolových ribosidů

pH	Složení pufru <sup>a</sup>	Iontová síla <sup>d</sup>
3	20 mmol l <sup>-1</sup> kyselina citronová (pK <sub>1</sub> 3,13) – 0,8 mmol/l CTAB <sup>b</sup>	0,009
5	20 mmol l <sup>-1</sup> kyselina octová (pK 4,76) – 0,8 mmol/l CTAB <sup>b</sup>	0,014
7	20 mmol l <sup>-1</sup> kyselina fosforečná (pK <sub>2</sub> 7,21)	0,035
9	20 mmol l <sup>-1</sup> TABS <sup>c</sup> (pK 8,90)	0,011

<sup>a</sup> Příslušná hodnota pH byla nastavena titrací pufrů roztokem NaOH, <sup>b</sup> hexadecyltrimethylamoniumbromid, <sup>c</sup> (*N*-tris[hydroxymethyl]methyl-4-aminobutansulfonová kyselina, <sup>d</sup> za laboratorní teploty

v závislosti na pH byl každý z ribosidů analyzován kapilární zónovou elektroforézou. Při analýzách byly použity výše popsané podmínky, pouze s jinými základními elektrolyty (tabulka I) o různém pH, jejichž složení bylo vybráno podle hodnot pK. Nastavení pH bylo prováděno titrováním pufrů roztokem NaOH. V případě roztoků o pH 3 a 5 by doba analýzy byla příliš dlouhá, proto byl přidán kationtový tenzid hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB) v submicelární koncentraci a experiment probíhal při obrácené polaritě. Tyto analýzy poskytly informace o elektromigračních a spektrálních vlastnostech studovaných látek. Efektivní pohyblivosti ribosidů byly vypočteny dle vztahu

$$\mu_{\text{ef}} = (l_t \cdot l_d / t_{\text{anal}} \cdot U) - (l_t \cdot l_d / t_{\text{EOF}} \cdot U)$$

kde  $l_t$  je celková délka kapiláry [cm],  $l_d$  je délka kapiláry k detektoru [cm],  $t_{\text{anal}}$  je migrační čas analytu [s],  $t_{\text{EOF}}$  je migrační čas značky elektroosmotického toku [s] a  $U$  je vložené napětí [V]. Pro stanovení pohyblivosti elektroosmotického toku byl jako značka použit mesityloxid.

Protože neznáme přesnou koncentraci syntetizovaných ribosidů v analyzovaných roztocích, vycházeli jsme při výpočtu molárních absorpčních koeficientů z publikovaných hodnot<sup>10–13</sup> a uvažovali vztah

$$\varepsilon_x = A_x \cdot \varepsilon_y / A_y$$

kde  $\varepsilon_x$  je molární absorpční koeficient [l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>],  $\varepsilon_y$  je publikovaný molární absorpční koeficient při pH 7 [l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>],  $A_x$  je korigovaná plocha píku [mAU cm],  $A_y$  je korigovaná plocha píku při pH 7 [mAU cm]. Korigované plochy píků byly odečítány při vlnové délce, která je uvedena v literatuře<sup>10–13</sup>.

## Výsledky a diskuse

Je všeobecně známo, že pH prostředí ovlivňuje disociaci a protonizaci ionogenních skupin analytu. Míru ionizace a velikost náboje vyjadřují hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí analytů, které jsou prezentovány v tabulce II. Ve struktuře A1r se při pH < 5 protonizuje aminoskupina vázaná na imidazolovém kruhu a v této oblasti pH se tedy A1r chová jako kationt. CA1r má ve své struktuře kromě aminoskupiny také karboxylovou skupinu. Při pH 3 se chová jako kationt, ale při pH 5 je nenabitý (migruje s elektroosmotickým tokem). Při pH

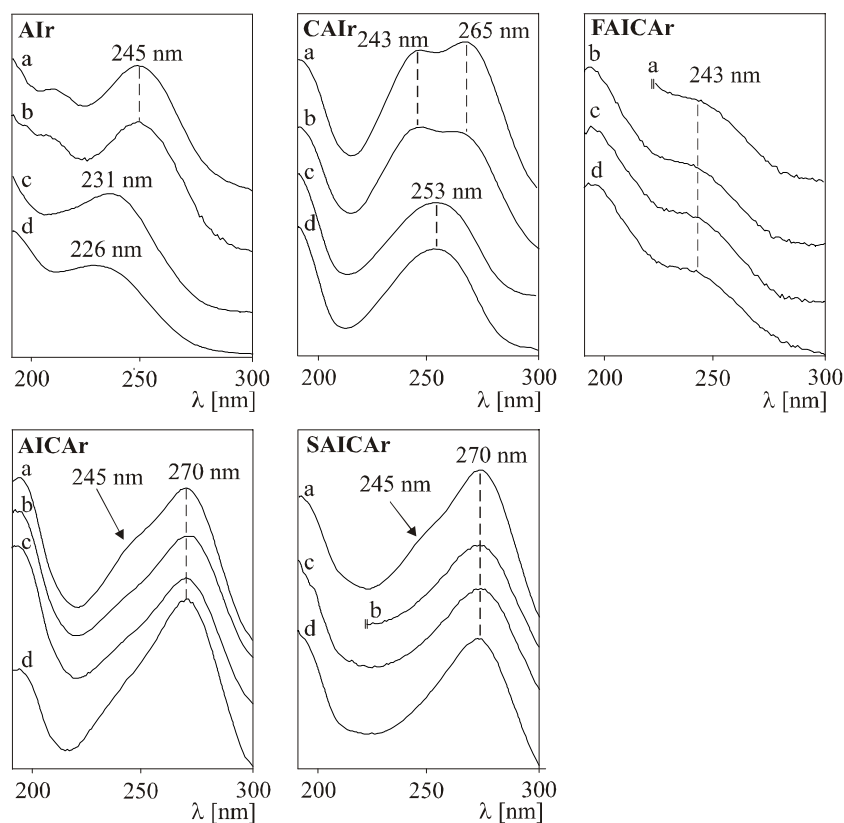
Tabulka II  
Efektivní pohyblivosti ( $\mu_{\text{ef}} \cdot 10^9$  [m<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>]) imidazolových ribosidů v závislosti na pH při teplotě 30 °C

Ribosid	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
A1r	22,2	15,9	0	0
CA1r	4,9	0	-15,3	-15,5
SA1CAr	0	0	-23,4	-22,8
A1CAr	5,5	0	0	0
FA1CAr	0	0	0	-3,0

> 5 se chová jako aniont, neboť karboxylová skupina je plně disociována a aminoskupina není protonizována. Další zvyšování pH disociaci neovlivňuje. SA1CAr má ve své struktuře dvě karboxylové skupiny a při pH > 7 se prokazatelně chová jako aniont. A1CAr obsahuje aminoskupinu a amidovou skupinu. Při pH < 3 se chová jako kationt, při vyšším pH již nenese žádný náboj. Jinak je tomu u FA1CAr, kde je aminoskupina chráněná formylovou skupinou, a proto se neprotonizuje. Při pH ≥ 9 disociuje enolforma aldehydové skupiny a FA1CAr se chová jako aniont.

Kromě elektromigračních vlastností se mění i vlastnosti spektrální. Hodnoty molárních absorpčních koeficientů ve spektrálních maximech ribosidů analyzovaných při různém pH jsou uvedeny v tabulce III. Na obr. 2 jsou uvedena UV spektra studovaných ribosidů při použitých pH. U SA1CAr a A1CAr se při pH < 3 zvyšuje absorbance v oblasti 245 nm. U CA1r se významně měnila UV spektra v závislosti na pH. Při pH 3 jsou zřejmá dvě absorpční maxima. Se snižujícím se pH se zvyšuje absorbance v oblasti 243 nm. Při pH 7 splývají obě maxima do jednoho v oblasti 253 nm, které se s rostoucím pH nemění. U A1r se s rostoucím pH posunuje absorpční maximum směrem k nižším vlnovým délkám. Naopak spektra FA1CAr zůstávají při všech hodnotách pH stejná.

Elektromigrační vlastnosti ribosidů jsou velmi užitečné pro jejich analýzu kapilární elektroforézou. Informace o spektrálních vlastnostech rozšiřují možnosti identifikace ribosidů i na jiné separační techniky využívající UV detekce. Znalosti spektrálních vlastností ribosidů byly využity při potvrzení identity látek analyzovaných kapilární elektroforézou. Jednotlivé ribosidy byly tak



Obr. 2. Závislost spektrálních vlastností imidazolových ribosidů na pH; a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7, d) pH 9

Tabulka III

Molární absorpční koeficienty ( $\epsilon$  [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]) imidazolových ribosidů

Ribosid	$\lambda$ [nm]	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
AIr	260	5969	4735	2400	7769
CAIr	260	7531	8281	10080	8912
SAICAr	270	24605	32180	13300	30347
AICAr	267	9844	11270	12600	9557
FAICAr	248	4798	4216	6590	4477

s jistotou identifikovány na základě svých spektrálních vlastností.

## Závěr

Byly připraveny meziproducty purinové *de novo* syntézy ve formě ribosidů a tyto ribosidy byly přečištěny. Pro identifikaci ribosidů kapilární elektroforézou jsou stěžejní spektrální a elektromigrační vlastnosti. Na základě elektroforetických analýz při různém pH s UV detekcí byly získány poznatky o ionizaci imidazolových ribosidů a o jejím vlivu na UV spektra. Zejména informace o spektrálních

vlastnostech rozšiřují možnost odhalit doposud neobjevené enzymové defekty druhé poloviny purinové *de novo* syntézy, a to elektroseparačními technikami s UV detekcí.

*Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZČR NR/7796-3 a MSM 6198959205.*

## LITERATURA

1. Sperling O., Eliam G., Parsky-Brosh S., De Vries A.: *Biochem. Med.* 6, 310 (1972).
2. Vincent M. F.: *Dissertation*. Université Catholique de

- Louvain, Louvain, 1997.
3. Marie S., Heron B., Bitoun P., Timmerman T., Van den Berghe G., Vincent M. F.: *Am. J. Human. Gen.* 74, 1276 (2004).
  4. Groziak M. P., Huan Z. W., Ding H., Meng Z., Stevens W. C., Robinson P. D.: *J. Med. Chem.* 40, 3336 (1997).
  5. Srivastava P. C., Mancuso R. W., Rousseau R. J., Robins R. K.: *J. Med. Chem.* 11, 1207 (1974).
  6. Zikanova M., Krijt J., Hartmannova H., Kmoch S.: *J. Inherit. Metab. Dis.* 28, 493 (2005).
  7. Mueller W., Benkovic S. J.: *Biochemistry* 20, 337 (1981).
  8. Lukens L., Flaks J.: *Methods Enzymol.* 6, 671 (1963).
  9. Adam T., Friedecký D., Fairbanks L., Ševčík J., Barták P.: *Clin. Chem.* 45, 2086 (1999).
  10. Mayer E., Leonard N. J., Bhat B., Stubbe J., Smith J. M.: *Biochemistry* 21, 5022 (1992).
  11. Laikind P. K., Seegmiller J. L., Gruber E.: *Anal. Biochem.* 156, 81 (1986).
  12. Hards R. G., Patterson D.: *J. Chromatogr.* 445, 217 (1988).
  13. Szabados E., Christopherson R. I.: *Anal. Biochem.* 221, 401 (1994).

**P. Vyskočilová<sup>a,b</sup>, P. Horník<sup>a,b</sup>, D. Friedecký<sup>a</sup>, and T. Adam<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc, Czech Republic*, <sup>b</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Spectral and Electromigration Characteristics of Imidazole Ribosides**

Some imidazole ribosides were synthesized, purified by ion exchange chromatography and analyzed by capillary micellar electrophoretic chromatography and zone electrophoresis. Basic spectral and electromigration characteristics of the ribosides at various pH are reported. The data on ribosides can be used in diagnosis of the known and as yet undescribed enzyme defects in the *de novo* purine synthesis.

### VŠCHT Praha přijme odborného pracovníka/ci do akreditované laboratoře pro Ústav chemie a analýzy potravin.

#### Hlavní náplň práce:

provádění rozborů vzorků potravin a plodin  
zajišťování provozu výzkumné a zkušební laboratoře  
vedení laboratorní dokumentace a záznamů  
technické zabezpečení seminářů a konferencí

#### Požadovaný profil vhodného uchazeče:

vysokoškolské vzdělání (praxe výhodou)  
zkušenosti v analytické (chemické) laboratoři  
základní schopnost práce s PC (MS Office)  
časová flexibilita a samostatnost  
znalost angličtiny vítána

#### Nabízíme:

samostatnou práci na špičkovém pracovišti  
příležitost k profesnímu rozvoji  
pracoviště v blízkosti metra  
pružnou pracovní dobu  
příspěvek na stravování, návštěvu kulturních a sportovních zařízení, rekreaci,  
penzijní připojištění

Nástup: dle dohody

Kontakt: jana.hajslova@vscht.cz