



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
3. KONFERENCIE
CENTRA EXCELENTNOSTI

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich
prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

chemsedm@savba.sk

Ing. Mária Kopáčová

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

Deficit prolíndehydrogenázy: Metodika na diagnostiku NMR spektroskopiou

Iveta Uhliariková¹, Mária Matulová¹, Anna Šalingová²

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemivuh@savba.sk

²Národný ústav detských chorôb, Oddelenie laboratórnej medicíny, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Deficit prolíndehydrogenázy (OMIM 170100) je veľmi zriedkavá autozomálne recesívna porucha metabolizmu kolagénu zapríčinená mutáciou PEPD (613230) génu na chromozóme 19q13. Kolagén je štrukturálny proteín, ktorý sa na konci svojho životného cyklu rozkladá na imidodipeptidy. Enzým prolíndehydrogenáza sa podieľa na degradácii imidodipeptidov obsahujúcich ako koncovú aminokyselinu prolín alebo hydroxyprolín. Štiepením väzby dochádza k uvoľneniu aminokyselín, ktoré môžu byť opätovne využité v bunkách. Nedostatok enzýmu sa prejavuje zvýšeným vylučovaním imidodipeptidov v moči. Charakteristickým klinickým prejavom tohto ochorenia bývajú chronické, pomaly sa hojace vredy a iné dermatologické prejavy; tvárový dysmorfizmus; mierna až ťažká mentálna retardácia. Časté sú aj opakujúce sa infekcie dýchacích ciest. Diagnostika je založená predovšetkým na prítomnosti a polohe vredov na koži, identifikácii konkrétnych proteínových markerov v moči alebo meraní aktivity prolidázy.

NMR spektroskopia je vysoko reprodukovateľná, nedeštruktívna analytická metóda nevyžadujúca úpravu vzorky. Na našom pracovisku ju využívame pri cielej diagnostike rôznych zriedkavých dedičných metabolických ochorení na identifikáciu / kvantifikáciu charakteristických biomarkerov v telových tekutinách, pre ktoré nemá diagnostické centrum vhodnú metodiku. Cieľom tejto práce bolo vypracovať jednoduchý a rýchly metodický postup uplatnením ¹H NMR spektroskopie na identifikáciu prítomnosti signálov imidodipeptidov v moči, ktoré sú charakteristickými biomarkermi deficitu prolíndehydrogenázy.

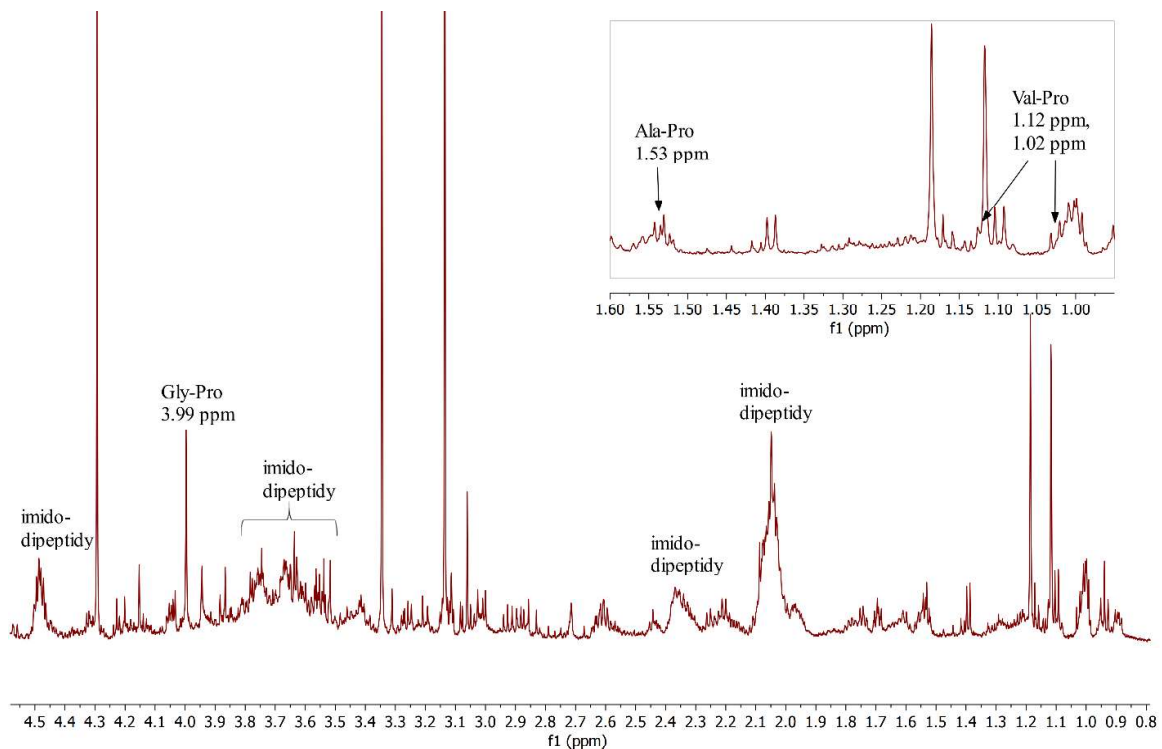
Materiál a metódy

Vzorka moču anonymného detského pacienta s deficitom prolidázy bola poskytnutá Centrom dedičných metabolických ochorení, Národného ústavu detských chorôb v Bratislave. Po odbere bola skladovaná pri teplote -20 °C. Moč bol rozmrazený tesne pred analýzou a centrifugovaný pri 13000 g po dobu 5 minút. 100 µl supernatantu moču bolo zmiešaných s 200 µl fosfátového pufru (pH 2.5) a 20 µl 10mM roztoku TSP-d4 (sodná soľ 3-(trimetylsilyl)-propiónovej kyseliny-d4).

¹H NMR spektrum bolo merané pri teplote 25 °C v 3-mm kyvete na 600MHz spektrometri Varian VNMRS vybaveného kryo sondou HCN ¹³C so zvýšenou toleranciou na prítomnosť solí, chladenou kvapalným héliom. Signál vody bol potlačený presaturáciou sekvenciou *presat*. Chemické posuny metabolitov boli kalibrované na interný štandard TSP (0 ppm).

Výsledky a diskusia

V ^1H -NMR spektre vzorky moču sú viditeľné charakteristické chemické posuny imidodipeptidov v oblastiach δ_{H} 1.9-2.4, δ_{H} 3.4-3.8 a δ_{H} 4.4-4.55 ppm. V spektre sú prítomné aj ďalšie signály dipeptidov, charakteristické pre deficit prolín-dehydrogenázy: singlet glycín-prolín (Gly-Pro) (δ_{H} 3.99 ppm), dublet alanín-prolín (Ala-Pro) (δ_{H} 1.53 ppm) a valín-prolín (Val-Pro) (δ_{H} 1.12 a 1.02 ppm). Analýza ^1H -NMR spektra vzorky moču potvrdila, že moč obsahuje metabolity charakteristické pre deficit prolidázy a potvrdzuje toto ochorenie.



Obr.1: Vybraná oblasť ^1H NMR spektra analyzovanej vzorky moču. Ala: alanín, Gly: glycín, Pro: prolín, Val: valín

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Engelke U.F.H., Moolenaar S.H., Hoenderop S.M.G.C., Morava E. van der Graaf M., Heerschap A., Wevers R.A. Handbook of ^1H -NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism: body fluid NMR spectroscopy and in vivo MR spectroscopy. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft, 2007, ISBN 3-936145-49-0.