

A NUKLEOTID-ANYAGCSERE BETEGSÉGEI

Staub Mária és Keszler Gergely

A sejtek nukleotid-anyagcseréje rendkívül összetett, folyamatos és jól szabályozott enzimreakciók összessége, amely magában foglalja a purin- és pirimidin-nukleotidok *de novo* bioszintézisét, a mentő (salvage) reakciókat, valamint a nukleotidok ill. nukleozidok egymásba történő átalakítását és végül a lebontásukat. A szabad bázisok és nukleozidok újrahasznosítása lehetővé teszi az energetikailag jóval kedvezőbb nukleotidellátást.

Az egyes szövetek nukleotid-szintézise különböző. A májban a *de novo* bioszintézis dominál, míg a központi idegrendszerben, az immunsejtekben (limfociták, polimorfonukleáris sejtek), a vörösvértestekben, a vastagbélben és az izomban a mentő reakciók vannak túlsúlyban. A dezoxiribonukleotidok szintézisét döntően a ribonukleotid-reduktáz katalizálja, amely S-fázis-specifikus enzim, ennek megfelelően döntően a DNS-szintézis hatalmas nukleotidigényét elégíti ki. Nyugvó sejtekben a DNS-hibák javításához van szükség dezoxinukleotidokra, amit a mentő reakciók fedeznek.

A kész nukleotidok legnagyobb mennyiségben a DNS- és RNS-szintézis prekurzorai, energiaforrások (ATP, GTP), jelátvivő molekulák (cAMP, cGMP), valamint a szénhidrát-, lipid- és fehérje-anyagcsere aktivátorai (UDP-cukrok, CDP-alkoholok és CDP-diacil-glicerin stb.).

A nukleotidok intracelluláris koncentrációja a bioszintetikus és lebontó útvonalak aktivitásának a függvénye. A táplálékból vagy az endogén nukleotidok bontásából származó nukleozidok foszforolízissel a megfelelő nukleobázisokká és ribóz-1-foszfáttá bomlanak a purin- illetve a pirimidin-nukleozid-foszforiláz révén. A (dezoxi)adenozin ebből a szempontból kivételt képez, mert a foszforolízis előtt (dezoxi)inozinná dezaminálódik. A keletkezett nukleobázis mentő reakciók segítségével újrahasznosítható, illetve húgysavvá oxidálódhat (purinok), vagy a gyűrű felhasadásával keletkező kismolekulák az intermedier

anyagcserében hasznosulhatnak (pirimidinek). A ribóz-1-foszfát könnyen átalakul ribóz-5-foszfáttá, amely újra bekapcsolódhat a nukleotid-szintézisbe, vagy a pentóz-foszfát-útvonalon keresztül glikolitikus intermedierekké alakulhat. A folyamatok szabályzásával kapcsolatban elmondható, hogy míg a de novo és salvage bioszintetikus utakat a nukleotid-végtermékek negatív visszacsatolással szabályozzák, addig a lebontás sebességét elsősorban az elérhető szubsztrátok koncentrációja határozza meg.

Érthető, hogy e bonyolult és teljes egészében még ma sem ismert mechanizmusok számos genetikai anyagcsere-betegség alapját képezhetik. Szerencsére ezek a kórképek a köszvény kivételével viszonylag ritkák, legtöbbjük azonban nagyon súlyos állapot, ami ezen enzimek anyagcserében betöltött fontos szerepét is alátámasztja. A betegségek klinikai képéről rengeteg adat áll rendelkezésünkre, azonban mind a mai napig erősen hiányos a tudásunk arról, hogy a molekuláris szintű eltérések miképpen eredményezik a klinikailag jól körülírható hematológiai, neuropszichiátriai stb. kórképeket. Az alábbiakban csupán a legfontosabb – és legjobban feltérképezett – betegségek kerülnek tárgyalásra, különös tekintettel azok patobiokémiai hátterére.

A purin-nukleotid-anyagcsere legismertebb károsodásai

- **köszvény, hiperurikémia** – arthriti urica, urát-nefropátia és -nephrolithiasis
- **hipoxantin-guanin-foszforibozil-tanszferáz (HGPRT)- hiány** – Lesch-Nyhan-szindróma
- **adenozin-dezamináz (ADA) -hiány** – immundeficiencia (SCID) -szindróma
- **purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) -defektus** – a celluláris immunitás károsodása
- **dezoxiguanozin-kináz és timidin-kináz-2-hiány** – mitokondriális DNS-deplációs szindróma (MDS)
- **adenin-foszforibozil-transzferáz (APRT) -hiány** – 2,8-dihidroxiadenin-nephrolithiasis
- **myoadenilát-dezamináz (AMP-DA) -hiány** – a purin-nukleotid-ciklus zavara
- **xantin-oxidáz-hiány** – örökletes xantinuria
- **adeniloszukcinát-liáz-hiány**
- **foszforibozil-pirofoszfát-szintetáz-hiány**

Hiperurikémia, köszvény

A húgysav a purinbázisok lebontásának végterméke, amely emberben – a szteránvázhoz hasonlóan – nem bontható tovább. Az urikáz-aktivitás mintegy 8 millió évvel ezelőtt bekövetkezett elvesztése erősen sérülékennyé tette a főemlősöket a húgysav felhalmozódásával szemben, amit csak részben kompenzált a húgysav xantinná történő visszaredukálásáért felelős xantin-oxidoreduktáz-enzim elvesztése az evolúció során. A vese felelős a húgysavkiválasztás kétharmadáért (napi 400-600 mg), a többi az epével és a széklettel választódik ki. A húgysav rossz vízoldékonysága (7 mg/dl) miatt a vér pH-értékénél gyakorlatilag telített oldatot képez, így már a szérum urátszintjének enyhe emelkedése esetén is fennáll a húgysavkristályok kicsapódásának veszélye. A köszvény a purinanyagcsere leggyakoribb, genetikai vagy szerzett zavara, lényegében az urátkristályok okozta ízületi gyulladással és vesekárosodással jellemezhető krónikus megbetegedés.

A vér és a testnedvek húgysavtartalmát alapvetően a húgysav termelésének és kiválasztásának egyensúlya szabja meg, ennek megfelelően a plazma emelkedett urátszintjéért a húgysav túltermelése és/vagy csökkent kiválasztása lehet a felelős.

Fokozott húgysavtermeléshez vezető állapotok

- I. A *de novo* és mentő reakcióutak ismert enzimopátiái (primer köszvény, az összes köszvényes eset mintegy 20-25%-a)
 1. A PRPP-szintáz túlműködése
 - a. az enzim V_{\max} -értéke megnövekszik
 - b. az AMP, GMP és IMP-közvetítette feedback gátlás károsodott
 - c. az enzim ribóz-5-foszfátra vonatkozó K_M -értéke csökkent

Ez az anyagcserezavar X-kromoszómához kötötten öröklődik, ennek megfelelően a fiúcsesemők érintettek. A húgysav-túltermelés mellett siketség, fejlődési visszamaradottság, ataxia és morfológiai eltérések is jelentkezhetnek.

2. A glutamin-PRPP-amidotranszferáz feedback gátlómechanizmusának csökkent érzékenysége

3. A HGPRT részleges hiánya

A legfontosabb purinmentő enzim csökkent aktivitása nyomán a hipoxantin és guanin nagy része a nukleotidokká történő átalakulás helyett uráttá oxidálódik. Ezzel párhuzamosan kevesebb IMP és GMP keletkezik, kevésbé gátlódik a *de novo* purinszintézis, ami purin- és következményes urát-túltermelést von maga után.

4. Az adenin-foszforiboziltranszferáz teljes vagy részleges hiánya

Ebben az esetben az adeninbázisok újrahasznosítása nem történik meg, és a HGPRT-hiányállapothoz hasonló mechanizmusok révén alakul ki a köszvény.

5. A xantin-oxidáz genetikai eltérésekből fakadó túlműködése

II. Az intermedier anyagcsere egyéb ismert enzimdefektusai (szekunder köszvény)

1. Fruktóz-intolerancia (aldoláz B-hiány)

Az aldoláz B hiányában fruktóz-1-foszfát halmozódik fel a májsejt citoplazmájában (foszfát-szekvesztráció, „foszfátsapda”). Anorganikus foszfát hiányában nincsen lehetőség az ATP újraszintézisére, így a regenerálódásra képtelen ADP és AMP húgysavvá alakul (l. az Orvosi Biokémia tankönyv 2-237. és 2-238. ábráit).

Mivel a fruktóz anyagcseréjében az aldoláz B katalizálta lépés a leglassúbb, nagyobb mennyiségű fruktóz fogyasztása is a fruktóz-1-foszfát átmeneti felhalmozódását és purindegradációt eredményezhet (fruktóz-indukálta hiperurikémia).

2. Von Gierke-kór (a glukóz-6-foszfátáz hiánya)

A glukoneogenesis utolsó enzimének kiesése esetén glukóz-6-foszfát halmozódik fel a citoplazmában, amely a glikogén-szintézis aktiválása mellett piruváttá bomlik, ami a tömeghatás törvénye miatt a laktát-dehidrogenáz segítségével tejsavvá redukálódik. A glukóz-6-foszfát egy nem elhanyagolható része a glukóz

direkt oxidációja révén ribóz-5-foszfáttá alakul. Utóbbi a foszforibozil-pirofoszfát prekursoraként aktiválja a purinok *de novo* szintézisét. A következményes hiperurikémia egyrészt a feleslegben keletkező purinbázisok gyors lebomlásának következménye, valamint a laktátacidózis meggátolja a húgysav vizeletbe történő kiválasztását (lásd a továbbiakban).

3. A zsírsavoxidáció zavara (közepes szénláncú zsíracil-KoA-dehidrogenáz-hiány)

A redukáló ekvivalensek (NADH és FADH₂) csökkent ütemű képződése különösen izommunka során nem teszi lehetővé az ATP gyors regenerálódását, így az ADP és ATP húgysavvá alakul. Az energiahány miatt izomfájdalmak és görcsök lépnek fel, a szérumban pedig megemelkedik a harántcsíkolt izom károsodására utaló biokémiai markerek szintje (kreatin-kináz, mioglobín, troponinok).

III. Nagy tömegű purinbázis lebomlása

1. Alkoholizmus (fokozott purin-katabolizmus)

Az etanol fokozatos oxidációja során nagymennyiségű ecetsav-molekula keletkezik a májsejtekben, amelyeket az acetát-tiokináz (acetyl-KoA-szintetáz) az intracelluláris acidózis elkerülése érdekében, a hosszú szénláncú zsírsavak aktiválásának analógiájára acetyl-KoA-vá alakít. Az ehhez szükséges nagy mennyiségű ATP-ből rövid idő alatt sok AMP, majd annak lebomlása révén húgysav keletkezik. Az ATP újraképződését az alkoholos májkárosodás, különösen a mitokondriumok károsodása is hátráltatja.

2. Tumorlízis-szindróma (a pusztuló tumorszövetből felszabaduló purinbázisok fokozott lebomlása). Általában a vérképző rendszerből kiinduló proliferációs kórképek (akut és krónikus mieloid és limfoid leukémia, policitémia, egyéb mieloproliferatív betegségek), de egyéb, fokozott sejtpusztulással járó állapotok is kiválthatják (szarkoidózis, pikkelysömör). Különösen a daganatellenes kezelések során lehet vele gyakran találkozni.

A húgysav kiválasztásának zavara

A húgysavat meglehetősen bonyolult és több ponton finoman szabályozott transzportrendszerek választják ki a vesében. A glomerulusokban a glukózhoz hasonló módon az urát teljes mennyisége átfiltrálódik a bazális membránon, majd a proximális tubulus területén a filtrált mennyiség közel 99%-a visszaszívódik a nátriumfüggő URAT-1 transzporter segítségével (pre-szekretórikus reabszorpció). Ezt követi a teljes urát-pool kb. 50%-ának (naponta átlagosan 500 mg) tubuláris szekréciója, amelyért döntően a hUAT (human uric acid transporter; uromodulin) és az MRP-4 membránfehérjék felelősek. Ezt követően a szekretált mennyiség 80-90%-a újra visszaszívódik, míg 10-20%-a kerül véglegesen a vizeletbe.

A proximális tubulus apikális membránjában található URAT-1 fehérje szerves anion antiporter, amely az urát lumenből történő felvételéhez kapcsolatosan egy szerves aniont, általában laktátot transzportál a filtrátumba. Az antiporter probeniciddel, az angiotenzin-II-receptor blokkoló losartannal és szulfipirazonnal gátolható. A sejt belsejébe került húgysav a bazolaterális membrán OAT3 antiporterén keresztül hagyja el a tubulussejtet, és vele szemben egy szerves anion jut be a citoplazmába. Alternatívaként az UAT urát-unipporter jöhet még számításba, amely facilitált diffúzióval juttatja vissza az urátot a keringésbe. Megfigyelték, hogy a szérum húgysavszintje férfiakban a pubertást követően megemelkedik, míg nőkben a menopauzát követően lecsökken. Ennek hátterében az állhat, hogy az androgén hormonok serkentik az URAT-1 expresszióját, míg az ösztrogének gátolják azt. Az emberi URAT-1 transzporter eddig leírt mutációi csökkent húgysavfelvétellel járnak, tehát hiperurikozuriát és hipourikémiát eredményeznek. A csatorna funkciónyerő mutációi és polimorfizmusai elméletileg hiperurikémiát okozhatnának, azonban emberben efféle eltéréseket még nem sikerült azonosítani.

A húgysav tubuláris szekréciójáért elsősorban a Henle-kacs vastag felszálló szegmensében található NPT1 (uromodulin, UMOD, Tamm-Horsfall-protein) apikális transzporter a felelős, amelynek mutációi a hiperurikémiával és progresszív vesekárosodással járó familiáris juvenilis hiperurikémiás nefropátiát (Bartter-szindróma), illetve a medulláris cisztás vesebetegség (MCKD) változatait okozzák. Az utóbbi időben számos

pontmutációt írtak le az uromodulin 4-es és 5-ös exonjainak területén, amelyek általában cisztein aminosavakat érintenek. Ezek a pontmutációk az uromodulin intracelluláris transzportjának súlyos károsodását és a fehérje endoplazmás retikulumban történő felhalmozódását okozzák, ami ER-stresszt vált ki és a vese parenchimasejtek hialinos degenerációját okozta.

A húgysavkiválasztás zavarait a következőkben foglaljuk össze.

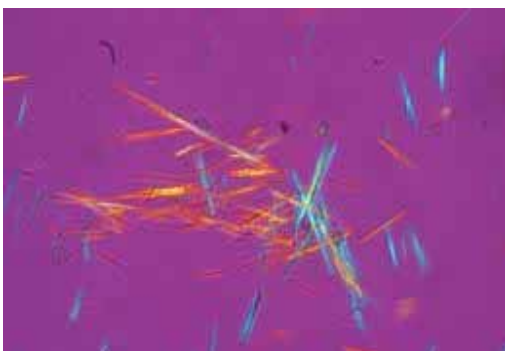
- I. Krónikus veseelégtelenség
- II. Familiáris hiperurikémiás nefropátia (a húgysav tubuláris transzportjáért felelős uromodulin mutációja)
- III. A proximális tubulus szerves anion-transzporterén a húgysavval kompetáló szerves savak jelenléte
 1. Metabolikus acidózis (laktát, propionát, metilmalonát, ketontestek megjelenése éhezésben vagy diabetesben stb.)
 2. Savas gyógyszermetabolitok jelenléte (pl. thiazid- és kacsdiuretikumok, probenacid, nikotinsav vagy penicillinek szedése)
- IV. A húgysavkiválasztás egyéb zavarai (ólom- vagy berilliummérgezés, terhességi toxikózis (preeklampszia), dehidráció, vízajtó gyógyszerek túladagolása)

A klinikai gyakorlatban a köszvény primer és szekunder változatait szokták elkülöníteni; primer köszvény alatt a nukleotid-anyagcsere enzimeinek kóros működése nyomán fellépő (a fenti táblázat I. része), illetve az ismeretlen eredetű köszvényt értjük, míg az összes többi eset – amikor a betegség egy másik kóros állapot következtében lép fel – másodlagos köszvénynek tekintendő. A másodlagos köszvény jóval gyakrabban lép fel, az esetek mintegy 75-80 százaléka ebbe a kategóriába sorolható. Ez a kóroktani terminológia természetesen nemcsak a köszvény kapcsán, hanem az orvostudomány valamennyi területén általános érvényű.

A klinikai tünetek az emelkedett húgysavszint és az urát rossz vízdékonyságának a következményei, szoros összefüggés azonban mégsem mutatható ki az urát szérumszintje és a betegség súlyossága között.

1. A köszvény általában akut ízületi gyulladással rohammal kezdődik, amelyet az ízületi folyadékból kicsapódó mononátrium-urát-monohidrát-kristályok váltanak ki (kémiai gyulladás). Ezeket a kristályokat az ízület punkciójával nyert folyadékból polarizációs mikroszkóp segítségével lehet kimutatni, a látótérben jellegzetes, tű alakú, kihegyezett végű kettősen fénytörő kristályokat lehet megfigyelni. Ha a polarizált fény síkja a kristály

hossztengelyével párhuzamos, akkor pirosas-sárga, ha merőleges, akkor kék színben tűnnek elő (1. ábra).



1. ábra. Kettősen fénytörő urátkristályok köszvényes beteg ízületi folyadékában

Elsősorban az alacsonyabb hőmérsékletű perifériás ízületek érintettek (a húgysav hidegen rosszabul oldódik); jellemző az öregujj ízületének fájdalmas gyulladása (podagra, 2. ábra), de akár a fülkagylón is megjelenhetnek a fájdalmas köszvényes csomók



2. ábra. Akut köszvényes ízületi gyulladás a lábon

(3. ábra). Az érintett ízületek duzzadtak, rendkívül érzékenyek, felettük a bőr feszes, meleg, sötétvörös; a láz akár a 39 °C-ot is elérheti.



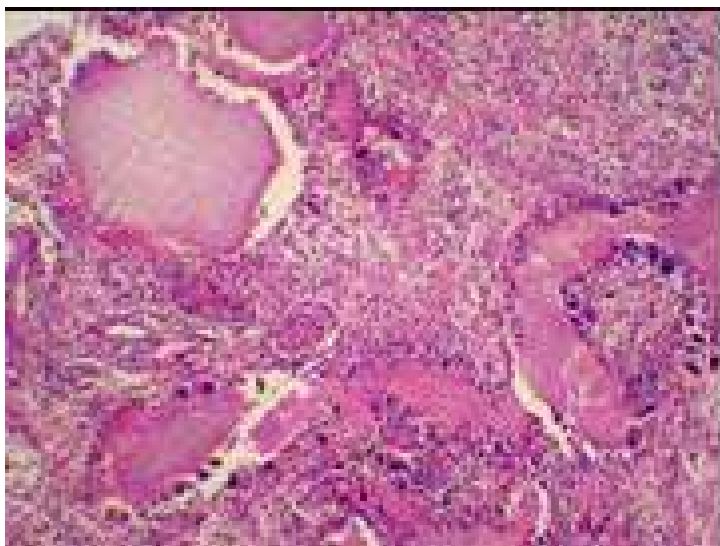
3. ábra. Köszvényes csomók a fülkagylón



2. A krónikus deformáló arthritis többszörös akut fellángolás nyomán keletkezik. A tömeges urátlerakódások (tophusok) körül makrofágok, óriás- és hízósejtek, később fibroblasztok részvételével gyulladásos reakció lép fel (granulóma), amely az ízületi felszín pusztulásához vezet. Az ízület erősen eldeformálódik, mozgásai erősen beszűkülnek és komoly fájdalommal járnak (4. ábra).

4. ábra. Köszvényes csomók a kéz ízületein

3. A másik fontos célszerv a vese; a kristályok kicsapódása a veseműködés beszűkülésével járó urát-nefropátiát, tubuláris elzáródásokat, nefroszklerózist és urátkövek megjelenését okozza (5. és 6. ábra). Az urát okozta proximális tubulussejt-károsodás összefüggésben lehet

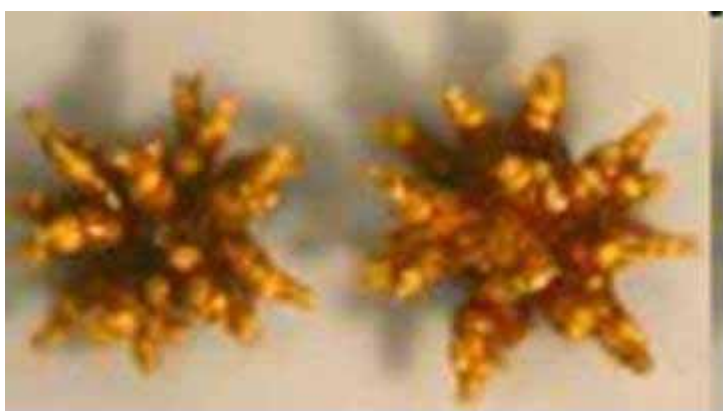


5. ábra. A vesetubulus lumenét teljes egészében kitöltő, homogén eozinofil festődésű urátkristály

azzal a ténnyel, hogy az urát reabszorpcióját végző sejtek különösen magas húgysavkoncentrációnak vannak kitéve. Egészen ritka esetben nefrozissal járó AA-amiloidózis is jelentkezhethet, ami azt jelenti, hogy a veseállományban a szérum amiloid A fehérje részleges hasításakor keletkező fibrilláris AA-amiloid fehérjék rakódnak le. A tubuláris húgysavkicsapódás legfontosabb oka a vizelet túl savas pH-ja (<5,5),

ami azonban szisztémás acidózissal nem magyarázható. A jelenség pontos oka nem ismert, azonban az erre hajlamos betegek az átlagosnál kevesebb ammóniumiont választanak ki a

vizeletbe. Elképzelhető, hogy a vese glutamináz-aktivitásának csökkenéséhez vezető polimorfizmusokkal állunk szemben. A vesében az ammónia szinte kizárólagos forrása a tubulussejtek glutamináz-aktivitása; a purin-nukleotid-ciklus jelentősége – szemben az izomszövettel – a vesében elhanyagolható. További lényeges tényező, hogy hiperurikémia kapcsán urátsók, illetve húgysav kicsapódásának hiányában is megfigyelhető toxikus hatás: az oldott urát az arteriolák falában simaizomsejt-proliferációt, renális hipertenziót és permeabilitás-fokozódást eredményez, ami a szérum húgysavszintjének normalizálásával vagy ACE-inhibitorokkal visszafejleszhető.



6. ábra. Műtéttel eltávolított urátkövek és a vesemedence lumenét kitöltő kövek röntgenárnyéka natív felvételen



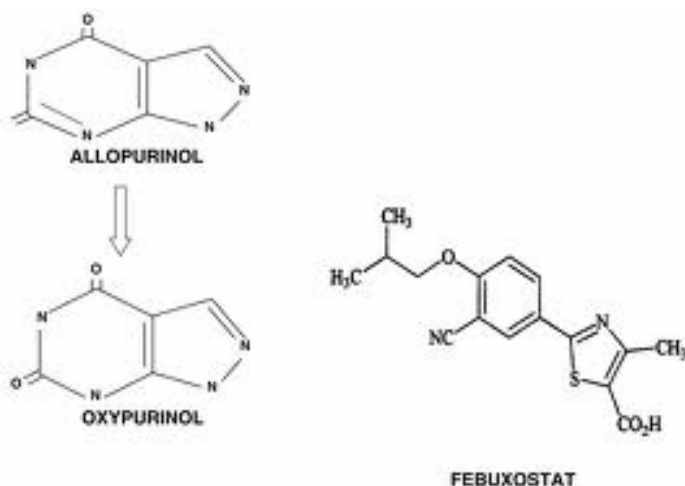
4. Az 1950-es évek nagy epidemiológiai felmérései rávilágítottak az emelkedett húgysavszint és a kardiovaszkuláris kockázat összefüggésére, azonban nem tisztázódott, hogy a hiperurikémia a szív-érrendszeri betegségek független rizikófaktora-e, vagy egyszerűen azok markere. Ez a kérdés azóta is erősen vitatott, **és nincs konszenzus abban a tekintetben sem, hogy a hiperurikémiát a metabolikus szindróma részének kell-e tekinteni.** Újabb adatok ugyanakkor mellett szólnak, hogy a húgysavszint a magasvérnyomás-betegséggel összefüggést mutat, így a serdülők körében diagnosztizált primer hipertenziós esetek 89%-ának háttérében hiperurikémiát azonosítottak. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, hogy a húgysavszint gyógyszeres csökkentésével az esetek 80%-ában el lehetett érni a vérnyomás normalizálódását. Állatkísérletek során már enyhe hiperurikémia is az endoteliális nitrogén-TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

monoxid-szintézis csökkenését eredményezte. A metabolikus szindrómával is összefüggést találtak, nevezetesen az erősen lipogén fruktóztartalmú diéta az elhízás mellett emelkedett húgysavszintet is eredményez, ami egyebek mellett inzulinrezisztenciához és II-es típusú cukorbetegséghez is vezethet. Az inzulinrezisztencia pedig vissza tud hatni a szérum urátszintre, ugyanis a vese urátranzsportereinek expressziója transzkripciós szinten az inzulin kontrollja alatt áll.

A köszvény diagnózisát a klinikai tünetek mellett a 450 $\mu\text{mol/l}$ -t meghaladó plazma húgysavszint, a szérum gyulladási markereinek emelkedett koncentrációja, az emelkedett fehérvérsejtszám, míg krónikus köszvényben ízületi képző eljárások támasszák alá.

Izotópdiagnosztikai módszerekkel a páciens teljes húgysavpoolja is meghatározható. A vizsgálathoz ^{15}N -nel jelzett húgysavat adnak be intravénásan, majd annak a szervezet vizeitereiben történt egyenletes eloszlása után mérhető koncentrációjából meghatározható a húgysav teljes mennyisége. Értéke férfiakban 1200 mg-ig, nőkben 600 mg-ig elfogadható, azonban súlyos köszvényben 30 ezer milligrammot (30 gramm) is mértek már.

A köszvény kezelésében a diétás megkorlátások (alacsony purintartalmú ételek fogyasztása; hús, fruktóz és alkohol kerülése; fokozott folyadékbevitel) és a tubuláris húgysavszekréciót fokozó szulfipirazon és probenecid mellett az allopurinol és alloxantin döntő jelentőségű.



7. ábra. Az allopurinol és oxidációs terméke, illetve a febuxostat szerkezeti képlete

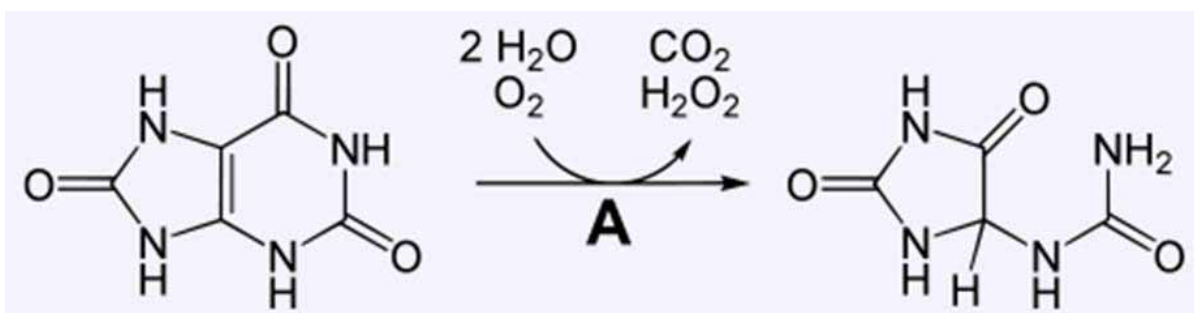
Utóbbiak a hipoxantin és xantin analógjai (az N_7 és C_8 -atomok felcserélésével vezethetők le, 7. ábra). A xantin-oxidáz szubsztrátjai, de az oxidált termék irreverzibilisen kötődik az aktív helyhez és bénítja az enzimet („öngyilkos enzim”). Az allopurinol különösen húgysav-túltermelés esetén hatásos, ilyenkor a vizelettel hipoxantin és xantin ürül, amelyek a húgysavnál sokkal jobban oldódnak vízben, így nem okoznak köszvényes tüneteket. A kezelés

leggyakoribb mellékhatása, hogy paradox módon akut köszvényes rohamot válthat ki. Emiatt a köszvény kezelésében fokozatosan teret nyernek a xantin-oxidáz nem purinvázis gátlószerei

TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

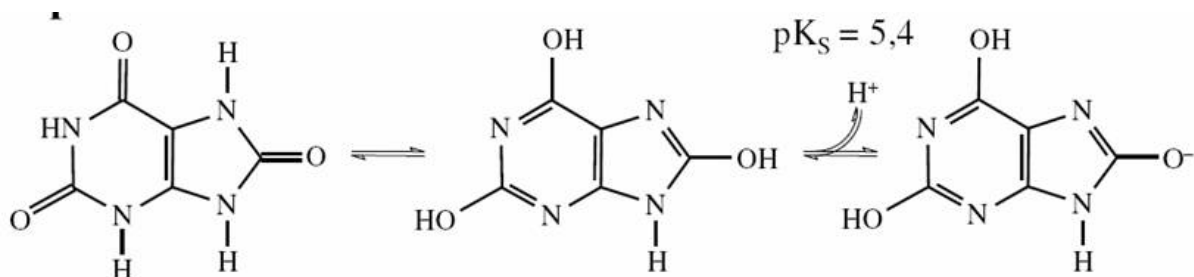
is, mint pl. a 2-aryl-tiazolkarboxilsav-származék febuxostat, amellyel kapcsolatban komolyabb mellékhatásokat még nem írtak le (7. ábra).

A tumorlízis-szindrómában akután jelentkező és életveszélyes komplikációkkal járó hiperurikémia kezelésére sikerrel alkalmazzák az urát-oxidáz rekombináns formáját, a rasburikázt (az urát-oxidáz génje egy nonsense mutáció következtében nem expresszálódik emberben). A rasburikáz a húgysavat az 5-10-szer jobban oldódó, így sokkal könnyebben kiválasztható allantoinná oxidálja (8. ábra). A rekombináns enzimmel történő kezelésnek számos előnye van az allopurinollal szemben: sokkal gyorsabb a hatása, már pár óra alatt normalizálja a szérum húgysavszintjét, és a xantin-felhalmozódás vesekárosító hatását, illetve a vizelet alkalinizálását is elkerülhetjük. Ez utóbbi azért lényeges, mert alkalikus pH-értékeknél megnő a xantin- és kalciumkövek képződésének az esélye.



8. ábra. A húgysav átalakulása vízdékony allantoinná a rasburikáz katalizálta reakció során

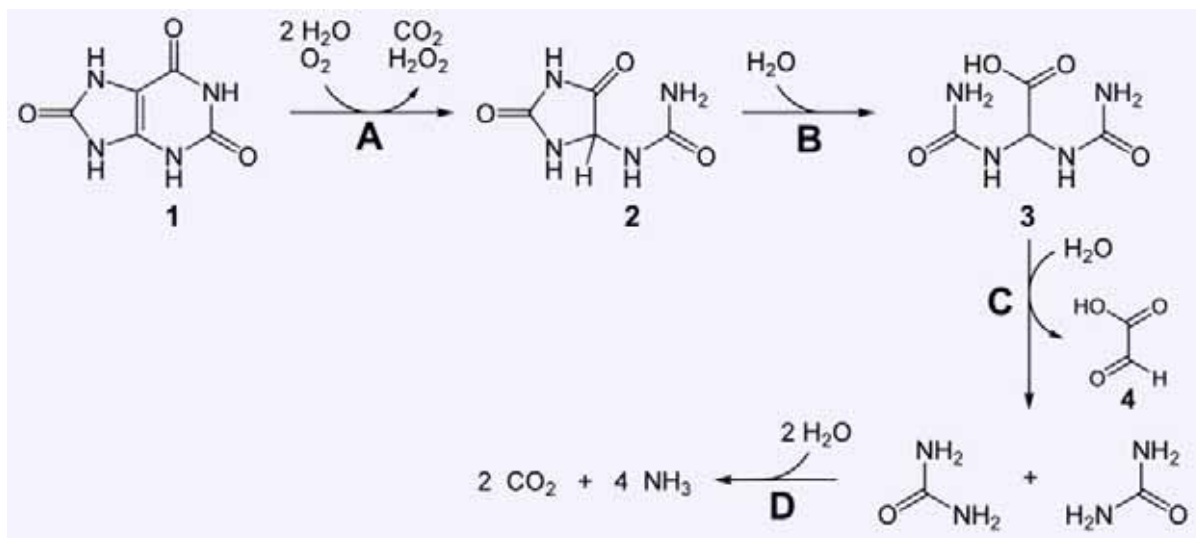
Az akut köszvényes roham nem-szteroid gyulladásgátlókkal vagy a tubulin-polimerizáció gátlásán keresztül a fehérvérsejtek migrációját gátló kolhicinnel is kezelhető. Ízületi érintettség esetén kortikoszteroidok ízületi üregbe történő injektálása is szóba jöhet. Lényeges a diurézis fokozása (fokozott folyadékbevitel), illetve a vizelet alkalinizálása is (sókeverékek), hiszen lúgos pH-n a húgysav deprotonált alakban fordul elő és oldhatósága kifejezettebb (9. ábra).



9. ábra. A húgysav oxo-enol tautomériája és elektrolitos disszociációja lúgos közegben.

A húgysav – a purin- és pirimidinbázisokhoz hasonlóan – laktim-laktám tautomériát mutat. Lúgos közeg elősegíti a laktim (enol) forma kialakulását. Az enolok gyenge savak, enyhén lúgos közegben disszociálnak, így alakul ki a húgysav anionja, az urát, amely vizes közegben a húgysavnál jobban oldódik és a szervezetben leggyakrabban nátriumsókat képez.

Az eddig elmondottak alapján joggal tekinthetnénk a húgysavat az anyagcsere fekete bárányának, azonban jóval árnyaltabb a kép. Az utóbbi évek megfigyelései hívták fel a figyelmet arra, hogy az oxidatív stressz kivédésében a húgysav fontos szerepet játszik. Kísérletesen bizonyították, hogy az endogén húgysav még az aszkorbinsavnál is hatékonyabb antioxidáns, és lényeges szerepet játszik a membránperoxidáció, a methemoglobin-képződés, az érrelmeszesedés és a nukleinsavak oxidatív károsodásának kivédésében. Ilyenkor a húgysav erélyes nem-enzimatis oxidáció hatására vagy az „oxo-hem” katalízis révén allantoinná alakul. Az allantoin az emberi szervezetben kizárólag nem-enzimatisan képződik (a teljes mennyisége átlagosan 25 mg), mivel emberben nincsen urát-oxidáz (urikáz) enzim, a szérum allantoin szint mérése tehát az oxidatív stressz megbízható indikátora lehet. További érdekesség, hogy a főemlősök hosszabb élettartamát több kutató összefüggésbe hozza azzal, hogy májukból eltűnt az urikáz-aktivitás. Az ennek következtében megemelkedett húgysavszint hatékony védelmet jelenthet az oxidatív károsodással szemben (10. ábra).



10. ábra. A húgysav tökéletes oxidációja a madarakban és az emlősök túlnyomó többségében
A purinyűrűt az urát-oxidáz (urikáz) allantoinná (2) hasítja (A), amelyben az allantoináz (B) elhidrolizálja a pirimidingűrűt is, majd a keletkező aciklusos terméket (3) az allantoikáz enzim (C) oxálsav-szemialdehidre (4) és két molekula karbamidra hasítja, amelyeket az ureáz enzim (D) szén-dioxidra és ammóniára bont.

Lesch-Nyhan-szindróma

A hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz enzim (HGPRT) veleszületett teljes hiánya okozta komplex kórkép; hiperurikémiával, szellemi visszamaradottsággal, mozgászavarokkal, sőt öncsonkítással jár. Az enzim részleges hiányának (heterozigóták) emelkedett plazma urátszint és ízületi gyulladás a következménye, így a köszvény egyik genetikai altípusához sorolható, ám neurológiai tüneteket ritkán okoz, öncsonkítás pedig ilyen esetben sohasem fordul elő.

A HGPRT a hipoxantin- és guanin-bázisok újrahasznosításáért felelős; foszforibozil-pirofoszfát felhasználásával IMP-t és GMP-t képez (Orvosi Biokémia tankönyv, 2-224. ábra). Az enzimfehérje minden sejttípus citoplazmájában megtalálható, de expressziója nagyon különböző – legnagyobb mennyiségben az agyban és a herében fordul elő. A natív enzim TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

homotetramer szerkezetű, aegységeit 217 aminosav építi fel. A többi foszforibozil-transzferázzal nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutat; kilenc exonból és nyolc intronból álló génje az X kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (Xq26-q27). K_M -értéke a hipoxantinra nézve 5-17 μM , de természetes szubsztrátjai mellett kisebb affinitással számos purin-analóg foszforibozilálására is képes. A HGPRT a központi idegrendszerben mindenekelőtt a bazális ganglionokban expresszálódik. Az enzimdefektus jellegzetes idegrendszeri tünetei részben ezen lokalizációjával magyarázhatók.

Molekuláris biológiai módszerekkel a gén területén 31 különböző mutációt derítettek fel, melyek a promotert és a kódoló szekvenciákat egyaránt érinthetik, az enzimaktivitás változó arányú csökkenését eredményezve. Pontmutációk okozta egyetlen aminosav-csere (pl. a Toronto-variánsban a 109-es glicin argininre történő szubsztitúciója) drasztikusan megváltoztathatja a natív enzim kinetikai paramétereit, antigenitását, elektroforetikus mobilitását és hőstabilitását. Emellett a gén teljes delécióját, exon-endoduplikációt, részleges 3'-deléciókat és inszerciókat is kimutattak már. A felderített mutációk többsége (85%-a) ugyanakkor nem jár a génstruktúra jelentős megváltozásával.

A kórkép gyakorisága 1/380.000 élveszületés, földrajzi eltéréseket nem mutat. A betegség tünetei az X-kromoszómához kötött kórképekre jellemző módon szinte kizárólag férfiakban jelentkeznek, akik a hibás allélt a tünetmentes anyától öröklik (vagy nagyon ritkán a csírasejtvonalban lép fel mutáció). Az egészséges hordozók kiszűrése fibroblaszttenyészetek enzimaktivitásának meghatározásával lehetséges; ilyenkor az X-kromoszóma véletlenszerű inaktiválódása miatt a sejtek mozaikszerű aktivitást mutatnak. A prenatális diagnózis amnioncentézissel vagy chorionbiopsziával nyert magzati sejtekből enzimméréssel, vagy a jóval érzékenyebb PCR-RFLP alapú genotipizálással lehetséges, de a kórkép ritkasága s az invazív diagnosztika veszélyei miatt rutinszerűen nem alkalmazzák.

A Lesch–Nyhan-szindróma a következő tünetekkel jellemezhető:

I. Hiperurikémia

A húgysav felhalmozódása az enzimhiányok klasszikus következményeivel (szubsztrátok felhalmozódása, termékek hiánya) nagyon jól magyarázható.

1. HGPRT-aktivitás hiányában nem lehetséges a hipoxantin és a guanin újrahasznosítása. A felhalmozódó szabad bázisok húgysavvá bomlanak a guanáz és a xantin-oxidáz által katalizált reakciókban.
2. Erősen emelkedik a másik szubsztrát, a foszforibozil-pirofoszfát (PRPP) koncentrációja, amely a PRPP-amidotranszferáz feed-forward aktiválásán keresztül

gyorsítja a purinok *de novo* bioszintézisét. Ezen túl az adenin-foszforiboziltranszferáz aktivitása is emelkedik a PRPP-túltermelés következtében. A purin-túlprodukciónak pedig előbb-utóbb gyorsult katabolizmushoz vezet.

3. Elmarad az IMP és a GMP szintézise, amelyek normál körülmények között fékeznék a *de novo* szintézis sebességét (Orvosi Biokémia tankönyv, 2-223. ábra). Ennek következtében a sejt szükségleteinél több purin-nukleotid keletkezik, amelyek végső soron húgysavvá bomlanak.

Az első figyelmeztető jel a vizeletből kicsapódó homokszerű húgysavkristályok megjelenése a pelenkán. Később a köszvényre jellemző vese- és akut ízületi elváltozások is kifejlődnek, azonban az ízületek krónikus, degeneratív érintettsége ritka.

II. Idegrendszeri tünetek

Az idegrendszeri tünetek megléte és súlyossága alapján a HGPRT-mutációk okozta kórképeket három csoportba sorolhatjuk. Érdekes módon a neurológiai eltérések akár teljesen hiányozhatnak is, ilyenkor Kelley-Seegmiller-szindrómáról (HRH, HGPRT-related hyperuricemia) beszélünk, de az esetek többségében neuropszichiátriai tünetek jelentkeznek: mentális retardáció, fokozott görcskészség és izomtónus-zavarok öncsonkítás nélkül; ezt a betegségrcsoportot HRND-nek nevezi a szakirodalom (HGPRT-related neurological dysfunction). A legsúlyosabb, öncsonkítással járó idegrendszeri károsodások a Lesch-Nyhan-szindrómában láthatók. Az érintett újszülöttek gyakran teljesen egészségesnek tűnnek, a szellemi visszamaradottság csupán 3–6 hónapos kortól válik szembetűnővé; a gyermek nem tanul meg beszélni, IQ-ja nagyon alacsony érték (40-80). Az első életév során koordinálatlan, nagy amplitúdójú mozgáskombinációk figyelhetők meg (athetózis, chorea), később tónusfokozódás alakul ki fokozott görcskészséggel (piramidális és extrapiramidális tünetek). A motoros zavar annyira súlyos, hogy a Lesch-Nyhan-szindrómások gyakorlatilag kivétel nélkül járásképtelenek és egész életükben kerekesszékhez vannak kötve. A Lesch–Nyhan-szindróma legfenyegetőbb tünete az esetek 85%-ában megfigyelhető agresszió és öncsonkítás, mely 3-5 éves korban jelentkezik és kórjelző értékű. A betegek ajkukat és nyelvüket harapdálják, később ujjukat és kezüket rágják, súlyos önsérüléseket okozva, gyakran a végtagok leköttözéséhez és a fogazat preventív eltávolításához kell folyamodni (11. ábra).

Az
TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE
Orvosi Vegytani Intézet



öncsonkításos rohamokat gyakran környezeti ingerek provokálják; néha hónapokig nem jelentkeznek, máskor halmozottan fordulnak elő. Az öncsonkításos tünetek nem a fájdalomérzet hiányának következményei, a betegek megélik a saját maguk által okozott fájdalmat. Manapság az obszesszív-kompulzív zavarok körébe sorolják ezt a kórképet.

11. ábra. Jellegzetes öncsonkításos sérülések Lesch-Nyhan-szindrómában

Képkalkotó vizsgálatokkal kimutatható, hogy az agy mérete lényegesen kisebb HGPRT-hiány esetén; különösen a nucleus caudatus és a putamen magok zsugorodása számottevő.

HGPRT-t nem expresszáló dopaminerg neurontenyészetek vizsgálata rávilágított a dendritek arborizációjának, a szinapszisok kialakulásának zavarára, azonban ezeket az eredményeket génkiütött egereken nem sikerült reprodukálni.

A likvor rutin laborvizsgálata normális értékeket ad, de a neurotranszmitterek lebomlási termékei kóros mennyiségben vannak jelen. A homovanillinsav és a 3-metoxi-4-hidroxi mandulasav csökkent szintje a dopaminerg és noradrenerg ingerületátvitel érintettségét jelzik, míg a szerotonin és annak inaktív metabolitja, az 5-hidroxi-indolecetsav koncentrációját emelkedettnek találták. A Lesch-Nyhan-betegek központi idegrendszerében leírt biokémiai rendellenességek közül a hipoxantin emelkedett koncentrációjának

tulajdonítanak különös jelentőséget. Kimutatták, hogy a hipoxantin befolyásolja a transzmembrán adozintranszportot és a Na/K-ATPáz aktivitását, amit összefüggésbe hoztak a metabolit toxikus hatásával. Szövettanilag a bazális ganglionok dopaminerg neuronjainak pusztulása mutatható ki (ez jellemző Parkinson-kórban is); ezzel magyarázhatók az akarattól független mozgások. A bazális ganglionok dopaminerg rendszerének funkcionális zavarát, a dopamin-transzporter denzitásának csökkenését pozitron-emissziós tomográfiás (PET) vizsgálatok is alátámasztják.

Pinto és Seifert elmélete szerint feltételezhető, hogy a HGPRT-aktivitás hiánya guanin-nukleotid-hiányt idéz elő a bazális ganglionokban és a kérgi neuronokban, ezáltal károsodik a G-fehérjék működése, melyek a dopaminerg és noradrenerg jelátvitelben nélkülözhetetlenek. Mint ismeretes, a bazális ganglionok szinte kizárólag mentő reakciókkal fedezik nukleotidigényüket; érthető, hogy e forrás kiesése anyagcseréjük ilyen mélyreható változását okozza.

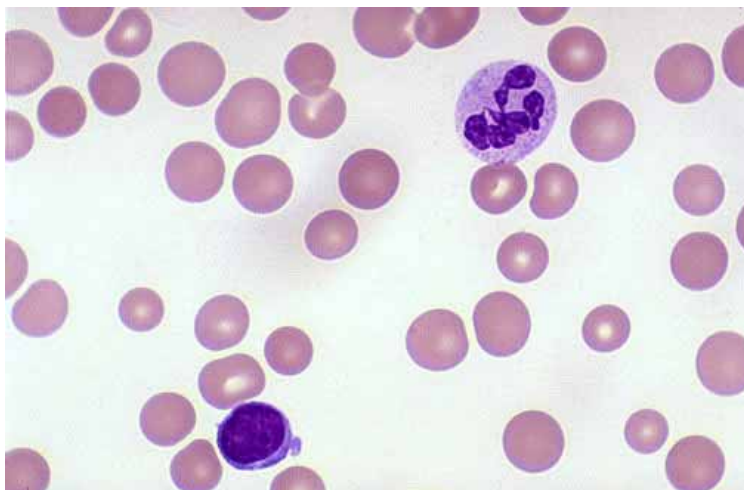
Felmerült annak lehetősége is, hogy nagyon magas koncentrációja esetén a húgysav már prooxidánsként viselkedik, és ezáltal károsodnak a neuronok. Ennek viszont ellentmond az a tény, hogy köszvényben nem észlelhető neurotoxicitás, sőt számos kiemelkedő tehetség – Newton, Kant, Milton és Franklin – is súlyos köszvényben szenvedett.

A Lesch-Nyhan szindróma patogenezisének jobb megértése érdekében egy farmakológiai és egy géniütött állatmodellt is létrehozta. Újszülött patkányokat 6-hidroxi-dopaminnal kezeltek, amely szer a katekolaminerg neuronokat károsítja és öncsonkító viselkedést idézett elő. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a dopaminhiány oki szerepet játszhat a betegség neurológiai tüneteinek kialakulásában. A HGPRT-hiányos egerek ugyanakkor nem mutattak idegrendszeri tüneteket, de életkoruk előrehaladtával egyre csökkent agyuk dopamintermelése. Emellett számos, a központi idegrendszerre jellemző gén expressziója is megváltozott a knockout egerekben.

III. A vérképző rendszer rendellenességei

Az intenzív *de novo* purin-bioszintézis megnövekedett folsavfelhasználással jár (12. ábra), így hosszú távon csökken a plazma folátszintje és megaloblasztos anémia alakul ki, amely folsavpótlásra jól reagál. Emellett a fehérvérsejtek is károsodnak, pl. az IgG-t termelő B-limfociták kisebb aktivitásúak, így másodlagos fertőzések léphetnek fel.

12. ábra. Perifériás vérkép Lesch-Nyhan-szindrómával asszociálódó megaloblasztos anémiában. A hatalmas megaloblasztok mellett jellegzetesek a hiperszegmentált granulociták.



A betegséget allopurinollal kezelik, mely a szérumban és vizeletben a húgysav-koncentrációját jelentősen csökkentve megelőzi a hiperurikémia okozta vese- és ízületi károsodásokat, ezzel az enzimhiányos betegek életminőségét javítja. Sajnos az

idegrendszeri tünetekre, amelyek nem az emelkedett húgysavszint következményei, nincs hatással. A GMP- és IMP-pótlás sem vezetett eredményre, így csupán tüneti kezelésre van lehetőség. Az agresszivitást 5-hidroxi-triptofánnal, a szerotonin-szintézis előanyagával, illetve erős nyugtatókkal próbálják csökkenteni. Döntő áttörés valószínűleg csak a hiányzó enzimműködés helyreállításával érhető el. A fő problémát az jelenti, hogy egyelőre csak csontvelői őssejtekbe sikerült a működő gént bejuttatni; kérdéses, hogy a nem osztódó neuronokba bevihető-e a hiányzó génszakasz. A kezelések ellenére csak a betegek elenyésző százaléka éri meg a 40. életévét.

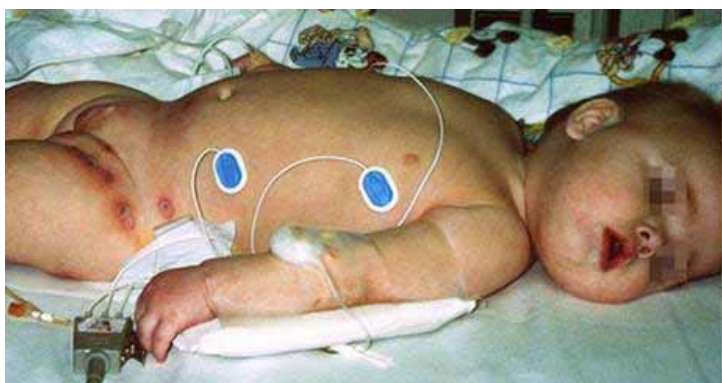
Súlyos kombinált immundeficiencia (SCID) - szindróma

Az adenzin-dezamináz (ADA) és a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) enzimek a purin-nukleozidok húgysavvá történő lebontásában nélkülözhetetlenek. Örökletes hiányuk olyan metabolitok felszaporodásával jár, melyek a limfocitákra toxikusak és az immunfunkciók életveszélyes károsodását okozzák. Az ADA hiánya a T- és B-sejtekre egyaránt toxikus, így a klasszikus SCID (severe combined immunodeficiency) -szindrómát hozza létre. A PNP-hiányos betegek celluláris immunválasza erősen károsodott, míg humorális immunitásuk megtartott vagy fokozottan aktív. Szerencsére a kórkép meglehetősen ritka; az esetek harmadában X-hez kötött öröklődést mutat, a többi esetben autoszomális recesszív öröklődésű. A veleszületett immunhiányos állapotok közel feléért az ADA hiánya felelős.

Az adenzin–deamináz az adenzin és a 2'-dezoziadenozin irreverzibilis, hidrolitikus deaminálásáért felelős; termékei az inozin és a dezoziinozin. Bár minden sejtben megtalálható, aktivitása az éretlen tímuszsejtekben a legmagasabb, érésük során viszont fokozatosan csökken. Többféle izoenzimét is leírták, amelyek szerkezeti felépítése hasonló. A katalitikus alegység homodimer formában aktív, amelyet az ún. komplettáló glikoprotein rögzít a sejtmembrán külső felszínéhez (ektoenzim), lehetővé téve az extracelluláris adenzin lebomlását. A katalitikus alegység génje a 20q13.11 lókuszon található, és 12 exonból áll. Promotere GC-bázispárokban rendkívül gazdag. Ennek is köszönhető, hogy az ADA a folyamatosan expresszálódó „housekeeping” gének közé tartozik, jelezve, hogy átírása nélkülözhetetlenül fontos a sejt számára.

A gén több, autoszomális recesszíven öröklődő mutációját írták le eddig; ebből öt egyetlen aminosavcserével járó, csökkent aktivitást eredményező pontmutáció, egy esetben pedig a 4-es exon teljes delécióját találták. A diagnózis a vörösvértest-lizátum csökkent vagy hiányzó enzimaktivitása alapján állítható fel. Amnionsejt-kultúrából végzett enzimaktivitás-meghatározás lehetőséget ad a prenatális diagnózisra.

Az enzimhiány már a születés utáni hetekben, a bőrön, a gyomor-bél és a légzőtraktus nyálkahártyáján súlyos és visszatérő bakteriális, vírusos vagy gombafertőzések formájában



jelentkezik (13. ábra). Nagyon jellemző az AIDS-ben is gyakran megfigyelhető candidiasis és Pneumocystis-pneumonia, aminek

13. ábra. Immunhiányos állapot következtében fellépő krónikus bőrfertőzések csecsemőkorban

következtében a nem megfelelően kezelt betegek két

éves koruk előtt meghalnak. Az AIDS-hez olyannyira hasonlító immunhiány és tünetek miatt a betegséget a „non-HIV AIDS” névvel is szokták illetni.

A diagnózist a nyirokcsomók hiánya, mellkasröntgenen a thymusárnyék hiánya és az alacsony (500/μl alatt) limfocitaszám támasztja alá. Itt kell megemlíteni a részleges ADA-hiány fogalmát, amikor vörösvértestekből nem mutatható ki ADA-aktivitás, más szövetekben viszont a normális alapaktivitás 2-70%-a mérhető. Ilyenkor instabil, rövidebb féléletidejű mutáns enzim szintetizálódik; a vörösvértestek fokozatosan elvesztik ADA-aktivitásukat, viszont a sejtmaggal rendelkező többi sejt képes új enzimet szintetizálni. Az immunfunkciók a részlegesen csökkent enzimaktivitás ellenére normálisak, így ezek a betegek általában nem kerülnek felismerésre.

Az ADA enzim hiányát kísérő metabolikus változások

Az enzim hiánya a szubsztrátok felszaporodásával jár, tehát megnövekszik a (dezoxi)adenozin koncentrációja a vérplazmában, amit a nukleozid sejtbe történő felvétele követ. A sejtmembránban passzív (ekvilibratív) és másodlagosan aktív (koncentratív) nukleozid-transzporterek is megtalálhatók. A szelektív limfotoxicitásért az a tény tehető felelőssé, hogy a T-sejtek (és különösen a tumorsejtek) erősen koncentrálják citoplazmájukban ezt a vegyületet. A két nukleozidot az adenzin-kináz és a széles szubsztrátspecificitású, így purinok foszforilációjára is képes pirimidin-mentő enzim, a dezoxicitidin-kináz (dCK) nukleozid-monofoszfátokká tudja alakítani, majd specifikus monofoszfát- és aspecifikus difoszfát-kinázok katalizálják további foszforilációjukat. Ennek következtében főleg a dATP koncentrációja emelkedik meg jelentősen a sejtekben.

Hasonló metabolikus változást lehet létrehozni az ADA specifikus gátlószereivel (pl. dezoxicoformicin), amelyeket a leukémiák és limfómák kezelésére használnak. A kezelés célja a citotoxikus dATP koncentrációjának emelése a malignus klónok elpusztítása érdekében.

A citoplazma emelkedett adenzin- és adenin-nukleotid-koncentrációja a következő biokémiai változásokat okozza:

1. Az osztódó sejtekben a dATP gátolja a ribonukleotid-reduktáz enzimkomplex aktivitását. Ez az a nukleotid, amely valamennyi nukleozid-difoszfát szubsztrátmolekula redukcióját gátolhatja. A sejt dezoxiribonukleotid-poolja a ribonukleotidok mennyiségének csak 0,1 - 1%-át teszi ki, amely – utánpótlás, állandó szintézis hiányában – csupán néhány percre képes biztosítani a DNS-replikáció nukleotidigényét. Így a DNS-szintézis és a sejtosztódás megáll, a sejtciklus megreked a G1/S restrikciós pontban.

2. A dATP a nyugvó sejtekre is toxikus, mert az emelkedett dATP-koncentráció proapoptotikus hatású. A dATP fontos szerepet játszik az ún. apoptozóma szerveződésében, amely a citokrom-c mitokondriumból történő kiáramlása során szerveződik és a prokaspáz-9 aktiválása révén elpusztítja a sejtet. Valószínűleg ez a legfontosabb oka az adenzin-dezamináz hiánya esetén megfigyelhető masszív limfocita-pusztulásnak. Ezen a TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

megfigyelésen alapul a különféle citotoxikus nukleozid-analógok, pl. a hajás sejtes leukémia kezelésére használt 2-klór-2'-dezoxiadenozin (CdA, Cladribine) hatásmechanizmusa is. Ezt az ADA-rezisztens antimetabolitot is a dezoxicitidin-kináz foszforilálja és aktiválja, majd az aktív trifoszfát-forma apoptózist vált ki, mert az apoptoszómában a dATP-t helyettesítheti, sőt a természetes nukleotidnál sokkal erősebben indukálja a programozott sejthalált. Munkacsoportunk érdekes megfigyelése volt, hogy a citotoxikus nukleozid-analógok hatására a dezoxicitidin-kináz aktivitása a többszörösére fokozódik; a jelenség hátterében később az enzim többszörös foszforilációját írták le. Ennek a folyamatnak fontos klinikai jelentősége lehet, hiszen ezáltal a kemoterápiás szer aktiválása sokkal hatékonyabbá válik, az analóg önmaga hatását potenciózza, kisebb dózis is elegendő lehet a tumorsejt elpusztításához, és kevesebb mellékhatást okoz. Természetesen ehhez az kell, hogy a daganatos sejt dezoxicitidin-kináz-expressziója megfelelő legyen. Ezzel kapcsolatban összefüggést mutattak ki a tumor kemoterápiás érzékenysége és dezoxicitidin-kináz aktivitása között, és jelenleg is folynak próbálkozások az enzim kemorezisztens tumorokba történő bejuttatásával. Egy svéd munkacsoport azt is kimutatta, hogy apoptózis során az intermembrán térből a citokróm c mellett a dezoxiguanozin-kináz is felszabadul, és szerepet játszik a kemoterápiás dezoxiadenozin-analógok in situ aktiválásában.

Az elmondottakon túl a túl magas dATP-koncentráció a DNS-hibajavító enzimeket is gátolja, valószínűleg a dezoxiribonukleozid-poolok arányeltolódása miatt. Ennek következtében emelkedik a lánctörések gyakorisága, és aktiválódik a kromatin-asszociált poli-ADP-ribózsintetáz/polimeráz (PARP) enzim, amely NAD hasítása terhére egy poli-ADP-ribóz-láncot képez. Ez a polimer az egyszálú DNS-lánctöréseket javító enzimek számára egy aktivációs szignált jelent, azonban szintézise rengeteg NAD-ot emészt fel, ennek következtében NAD-hiány, redukáló ekvivalens hiány és az elégtelen ATP-termelés következtében nekrotikus sejthalál következik be.

3. Erősen lecsökken a sejtek ATP-tartalma, mert a dATP és az ATP szintje között fordított arányosság van. Ez a jelenség részben azzal magyarázható, hogy a dAMP az AMP-dezaminázt erősen aktiválja, de az AMP sokkal jobb szubsztrátja az enzimnek, mint a dAMP, így annak dezaminációja annál intenzívebb, minél magasabb a 2'-dezoxiszármazék szintje. Ha az ATP mennyisége a normális koncentráció felére csökken, kifejezetté válik a hemolízis sebessége.

Egy másik elmélet sejtmagi folyamatokkal magyarázza az ATP-szint kritikus
TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE
Orvosi Vegytani Intézet

csökkenését. Kimutatták, hogy a dATP gátolja a DNS-hibajavító enzimek működését, ennek folyományaként egy- és kettős szálú lánctörések keletkeznek a kromoszómákon.

4. Az aktivált metilciklus (Orvosi Biokémia tankönyv 2-182. ábra) gátlása

Az ADA-hiányállapotban felhalmozódó adenzin a tömeghatás törvényéből kifolyólag megfordítja az S-adenozil-homocisztein-hidroláz katalizálta reakció irányát, sőt az emelkedett dezoxiadenozin-koncentráció irreverzibilisen gátolja ugyanezt az enzimet. Az ennek következtében megemelkedő S-adenozil-homocisztein-koncentráció gátolja a metiltranszfer-reakciókat, így számos kismolekula szintézise (kreatin, kolin, karnitin, katekolaminok) és a makromolekulák (DNS, fehérjék) metilálása is zavart szenved, ami az epigenetikai információ megváltoztatása miatt a génexpresszió zavarait vonja maga után.

5. Az extracelluláris adenzin hatásai

Az adenzinnak számos fiziológiás hatása van, amit plazmamembrán receptorokhoz való kötődéssel vált ki. Az A1 típusú adenzin-receptorok az adenilát-cikláz gátolják, míg az elsősorban limfoid sejteken található A2 típusú receptorok stimulálják azt. Az extracelluláris adenzin gátolja a trombocita-aggregációt, a lipolízist, a neurotranszmitterek felszabadulását, a neutrofil granulociták szabadgyök-képzését, serkenti a szteroidok bioszintézisét és a hisztamin felszabadulását. A megfelelő nukleotidoknak (AMP, ADP és ATP) viszont éppen ellentétes hatásuk van: fokozzák az aggregációt és a gyulladásos folyamatokat.

Az extracelluláris adenzin koncentratív és ekvilibratív nukleozid-transzportereken keresztül bejuthat a citoplazmába, ahol bizonyos szövetekben nukleotidokká foszforilálódik. Ezek allosztérikusan gátolhatják a foszforibozil-pirofoszfát-szintetáz és –amidotranszferáz enzimeket, befolyásolva ezzel mind a purinok, mind a pirimidinek de novo szintézisét, illetve a purinmentő reakciókat.

A SCID-szindróma terápiájában a különböző fertőzések megelőzésén ill. tüneti kezelésén túl a tisztított enzim izomba történő bevitele is szerepet kapott (szubsztitúciós terápia). Az aktív működési periódus meghosszabbítása végett az enzim egyes lizin-oldalláncaihoz kovalensen monometoxi-polietilén-glikolt (PEG) kapcsolnak, amely hathatós védelmet jelent a szöveti proteázok ellen, továbbá jelentősen csökken az ADA immunogenitása is. A módosított enzim az izomszövetből gyorsan a vérplazmába jut, s bár nem kötődik a sejtes

elemekhez, a belőlük kidiffundáló dezoxiadenozint hatékonyan lebontja. Heti egyszeri adagolás mellett a klinikai állapot jelentősen javul, azonban a kezelés rendkívül költséges. Egy további érdekes módszer a „kifordított” vörösvértest-membránba csomagolt PEG-ADA intravénás bejuttatása (bioliposzóma).

Egy másik kezelési mód a heterológ csontvelő-transzplantáció. A HLA-identikus, hisztokompatibilis donor felkutatása azonban sokszor reménytelen, s a súlyos immunhiány miatt nagy a graft-versus-host reakció esélye.

A SCID volt az első olyan enzimhiányos betegség, amelyet 1999-ben a világon először kezeltek sikeresen génterápiával. A beteg CD34+ csontvelői őssejtjeibe *ex vivo* bevitt gén hónapokig megfelelően működött, ám később sajnos inaktiválódott, így a páciens újra enzimpótlásra szorult. Vektorként egér leukémia retrovírusokat alkalmaztak; struktúrgénjeik helyébe klónozták az adenzin-dezamináz génjét. Sajnos a gén irányított bevitele még nem megoldott; így fordulhatott elő 2002-ben, hogy az ADA-génterápia az egyik betegnél leukémiát eredményezett, mert a bevitt gén véletlenül az LMO-2 transzkripció faktor kódoló régiójába integrálódott. Nagy szükség lenne olyan rekombinázt enzimre, amely a gént biztonságos módon integrálja a gazdasejt kromoszómájába. Erre reményt nyújthatnak a cinkujj-nukleázok (mesterséges restriktációs enzimek), amelyek kötőhelye a nukleotid-szekvenciának megfelelően tervezhető, így a hozzá kapcsolt restriktációs endonukleáz domén a beépítendő génszakasz számára megfelelő helyen bonthatja el a DNS-t.

A fertőzések megelőzése érdekében a betegeket steril környezetben kell tartani; ezt úgy oldják meg, hogy a beteget egy hermetikusan lezárt fóliagömbbe „csomagolják”; innen ered a SCID közismertebb angol neve, a „bubble boy syndrome” (14. ábra).



14. ábra. Immunhiányos betegek izolációja SCID-szindrómában

A purin-nukleozid-foszforiláz hiánya: a celluláris immunválasz károsodása

TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

A purin-nukleozid-foszforiláz elsősorban az inozin, a guanozin és ezek 2'-deoxiszármazékainak reverzibilis foszforolízisét végzi. Termékei tehát a hipoxantin, guanin és a (dezoxi)ribóz-1-foszfát. Az enzim hiányára jellemző alacsony szérum és vizelet húgysavszint a guanin és hipoxantin húgysav-prekursorok csökkent termelődésének következménye. Ezzel magyarázható a HGPRT-enzim csökkent aktivitása is. A HGPRT-hiányhoz hasonló állapottal állunk tehát szemben, mely *de novo* purin-túltermeléshez vezet, azzal a különbséggel, hogy a vizelettel hatalmas mennyiségű guanozin, inozin és ezek 2'-deoxi-származékai ürülnek. A vese nem károsodik, mert ezek a vegyületek a húgysavnál jóval vízzeloldékonyabbak. A szelektív T-limfotoxicitás (Nezelof-szindróma) oka nagy valószínűséggel a sejtek magas dGTP-tartalma, amely számos enzimet, így a ribonukleotid-reduktázt is gátolja. Az irodalom hat olyan esetet említ, amikor a vezető tünet a központi idegrendszer működészavara volt. A T-sejtek funkciózavara következtében a malignus és az autoimmun idegrendszeri betegségek kockázata is fokozott. Kezelés nélkül a betegek nem érik meg a felnőttkort. Csontvelő-transzplantációval és rekombináns enzim adásával történtek terápiás próbálkozások.

Összefoglalva, az adenzin-dezamináz és a purin-nukleozid-foszforiláz enzimek mutációja esetén súlyos immunhiányos állapot alakul ki, amelynek kiváltó oka a sejtek magas dATP-, illetőleg dGTP-tartalma.

Mitokondriális DNS-depléciós szindrómák

A dezoxiguanozin-kináz (dGK) a dezoxipurin-nukleozidokat és azok analógjait foszforiláló mentő enzim, amely foszfátdonorként ATP-t és UTP-t is képes hasznosítani. Az enzim expressziója konstitutív, és a legtöbb szövetben előfordul (limfoid szövetek, lép, bőr, máj és agy). Az enzimiről bebizonyosodott, hogy a timidin-kináz 2-es izoenziméhez (TK2) hasonlóan a mitokondriumban található. A TK2 egy szűk specificitású, kizárólag timidin foszforilálására alkalmas mitokondriális mentő enzim (a TK1-es izoforma a citoszolban működik).

A mitokondriális dNTP-pool a belső membrán átjárhatatlansága miatt teljesen elkülönül a citoplazmaitól. Emiatt a mátrix dezoxinukleotidjai vagy a belső membrán

TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

dezoxiribonukleotid-kARRIERJÉN keresztül juthatnak a mitokondriumba, vagy a mátrix mentő kinázai révén alakulhatnak ki. A szóban forgó két mentő enzim a dezoxiribonukleozidok felfoszforilálásának első, sebességmeghatározó lépését katalizálja, a további foszforilációs lépések a széles spektrumú mono- és difoszfát-kinázok kompetenciájába tartoznak. A mátrix dNTP-poolok fenntartása létfontosságú a mitokondriális DNS megkettőződése és hibajávítása szempontjából.

A dGK hiánya a mitokondriális DNS kópiaszámának csökkenésével járó mitokondriális DNS-deplációs szindrómák (MDS) egyik ritkán előforduló, de súlyos válfaját okozza. Az érintett betegeken már röviddel a születés után progresszív májelégtelenség és neurológiai tünetek alakulnak ki (15. ábra). A májbetegség általában kezelhetetlen és rövid időn belül halálos

kimenetelű lehet. A pszichomotoros fejlődés erőteljes lassulása és nystagmus is gyakran megfigyelhető, továbbá a mitokondriális terminális oxidáció károsodása miatt súlyos tejsavas acidózis alakul ki (a mitokondriális DNS a légzési lánc 85 fehérjéjéből 13-at kódol; a II-es komplex kivételével valamennyi komplex tartalmaz mitokondriális eredetű komponenseket). Fontos kiemelni, hogy a dGK hiányában kialakuló szervkárosodás mennyire specifikus. Ezzel kapcsolatban azt feltételezik, hogy a dezoxicitidin-kináz (dCK), egy citoszolban található purinmentő enzim kompenzálhatja a dGK hiányát a betegség által nem károsított szövetekben. Így már érthetővé válik, hogy a dCK-t minimális mértékben expresszáló agy- és májszövet miért ennyire érzékeny a dGK hiányára (hepatocerebrális MDS).



14. ábra. DNS deplációs szindróma

A mitokondriális DNS replikációja a sejtciklus fázisaitól függetlenül megy végbe és a dGK-zal együtt számtalan olyan enzimet igényel, amelyeket a sejtmag DNS-e kódol. A dezoxiguanozin-kináz fontos szerepet játszik a mitokondriális dATP és dGTP-poolok koncentrációjának és arányának fenntartásában. A kiegyensúlyozott dNTP-ellátás, amely a

DNS-replikáció előfeltétele, egyrészt mitokondriális mentő (salvage) útvonalakon keresztül valósul meg, vagy dezoxiribonukleozid-di- és trifoszfátok felvételét igényli a citoplazmából, mert a mitokondriumokban nincsen de novo nukleotid-szintézis. Közismert tény, hogy a ribonukleotid-reduktáz aktivitása a sejtciklus S-fázisára korlátozódik, így nyugvó és differenciált sejtekben alig van de novo dNTP-szintézis. Ebből következik, hogy a posztmitotikus szövetek szinte teljes egészében a mitokondriális mentő rendszerekre vannak utalva, hiszen a citoplazmatikus dNTP-szintézis csupán a genomiális DNS hibajavításához szükséges igényt tudja fedezni, a mitokondriális DNS replikációjáét már nem. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a ribonukleotid-reduktáz nemrégiben leírt p53-függő R2-es alegysége, amely helyettesítheti az S-fázisra specifikus R2 alegységet, nyugvó sejtekben is beindíthatja a dNTP-szintézist, de ez a mechanizmus is elsősorban a nagyobb DNS-károsodások javítási igényét hivatott fedezni.

Összefoglalva, a dGK hiánya nyugvó szövetekben a mitokondriális dNTP-poolok aránytalanságát eredményezi, ami a mutációk és a DNS-lánctörések gyakoriságának ugrásszerű növekedésén keresztül a DNS-kópiaszám gyors csökkenéséhez vezet. Ezt alátámasztandó, dGK-hiányos fibroblaszkultúrákon kimutatták, hogy osztódó sejtek mitokondriális DNS-tartalma alig csökkent a kontroll vad típusú sejtekéhez viszonyítva, viszont szérummegvonás következtében a Go fázisba lépő sejtek mtDNS-mennyisége azonnal csökkenni kezdett, amit dGMP és dAMP hozzáadásával meg lehetett előzni. Ez a megfigyelés már a hepatocerebrális (dGK-hiányos) MDS lehetséges kezelésének irányába mutat.

A TK2 hiánya elsősorban az izomszövetet károsítja, míg a májat relatíve megkíméli (miopátiás MDS). Ez utóbbi megfigyelés annak fényében nehezen érthető, hogy a májban sem a de novo útvonal, sem a citoplazmatikus TK1 és dCK nem mutat túl magas aktivitást. A legvalószínűbb magyarázat az lehet, hogy a TK2 mutációja esetén mindig megmarad valamennyi reziduális enzimaktivitás, amennyi elegendő lehet a mitokondriális DNS fenntartása számára. Ezt a feltételezést az a megfigyelés is alátámasztja, hogy máj mitokondriumokban a DNS mennyiségéhez viszonyított TK2 aktivitás viszonylag magas.

Homozigóta TK2 mutációról és a TK2 teljes hiányáról még nem számoltak be. Valószínűleg az ilyen beteg sokszervi elégtelenségben szenvedne és az elmondottak miatt a máj is súlyosan károsodna.

Az izomszövet TK2 mutációkkal szemben észlelhető sérülékenysége arra vezethető vissza, hogy itt normál körülmények között is viszonylag alacsony enzimaktivitás mérhető, míg a mitokondriális genom által kódolt légzési lánc komponensekre az izom intenzív anyagcsereje és ATP-szüksége miatt nagy szükség van. Úgy

tűnik, hogy egészséges egyénekben sincsen a TK2-nek az izomszövetben túl magas rezerv kapacitása, heterozigóta mutációk esetén pedig az izom nem tudja a fellépő nukleotid-hiányt kompenzálni.

A purin-anyagcsere további enzimhiányos kórképei

Az adenin-foszforiboziltranszferáz (APRT) hiányában az adenin nem tud salvage segítségével nukleotiddá alakulni, mert a HGPRT-nek nem szubsztrátja, viszont a xantin-oxidáz 2,8-dihidroxiadeninné alakíthatja. Ez a vegyület a húgysavhoz hasonlóan nagyon rosszul oldódik vízben, ezért kicsapódik a vesetubulusokban és veseelégtelenséget okozhat. A keletkező áttetsző, puha vesekövek ásványi anyag hiányában nem adnak röntgenárnyékot. Az autoszómális recesszíven öröklődő kórkép egyéb biokémiai és klinikai eltéréssel nem jár, és hiánytünetek sem jelentkeznek, mert a de novo szintézis teljes egészében fedezni tudja az adeninszükségletet. A vesekövek kialakulását allopurinol-kezeléssel és bőséges folyadékbevitellel lehet megelőzni, a vizelet alkalizálása nem javítja a 2,8-dihidroxiadenin vízdékonyságát. A kórkép gyakorisága 1:40.000, ezideig 17 mutációt írtak le az APRT-génben.

A (mio)adenilát-dezamináz az AMP-dezamináz izomban található izoenzime, amely egy fontos anyagcsereút, a purin-nukleotid-ciklus tagja. Hiányában az AMP nem tud inozin-monofoszfáttá és ammóniává bomlani, így a működő izom nem képes aminosavak bontásából energiát nyerni. Ennek következtében lépnek fel az anyagcsere-betegség jellegzetes tünetei, a terhelésre jelentkező görcsök és izomfájdalmak. A kaukázusi populációban kissé gyakoribbak az enzim mutációi, mint az észak-amerikai lakosság körében.

A purin-nukleotid-ciklus biológiai jelentőségét az adja, hogy az izomszövetben lehetővé válik az aszpartát átalakítása fumaráttá, ami tulajdonképpen a citrátkör anaplerotikus reakciójaként is felfogható. Ennek nyomán a maximális erő kifejtéssel működő izom elegendő oxidatív kapacitáshoz jut. Ezzel összhangban áll az az 1920-as évek végén tett megfigyelés, hogy az izomműködés intenzitása az izomból kiáramló ammónia mennyiségével arányos. A ciklus másik fontos feladata az, hogy az izomkontrakció során keletkező AMP adenzinná történő defoszforilációját megakadályozza azzal a némiképp szokatlan módszerrel, hogy az AMP-t IMP-vé dezaminálja, amelyből újra AMP készülhet. Megemlítendő, hogy a ciklus egy másik

enzimének, az adeniloszukcinát-liáznak a defektusa is izomfájdalmakkal és görcsökkel járó kórképet eredményez.

Érdekes módon az enzim génjében olyan polimorfizmusokat is leírtak, amelyek csökkentik az enzimaktivitást, de nem olyan mértékben, hogy az izomgörcsökkel járjon. Az érintett egyéneknél emelkedik az AMP koncentrációja, amelyből az 5'-nukleotidáz hatására a kardioprotektív hatású adenzin keletkezik. Ez a magyarázata annak, hogy ha a csökkent aktivitású allél van jelen a szívizom sejtjeiben, lényegesen enyhébb a veleszületett kardiomiopátiák kórlefolyása, mint a magasabb aktivitású adenilát-dezaminázzal rendelkező betegeké.

A xantin-oxidáz hiánya örökletes xantinuriához vezet. Az enzim molekuláris oxigént használ, emellett FAD, vas és molibdén kofaktorokat is igényel. A reakció során szuperoxid-anion, majd hidrogén-peroxid keletkezik. Utóbbi vas(II)-ionok jelenlétében hidroxilgyökké és hidroxidionná oxidálódik. Ezek a reakcióképes gyökök akár szöveti károsodást is okozhatnak. A xantin-oxidáz az emberben csaknem kizárólag a májban és a vékonybélben található. Májban az enzimet a sinusoidokat borító endothelsejtekből tudták kimutatni. Az enzimfunkció kiesése következtében a hipoxantin és a xantin nem tud húgysavvá alakulni, így változatlan formában ürülnek a vizelettel, a szérumban és a vizelet húgysavszintje pedig extrém alacsony. A xantinuria kétféle klinikai képpel jelenhet meg.

Első típusa bármely életkorban akut veseelégtelenség képében jelentkezhet. A xantin még rosszabbul oldódik a vizeletben, mint a húgysav, így vesekárosodás léphet fel. A xantinkövek ugyanakkor nehezen diagnosztizálhatók, mert nem sugárfogók, csak akkor, ha legalább 5 % kalcium-foszfátot is tartalmaznak.

A második típusban a xantin-oxidáz mellett a mutáció az aldehid-oxidáz és a szulfid-oxidáz aktivitását is erősen csökkenti. Mindhárom enzim molibdén kofaktorról működik, és a genetikai eltérés a három enzimben közös molibdénköti alegységet teszi működésképtelenné. Molibdénhiányos étrenden tartott kísérleti állatoknál hasonló állapot jelentkezik. Az újszülöttkorban jelentkező akut veseelégtelenség, ízületi és izombántalmak, nystagmus és a grand mal epilepsziára jellemző tónusos-klónusos görcsök megerősítik a diagnózis felállítását. Vannak xantinuriások, akik fizikai erőfelfejtés kapcsán izomfájdalmakra panaszkodnak; ilyenkor az izomszövetből vett biopsziás mintában xantinkristályokat lehet kimutatni. A mintából xantin szubsztráttal nem mutatható ki enzimaktivitás, míg hipoxantin alkalmazásával legfeljebb a normálérték 5%-ának megfelelő aktivitás mutatható ki.

A kezelés lényegében a purinbevitel csökkentésére, a folyadékfelvétel fokozására és a vizelet alkalizálására szorítkozik.

Az adeniloszukcinát-liáz az IMP-AMP átalakulás során az adeniloszukcinátot AMP-vé és fumaráttá alakítja, illetve a puringyűrű de novo szintézise során fumarátot hasít ki a foszforibozil-amionimidazol-szukcinokarboxamid-ribozidból. Az enzim homotetramer formában aktív, négy, egymással egyenértékű aktív helyet tartalmaz, amelyeket mindenkor három-három alegység térbeli kölcsönhatása hoz létre. Az enzim hiányát 1984-ben írták le először; azóta mintegy 30 különböző mutációra derült fény. Ezek a mutációk általában az enzim érzékeny negyedleges szerkezetét változtatják meg. Már apró szerkezeti változások is az aktív hely térszerkezetének olyan mérvű torzulásához vezetnek, hogy az enzim nem tudja szubsztrátjait megkötni, illetve sokkal sérülékenyebb lesz hődenaturációval szemben. Megfigyelték, hogy azok a mutációk, amelyek a negyedleges szerkezetet befolyásolják, mindkét szubsztrát átalakítását károsítják, míg az aktív helyekre lokalizálódó szerkezeti eltérések sokkal inkább az adenzilszukcinát átalakítását gátolják.

Az enzimhiány következtében a testfolyadékok szukcinilpurin (SAICA-ribozid és adeniloszukcinát, az enzim szubsztrátjainak defoszforilált származékai) koncentrációja erősen megemelkedik. Az érintett betegeken a pszichomotoros fejlődés lassulása, epilepszia, hipotónia és autisztikus vonások figyelhetők meg. A súlyos mentális retardációval sújtott betegpopuláció vérében az adeniloszukcinát és a SAICA-ribozid koncentrációinak aránya egyhez közeli érték, míg enyhe vagy mérsékelt szellemi károsodás esetén 2-4 közötti hányados mérhető. Ezek a megfigyelések arra utalhatnak, hogy a SAICA-ribozid lehet a neurotoxicitásért felelős metabolit, míg az adeniloszukcinát valahogyan kivédheti annak károsító hatását. Az elmélet támogatói azt is feltételezik, hogy a SAICA-ribozid agonistaként viselkedhet az NMDA-típusú glutamát-receptorokon, de ezt kísérletesen még nem sikerült bebizonyítani.

A foszforibozil-piروفوسفát-szintetáz (PRPS) már említésre került a hiperurikémia kapcsán, mert bizonyos mutációi az enzim hiperaktivitását eredményezik. Itt a jóval ritkábban előforduló funkcióvesztő mutációkat tekintjük át röviden. A PRPS enzimaktivitás hiányából fakadó kognitív defektust először 1974-ben írták le. Később a perifériás szenzoros és motoros neuropátiával járó Charcot-Marie-Tooth-szindróma egyik X-kromoszómához kötött variánsával (CMTX5), illetve az Arts-szindrómával is kapcsolatba hozták. Ebben az esetben az X-kromoszómán található, minden szövetben expresszálandó PRPS1 izoenzim defektusa van a háttérben. Az egészséges kontrollokhoz képest mintegy feleakkora enzimaktivitás jól

magyarázható azzal, hogy a PRPS2 izoenzim szerkezete és aktivitása normális. A CMTX5-ben szenvedő betegek a perifériás neuropátia mellett prelingvális típusú szenzoneuronális hallásvesztésben, látászavarban szenvednek, de mentális retardáció nem jellemző rájuk, ugyanakkor a szérumban a húgysavszint is normális.

Ezek a tünetek meglepően hasonlítanak a ritka Rosenberg-Chutorian-szindróma tünetegyüttesére. Később jöttek rá, hogy mindkét betegséget a PRPS1 gén missense mutációi okozzák (M115T a CMTX5, illetve E43D az RCS esetén). Az X-hez kötött öröklődést mutató Arts-szindróma tünetei a szellemi visszamaradottság, izomtónusgyengeség, ataxia, lassult motoros fejlődés, halláskárosodás, látóideg-atrófia és makacs fertőzések, amelyek a páciens korai halálához vezetnek. Ebben az esetben az átlagosnál alacsonyabb húgysavszint mérhető, és a vizelet hipoxantin-koncentrációja is csökkent. Ebben az esetben is a PRPS1 gén pontmutációit sikerült kimutatni (L152P és Q133P).

A pirimidin-anyagcsere legfontosabb zavarai

- **UMP-szintáz-hiány** – örökletes orotsavuria
- **pirimidin-5'-nukleotidáz-hiány** – hemolitikus anémia
- **dihidropirimidin-dehidrogenáz-hiány** – epilepszia és további neurológiai tünetek
- **dihidropirimidináz-hiány** – dihidropirimidinuria
- **timidin-foszforiláz-hiány** – mitokondriális károsodás

A pirimidin-nukleotidok anyagcseréjével kapcsolatos megbetegedések, enzimhiányos kórképek száma lényegesen kevesebb, mint a purinbázisok metabolizmusával összefüggő zavaroké. Ennek oka, hogy a pirimidinek bioszintézise és lebontása kisebb számú és egyszerűbb reakciót igényel. Az emberi szervezet naponta mintegy 450-700 mg pirimidin-nukleotidot szintetizál, ami megegyezik a napi purinszükséglettel. A mentő reakciók csak a nukleozidokat képesek kellően hasznosítani. A purin- és pirimidin-lebontás legfőbb különbsége az, hogy míg a puringyűrű nem hasad fel és vízben rosszul oldódó oxidációs termékek keletkeznek, addig a pirimidinek gyűrűje felbomlik és vízzoldékony termékek – szén-dioxid, ammónia és béta-alanin vagy béta-amino-izovajsav keletkeznek.

Egészséges egyéneknél a béta-amino-izovajsav metilmalonát-szemialdehiddé transzaminálódik és szukcinil-KoA-vá oxidálódva lép be a citrátkörbe, azonban leukémiában vagy ionizáló sugárzások okozta sejtelhalás és pirimidin-túlkínálat kapcsán nagy

TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

mennyiségben ürül a vizelettel. Autoszomális recesszív öröklődésű transzamináz-defektus következtében ugyancsak megjelenik a vizeletben, azonban semmiféle tünetet nem okoz (a távol-keleti lakosság mintegy negyedében fordul elő az enzim teljes hiánya).

Béta-alaninuria figyelhető meg a pirimidin-bázisok túltermelésével járó kórképekben, leggyakrabban a hiperurikémiához társuló foszforibozil-pirofoszfát túltermeléséhez társuló járulékos tünetként.

Örökletes orotsavuria: az UMP-szintáz hiánya

A pirimidinek *de novo* bioszintézisének utolsó két lépését a citoplazmatikus orotát-foszforiboziltranszferáz (OPRT) és az orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz (ODC) katalizálja. Ezt a két enzimaktivitást az egyetlen gén által kódolt egyazon polipeptidlánc két doménje hordozza; ezt a „tandem” enzimet szokták együttesen UMP-szintáz néven említeni. A natív enzim dimert képez. Mindkét monomeren, a linker-peptiddel összekötött OPRT- és ODC-doméneken kívül egy pirimidin-nukleotid-kötőhely is található. Az ide bekötődő monofoszfátok feedback gátlást fejtenek ki az enzim aktivitására. Limitált proteolízissel a globuláris domének jól elkülöníthetők egymástól és katalitikus funkcióik is jól vizsgálhatók. Már minimális szerkezeti változás, akár egy aminosavcsere is elég ahhoz, hogy a dimerizáció ne jöhessen létre. Ilyenkor az ODC aktivitása megszűnik, mert ez a domén csak a dimerizált enzimben aktív, ugyanakkor az OPRT-aktivitás megtartott (II-es típusú orotsavuria). Az I-es típusú orotsavuriát az UMP-szintáz teljes hiánya (mindkét enzimaktivitás elvesztése) okozza. Genetikai és biokémiai vizsgálatokkal megfelelő mennyiségben expresszálandó, de pontmutáció következtében szerkezetileg és funkcionálisan is károsodott enzimfehérjét mutattak ki. Egyetlen pontmutáció is elegendő ahhoz, hogy a dimert destabilizálja és disszociációját előidézzék. Az UMP-szintáznak ugyanakkor számos farmakológiai gátlószere is ismert, amelyekkel az enzimhiányos állapot kísérleti állatokban előidézhető és vizsgálható. Ilyen szer a köszvény kezelésére alkalmazott allopurinol, amely pirimidin-analógokkal felfüggeszthető orotsav- és orotidilsavuriát idéz elő. Hasonló hatása van a 6-azauridinnak és a barbiturátszármazékoknak is.

Az UMP-szintáz hiányának logikus következménye, hogy az orotsav – UMP átalakulás hiányában orotsav szaporodik fel a szervezetben, illetve hiányoznak a pirimidin-nukleotidok,

hiszen végső soron a citidilát és a timidilát is UMP-ből keletkezik. Az UMP-szintáz hiánya tehát változatos klinikai képpel jelentkezik; a legjellegzetesebb tünetek a következők:

1. B₁₂- és folsavrezisztens megaloblasztos anémia, amelyet leggyakrabban másfél hónapos – 7 éves kor között diagnosztizálnak. A plazma hemoglobinkoncentrációja nem több 60-80 g/L-nél, vagyis a normálérték alig fele. A betegek többségében a vérszegénység mérsékelt súlyos, viszonylag lassan súlyosbodik és szubsztitúciós urudin-terápiára nagyon jól reagál. A vörösvértestek súlyos morfológiai eltéréseket mutatnak, mindehhez csökkent neutrofil- és limfocitaszám is társul, ami másodlagos fertőzésekre hajlamosít. A vészes vérszegénység oka, hogy dUMP hiányában nem keletkezik a DNS-szintézishez elegendő mennyiségű timinnukleotid. Az RNS-szintézis kevésbé érintett, ezért a vörösvértest-előalakok jellegzetes magsejtplazma érési disszociációt mutatnak. Az adekvát terápia szempontjából nagyon fontos az UMP-szintáz defektusa nyomán megfigyelhető, illetve a folát- vagy B₁₂-hiány következtében fellépő vérszegénység differenciál-diagnózisa. Utóbbi esetben a timidilát-szintáz N⁵, N¹⁰-metilén-tetrahidrofolsavval való ellátása nem megfelelő.

2. A vizelettel nagy mennyiségű (akár napi egy-másfél grammnyi) orotsav ürül, kicsapódva kristályokat képez, tubuláris elzáródást okoz (orotsavkristályok szinte kizárólag csak enzimdefektus esetén keletkeznek, szekunder orotsavuriában nem). A vizelet orotát-tartalma legegyszerűbben kolorimetriával mérhető, ám a meghatározást számos egyéb vegyület befolyásolja, ezért a pontos méréshez kromatográfiás elválasztás vagy izotópdilúciós technika alkalmazandó. A normális napi orotsav-kiválasztás nem haladja meg a 10 μmol/mmol kreatinin mennyiséget.

3. Az idegrendszeri tünetekért (agyi keringési-, intellektuális és motoros zavarok, izomgyengeség, hipotóniás izomzat, indíték- és mozgásszegénység, kétoldali kancsalság) az UDP és UTP hiánya a felelős, amelyeknek a látgyagyhártya ereiben kifejezett értágító hatása van.

4. A súlyos szív-érrendszeri fejlődési rendellenességek, illetve a születés után egyre súlyosbodó általános izomgyengeség mögött az izomszövetek normális anyagcseréjéhez

szükséges aktivált nukleotid-származékok (UDP-cukrok, CMP-neuraminsav, CDP-kolin, -etanolamin és -diacil-glicerol) hiánya áll.

5. Az immunrendszer érintettsége a purin-nukleozid-foszforiláz-hiányban észlelt klinikai képhez hasonló: a limfociták száma csökkent, elsősorban a celluláris immunválasz károsodott, míg a humorális nem érintett. Az immunhiányt egy, máig még nem azonosított toxikus metabolit számlájára írják.

A betegség kezelésében a pirimidin-szubsztitúció általában látványos eredményeket hoz. Az uridin mellékhatások nélkül adható; a mentő reakciók segítségével UMP-vé alakul, amely gátolja a de novo orotátszintézist és egyúttal a hiányzó összes pirimidin-nukleotidot is pótolja. Érdekesség, hogy a magzat pirimidin-szükségletének kb. 50%-át az anyai vérből fedezi, így akár teljes UMP-szintáz-deficiencia esetén is elegendő timin- és citozinszármazékot vehet fel. Amennyiben viszont a placentáris pirimidintranszport károsodott, a magzat már az említett fejlődési rendellenességekkel születik.

Tüneti kezelésként kortikoszteroidok adhatók, amelyek a vérképet rövid időn belül normalizálják.

Fontos megjegyezni, hogy az UMP-szintáz defektusán túl számos egyéb anyagcserezavar is orotsavuriához vezethet. Érdekes patomechanizmusa van például az ureaciklus egyik mitokondriális enzime, az ornitin-transzkarbamiláz hiányában megfigyelhető orotsav-túltermelésnek. Ilyenkor a mátrixban felhalmozódó karbamil-foszfát a citoplazmába diffundál s a pirimidin-bioszintézisbe csatlakozva fokozza annak sebességét (a karbamil-foszfát az ureaciklus és a pirimidin-szintézis közös intermedierje). Ez a jelenség a mitokondriális belső membrán bármilyen okból fellépő károsodásánál is megfigyelhető, így pl. a zsírmájjal és agykárosodással járó Reye-szindrómához társult orotsavuria hátterét is megmagyarázza.

Az ureaciklus többi enzimének hiánya hasonlóképpen vezethet orotsavuriához, ami egyébként a foszforibozil-pirofoszfát-szintetáz vagy a purin-nukleozid-foszforiláz hiányában, terhességben és néhány gyógyszer (allopurinol, oxipurinol, 6-azauridin) mellékhatásaként is megjelenhet.

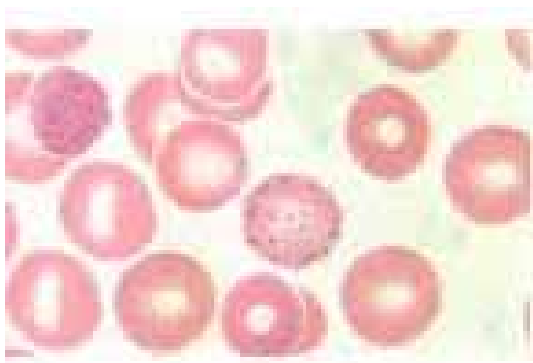
Pirimidin-5'-nukleotidáz-hiány

Az UMP-hidroláznak is nevezett enzim a pirimidin-5'-monofoszfátok nukleozidokká történő defoszforilációjáért felelős. Aktivitása AMP-vel, purinbázisokkal, illetve purin- és pirimidin-nukleozidokkal gátolható. Több izoenzime létezik.

Az enzimhiány következtében a vörösvértestek citoplazmájának pirimidin-nukleotid-koncentrációja erősen megemelkedik. Kromatográfiás elválasztásuk során kiderült, hogy a TÁMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

citozin-nukleotidok, s közülük is a trifoszfát mennyisége a legmagasabb. A CDP-etanolamin és a CDP-kolin szintje is fokozott, de a membrán-foszfolipidek anyagcseréjének lényeges megváltozását nem mutatták ki.

A vezető klinikai tünet a hemolitikus anémia és a következményes lépmeagnagyobbodás együttese. A vörösvérsejtek jellegzetes bazofil pettyezettséget mutatnak, ami kórjelző értékű (15. ábra). UV-spektroszkópiás vizsgálatok a citozin és uracil-nukleotidok elnyelési maximumán kifejezett abszorpciós csúcsokat jeleznek. Izotópos vizsgálatokkal kimutatható,



hogy a vörösvértestek citoplazmájában felhalmozódó nukleotidok forrása uridin helyett az orotsav.

15. ábra. Jellegzetes bazofil pettyezettségű vörösvérsejtek pirimidin-5'-nukleotidáz-hiányban

A plazmamembránon keresztül történő orotáttranszport gátlása alkalmas eszköznek ígérkezik a hemolízis kezelésére; az erre alkalmas gyógyszer kifejlesztése folyamatban van.

Dihidropirimidin-dehidrogenáz-hiány

A dihidropirimidin-dehidrogenáz az uracil és a timin lebontásának NADPH-dependens, sebességmeghatározó lépését katalizálja; a reakció termékei a dihidrouracil és a dihidrotimin. Az enzim defektusa rendkívül szerteágazó klinikai tüneteket eredményezhet, amelyek közül a hányásos rohamok és testi-szellemi fejlődési visszamaradottság, epilepsziás görcsrohamok, mikrokefália, táplálási nehézségek, autizmus és spasztikus tónusfokozódás a legjellemzőbbek. A diagnózis felállítása a vizelet magas uracil-, 5-hidroximetil-uracil- és timin-koncentrációján, valamint a szövetekben mérhető alacsony vagy teljességgel hiányzó enzimaktivitáson alapszik. Az oki terápia még nem megoldott. Elképzelhető, hogy a kórkép markáns idegrendszeri manifesztációit a béta-aminosavak csökkent képződése okozza. A béta-amino-izovajsav a központi idegrendszer egyik legfontosabb gátló neurotranszmitterének, a gamma-amino-vajsavnak (GABA) konstitúciós izomere, és kimutatták, hogy a GABA- és glicinreceptorokon is parciális agonistaként működhet. Az

epileptiform görcsöket és a tónusfokozódást jól magyarázhatja e gátló hatású agonista kiesése.

Az alacsony enzimaktivitásra gyakran csak felnőttkorban derül fény annak kapcsán, hogy a daganatos beteg súlyos, toxikus tünetekkel reagál az 5-fluoro-uracilra, amely az egyik leggyakrabban használt kemoterápiás szer szolid tumorok kezelésére. A mérgezéses tüneteket az enzimhiány következtében toxikus plazmakoncentrációt elérő antimetabolit okozza. Az 5-fluoro-uracillal történő kezelés megkezdése előtt tehát enzimaktivitás-méréssel feltétlenül ki kell zárni a dihidropirimidin-dehidrogenáz enzim hiányát.

Dihidropirimidinuria

A vizelettel nagy mennyiségben ürülő dihidrouracil és dihidrotimin a dihidropirimidináz enzim defektusát jelzi. Eddig kb. húsz gyermekben diagnosztizálták a betegséget, akik epileptiform tüneteket, átmeneti tudatzavart és szellemi visszamaradottságot mutattak. Megfelelő szűrőpapír-gyorstesztel már a vizeletből is kimutathatók a dihidropirimidin-származékok, hasonlóan a fenilketonuria szűrésére bevezetett módszerhez.

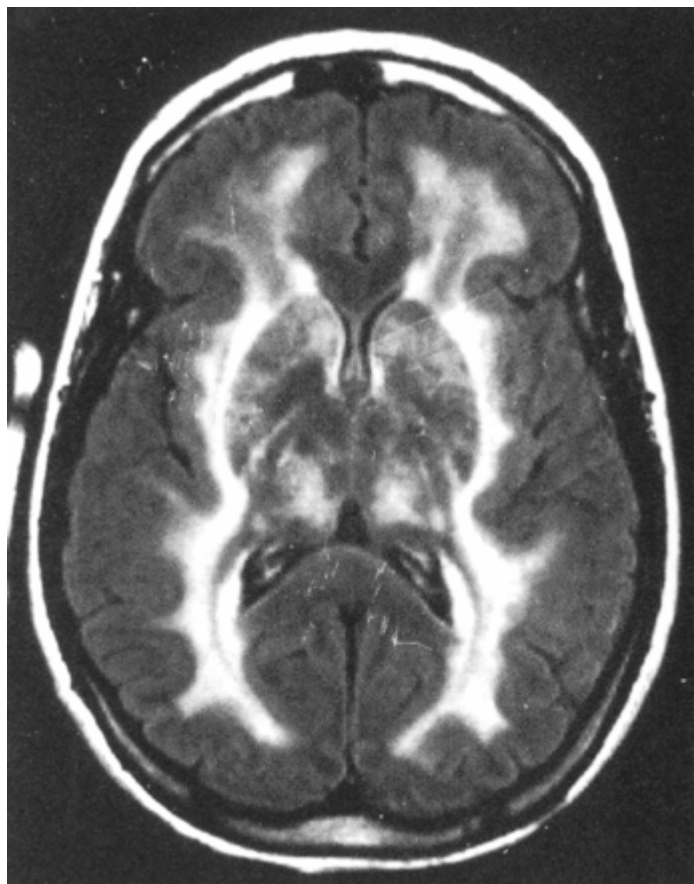
Timidin-foszforiláz-hiány

A timidin-foszforiláz, amely azonos a PDGF növekedési faktorról (platelet derived endothelial cell growth factor), illetve a gliostatinnal, a pirimidin-dezoxinukleozidok (dezoxitimidin és dezoxiuridin) foszforolízisét katalizálja, termékei a megfelelő bázisok és a dezoxiribóz-1-foszfát. A humán enzim homodimer formában aktív, molekulatömege 90 kDa. Legnagyobb mennyiségben a vérlemezkék és a placenta tartalmazzák, de emellett a nyirokcsomókból, lépéből, a májból, tüdőből és perifériás limfocitákból is kimutatható.

Egészséges egyéneken a dezoxipirimidin-nukleozidok szinte teljes hiánya a timidin-foszforiláz számlájára írható. Az enzim hiányában dThd és dUrd halmozódnak fel a plazmában, mert a vesén keresztül történő kiválasztásuk nem túl hatékony; filtrációjukat gyakorlatilag teljes reabszorpció követi. A két nukleozid intracelluláris koncentrációja is nagyon magas, a mentő utakon a megfelelő trifoszfátokká alakulnak és a dTTP magas koncentrációja mindenekelőtt a mitokondriális dNTP-poolokban okoz arányeltolódást. A TAMOP-4.1.2/A/2-10/1-2010-0008 "Képzés- és Tartalomfejlesztés a Semmelweis Egyetemen". Szemináriumi anyagok fejlesztése – SE Orvosi Vegytani Intézet

mitokondriális poolok érintettsége két okra vezethető vissza. Egyrészt a sejtmagi DNS-hez képest a mitokondriális DNS-replikáció sokkal inkább a timidinmentő utak aktivitásának függvénye, mert a genomiális DNS döntően a de novo dNTP-szintézis kap utánpótlást. Másrészt a mitokondriumokban gyakorlatilag nem létezik egy hatékony hibajavító mechanizmus, amely a poolok eltolódásából fakadó DNS-töréseket kijavíthatná. Ennek következtében számtalan deléció, pontmutációk és DNS-depléció alakulnak ki a mitokondriumokban. Hasonló mellékhatásokat okozhat a nukleozid-analógokkal végzett kemoterápia is, egyes nukleozid-analógok ugyanis gátolhatják a mitokondriális DNS-polimeráz-gammát.

A TK2 mutációi a mitokondriális neurogastrointesztinális encefalomiopátia (MNGIE) nevű, autoszomális recesszíven öröklődő, sokszervi károsodással járó betegséget okozza. A vezető klinikai tünetek közé a finom szemmozgások zavara, majd teljes bénulása, a szemhéj lógása, a gastrointesztinális perisztaltika zavarai, perifériás neuro- és miopátia, illetve központi idegrendszeri leukoencefalopátia tartoznak (16. ábra). Érdekes módon a harántcsíkolt izomrostok annak ellenére károsodnak, hogy az izomszövet a timidin-foszforilázt egyáltalán nem expresszálja. A szakirodalomban „izomparadoxként” emlegetett jelenség oka az lehet, hogy a dThd és dUrd magas extracelluláris koncentrációja következtében az izomrost citoszóljában is megemelkedik e két nukleotid szintje részben azok sejtbe történő felvétele, részben az endogén dezoxipirimidinek sejtbe történő kiáramlásának gátlása miatt.



16. ábra. MNGIE-ben szenvedő beteg agyi MRI-felvétele. Jellegzetes tünet a fehérállomány erős jelintenzitása.