

## ZÁRÓ SZAKMAI BESZÁMOLÓ

Cím: *A súlyos veleszületett neutropénia genetikai hátterének magyarországi feltérképezése és a betegség hátterében lévő tényezők megismerése*

A téma száma: OTKA 101226

A munka kezdete és befejezése: 2012. február 1 – 2016. május 31.

### *Személyi vonatkozások*

A kutatási szerződésben szereplő kutatók közül Dr. Száraz Péter posztdoktorális ösztöndíjjal Kanadában folytatta tudományos munkáját, Dr. Kereszturi Éva szülési szabadságra, majd GYED-re ment, így a projekt végig már nem vettek részt a kísérletes munkában.

A laboratóriumból távozó kollégák feladatait Dr. Bögel Gábor posztdoktorális munkatárs, Dr. Pittner Rebeka és Dr. Lédeczi Zsigmond PhD hallgató, valamint Fabian Plank és Michelle Klein tudományos diákkörösök vették át, így egy rövid ideig tartó visszaesés után biztosítottuk a folyamatos munkamenetet.

### *Bevezetés*

Számos anyagcsere-betegség kísérő tünete neutropénia, neutrofil apoptózis és neutrofil funkciózavar. A legtöbb esetben nem ismert a jelenség hátterében álló ok. Munkacsoportunk régóta foglalkozik endoplazmás retikulum (ER) fehérjével, ezért olyan ER fehérjék vizsgálatát tűztük ki célul, melyek neutrofil funkciózavarhoz vezetnek. Korábban a glukóz-6-foszfát transzportert, jelenleg elsősorban a glukóz-6-foszfátáz bétát (G6PC3) és az ADP dependens glukokinázt (ADPGK) – melynek a glukóz-6-foszfát a terméke - vizsgáltuk. Epidemiológiai célkitűzése is volt a pályázatnak, hiszen Magyarországon eddig nem voltak, vagy nagyon kis esetszámban voltak genetikai háttérrel feltérképezve a neutropéniával járó (anyagcsere) betegségek. Európai adatok alapján 3-5 beteg/1000000 lakos az előfordulási aránya a veleszületett súlyos neutropéniának (Kostmann szindróma, SCN). Magyarországon ez nagyjából 30-50 SCN beteget jelent.

### ***A pályázat témájában elért eredmények***

#### *Vizsgált betegek*

Az epidemiológiai cél kitűzése és eredménye nem bizonyult annyira hatékonyak, mint azt reméltük. Külföldi posztdoktorális tanulmányúton szerzett tapasztalatok alapján terveztük a külföldön látott példát itthon megvalósítani. Munkacsoportunk 21 esetben vizsgált humán DNS mintákat. A kontroll vizsgálatokhoz szükséges granulocitákat az Országos Vérellátó Szolgálatól vásárolt anonimizált vérkészítményből – „buffy coat”-ból – izoláltuk. A vizsgálatokat az ETT-TUKEB engedélyének birtokában végeztük.

A kapott minták feldolgozása során felmerült a probléma, hogy bár a minták az anamnézis és a heteroanamnézis alapján neutropéniás betegektől származnak, mégis a klinikai kép nem volt összhangban a vérképből rendelkezésünkre álló - időnként alacsony - fehérvérsejt-számokkal.

A vizsgálatba bevont betegek életkora 6 hó és 36 év között változott, a fehérvérsejt-számok 1,31 G/l és 11,0 G/l között voltak. A neutrofil granulociták értékei 0,2G/l és 9,56 G/l között mozogtak a vérvételek idején.

Öt esetben társultak súlyos klinikai tünetek a neutropéniához, úgymint visszatérő bakteriális bőr-, felsőlégti-, húgyuti fertőzések, aphtózus sztomatitis, gombás fertőzések, urogenitális és/vagy pulmonális malformációk, fejlődési visszamaradottság. Négy esetben enyhébb bakteriális fertőzés jelentkezett nagyobb gyakorisággal, míg a többség esetében nem voltak a korosztálynak megfelelő fertőzéseken kívül egyéb tünetek. Azokban az esetekben, ahol a vérvétel idején normális fehérvérsejtszám és neutrofil granulocita szám volt megfigyelhető, azért végeztük el a szekvenálásokat, mert az anamnézisben heteroanamnézisben gyakran előfordult laborvizsgálatok esetében granulocitopénia, amely a vizsgálat időpontjában nem volt detektálható. Ilyen esetek főleg az első három évben fordultak elő. Az első három év eredményeit bemutattuk a Magyar Gyermekgyógyászok és Gyermek-hematológusok Társasága évi munkaértekezletén 2015 januárjában. A munkaértekezleten más előadóktól elhangzottak egybevágtak saját megfigyeléseinkkel. Azokban a mintákban, ahol bár csökkent volt a neutrofil sejtek száma, viszont a klinikai kép, ill. az epikrizis teljesen „átlagos” eseteket írt le, nem találtunk eltérést. Klinikus kollégákkal konzultálva arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek benignus neutropéniák, és bár valószínűleg veleszületettek, idővel elmúlnak. Miután a megszokottól súlyosabb fertőzések nem léptek fel, ezeket az eseteket nem tekintettük SCN betegekné.

Ezek után szigorúbb beválasztási és kizárási kritériumokat vezettünk be, hiszen kiderült, hogy számos esetben granulocitopénia megfigyelhető kiemelkedő klinikai tünetek nélkül is. Bevonási minimál kritériumok lettek a szokatlanul gyakori fertőzések, vagy rekurrens bőr, vagy léguti bakteriális fertőzések, illetve tüdőgyulladás és két éves kor fölött krónikus aphtózus sztomatitis voltak a neutropénia mellett. A kutatás utolsó évében ennek fényében kevesebb beteget tudtunk bevonni a kutatásba.

#### *A szekvenálások eredménye*

A legfontosabb szekvenálási eredményünk egy beteg esetében diagnosztikus volt a G6PC3-mal kapcsolatban. Kimutattunk egy G/C nonszensz mutációt a G6PC3 gén 141. bázisa helyén. Ennek következménye, hogy a G6PC3 első exonjában a 47. aminosav beépülése helyett a fehérje terminálódik - Tyr --> STOP. Ezek után természetesen a családtagok G6PC3 szekvenciáját is megvizsgáltuk. A mutáció heterozigóta formában mind a két egészséges szülőben megtalálható, de ez náluk betegséget, tüneteket nem okoz. A fenti betegnek van egy egészséges testvére, akinek szintén megvizsgáltuk a G6PC3 génjét, ő mindkét szülőtől a jó allélt örökölte. Ezek alapján sikeresen igazoltuk a betegség hátterében álló mutációt, amely az első magyarországi SCNIV-es beteget jelenti.

*Az ELA2-t kódoló gén esetében:*

- kimutattuk a már ismert rs137854451 ELA2 mutációt az 5. exonban. A mutációt szekvenáláson kívül RFLP-vel is igazoltuk. A mutáció misszensz - Gly185Arg - és minden esetben súlyos lefolyású betegség képében jelentkezik. A mutációt mi is súlyos betegnél mutattuk ki, aki a betegség progressziója következtében exitált.
- G/A, heterozigóta mutáció a 3. exonban; autoszomális domináns --> Val72Met; rs137854449, már leírt patogén mutáció;
- G deléción az 5. (utolsó) exonban; kereteltolódás; korábbi stop kodon, azaz triptofán helyett leáll a szintézis --> W241Term; ezt a mutációt eddig egyszer írták le;

Egyéb eltérések, amelyeket a szekvenálások során találtunk, de jelen ismereteink szerint nem köthetők a betegséghez:

*GFI-t kódoló génben:*

- a 2. intron régióban GCCCCGCCTGGCCCGCGCGC deléción, heterozigóta, rs150506480;
- 5'UTR régióban T/G polimorfizmus, heterozigóta, rs72962659;
- 3. exonban T/C polimorfizmus heterozigóta, nem okoz aminosav cserét – Cys/Cys, rs11164605;

*G6PC3-t kódoló génben*

- 5'UTR régióban C/T polimorfizmus, heterozigóta, rs228758;
- 5'UTR régióban C/A polimorfizmus, heterozigóta, nincs az adatbázisban;
- 3' UTR régióban C/G polimorfizmus, heterozigóta, rs1046770;

*ADPGK-t kódoló génben:*

- két betegnél (testvérek): ADPGK exonban ismert SNP rs34149613, Ser437Leu;
- négy betegnél: SNP rs228758 C/T - intron régióban;

Két betegben csökkent granulocita funkciót, és a Grp78, mint endoplazmás retikulum stressz marker fokozott expresszióját mutattunk ki, de eltérést az általunk vizsgált génekben nem találtunk.

#### *A G6PC3 kiesésének következményei*

Hipotézisünk szerint a granulocitákban a fokozott glukóz-6-foszfát termelés a szubsztrát kínálat növelése révén befolyásolhatja a lumenális G6P metabolizmust a granulociták érése során, így kihatással lehet az ER belső homeosztázisára.

Az eddigi egyetlen SCNIV-es beteg esetében fehérvérsejtből endoplazmás retikulum stressz-markereket, illetve a betegséghez vezető egyéb, főleg apoptózishoz vezető fehérjéket mértünk immunblot technikával. Az eredményeink azt mutatják, hogy ebben a betegben a stresszfehérjék közül a BiP, a P-Perk, a P-eIF2- $\alpha$  szintje emelkedett meg, míg az ATF4 és a CHOP csökkent volt. Érdekes, hogy a H6PD is csökkent volt a vizsgált mintában a kontrollhoz képest. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy bár fennáll fokozott endoplazmás retikulum (ER) stressz a G6PC3

kiesése miatt, és ez ER stressz következtében beindíthatja az apoptotikus utakat. A mintákban ez a fehérjék szintjén nem mutatkozik meg, hiszen az ATF4 és a CHOP nem volt emelkedett. Ennek okát nem könnyű megtalálni, hiszen figyelembe kell azt is venni, hogy a beteg rendszeresen G-CSF-et kap. Emellett rendszeresen részesül E-vitamin szupplementációban, ami feltehetően ellensúlyozza az ER-stressz okozta molekuláris változásokat. Ezeket a változásokat jelenleg túltermeltetett, illetve géncsendesített sejtenyészeteken, mint modelleken vizsgáljuk.

### *G6PC3 enzimaktivitásának vizsgálata*

Beállítottuk a számunkra alkalmas foszfátkimutatáson alapuló foszfatáz-aktivitás mérését. Különböző szubsztrátokat vizsgáltunk (először) patkány máj (negatív kontroll), illetve here mikroszómán. Ez utóbbi szövetben a G6PC3 expressziója körülbelül tízszerese a többi szövetének. Ezen kívül teljes patkányhere-homogenátumból és mikroszómából tisztítottuk a G6PC3-mat. Fehérjetisztítás után mért aktivitások azt mutatják, hogy egyszeri DEAE-szefaróz tisztítással külön lehet választani a 6-foszfoglukonát (6PG) aktivitást a glukóz-6-foszfát (G6P) aktivitástól. Az enzim fenil-szefarózos oszloppal már nem tisztítható tovább. Az aktivitások jól korrelálnak a Western-blottal kimutatható G6PC3-mat tartalmazó frakciókban. A legmagasabb 6PG foszfatáz aktivitással rendelkező frakció segítségével egyéb terminális szénhidrát-foszfát hidroláz aktivitásokat is megmértünk. A szakirodalomban nem található megbízható adatok ezzel kapcsolatban. A legmagasabb aktivitást xilulóz-5-foszfáttal kaptuk, amely a 6PG aktivitásánál nagyjából tízszerese. Ezt követte csökkenő sorrendben a ribóz-5-foszfát-, szorbitol-6-foszfát-, illetve a fruktóz-6-foszfát foszfatáz aktivitása. A legkisebb aktivitást G6P-tal és eritroz-4-foszfáttal kaptuk, előbbinél a 6PG-foszfatáz aktivitása nagyjából kétszerese. A méréseket G6PC3-mal túltermeltetett HEK sejtekben is elvégeztük, melyek az előzőekkel teljesen egybevágnak.

Az irodalmi adatok és saját méréseink is azt mutatják, hogy SCN-ben a granulociták szénhidrát-anyagcseréje érintett. Megvizsgáltunk a glukóz metabolizmusában részt vevő endoplazmás retikulumhoz kötődő fehérjék expresszióját is in vitro sejtenyészetben. Kísérleti alanyként HL-60-as sejteket használtunk, melyek differenciálhatóak mind granulocita jellegű sejté, mind makrofágokká. A G6PC3, H6PD, G6PT és az ADPGK fehérjék expresszióját vizsgáltuk meg mRNS és fehérje szinten a HL-60-as sejtek differenciációja során (RT-PCR, Western-blot). Eredményeink azt mutatták, hogy a G6PC3, ill. G6PT mennyisége nem változik sem mRNS, sem fehérje szinten a differenciálódás során. Az ADPGK jelentősen indukálódik mind RT-PCR-rel vizsgálva, mind fehérje szinten. Az indukció arányos a differenciálódott sejtek számával. Az enzimaktivitás mérések szintén alátámasztják ezt az indukciót. A H6PD mRNS szintén indukálódik az RT-PCR szerint. A fehérjevizsgálatok egyértelműen az érintett enzimek indukcióját támasztják alá, ez utóbbi fehérjéhez az enzimaktivitás mérések még folyamatban vannak.

### *HL-60 differenciálódása során indukálódó ADPGK vizsgálata*

Az enzimnek ADP és glukóz a szubsztrátja, termékei a glukóz-6-foszfát és AMP. Lokalizációja ER-hez kötött, az aktív centruma a citoplazma felé mutat. Az ADPGK expressziója tízszeres emelkedést mutatott DMSO-val differenciált HL-60-as sejtekben a differenciálatlanokhoz képest. Az indukciót fehérje szinten is megerősítettük. C<sup>14</sup>-gyel jelölt glukóz és ioncserélő kromatográfia segítségével specifikus aktivitásemelkedést is kimutattunk. A mért aktivitások a nem differenciált vs. differenciált sejtekben a következők voltak:  $3.743 \pm 0.2641$  U/mg prot. vs  $5.039 \pm 0.1321$  U/mg prot. (átlag  $\pm$  SEM, n= 10 és 18 között,  $p < 0,001$ ). Az enzimaktivitásokat fluoriméterrel NADPH termelésen alapuló módszerrel is megmértük. Az eredmények egyeztek a radioaktív méréseknél kapottakkal.

Az eukarióta ADPGK-ról egyelőre kevés publikáció jelent meg és a funkciója is ismeretlen. Feltételezéseink szerint a granulocita irányba differenciálódott HL-60 sejtekben az ADPGK indukciója teszi lehetővé, hogy a sejtek az „oxidatív burst”-höz szükséges NAPDH generálásához megfelelő mennyiségű glukóz-6-foszfátot G6P tudjanak termelni. Hipotézisünk felállításához ADPGK siRNS-sel csendesített differenciált HL-60-as sejteket használtunk. Az expresszió és enzimaktivitás a géncsendesített sejtekben szignifikánsan alacsonyabb volt. A funkcionális vizsgálatokhoz forbol-észterrel aktivált differenciálódott HL-60-as sejteken szuperoxid termelést mértünk. Az ADPGK siRNS-sel kezelt sejtekben szignifikánsan kevesebb szuperoxid termelődött a kontroll sejtekhez képest. Ezzel igazolni látjuk, hogy ADPGK-ra granulocita jellegű sejtekben a megfelelő mértékű szuperoxid termeléshez van szükség. Az ADPGK-t szintén tisztítottunk fehérvérsejtekből, majd karakterizáltuk. Két anioncserélő és egy hidroxipatit tisztítási lépés után a fehérje továbbra is aktív, a specifikus aktivitása körülbelül 360 szorosa a kiindulási értéknek. További tisztítási lépések jelenleg folyamatban vannak. Feltételezéseink szerint az enzim hiánya fokozott bakteriális fertőzésekhez vezethet, de erre vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésünkre. Az ADPGK szerepe ezen kívül granulocitákban - feltételezhetően - az érés során a fokozott G6P termelés, amely a szubsztrátkínálat növelése révén befolyásolhatja az ER lumenális G6P metabolizmust.

### *Egyéb*

A pályázat időtartama alatt az OTKA pályázatnak is köszönhetően megalakítottuk az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben az önálló „Ritka anyagcsere-betegségek munkacsoport”-ot.

*Összefoglalóan a legfontosabb eredmények, melyeket a pályázat ideje alatt elértünk:*

- Rutinszerűen használható szekvenálási módszert állítottunk be a következő SCN-t okozó gének esetében:  
G6PC3, ELA2, GFI, WASP, ADPGK
- Diagnosztizáltuk az első magyarországi SCNIV –ben szenvedő G6PC3-mutációt hordozó beteget.
- Súlyos SCN-es betegnél diagnosztizáltunk egy ritka mutációt az ELA2 génben.

- Három esetben tudtuk kimutatni ELA2 mutációját SCN esetében, és egy esetben a G6PC3 mutációját. Ezek az eredmények alulreprezentálják a feltételezett SCN-es betegek számát.
- Kimutattuk, hogy a G6PC3 fehérjének van más szubsztrátja is a glukóz-6-foszfáton kívül.
- A terminális szénhidrát-foszfátok közül a G6PC3 emelkedett aktivitást mutat xilulóz-5-foszfáttal, ribóz-5-foszfáttal, szorbitol-6-foszfáttal, illetve fruktóz-6-foszfáttal, valamint jelentős aktivitása van 6-foszfoglukonáttal.
- Kimutattuk az ADPGK szerepét granulociták szuperoxid termelésében.
- Megállapítottuk, hogy klasszikus fehérjetisztítási módszerekkel az ADPGK fehérvérszövetekből tisztítható, funkcióját megtartja.

### *Eredmények bemutatása*

Kísérleti eredményeinket először a 2012-es horvát, szlovén és magyar biokémiai egyesületek első közös nemzetközi konferenciáján Opatijában poszter formájában mutattuk be (FEBS3+ Meeting, Opatija, Június 13-16., 2012). A későbbiekben a következő tudományos szimpóziumokon, konferenciákon mutattuk be eredményeinket:

- A Magyar Élettani, Farmakológiai és Mikrocirkulációs Társaságok 2013. évi Közös Tudományos Kongresszusa 2013. június 5-8., Budapest: *„Szénhidrát-anyagcserében részt vevő fehérjék vizsgálata HL-60 sejtek differenciálódása során”*
- A MGYT-MIT-MAKIT Gyermekimmunológiai Munkacsoport ülése 2013. december 6-7., Bükfürdő: *„ADP függő glukokináz szerepe leukociták szuperoxid termelésében”*
- FEBS-EMBO Konferencia, Párizs, 2014. augusztus: *„The role of ADP dependent glucokinase in the peroxide production of HL-60 cells”*
- MBKE - Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése Debrecen, 2014. augusztus: *„Role of ADP dependent glucokinase in respiratory burst of differentiated HL-60 cells”*
- MGYGYT – Magyar Gyermekgyógyászok és Gyermek-hematológusok Társasága évi munkaértekezlete 2015. január: *„A súlyos veleszületett neutropénia (SCN) genetikai hátterének magyarországi feltérképezése és a betegség hátterében lévő tényezők megismerése”*
- 20th Congress of European Hematology Association (EHA), 2015. június 11-14., Bécs: *„Endoplasmic reticulum stress response in G6PC3 deficient white blood cells”*
- 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), 2015. július 4-9., Berlin: *„G6PC3 deficient human white blood cells exhibit distinct endoplasmic reticulum stress response”*
- Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet szemináriuma 2015. december 9., Budapest: *„Glukóz-6-foszfát metabolizmusa extrahepatikus szövetekben”*
- Semmelweis Egyetem PhD tudományos napok 2016. április 7-8, Budapest. : *„Endoplasmic reticulum stress response in G6PC3 deficient white blood cells”*
- 46. Membrán-Transzport Konferencia, 2016. május 17-20. Sümeg: *„Glükóz-6-foszfát- $\beta$  szubsztrátspecifitásának és biológiai jelentőségének vizsgálata”*