

Michał Skulski

Analiza podłoża molekularnego przypadku nieznanej anemii hemolitycznej z zastosowaniem wysokosprawnych metod sekwencjonowania.

Streszczenie

Anemie hemolityczne są grupą schorzeń, które łączy wspólny mianownik - szybki, wewnątrznaczyniowy rozpad erytrocytów spowodowany nieprawidłową ich budową. Najliczniej spotykanymi defektami są membranopatie i enzymopatie, charakteryzujące się występowaniem odpowiednio zaburzeń w organizacji błony erytrocytarnej i deficytami enzymów, takich jak na przykład dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, katalizująca pierwszą reakcję w szlaku pentozofosforanowym. Pomimo dobrego poznania podstaw molekularnych wielu przypadków wspomnianych powyżej anemii wciąż diagnozowane są ich nowe rodzaje, wymagające dla właściwej terapii szczegółowej diagnostyki genetycznej. W niniejszej pracy podjęto próbę określenia podłoża molekularnego anemii hemolitycznej, której fenotyp nie odpowiada żadnemu opisanemu do tej pory w literaturze.

Erytrocyty jako komórki pozbawione jądra nie są dobrym punktem wyjścia do analiz molekularnych, dlatego wybrano retikulocyty - prekursor erytrocytów, posiadające materiał genetyczny w postaci RNA. Choć istnieje wiele metod izolacji, to nie zapewniają one odpowiedniej wydajności w przypadku wykorzystania krwi obwodowej osób zdrowych, charakteryzujących się niską ilością krążących retikulocytów (0,5 - 2,9%). Ponadto dla analizy transkryptomicznej (RNA-Seq) istotna jest czystość materiału, w tym przypadku przekładająca się na odseparowanie frakcji komórek jądrzastych, mogących stanowić źródło artefaktów. Wykorzystując opisane wcześniej techniki podjęto próbę opracowania nowej metody izolacji retikulocytów, opartej kolejno na filtracji leukocytów, separacji w gradientach Ficoll-paque'u i Percollu oraz separacji immunomagnetycznej z wykorzystaniem systemu mikrokulek opłaszczonych odpowiednimi przeciwciałami. Wyizolowane z tak otrzymanej puli retikulocytów RNA (cDNA) było wolne od transkryptów charakterystycznych dla komórek jądrzastych, a także wolne od genomowego DNA. Przeprowadzona w następnym etapie analiza danych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA wykazała obniżenie ekspresji dziewięciu genów, jednakże żaden z nich nie okazał się powiązany z fenotypem anemii hemolitycznej. W związku z tym, że niemożliwe było wytypowanie relatywnie małej puli transkryptów w celu weryfikacji metodami biologii molekularnej zdecydowano o przeprowadzeniu sekwencjonowania całego eksomu (WES) pacjentów N61 i N62

z nieznaną anemią hemolityczną. Uzyskane z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych dane wykazały u pacjentów N61 i N62 heterozygotyczną mutację o bardzo niskiej częstotliwości w populacji w genie *NT5C3A*, skutkującą delecją reszty fenyloalaniny w pozycji 149 łańcucha aminokwasowego cytozolowej 5'-nukleotydazy 3A, która jest białkiem enzymatycznym, zaangażowanym w metabolizm nukleotydów pirymidynowych. Genotypowanie tej zmiany (c. 444_446delGTT) na poziomie mRNA/cDNA ujawniło, że w sekwencji 4. wariantu transkrypcyjnego, charakterystycznego dla retikulocytów, mutacja ta występuje w postaci homozygotycznej u pacjentów oraz nie jest wykrywana zarówno u asymptomatycznych członków rodziny jak i u kontroli, a także nie jest wykrywany allel prawidłowy. Przy pomocy techniki Western blot wykazano całkowity brak pasma charakterystycznego dla cytozolowej 5'-nukleotydazy pirymidynowej 3A w próbkach cytozolu erytrocytarnego pacjentów co znajduje odzwierciedlenie w danych uzyskanych z pomiarów aktywności enzymatycznej (widoczny brak lub minimalna aktywność katalityczna wobec UMP). Co więcej, stosunek nukleotydów purynowych do pirymidynowych jest u nich około 2,5-krotnie niższy niż u asymptomatycznych członków rodziny i kontroli, co sugeruje całkowite zahamowanie szlaku degradacji pirymidyn oraz ich akumulację. Ponadto w obrazie WB zaobserwowano u ojca N91 obniżenie ilości analizowanego białka o około 60%, choć aktywność enzymatyczna pozostaje u niego w normie, co można tłumaczyć obecnością tylko jednego (prawidłowego) allelu genu *NT5C3A* w transkryptomie jego retikulocytów oraz możliwą nieznaną mutacją w miRNA lub czynniku transkrypcyjnym, regulującym ekspresję omawianego genu. Prawdopodobnie ta sama przyczyna leży u podstaw obecności tylko zmutowanego allelu wykrywanego w transkryptomie retikulocytów pacjentów HA.

Przeprowadzone badania nie pozwoliły wyjaśnić obecności tylko zmutowanego allelu genu *NT5C3A* w transkryptomie retikulocytów pacjentów N61 i N62, niemniej jednak wykazały, że mutacja skutkująca delecją F-149 w cytozolowej 5'-nukleotydazie pirymidynowej 3A zdaje się być bezpośrednią przyczyną obserwowanych u pacjentów N61 i N62 efektów fenotypowych. Dalsze badania są niezbędne, by poznać mechanizm molekularny obserwowanego zaburzenia ekspresji.