

# A LUMINÁLIS HEXÓZ-6-FOSZFÁT-DEHIDROGENÁZ ENZIM HIÁNYÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN MIELOID HL-60 SEJTVONALBAN

Lédeczi Zsigmond, Németh Klaudia, Kardon Tamás, Legeza Balázs

Semmelweis Egyetem, Biokémiai és Molekuláris biológiai Intézet, Molekuláris Biológiai Tanszék, Budapest

Az endoplazmatikus retikulumban (ER) található hexóz-6-foszfát dehidrogenáz (H6PD) a lumemben lévő glukóz-6-foszfát (G6P) átalakulását katalizálja 6-foszfoglukonáttá (6PG), mellyel párhuzamosan egy  $\text{NAPD}^+$ -t redukál. Korábbi munkánk során a széleskörben expresszáldó enzim jelenlétét kimutattuk neutrofil granulocitákban. Az ER membrán glukóz-6-foszfát transzporterének genetikai hiánya, illetve a transzport gátlása neutrofil granulocitákban a sejtek apoptózisához vezet. *In vitro* sejtes kísérleteink alapján az intraluminális  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  redox; státuszának változása felelős lehet a kiváltott apoptózisért. Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a H6PD hiánya által előidézett luminális  $\text{NADPH}$  redox állapot változás hogyan befolyásolja a neutrofil sejtek életképességét, azok funkcióját.

A humán neutrofilek modellezésére használt promielocitás leukémia eredetű HL-60 sejtvonalban CRISPR-Cas9 technológia segítségével hoztuk létre H6PD knock-out sejteket, a konstrukciók sejtekbe jutására lentivírusos transzfekciós rendszert használtunk. A sikeres géntörölést real-time PCR-rel, western blot analízissel és újgenerációs szekvenálással igazoltuk. A sejtek további funkcionális karakterizálása érdekében DMSO kezeléssel granulocita szerű sejtvonallá differenciáltattuk a génmódosított promielocitákat, majd Western blot analízissel és real time PCR-rel tanulmányoztuk a különböző ER stressz markeret és a redox homeosztázis fenntartásában érintett gének expressziós változását.

A továbbiakban a kontroll és fagocitává érett sejtek funkcionális vizsgálatát folytattuk, részben ROS termelést és baktériumölést tanulmányozva. Következő lépésként pedig a H6PD kiesése következtében kialakuló nagyobb génexpressziós mintázat változásait térképeznénk fel, metabolikus útvonalak résztvevőit microarray módszerrel elemeznénk.

**Rövidítések: H6PD: hexóz-6-foszfát dehidrogenáz, ER: endoplazmatikus retikulum,  $\text{NAPD}^+$  oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát,  $\text{NAPDH}$ : redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát, G6P: glukóz-6-foszfát, 6PG: 6-foszfoglukonát DMSO: dimetil-szulfoxid, ROS: reaktív oxigén gyökök.**