

A bioinformatikai analízis szerepe az örökletes fruktóz-intolerancia korai szűrésében

György Attila Tamás¹, Kovács Zsolt²

¹Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány, és Technológiai Egyetem, orvostanhallgató,

²Marosvásárhelyi Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány, és Technológiai Egyetem, Biokémia Tanszék

AUTHOR AFFILIATION

University of Medicine, Pharmacy,
Science and Technology of Tîrgu Mureş,
Biochemistry discipline, senior lecturer

CORRESPONDING AUTHOR

Kovács Zsolt

University of Medicine, Pharmacy,
Science and Technology of Tîrgu Mureş,
Biochemistry discipline
Gheorghe Marinescu street, no. 38
540142, Tîrgu Mureş, Romania
Email: kovacska_zsoltkovacs@yahoo.com

The role of bioinformatic analysis in the early diagnosis of hereditary fructose intolerance

ABSTRACT

Introduction: The importance of early screening for congenital metabolic diseases is well illustrated by hereditary fructose intolerance (HFI), in which the enzyme aldolase B is not synthesized normally in the organism due to a mutation in the ALDOB (9q31.1) gene, and so the breakdown of fructose-1-phosphate is inadequate. Early diagnosis is essential in the selection of appropriate treatment, as soon as possible. Otherwise, constant intake of fructose into the body can lead to worsening of symptoms and liver damage, which can finally lead to death. **Objective:** The aim of our research is to facilitate the screening of hereditary fructose intolerance, thus making possible the selection of the correct treatment as soon as possible. For this purpose, we used bioinformatics and the help of an application we made. **Methods:** Bioinformatic analysis is designed to facilitate the comparison of the patient's gene obtained by chromosomal sequencing with the nucleotide sequence of the healthy gene. The program we created can recognize and compare the sequence of the patient's ALDOB gene with the normal one. In a further step, the program can create the mRNA of the introduced gene, and from this, the structure of the protein encoded by the tested gene. **Results:** The program written in C# can recognize the ALDOB gene introduced in FASTA format, and in case of any differences, it determines the exact positions these can be found, and the type of nucleotides that differ from the normal ones in the introduced sequence. **Conclusion:** Bioinformatic processing provides a reliable and quick solution for early screening of HFI, since the necessary genetic sampling can be done even on the first week after birth, thus contributing to the establishment of correct treatment. This could also reduce the frequency of complications of patients with HFI and the number of deaths recorded mainly in infants.

Keywords: örökletes fruktóz-intolerancia, bioinformatika, aldoláz B, szekvencia összehasonlítás

KIVONAT

Bevezetés: A korai szűrés fontosságát veleszületett anyagcsere-betegségek esetében jól szemlélteti az örökletes fruktóz-intolerancia (hereditary fructose intolerance – HFI), amely során az ALDOB (9q31.1) gén mutációja következtében a szervezetben nem szintetizálódik aldoláz B enzim, így a fruktóz metabolizmusában szereplő fruktóz-1-foszfát lebontása nem megfelelő. A korai diagnózis a megfelelő kezelés mielőbbi felállításában elengedhetetlen, jelen esetben a fruktóz és szacharóz étrendből való kiiktatása. **Ellenkező**

DOI: 10.2478/orvtudert-0006

Orvostudományi Értesítő 2021, 94(1): 45-50

esetben a fruktóz állandó jellegű bevitele a szervezetbe a tünetek súlyosbodását, májkárosodást eredményezhet, ami halálhoz is vezethet. Célkitűzés: Kutatásunk célja az örökletes fruktóz intolerancia szűrésének megkönnyítése, lehetővé téve ezáltal a megfelelő kezelés mielőbbi beállítását. Erre a célra bioinformatikai módszert választottunk, egy általunk készített program segítségével. Módszerek: A bioinformatikai analízis célja megkönnyíteni a kromoszóma szekvenálás útján nyert DNS szekvencia összehasonlítását egy egészséges gén nukleotid sorrendjével. Az általunk készített program képes felismerni a 9-es kromoszóma DNS szekvenciájából az ALDOB gén locusát, illetve összehasonlítja ennek szerkezetét az előzőleg bevezetett normál ALDOB gén szekvenciájával. Egy további lépésben a program képes elkészíteni a bevezetett gén szekvencia hírvívó RNS-ét, majd ebből leírni a vizsgált gén által kódolt protein szerkezetét. Eredmények: A C#-ban írt program képes

felismerni a FASTA formátumban bevezetett ALDOB gént, leírva a normális szekvenciától való eltéréseket. Ebben az esetben megállapítja, hogy pontosan melyik pozíciókban észleli az eltérést és mely nukleotidokban tér el a bevezetett szekvencia a normálistól. Következtetés: A bioinformatikai feldolgozás egy megbízható és gyors megoldást biztosít az örökletes fruktóz intolerancia korai szűrésére, hiszen a hozzá szükséges genetikai mintavétel már a születés első hetében megvalósítható, így járulva hozzá a mielőbbi helyes kezelés felállításához. Ennek segítségével az örökletes fruktóz intoleranciában szenvedők szövődményeinek gyakorisága, és a főleg csecsemők körében regisztrált elhalálozások száma is csökkenthető lenne a jövőben.

Kulcsszavak: örökletes fruktóz-intolerancia, bioinformatika, aldoláz B, szekvencia összehasonlítás

Bevezetés, célkitűzés

A veleszületett betegségek diagnózisa gyakran nehézségekbe ütközhet, főleg az olyan patológiák esetében, ahol klinikai jellemzők, tünetek akár csak később, bizonyos idő elteltével jelentkeznek. Ezekben az esetekben a korai diagnózis minden nehézsége ellenére igen jelentős fontosságú és ennek megkönnyítése a modern orvostudomány egy központi célkitűzése. Jól példázza ezt az örökletes fruktóz-intolerancia (*hereditary fructose intolerance* – *HFI*) esete is, amelynek során az első klinikai tünetek a nem anyatejjel táplált csecsemőknél jelentkeznek a leg hamarabb, heveny formában. Egyes esetekben azonban, a klinikai jelek nem specifikus jellege miatt – hányás, verejtékezés, sápadtság, hasmenés, levertség – a diagnózis más feltételezéseket vethet fel [1]. Ennek értelmében, munkánk során az örökletes fruktóz-intolerancia korai szűrésének elvégzésére egy alternatív megoldás felállítását tűztük ki célul, a bioinformatika segítségével, felhasználva egy saját készítésű programot.

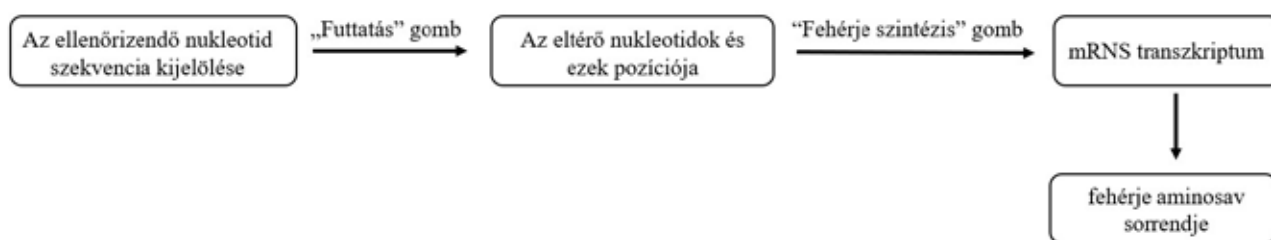
Anyag és módszer

Az örökletes fruktóz-intolerancia kórképét 1957-ben írták le először, Svájcban és autoszomális recesszív öröklődésmenetet mutat [2]. Viszonylag ritka, előfordulási gyakorisága 1:26100 [3] körüli az élve születettek körében. A betegségben a fruktóz metabolizmusa károsodik a 9-es kromoszómán elhelyezkedő ALDOB (*9q31.1*) gén veleszületett mutációja következtében. A gén több mint 50 mutációját írták le és a betegség fenotípusa szerint lehet

enyhe, közepes és súlyos lefolyású is [4]. Ennek során a szervezetben nem, vagy nem elegendő mennyiségben szintetizálódik az aldoláz B enzim, így a fruktóz-1-foszfát lebontása zavart szenved, előidézve ennek a toxikus anyagcsere terméknek a felhalmozódását a májsejtekben. Az újszülöttek tünetmentesek az első nem anyatejjel történő táplálásig, amelynek alkalmával gyümölcsle, méz vagy szacharózzal édesített folyadék formájában megtörténik a fruktóz bevitele a szervezetbe, így jelentkezhetnek heveny formában az első klinikai tünetek, főleg hányás, hasmenés, sápadtság, verejtékezés [5]. Ritkábban, súlyos esetekben jelentkezhet sárgaság, illetve eszméletvesztéssel járó görcsök, a tejsav felhalmozódás okozta metabolikus acidózis, hepatomegalia, vagy akár légzési zavarok (apnoe, tachypnoe), kóma is [6].

A fruktóz nem megfelelő anyagcseréjének következtében súlyos hypoglykaemia alakulhat ki, valamint a felhalmozódott, toxikus hatású fruktóz-1-foszfát májkárosodást válthat ki, a májsejtek pusztulása révén. Az enzim deficiencia következtében csökken a glükóz és glikogén szintézise és az ATP újraképződése is zavart szenved. Továbbá a vesében felhalmozódhatnak különböző köztes anyagcseretermékek, amelyek a glükóz, illetve az aminosavak, de a bikarbonát és foszfát visszaszívódását is gátolhatják ezen a szinten.

A korai diagnózis fontossága a megfelelő kezelés mielőbbi felállításában keresendő, vagyis a fruktóz és szacharóz étrendből való kiiktatásában. Ellenkező esetben a fruktóz állandó jellegű bevitele a tünetek súlyosbodását eredményezheti és kritikus esetekben további szövődményeket is okozhat, többek között renalis tubularis acidózist, vesekárosodást, illetve változó súlyosságú



1. ábra. Folyamatábra

neurológiai tüneteket, eszméletvesztéssel járó görcsrohamoktól, mentális retardáció jelentkezéséig, akár kómát is [6]. Nagymértékű fruktóz bevitel esetében a bekövetkező májkárosodás akár halálhoz is vezethet. A kezelés központi célja a fruktóz tartalmú élelmiszerek, így a legtöbb gyümölcs, bizonyos zöldségek, illetve méz redukálása és kiiktatása, ezáltal minimalizálva, megszüntetve a szervezet fruktóz-expozícióját [5]. Ebben az esetben a betegek életkilátásai jelentős mértékben javíthatóak és a várható élettartam azonos lehet a populációban mért átlaggal.

Az általunk eszközölt megoldás célja megkönnyíteni a beteg mintájából kromoszomális szekvenálás útján nyert ALDOB gén összehasonlítását az egészséges gén szerkezetével. Erre a célra egy bioinformatikai program elkészítése mellett döntöttünk, amely C#-ban íródott és a könnyebb átláthatóság, valamint egyszerűbb használhatóság végett egy kezelőfelületet is kapott. Erre a Microsoft Forms lekérdezésekre alapuló űrlap applikációja nyújtott lehetőséget, amely biztosítani tudja az egyszerű, bárki számára könnyen elsajátítható használhatóságot. Ezt mindössze néhány gomb, illetve egy párbeszéd ablak alkotja, amely megjeleníti a szekvencia összehasonlításokat.

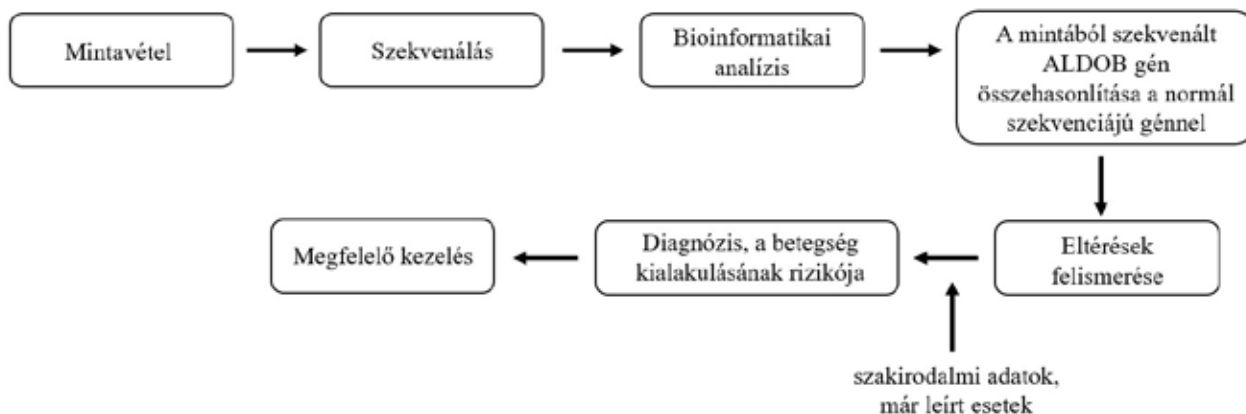
Programunk működését a következőkben néhány lépésben szemléltetjük. Elsőként a „Tallózás” gombra kattintva a felugró ablakban kiválasztjuk az összehasonlításnak alávetni kívánt, feltételezhetően hibás nukleotid szekvencia FASTA kódját. Ezt követően a „Futtatás” gombra kattintva, egy rövid töltési idő után, rögtön láthatjuk is, hogy a beolvasott gén egyes pozíciókban pontosan milyen nukleotidokban tér el a normál ALDOB gén szerkezetétől. Emellett a beolvasott és a normál gén hossza, valamint ez alatt a referencia szekvencia teljes egészében is megtekinthető. Ezt követően a „Fehérje szintézis” gombra kattintva, a program elkészíti a bevezetett DNS szekvencia mRNS transzkriptumát, valamint tovább görgetve, az ebből létrehozott fehérje aminosav sorrendjét is. Az egyes lépések között lehetőség van visszatérni és a megjelenített

szekvenciák akár direkt módon is kimásolhatóak a programból. Egy elemzés lefuttatása után lehetőség van egy újabb vizsgálat azonnali indítására, így egymás után tetszőleges mennyiségű mintát vihetünk be a programba és az összehasonlítások eredményeit rögzíteni is tudjuk.

Eredmények

A normál gén szerkezetét az NCBI adatbázisa szerinti legfrissebb, GRCh38.p13-as primary assembly-nek megfelelően „tanítottuk” meg a programnak. A normál humán ALDOB gén a 9-es kromoszómán helyezkedik el, az NC_000009.12 jelzésű locusban és 15.215 nukleotid alkotja. A hibás gének szekvenciáinak szimulálására a normál szekvenciában a szakirodalomban már leírt módosulásokat eszközöltük, a realitás legjobb tükrözése érdekében. Így kaptuk meg azokat a szekvenciákat, amelyeket a programba bevezetve összehasonlítottunk a normál, egészséges gén szerkezetével. A bevezetett és a normál ALDOB gén szekvenciája között felfedezett eltérések, előzőleges megfigyelésekre építve, lehetővé teszik a betegség kialakulási valószínűségének felmérését, erős alapot biztosítva ezáltal a korai diagnózisnak.

Bár az általunk eszközölt megoldáshoz hasonló alternatívák már léteznek, mint például az NCBI (National Center for Biotechnology Information) részét képező BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), mégis ennek előnyei miatt, egy hatékony megoldásnak bizonyulhat. Ezen előnyök között említhető, hogy mivel csak egy génhez való viszonyítást végez, ezért sokkal gyorsabban, néhány másodperc alatt lefut, elkészíti az összehasonlítást és feltünteti a számunkra fontos információkat. Egy másik nagy előnye a felhasználóbarátság, hiszen programunk működése a bonyolult és előzetes tapasztalatokat igénylő bioinformatikai adatbázisokkal szemben, egyszerű használat során is elsajátítható. Emellett megemlíthetjük,



2. ábra. A program folyamatábrája

hogy a BLAST-al szemben internetkapcsolat nélkül is működtethető, valamint alacsony rendszerigénye miatt bármilyen számítógépen lefuttatható. Természetesen a hátrányok felismerése is fontos a jövőbeli fejlesztés céljából, ezek között említhetjük, hogy az általunk készített applikáció korlátozott forrásokkal működik, illetve, hogy a személyes fejlesztés miatt frissíteni kell, mindig a legaktuálisabb, primary assembly-nek megfelelően. Ezek a problémák azonban úgy gondolom, hogy idővel kiküszöbölhetőek, széles körben is előnyösen használhatóvá téve az általunk kivitelezett megoldást.

Megbeszélés

A bioinformatika a modern orvosi diagnosztikában egyre fontosabb szerepet kap, köszönhetően annak, hogy akár nagy volumenű adat feldolgozását is lehetővé teszi, illetve igen pontos, megbízható eredményeket tud biztosítani [7]. Ennek megfelelően ez az eljárás hasonló előnyöket nyújthat az örökletes fruktóz intolerancia korai diagnózisában alkalmazva is. A vizsgálat elvégzésének legfőbb hátránya a génszekvenálás szükségessége, mely további költségeket vethet fel, azonban ennek kapcsán is fontos megjegyezni, hogy az idő előrehaladtával ez is egyre inkább elérhetővé válik, úgy anyagi, mint erőforrási szempontból. Ezzel szemben nagy előnye, hogy valódi korai diagnózist tesz lehetővé, hiszen a szekvenáláshoz szükséges vérminta már a születést követő első héten levehető például sarokból [8]. A szekvenálást követően a minta feldolgozása, bioinformatikai analízise viszonylag hozzáférhető módon megvalósítható az általunk kivitelezett megoldás alkalmazásával, a már említett módon. A bioinformatikai vizsgálat eredményeit megkapva ezeket kiértékelhetjük

a már létező szakirodalmi adatok, valamint a genetikai diagnosztikában szintén használatos predikciós szoftverek segítségével, amelyek változó pontossággal tudják előrevetíteni a betegség kialakulásának valószínűségét, már ismert esetekből, adatokból következtetve [9]. Az így kapott eredmények segíthetnek a betegség korai felismerésében, biztosítva ezáltal a megfelelő kezelés időben történő beállítását.

Munkánk továbbfejlesztésének lehetőségét is fenntartjuk és vizsgáljuk azon funkciók tárházát, amelyekkel az általunk készített programot kibővítve, ez még szélesebb felhasználhatóságot tehetne lehetővé, alternatívát biztosítva, akár komplexebb analízisek elvégzésére is. További célkitűzéseink közé tartozik a program fejlesztése annak érdekében, hogy képes legyen elvégezni a bevezetett ALDOB gén által kódolt aldoláz B enzim térszerkezetének modellezését, a normál gén által kódolt enzim térszerkezetének ismeretében. Erre az elvre épül a komparatív fehérje szerkezet modellezés is, amely egy már ismert térszerkezetű fehérje szekvenciájához hasonlítja a vizsgált protein aminosav sorrendjét és ennek alapján próbálja prediktíven meghatározni a keresett térszerkezeti modellt [10]. A feladatot megnehezíti a fehérjék többszintű szerkezetének modellezése, illetve ezek váltakozásának és egymásra gyakorolt hatásának rekonstrukciója az informatika világában. Ennek ellenére léteznek erre vonatkozó kutatások és eredmények a szakirodalomban, és feltehetően a mesterséges intelligencia ezen téren való alkalmazása megoldást nyújthat erre a problémára [11]. Amennyiben az említett fejlesztést eszközölni tudnánk, az ellenőrzést nyújthatna a teljes eljárás hatékonyságára nézve, lehetőséget adva az így kapott modell összehasonlítására a beteg mintájából kimutatott aldoláz B enzim térszerkezetével.



3. ábra. A program működés közben

Következtetés

Bár az örökletes fruktóz intoleranciában szenvedők nagy része szövődménymentesen éli át a betegséget, vannak feljegyzések elhalálozási esetekről is, elsősorban csecsemők körében. A leírt halálesetek a késői diagnózis eredményeként nem betartott fruktózmentes diéta által kiváltott metabolikus zavarok következményének tudhatók be. Ezek, a bár ritka, de banális és tragikus esetek megelőzhetőek lennének az örökletes fruktóz intolerancia célzott szűrése által, amelyben az általunk kivitelezett bioinformatikai megoldás releváns segítséget nyújthatna. A vizsgálat eredményei alapján következtethetünk a betegség jelenlétére, így felállítva a pozitív diagnózist, de a szakirodalmi adatok és a már leírt esetek alapján akár a

betegség kialakulásának kockázati tényezőit is felmérhetjük. Következtetésként tehát elmondhatjuk, hogy a bioinformatikai feldolgozás egy megbízható és gyors megoldást biztosít, és, mivel a hozzá szükséges genetikai mintavétel már a születés utáni első héten megvalósítható, lehetővé teszi a mielőbbi helyes diagnózis és kezelés felállítását, hozzájárulva ezáltal az örökletes fruktóz intoleranciában szenvedők életkilátásainak jelentős mértékű javításához.

Irodalom

1. Thanner F. Möglichkeiten zur Diagnostik einer hereditären Fructose-Intoleranz [Diagnostic procedures in hereditary fructose intolerance (author's transl)]. *Klin Wochenschr.* 1977 Aug 15;55(16):787-90. German. doi: 10.1007/BF01651266. PMID: 904245.

2. dr. Buzás György Miklós, A fruktóz és a fruktózingtolerancia, *Orv. Hetil.*, 2016, 157(43), 1708–1716
3. Santer R, Rischewski J, von Weihe M, Niederhaus M, Schneppenheim S, Baerlocher K, Kohlschütter A, Muntau A, Posselt HG, Steinmann B, Schneppenheim R. The spectrum of aldolase B (ALDOB) mutations and the prevalence of hereditary fructose intolerance in Central Europe. *Hum Mutat.* 2005 Jun;25(6):594. doi: 10.1002/humu.9343. PMID: 15880727.
4. Esposito G, Imperato MR, Ieno L, Sorvillo R, Benigno V, Parenti G, Parini R, Vitagliano L, Zagari A, Salvatore F. Hereditary fructose intolerance: functional study of two novel ALDOB natural variants and characterization of a partial gene deletion. *Hum Mutat.* 2010 Dec;31(12):1294-303. doi: 10.1002/humu.21359. Epub 2010 Nov 16. PMID: 20848650.
5. Gaughan S, Ayres L, Baker PR II. Hereditary Fructose Intolerance. 2015 Dec 17 [updated 2021 Feb 18]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021. PMID: 26677512.
6. Oláh Éva, *Klinikai genetika, Medicina Könyvkiadó Zrt., 2015 (281. oldal)*
7. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem.* 2015 Jan;61(1):124-35. doi: 10.1373/clinchem.2014.224360. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25451870.
8. Scala I, Parenti G, Andria G. Universal screening for inherited metabolic diseases in the neonate (and the fetus). *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Oct;25(Suppl 5):4-6. doi: 10.3109/14767058.2012.716983. PMID: 23025760.
9. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W597-603. doi: 10.1093/nar/gks400. Epub 2012 May 31. PMID: 22661580; PMCID: PMC3394269.
10. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2016 Jun 20;54:5.6.1-5.6.37. doi: 10.1002/cpbi.3. PMID: 27322406; PMCID: PMC5031415.
11. Yang KK, Wu Z, Bedbrook CN, Arnold FH. Learned protein embeddings for machine learning. *Bioinformatics.* 2018 Aug 1;34(15):2642-2648. doi: 10.1093/bioinformatics/bty178. Erratum in: *Bioinformatics.* 2018 Dec 1;34(23):4138. PMID: 29584811; PMCID: PMC6061698.