

A kanyargós artéria szindróma és a GLUT10

Doktori értekezés

Németh Csilla Emese

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Bánhegyi Gábor, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Margittai Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Szilvia Zita, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Zádori Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Varga Gábor, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Monostory Katalin, Ph.D., tudományos
főmunkatárs
Dr. Voszka István, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezető	7
1.1. A kanyargós artéria szindróma: oka, tünetei	7
1.2. A C-vitamin	8
1.2.1. Történelmi áttekintés	8
1.2.2. A C-vitamin bioszintézise és napi szükséges mennyisége	9
1.2.3. Oxidatív stressz és a C-vitamin antioxidáns hatása	11
1.2.4. A C-vitamin, mint kofaktor	14
1.2.4.1. Aszkorbátfüggő monooxigenázok	14
1.2.4.2. Aszkorbátfüggő dioxigenázok	14
1.3. Slc szállítófehérje család	16
1.3.1. GLUT transzporterek (SLC2)	16
1.3.2. A GLUT10	18
1.3.3. GLUT10 génkiütött (knockout) állatmodellek	23
1.3.4. SLC23 – Na ⁺ -függő C-vitamin transzporterek	24
1.4. C-vitamin transzportja az eukarióta szervezetben	24
2. Hipotézis és célkitűzések	27
3. Módszerek	28
3.1. Kísérleti állatok	28
3.2. Szubcelluláris frakciók előállítása májszövetből	28
3.3. Sejttenyészetek	28
3.4. Szubcelluláris frakciók előállítása humán fibroblasztokból	29
3.5. A hTERT fibroblaszt sejt kultúrák és géncsendesítésük	30
3.6. RNS izolálás és PCR analízis	30
3.7. Western blot analízis	31
3.7.1. A géncsendesítés ellenőrzése	31
3.7.2. Sejtfrakciók Western blot analízise	31
3.8. Sejtkészítmény előállítása transzport méréshez	31
3.8.1. Intakt fibroblasztok	31

3.8.2.	Szemipermeabilizált fibroblasztok	32
3.9.	Liposzóma preparálás	32
3.10.	A GLUT10 in vitro transzlációja	32
3.11.	Aszkorbát felvétel mérése rapid filtrációval	33
3.12.	Aszkorbát mennyiségi meghatározása nagyhatékonyságú folyadékromatográfiával	34
3.13.	Az ATS sejtek transzfekciója	34
3.14.	Immunfluoreszcens analízis humán fibroblaszt sejteken	35
3.15.	Statisztikai módszerek	36
4.	Eredmények	37
4.1.	A GLUT10 sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata	37
4.2.	Az endomembránokon keresztül zajló transzport defektusa ATS-ben	40
4.3.	GLUT10 – dehidroaskorbát transzporter	41
4.4.	A GLUT10 reexpressziója ATS fibroblasztokban: a DHA transzport helyreállása	50
5.	Megbeszélés	52
6.	Következtetések	57
7.	Összefoglalás	58
8.	Summary	59
	Irodalomjegyzék	60
	Saját közlemények	71
	Köszönetnyilvánítás	72

Rövidítésjegyzék

AA	aszorbát
ANOVA	variancia analízis (analysis of variance)
ATS	kanyargós artéria szindróma (arterial tortuosity syndrome)
CREB	cAMP rezszonzív elemhez kötődő fehérje
CTGF	kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor)
DHA	dehidroaszorbát
DHLA	dihidro-liponsav (dihydrolipoic acid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	deoxiribonukleinsav
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EFSA	European Food Safety Authority
ER	endoplazmás retikulum
EVM	Expert Group on Vitamins and Minerals
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GLO	L-gulonolakton oxidáz
GLUT	glukóz transzporter
GLUT10	glukóz transzporter 10

GRP78	glukóz-regulált protein78
GSH	redukált glutation
GSSG	glutation-diszulfid
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-piperazin-1-etánszulfonsav
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HPLC	high-performance liquid chromatography
hTERT	humán telomeráz reverz transzkriptáz
HyPro	hidroxiprolin
IBD	Inflammatory Bowel Disease - gyulladásoos bélbetegség
IOM	Institute of Medicine
LS	liponsav
LUV	large unilamellar vesicles
MOPS	3-(N-morfolino)propánszulfonsav
mRNS	messzendzser ribonukleinsav
NRV	Nutrient reference value
OGYEI	Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAL	peptidil-alfa-hidroxiglicin-alfa-amidáló liáz
PBS	phosphate-buffered saline
PDI	protein-diszulfid izomeráz
PHM	peptidilglicin alfa-hidroxiláló monooxigenáz

Pro	prolin
PVDF	polivinilidin fluorid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNS	short hairpin RNS
SLC	solute carrier
SVCT 1/2	sodium-dependent vitamin C transporter 1/2
TET	ten-eleven translocation
TGF β	transforming growth factor beta
TGFBRI/II	transforming growth factor beta receptor I/II
UDP-glukóz	uridin-difoszfát-glukóz
UL	Upper level
UV	ultraviola
VDAC1	voltage-dependent anion-selective channel 1
VSOAC	volume sensitive anion channel

1. Bevezető

1.1. A kanyargós artéria szindróma: oka, tünetei

A kanyargós artéria szindróma (Arterial Tortuosity Syndrome, ATS; OMIM 208050) olyan autoszómális recesszíven öröklődő betegség, melyet a GLUT10 transzportert kódoló *SLC2A10* gén mutációja okoz. Ez a kór a kötőszövet elváltozásában nyilvánul meg, tünetei a következők: az artériák megnyúlnak és kanyargós lefutásúvá válnak, emellett kialakulhatnak olyan szűkületek (sztenózisok) amelyek csökkenthetik létfontosságú szervek vérellátását, ezen felül terhelik a szív pumpáló működését. Másik tünete az érfalak gyengülésével kialakuló ütőértágulat, melynek szakadása súlyos belső vérzést és halált okozhat. A betegség a test más részein is okoz elváltozásokat, mint például a laza ízületek, nyújtható bőr, gerincferdülés, pókujjúság, abnormális állkapocs vagy állcsont méret, nyújtott arc, magasan ívelt szájpad. A tünetek nagyon sokrétűek, és sok hasonlóságot mutatnak olyan - szintén genetikai hátterű - kötőszöveti megbetegedésekkel, mint a Marfan-, Ehlers-Danlos- és a Loeys-Dietz-szindróma, ezért a kanyargós artéria szindrómának nincsenek jól meghatározott diagnosztikai kritériumai. A diagnózis felállításához molekuláris genetikai tesztet alkalmaznak, melynek során az *SLC2A10* gén szekvenciáját ellenőrzik, és ha nem találnak elváltozást, akkor deléció/duplikáció vizsgálatot (vagy más néven kópiaszám analízist) végeznek. A betegség előfordulási gyakorisága nem ismert, az orvosi szakirodalomban mintegy 100 esetet ismertettek; számos esetben olyan családok érintettek, amelyekben előfordult közeli rokonságban állók házassága (Coucke és mtsai. 2006, Zaidi és mtsai. 2009, Faiyaz és mtsai. 2008, Coucke és mtsai. 2003, Faiyaz és mtsai. 2009). Eddig 35 mutációt azonosítottak, ebből 21 misszensz szubsztitúció, 5 nonszensz nukleotid csere, 8 deléció, ami korai stop kodont, vagy kereteltolódást idéz elő, valamint egy splice mutáció (Coucke és mtsai. 2006, Drera és mtsai. 2007, Callewaert és mtsai. 2008, Faiyaz és mtsai. 2008, Ritelli és mtsai. 2009, Zaidi és mtsai. 2009, Faiyaz és mtsai. 2009, Castori és mtsai. 2012, Karakurt és mtsai. 2012, Takahashi és mtsai. 2013, Ritelli és mtsai. 2014, Beyens és mtsai. 2018). Az *SLC2A10* gén által kódolt GLUT10 sejten belüli elhelyezkedése és funkciója ezeddig tisztázatlan, a betegség patomechanizmusa ismeretlen.

1.2. A C-vitamin

1.2.1. Történelmi áttekintés

A C-vitamin okozta hiánybetegségről, a skorbutról már időszámításunk előtt is több írás látott napvilágot. Az ókorban rettegett betegségként tartották számon, melyről már Hippokratész is elmélkedett egyik értekezésében. A kór leggyakrabban a nyomorban élőket tizedelte a téli időszak végén. A nagy földrajzi felfedezések korában, a hosszú hajútak során is rengeteg áldozatot szedett a „tengeri pestis”. Az elnevezés Sir Richard Hawkins-tól ered 1593-ból, utalva a betegség járványszerű előfordulására. Ekkor még nem tudták, hogy ezt a megbetegedést a C-vitamin hiánya okozza, ami az oly gyakran előforduló vitaminhiányos táplálkozásnak volt köszönhető. A betegség széles tünetskálával rendelkezik, többek között fáradtság, vérző íny, kihulló fogak, letargia, lassú sebgyógyulás, valamint a bőrön keletkező bevérzések jellemzőek. John Woodall brit sebész 1617-ben írt először a táplálkozás és a skorbut közötti összefüggésről, illetve közölte olyan növények sorát melyek a skorbut ellen hatásosak „Az orvos kézikönyve” című munkájában. A magyar származású katonaeorvos, Krámer János György a török hadjáratok idején a katonák között savanyú káposztát osztott, mellyel sikerült megelőznie a skorbutot (Kramer 1739). James Lind skót hajóorvos végezte az első kontrollált kísérletet 1747-ben, melynek során matrózok csoportjait különböző szerekkel kezelt, miután a skorbut tüneteit észlelte rajtuk. 1753-ban megírta „A treatise of the scurvy” című könyvét, melyben a citrusfélék fogyasztását javasolja a skorbut ellenszereként (Lind 1753). A skorbutot emberi betegségnek tekintették egészen 1907-ig, amikor is Axel Holst és Theodor Frølich, két norvég fizikus a beri-beri betegség (tiamin hiány) kutatása során skorbutot idézett elő tengerimalacokban (Holst és Frølich 1907). Szent-Györgyi Albert az 1920-as évek végén a sejtlégzéssel kapcsolatos kutatásai során izolálta azt a redukáló anyagot, melyet először ignóznak, majd hexuronsavnak nevezett el. Később a hexuronsavat a C-vitaminnal azonosították. Erről a felfedezésről Szent-Györgyi Albert és Joseph L. Svirbely a Nature folyóiratban számolt be 1932-ben. A C-vitamin kémiai szerkezetének meghatározásáért Sir Walter Norman Haworth brit vegyész kémiai Nobel-díjat kapott 1937-ben (King 1953). A C-vitamint a skorbutot megelőző hatása miatt aszkorbinsavnak is nevezik.

1.2.2. A C-vitamin bioszintézise és napi szükséges mennyisége

Az aszkorbinsavat a legtöbb növényi és állati szervezet képes előállítani (Bánhegyi és mtsai. 1997). A növényi szervezetben zajló C-vitamin szintézis több útvonalon is végbe mehet, melyek tárgyalásától ebben az értekezésben eltekintünk. Az evolúció folyamán megváltozott a C-vitamin képződésének helye az állati szervezetben, ugyanis míg egyes halak, kétéltűek, hüllők és ősi madarak esetében a szintézis a vesében zajlik, addig az emlősök egy részében, illetve evolúciósan újabb madárfajoknál a képződés helye áthelyeződött a májba (Chatterjee 1973). Azonban akadnak olyan fajok, melyek C-vitamin szintetizáló képességüket elvesztették az evolúció során. Ilyenek például a rovarok, egyes hal- és madár fajok, az emberszabásúak és olyan emlősök, mint a tengerimalac és a gyümölcssevő denevérek. Az aszkorbát előállítása a szervezetben egy négy lépéses reakciósorból áll, a szintézis kiindulópontja az UDP-glukóz. A folyamat több szinten szabályozott, egyfelől a szintézis aktivitását meghatározza a glikogénolízis, másrészt a szintézis utolsó lépését katalizáló enzim, a L-gulonolakton-oxidáz (GLO) génexpressziójának szintjén is szabályozódik. (Braun és mtsai. 1999). A L-gulonolakton-oxidáz az endoplazmás retikulum (ER) membránjához kapcsolódó enzim, amely az L-gulono-1,4-laktonból állít elő aszkorbátot. Az enzim ezen kívül hidrogén-peroxidot is termel, minek következtében az aszkorbinsav termelés glutation oxidációval kísért folyamat (Bánhegyi és mtsai. 1996, Puskás és mtsai. 1998). A GLO bizonyos fajokban hiányzik, így ezek a fajok nem képesek az aszkorbátot előállítani, szükséges tehát, hogy a napi mennyiséget a táplálékkal vegyék fel (Bánhegyi és mtsai. 1998).

A C-vitamin felfedezése óta a mai napig rengeteg eltérő véleményt hallani arról, hogy mekkora mennyiség fedezi a napi C-vitamin szükségletet. Nehéz ezt a kérdést megválaszolni, hiszen a vitaminigény egyénekenként eltérő, függ a kortól, nemtől, életmódtól és testtömegetől egyaránt. Az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (OGYÉI) közre adta a 1169/2011/EU rendelet XIII. mellékletét, melyben megtalálhatóak a felnőttek számára ajánlott napi vitamin és ásványi anyag beviteli referencia értékeket (NRV értékek). A lista alapján a C-vitamin szükséges mennyisége átlagosan 80 mg/nap. Ezen kívül összegezték három tudományos munkacsoport UL (Upper Level) értékeit is. Ezek a munkacsoportok: a European Food

Safety Authority (EFSA), a US Institute of Medicine (IOM) és a UK Food Standard Agency Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM). Az UL érték a vitaminok és ásványi anyagok legfelső tolerálható szintje, azt az anyagmennyiséget jelenti, amely napi rendszeres fogyasztás mellett az egészségre nem fejt ki kedvezőtlen hatást. Ennek az értéknek a meghatározásához figyelembe kell venni az adott vitamin vagy ásványi anyag összes lakossági forrásából származó bevitelét. A ma oly közkedvelt étrend-kiegészítők vitamin és ásványi anyag tartalmát az UL értékek alapján határozzák meg. Az EFSA tudományos adatok hiányában nem közölt UL értéket, az IOM UL értéke C-vitaminra vonatkozóan 2000 mg/nap. Az EVM csak útmutató értéket (Guidance= G érték) határozott meg 1000 mg/nap mennyiségben.

A C-vitamin 200-400 mg/nap orális adagolása esetén elérjük a 80 μ M körüli telítési plazmakoncentrációt (Levine és mtsai. 1996). Ennél magasabb plazmakoncentráció csak intravénás aszkorbátadagolással érhető el, melyet terápiás célból alkalmaznak (Padayatty és mtsai. 2004, Padayatty és mtsai. 2006).

A C-vitamin megadózisban (>2500 mg/nap) való orális adagolása megkérdőjelezhető, mivel mellékhatásként hasmenés léphet fel, illetve vas-anyagcsere zavarban szenvedőknél vasmérgezést is okozhat, hiszen az aszkorbinsav elősegíti a szervezetben a vas felszívódását (Cameron és Campbell 1974, McLaran és mtsai. 1982, Cook és mtsai. 1984). Hosszú ideig tartotta magát az a tévhit, hogy nagy mennyiségű aszkorbinsav fogyasztása növeli a vesekő képződés esélyét, azonban mára bebizonyosodott, hogy ennek a hatásnak épp az ellenkezője igaz, hiszen a C-vitamin által savasított vizelet a foszfát köveket oldja, illetve gátolja a kialakulásukat. Bár a C-vitamin oxálsavvá bomlik le, ami a vesekő egyik típusának fő alkotó eleme, azonban ez nem növeli a kialakulás valószínűségét (Curhan és mtsai. 1999).

A C-vitamin gazdaságos előállításának lépéseit Reichstein és Grüssner dolgozták ki 1934-ban (Reichstein és Grüssner 1934). A szintézis D-glukózból indul ki, melyet első lépésben szorbitollá hidrogéneznak, majd mikrobiális oxidációval L-szorbózzá alakítják *Gluconobacter oxydans* baktériumok felhasználásával. Az L-szorbózból acetonnal való kondenzációval diaceton-L-szorbózt állítanak elő. Ezt a vegyületet kálium-permanganáttal oxidálják diaceton-2-keto-L-gulonsavvá. Vízzel melegítve az aceton hidrolizál, így keletkezik a 2-keto-L-gulonsav, amelyből enolizációval nyerik az L-aszkorbinsavat. Habár történtek kísérletek arra vonatkozóan,

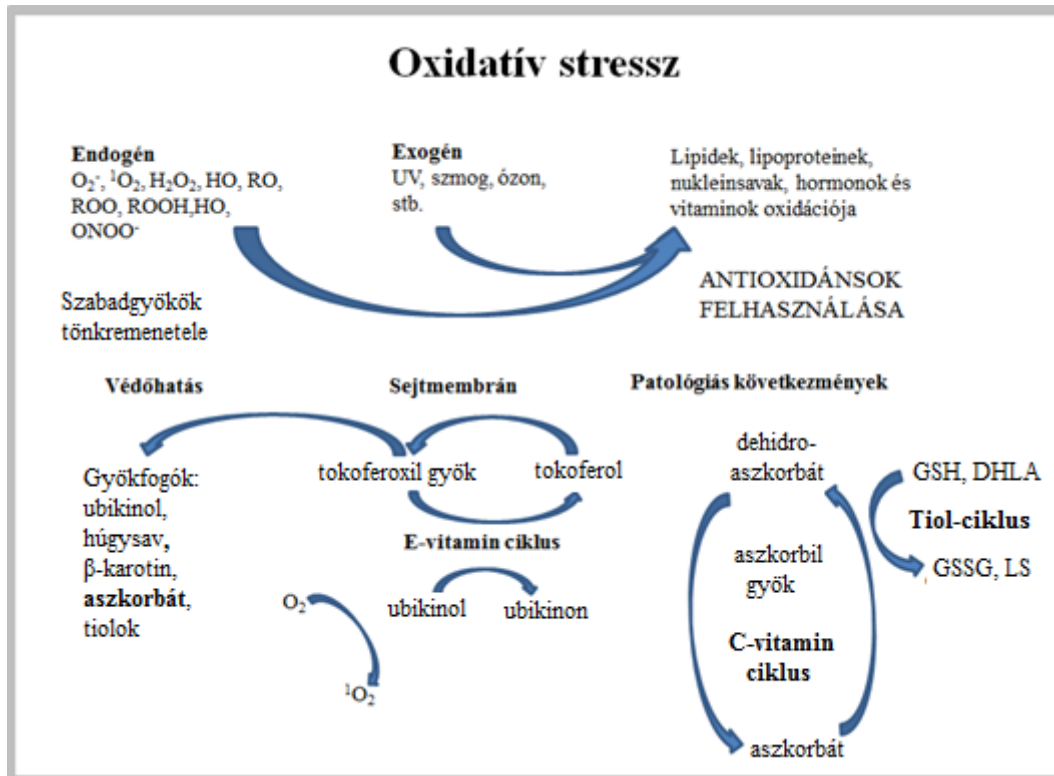
hogy csökkentsék a C-vitamin ipari léptékű szintézisében a kémiai lépések számát, de mivel a termékhozam elmaradt a Reichstein-szintéziséhez képest, ezért az aszkorbinsavat a mai napig ezzel az eljárással állítják elő.

Ugyan az aszkorbinsavnak nem ismert toxikus hatása, azonban mégis tanácsosabb az étrend-kiegészítők és vitamin kapszulák helyett a gyümölcsben és zöldségben gazdag kiegyensúlyozott étrendet választani, amely biztosan fedezi a napi szükséges mennyiséget.

1.2.3. Oxidatív stressz és a C-vitamin antioxidáns hatása

Oxidatív stressz esetén felborul az egyensúly a prooxidánsok és az antioxidáns-kapacitás között (Ames és mtsai. 1993). Az oxidatív stressz kialakulásában szerepet játszhat a szervezetben keletkező szabadgyökök mennyiségének növekedése, és az ezek ellen ható eliminációs ágensek csökkenése. Azokat a vegyületeket, melyek védelmet nyújtanak az oxidáció, illetve a szabadgyökképződés ellen, antioxidánsoknak nevezzük. Ezt az egyensúlyt nagymértékben befolyásolhatják a külső körülmények és a táplálkozás. Külső tényező lehet (1. ábra):

- ionizáló és nagy energiájú sugárzás (UV-A, UV-B, röntgen)
- magas telítetlen zsírsav bevitel
- környezeti toxinok (herbicidek, peszticidek)
- szmog (ózon és nitrogén-oxidok)
- dohányfüst és alkohol



1. ábra: Oxidatív stresszt kiváltó tényezők és a közömbösítő antioxidáns rendszer. (Boross és Sajgó 1993)

A prooxidáns és antioxidáns rendszerek közötti egyensúly felborulása oxidatív stresszhez vezethet. Endogén vagy exogén prooxidánsok egyaránt okozhatják a szervezet makromolekuláinak károsodását, melyek ellen a szervezet sejtmembránban elhelyezkedő (pl. tokoferol) vagy vízoldékony (pl. aszkorbát) antioxidánsokkal védekezik.

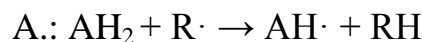
Kiemelten fontosak a fémtoxikózisok közül a redox-aktív fémek, mint például a vas és a réz ionjainak hatásai (Ercal és mtsai. 2001). Mindkét fém ionjai indukálhatják reaktív oxigén intermedierek képződését, amelyek lipidperoxidációs folyamatokat katalizálnak (Chan és mtsai. 1982, Cederbaum és mtsai. 1989). A redox-inaktív fémek a sejtek tiol csoportot tartalmazó antioxidáns kapacitását meríthetik ki, fokozva a szabadgyökök képződését (Ercal és mtsai. 2001).

A születést követően az oxigén ellátottság jelentősen eltér az embrionális fejlődési szakaszhoz viszonyítva. Újszülött korban a hiperoxiás körülmények miatt

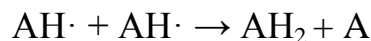
keletkező szabad oxigéngyökök eliminálására feltehetően csak a megfelelően működő antioxidáns védelem képes (Muller 1987). Számos vizsgálat kimutatta, hogy az állati szervezet reagál a légköri oxigén belélegzése során fellépő oxidatív stresszre (Muller 1987, Gaál és mtsai. 1996).

Nagy fizikai megterhelés is előidézheti a szabad oxigéngyökök (ROS- reactive oxygen species) képződését, melyet az izomkárosodás következtében fellépő oxidatív stressz eredményez, ez a hatás antioxidánsok alkalmazásával csökkenthető, illetve kivédhető (Dekkers és mtsai. 1996, Sackeck és Blumberg 2001).

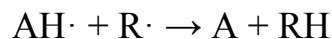
Az evolúció során számos védelmi mechanizmus fejlődött ki az endogén és exogén hatásra kialakuló káros oxigén tartalmú vegyületek átalakítására (1. ábra). A szervezet antioxidáns rendszere két részre, enzimátikus és nem enzimátikus részegységekre tagolható. A nem enzimátikus védelmi rendszer legfőbb elemei: C-vitamin, E-vitamin, karotinoidek, továbbá egyéb, szintén nem endogén vegyületek, mint a flavonoidok és polifenolok (Frankel 1993). A legnagyobb mennyiségben jelen lévő, vízdoldékony C-vitamin összes fiziológiai és biokémiai hatása redukálóképességében rejlik. A diénol struktúra hidroxil csoportjai savas disszociációra képesek, pK értékeik 4,17 és 11,57. Fiziológias pH értéken monovalens anion formában van jelen (Rose és Bode 1993), amely két elektron leadására képes. Az első reverzibilis lépésben aszkorbil szabadgyök képződik, ami más szabadgyökökkel összehasonlítva viszonylag stabil és nem reaktív (Padayatty 2003). Az aszkorbát képes a szabadgyökök redukciója által azokat semlegesíteni, miközben kevésbé veszélyes aszkorbil gyökké alakul.



Az aszkorbil gyök egy újabb lépésben tovább oxidálódik diszproporcionálódással,



vagy egy másik biológiailag aktív vegyülettel dehidroaszkorbáttá, ami hidrolízissel lebomlik vagy redukáló ágens hatására visszaalakul aszkorbáttá.



1.2.4. A C-vitamin, mint kofaktor

Az aszkorbinsav egyéb funkciói mellett több enzim működésében is részt vesz kofaktorként. Ezek az enzimek két nagyobb csoportra oszthatók. Az egyik csoport a Cu^+ ion tartalmú monooxigenázok, a másik csoport a Fe^{2+} és α -ketoglutarát-függő dioxigenázok.

1.2.4.1. Aszkorbát-függő monooxigenázok

A monooxigenázok az oxigén molekula egyik atomját építik be egyéb molekulába, míg a másikat vízzé alakítják. Az aszkorbinsav-függő monooxigenázok aminosav eredetű és peptidhormonok előállításában vesznek részt.

Ide tartozik a dopamin β -hidroxiláz, amely a mellékvesévelő kromaffin sejtjeiben, valamint egyes központi idegrendszeri neuronokban található vezikuláris enzim, ami a dopamint alakítja noradrenaliná.

A peptidil-glicin α -amidáló monooxigenáz egy kétfunkciós enzim, amely két katalitikus doménnel (PHM és PAL domének) rendelkezik (Prigge és mtsai. 2000). A PHM a neuropeptidek bioszintézise során az alfa-amidáció első lépését katalizálja, melynek során peptid C-terminális végén lévő glicin maradékot amidálja. A PHM működése közben két réziont köt meg, és aszkorbinsavat használ redukáló ágensként.

1.2.4.2. Aszkorbát-függő dioxigenázok

Aszkorbát-függő dioxigenázok részt vesznek többek között a karnitin és kollagén bioszintézisében, a tirozin katabolizmusában, valamint a génexpresszió szabályozásában a Ten- Eleven Translocation (TET) enzimsalád működése révén.

A prolil- és lizil-hidroxilázok zavartalan működése a kollagén szintézis során a hármas hélix szerkezet kialakításában elengedhetetlen. A folyamatban szerepet játszó enzimek közül legrészletesebben a prolil-4-hidroxilázt jellemezték (Myllyharju 2003), amely az ER lumenébe lokalizált, 2α és 2β alegységekből álló tetramer szerkezetű enzim. Az α alegység a katalitikus helyet tartalmazza, a β alegység pedig azonos a protein disszulfid izomerázzal. A prolil-4-hidroxiláz működése során az α -ketoglutarát

dekarboxilálásakor oxidálódik a vas ion, amelyet az aszkorbát redukál vissza fenntartva az enzim működőképes állapotát. Az aszkorbát regenerálását Meister (1994) szerint a protein-diszulfid izomeráz (PDI) végzi glutation felhasználásával, melynek eredményeképpen a dehidroaszkorbátból (DHA) redukált állapotú aszkorbát keletkezik.

A 4-hidroxi-fenilpiruvát dioxigenáz a tirozin-katabolizmus során a 4-hidroxi-fenilpiruvát átalakítását végzi homogentizinsavvá. Az enzim működéséhez nem igényel α -ketoglutarátot, az oxigén molekula mindkét atomját ugyanabba a szubsztrátba építi be. Skorbutizált tengerimalacokban az enzim csökkent működése folytán tirozinémia alakul ki, a vizeletben megjelenik a 4-hidroxi-fenilpiruvát és 4-hidroxi-fenillaktát (Englard és Seifter 1986).

A karnitin az aktivált, hosszú szénláncú zsírsavak mitokondrium mátrixba való szállításában vesz részt (Bieber 1988, McGarry 1995). A karnitin szintézise fehérjelebontásból származó ϵ -N-trimetillizinből indul ki, mely β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin, γ -trimetilamino-butiraldehid és γ -butirotetain vegyületeken keresztül karnitinná alakul. A folyamat két hidroxilációs lépést tartalmaz: az ϵ -N-trimetillizinből β -hidroxilációval β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin képződik, majd az utolsó, reverzibilis lépésben a γ -butirotetain hidroxilálódik karnitinná (Vaz és Wanders 2002). A két reakciót két Fe^{2+} - α -ketoglutarát-függő dioxigenáz (ϵ -N-trimetillizin-hidroxiláz és γ -butirotetain-hidroxiláz) katalizálja, melyek működését redukálószeresek, többek közt az aszkorbát is fokozzák (Hulse és mtsai. 1978, Lindstedt és Lindstedt 1970).

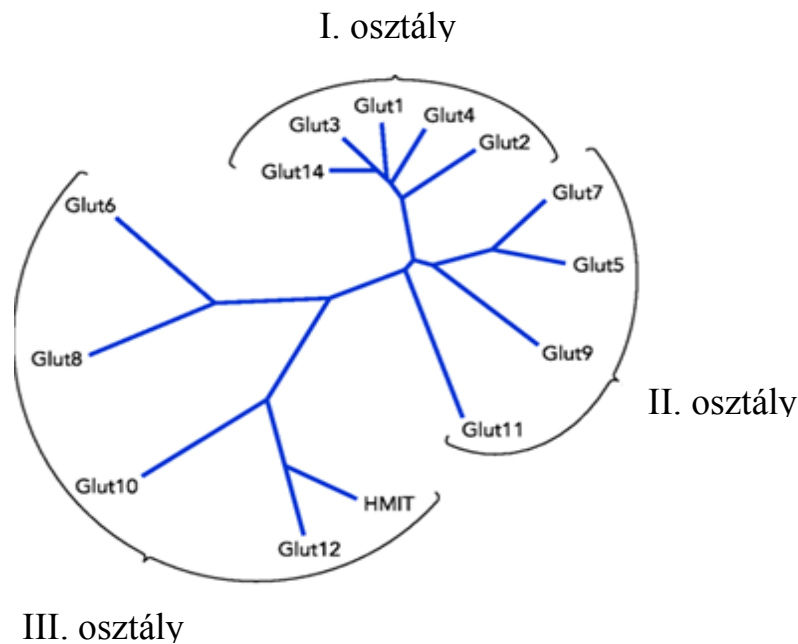
A C-vitaminról kimutatták, hogy Fe^{2+} - α -ketoglutarát-függő dioxigenázok kofaktoraként hiszton és DNS demetilációs reakciókban is részt vesz a sejtmagban. A TET fehérjecsalád tagjai (TET1-3) a DNS 5-metilcitozin nukleotidjait hidroxilálják első lépésben 5-hidroximetilcitozinná, majd 5-formilcitozinná és 5-karboxilcitozinná. Az 5-formilcitozint és az 5-karboxilcitozint a terminális deoxinukleotidil-transzferáz enzim képes módosítatlan citozin nukleotiddá alakítani, ezáltal bezárni az aktív demetilációs kört. Ezeknek az epigenetikai módosításoknak jelentős szerepe lehet a génexpresszió szabályozásában.

1.3. SLC szállító fehérjecsald

Az SLC (solute carrier) szupercsalád közel 400 membrán-kötött fehérjéből áll, melyeket 52 alosztályba csoportosítanak (Lin és mtsai. 2015). Ezek a transzporterek szubsztrátok széles körének biológiai membránokon keresztüli szállítását segítik elő facilitált diffúzióval vagy másodlagos aktív transzporttal.

1.3.1. GLUT transzporterek (SLC2)

Eukarióta sejtekben monoszacharidok, cukoralkoholok és egyéb szerves kismolekulák membránon keresztüli transzportját az *SLC2* gén által kódolt GLUT (glukóz transzporter) fehérjecsald látja el. Eddig 14 különböző GLUT fehérjét azonosítottak, melyek szekvencia azonosság alapján 3 osztályba (2. ábra) sorolhatók (Manolescu és mtsai. 2007, Mueckler és Thorens 2013).



2. ábra: A GLUT fehérjék osztályozása

(Manolescu és mtsai. 2007)

Az eddig azonosított 14 GLUT transzporter szekvencia homológia alapján három különböző osztályba sorolható. Az egyes osztályokra eltérő transzport aktivitások jellemzőek.

Az I. osztályba a jól karakterizált GLUT transzportereket sorolják, melyek glukóz transzportjában vesznek részt. A II. osztályba tartozó fehérjék főként fruktózt szállítanak, a III. osztályban pedig azok az atipikus szerkezetű GLUT transzporterek találhatók, melyeknek nem, vagy kevéssé ismert a szubsztrátja. Minden GLUT családba tartozó glukóz transzporter integráns membránfehérje, 12 transzmembrán szegmensből épül fel. Az I. és II. GLUT osztályokra jellemző, hogy egy hosszú intracelluláris hurkot tartalmaznak a 6. és 7. transzmembrán szegmensek között és egy ugyancsak hosszú, de extracelluláris, glikozilált hurok található az 1. és 2. szegmensek között. A III. osztály szerkezete annyiban tér el, hogy a glikozilált hurok a 9. és 10. szegmens között helyezkedik el (Mueckler és mtsai. 1985, Manolescu és mtsai. 2007). A GLUT transzporterek eltérő szubsztrát specificitást mutatnak, részt vesznek különböző hexóz molekulák, valamint a mio-inozitol (Uldry és mtsai. 2001) szállításában, továbbá kimutatták húgysav (Bibert és mtsai. 2009, Matsuo és mtsai. 2008, So és Thorens 2010), glukózamin (Maher és Harrison 1990) és dehidroaszorbát (Lee és mtsai. 2010) transzport működésüket is. A GLUT transzporterek szakirodalomban ismertetett szubsztrátjait és szöveti lokalizációjukat az 1. táblázat foglalja össze.

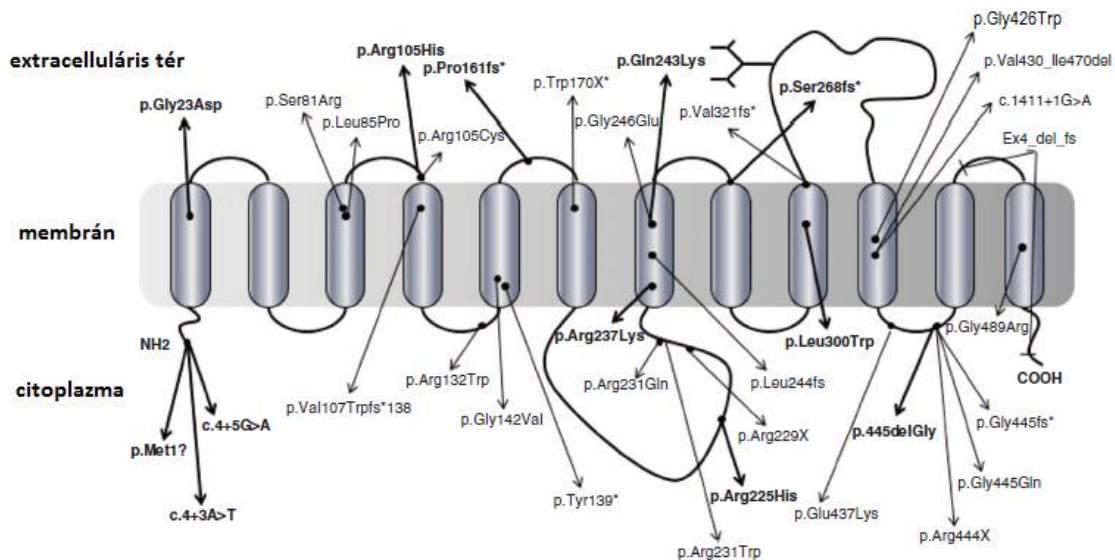
1. táblázat: A GLUT transzporterek eddig ismert szubsztrátjai és szöveti előfordulásuk.

A táblázat Thorens és Mueckler (2010) munkája alapján készült új szakirodalmi adatok felhasználásával (Corpe és mtsai. 2013, Shaghghi és mtsai. 2017).

fehérje	gén	szubsztrát	szövet
GLUT1	SLC2A1	glukóz, galaktóz, mannóz, glukózamin	eritrociták, agy, vér-agy gát.
GLUT2	SLC2A2	glukóz, galaktóz, mannóz, glukózamin	agy, vese, máj, Langerhans-szigetek
GLUT3	SLC2A3	glukóz, galaktóz, mannóz, xilóz	agy, here
GLUT4	SLC2A4	glukóz, glukózamin	fehér- és barna zsírszövet, izomszövet, szív
GLUT5	SLC2A5	fruktóz	vékonybél, vese
GLUT6	SLC2A6	glukóz	agy, lép, leukociták
GLUT7	SLC2A7	glukóz, fruktóz	vékonybél, vastagbél, here, prosztata
GLUT8	SLC2A8	glukóz, fruktóz, galaktóz, DHA	here, agy, máj, barna zsírszövet, tüdő, lép, vékonybél
GLUT9	SLC2A9	húgysav (glukóz, fruktóz)	tüdő, máj, placenta, vese, leukociták
GLUT10	SLC2A10	glukóz, galaktóz (DHA?)	szív, tüdő, agy, máj, hasnyálmirigy, placenta, vese, izom szövet
GLUT11	SLC2A11	glukóz, fruktóz	szív, izom szövet
GLUT12	SLC2A12	glukóz, DHA	szív, prosztata, izom szövet, placenta
GLUT13 (HMIT)	SLC2A13	mio-inozitol	agy, zsírszövet
GLUT14	SLC2A14	fruktóz, glukóz, DHA	here, vékonybél, vastagbél, placenta, máj, vese, szív, petefészek

1.3.2. A GLUT10

A GLUT10 az *SLC2A10* gén által kódolt glukóz transzporter, mely a glukóz transzporterek III. osztályába sorolható. McVie-Wylie és munkatársai (2001) szekvencia analízissel megállapították, hogy az *SLC2A10* gén a 20. kromoszóma q12-q13.1 régiójában található, 5 exont és 4 intront tartalmaz, és ~28 kb hosszúságú szakaszt tesz ki a genomi DNS-ben. A GLUT10 fehérje 541 aminosavból áll (McVie-Wylie és mtsai. 2001), a GLUT3-mal 29,7%, az GLUT8-cal körülbelül 33,6% szekvencia azonosságot mutat. Szerkezetének hidropátiás analízise alapján 12 transzmembrán hélixből épül fel, a 6. és 7. hélixek között tartalmaz egy hidrofil intracelluláris hurkot, a 9. és 10. hélixek között pedig egy hosszú extracelluláris hurok helyezkedik el, amely feltehetően az N-terminális glikozilált helyet tartalmazza (McVie-Wylie és mtsai. 2001). A GLUT10 fehérjének 35 mutációját sikerült eddig azonosítani, a fehérje szerkezetben keletkező változásokat a 3. ábra szemlélteti (Beyens és mtsai. 2018).



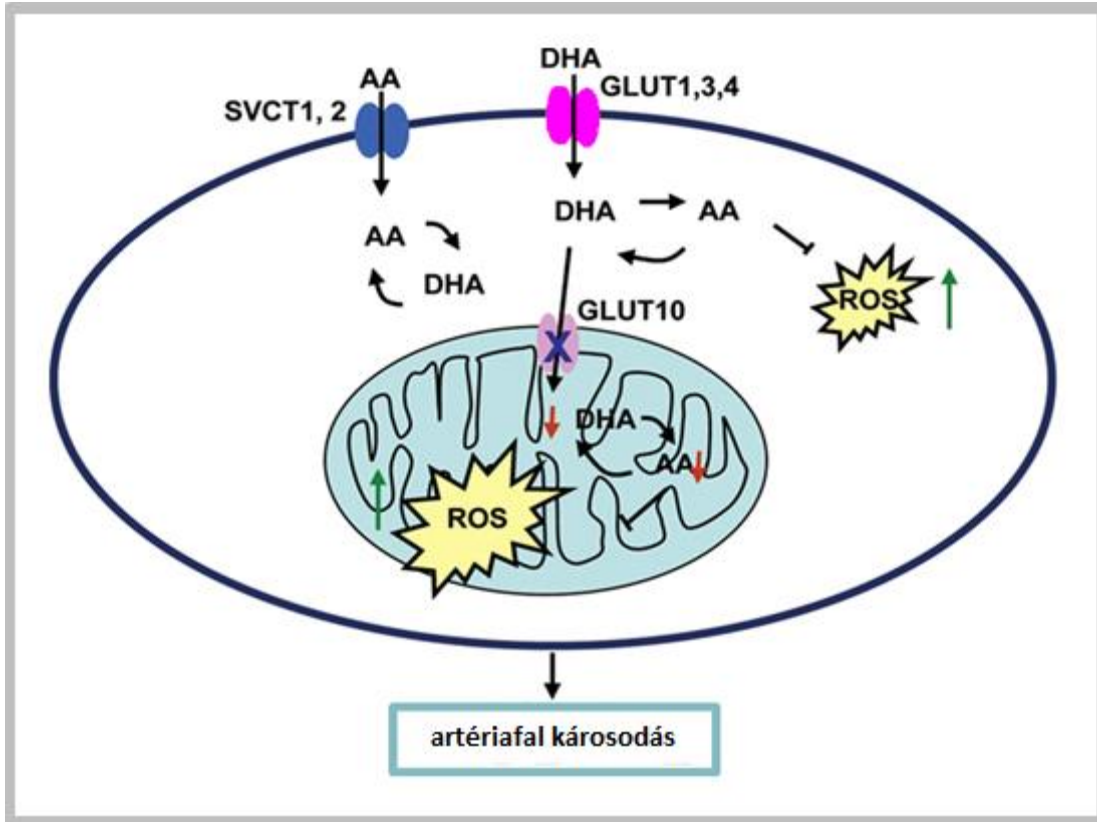
3. ábra: Az *SLC2A10* gén szakirodalomban leírt mutációi. (Beyens és mtsai. 2018)

A 12 transzmembrán egységgel rendelkező GLUT10 fehérje génjében eddig 35 mutációt írt le a szakirodalom. Az egyes mutációkat az ábrán fekete nyilak jelölik.

Dawson és munkatársai (2001) karmosbeka petesejtekben expresszáltatták a GLUT10 transzportert. Vizsgálatuk közben jutottak arra a megállapításra, hogy a GLUT10 segíti

a 2-deoxi-D-glukóz transzportját. A D-glukóz és a D-galaktóz versengés révén csökkentette a 2-deoxi-D-glukóz felvételét; a transzport folyamat floretinrel gátolható volt. Wood és munkatársai 2003-ban RT-PCR-rel végzett kísérletekkel igazolták a GLUT10 jelenlétét egér és humán zsírszövetben. *In situ* hibridizációs vizsgálatok során Lee és munkatársai magas GLUT10 mRNS expressziót észleltek egér aorta simaizom sejtjeiben (Lee és mtsai. 2010). Alap körülmények között egér eredetű 3T3-L1 differenciált adipocita sejtvonalban a transzporter a Golgi-ban lokalizálódott, mely inzulin stimulusra kihelyeződött a mitokondriumba. Hasonló eredményt kaptak A10 patkány szívizomból származó simaizom sejtekben, azzal az eltéréssel, hogy a GLUT10 normál és inzulin stimulált körülmények között is a mitokondriumban helyezkedett el. A GLUT10 overexpressziója fokozta az L-dehidroaszorbinsav mitokondriumba való felvételét, ami D-glukózzal gátolható volt. A10 sejtekben a GLUT10 túltermelése csökkentette a mitokondriumban az oxidatív stressz során keletkező reaktív oxigéngyök képződést (4. ábra; Lee és mtsai. 2010).

Egy másik kutatócsoport humán HEK293 sejtekben azonosított egy alacsony affinitású Na^+ -függő C-vitamin (SVCT2) transzporter fehérjét, amely felelős lehet az aszkorbát mitokondriumba való bejutásáért. Emellett a GLUT10 elenyésző mértékben fejeződött ki ugyanebben a sejtvonalban. Az eredményekből arra következtettek, hogy a GLUT10-nek nincs jelentős szerepe a mitokondriális dehidroaszorbát transzportban (Muñoz-Montesino és mtsai. 2014). Ezt a feltevést támasztották alá Szarka és Balogh (2015) *in silico* predikciós vizsgálatai, mellyel kimutatták, hogy nagyon kicsi a valószínűsége a GLUT10 mitokondriális lokalizációjának.

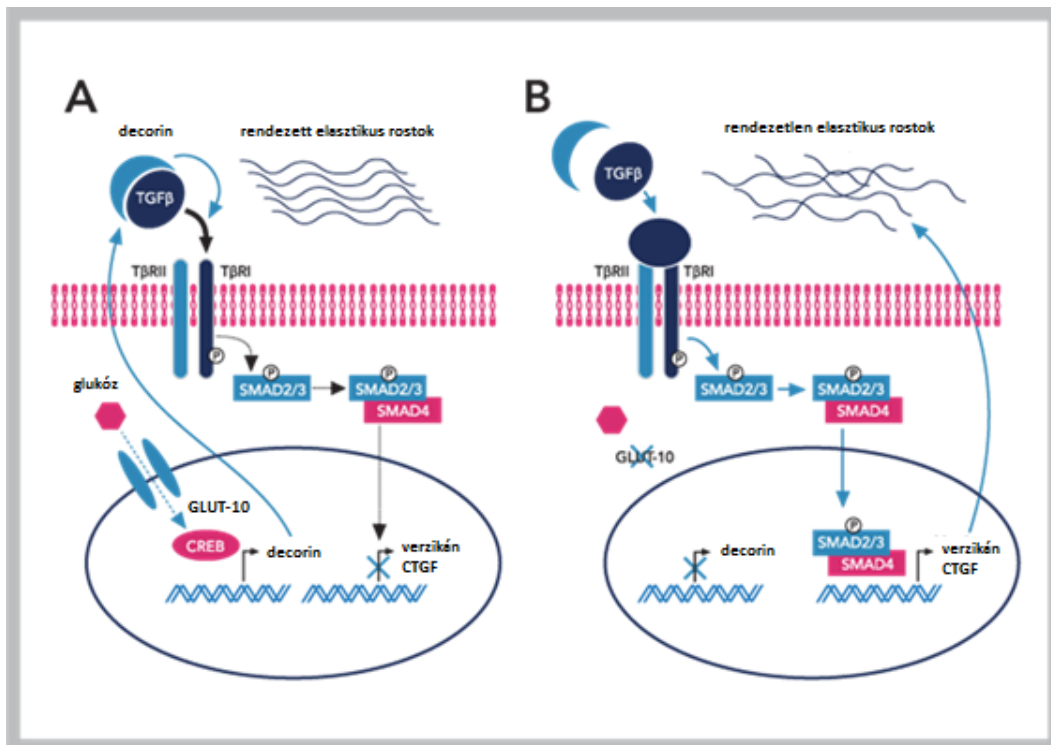


4. ábra: GLUT10 feltételezett szerepe a mitokondriumban. (Lee és mtsai. 2010)

Az aszkorbát (AA) és oxidált formája, a dehidroaszkorbát (DHA), nátrium-függő C-vitamin transzporterek és GLUT transzporterek segítségével a sejtbe jut, majd a mitokondrium membránjában lévő GLUT10-en keresztül kerülhet a mátrixba, ahol aszkorbáttá redukálódik és a keletkező reaktív oxigéngyökök (ROS) semlegesítésében vesz részt. A hipotézis alapján a GLUT10 transzport funkciójának kiesése ROS felhalmozódás révén vezethet az artériafal károsodásához.

Coucke és munkatársai 2006-ban végeztek kísérleteket a GLUT10 sejten belüli elhelyezkedésének felderítésére. Kimutatták, hogy a fehérje humán fibroblaszt sejtekben a sejtmag periferiáján található tetemes mennyiségben (Coucke és mtsai. 2006). Akhurst erős klinikai hasonlóságokat fedezett fel a GLUT10 mutációjának következtében fellépő kanyargós artéria szindróma és a Loeys-Dietz szindróma között, melyet a *TGFBRI*, illetve a *TGFBRII* mutációja okoz (Akhurst 2006). Ebben a betegségben a tünetek a TGF β jelpálya túlműködése következtében alakulnak ki. Ebből kiindulva a

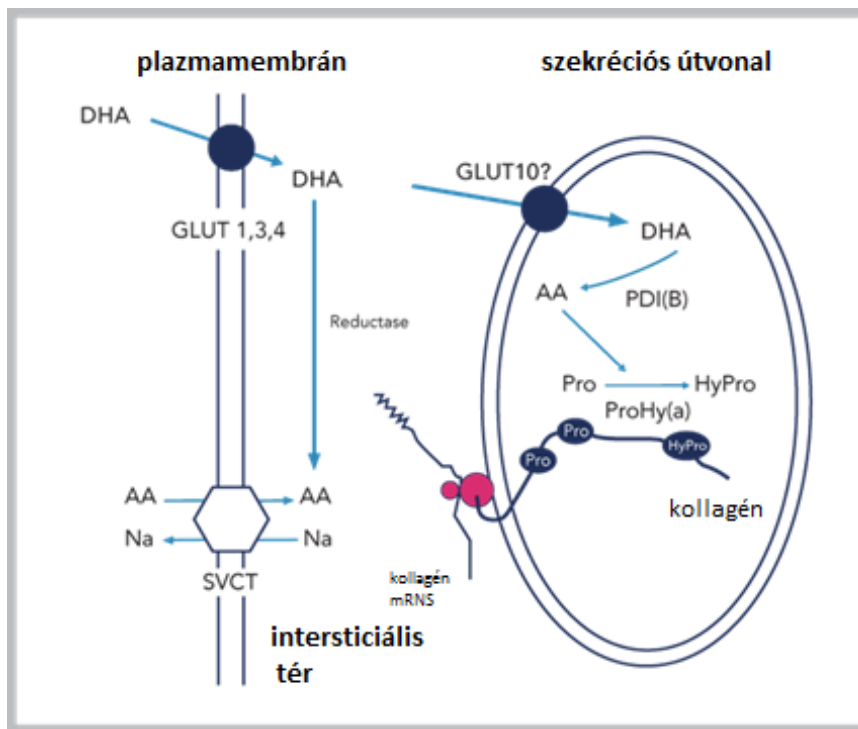
szerző felállított egy modellt a GLUT10 szerepére és a kanyargós artéria szindróma patogenezisére vonatkozóan, miszerint ez a transzporter glukózt szállítana a sejtmagba és a cAMP-reszponzív elemhez kötődő fehérjén (CREB) keresztül aktiválná a decorin transzkripcióját (5.A. ábra). A decorin extracellulárisan kötődik a TGF β ligandhoz és inaktiválja azt, ezáltal csökkentve a jelpálya működését. GLUT10 hiányában (5.B ábra) az útvonal aktiválódik és SMAD2/3 transzkripciós faktorok foszforilációját követően átíródnak a SMAD-függő gének, többek között a CTGF (kötőszöveti növekedési faktor) és a verzikán génjei. A CTGF a fokozott kollagén termelésért a verzikán pedig a simaizomsejtek túlburjánzásáért felelős.



5. ábra: A GLUT10 hiányában kialakuló glukóz-függő TGF β jelpálya aktiváció. (Akhurst 2006)

A kanyargós artéria szindróma ezen modellje szerint a GLUT10 perinukleáris elhelyezkedésű és glukózt transzportál a sejtmagba. GLUT10 hiányában a sejtmag periferiáján glukóz-függő TGF β aktiválódás lép fel, ami stimulálja az érfal sejteinek proliferációját.

Egy későbbi kísérletsorozatban PAC-1 patkány aorta simaizom sejtekben a GLUT10 ER-rel való kolokalizációját mutatták ki. Ez az eredmény, illetve a kanyargós artéria szindróma kötőszöveteket érintő elváltozásai sugallták az a hipotézist, hogy a GLUT10 az ER membránjában helyezkedik el és dehidroaszorbátot, az aszkorbát oxidált formáját szállítja az ER-ba. A DHA redukálódik a lumenben és proлил-, valamint lizil-hidroxiláz enzimek kofaktoraként részt vesz a megfelelő struktúrájú kollagén és elasztin fehérjék kialakításában (6. ábra, Segade 2010). A GLUT10 mutációja okozhatja a lokális csökkent aszkorbátszint következtében kialakuló jellegzetes tüneteket a kanyargós artéria szindrómás betegeknél, a TGF β jelpálya pedig az extracelluláris mátrix defektusa következtében aktiválódhat másodlagos hatásként.



6. ábra: GLUT10 feltételezett lokalizációja az endoplazmás retikulumban.
(Segade 2010)

A GLUT10 transzporter az ER membránjában helyezkedik el és DHA-t szállít a lumenbe. A DHA a lumenben aszkorbáttá (AA) redukálódik és részt vesz a proлил- és lizil-hidroxiláz enzimek működésében, hozzájárulva a kollagén és elasztin molekulák megfelelő struktúrájának kialakításához.

1.3.3. GLUT10 génkiütött (knockout) állatmodellek

A GLUT10-zel kapcsolatos kísérletek kapcsán több munkacsoport is vállalkozott arra, hogy knockout állatot állítson elő. Az egér, mint modell állat nagyon ellentmondásos eredményekhez vezetett. Egy 2008-as tanulmány szerint a homozigóta c.383G>A (G128E misszensz szubsztitúció) és c.449C>T (S150F misszensz szubsztitúció) mutációval rendelkező egerek nem mutatják a humán kanyargós artéria szindróma egyetlen tünetét sem (Callewaert és mtsai. 2008). Cheng és munkatársai később hisztokémiai módszerrel kimutatták, hogy az ugyanilyen mutációval rendelkező egerek artériái megnövekedett mennyiségű elasztikus rostot tartalmaznak és az érfalak elvékonyodnak (Cheng és mtsai. 2009). Azonban a glukóz koncentrációja a vérben és a vizeletben normális, a felnőtt egyedeknél sem találtak az agyban aneurizmákat, sztenózisokat, sem kanyargós lefutású ereket, külső fenotípusos jegyeik megegyeznek a kontroll állatokéval. Feltételezhető, hogy fenotípusos tünetek azért nem alakulnak ki, mert az egér azon fajok közé tartozik, melyek képesek C-vitamin szintézisre, számukra ez a vitamin nem esszenciális. Folyamatban van olyan dupla KO egerek előállítása, melyekben nem csak a GLUT10, hanem az aszkorbát szintézisének utolsó lépését katalizáló GLO génje is ki van ütve. Ilyen módon vizsgálhatóvá válik majd a GLUT10 szerepe a C-vitamin transzportjában *in vivo* körülmények között is.

A zebrahal (*Danio rerio*) korai fejlődési stádiumban jól alkalmazható modell állatnak, mutatja a kanyargós artéria szindróma tüneteit és ugyanúgy skorbutizálható, mint a tengerimalac vagy az ember. Antiszensz morfolinó oligonukleotid mikroinjektálásával *in vivo* gátolni lehet a transzlációt, ezáltal meggátolni pl. a GLUT10 fehérje kifejeződését. A beavatkozás következtében az embriókban hajlott (1. csoport) vagy hullámos (2. csoport) gerinchúr alakult ki, a kezelt embriók harmadik csoportjában az embriók rendellenesen fejlődtek, kicsik maradtak, - kiterjedt főleg a farok részre irányuló - diszpláziával (Willaert és mtsai. 2012). A zebrahal gyors fejlődésű, alacsony a fenntartási költsége és lényegesen kisebb a helyigénye, mint a kísérletekhez általában használt rágcsáló fajoknak, mégis kevés labor van ezen fajta kísérleti állatok fenntartására berendezkedve.

1.3.4. *SLC23- Na⁺-függő C-vitamin transzporterek*

A C-vitamin redukált formájának felvétele az emberi szervezetben aktív mechanizmussal történik két Na⁺-függő C-vitamin transzporter (SVCT-1/2) segítségével. Az SVCT-1 transzportert az *SLC23A1* gén kódolja, amely az 5 kromoszóma q31.2-31.3 régiójában található. A 16,096 bázispár hosszúságú gén 15 exont tartalmaz (Wang és mtsai. 2000, Eck és mtsai. 2004). Az SVCT-1 nagy kapacitású, de kis affinitású ($K_m = 65-237 \mu\text{M}$) C-vitamin transzporter, melynek elsődleges feladata a szervezet C-vitamin homeosztázisának fenntartása a táplálékkal bevitt aszkorbát felszívása, illetve a vesén keresztüli visszaszívás révén (Savini és mtsai. 2008). Az SVCT-1 génkiütött egerekben az aszkorbát vizeletbe ürítése körülbelül 10-szeresére emelkedett a vad típusú egerekéhez képest, míg a vérplazma C-vitamin szintje 50-70%-kal csökkent (Corpe és mtsai. 2007).

Az SVCT-2 transzportert kódoló gén (*SLC23A2*) a 20. kromoszóma rövid karjának 12.2-12.3 régiójában található, 158,398 bázispár hosszúságú és 17 exonból áll (Stratakis és mtsai. 2000, Eck és mtsai. 2004). Kis kapacitású és nagy affinitású transzporter ($K_m = 8-62 \mu\text{M}$), mely széles körben expresszálódik az aktív anyagcserét folytató és specializált sejtekben, szövetekben. Nagy mennyiségben fejeződik ki az agyban, vázizomban, szemben és a placentában (Wilson 2005). Az SVCT-2-ről kimutatták, hogy elengedhetetlen a prenatális és a placentán keresztüli aszkorbát transzportban (Biondi és mtsai. 2007). Az *slc23a2*^{-/-} génkiütött egerek méhen belüli fejlődése normális, azonban a születést követően rövid időn belül meghalnak légzési elégtelenség, illetve intracerebrális vérzés következtében, melyet feltehetően a központi idegrendszer elégtelen működése okoz (Sotiriou és mtsai. 2002).

1.4. *C-vitamin transzportja az eukarióta szervezetben*

Az ember a napi C-vitamin szükségletét a GLO enzim hiánya miatt természetes forrásból és étrend-kiegészítőkből kénytelen fedezni. A C-vitamin étrendben is megtalálható két leggyakoribb formája, az aszkorbát és a dehidroaszkorbinsav (DHA) a bélrendszer teljes hosszán képes felszívódni (Malo és Wilson 2000). Mindkét vegyület felvétele telíthető növekvő szubsztrátkoncentráció mellett, ami arra utal, hogy a felvételt

transzporterfehérjék segítik. A C-vitamin redukált formájának, az aszkorbátnak a felvétele a bél kefeszegélyű epitél sejteinek membránjában elhelyezkedő Na^+ -függő C-vitamin transzportereken keresztül történik aktív transzporttal, melyek működése Na^+/K^+ -ATPázhoz kapcsolt. Az SVCT-k polarizáltan helyezkednek el az enterociták plazmamembránjában, az SVCT-1 kifejeződése az apikális, míg az SVCT-2 transzporterek lokalizációja a bazolaterális membránban figyelhető meg (Boyer és mtsai. 2005). A DHA felvétele a sejtek citoplazmájába glukóz-transzportereken (GLUT1, GLUT3 és valószínűleg GLUT4) keresztül valósul meg facilitált diffúzióval (Rumsey és mtsai. 1997, Rumsey és mtsai. 2000). Patkány eredetű enterocitákban kimutatták, hogy a GLUT2 és a GLUT8 is képes a DHA transzportjára (Corpe és mtsai. 2013), azonban a szakirodalmi forrásokban a publikált eredmények ellentmondásosak a GLUT2 transzportert illetően (Cura és Carruthers 2012, Mardones és mtsai. 2011). Karmosbéka petesejtben expresszálatott GLUT14 transzporterről bebizonyosodott, hogy szintén glukóz és DHA transzporter (Shaghghi és mtsai. 2017). A GLUT14 génjének egy pontos nukleotid polimorfizmusait (rs2889504, rs12815313, rs10846086) összefüggésbe hozták az IBD-vel (Inflammatory Bowel Disease-gyulladásos bélbetegség), melynek hátterében feltevések szerint az antioxidánsok, többek között a C-vitamin transzport defektusa állhat (Shaghghi és mtsai. 2014, Corpe és mtsai. 2013, Padayatty és mtsai. 2003). A GLUT14 kifejeződését megfigyelték vékonybélben, vastagbélben, herében, májban, vesében, szívben, vázizomban valamint a placentában és a petefészekben is (Shaghghi és mtsai. 2017).

A fent említett transzporter fehérjék megtalálhatóak az eukarióta sejtek kompartmentumainak membránjában is, ezáltal segítve a sejtek redox homeosztázisának fenntartását. A GLUT14 transzporter például a COMPARTMENTS szubcelluláris lokalizációs adatbázis összesítő eredménye alapján a plazmamembránban és a sejtmembránban helyezkedik el.

A mitokondrium membránjában főként GLUT és SVCT-2 transzporterek kifejeződése jellemző (Szarka és Lőrincz 2013). A GLUT1 aszkorbát transzportban betöltött szerepét vesesejtkultúra-eredetű mitokondriumokban KC és munkatársai közölték 2005-ben. U937 humán sejtekben SVCT-2 expresszióját írták le (Azzolini és mtsai. 2013), ami arra utal, hogy a C-vitamin redukált formája is képes átjutni a mitokondriális membránon. Patkánymáj ER frakcióján végzett transzportmérésekkel

igazolták, hogy az aszkorbát felvétele ebbe a kompartmentumba preferáltan DHA formájában történik feltehetőleg GLUT transzporterén keresztül, majd a DHA a lumenben aszkorbáttá redukálódik (Bánhegyi és mtsai. 1998) glutation vagy fehérjék tiolcsoportjainak terhére.

A mai napig ismeretlen az a mechanizmus, amellyel az aszkorbát a sejtet elhagyva az extracelluláris térbe kerül. Feltevések szerint ebben a folyamatban térfogat-érzékeny anion csatornák (VSOAC- volume sensitive anion channel) játszanak szerepet, melyekről kimutatták, hogy a sejten belüli ozmolaritás változás hatására anionok passzív transzportjára képesek (Jackson és Strange 1993, Strange és Jackson 1995). Asztrocita sejt kultúrában kimutatták VSOAC fehérjék működését (Siushansian és mtsai. 1996), azonban enterocitákban jelenlétüket nem sikerült azonosítani. A glutamát-aszkorbát hetero-kicserélődés (hetero-exchange), mint transzport lehetőség abból a megfigyelésből ered, hogy az agyi sejtekben a glutamát felvétele aszkorbát effluxot idéz elő (Grünwald és mtsai. 1984, Cammack és mtsai. 1991, Rebec és mtsai. 1994). Hipertonikus médium, illetve anion-transzport inhibitorok használata (pl: DIDS) gátolja az aszkorbát kiáramlását (Upston és mtsai. 1982), azonban az intracelluláris aszkorbát koncentrációnak semmilyen hatása nincs sem a glutamát felvételére, sem leadására, ami a VSOAC aszkorbát effluxban betöltött szerepét valószínűsíti. Régóta ismert, hogy az endokrin és exokrin sejtek szekréciós vezikulumai aszkorbátot tartalmaznak. Mellékvesevelő sejtjeinek kromaffin vezikulumaiban az aszkorbát mennyisége millimoláros koncentrációban van jelen, mely excitózissal ürül (Daniels és mtsai. 1982, Daniels és mtsai. 1983). Liposzómákba ágyazott réskapcsolat (gap-junction) hemicsatornákon végzett kísérlettel igazolták, hogy a struktúra jelenléte megnöveli az aszkorbát permeabilitását (Ahmad és mtsai. 2002, Ramundo-Orlando és mtsai. 2005). Az eredményekből arra következtettek, hogy a hemicsatorna képes glukóz mellett az aszkorbát (és glutation) transzportját is mediálni (Gao és mtsai. 2004, Berthoud és mtsai. 2009).

2. Hipotézis és célkitűzések

Munkacsoportunk korábbi eredménye alapján az aszkorbinsav oxidált formájának, a DHA-nak a patkány máj ER-ba (mikroszóma frakció) való felvétele igen jelentős az aszkorbát felvételhez képest, ami alapján DHA-specifikus transzporter jelenlétét feltételezzük az ER membránjában.

Hipotézisünk szerint a GLUT10 transzporter az ER membránjában, valamint a sejtmembránban található és DHA-ot szállít az ER belső terébe. A DHA aszkorbáttá redukálódik ebben a speciális környezetben, feltehetően a protein diszulfid izomeráz, vagy hasonló működésű enzimek segítségével, majd kofaktorként részt vehet a prolil- és lizil-hidroxiláz enzimek működésében. Ezeknek az aminosavaknak a hidroxilálása elengedhetetlen a megfelelő szerkezetű kollagén rostok kialakításában.

A kísérleti munka fő célkitűzései a következők voltak:

- A GLUT10 glukóz transzporter sejten belüli elhelyezkedésének felderítése humán fibroblaszt sejtvonalakban;
- Az aszkorbát és DHA transzport mérése kontroll és ATS fibroblaszt sejtekben;
- különböző szubsztrátok transzportjának vizsgálata *in vitro* transzlált GLUT10-et tartalmazó proteoliposzómákban.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Lokalizációs kísérleteinket hím Hartley tengerimalacokon (400-500 g), hím Wistar patkányokon (180-210 g) és hím BALB/c egereken végeztük. A megérkezést követően az egereket és patkányokat normál tápon tartottuk. A tengerimalacokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoport egy hétig normál tápot (0,1 g/ 100 g aszkorbát tartalom) kapott, majd aszkorbát mentes diétára állítottuk őket 3 hétre. A másik csoportot négy héten keresztül a normál táppal etettük. Ezt követően az állatokat leöltük és a májat eltávolítottuk.

3.2. Szubcelluláris frakciók előállítása májszövetből

A hím Hartley tengerimalacok, hím Wistar patkányok, valamint hím BALB/c egerek (20-28 g) májából mikroszómát preparáltunk (Henne és Söling 1986). A frissen eltávolított májat kis darabokra vágtuk HEPES pufferbe (20 mM, pH=7) tettük, melyből Potter-Elvehem homogenizátorral szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót kihígítottuk 20 %-os koncentrációra, majd 1000 g-vel centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on. A fugálás során keletkezett sejtörmelékes üledéket eldobtuk és a felülúszót centrifugáltuk (11000 g, 20 perc, 4 °C-on). Így megkaptuk a mitokondriális frakciót. A felülúszót új centrifugacsövekbe pipettáztuk és ultracentrifugával elválasztottuk a citoszólikus (felülúszó) és mikroszóma (üledék) frakciókat (100 000 g, 60 perc, 4 °C). A mitokondriális és mikroszóma frakciókat MOPS pufferben (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, pH= 7) felszuszpendáltuk és felhasználásig az összes frakciót nitrogénben tároltunk. A frakciók fehérjekoncentrációját a későbbiekben Pierce BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg.

3.3. Sejttenyészetek

A fibroblaszt sejtvonalak genti és bresciani együttműködő csoportoktól származnak, melyeket ATS-es és egészséges kontroll személyek bőrbíopsziájából

állítottak elő (Coucke és mtsai. 2006) a Helsinki Nyilatkozat irányelveit figyelembe véve. A betegek által hordozott mutációkat az alábbi 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat: A kísérletek során felhasznált ATS beteg sejtvonalak és hordozott mutációik.

beteg	mutáció	mutáció leírója
P1	homozigóta, 1334delG, mikrodéláció	Coucke és mtsai. 2006
P2	heterozigóta, c.1309G>A és c.1330C>T tranzíció	Drera és mtsai. 2007
P3	homozigóta, 1411+1G>A, splicing mutáció	Castori és mtsai. 2012
P4-8	homozigóta, 510 G-A csere	Coucke és mtsai. 2006

Az irharéteg eredetű fibroblaszt sejtvonalatokat *in vitro* körülmények között 2 mM L-glutamin, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 µg/ml Penicillin/Sztreptomycin tartalmú DMEM (GIBCO) médiumban tenyésztettük. Kísérleteinkhez a sejteket 5-7 passzázsszám elérésekor használtuk fel. A sejt kultúrákat 5%-os CO₂ koncentráció mellett 37°C-on tartottuk fenn sejtenyésztő inkubátorban.

3.4. Szubcelluláris frakciók előállítása humán fibroblasztokból

A szubcelluláris frakciókat humán kontroll fibroblaszt sejtekből készítettük Leuzzi és munkatársai (2003) közleménye alapján, kisebb módosításokkal. A konfluens flaska tartalmát mosási lépést követően tripszinezttük, majd szacharóz-HEPES pufferben (0.34 M szacharóz, 10 mM HEPES) felszuszpendáltuk azt. A sejteket ultrahang segítségével feltártuk és a megfelelő homogenitás elérése érdekében 5-ször 15 másodpercig szonikáltuk 4 °C-on (Sonic 300 Dismembrator, 35% amplitúdó). A homogenátumot centrifugacsövekbe töltöttük és 1000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A keletkezett üledék a sejtörmeléken kívül tartalmazta a sejtmagi frakciót, amit egy további centrifugálási lépéssel tisztítottunk. A felülúszót tovább centrifugáltuk új centrifugacsőben 18000 g-n 20 percig, így jutottunk hozzá a mitokondriális frakcióhoz. Ezt követően a felülúszót újra lecentrifugáltuk (195 000 g, 60 perc). Az ultracentrifugálással nyert felülúszó tartalmazta a citoszólt, az üledék pedig a

mikroszóma frakciót. A frakciók tisztaságát Western blot technikával ellenőriztük (Margittai és mtsai, 2008). A frakciókra jellemző antitestek sorrendben a következők voltak: mitokondrium-VDAC1 (feszültség-függő anion csatorna 1); citoszól-GAPDH (gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz); mikroszóma- Grp94 (glukóz regulált protein 94); sejtmag- Lamin a/c. Az elsődleges antitestekhez specifikusan kötődő másodlagos antitestek tormaperoxidáz-konjugált egér, nyúl és kecske Ig elleni antitestek voltak (Santa Cruz Biotechnology).

3.5. hTERT fibroblaszt sejt kultúrák és géncsendesítésük

A BJ-5ta hTERT jelzésű immortalizált fibroblaszt sejt vonalat az LGC Standard-tól (Teddington, Middlesex, UK) szereztük be. A sejteket DMEM és Medium199 (GIBCO) médium 4:1 arányú keverékében növesztettük 10% FBS, 0,01% Hygromycin B és 1% antibiotikum/antimikotikum mellett. A fibroblasztokat 75 cm²-es flaskákban tartottuk a konfluens állapot eléréséig 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett.

A két GLUT10 csendesített hTERT sejt vonal előállítására GIPZ lentivírus konstrukcióba épített shRNS felhasználásával történt (Thermo Fisher Scientific által tervezett konstrukciók segítségével). A infektált sejtek szelektálását, a stabil klónok létrehozását puromycinnel végeztük, két nappal az infekciót követően.

3.6. RNS izolálás és PCR analízis

A hTERT sejt vonalakban az *SLC2A10* gén csendesítését PCR technikával ellenőriztük. Az RNS izoláláshoz a Qiagen RNeasy Plus Mini Kit termékét használtuk a gyártó utasításai alapján. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop1000 készülékkel határoztuk meg. Az RNS 2 µg-jából SuperScriptIII First-Strand Synthesis System termékkel cDNS-t állítottunk elő. A cDNS-t (1µl) az Invitrogen Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG-vel sokszoroztuk fel. A humán *SLC2A10* gén amplifikálásához használt oligonukleotid primerpár a következő volt: szensz, 5' CTTCAACTGGGCGGCAACC 3'antiszensz, 5'CGAGGACAGCGGTCAGTCCGT 3'. A sokszorosítást a következő protokoll szerint végeztük: 95 °C (10 perc), 40 ciklus

95 °C (20 s), 55 °C (20 s), 72 °C (20 s). Minden PCR termékből egyenlő mennyiséget (160 ng) vittünk fel a géltre. Az elválasztást 1%-os agaróz gélen végeztük.

3.7. *Western blot analízis*

3.7.1. *A géncsendesítés ellenőrzése*

A hTERT sejteket hatlyukú tenyésztőlemezen növesztettük 2-3 napig. A sejteket PBS-es (phosphate-buffered saline) mosást követően RIPA pufferben (50 mM Tris-Cl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS) lizáltuk. A fehérje koncentrációt Pierce BCA Protein Assay Kit-el határoztuk meg. A Western blot mérésekhez egyforma mennyiségű (20 µg) fehérjét vittünk fel 10-12%-os SDS poliakrilamid géltre (Laemmli, 1970). A fehérjéket elektro-blot készülékkel PVDF membránra transzferáltuk. A minták fehérje mennyiségét Ponceau S festést követő denzitometrálással hasonlítottuk össze. Az immun-detektáláshoz felhasznált antitestek: anti-glukóz transzporter GLUT10 antitest (1:1000; Abcam, Cambridge, UK) és GAPDH (1:7500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA).

3.7.2. *Sejtfrakciók Western blot analízise*

A szubcelluláris frakciók egyforma mennyiségét (20 µg) 12 %-os SDS poliakrilamid gélen futtattuk. Az analízis során felhasznált antitestek: anti-glukóz transzporter GLUT10 (1:1000; Abcam), VDAC1 (1:1000; Santa Cruz), Lamin a/c (1:2000; Santa Cruz) és Grp94 (1:5000; Santa Cruz); GAPDH (1:7500; Santa Cruz).

3.8. *Sejtkészítmény előállítása transzport méréshez*

3.8.1. *Intakt fibroblasztok*

A négy darab 75 cm³-es konfluens flaskából a médiumot eltávolítottuk, majd mostuk 1x-es PBS oldattal. A sejteket tripszinezttük és közömbösítést követően a sejtszuspenziót 50 ml-es faloncsőbe gyűjtöttük. A sejteket 5 percig 1000 g-vel fugáltuk 4 C°-on, a keletkezett pelletet mostuk 1x-es PBS-sel, majd újra centrifugáltuk.

Újra szuszpendáltuk a pelletet 3 ml PBS-ben, a sejtszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg.

3.8.2. Szemipermeabilizált fibroblasztok

Az intakt fibroblasztok esetében leírt eljárást annyiban módosítottuk, hogy az utolsó centrifugálási lépést követően a sejteket 20 mM-os MOPS (3-(N-morfolino) propánszulfonsav) pufferben (pH 7,2) szuszpendáltuk. 1 mM NaN_3 -al gátoltuk a mitokondrium működést és 40 μM végkoncentrációjú digitoninnal permeabilizáltuk a sejteket.

3.9. Liposzóma preparálás

A nagyméretű, egyrétegű liposzómákat (large unilamellar vesicles; LUV) L- α -foszfatidilkolin tartalmú tojáslecitinből állítottuk elő (tojáslecitin; Cat. No. 61755; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA). A lipideket kloroform-metanol 9:1 arányú keverékében feloldottuk és egy csiszoltdugós üveg falára filmréteget képeztünk belőle, majd ezt a réteget argongázzal a cső falára szárítottuk. A maradék nedvességet vákuum exikátor segítségével eltávolítottuk. Elsőként többrétegű liposzómát állítottunk elő a 20 mg/ml lipid koncentrációjú oldatból 40 °C-os, 20 mM koncentrációjú Hepes pufferrel (pH 7,4). A többrétegű liposzóma szuszpenziót 0,4 μm -es polikarbonát szűrőt tartalmazó extrúderen 40-szer átnyomtuk 40 °C-on.

3.10. A GLUT10 in vitro transzlációja

A humán *SLC2A10* gént PCR technika alkalmazásával sokszoroztuk fel, melyhez a következő primereket használtuk:

forward: 5' TACTTCCAATCCAATGCAATGGGCCACTCCCCACCT3';

reverse: 5' TTATCCACTTCCAATGCATCAGGAGGCCGCAGAGAT3'.

A keletkezett PCR terméket ligálás-független klónozással pEU3-NII-GLICNot vektorba illesztettük. Az így létrehozott vektort *E. coli* sejtbe transzformáltuk. Az ampicillin-rezisztens kompetens sejtekből felnövesztett kolóniából plazmidot izoláltunk,

amely tartalmazza a GLUT10 génjét. Az *in vitro* mRNS szintézishez 1 µg tisztított plazmidot használtunk fel, melyet NotI restrikciós endonukleázzal hasítottunk. A szintézis TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit-tel végeztük, a gyártó utasításai szerint. Az mRNS csapadékot levegőn szárítottuk, majd SUB-AMIX pufferben visszaoldottuk a transzlációhoz.

A *batch*-típusú transzlációhoz 5 µl búzacsíra-kivonatot, 1 µg mRNS-t, 5 µl liposzómát (20 mg/ml) és 0,8 µl kreatin-kinázt (1 mg/ml) használtunk fel 25 µl végtérfogatban. A reakcióelegyet 3 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Két negatív kontroll reakcióelegyet is összeállítottunk, az első reakcióelegyből a liposzómát, a másodikkól az mRNS-t hagytuk ki. A transzlációs elegyet a reakció végén 13000 rpm-en centrifugáltuk 30 percig.

3.11. Aszkorbát felvétel mérése rapid filtrációval

Az intakt és plazma membrán permeabilizált sejteket ¹⁴C-el jelölt aszkorbinsavval, dehidroaszkorbinsavval és egyéb szubsztrátokkal inkubáltuk, majd vákuum pumpa segítségével 0,45 µm pórusméretű membránon szűrtük át (Whatman International Ltd.; Maidstone, Kent, UK). A membránt 2 ml MOPS pufferrel mostuk, majd a visszamaradt radioaktivitást folyadék szcintillációs számlálóval mértük. Minden mérés végén 0,4 %-os végkoncentrációban deoxikólsavat adtunk. Ezzel a kezeléssel teljesen permeabilizáltuk a sejteket és a membránon visszamaradt radioaktivitást alapértékként levontuk a számolt koncentrációkból. A mérés során felhasznált ligandok a következők voltak: D-[U-¹⁴C]glukóz (Cat. No.: CFB2 Amersham Biosciences UK Ltd.; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) [U-¹⁴C]szacharóz (Cat. No.: CFB146 Amersham Biosciences UK Ltd. Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) UDP-glukuronsav[Glucuronyl-U-¹⁴C] (Product No.: NEC414010UC Perkin Elmer; Boston, Massachusetts, USA) L-[1-¹⁴C]aszkorbát (Cat. No.: ARC1569 Americal Radiolabeled Chemicals, Inc. 101 ARC Drive, Saint Louis, USA). A dehidroaszkorbinsavat brómozással állítottuk elő Del Bello és munkatársai közleménye alapján (Del Bello és mtsai., 1994). A mikroszómában és proteoliposzómában a transzport mérések a fent ismertetett módszer alapján történtek. A kísérletekhez 60 µg mikroszómális fehérjét, illetve 10 µg *in vitro* transzlált fehérjét használtunk fel.

3.12. Aszkorbát mennyiségi meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A kontroll és ATS sejtek aszkorbát tartalmát folyadékkromatográfiás eljárással határoztuk meg. A mérések megkezdése előtt a sejteket 50 μ M aszkorbáttal előkezeltük 0, 6, 12 és 24 óráig. A kezelést követően a sejtekről a tápoldatot eltávolítottuk, kétszer mostuk 1x-es PBS oldattal. Tripszinezést követően felvettük 25 w/v %-os metafoszforsav oldatban. A mintákban levő DHA-ot 5 mM végkoncentrációjú ditiotreitollal redukáltuk 20 percig tartó kezeléssel szobahőmérsékleten. A mintákat 14000 g-vel centrifugáltuk. Az aszkorbát szintet a tiszta felülúszóból határoztuk meg. Az elválasztást Waters Alliance 2690 típusú szeparációs modulon végeztük, melyhez 25 x 0,46 mm méretű, 5 μ m szemcseméretű, Nucleosil 100 C18 fordított fázisú oszlopot kötöttünk. A mintákat 0,1 M-os, végtérfogatban 0,2 mM EDTA-t is tartalmazó NaH_2PO_4 oldattal (pH 3,1) eluáltuk. A mérést 254 nm-en végeztük mintánként 25 percig. A kromatogramok görbe alatti területeiből és a sejt számokból határoztuk meg a sejtek által felvett aszkorbát mennyiségét.

3.13. Az ATS sejtek transzfekciója

Az *SLC2A10* cDNS-ét kontroll fibroblasztokból izolált RNS-ből állítottuk elő SuperScriptIII One-Step Synthesis System felhasználásával, majd felsokszoroztuk a 3.6 pontban leírtak szerint. A keletkezett PCR terméket eukarióta pEF6/V5-His-TOPOTM expressziós vektorba illesztettük a gyártó utasításai alapján (Life Technologies). Ez az emlős sejtekre specializált expressziós vektor blaszticidin rezisztencia gént tartalmaz, melynek segítségével szelektálni tudtuk a megfelelő klónokat. Ehhez a lépéshez 2 μ g/ml koncentrációban blaszticidint tartalmazó szelektív tápoldatot használtunk, melyet 3 naponta cseréltünk a sejteken. Ezen kívül a C-terminális végen V5 epitópot és polihisztidint (6 db hisztidin) tartalmaz, ami megkönnyíti a tisztítást és a későbbiekben az expresszált fehérje detektálását. A P1 ATS sejt vonal transzfekcióját TurboFect transzfekciós reagenssel végeztük a gyártó utasításai szerint (Thermo Scientific). Kontrollként üres vektorral (mock) transzfektált sejteket alkalmaztunk.

3.14. *Immunfluoreszcens analízis humán fibroblaszt sejtekben*

A GLUT10 dúsulásának mikroszkópos vizsgálatához a kontroll fibroblaszt sejtvonalakat 48 óráig növesztettük, majd 2 percig kezeltük 3 % paraformaldehid/ 0,5 % Triton X-100 keverékével. Ezt követően 3 % paraformaldehiddel fixáltuk a sejteket 20 percig. A mosási lépést 100 mM-os glicerin/ PBS oldattal végeztük. A sejteket 30 percig blokkoltuk 5 %-os bovine serum albumin oldattal, majd 20 µg/ml poliklonális anti-humán GLUT10 antitesttel (Alpha Diagnostic Int. Inc., San Antonio, TX) inkubáltuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on. A sejteket mostuk PBS-sel és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk 1:1000 hígítású Alexa Fluor 488-al kapcsolt anti-nyúl másodlagos antitesttel. A mitokondrium kimutatásához 2 µg/ml monoklonális anti-citokróm c antitesttel inkubáltuk a sejteket 2 órán át, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 594-el konjugált anti-egér antitestet alkalmaztunk. A fluoreszcens jelet Nikon Eclipse Ti fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakoztatott DS Qi1 digitális kamerával (Nikon, Japán) rögzítettük.

Ahhoz, hogy a GLUT10 kolokalizációját a protein-diszulfid izomerázzal (PDI) vizsgálhassuk, a transzfektált ATS-es humán fibroblasztokat 48 óráig növesztettük, majd jéghideg etanollal fixáltuk. A fluoreszcens jelöléshez a sejteket két órán át inkubáltuk 1:100 hígítású poliklonális anti-PDI antitesttel (Novus Biologicals), illetve 1 µg/ml koncentrációjú anti-V5 monoklonális antitesttel (Sigma Chemicals). Mosás után 1 órát inkubáltuk Alexa Fluor® 488 és 594-el konjugált anti-nyúl és anti-egér másodlagos antitestekkel. A fluoreszcens jelet Zeiss fluorescence Axiovert mikroszkóphoz csatlakoztatott CCD kamerával (SensiCam-PCO Computer Optics GmbH, Germany) rögzítettük.

A GLUT10 reexpressziójának ellenőrzéséhez kontroll, nem-transzfektált, üres vektorral transzfektált, illetve GLUT10 reexpresszáló ATS-es fibroblaszt sejtvonalakat 48 óras növesztést követően ugyancsak fixáltuk a fent leírtak szerint, majd inkubáltuk 20 µg/ml poliklonális anti-humán GLUT10 antitesttel egy éjszakán keresztül 4°C-on. A sejteket mostuk PBS-sel és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk 1:1000 hígítású rodaminnal kapcsolt anti-nyúl másodlagos antitesttel. A jelet Zeiss fluorescence Axiovert mikroszkóphoz csatlakoztatott fekete-fehér CCD kamerával (SensiCam-PCO Computer Optics GmbH, Germany) rögzítettük.

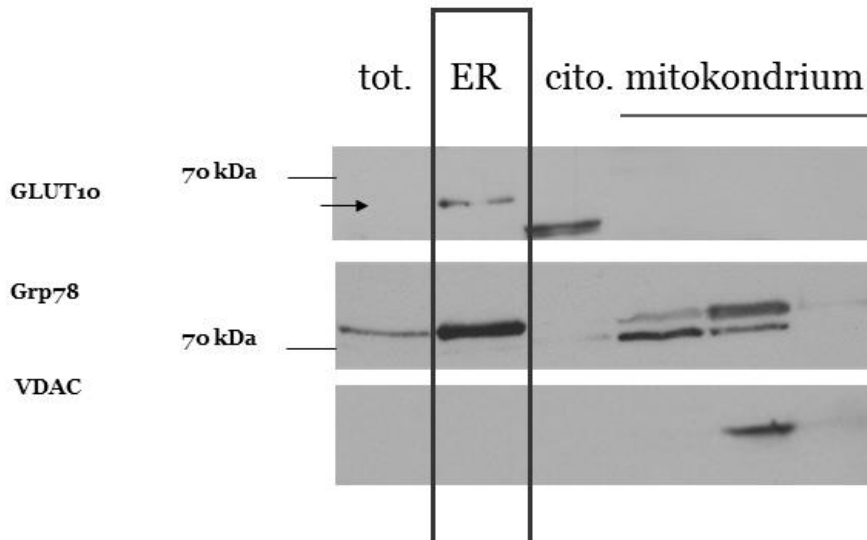
3.15. Statisztikai módszerek

Minden kísérlet során legalább három paralell mérést végeztünk. Az eredményeket átlag \pm standard hiba (SEM) alakban mutatjuk be. A statisztikai analízis során kétmintás Student t-próbát, valamint ANOVA variancia-analízist alkalmaztunk. Szignifikancia szintnek az 5 %-os valószínűséget fogadtuk el.

4. Eredmények

4.1. A GLUT10 sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata

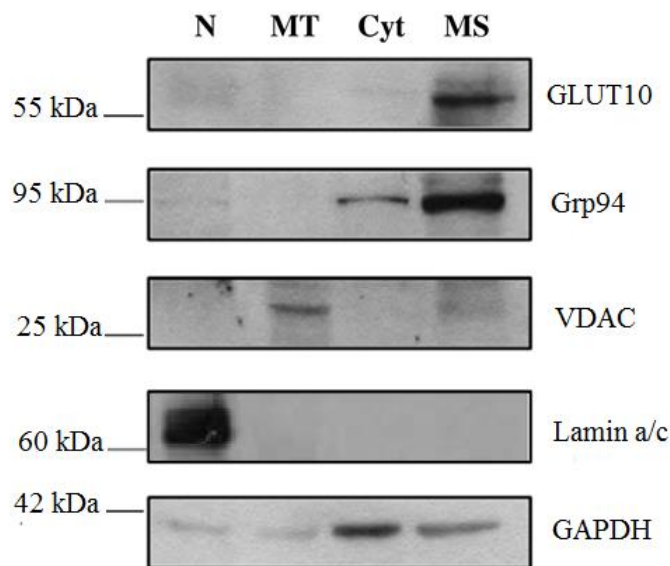
Első lépésként megvizsgáltuk a GLUT10 szubcelluláris elhelyezkedését tengerimalac májából készített kompartmentum frakciókban, melyeket ultracentrifugálással állítottunk elő. A frakciók ellenőrzésére olyan antitesteket használtunk, amelyek adott frakciókban dúsulnak fel (VDAC-mitokondrium; Grp78-ER). A kísérleteink során azt találtuk, hogy a GLUT10 fehérje az ER frakcióban van jelen legnagyobb mennyiségben (7. ábra).



7. ábra: A GLUT10 szubcelluláris lokalizációja tengerimalac májából izolált frakciókon.

A GLUT10 fehérje expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk tengerimalac májából ultracentrifugálással készített szubcelluláris frakciókon. A frakciók tisztaságát Grp78 (ER) és VDAC (mitokondrium) antitestekkel ellenőriztük.
tot.-teljes homogenátum, ER-endoplazmás retikulum, cito.-citoszol

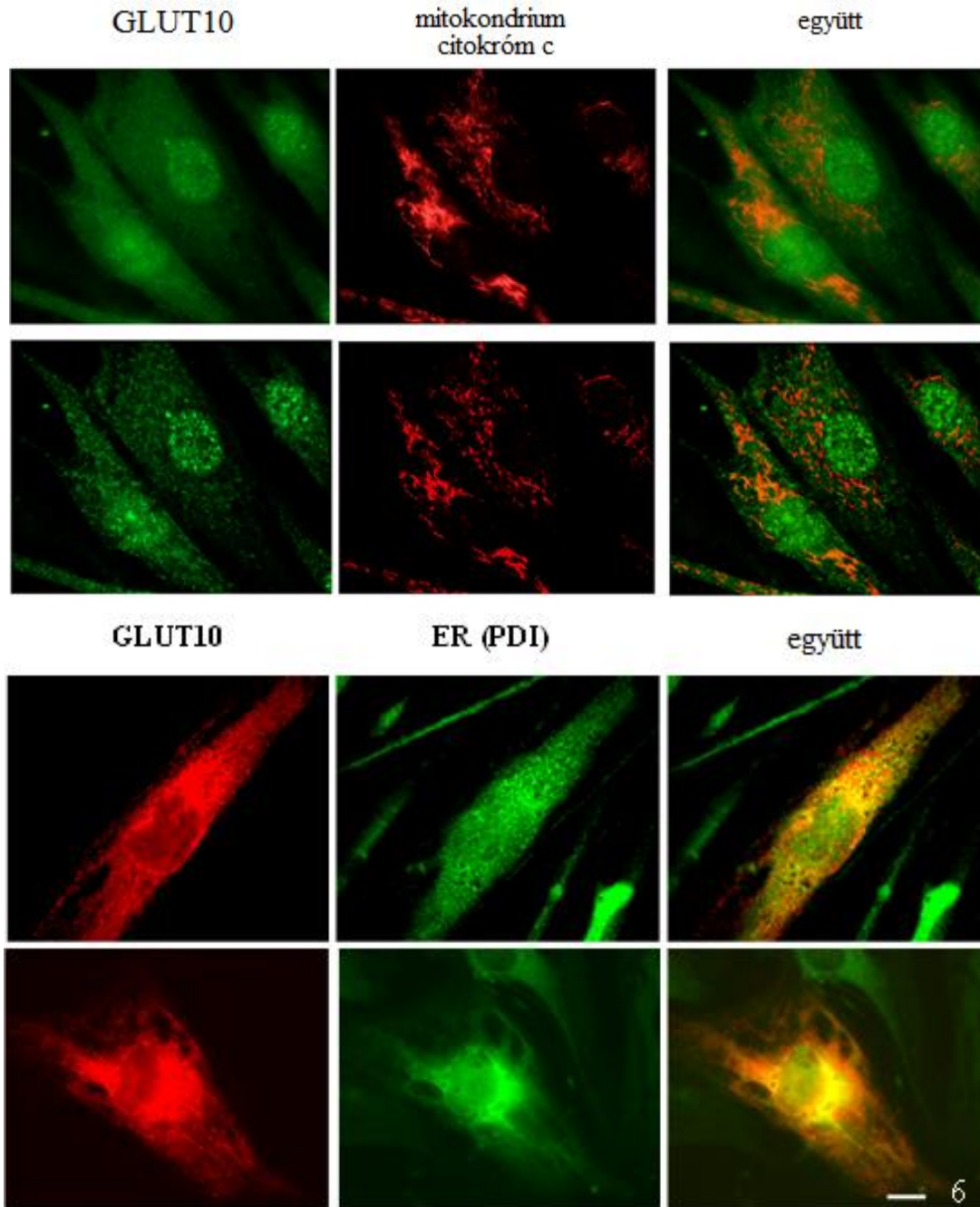
Kíváncsiak voltunk arra, hogy a további kísérleteinkhez felhasználni kívánt kontroll humán fibroblaszt sejtvonalakban is hasonló szubcelluláris elhelyezkedést tapasztalunk-e, mint a korábbi állati eredetű mintákban. A fibroblasztokból magi, mitokondriális, citoszólikus és ER frakciókat állítottunk elő (8. ábra). A frakciók tisztaságát frakció-specifikus antitestekkel ellenőriztük. A Western blot analízis alapján a vizsgált fehérje a humán sejtvonalban is az ER frakcióban volt jelen.



8. ábra: GLUT10 szubcelluláris elhelyezkedése humán fibroblasztokból izolált sejtfrakciókban.

A GLUT10 a humán fibroblaszt sejtekből izolált, főként endoplazmás retikulumot tartalmazó mikroszóma frakcióban volt jelen. A sejtfrakciók ellenőrzését négy különböző antitesttel végeztük, hogy meggyőződjünk az elválasztás sikerességéről. N-sejtmag, MT-mitokondrium, Cyt-citoszól, MS-endoplazmás retikulum

A GLUT10 szubcelluláris elhelyezkedését immunhisztokémiai vizsgálatokkal is ellenőriztük primer fibroblaszt sejteken. Markáns kolokalizációt figyeltünk meg a GLUT10 és a PDI között (9. ábra), míg a transzporter a mitokondriális marker citokróm c-vel nem mutatott kolokalizációt.

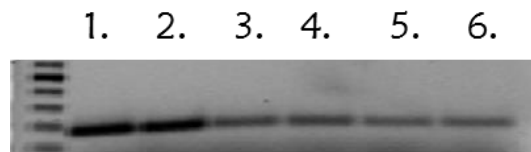


9. ábra: A GLUT10 lokalizációjának vizsgálata humán fibroblasztokban.

A primer fibroblaszt sejtekben a GLUT10 antitest mellett a mitokondriumot citokróm c-re, az endoplazmás retikulumot pedig PDI-re (protein diszulfid izomeráz) specifikus antitesttel jelöltük. A GLUT10 nem mutatott kolokalizációt a citokróm c-vel, a PDI-vel viszont nagymértékű átfedést figyeltünk meg.

4.2. Az endomembránon keresztül zajló transzport defektusa ATS-ben

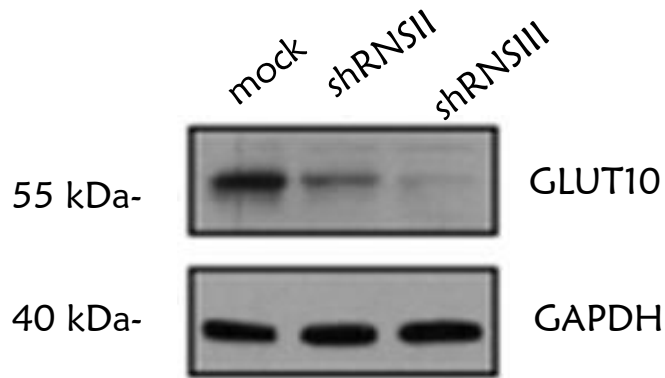
A transzport méréseinkhez hTERT immortalizált humán bőr fibroblaszt sejtvonalból shRNS-t tartalmazó lentivírusos infekcióval létrehoztunk több olyan vonalat, melyekben a beavatkozással csendesítettük az *SLC2A10* gént. A stabil klónokat puromycines szelekcióval válogattuk ki. A csendesítést fél-kvantitatív RT-PCR-rel ellenőriztük (10. ábra).



10. ábra: Az SLC2A10 gén csendesítésének ellenőrzése.

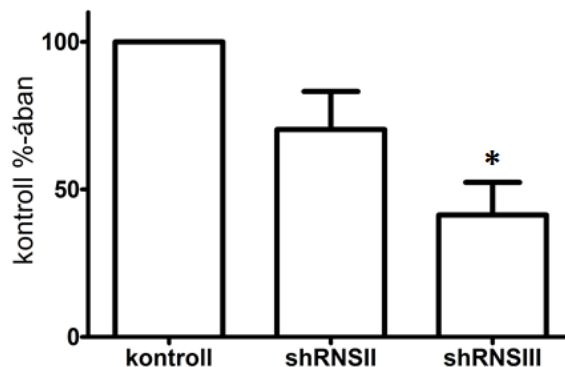
A hTERT fibroblaszt sejtekben a GLUT10 génjének csendesítését különböző shRNS-eket tartalmazó lentivírusos infekcióval végeztük. RT-PCR technikát alkalmaztunk a csendesítés ellenőrzésére, és megállapítottuk, hogy a csendesítés mindkét alkalmazott csendesítő vektor esetén – bár különböző mértékben – sikeres volt. (1,2: kontroll minták, 3-6: csendesített minták)

A további kísérletekhez két stabil csendesített sejtvonalat választottunk ki, melyekben ellenőriztük a GLUT10 fehérje szintjét (11. ábra). A fehérje mennyiség számszerűsítéséhez a filmeket denzitometráltuk, kontrollként a GAPDH fehérjét alkalmaztuk. Azt tapasztaltuk, hogy shRNSIII sejtvonalban csökkent szignifikánsan (41,33 %) a GLUT10 fehérje mennyisége (12. ábra).



11. ábra: A géncsendesített sejtvonalak fehérje szintjének ellenőrzése.

A csendesített sejtvonalakban a GLUT10 fehérje mennyiségét Western blot technikával vizsgáltuk, amelyhez GLUT10 specifikus antitestet alkalmaztunk. A denzitometriai értékelés során a GAPDH referencia gén fehérjéjét használtuk. (n=4).



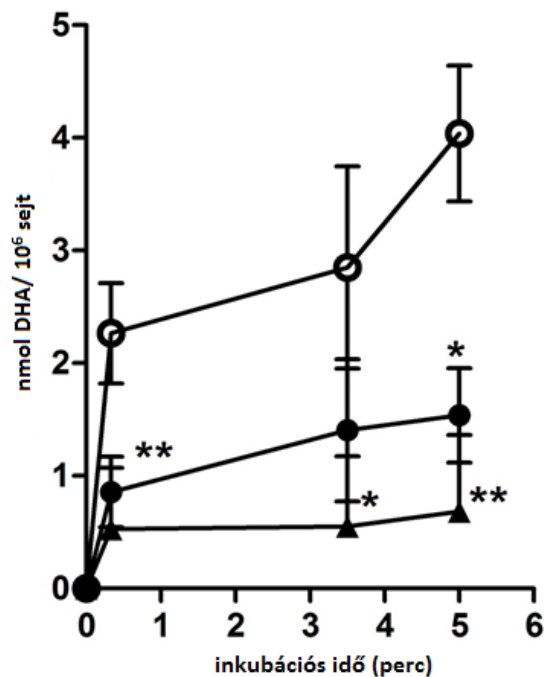
12. ábra: Csendesített sejtekben a GLUT10 fehérje mennyisége a kontroll %-ában.

A denzitometriás értékelést Western blot filmek alapján végeztük, 100%-nak a kontroll minta GLUT10 mennyiségét állítottuk be. Az shRNSIII konstrukttal végzett csendesítés szignifikánsan csökkentette a GLUT10 fehérje mennyiségét. (p=0,034)

4.3. GLUT10 – dehidroaszorbát transzporter

A hTERT fibroblaszt sejteken olyan transzport méréseket végeztünk, melynek során kizárólag a sejtek plazmamembránját permeabilizáltuk, az endomembránokat intaktságának megőrzése mellett (szemipermeabilizálás). Erre azért volt szükség, hogy

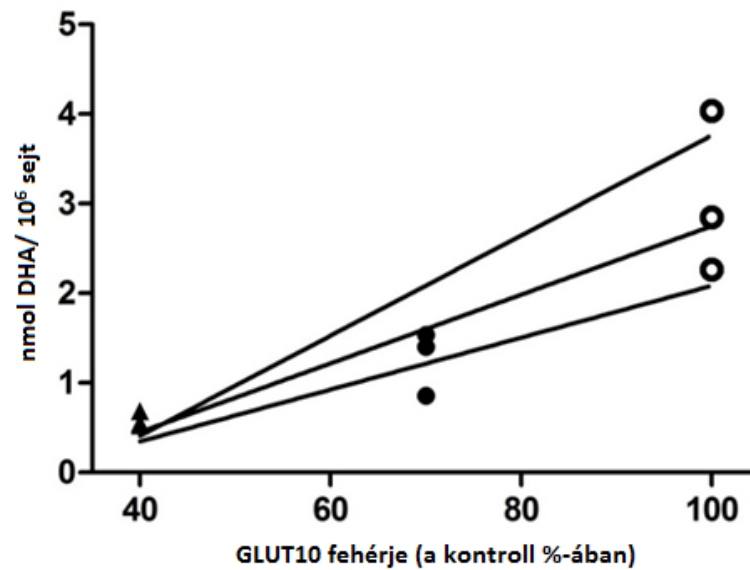
megmérhessük az endomembránokon keresztül történő DHA felvételt. A szemipermeabilizálás a plazmamembrán szelektív permeabilizálását jelenti, melyhez digitonint használtunk 40 μ M végkoncentrációban. A mitokondrium működését Na-aziddal gátoltuk, hogy kiküszöböljük a mitokondriális transzportot. A szemipermeabilizált hTERT fibroblaszt sejteken végzett transzportmérések kimutatták, hogy mindkét shRNS-sel csendesített sejtvonalon jelentősen csökkent a dehidroaszkorbát felvétel a kontroll sejtvonálhoz képest (13. ábra). A DHA transzport szoros korrelációt mutat a GLUT10 expresszált mennyiségével (14. ábra).



13. ábra: A szemipermeabilizált hTERT fibroblaszt sejtek DHA transzportja.

○- mock (üres vektor), ●- shRNSII, ▲- shRNSIII

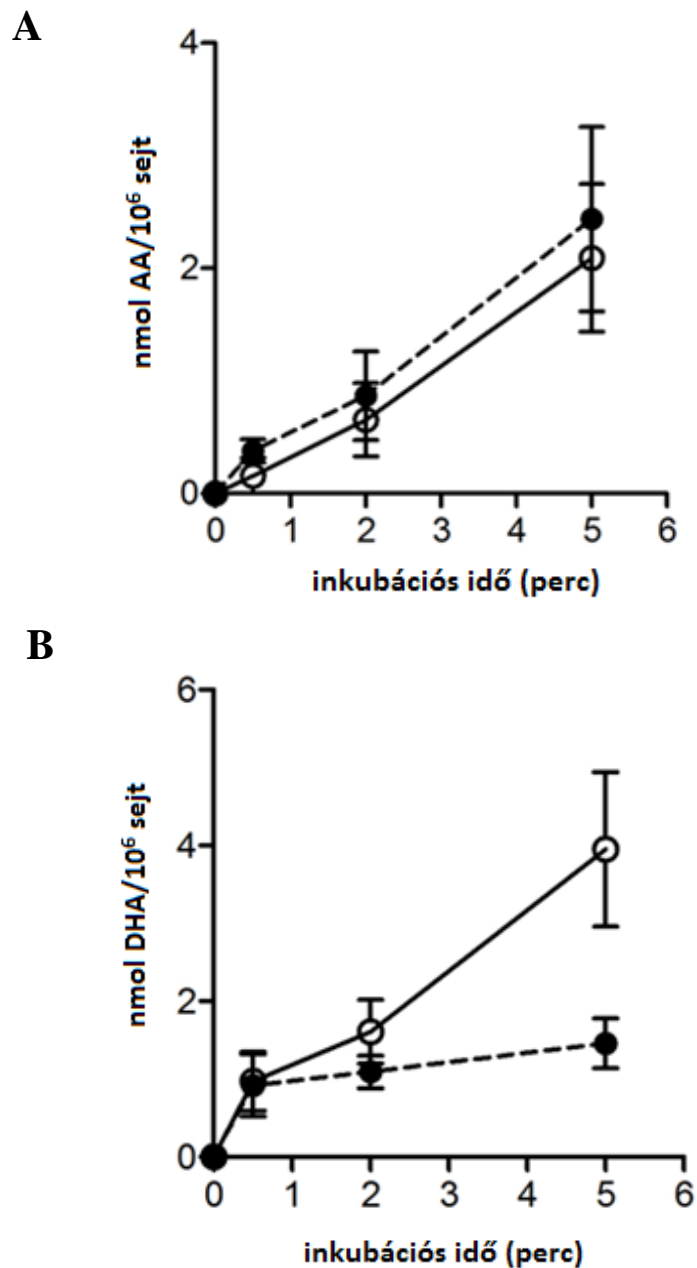
A digitoninnal permeabilizált fibroblasztokat (kontroll és csendesített) DHA és [¹⁴C]-DHA jelenlétében inkubáltuk. A mitokondrium működését Na-aziddal gátoltuk. A jelzett időpontokban 0,1 ml mintát vettünk, leszűrtük és szcintillációs számlálóval mértük a filteren levő radioaktivitást. Az adatok három mérés összesítéséből származnak, átlag \pm SEM. (*p < 0,05; **p < 0,01).



14. ábra: A GLUT10 fehérjeszint és a DHA transzport korrelációja.

○ - mock (kontroll), ● - shRNSII, ▲ - shRNSII

Kontroll és ATS-ben szenvedő betegekből izolált primer fibroblasztokon vizsgáltuk az aszkorbát és DHA transzportot. A teljes sejten mért transzport azt mutatja, hogy az aszkorbát transzport az ATS-es sejtekben változatlan (15. A ábra), míg a DHA transzport alacsonyabb fokú a GLUT10 mutáns sejtekben (15. B ábra).

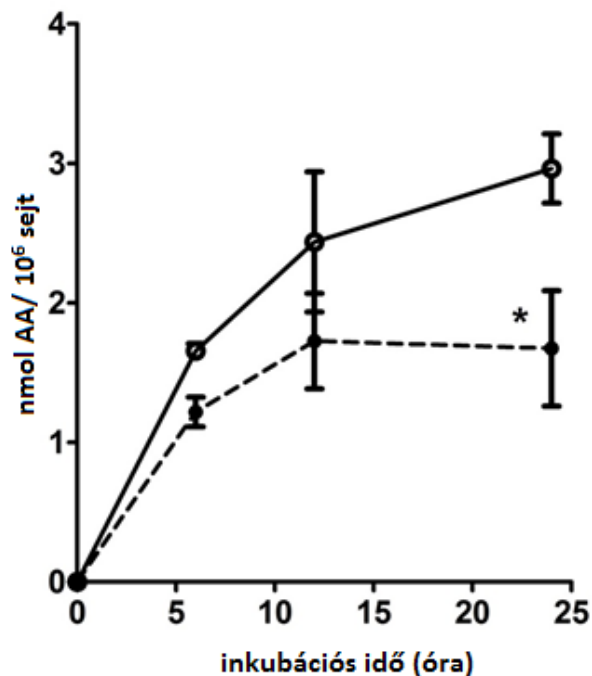


15. ábra: Primer intakt fibroblaszt sejtek aszkorbát (A) és DHA (B) transzportja.

○-kontroll ●- ATS

Az aszkorbát (AA) és dehidroaszkorbát (DHA) felvételét mértük intakt kontroll és ATS sejtekben rapid filtrációs technikával, melynek során radioaktívan jelölt ligandot használtunk 1 mM-os koncentrációban. A DHA transzport jelentősen csökkent az ATS sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva, míg az aszkorbát transzportjában nem volt különbség. (n= 6-10, átlag± SEM).

Intakt fibroblaszt sejteken nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás technikával mértük az aszkorbát hosszútávú felvételét. A kísérlethez a kontroll és ATS sejteket 24 órán keresztül előkezeltük aszkorbáttal 50 μM (fiziológias) végkoncentrációban 0, 6, 12 és 24 órán keresztül. A kezelést követően a sejtekből és a sejtek tápoldatából megmértük a felvett (16. ábra) és visszamaradt aszkorbát mennyiségét (17. ábra). Fiziológias koncentráció mellett az ATS sejtek aszkorbát akkumulációja elmaradt a kontroll sejtektől. A 24 órás kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb aszkorbát koncentrációt mutattunk ki a beteg sejtekben ($p=0,037$).

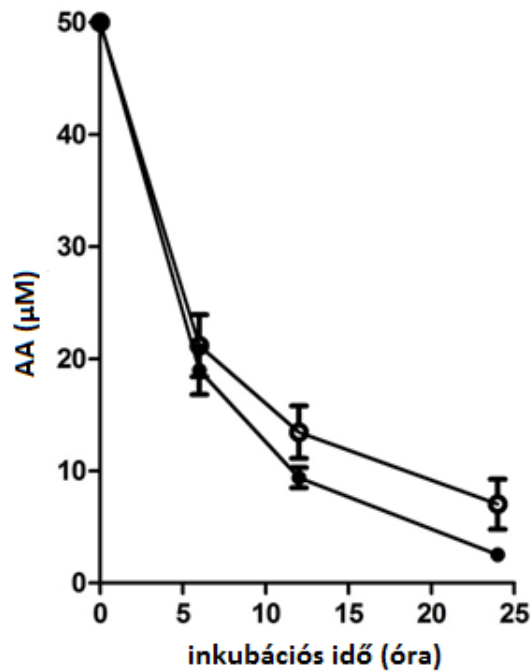


16. ábra: Primer intakt fibroblaszt sejtek hosszútávú aszkorbát felvétele.

A kontroll és ATS sejteket aszkorbáttal kezeltük 50 μM végkoncentrációban 0, 6, 12 és 24 órán át, majd mértük az aszkorbát felvételét HPLC technikával. Az ATS sejtekben szignifikánsan alacsonyabb aszkorbát (AA) koncentrációt mértünk. ($p= 0,037$)

(○-kontroll ●- ATS), $n= 3$, átlag \pm SEM.

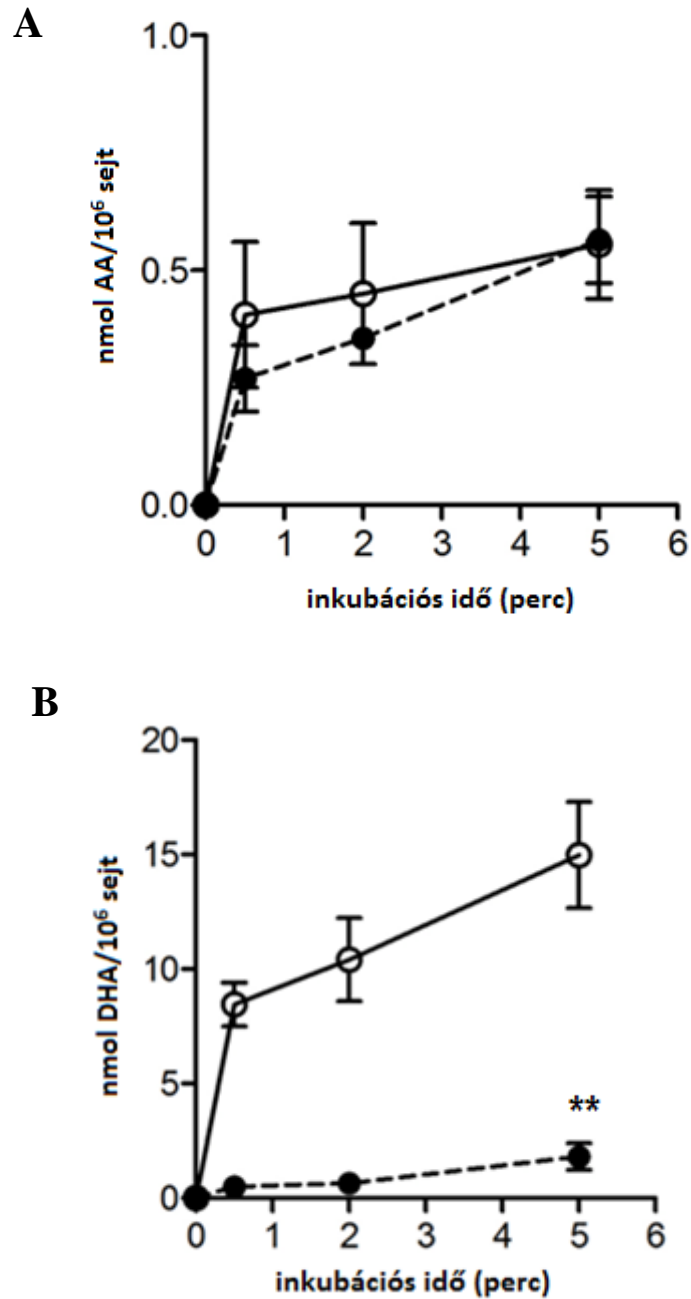
A sejtek tápoldatában az aszkorbát koncentráció jelentősen csökkent 24 óra alatt, az aszkorbát egy része nagy valószínűséggel oxidálódott az inkubációs idő folyamán. A tápoldatok aszkorbát koncentrációjában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll és az ATS fibroblasztok között.



17. ábra: A visszamaradt aszkorbát koncentrációjának meghatározása primer intakt fibroblaszt sejtek tápoldatából HPLC technikával.

○-kontroll ●- ATS (n= 3, átlag± SEM, ns)

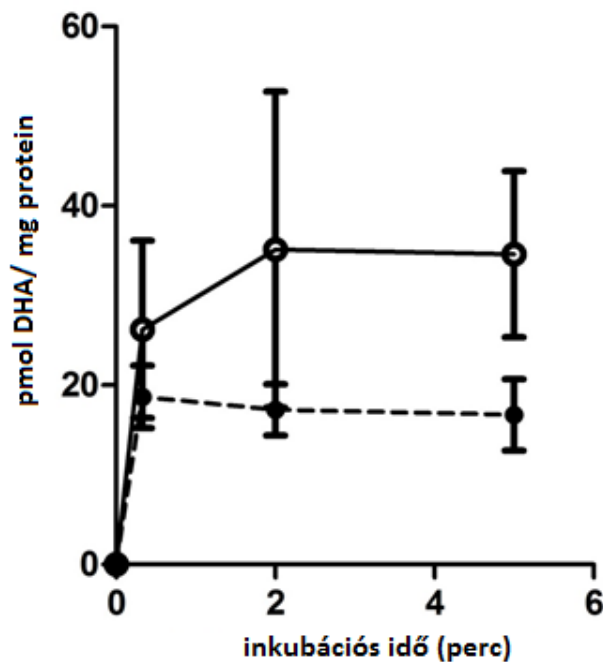
A primer fibroblaszt sejtek plazmamembránját is permeabilizáltuk digitoninnal az endomembránokon keresztüli transzportméréshez. Az aszkorbát felvétele számottevően nem változott az ATS-es sejtekben a kontrollhoz viszonyítva (18. A ábra), azonban nagy mértékű csökkenést tapasztaltunk a beteg sejtek DHA transzportjában (18. B ábra).



18. ábra: Szemipermeabilizált primer fibroblaszt sejtek aszkorbát (A) és DHA (B) transzportja.

Primer fibroblasztok plazmamembránját digitoninnal permeabilizáltuk, majd radioaktív ligandokkal való inkubálás után (1-1 mM) rapid filtrációval mértük az aszkorbát (A) és a DHA (B) felvételét (n= 6-10, átlag± SEM). (○-kontroll ●- ATS), p=0,0059

Következő lépésként primer fibroblaszt sejtekből izolált mikroszóma (ER) frakciót fúzionáltattunk egyrétegű liposzómákkal. A transzport mérés eredményét a 19. ábra szemlélteti. Az ATS sejtekből izolált mikroszóma frakció DHA transzportja elmarad a kontroll csoporttól, azonban az eredmény statisztikailag nem szignifikáns.



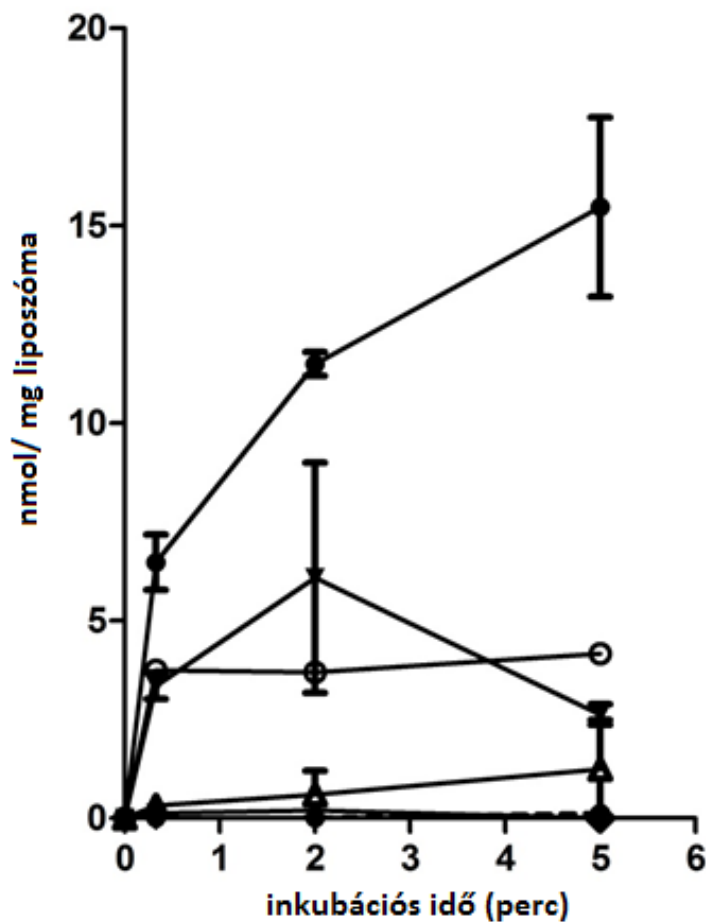
19. ábra: DHA transzport mérése mikroszómával fúzionáltatott liposzómákon.

Kontroll és ATS sejtekből izolált mikroszóma (ER) frakciót fúzionáltattunk egyrétegű liposzómával, majd rapid filtrációs technikával mértük a DHA felvételét. Az ATS sejtekből izolált mikroszóma frakció DHA transzportja ugyan elmarad a kontroll csoporthoz képest, de ez a különbség statisztikailag nem szignifikáns.

○-kontroll, ●- ATS (n= 3, átlag± SEM).

In vitro transzlációval előállított GLUT10 fehérjét egyrétegű, tojás lecitin alapú liposzómába ágyaztuk, hogy mérhessük a DHA és egyéb lehetséges GLUT10 szubsztrátok transzportját. A mérésekhez kétféle koncentrációban használtunk DHA-ot (1 és 5 mM), valamint aszkorbátot, glukózt, szacharózt és UDP-glukuronsavat 1 mM-os koncentrációban. A GLUT10-et tartalmazó liposzómát 0,33, 2 és 5 percig inkubáltuk a

kiválasztott szubsztrátokkal. Kontrollként üres liposzómát alkalmaztunk (20. ábra). Az UDP-glukuronsav és a szacharóz esetében nem tudtuk transzport aktivitást mérni, az aszkorbát esetében kis mértékű felvételt figyeltünk meg. A glukózt és a DHA-ot 1mM-os koncentrációban vizsgálva hasonló mérési eredményeket kaptunk, a GLUT10 mindkét anyagot 3-5 nmol/mg liposzóma koncentrációban transzportálta. A DHA esetében a szubsztrát felvétel koncentráció-függő volt.

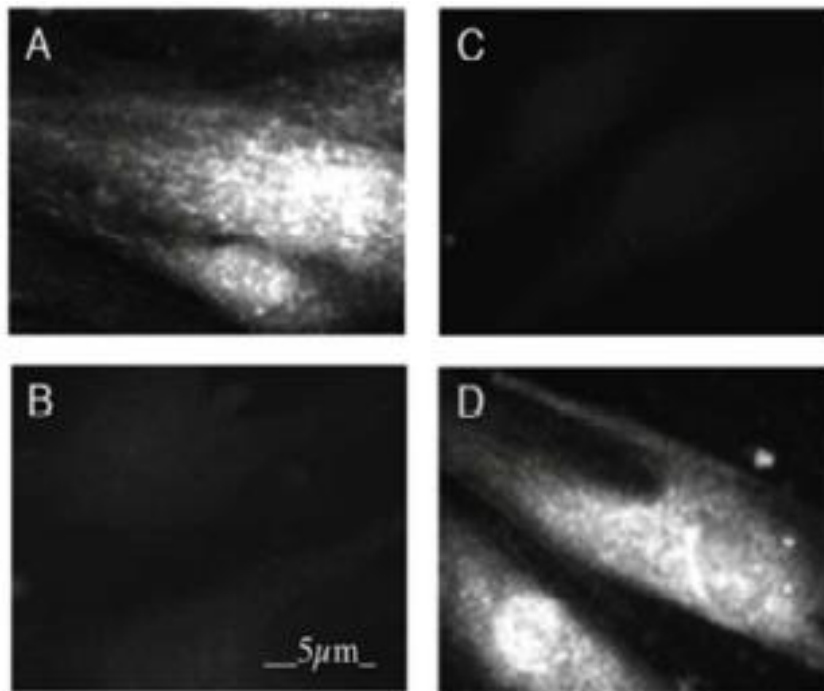


20. ábra: A transzlált GLUT10 transzport aktivitása.

Az *in vitro* transzlációval előállított fehérjétegyrétegű liposzómába ágyaztuk és mértük különböző szubsztrátok transzportját rapid filtrációs technikával. Transzport aktivitást a glukóz és a DHA esetében tapasztaltunk, amely koncentráció-függő volt. ○- DHA (1mM), ●- DHA (5mM), ▼- glukóz (1mM), ◆-UDP-glukuronsav (1mM), △-aszkorbát (1mM), ◻-szacharóz (1mM), ⊗- üres liposzóma (n= 2-4, átlag± SEM).

4.4. *A GLUT10 reexpressziója ATS fibroblasztokban: a DHA transzport helyreállása*

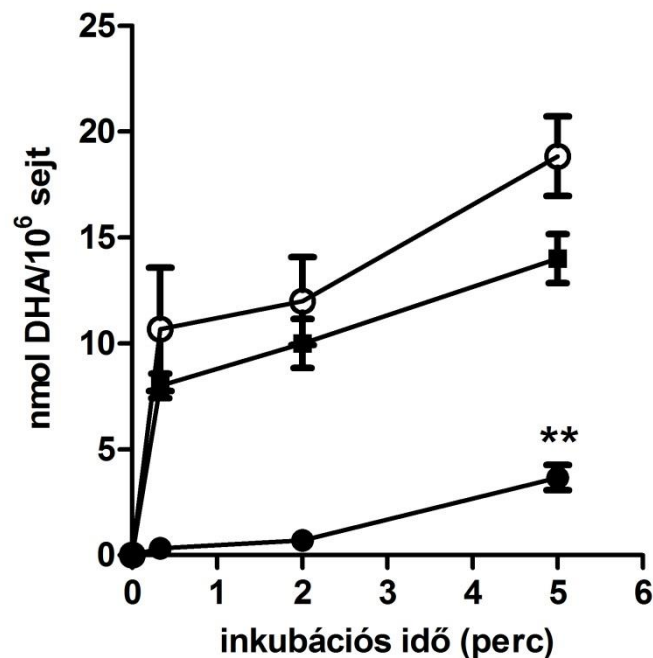
A reexpressziós kísérletekhez a pEF6/V5-His-TOPO™ His-tag-gel jelölt expressziós vektorral transzfektáltuk az ATS-es sejteket, ami tartalmazta a GLUT10 génjét. A transzfekció sikerességét antitestes immunjelöléssel ellenőriztük, kontrollként üres vektorral transzfektált ATS sejteket használtunk. Az 21. A. ábrán GLUT10-et expresszáló kontroll fibroblaszt képe látható. Az 21. B. ábrán bemutatott ATS fibroblasztok és a C. ábrán szereplő üres vektorral (mock) transzfektált ATS-es sejtek egyike sem fejezte ki a vizsgált transzportert. A sikeres transzfekciót követően az ATS-es sejtek újra expresszálták a GLUT10 fehérjét (21. D. ábra).



21. ábra: A GLUT10 reexpressziója humán ATS-es fibroblasztokban.

A P1 betegből származó ATS sejtvonalba transzfekcióval re-expresszáltuk a GLUT10 fehérjét. A GLUT10 expresszióját antitestes immunjelöléssel és fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük. A- kontroll fibroblasztok; B- ATS fibroblasztok; C- üres vektorral transzfektált ATS fibroblasztok; D- GLUT10-et tartalmazó vektorral transzfektált ATS fibroblasztok.

A GLUT10 fehérjét újra kifejező P1 ATS sejt vonalon transzport méréseket végeztünk, annak vizsgálatára, hogy a transzporter funkcióképes-e a transzfektált sejtekben. Ehhez a kísérlethez a sejtek plazmamembránját digitoninnal permeabilizáltuk a már korábban leírt módon, majd rapid filtrációs eljárással mértük a DHA (1 mM) felvételét három különböző időpontban. A mérés eredménye azt mutatja, hogy a transzfekciót követően az ATS-es sejtekben a DHA transzport helyreállt (22. ábra), hasonló koncentráció értékeket érve el, mint amiket a szemipermeabilizált kontroll fibroblasztok esetében mértünk.



22. ábra: A GLUT10 transzportert reexpresszáló ATS-es sejtek DHA transzportja.

A GLUT10 re-expresszáló szemipermeabilizált sejtek DHA (1 mM) felvételét mértük rapid filtrációs technikával. A korábban már bemutatott ATS fibroblasztok transzportjához viszonyítva jelentősen magasabb (kontrollhoz hasonló) felvételt mértünk. A grafikon három független mérés eredményét ábrázolja (átlag \pm SEM).

○- transzfektált ATS-es fibroblaszt sejtek, ●- ATS fibroblaszt sejtek, ■- kontroll fibroblasztok, ($p=0,0015$)

5. Megbeszélés

Az aszkorbáthiány következtében kialakuló súlyos táplálkozási betegség, a skorbut már a C-vitamin felfedezése előtt is régóta ismert volt. A skorbut sejtszinten normál C-vitamin bevitel mellett is kialakulhat, hiperglikémia esetén a szövetek aszkorbát szintje csökkenhet a glukóz és a DHA GLUT transzporterekért való versengése következtében. (Price és mtsai. 1996, Cunningham 1998). Ez a látens, szöveti skorbut inzulin-függő cukorbetegségben is jelen lehet, ami az endotélium működési zavarát idézi elő és ateroszklerózis kialakulásához vezethet (Price és mtsai. 2001). A fent felsorolt tanulmányok rámutatnak, hogy az intracelluláris skorbut létezik, melyet a sejtek megnövekedett aszkorbát fogyasztása, vagy az adott sejtípusba való transzport nem megfelelő aktivitása okozhat. A C-vitamin transzporterek jelenléte az intracelluláris membránokban, valamint az egyes kompartmentumok különböző C-vitamin felhasználása alapján felvetődik, hogy szubcelluláris skorbut is létezhet.

Ilyen aszkorbát kompartmentációs betegség lehet a kanyargós artéria szindrómának nevezett örökletes kötőszöveti betegség, melyet a GLUT10 transzportert kódoló *SLC2A10* gén mutációja okoz. A betegség patomechanizmusa ugyanakkor a mai napig sem tisztázott. A GLUT10 fehérje sejten belüli lokalizációjának és transzportált ligandjainak megismerésével azonban közelebb juthatunk ahhoz, hogy megértsük a GLUT10 szerepét ebben a kardiovaszkuláris rendszert is érintő ritka megbetegedésben. Munkánk során abból a Segade (2010) által közöl hipotézisből indultunk ki, hogy a GLUT10 az ER membránjában helyezkedik el és DHA-ot szállít az ER lumenébe. A DHA aszkorbáttá redukálódva részt vesz többek között a prolil- és lizil-hidroxiláz enzimek működésében (23. ábra). Munkacsoportunk korábbi kísérletei azt mutatták, hogy a DHA (humán) máj ER-be való felvétele igen jelentős, minek alapján transzporter jelenlétét feltételeztük az ER membránon.

Kísérleteink egy része arra irányult, hogy megvizsgáljuk a GLUT10 faji szubcelluláris elhelyezkedését. Immunoblot analízissel sikerült kimutatnunk, hogy a vizsgált transzporter fehérje humán fibroblaszt sejtek és tengerimalac májból származó mikroszóma esetében az ER frakciójában dúsul, míg a mitokondriumból nem volt kimutatható. A kanyargós artéria szindróma patológiás elváltozást ennek ellenére

májszövetben nem idéz elő feltehetően a májsejtek ER membránjának nagy DHA/glukóz transzporter heterogenitása miatt (Bánhegyi és mtsai. 1998).

Humán fibroblasztokban végzett immunhisztokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a GLUT10 erős perinukleáris elhelyezkedésű, amiből arra következtettünk, hogy a fehérje a magmembránban és/ vagy a nukleoplazmás retikulum membránban található. Ez a feltevés immunoblottal nem igazolódott, mert a kontroll sejtekből izolált magi frakcióban nem tudtuk kimutatni a GLUT10 jelenlétét. A mitokondrium megjelölésére használt citokróm-c a transzporter fluoreszcens jelöléséhez viszonyítva teljesen eltérő morfológiát tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a két fehérje nem kolokalizál.

Megvizsgáltuk humán fibroblaszt sejtekben a GLUT10 és az ER marker PDI sejten belüli elhelyezkedését. A kísérlethez a P1 kanyargós artéria szindrómás beteg fibroblasztjait használtuk fel, ahol teljes mértékben hiányzik a GLUT10 fehérje expressziója. Tranziens transzfekcióval sikerült a P1 sejtekből újra GLUT10-et expresszáló sejteket előállítani. A transzfektált sejtvonalban a vizsgált fehérje sejtmag körüli elhelyezkedést mutat és markánsan kolokalizál a protein diszulfid izomerázzal. A GLUT10 elhelyezkedésének mintázata nagyon hasonlít a patkány aorta sima izomsejtekből kimutatott GLUT10 expresszióhoz (Segade 2010).

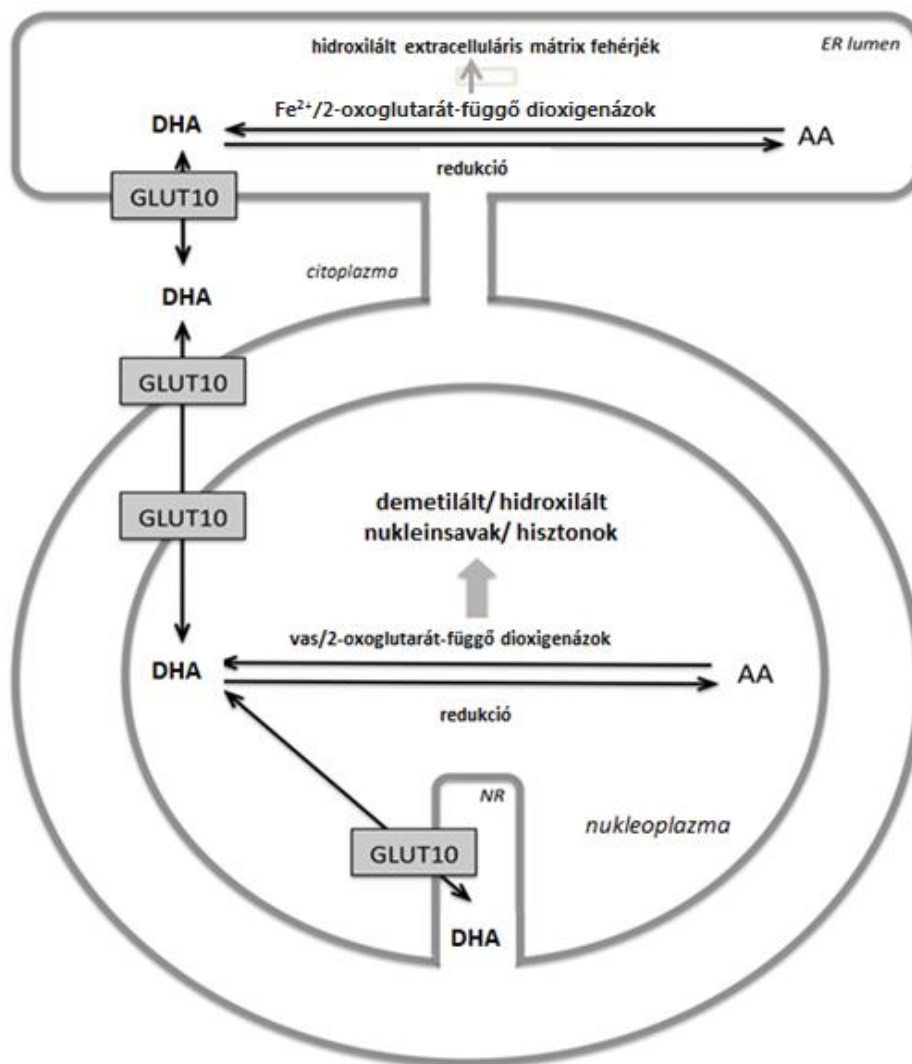
Eredményeink alapján megkérdőjelezhető a GLUT10 transzporter mitokondriális elhelyezkedése, melyet egér modellben közöltek le 2010-ben (Lee és mtsai. 2010). Az eredményekben fellelhető ellentmondások feltehetően a fajok közötti különbségekből adódhatnak. GLUT10 mutáns egerekben a kanyargós artéria szindróma emberre jellemző fenotípusa nem alakul ki, ami azzal magyarázható, hogy az egér a működőképes gulonolakton oxidáz enzime révén képes a C-vitamin szintézisére. Ezen kívül a mitokondrium membránban számos egyéb aszkorbát és DHA transzporter található (Szarka és mtsai. 2004, KC és mtsai. 2005, Azzolini és mtsai. 2013, Muñoz-Montesino és mtsai. 2014), melyeken a C-vitamin a mitokondriumba juthat, így a GLUT10 elveszti jelentőségét, mint mitokondriális transzporter.

Funkcionális vizsgálataink során liposzómába ágyazott, *in vitro* transzlációval előállított GLUT10 fehérjéről sikerült bizonyítanunk, hogy dehidroaszkorbát és glukóz transzportjára egyaránt képes. ATS fibroblasztokból, illetve kontroll sejtekből izolált és liposzómával fuzionáltatott mikroszóma (ER) frakción kimutattuk, hogy a DHA transzport csökkent azokban a proteoliposzómákban, amelyek az ATS betegek

mikroszómális fehérjéjét tartalmazták. A teljes sejten mért transzport azt mutatja, hogy az aszkorbát transzport az ATS-es sejtekben változatlan, míg a DHA transzport alacsonyabb fokú a GLUT10 mutáns sejtekben. Ennek magyarázata lehet, hogy a GLUT10 kis mennyiségben a plazmamembránban is előfordul. Másik lehetőség, hogy az endomembránokon keresztüli transzport hatással van a teljes sejt DHA felvételére is, vagyis a kontroll sejtekben az endomembránokon akadálytalanul átjut a DHA, így azok „beszívják” a kívülről hozzáadott DHA-ot. GLUT10 mutáns sejteken ez a szívóhatás nem érvényesül, tehát alacsonyabb fokú teljes sejt felvételt kapunk. Plazmamembrán permeabilizált ATS fibroblaszt sejtekben nagymértékű DHA transzport csökkenést tapasztaltunk a kontroll sejtekhez képest, ami az endomembránokon keresztüli DHA transzport defektusára utal. A hTERT fibroblaszt sejtekben a GLUT10 génjének csendesítésével a DHA felvétele szignifikánsan csökkent az endomembránokon át. A transzport funkciót helyre tudtuk állítani ATS fibroblasztokban a GLUT10 újra expresszáltatásával. Régóta feltételezik, hogy az endomembránok, főként az ER glukóz transzportját az ER-ben lokalizált glukóz-6-foszfátáz rendszer tagja látja el (van Schaftingen és Gerin 2002). Az endomembránokban megfigyelhető transzportaktivitás háttérében a glukóz és DHA transzportért felelős GLUT10 is állhat, azonban több funkcionális tanulmány is igazolja az ER glukóz transzportereinek heterogenitását (Marcolongo és mtsai. 1996, Bánhegyi és mtsai. 1998, Fehr és mtsai. 2005). Feltételezésünk szerint a GLUT10 defektusa lokális hipovitaminózist idéz elő, melyben nem minden sejttípus érintett. Az érintettség valószínűleg a GLUT10 relatív expressziójával függ össze; fibroblasztokban és érfali simaizom sejtekben a transzporter erőteljesen expresszálódik (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=81031>). Így nem meglepő, hogy a kóros elváltozások ezekre a sejtekre korlátozódnak.

Felmerül a kérdés, hogy a C-vitaminnak mely funkciója hiányzik a kanyargós artéria szindrómás betegekben? Az aszkorbát nyilvánvaló antioxidáns hatásán kívül $\text{Fe}^{2+}/2$ -oxoglutarát-függő dioxigenázok kofaktora (23. ábra; Kuiper és Vissers 2014). Ebbe az enzimsaládba tartoznak ugyanúgy a prolil- és lizil-hidrozilázok, melyek a kollagén és elasztin molekulák poszttranszlációs módosítását végzik (Myllyharju 2008), mint számos DNS és hiszton demetiláz enzim (Monfort és Wutz 2013). A DHA elektron akceptorként fontos szerepet tölt be az oxidatív fehérjetekeredés során a diszulfid-hidak kialakításában (Nardai és mtsai. 2001, Saaranen és mtsai. 2010). A nukleoplazmában és

a szekréciós apparátus elemeiben fellépő aszkorbáthiány epigenetikai és poszttranszlációs szinten is befolyásolhatja az extracelluláris mátrixfehérjék termelését (Bánhegyi és mtsai. 2014). Transzkriptom analízissel génexpressziós változásokat sikerült kimutatni ATS-es fibroblasztokban (Zoppi és mtsai. 2015). Expressziós eltérést nem csak a TGF β jelpálya és extracelluláris mátrix szerveződéséért és homeosztázisáért felelős génekben találtak, hanem olyan génekben is, melyek a sejtek energiamérlegének szabályozásában és az oxidatív stresszválaszban játszanak szerepet (Zoppi és mtsai. 2015). További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy tisztázni tudjuk ezeknek a változásoknak a befolyását a kanyargós artéria szindróma patomechanizmusára.



23. ábra: A C-vitamin lehetséges szerepe az endoplazmás retikulumban és a magmembránban.

6. Következtetések

Legfontosabb új megállapításaink a következők:

- A GLUT10 fehérje, mely véleményünk szerint a DHA transzportjáért felelős, az ER-ben lokalizálódik.
- GLUT10 mutáns (ATS betegekből származó) és géncsendesített sejteken végzett transzport mérésekkel igazoltuk, hogy a DHA transzportja mind a plazmamembránon, mind az endomembránokon keresztül csökkent a vad típusú GLUT10-et tartalmazó sejtekhez képest.
- Proteoliposzómákban igazoltuk, hogy a GLUT10 dehidroaszorbát transzporter.

7. Összefoglalás

A kanyargós artéria szindróma (arterial tortuosity syndrome (ATS, OMIM 208050) a kötőszövet egyénes öröklődő betegsége, melyet a nagyobb artériák megnyúlása és kacsaringós lefutása, az ízületek hipermobilitása és a bőr lazasága jellemez. Az ATS oka a glukóz transzporter 10 (GLUT10) fehérjét kódoló *SLC2A10* gén mutációja. Az ATS jelenlegi modelljei azt feltételezik, hogy (i) a GLUT10 hiánya a sejtmag periferiáján glukóz-függő TGF β aktiválódáshoz vezet, mely stimulálja az érfal sejteinek proliferációját, illetve (ii) a mitokondriális aszkorbát akkumuláció hiánya oxidatív stresszt okoz az érfal simaizom sejtjeiben. Hipotézisünk szerint - mely saját korábbi eredményeinken alapul - a GLUT10 (dehidroaszkorbát formájában) aszkorbinsavat transzportál az endoplazmás retikulum lumenébe. Az intraluminális prolil- és lizil-hidroxilázok kofaktora az aszkorbinsav, így hiányában a kollagén és elasztin képződése és feltekeredése zavart szenved. Célunk volt a GLUT10 szubcelluláris lokalizációjának felderítése és a GLUT10-függő dehidroaszkorbát transzport kimutatása fibroblasztok endoplazmás retikulumában. A kísérleteket főleg humán sejtes modelleken végeztük, mivel a GLUT10 knockout egér nem mutatja az ATS tüneteit. Erdeményeink szerint a GLUT10 az endoplazmás retikulum (ER) dehidroaszkorbinsav (DHA) transzportere. Immunocitokémiai vizsgálatok a GLUT10 perinukleáris elhelyezkedését mutatták kontroll fibroblasztokban. A GLUT10 fehérje sejtfractionálást követő immunoblottal a fibroblasztok mikroszomális frakciójában lokalizálódott. A fibroblasztok hosszantartó inkubálása aszkorbát jelenlétében kétszeres intracelluláris aszkorbát koncentrációt eredményezett a kontroll sejtekben az ATS sejtekhez képest. Szelektíven plazmamembrán permeabilizált ATS és GLUT10 csendesített fibroblasztok DHA felvételében jelentős csökkenést észleltünk. A GLUT10 ATS fibroblasztokban történő stabil kifejezése helyreállította a DHA transzportot. Az *in vitro* transzlációval előállított GLUT10 fehérje proteoliposzómában hatékonyan facilitálta a DHA transzportot. Erdeményeink szerint tehát a GLUT10 facilitálja a DHA felvételét az ER lumenbe; az aszkorbát hiány ezen kompartmentumok Fe²⁺/2-oxoglutarát-függő dioxigenázainak csökkent funkcióján keresztül válthatja ki a patológiás hatásokat.

8. Summary

Arterial tortuosity syndrome (ATS, OMIM 208050) is a heritable monogenic disorder of connective tissue characterized by elongation and generalized tortuosity of the major arteries, hyper mobility of the joints, and laxity of skin. ATS is caused by mutations in *SLC2A10*, encoding Glucose Transporter 10 (GLUT10). The current models of ATS hold (i) that loss of GLUT10 at the nuclear periphery induces a glucose-dependent increase in TGF β that stimulates vessel wall cell proliferation: (ii) that loss of GLUT10 results in a defective mitochondrial ascorbate accumulation and in turn in oxidative stress of the vascular smooth muscle cells. We proposed - based on our previous work - that GLUT10 transports ascorbate (in the form of dehydroascorbate), a cofactor for prolyl- and lysyl-hydroxylases, into the rough endoplasmic reticulum. In ATS, loss of GLUT10 results in defective collagen and elastin maturation/folding. The aim of the project was to prove the subcellular localization of GLUT10 and to demonstrate GLUT10-mediated dehydroascorbate transport into the endoplasmic reticulum of fibroblasts. The work have been done in human cell models, as the GLUT10 knock out mouse does not present with evident ATS symptoms. We found that GLUT10 is a dehydroascorbic acid (DHA) transporter in the endoplasmic reticulum (ER) and nuclear envelope. GLUT10 showed a perinuclear distribution demonstrated by immunocytochemistry in fibroblasts from healthy controls. Cell fractionation and immunoblotting revealed that GLUT10 protein was present in the ER - but not mitochondrial - fraction of the cells. Transport measurements in cells whose plasma membrane was selectively permeabilized showed that DHA transport and accumulation was markedly reduced in fibroblasts from ATS patients and in GLUT10 silenced immortalized human fibroblasts. Re-expression of GLUT10 in patients' fibroblasts restored DHA transport activity. GLUT10 protein produced by *in vitro* translation and incorporated into liposomes efficiently transported DHA. Long-term incubation in the presence of ascorbate (AA) resulted in a twofold higher steady-state intracellular AA concentration in control fibroblasts compared to ATS cells. Our data demonstrate that GLUT10 facilitates DHA entry into the ER lumen; the missing function of AA as a cofactor for iron/2-oxoglutarate dependent dioxygenases in these compartments might be a decisive factor of the pathomechanism of ATS.

Irodalomjegyzék

- Ahmad S, Evans WH. (2002) Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J*, 365: 693-699.
- Akhurst RJ. (2006) A sweet link between TGF β and vascular disease? *Nat Genet*, 38: 400-401.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 7915-7922.
- Azzolini C, Fiorani M, Cerioni L. (2013) Sodium-dependent transport of ascorbic acid in U937 cell mitochondria. *IUBMB Life*, 65: 149–153.
- Bánhegyi G, Csala M, Braun L, Garzó T, Mandl J. (1996) Ascorbate synthesis-dependent glutathione consumption in mouse liver. *FEBS Lett*, 381: 39-41.
- Bánhegyi G, Braun L, Csala M, Puskás F, Mandl J. (1997) Ascorbate metabolism and its regulation in mammals. *Free Radic Biol Med*, 23: 793-803.
- Bánhegyi G, Braun L, Csala M, Puskás F, Somogyi A, Kardon T, Mandl J. (1998) Ascorbate and environmental stress. *Ann N Y Acad Sci*, 851: 292-303.
- Bánhegyi G, Marcolongo P, Puskás F, Fulceri R, Mandl J, Benedetti A. (1998) Dehydroascorbate and ascorbate transport in rat liver microsomal vesicles. *J Biol Chem*, 273: 2758-2762.
- Bánhegyi G, Benedetti A, Margittai E, Marcolongo P, Fulceri R, Németh C, Szarka A. (2014) Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochim Biophys Acta*, 1843: 1909-1916.
- Berthoud VM, Beyer EC. (2009) Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal*, 11: 339-353.
- Beyens A, Albuissou J, Boel A, Al-Essa M, Al-Manea W, Bonnet D, Bostan O, Boute O, Busa T, Canham N, Cil E, Coucke PJ, Cousin MA, Dasouki M, De Backer J, De Paepe A, De Schepper S, De Silva D, Devriendt K, De Wandele I, Deyle DR, Dietz H, Dupuis-Girod S, Fontenot E, Fischer-Zirnsak B, Gezdirici A, Ghoumid J, Giuliano F, Diéz NB, Haider MZ, Hardin JS, Jeunemaitre X, Klee EW, Kornak U, Landecho MF, Legrand A, Loeys B, Lyonnet S, Michael H, Mocerri P, Mohammed S, Muiño-Mosquera L, Nampoothiri S, Pichler K,

- Prescott K, Rajeb A, Ramos-Arroyo M, Rossi M, Salih M, Seidahmed MZ, Schaefer E, Steichen-Gersdorf E, Temel S, Uysal F., Vanhomwegen M, Van Laer L, Van Maldergem L, Warner D, Willaert A, Collins TR, Taylor A, Davis EC, Zarate Y, Callewaert B. (2018) Arterial tortuosity syndrome: 40 new families and literature review. *Genet Med*
- Bibert S, Hess SK, Firsov D, Thorens B, Geering K, Horisberger JD, Bonny O (2009) Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297: 612-619.
- Bieber LL. (1988) Carnitine. *Annu Rev Biochem*, 57: 261-283.
- Biondi C, Pavan B, Dalpiaz A, Medici S, Lunghi L, Vesce F. (2007) Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR 8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol Hum Reprod*, 13: 77–83.
- Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird DJ, Hirst M, Rao A, Lorincz MC, Ramalho-Santos M. (2013) Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst- like state in ES cells. *Nature*, 500: 222-226.
- Boross L, Sajgó M. (1993) *A Biokémia Alapjai*, pp. 295, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Boyer JC, Campbell CE, Sigurdson WJ, Kuo SM. (2005) Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 334: 150–156
- Braun L, Kardon T, El Koulali K, Csala M, Mandl J, Bánhegyi G. (1999) Different induction of gulonolactone oxidase in aromatic hydrocarbon-responsive or - unresponsive mouse strains. *FEBS Lett*, 463: 345-349.
- Butler JS, Koutelou E, Schibler AC, Dent SY. (2012) Histone-modifying enzymes: regulators of developmental decisions and drivers of human disease. *Epigenomics*, 4: 163-177.
- Callewaert BL, Willaert A, Kerstjens-Frederikse WS, De Backer J, Devriendt K, Albrecht B, Ramos-Arroyo MA, Doco-Fenzy M, Hennekam RC, Pyeritz RE, Krogmann ON, Gillessen-kaesbach G, Wakeling EL, Nikzainal S, Francannet C, Mauran P, Booth C, Barrow M, Dekens R, Loeys BL, Coucke PJ, De Paepe AM.

- (2008) Arterial tortuosity syndrome: clinical and molecular findings in 12 newly identified families. *Hum Mutat*, 29: 150-158.
- Cameron E, Campbell A. (1974) The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact*, 285-315.
- Cammack J, Ghasemzadeh B, Adams RN. (1991) The pharmacological profile of glutamate-evoked ascorbic acid efflux measured by in vivo electrochemistry. *Brain Res*, 565: 17-22.
- Castori M, Ritelli M, Zoppi N, Molisso L, Chiarelli N, Zaccagna F, Grammatico P, Colombi M. (2012) Adult presentation of arterial tortuosity syndrome in a 51-year-old woman with a novel homozygous c.1411+1G>A mutation in the SLC2A10 gene. *Am J Med Genet A*, 58: 1164-1169.
- Cederbaum AI. (1989) Metals and oxygen free radical toxicity. *Free Rad Biol Med*, 7: 559-566.
- Chan PC, Peller OG, Kesner L. (1982) Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membranes. *Lipids*, 17: 331-337.
- Chatterjee IB. (1973) Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182: 1271-1272.
- Cheng CH, Kikuchi T, Chen YH, Sabbagha NG, Lee YC, Pan HJ, Chang C, Chen YT. (2009) Mutations in the SLC2A10 gene cause arterial abnormalities in mice. *Cardiovasc Res*, 81: 381-388.
- Cook JD, Watson SS, Simpson KM, Lipschitz DA, Skikne BS. (1984) The effect of high ascorbic acid supplementation on body iron stores. *Blood*, 64: 721-726.
- Corpe C, Tu H, Wang J. (2007) SVCT1 (Slc23a1) knock out mice: Slc23a1 as the vitamin C kidney reabsorptive transporter. *FASEB J*, 21: 520.
- Corpe CP, Eck P, Wang J, Al-Hasani H, Levine M. (2013) Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem*, 288: 9092-9101.
- Coucke PJ, Wessels M, Van Acker P, Gardella R, Barlati S, Willems PJ, Colombi M, De Paepe A. (2003) Homozygosity mapping of a gene for arterial tortuosity syndrome to chromosome 20q13. *J Med Genet*, 40: 747-751.
- Coucke PJ, Willaert A, Wessels MW, Callewaert B, Zoppi N, De Backer J, Fox JE,

- Mancini GM, Kambouris M, Gardella R, Facchetti F, Willems PJ, Forsyth R, Dietz HC, Barlati S, Colombi M, Loeys B, De Paepe A. (2006) Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat. Genet*, 38: 452-457.
- Cunningham JJ. (1998) The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulin-dependent diabetes mellitus, *J. Am. Coll. Nutr*, 17: 105–108.
- Cura AJ, Carruthers A. (2012) Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism and homeostasis. *Compr. Physiol*, 2: 863–914.
- Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. (1999) Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol*, 4: 840-845.
- Daniels AJ, Dean G, Viveros OH, Diliberto EJ. (1982) Secretion of newly taken-up ascorbic acid by adrenomedullary chromaffin cells. *Science*, 216: 737-739.
- Daniels AJ, Dean G, Viveros OH, Diliberto EJ. (1983) Secretion of newly taken up ascorbic acid by adrenomedullary chromaffin cells originates from a compartment different from the catecholamine storage vesicle. *Mol Pharmacol*, 23: 437-444.
- Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab*, 74: 186-199.
- Dekkers JC, Van Doornen LJ, Kemper HC. (1996) The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise induced muscle damage. *Sports Med*, 21: 213–238.
- Del Bello B, Maellaro E, Sugherini L, Santucci A, Comporti M, Casini AF. (1994) Purification of NADPH-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver and its identification with 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J*, 304: 385-390.
- Drera B, Guala A, Zoppi N, Franceschini P, Barlati S, Colombi M. (2007) Two novel SLC2A10/GLUT10 mutations in a patient with arterial tortuosity syndrome. *Am J Med Genet A*, 143: 216-218.

- Eck P, Erichsen HC, Taylor JG, Yeager M, Hughes AL, Levine M, Chanock S. (2004) Comparison of the genomic structure and variation in the two human sodium-dependent vitamin C transporters, SLC23A1 and SLC23A2. *Hum Genet*, 115: 285–294.
- Englard S, Seifter S. (1986) The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr*, 6: 365-406.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*, 6: 529-539.
- Faiyaz-Ul-Haque M, Zaidi SH, Wahab AA, Eltohami E, Al-Mureikhi MS, Al-Thani G, Peltekova VD, C-Tsui L, Teebi AS. (2008) Identification of a p.Ser81Arg encoding mutation in SLC2A10 gene of arterial tortuosity syndrome patients from 10 Qatari families. *Clin Genet*, 74: 189-193.
- Faiyaz-Ul-Haque M, Zaidi SH, Al-Sanna N, Alswaid A, Momenah T, Kaya N, Al-Dayel F, Bouhoagah I, Saliem M, Tsui LC, Teebi AS (2009) A novel missense and a recurrent mutation in SLC2A10 gene of patients affected with arterial tortuosity syndrome. *Atherosclerosis*, 203: 466-471.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341: 454-457.
- Gaál T, Vajdovich P, Speake BK, Noble RC, Surai PF, Mézes M. (1996) Lipidperoxidáció az életkor függvényében. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 51: 165–169.
- Gao J, Sun X, Martinez-Wittinghan FJ, Gong X, White TW, Mathias RT. (2004) Connections between connexins, calcium, and cataracts in the lens. *J Gen Physiol*, 124: 289-300.
- Grünewald RA, Fillenz M. (1984) Release of ascorbate from a synaptosomal fraction of rat brain. *Neurochem. Int*, 6: 491–500.
- Henne V, Söling HD. (1986) Guanosine 5'-triphosphate releases calcium from rat liver and guinea pig parotid gland endoplasmic reticulum independently of inositol 1,4,5-trisphosphate. *FEBS Lett*, 202: 267-273.

- Holst A, Frølich T. (1907) Experimental studies relating to ship-beri-beri and scurvy.II. On the etiology of scurvy. *J Hyg*, 7: 634-671.
- Hulse JD, Ellis SR, Henderson LM. (1978) Carnitine biosynthesis. beta- Hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *J Biol Chem*, 253: 1654-1659.
- Jackson, PS, Strange, K. (1993) Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am. J. Physiol*, 265: C1489– C1500.
- Karakurt C, Koçak G, Elkiran O, Coucke PJ, Van Maldergem L. (2012) Arterial tortuosity syndrome: case report. *Genet Couns*, 23: 477-482.
- KC S, Cárcamo JM, Golde DW. (2005) Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB J*, 19: 1657–1667
- King CG. (1953) The discovery and chemistry of vitamin C. *Proc Nutr Soc*, 12: 219-227.
- Kramer JGH. (1739) *Medicina castrensis*. Wien, Austria. Kurtzböck
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lee YC, Huang HY, Chang CJ, Cheng CH, Chen YT. (2010) Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet*, 19: 3721-3733.
- Leuzzi R, Bánhegyi G, Kardon T, Marcolongo P, Capecchi PL, Burger HJ, Benedetti A, Fulceri R. (2003) Inhibition of microsomal glucose-6-phosphate transport in human neutrophils results in apoptosis: a potential explanation for neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b. *Blood*, 101: 2381-2387.
- Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park JB, Lazarev A, Graumlich JF, King J, Cantilena LR. (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 3704-3709.
- Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. (2015) SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 14: 543-560.

- Lind J. (1753) A Treatise of the Scurvy: in Three Parts. Containing an inquiry into the Nature, Causes and Cure of that Disease, together with a Critical and Chronological Edinburgh, UK. Sands, Murray and Cochran.
- Lindstedt G, Lindstedt S. (1970) Cofactor requirements of gamma-butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J Biol Chem*, 245: 4178-4186.
- Maher F, Harrison LC. (1990) Hexose specificity for downregulation of HepG2/ brain-type glucose transporter gene expression in L6 myocytes. *Diabetologia*, 33: 641-648.
- Malo C, Wilson JX. (2000) Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles. *J. Nutr*, 130: 63–69.
- Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, Cheeseman C. (2007) Facilitated hexose transporters new perspectives on form and function. *Physiology*, 22: 234-240.
- Mardones L, Ormazabal V, Romo X, Jaña C, Blinder P, Peña E. (2011) The glucose transporter-2 (GLUT2) is a low affinity dehydroascorbic acid transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 410: 7–12.
- Margittai E, Bánhegyi G. (2008) Isocitrate dehydrogenase: A NADPH-generating enzyme in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*, 471: 184-190.
- Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Domoto H, Phetdee K, Wiriyasermkul P, Kikuchi Y, Oda T, Nishiyama J, Nakamura T, Morimoto Y, Kamakura K, Sakurai Y, Nonoyama S, Kanai Y, Shinomiya N. (2008) Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am J Hum Genet*, 83: 795.
- McGarry JD. (1995) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: its broadening role in fuel homeostasis and new insights into its molecular features. *Biochem Soc Trans*, 23: 321-324.
- McLaran JC, Bett JH, Nye JA, Halliday JW. (1982) Congestive cardiomyopathy and haemochromatosis-rapid progression possibly accelerated by excessive ingestion of ascorbic acid. *Aust N Z J Med*, 12: 187-188.
- McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized

- on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 72: 113-117.
- Meister A. (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*, 269: 9397-9400.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229: 941-945.
- Mueckler M, Thorens B. (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*, 34: 121-138.
- Muller DPR. (1987) Free radical problems of the newborn. *Proc. Nutr. Soc*, 46: 69–75.
- Muñoz- Montesino C, Roa FJ, Peña E, González M, Sotomayor K, Inostroza E, Muñoz CA, González I, Maldonado M, Soliz C, Reyes AM, Vera JC, Rivas CI. (2014) Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radic Biol Med*, 70: 241-254.
- Mylyharju J. (2003) Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol*, 22: 15-24.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*, 22: 18-35.
- Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M. (2004) Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med*, 140: 533-537.
- Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. (2006) Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*, 174: 937-942.
- Pastor WA, Aravind L, Rao A. (2013) TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 341-356.
- Price KD, Price CS, Reynolds RD. (1996) Hyperglycemia-induced latent scurvy and atherosclerosis: the scorbutic-metaplasia hypothesis, *Med. Hypotheses*, 46: 119–129.

- Price KD, Price CS, Reynolds RD. (2001) Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 158: 1–12.
- Prigge ST, Mains RE, Eipper BA, Amzel LM. (2000) New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci*, 57: 1236-1259.
- Puskás F, Braun L, Csala M, Kardon T, Marcolongo P, Benedetti A, Mandl J, Bánhegyi G. (1998) Gulonolactone oxidase activity-dependent intravesicular glutathione oxidation in rat liver microsomes. *FEBS Lett*, 430: 293-296.
- Ramundo-Orlando A, Serafino A, Schiavo R, Liberti M, d'Inzeo G. (2005) Permeability changes of connexin 32 hemi channels reconstituted in liposomes induced by extremely low frequency, low amplitude magnetic fields. *Biochim Biophys Acta*, 1668: 33-40.
- Rebec GV, Pierce RC. (1994) A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol*, 43: 537-565.
- Reichstein, T, Grüssner, A. (1934) Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv. Chim. Acta*, 17: 311–328.
- Ritelli M, Drera B, Vicchio M, Puppini G, Biban P, Pilati M, Prioli MA, Barlati S, Colombi M. (2009) Arterial tortuosity syndrome in two Italian paediatric patients. *Orphanet J Rare Dis*, 4: 20.
- Ritelli M, Chiarelli N, Dordoni C, Reffo E, Venturini M, Quinzani S, Monica M., Scarano G, Santoro G, Russo MG, Calzavara-Pinton P, Milanese O, Colombi M. (2014) Arterial Tortuosity Syndrome: homozygosity for two novel and one recurrent SLC2A10 missense mutations in three families with severe cardiopulmonary complications in infancy and a literature review. *BMC Med Genet*, 15: 122.
- Rose RC, Bode AM. (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J*, 7: 1135-1142.
- Rumsey SC, Kwon O, Xu GW. (1997) Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem*, 272: 18982–18989.

- Rumsey SC, Daruwala R, Al-Hasani H. (2000) Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem*, 275: 28246–28253.
- Sacheck JM, Blumberg JB. (2001) Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition*, 17: 809-814.
- Savini I, Rossi A, Pierro C. (2008) SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, 34: 347–355.
- Segade F. (2010) Glucose transporter 10 and arterial tortuosity syndrome: the vitamin C connection. *FEBS Lett*, 584: 2990-2994.
- Siushansian R, Dixon SJ, Wilson JX. (1996) Osmotic swelling stimulates ascorbate efflux from cerebral astrocytes. *J. Neurochem*, 66: 1227–1233.
- So A., Thorens B. (2010) Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*, 120: 1791-1799.
- Sotiriou S, Gispert S, Cheng J, Wang Y, Chen A, Hoogstraten-Miller S, Miller GF, Kwon O, Levine M, Guttentag SH, Nussbaum RL. (2002) Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med*, 8: 514–517.
- Strange K, Jackson PS. (1995) Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channel. *Kidney Int*, 48: 994–1003.
- Stratakis CA, Taymans SE, Daruwala R, Song J, Levine M. (2000) Mapping of the human genes (SLC23A2 and SLC23A1) coding for vitamin C transporters 1 and 2 (SVCT1 and SVCT2) to 5q23 and 20p12, respectively. *J Med Genet*, 37: E20.
- Svirbely JL, Szent-Györgyi A. (1932) The chemical nature of vitamin C. *Biochem J*, 26: 865-870.
- Szarka A, Lőrincz T. (2013) Cellular and intracellular transport of vitamin C. *The physiologic aspects Orvosi hetilap*, 154: 1651–1656.
- Szarka A, Balogh T. (2015) In silico aided thoughts on mitochondrial vitamin C transport. *J Theor Biol*, 365: 181-189.
- Takahashi Y, Fujii K, Yoshida A, Morisaki H, Kohno Y, Morisaki T. (2013) Artery tortuosity syndrome exhibiting early-onset emphysema with novel compound heterozygous SLC2A10 mutations. *Am J Med Genet A*, 161: 856-859.
- Thorens B, Mueckler M. (2010) Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: 141-145.

- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. (2001) Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J*, 20: 4467-4477.
- Upston JM, Karjalainen A, Bygrave FL, Stocker R. (1999) Efflux of hepatic ascorbate: a potential contributor to the maintenance of plasma vitamin C. *Biochem J*, 342: 49-56.
- Vaz FM, Wanders RJ. (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*, 361: 417-429.
- Wang Y, Mackenzie B, Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. (2000) Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 267: 488-494.
- Willaert A, Khatri S, Callewaert BL, Coucke PJ, Crosby SD, Lee JG, Davis EC, Shiva S, Tsang M, De Paepe A, Urban Z. (2012) GLUT10 is required for the development of the cardiovascular system and the notochord and connects mitochondrial function to TGF β signaling. *Hum Mol Genet*, 21: 1248-1259.
- Wilson JX. (2005) Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr*, 25: 105-125.
- Woodall J. (1617) *The surgeons mate*. London, England.
- Zaidi SH, Meyer S, Peltekova VD, Lindinger A, Teebi AS, Faiyaz-Ul-Haque M. (2009) A novel non-sense mutation in the SLC2A10 gene of an arterial tortuosity syndrome patient of Kurdish origin. *Eur J Pediatr*, 168: 867-870.
- Zoppi N, Chiarelli N, Cinquina V, Ritelli M, Colombi M. (2015) GLUT10 deficiency leads to oxidative stress and non-canonical $\alpha\beta3$ integrin-mediated TGF β signalling associated with extracellular matrix disarray in arterial tortuosity syndrome skin fibroblasts. *Hum Mol Genet*, 24: 6769-6787.

Saját közlemények jegyzéke:

Az értekezés témájában publikált saját közlemények

Bánhegyi G, Benedetti A, Margittai E, Marcolongo P, Fulceri R, Németh CE, Szarka A. (2014) Subcellular compartmentation of ascorbate and its variation in disease states. *Biochim Biophys Acta*, 1843: 1909-1916. (IF= 5,019)

Németh CE, Marcolongo P, Gamberucci A, Fulceri R, Benedetti A, Zoppi N, Ritelli M, Chiarelli N, Colombi M, Willaert A, Callewaert BL, Coucke PJ, Gróf P, Nagy SK, Mészáros T, Bánhegyi G, Margittai É. (2016) Glucose transporter type 10 - lacking in arterial tortuosity syndrome - facilitates dehydroascorbic acid transport. *FEBS Lett*, 590:1630-40. (IF= 3,623)

Gamberucci A¹, Marcolongo P¹, Németh CE¹, Zoppi N, Szarka A, Chiarelli N, Hegedűs T, Ritelli M, Carini G, Willaert A, Callewaert BL, Coucke PJ, Benedetti A, Margittai É, Fulceri R, Bánhegyi G, Colombi M. (2017) GLUT10-Lacking in Arterial Tortuosity Syndrome-Is Localized to the Endoplasmic Reticulum of Human Fibroblasts. *Int J Mol Sci*, 18. (IF= 3,226)

(¹megosztott első szerzőség)

Egyéb saját közlemények

Németh CE, Bernert Z, Gallina Z, Varga M, Pap I, Hajdu T. (2015) Kaposvár 61-es út 2. Lelőhely Árpád-kori embertani anyagának paleopatológiai vizsgálata. *AnthropKozl*, 56: 61-90.

Köszönetnyilvánítás

Az értekezés alapját képező kísérletek 2011-2016 között a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetében készültek, ahol 2012-ig tudomány segédmunkatársként, majd a Patobiokémia Ph.D. program önköltséges hallgatójaként dolgoztam. Munkám irányítói Dr. Bánhegyi Gábor és Dr. Margittai Éva, akiknek baráti támogatásáért, szakmai tanácsaiért, kritikai megjegyzéseiért ezúton fejezem ki köszönetemet. Külön köszönettel tartozom Dr. Mandl József professzor úrnak, hogy lehetővé tette, hogy az intézetben kutathassak. Köszönöm Mesziár Mónikának a kísérletek során végzett munkáját.