

A kanyargós artéria szindróma és a GLUT10

Doktori tézisek

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

Bevezetés

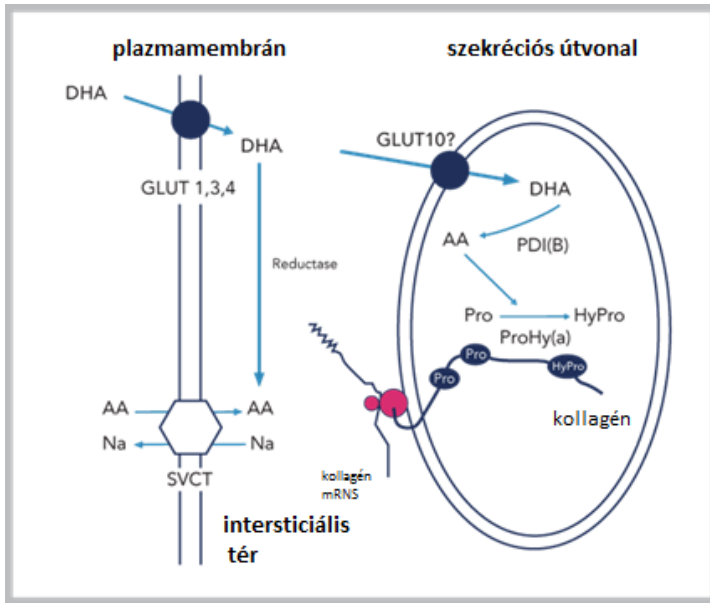
A kanyargós artéria szindróma (Arterial Tortuosity Syndrome, ATS; OMIM 208050) olyan autoszómális recesszíven öröklődő betegség, melyet a GLUT10 transzportert kódoló *SLC2A10* gén funkcióvesztéssel járó mutációja okoz. Ez a kór a kötőszövet elváltozásaiban nyilvánul meg, legjellemzőbb tünetei a következők: 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. Bár a GLUT10 szerepét az ATS-ben már régen leírták, a fehérje sejtben belüli elhelyezkedése és funkciója vitatott, így a betegség patomechanizmusa máig ismeretlen. Az ATS korábbi modelljei azt feltételezik, hogy (i) a GLUT10 hiánya a sejtmag periferiáján glukózfüggő TGF β aktiválódáshoz vezet, mely stimulálja az érfal sejtjeinek proliferációját, vagy (ii) a mitokondriális aszkorbát akkumuláció hiánya oxidatív stresszt okoz az érfal simaizom sejtjeiben.

Az ember a napi C-vitamin szükségletét a szintézis utolsó lépését katalizáló gulonolakton-oxidáz enzim hiánya miatt természetes forrásból kénytelen fedezni. A C-vitamin étrendben is megtalálható két leggyakoribb formája, az aszkorbát és a dehidroaszkorbinsav a bélrendszer teljes hosszán képes felszívódni. Mindkét vegyület felvétele telíthető, ami arra utal, hogy a felvételt transzporterfehérjék segítik. A C-vitamin redukált formájának, az aszkorbátnak a felvétele Na⁺-függő C-vitamin transzportereken keresztül történik aktív

transzporttal, melyek működése Na^+/K^+ -ATPázhoz kapcsolt. A dehidroaskorbinsav felvétele a glukóz transzportereken keresztül valósul meg facilitált diffúzióval. Míg a plazmamembránon keresztüli szállítást végző fehérjéket jól ismerjük, a két molekula sejten belüli transzportja nagyrészt feltáratlan.

Munkacsoportunk patkány májszövet eredetű endoplazmás retikulum frakción mért aszkorbát és dehidroaskorbinsav transzportjában jelentős eltérést tapasztalt. Míg az aszkorbát transzportja nagyon alacsony mértékű volt, a jelentős dehidroaskorbinsav felvétel az endoplazmás retikulumba transzporter fehérje jelenlétét feltételezi. Erre a kísérletre alapoztuk hipotézisünket, miszerint a GLUT10 dehidroaskorbinsavat transzportálhat az endoplazmás retikulum lumenébe. A lumenben a DHA aszkorbáttá redukálódik, majd az intraluminális prolil- és lizil-hidrozilázok kofaktoraként részt vesz a kollagén és elasztin képződésében és foldingjában (1. ábra).

Lokalizációs és funkcionális vizsgálataik modelljéül olyan kanyargós artéria szindrómás betegekből izolált fibroblaszt sejteket választottunk, melyek a szakirodalomban leírt 35 féle GLUT10 mutáció valamelyikét hordozzák.



1. ábra A GLUT10 feltételezett lokalizációja és szerepe az endoplazmás retikulumban

Célkitűzések

- A GLUT10 glukóz transzporter sejten belüli elhelyezkedésének felderítése humán fibroblaszt sejtvonalakban;
- Aszkorbát, dehidroaskorbinsav és más vegyületek transzportjának vizsgálata *in vitro* transzlációval előállított GLUT10-et tartalmazó proteoliposzómákban;
- A GLUT10 aszkorbát és dehidroaskorbinsav transzportjában betöltött szerepének vizsgálata kontroll és ATS-es páciensekből származó fibroblasztokon;

Módszerek

Szubcelluláris frakciók előállítás a humán fibroblasztokból

A szubcelluláris frakciókat humán kontroll fibroblaszt sejtekből készítettük. A sejteket ultrahangos szonikátor segítségével feltártuk, majd a sejthomogenátumot 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 18 000 g-n 20 percig, így jutottunk hozzá a mitokondriális frakcióhoz. Ezt követően a posztmitokondriális felülúszót újra lecentrifugáltuk (195 000 g, 60 perc), az így keletkezett üledék tartalmazta a mikroszóma frakciót.

hTERT fibroblaszt sejt kultúrák és csendesítésük

A GLUT10 csendesítését BJ-5ta hTERT jelzésű immortalizált fibroblaszt sejt vonalon végeztük, amit az LGC Standard-tól szereztük be. Az *SLC2A10* gén csendesítése hTERT sejt vonalakban GIPZ lentivírus konstrukcióba épített shRNS felhasználásával történt. A transzfektált sejtek szelektálását puromycin hozzáadásával végeztük.

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 RNS 2 µg-jából SuperScriptIII First-Strand Synthesis System termékkel cDNS-t állítottunk elő.

Western blot analízis

A géncsendesítés ellenőrzése

A Western blot mérésekhez egyforma mennyiségű (20 µg) fehérjét vittünk fel a hTERT sejtekből készített fehérje mintákból 10-12%-os SDS poliakrilamid géltre. A fehérjéket elektro-blot készülékkel PVDF membránra transzferáltuk. A minták fehérje mennyiségét Ponceau festést követő denzitometrálassal hasonlítottuk össze. Az immun-detektáláshoz felhasznált antitestek: anti-glukóz transzporter GLUT10 antitest (1:1000) és GAPDH antitest (1:7500).

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), VDAC1 (1:1000), Cyclophylin D (1:2000) és Grp94 (1:5000).

Sejtkészítmény előállítása transzport méréshez

A sejteket centrifugálást követően 20 mM-os MOPS pufferben (pH 7,2) szuszpendáltuk. 1 mM NaN_3 -al gátoltuk a mitokondrium működést, majd 40 µM végkoncentrációjú digitoninnal permeabilizáltuk a sejtek plazmamembránját.

Liposzóma preparálás

A nagyméretű, egyrétegű liposzómákat (large unilamellar vesicles; LUV) L- α -foszfatidilkolin tartalmú tojáslecitinből

állítottuk elő, melyet 0,4 µm-os polikarbonát szűrőt tartalmazó extrúderen 40-szer átnyomtuk 40 C°-on.

A GLUT10 in vitro translációja

Az *in vitro* transzkripcióval előállított GLUT10 mRNS-ről fehérjét állítottunk elő búzacsíra kivonat segítségével, amely minden translációhoz szükséges komponenst tartalmazott az aminosavak kivételével.

Szubsztrát 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. A membránt 2 ml MOPS pufferrel mostuk, majd a visszamaradt radioaktivitást folyadék szcintillációs számlálóval mértük.

Aszkorbát mennyiségi meghatározása HPLC-vel

A kontroll és ATS sejtek aszkorbát tartalmát folyadékkromatográfiás eljárással határoztuk meg. A mérések megkezdése előtt a sejteket 50 µM aszkorbáttal előkezeltük 0, 6, 12, 24 óráig. A sejteket 25 w/v%-os metafoszforsav oldatban feltártuk és centrifugáltuk, az aszkorbát szintet pedig a tiszta felülúszóból határoztuk meg.

Az ATS beteg sejtek transzfekciója

Az *SLC2A10* cDNS-ét kontroll fibroblasztokból izolált RNS-ből állítottuk elő SuperScriptIII One-Step Synthesis System felhasználásával, majd felszoroztuk PCR technikával. A

keletkezett PCR terméket eukarióta pEF6/V5-His-TOPO™ expressziós vektorba illesztettük. Az ATS sejtvonalt transzfekcióját TurboFect transzfekciós reagenssel végeztük. Kontrollként üres vektorral (mock) transzfektált sejteket alkalmaztunk.

Immunfluoreszcens analízis humán fibroblaszt sejtekben

A GLUT10 immunodetektálásához a kontroll fibroblaszt sejtvonalat poliklonális anti-humán GLUT10 antitesttel, valamint Alexa Fluor 488-al kapcsolt anti-nyúl másodlagos antitesttel inkubáltuk. A mitokondrium kimutatásához monoklonális anti-citokróm c antitesttel inkubáltuk a sejteket, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 594-el konjugált anti-egér antitestet alkalmaztunk. A GLUT10 kolokalizációját protein-diszulfid izomerázzal (PDI) olyan ATS fibroblasztokon vizsgáltuk, melyeket tranziensen transzfektáltunk V5-jelölt GLUT10 fehérjével. A fibroblasztokat fluoreszcensen jelöltük nyúl poliklonális anti-PDI antitesttel, mely ily módon az ER kimutatását biztosította, illetve anti-V5 monoklonális antitesttel, ami a V5-jelölt GLUT10 fehérjét mutatta ki. A sejteket - mosást követően - Alexa Fluor® 488 és 594-el konjugált anti-nyúl és anti-egér másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A GLUT10 re-expressziójának ellenőrzéséhez a sejtvonalat poliklonális anti-humán GLUT10 antitesttel és rodaminnal kapcsolt anti-nyúl másodlagos antitesttel inkubáltuk. A jelet Zeiss fluorescence Axiovert mikroszkóphoz csatlakoztatott fekete-fehér CCD kamerával rögzítettük.

Statisztikai módszerek

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

Eredmények

Első lépésként megvizsgáltuk a GLUT10 sejten belüli elhelyezkedését tengerimalac májából készített szubcelluláris frakciókban. A frakciók ellenőrzésére olyan antitesteket használtunk, amelyek az adott frakciókra jellemző fehérjékkel reagálnak (VDAC-mitokondrium; Grp78-endoplazmás retikulum). A kísérleteink során azt találtuk, hogy a GLUT10 fehérje az endoplazmás retikulum frakcióban van jelen legnagyobb mennyiségben. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a további kísérleteinkhez felhasználni kívánt kontroll humán fibroblaszt sejtvonalakban is hasonló szubcelluláris elhelyezkedést tapasztalunk-e, mint az állati eredetű mintákban. A fibroblasztokból magi, mitokondriális, citoszólikus és endoplazmás retikulum frakciókat állítottunk elő. A frakciók tisztaságát a fent leírt módon frakció-specifikus antitestekkel ellenőriztük. Western blot analízis alapján a vizsgált fehérje a humán sejtvonalban is az endoplazmás retikulum frakcióban volt jelen.

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

A GLUT10 sejten belüli elhelyezkedésének tisztázása után a transzport méréseinkhez először hTERT immortalizált humán bőr fibroblaszt sejtvonalakat használtunk, melyekben a GLUT10 fehérje génjét lecsendesítettük. A sejtekből olyan klónokat szelektáltunk, melyek stabilan expresszálták a GLUT10 csendesítéséért felelős vektort, majd ezekben

ellenőriztük a csendesítés hatékonyságát. A stabilan expresszálo klónok szemi-kvantitatív RT-PCR analízise azt mutatta, hogy a három alkalmazott csendesítő szekvencia közül kettő hatékony volt.

A csendesített hTERT fibroblaszt sejteken a plazmamembránt digitoninnal permeabilizáltuk az endomembránok intaktságának megőrzése mellett (szemipermeabilizálás). A mitokondrium működését Na-aziddal gátoltuk, hogy kiküszöböljük az esetleges mitokondriális transzportot. A szemipermeabilizált hTERT fibroblaszt sejteken végzett transzportmérések kimutatták, hogy a csendesített sejtvonalakban jelentősen csökkent a dehidroaszorbát felvétel a kontroll sejtvonalhoz képest. A dehidroaszorbinsav transzport szoros korrelációt mutatott a GLUT10 fehérje expresszált mennyiségével.

Ezután kontroll és ATS-ben szenvedő betegekből izolált intakt primer fibroblasztokon vizsgáltuk az aszorbát és dehidroaszorbinsav transzportot. A teljes sejten mért transzport azt mutatta, hogy míg az aszorbát transzport az ATS-es sejtekben változatlan, a dehidroaszorbinsav transzport szignifikánsan csökkent 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 dehidroaszorbinsav felvételére is, vagyis a kontroll sejtekben az endomembránokon akadálytalanul átjut a dehidroaszorbinsav, így azok „beszívják” a kívülről adott dehidroaszorbinsavat. GLUT10 mutáns sejteken ez a szívóhatás kevésbé érvényesül, tehát alacsonyabb fokú teljes sejt felvételt kapunk.

Intakt fibroblaszt sejteken HPLC technikával mértük az aszkorbát hosszútávú felvételét. Fiziológiás koncentráció mellett az ATS beteg sejtek aszkorbát akkumulációja elmaradt a kontroll sejtektől. A 24 órás kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb aszkorbát koncentrációt mutattunk ki a beteg sejtekben. 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 jelentős eltérést a kontroll és az ATS betegek fibroblasztjai között.

Ezt követően primer fibroblaszt sejtek plazmamembránját is permeabilizáltuk digitoninnal az endomembránokon keresztüli transzportméréshez. Míg az aszkorbát felvétele számottevően nem változott a beteg sejtekben a kontrollhoz viszonyítva, a beteg sejtek dehidroaszkorbát transzportjában nagymértékű csökkenést tapasztaltunk.

Az endomembránokon keresztüli transzportvizsgálatok következő lépéseként primer fibroblaszt sejtekből izolált endoplazmás retikulum frakciót fúzionáltattunk unilamelláris liposzómákkal. Az ATS beteg sejtekből izolált frakció dehidroaszkorbinsav transzportja elmaradt a kontroll csoporttól, azonban az eredmény statisztikailag nem volt szignifikáns.

Dehidroaszkorbát és egyéb lehetséges GLUT10 szubsztrátok transzportjának közvetlen vizsgálatához *in vitro* transzlációval előállított GLUT10 fehérjét ágyasztunk liposzómába. Az UDP-glukuronsav és a szacharóz esetében nem tudtunk transzport aktivitást mérni, az aszkorbát esetében kis mértékű felvételt figyeltünk meg. A glukózt és a dehidroaszkorbátot 1 mM-os

koncentrációban vizsgálva hasonló mérési eredményeket kaptunk, a GLUT10 mindkét anyagot 3-5 nmol/mg liposzóma koncentrációban transzportálta. A dehidroaszorbát esetében a szubsztrát felvétel koncentráció függő volt.

A GLUT10 fehérjét újra kifejező egyik ATS sejvonalon 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 dehidroaszorbát felvételét. A mérés eredménye azt mutatja, hogy a transzfekciót követően az ATS-es sejtekben a dehidroaszorbinsav transzport helyreállt, hasonló koncentráció értékeket érve el, mint amiket a szemipermeabilizált kontroll fibroblasztok esetében mértünk.

Következtetések

- A GLUT10 fehérje a humán fibroblaszt sejtek endoplazmás retikulumába lokalizálódik.
- *In vitro* transzlációval előállított és liposzómába ágyazott GLUT10 fehérjével igazoltuk, hogy a GLUT10 dehidroaszorbát transzporter.
- GLUT10 mutáns és géncsendesített sejteken végzett transzport mérésekkel igazoltuk, hogy a dehidroaszorbinsav transzportja mind a plazmamembránon, de főként az endomembránokon keresztül csökkent a vad típusú GLUT10-et tartalmazó sejtekhez képest.

Saját közlemények jegyzéke:

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.