

Hogyan növeli a humán zsírszövet eredetű őssejtek in vitro terápiás hatékonyságát a kénhidrogén?

Csizmazia Ágnes SE ÁOK V.,
Marosi Gabriella SE ÁOK II.
kicsicsizi@gmail.com, gmarosi.tfg@gmail.com

Bevezetés: A kénhidrogén gázhalmazállapotú transzmitterként van jelen az élő szervezetekben, és szerteágazó hatásokkal rendelkezik. Korábbi vizsgálataink alapján a kénhidrogén növeli a terápiásan alkalmazott humán zsírszövet eredetű őssejtek (ASC) túlélését és hatékonyságát a szívinfarktus in vitro modelljében. Jelen kísérleteinkben megvizsgáltuk a kénhidrogén szerepét ezen sejtek proliferációjában, mitokondriális aktivitásában és antioxidáns védelmében.

Módszerek: A proliferációmérés során az őssejteket 0,3 μ M (ASC-0,3), 3 μ M (ASC-3) és 30 μ M (ASC-30) nátriumhidroszulfiddal (NaHS, kénhidrogén-donor) kezeltük a 9 napos vizsgálat kezdetén, 3. és 6. napján, míg a kontroll csoport (ASC) vehikulumot kapott. Az endogén kénhidrogén-termelés gátlásának hatását vizsgálva az őssejteket 3 naponta kezeltük a cisztationin- γ -liáz enzim gátlószerevel, 10 μ M propargylglicinnel (PAG). A sejtek proliferációját fluoreszcens mikroszkóppal követtük, és a sejtszám-változásokat a kezdeti érték százalékában fejeztük ki. A mitokondriális aktivitást resazurin-tesztel mértük a kezeléseket megelőzően, továbbá a 9. napon, és a változást százalékosan fejeztük ki. Az antioxidáns hatást 2 órás 2 μ M H_2O_2 kezelést követő laktátdihidrogenáz (LDH) felszabadulás mérésével vizsgáltuk 3 és 30 μ M NaHS előkezelést követően.

Eredmények: A NaHS a kilencedik napra dóziszfüggő mértékben növekvő proliferációt hozott létre (ASC: $234 \pm 25\%$; ASC-0,3: $331 \pm 67\%^{***}$; ASC-3: $405 \pm 61\%^{****}$; ASC-30: $471 \pm 33\%^{****}$; vs kontroll, $*p < 0,05$; $****p < 0,0001$). A PAG a 3. naptól kezdődően szignifikánsan csökkentette az őssejtek proliferációját (kontroll: $156,2 \pm 10,3\%$; 10 μ M PAG: $81,7 \pm 4,7\%^{****}$, $p < 0,0001$). Az összesített mitokondriális aktivitás tekintetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Az LDH-felszabadulás a 3 μ M NaHS előkezelés hatására csökkent (kontroll: $90,3 \pm 7,9\%$; 3 μ M NaHS: $67,0 \pm 5,7\%^{**}$; 30 μ M NaHS: $89,5 \pm 10,2\%$, $p < 0,01$).

Következtetés: A kénhidrogén dóziszfüggően növeli a humán zsírszövet eredetű őssejtek proliferációját. A nagyobb proliferáció mellett azonos összesített mitokondriális aktivitás csökkent sejtenkénti mitokondriális aktivitásra utalhat, ami a reaktív szabadgyökök kisebb mértékű felszabadulását okozhatja. Az antioxidáns védelem hatékonyabb 3 μ M NaHS kezelést követően. Eredményeink magyarázhatják a korábbi, in vitro őssejtterápia-modellünkben tapasztalt előnyös hatásokat.

Támogatás: OTKA 83803

Kiss et al. Hydrogensulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. Life Sci 2008, 83:589-94.

Dongó et al. The cardioprotective potential of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury. Acta Phys Hung 2011 98:369-381.

Témavezető(k): Dr. Kiss Levente egyetemi adjunktus, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet, Benkő Zsolt PhD-hallgató, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet

Konzervált aminosavak szerepe a CB1 kannabinoid receptor jelátvitelében

Tímár Dániel SE ÁOK III.
lamaltrobe@gmail.com

A 7-transzmembrán receptorok működésének megértéséhez fontos, hogy azonosítsuk a receptor aktív és inaktív konformációjának stabilizálásában szerepet játszó aminosavakat. A rendelkezésre álló kristálystruktúrák alapján felmerült, hogy az R3.50, Y5.58 és D6.30 pozíciójú konzervált aminosavak ilyen funkcióval bírnak. Célunk volt, hogy az általunk kutató CB1 kannabinoid receptor (CB1R) mutációs analízisével megvizsgáljuk ezen aminosavak szerepét a receptorról induló egyes jelpályák (G-fehérje aktiválás és β -arresztin2 kötés) elindításában.

Irányított mutagenézissel hoztuk létre az R3.50A, Y5.58A és D6.30A mutációkat. Méréseinkhez CHO sejteket transziensen transzfektáltunk a szükséges plazmidokkal. A receptorok sejtben belüli eloszlását konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, fluoreszcens fehérjével jelölt receptorokkal. A G-fehérje aktiválást biolumineszcencia rezonancia energia-transzfer (BRET) módszerrel vizsgáltuk, melynek során Renilla luciferázzal jelölt αo (αo -Rluc) és YFP-vel jelölt $\beta \gamma$ (YFP- $\beta \gamma$) alegységek szétválását követtük. A β -arresztin2 (β -arr2) kötését Rluc-al jelölt β -arr2 (β -arr2-Rluc) és a plazmamembránt megjelölő MP-mVenus fehérje közti BRET segítségével követtük. A β -arr2 kötését konfokális mikroszkóppal tettük láthatóvá, GFP-vel jelölt β -arr2 expressziójával.

Eredményeink alapján a vizsgált CB1R mutánsok mindegyike a vad típusú receptorhoz (CB1R-WT) hasonló mértékben fejeződött ki a plazmamembránban. CB1R-Y5.58A mutáns G-fehérje aktiválása csak részlegesen csökkent, azonban β -arr2 kötési képessége teljesen eltűnt. A CB1R-R3.50A mutánsnál a CB1R-WT-hoz hasonlóan bazális G-fehérje aktivációt detektáltunk, agonista stimulusra azonban a G-fehérje aktiváció elmaradt a CB1R-WT-től. Ezen mutánsnál ugyanakkor megjelent egy markáns bazális β -arr2 kötés, miközben agonista hatására kevésbé kötötte a β -arr2-t, mint a CB1R-WT. A CB1R-D6.30A mutáns a CB1R-R3.50A-hoz hasonló karakterisztikával rendelkezett, mind G-fehérje aktiválás, mind β -arr2 kötés tekintetében.

Eredményeink alapján a vizsgált mutációk különböző módon befolyásolják a CB1R G-fehérje aktiválását, illetve β -arr2 kötési képességét. Ugyanez mondható el a receptor bazális illetve agonista-indukált jelátviteléről is. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a CB1R több különböző aktív konformációt felvehet, melyek az egyes jelpályákat eltérő mértékben aktiválják.

Munkacsoportunk ebben a témában korábban nem publikált.

Témavezető(k): Dr. Hunyady László egyetemi tanár, Élettani Intézet, Dr. Gyombolai Pál egyetemi tanársegéd, Élettani Intézet