

Nukleozid-módosított VEGFC mRNS-LNP terápia hatásai genetikai nyirokódéma modellben

SZŐKE DÁNIEL IMRE

Általános orvos, Oszatlan, 12. félév

KOVÁCS GÁBOR

Általános orvos, Oszatlan, 12. félév

Semmelweis Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

Bevezetés: A nyirokódéma prevalenciáját világszinten százmillió nagyságrendűre becsülik. Ezen betegség hatása nem csak a betegek életminősége romlik, de hosszú távon számos súlyos szövődemény alakulhat ki. A mai napig nem áll rendelkezésre definitív gyógymód a betegség kezelésére. Számos kísérlet történt az elmúlt évtizedekben fehérje alapú terápiás módszerek kidolgozására. Példaként említhetők a rekombináns fehérje, és az adenovírus alapú rendszerek, melyeknek azonban számos limitációja van. A Lipidnanopartikulába (LNP) csomagolt mRNS-ek új fejezetet nyithatnak meg a fehérje alapú terápiás eszközök fejlesztésében. A 2018 évi helyi TDK konferencián bemutattuk, hogy a VEGFC mRNS-LNP hatására sejtek sikeresen fejtek ki VEGFC fehérjét, majd ez egerekbe injektálva több szervben idézte elő nyirokerek növekedését.

Célunk ezen VEGFC mRNS alapú eszköz lehetséges mellékhatásainak vizsgálata élő szervezetben és kísérletes tesztelése genetikai nyirokódéma modellben.

Módszerek: Különböző genetikai hátterű egerek szerveit kontroll és VEGFC mRNS-LNP-vel injektáltuk. A nyirokér riporter egerek mintáit közvetlenül, és paraffin alapú szövettani metszetek immunfestését követően fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Továbbá a VEGFC mRNS-LNP-vel kezelt mintákon áramlási citometriát végeztünk. A nyirokerek funkcióját nagy molsúlyú Rhodamin-Dextrán segítségével teszteltük. Ezt követően nyirokódéma egérmódelben vizsgáltuk a VEGFC mRNS-LNP betegségre gyakorolt hatását.

Eredmények: Míg rendszerünk hatékonyan idézett elő nyirokernövekedést, vérernövekedést és jelentős mértékű immunsejt infiltrációt vizsgálataink során nem tapasztaltunk. A kialakult nyirokerek képesek voltak nagy molsúlyú molekulák felvételére és elszállítására, illetve a VEGFC mRNS-LNP nyirokernövekedést előidéző hatása szervspecifikusnak bizonyult. Nyirokódéma állatmodellben azt tapasztaltuk, hogy a kialakított nyirokódéma VEGFC mRNS-LNP segítségével összességében gyorsabban gyógyult.

Következtetések: Összességében elmondhatjuk, hogy az általunk kifejlesztett rendszer nem csak egy kiváló eszköz nyirokerek szerepének különböző laboratóriumi kísérletekben való vizsgálatára, de a jövőben új terápiás módszerrel válhat egy számos ember életét megnehezítő betegség gyógyítására.

Támogatók: Lendület Program (LP2014-4/2018)NPK-P_16-2016-1-0039VEKOP-2.3.2-16-2016-00002 és EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009

Témavezető: Dr. Jakus Zoltán, egyetemi docens (SE)



2019.04.24. (szerda) - 15:30

In Vitro Diagnosztikai Tömb, Nagyöadó

A flotillin-1, mint a protein foszfatáz 2A szubsztrát fehérjéjének vizsgálata

THALWIESER ZSÓFIA

Biotechnológia, MSc, 3. félév

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

A protein foszfatáz 2A (PP2A) a Ser/Thr specifikus foszfatázok csoportjába tartozik. Szerkezetét tekintve három alegységből áll, melyek közül a változatos B alegység határozza meg a holoenzim szubsztrát specifikitását, valamint a sejtben belüli lokalizációját. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az endotélsejtekben a flotillin-1 fehérje, a B55 α regulátor alegységet tartalmazó PP2A holoenzimmel hat kölcsön. A kölcsönhatást a fehérjék kolokalizációjával, immunprecipitációval és pull down kísérletekkel igazoltuk. Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a protein kináz C (PKC) enzim a flotillin-1 fehérjét a Ser315oldalláncon foszforilálja. Jelenlegi munkánk célja volt annak vizsgálata, hogy a flotillin-1 lehet-e a PP2A szubsztrátja.

Tüdő artéria endotél sejtekben siRNS technikával depletáltuk a PP2A regulátor B α alegységét, melynek hatására a flotillin-1 a sejtmag körül dúsult fel. Ugyanezt a változást láttuk a PKC enzim aktiválásakor is. Proximity ligation assay (PLA) módszerrel kimutattuk, hogy a PKC enzim aktivációjakor a flotillin-1 és PP2A B α közötti kölcsönhatás sokkal kifejezettebb lett. Rekombináns DNS technikával létrehoztuk a flotillin-1foszforilációt utánzó (S315D) és foszforonull (S315A) mutánsait. A kísérletekhez a flotillin-1 kódoló szakaszokat emlős expresszióra alkalmas pcDNA3.1/myc-His vektorba, míg a bakteriális expresszióhoz pGEX-4T-2 vektorba klónoztuk. Az endotél sejtekben optimalizáltuk a rekombináns fehérjék overexpresszióját, majd lokalizációjukat immunfluoreszcens festéssel, míg a PP2A B α fehérjével való kölcsönhatásukat immunprecipitációs kísérletekkel ellenőriztük. Bakteriális expresszióval előállítottuk a GST-flotillin-1 mutáns fehérjéket, melyeket pulldown módszerben használtunk fel. A kölcsönhatás kinetikai vizsgálatához az ún. NanoBit rendszerrel terveztünk vizsgálatokat, amelyhez a szükséges rekombináns plazmidokat már létrehoztuk.

Eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az endotél sejtekben a flotillin-1 fehérjefoszforiláció függő módon hat kölcsön a PP2A B α holoenzimmel, valamint hogy a PKC által foszforilált flotillin-1 a PP2A enzim szubsztrátja lehet.

Témavezető: Dr. Boratkó Anita, egyetemi adjunktus (DE)



2019.04.24. (szerda) - 15:45

In Vitro Diagnosztikai Tömb, Nagyöadó