

CELLULÁRIS MEMBRÁNOK BIOFIZIKAI PARAMÉTEREINEK VIZSGÁLATA GAUCHER-FENOTÍPUSÚ NEURONÁLIS SEJTMODELLBEN

Kovács Tamás¹Vigh Barbara¹, Szabó Máté¹, Cs. Szabó Bence¹, Székelyhidi Virág¹, Kurtán Kitti¹, Panyi György¹, Nagy Péter¹, Zákány Florina¹¹Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A lizoszomális béta-glükocerebrozidáz (GBA) örökletes deficienciája által okozott Gaucher-kór patognómikus eltérése a glükozilceramid (GlcCer) felhalmozódása az intracelluláris organellumok membránjában és a plazmamembránban, amely révén azok biofizikai jellemzői jelentősen megváltozhatnak, hozzájárulva a betegség patomechanizmusához. A Gaucher-kórban leginkább érintett sejtek a makrofágok mellett a neuronok, amelyek eltérései megfelelő modellrendszer hiányában még jórészt ismeretlenek.

Célul tűztük ki egy új neuronális Gaucher-modellrendszer membránbiofizikai karakterizálását. Ehhez a GBA^{-/-} egerekből származó immortalizált kortikális neuronokból álló modellben környezeti paraméterekre szenzitív fluorofórok (TMA-DPH, Laurdan, PY3174, di-8-ANEPPS és F66) spektrofluorimetriás, konfokális mikroszkópos és áramlási citométeres vizsgálatával jellemeztük a membránbiofizikai eltéréseket kontroll GBA^{+/+} sejtekhez viszonyítva. Emellett konfokális mikroszkópia, F66 és intracelluláris organellumokra specifikus markerek használatával karakterizáltuk különböző kompartmentumok membránjait.

Eredményeink alapján a GBA^{-/-} neuronokban a GlcCer akkumulációja a membránbiofizikai paraméterek eltéréseivel társul. A GBA^{-/-} neuronokban a GBA^{+/+} neuronokhoz képest ugyanis szignifikánsan lecsökken a membránok fluiditása, illetve hidrációja (a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája, illetve a Laurdan generalizált polarizációja (GP) magasabb), valamint megnövekszik a lipid rendezettség mértéke (a PY3174 GP értéke emelkedett). Emellett megnőtt a membránhoz asszociált molekuláris dipólok rendeződéséből származó és a membrán belsejében jelentős pozitív potenciálként megjelenő dipólpotenciál nagysága (az intramembrán elektromos erőter nagyságával arányos di-8-ANEPPS excitációs arány megnőtt, míg az azzal negatívan korreláló F66 emissziós arány lecsökkent). Különböző intracelluláris organellumokat vizsgálva azt találtuk, hogy a dipólpotenciál különösen a lizoszómákban emelkedett, amely eltérés nagyobbak bizonyult, mint a plazmamembránban.

Kísérleteink során karakterizáltuk az újonnan leírt GBA^{-/-} neuronális Gaucher-fenotípusú modellrendszer membránbiofizikai eltéréseit, valamint validáltunk egy olyan mérési módszert, amely alkalmas lehet élő sejtek celluláris membránjainak biofizikai karakterizálására *in situ*.

ÚNKP-21-4-II-DE-137, ÚNKP-21-4-II-DE-138, ÚNKP-21-3-I-DE-233, ÚNKP-21-3-I-DE-316

Rövidítések: di-8-ANEPPS: 4-(2-[6-(dioktilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só, F66: N-[3-(40-dihexilamino-3-hidroxi-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só, GBA: lizoszomális béta-glükocerebrozidáz, GlcCer: glükozilceramid, Laurdan: 6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin, PY3174: 4-[2-(6-Dibutilamino-5-fluoro-naftalen-2-il)-vinil]-1-(3-trietilammonio-propil)-piridinium dibromid, TMA-DPH: 4'-(trimetilammonio)-difenilhexatrién

A CIKLODEXTRINEK GÁTOLJÁK A SARS-COV-2 TŰSKEFEHÉRJE ACE2
RECEPTORHOZ TÖRTÉNŐ KÖTŐDÉSÉT ÉS FELVÉTELÉTZákány Florina¹Kurtán Kitti¹, Varga Zoltán¹, Nagy Péter¹, Panyi György¹, Kovács Tamás¹¹ Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen

A SARS-CoV-2 által okozott COVID-19 betegségben az első elfogadott gyógyszer a remdesivir volt, amelyet porként vagy koncentrált oldatként infúzióban alkalmaznak a klinikumban. Azonos mennyiségű remdesivir mellett mindkét formuláció jelentős mennyiségű (3-6 g) szulfobutiléter-béta-ciklodextrint tartalmaz, melynek vérbeli koncentrációja a mM-os nagyságrendet is elérheti. A SARS-CoV-2 sejtekbe történő túskefehérje által mediált bejutásának kapui a lipidtutajok, amelyekben a túskefehérje receptoraként szolgáló ACE2 receptor és a sejtbe jutást segítő TMPRSS2 proteáz dúsul.

A ciklodextrinek koleszterinkivonó képességük révén a tutajok roncsolásával képesek csökkenteni számos fehérje tutajbéli lokalizációját. Azt vizsgáltuk, hogy különböző CD-ek és remdesivir formulációk hogyan befolyásolják az ACE2R és a TMPRSS2 lipidtutajokkal való asszociációját, továbbá a vad típusú és a delta variánsú SARS-CoV-2 túskefehérje ACE2R-hoz történő kötődését és sejtbe történő felvételét.

Kísérleteinket az ACE2R-t és TMPRSS2-t stabilan expresszáló HEK sejteken és Calu-3 sejteken végeztük. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy különböző ciklodextrinek és remdesivir formulációk terápiásan releváns koncentrációkban alkalmazva szignifikánsan csökkentik az ACE2R és TMPRSS2 lipidtutajokkal és egymással való kolokalizációját, míg a remdesivir önmagában nincs hatással ezekre. Áramlási citometria során a ciklodextrinek és remdesivir formulációk dóziszfüggően csökkentették a fluoreszcensen jelölt vad típusú és delta variánsú túskefehérje ACE2R kötését, hasonlóan a túskefehérjék felvételéhez, amelyet konfokális mikroszkópiával kvantifikáltunk.

A ciklodextrinek terápiásan releváns koncentrációban alkalmazva az ACE2R, TMPRSS2 és lipidtutajok asszociációjának csökkentése révén gátolják a különböző variánsú SARS CoV-2 túskefehérjék ACE2R kötését és felvételét. Kétszeres ciklodextrin tartalma révén a remdesivir oldat hatékonyabban gátolja a fenti folyamatokat, ami felhívja a figyelmet a ciklodextrinek eddig kiaknázatlan terápiás potenciáljára, valamint a kétféle remdesivir formuláció esetleges in vivo hatékonyságbeli különbségeire.

ÚNKP-21-4-II-DE-138, ÚNKP-21-4-II-DE-137

Rövidítések: ACE2R: angiotenzin konvertáló enzim 2 receptor, Calu-3: humán bronchiális epitheliális sejtvonal, COVID-19: koronavírus betegség 19, HEK: humán embrionális vese sejtvonal, SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome-koronavírus 2, TMPRSS2: transzmembrán szerin proteáz 2