



MÉT 86. Vándorgyűlése

Debreceni Egyetem, 2024. május 29-31.



Absztrakt kötet

Különböző variánsú SARS-CoV-2 tüskefehérjék ACE2 receptorral való kölcsönhatásának vizsgálata

Kurtán Kitti, Naseem Muhammad Umair, Shakeel Kashmala, Varga Zoltán, Nagy Péter, Panyi György, Kovács Tamás, Zákány Florina

Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A SARS-CoV-2 fertőzés a vírus tüskefehérjék és a gazdasejt koleszterinben gazdag lipidtutajaiban dúsuló ACE2 és TMPRSS2 fehérjék kölcsönhatásával kezdődik. Korábban kimutattuk, hogy a terápiában is használt ciklodextrineket (CD) tartalmazó remdesivir formulációk a remdesivirtől függetlenül gátolják a tüskefehérjék ACE2 kötődését és internalizációját a membrán koleszterinszintjének csökkentése és a lipidtutajok integritásának megbontása által. A különböző variánsú tüskefehérjék ACE2 affinitása és a kötődés koleszterinfüggése közötti kapcsolatot korábban nem vizsgálták.

Feltevésünk szerint az eltérő ACE2 affinitással rendelkező variánsok különböző koleszterin- és így CD-érzékenységgel jellemezhetők, amely terápiás relevanciával bírhat. Ezért célunk, hogy összehasonlítsuk a klinikailag releváns (WT, Alfa, Béta, Delta, Omikron Ba1 és Ba2) SARS-CoV-2 variáns tüskefehérje receptorkötő domének (RBD-k) kötődési hatékonyságát és megvizsgáljuk annak koleszterinérzékenységgel és lipidtutaj preferenciával való korrelációját. Továbbá vizsgáljuk a koleszterinkivonás hatásait a különböző variánsú tüskefehérje trimerek internalizációjára.

ACE2-t és TMPRSS2-t stabilan expresszáló HEK293 sejtekben áramlási citometriával kimutattuk, hogy a különböző variánsú tüskefehérje RBD-k eltérő hatékonysággal kötődnek az ACE2-höz, és a folyamat hidroxipropil- β -ciklodextrin (HP β CD) általi gátlásának mértéke negatívan korrelál a kötődési hatékonysággal. Emellett megvizsgáltuk az RBD kötődés mértéke és a sejtmembrán lipidtutaj tartalma közötti korrelációt, amely során a lipidtutajokat kolera-toxin B alegységgel vagy egy környezetérzékeny fluorofórral azonosítottuk. Kimutattuk, hogy az alacsony ACE2 affinitású variánsok (pl. WT, Omikron Ba1) erősebb preferenciával rendelkeznek a magasabb tutajtartalommal rendelkező sejtek iránt, mint azok, amelyek magas affinitással bírnak (pl. Delta). Konfokális mikroszkópia és kvantitatív 3D képanalízis segítségével azt vizsgáljuk, hogy ezek a változások megjelennek-e a különböző variánsú tüskefehérje trimerek intracelluláris felvételének mértékében és HP β CD-érzékenységekben.

Eredményeink alapján a SARS-CoV-2 tüskefehérje variánsok ACE2 kötődési hatékonysága negatívan korrelál a kötődés koleszterinérzékenysége mértékével, amelynek háttérében az állhat, hogy a variánsok eltérő preferenciát mutatnak a tutajon belül, illetve kívül elhelyezkedő ACE2 receptorok iránt.

ÚNKP-23-2-I-DE-197 (K.K.), ÚNKP-23-5-DE-488, OTKA FK143400 (K.T.), OTKA FK146740, ÚNKP-23-4-II-DE-169 (Z.F.), OTKA 132906 (V.Z.), OTKA K138075, OTKA ANN133421 (N.P.)

P-15 Membrán ceramidok szerepének vizsgálata a Kv1.3 ioncsatorna Parkinson-kórra jellemző kóros foszforilációjában mikroglia sejtekben

Kovács Tamás, Cs. Szabó Bence, Kurtán Kitti, Varga Zoltán, Nagy Péter, Panyi György,
Zákány Florina

Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Bevezetés

A Parkinson-kór jellegzetessége a dopaminerg neuronok szelektív pusztulása, amelyben fontos a mikroglia kóros, Kv1.3 túlműködésével összefüggő aktivációja, ezáltal a csatorna szelektív gátlása új terápiás utat jelenthet. A Kv1.3 foszforilációjáért felelős Fyn kináz a betegség fontos rizikófaktor. A Parkinson-kórra jellemző a membrán ceramid (Cer) tartalmának növekedése. A sejtmembránban sajátos szignalizációs mikrokörnyezetet biztosító mikrodomének a koleszterinben és glükoszilceramidban (GCer) gazdag lipidtutajok mellett a Cer által képzett platformok. Azt, hogy Parkinson-kórban a membrán Cer tartalmának növekedése a Cer platformokon keresztül hozzájárulhat-e a Kv1.3 megnövekedett foszforilációjához (pKv1.3: foszforilált Kv1.3) korábban nem vizsgálták.

Anyag és módszer

Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a membrán Cer (töltés, lipopoliszacharid (LPS) kezelés) és GCer (töltés) szintjét növelő kezelések hatására hogyan változik a Kv1.3 és pKv1.3 szintje és membrán mikrodomének közti laterális megoszlása egér mikroglia sejtvonalon.

Eredmények

Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy míg a GCer töltés esetén a Kv1.3-lipidutaj kolokalizáció nő, addig a Cer szintet emelő kezelések (Cer töltés, LPS) hatására a csatorna-Cer platform kolokalizáció növekedett. Áramlási citometriás mérések alapján a Cer töltés és LPS hatására megnőtt a pKv1.3 mennyisége, ami együtt járt a pKv1.3-Cer platform kolokalizáció növekedésével, míg a pKv1.3-lipidutaj kolokalizáció nem változott. Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy az LPS által kiváltott hatások kivédhetőek-e a Cer szint növekedésének egyidejű megakadályozásával a szerin-palmitoil-transzferáz, savas vagy neutrális szfingomielináz enzimek gátlása révén.

Következtetés

Kimutattuk, hogy mikroglia sejtekben a sejtmembrán Cer szintjének növekedése a Kv1.3 megnövekedett foszforilációjával jár, a pKv1.3 pedig a Cer platformokban dúsul, így eredményeink a Parkinson-kórban megnövekedett Cer szint és a pKv1.3 szint közti direkt kapcsolatra utalhatnak.

Támogatás

OTKA FK143400, OTKA FK146740, ÚNKP-23-5-DE-488, ÚNKP-23-4-II-DE-169