

CERAMIDOK HATÁSA A Kv1.3 IONCSATORNA MEMBRÁN MIKRODOMÉNEK KÖZÖTTI MEGOSZLÁSÁRA ÉS KAPUZÁSÁRA

Cs. Szabó Bence, Kovács Tamás, Székelyhidi Virág, Szabó Máté, Panyi György, Nagy Péter, Varga Zoltán, Zákány Florina

Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A Kv1.3 ioncsatorna membránbeli lokalizációja és kapuzása jelentősen függ a sejtmembrán lipidösszetételétől. Korábban kimutattuk, hogy a Kv1.3 lipidtutajbeli dúsulása szignifikánsan megnöveli a membrán koleszterin tartalmának növelését követően, ami hozzájárulhat a koleszterin Kv1.3 ioncsatornára kifejtett elektrofiziológiai hatásaihoz. Ezek alapján a Cer, valamint a GlcCer szintén befolyásolhatja a Kv1.3 ezen paramétereit.

Kísérleteink során célunk a Kv1.3 membrán mikrodomének közötti megoszlásának, valamint egyensúlyi aktivációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával, illetve TEVCF módszerrel a sejtmembrán Cer, illetve GlcCer mennyiségének szelektív növelését követően.

A konfokális mikroszkópia során a CHO sejtekbe transzfektált Kv1.3 csatornákat anti-FLAG antitesttel, a lipidtutajokat GFP-GPI transzfektációval, a ceramid platformokat pedig anti-ceramid antitesttel jelöltük, majd a kolokalizáció kvantifikációjára meghatároztuk a jelölők intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens értékeket. A TEVCF mérések során a *Xenopus laevis* oocitákban expresszált Kv1.3 egyensúlyi aktivációján túl (G-V görbe) monitoroztuk a VSD mozgását, annak MTS-TAMRA festékkel történő jelölését követően (F-V görbe), ezáltal a ceramidok ioncsatornán belüli támadáspontjáról (VSD vagy PD) is információt kaptunk.

Eredményeink alapján a Cer szignifikánsan csökkenti a Kv1.3 lipidtutajokkal való kolokalizációját, míg növeli a ceramid platformokkal való asszociációt, míg a GlcCer a Kv1.3 lipidtutajokkal való kolokalizációját növeli a ceramid platformokkal való asszociáció változtatása nélkül. A Cer és a GlcCer egyaránt a pozitívabb feszültségek felé tolja el a G-V görbét. A Cer az F-V görbére is hasonló hatást gyakorol, ezáltal befolyásolja a csatorna VSD-jének működését is, míg a GlcCer valószínűleg közvetlenül a PD-n keresztül hat. A Kv1.3 eltérő módon megváltozott membránbeli lokalizációjának fontos szerepe lehet a kétféle ceramid kapuzásra kifejtett eltérő hatásmechanizmusában.

ÚNKP-21-3-I-DE-233, ÚNKP-21-4-II-DE-138, ÚNKP-21-4-II-DE-137, ÚNKP-21-3-I-DE-316, OTKAK_132906, OTKA_ANN133421, 2019-2.1.11-TÉT-2019-00059

Rövidítések: Cer: C16-ceramid, GlcCer: C16-glükoszilceramid, CHO: Chinese hamster ovary sejtvonal, FLAG: DYKDDDDK aminosavakat felismerő motívum, F-V görbe: fluoreszcens jel intenzitás változásának feszültségfüggését leíró görbe, GFP-GPI: zöld fluoreszcens fehérje-glükoszilfoszfatidilinozitol, G-V görbe: egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését leíró görbe, MTS-TAMRA: metántioszulfonát-5(6)-karboxitetrametilrodamin, PD: pórusdomén, TEVCF: kételektródás voltage-clamp fluorometria, VSD: feszültség szenzor domén