

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A dipólpotenciál vizsgálatának új lehetőségei élő,
egyedi sejtek plazmamembránjában és
intracelluláris membránrendszereiben**

Dr. Szabó Máté

Témavezető: Dr. Kovács Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
Debrecen, 2026

A dipólpotenciál vizsgálatának új lehetőségei élő, egyedi sejtek plazmamembránjában és intracelluláris membránrendszereiben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Szabó Máté okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem, Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja keretében

Témavezető: Dr. Kovács Tamás

Az értekezés bírálói:

Dr. Gombos Imre, PhD
Dr. Demény Máté Ágoston, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Bay Péter, az MTA doktora
tagok:	Dr. Gombos Imre, PhD
	Dr. Demény Máté Ágoston, PhD
	Dr. Bartók Ádám, PhD
	Dr. Gogolák Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2026. október 09. 13:00 óra

I. Előszó

Az utóbbi években általánosan elfogadottá vált nézet a biológiai membránokra már nem csupán „térrelválasztó”, passzív határoló elemekként tekint, hanem elismeri, sőt, fókuszba helyezi a membránt alkotó lipidek transzmembrán fehérjék szerkezetére, funkciójára gyakorolt aktív szerepét, melynek háttérében a közvetlen lipid-fehérje kölcsönhatások mellett a lipidek membránok strukturális szerveződésére gyakorolt hatása áll. A membrán szerkezetét leíró biofizikai paraméterek közül a membránfluiditás, illetve -hidráció viszonylag széles körben ismert és vizsgált, a harmadik alapvető biofizikai tulajdonság, a dipólpotenciál, illetve annak biológiai jelentősége azonban még jórészt feltáratlan. Ezen körülményeknek és paradigmaváltásnak köszönhetően került kutatásunk fókuszába a dipólpotenciál, valamint biológiai relevanciájának vizsgálata.

A dipólpotenciál nagyságát elsősorban a membránok lipidösszetétele határozza meg, mely mind az intracelluláris membránrendszerek között, mind egy adott membránrendszeren belül heterogenitást mutat, ezáltal várható, hogy a dipólpotenciál nagysága is jelentősen eltérő lehet a különböző szubcelluláris kompartmentumokban, illetve a különféle membrán mikrodoménekben is. A dipólpotenciál egy újabb dimenziót ad a lipid-fehérje kölcsönhatások értelmezése terén – kiegészítve a közvetlen receptor-ligand kölcsönhatások elméletét egy elektromos erőter által modulált, indirekt hatással.

A dipólpotenciált korábban elsősorban modellmembránokon vizsgálták, később speciális, mikrokörnyezeti paraméterekre, főleg a lokális elektromos erőter nagyságára érzékeny fluorofórok kifejlesztésével élő sejtek plazmamembránja is tanulmányozhatóvá vált, azonban az egyes membránalkotók arányának (pl. koleszterin) megváltozása következtében kialakuló eltéréseket még *in vitro* sem derítették fel részletesen, illetve az intracelluláris organellek, membránrendszerek is eddig lényegében feltérképezetlenül maradtak.

A dipólpotenciál kísérletes módosítására rendelkezésre álló módszerek száma is erősen limitált, továbbá a leggyakrabban alkalmazott eljárások jellemzően exogén, az élő szervezetben meg nem jelenő vegyületeken alapulnak. Kivételként említhető a fiziológiás körülmények között is jelen levő koleszterin dipólpotenciált növelő hatása, azonban ezzel ellentétes hatású, élő sejtekben is előforduló és a dipólpotenciál nagyságának kísérletes csökkentésére alkalmas, fiziológiás molekulát még nem írtak le.

A dipólpotenciál mérése sem tekinthető megoldottnak élő sejtekben – az „aranystandard” spektrofluoriméteres módszer egyedi sejtek vizsgálatát nem teszi lehetővé, míg a konfokális mikroszkópos eljárások általánosságban lassúak és munkaigényesek. Ezek miatt jelentős igény

mutatkozik egy nagy áteresztőképességű, egyedi élő sejtek vizsgálatára alkalmas mérőmódszerre – amely célra kézenfekvő az áramlási citométer alkalmazása. Eddig azonban nem volt ismert erre a célra megfelelő fluorofór, illetve nem publikáltak a szakirodalomban ilyen mérési módszert.

Disszertációmban az előbbieken felvetett problémákat megválaszolva mutatom be PhD kutatásaim során kapott eredményeimet, egyúttal rámutatva a dipólpotenciál – mint a sejtek funkcióit alapvetően befolyásoló tényező – jelentőségére.

II. A doktori értekezés előzményei, bevezetés

II/1. A transzmembrán szemlélettől az intramembrán régiókig

Az eukarióta sejtek membránrendszereinek, a velük kapcsolatos folyamatoknak és azok biológiai relevanciájának feltérképezéséhez megkerülhetetlen a membrán szerveződésével kapcsolatos jellemzők, így a membránpotenciálok részletes ismerete. A rendelkezésre álló vizsgálómódszerek fejlődésével a széles körben ismert transzmembrán potenciál mellett leírásra került két másik potenciál, a felületi, illetve a dipólpotenciál is.

A három közül legkevésbé ismert és karakterizált dipólpotenciált a membránban található szterolok, foszfolipidek és a membránhoz asszociált, interfaciális vízmolekulák molekuláris dipólusainak nem véletlenszerű rendeződéséből származtatjuk. Nagysága modellmembránokon végzett mérések és *in silico* szimulációk alapján 150-450 mV között van oly módon, hogy a membrán belső, hidrofób régiójának potenciálja pozitív a vizes fázisokhoz képest. A dipólpotenciál elektromos gradiense mindössze kb. 1 nm-es hatótávolságban figyelhető meg, következésképp az általa létrehozott elektromos erőter 2-3 nagyságrenddel meghaladja a transzmembrán és felületi potenciálok által generált erőterek nagyságát.

A dipólpotenciálra tekinthetünk az intramembrán régióra lokalizálódó és annak strukturális szerveződését jellemző tulajdonságként is, hasonlóan a hidrációhoz és a fluiditáshoz, hiszen nagyságát elválaszthatatlanul meghatározza a lipid kettősréteg molekuláris összetétele és a vízmolekulák jelenléte, illetve rendeződése. Elméleti megfontolások alapján tekinthetünk a három paraméterre a sejtmembrán eltérő „mélységét” jellemző tulajdonságként is: utóbbi kettő a kettősréteg belső, hidrofób részéről, míg a dipólpotenciál a felszín közeli régiók szerkezetéről nyújthat kvantitatív információt, így módon a dipólpotenciál feltárása egyben közelebb vihet bennünket a membránok szerveződésének, illetve az indirekt lipid-fehérje kölcsönhatások alaposabb megértéséhez is.

II/2. A dipólpotenciál nagyságát meghatározó tényezők és kísérletes növelésének lehetőségei

A dipólpotenciál nagyságát alapvetően meghatározó – és kísérletes körülmények között befolyásolható – tényező a membránok összetétele: elsősorban az alkotó foszfo- és szfingolipidek típusa, bizonyos telítetlen vagy telített zsírsavak jelenléte, azok koncentrációja, valamint a koleszterin és származékainak mennyisége.

A dipólpotenciál nagyságának kísérletes növelése főként a szterolok membránokba történő inkorporációjával történik. Erre a célra elsősorban az eddig leírt leghatékonyabb származékot,

az emberi szervezetben fiziológias körülmények között nem megtalálható 6-ketokolesztanolt (6KC) alkalmazzák mind modellmembránokban, mind pedig élő sejtek esetén. Mivel a koleszterin, illetve az egyéb szterolok erőteljesen hidrofób vegyületek, a sejtek ezen anyagokkal történő kezelése speciális vivőanyagokkal lehetséges. Erre a célra speciális ciklikus oligoszacharidok, a ciklodextrinek kínálnak megoldást, amelyek közül mind *in vitro*, mind *in vivo* a leghatékonyabbnak a véletlenszerűen metilált (metil- β -ciklodextrin, M β CD) származék, illetve ennek szterollal prekomplexált formája adódott.

II/3. A dipólpotenciál kísérletes csökkentésének lehetőségei

A dipólpotenciál hatékony csökkentésére kísérletes tapasztalatok alapján hosszú ideig kizárólagosan egy, a természetben is előforduló flavonszármazék, a phloretin kínált lehetőséget. A sejtek koleszterintartalmát csökkentő statinokkal, illetve ciklodextrinekkel történő kezelésekkel kapott eredmények részben ellentmondásosnak voltak, részben pedig a vegyületek toxikusnak bizonyultak. Ezen kezelések fiziológias alternatíváját jelenthetik bizonyos zsírsavak, általánosságban a többszörösen telítetlen ω -3 és ω -6 zsírsavak, például α -linolénsav (ALA) vagy γ -linolénsav (GLA), melyek általánosságban a koleszterinnel ellentétes hatásokat gyakorolnak a membránbiofizikai paraméterekre, azonban dipólpotenciálra gyakorolt hatásait élő sejtekben ezidáig még nem vizsgálták.

II/4. A dipólpotenciál meghatározása élő sejtek esetében

A dipólpotenciál meghatározása – intramembrán potenciálról lévén szó – annak elméleti definiálása óta nehézségekbe ütközött. A kvantitatív jellemzésére alkalmazott technikák, úgymint a krio-elektronmikroszkópia, atomerő mikroszkópia, vibrációs Stark-effektus spektroszkópia vagy molekuláris dinamikai szimulációs módszerek élő sejtek esetében nem, vagy csak korlátozottan alkalmazhatók. A probléma megoldását a feszültségérzékeny fluorofórok jelentették, ezen családon belül is az úgynevezett gyors szenzorok, melyek elektronszerkezete megváltozik az elektromos erőter nagyságának függvényében. A legkorábban leírt csoport, a 4-p-aminosztiril-1-piridinium származékok működése az elektronszerkezet megváltozásával járó elektrokrómos hatáson, másnéven Stark-effektuson alapszik, melynek következtében megváltozik a molekula gerjesztési és emissziós spektruma. A dipólpotenciál mérésére széleskörűen használt di-8-ANEPPS nevű fluorofór gerjesztéses aránymérési eljárás során alkalmazható: a molekulát két különböző hullámhosszon gerjesztve, azonos hullámhossz-tartományban detektálva az emittált fotonokat, a két esetben mérhető fluoreszcencia intenzitások hányadosa erőteljes korrelációt mutat a dipólpotenciál nagyságával.

A dipólpotenciál meghatározásának újabb lehetőségét biztosítják a nemrégiben karakterizált 3-hidroxi-flavon (3-HF) származékok, melynek biofizikai alapját a fluorofórok gerjesztett állapotában bekövetkező, úgynevezett gerjesztett állapotú intramolekuláris protontranszfer („Excited State Intramolecular Proton Transfer” – ESIPT) reakció képezi. Az ESIPT reakció hatására kétféle gerjesztett állapot, a normál (N^*) és tautomer (T^*) forma jön létre, melyek betöltöttségét a molekulát körülvevő lokális elektromos erőtér, így a dipólpotenciál nagysága alapvetően meghatározza. Az N^* és T^* festékpopulációknak megfelelően az emissziós spektrumban két jól elkülöníthető emissziós sáv figyelhető meg, így a fluorofór alkalmazható emissziós aránymérési eljárás segítségével a dipólpotenciál meghatározására – nagysága ugyanis az N^*/T^* aránnyal negatív, illetve a T^*/N^* aránnyal pozitív korrelációt mutat.

Az F66 alkalmas lehet áramlási citométeres mérési technikákhoz, azaz egyedi sejtek nagy áteresztőképességű elemzéséhez, amelyet azonban korábban még nem vizsgáltak, valamint kedvező spektrális tulajdonságai révén kombinálható lehet egyéb, konvencionális fluorofórokkal is.

II/5. A különböző celluláris membránok eltérő összetétele és dipólpotenciálja

A dipólpotenciállal – illetve általánosságban a membránbiofizikai paraméterekkel – kapcsolatos kutatások élő sejtekben eddig a plazmamembrán vizsgálatára fókuszáltak, az intracelluláris organellek lipid kettősrétegeiről, azok strukturális szerveződéséről azonban sokkal kevesebbet tudunk. Számos tanulmányban felvetették, hogy a szekréciós, endocitotikus útvonal organelleim, valamint a mitokondriumok membránjainak lipidösszetétele markánsan eltérhet egymástól, azonban rendkívül keveset tudunk arról, hogy ez megnyilvánul-e ezen membránok biofizikai tulajdonságainak funkcionális jelentőséggel bíró különbségeiben élő, ép sejtekben – az egyes organellekben tapasztalt eredményeket egymással összehasonlító elemzés pedig élő sejtek esetében még egyáltalán nem történt meg.

II/6. A dipólpotenciál biológiai relevanciája és a sejtpenetráló peptidek

A sejtmembrán lipidösszetételének megváltozásával járó kórképek, például a hiperkoleszterinémia különböző formái, a csökkent koleszterin-, azonban emelkedett 7DHC szinttel járó Smith-Lemli-Opitz szindróma, különféle neurodegeneratív betegségek, bizonyos tumorok vagy a Gaucher-kór pontos patomechanizmusának megértéséhez, a potenciális terápiás célpontok azonosításához elengedhetetlen a betegség szempontjából releváns molekulák kölcsönhatásainak megértése. A membránösszetétellel együtt megváltozó biofizikai tulajdonságok patofiziológiai jelentőségét egyre több bizonyíték támasztja alá, amelynek

háttérben a transzmembrán fehérjék szerkezetének és működésének befolyásolása, így végső soron a különböző sejtfunkciók modulációja áll.

Az intramembrán régióban érvényesülő dipólpotenciál elsősorban a fehérjék transzmembrán doménjére hatva befolyásolhatja azok funkcióját a töltött, illetve poláris aminosavakra gyakorolt hatások révén, a különböző konformációs állapotok stabilitásának és ezáltal a proteinek funkcionális aktivitásának modulálásával.

A dipólpotenciál biológiai relevanciáját az első, közel 50 évvel ezelőtti említését követően számos tanulmány hangsúlyozza különféle transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék esetében. Viszonylag hamar leírták a dipólpotenciál nagyságának hatását különféle bakteriális ionofórok asszociációjára és konduktanciájára; molekuláris dinamikai szimulációk kimutatták a hERG káliumcsatorna kapuzására, aktivációs és deaktivációs folyamataira gyakorolt hatásait, a kismolekulájú csatornamodulátorok vizsgálata során pedig azt találták, hogy a vegyületek hatékonyságát meghatározza azok dipólusmomentuma és így várhatóan a dipólpotenciálra kifejtett hatásuk is.

Fentiekkel összhangban munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy a dipólpotenciál változtatása hozzájárulhat a koleszterin és a 7DHC K_v1.3 és K_v10.1 feszültségkapuzott káliumcsatornák kapuzására gyakorolt gátló hatásaihoz, illetve magyarázhatja, hogy a ceramid és glükoszilceramid miért gátolja eltérő hatásmechanizmussal és különböző intramolekuláris támadásponton hatva a K_v1.3 kapuzását és feszültségérzékenységét.

A dipólpotenciál az aktív transzporterek működését is modulálhatja, így ezen fehérjecsalád egyik legszélesebb körben vizsgált tagja, a Na⁺/K⁺ ATPáz kapcsán pozitív korrelációt találtak a membránok dipólpotenciáljának nagysága és a fehérje aktivitása között. A daganatok kemoterápiával szemben mutatott rezisztenciájáért felelős egyik aktív transzporter, a P-glikoprotein (Pgp) vizsgálata során is több tanulmány igazolta a transzportfolyamat aktivitása és a dipólpotenciál nagysága közötti pozitív korrelációt.

A jelátviteli folyamatok során központi szerepet játszó különféle transzmembrán receptorok esetén is kimutatták a dipólpotenciál jelentőségét: az ErbB fehérjék esetében a dipólpotenciál nagyságának növelése például fokozza a receptorok dimerizációját, klaszterizációját és következményesen a daganatos proliferációban fontos jelátviteli útvonalak beindulását, míg a dipólpotenciál csökkentése eltérő hatásokkal bír.

Korábban kimutatták azt is, hogy a dipólpotenciál nagysága módosítja gyógyszermolekulák, β -amiloid és más peptidek membránhoz kötődését és a kettősrégeken történő átjutásának hatékonyságát. Utóbbiak közül kiemelt figyelmet érdemelnek az úgynevezett sejtpenetráló peptidek („cell-penetrating peptides”, CPP), melyek ígéretes alternatívát jelenthetnek az

egyébként a sejtmembrán szempontjából impermeábilis vegyületek – különböző gyógyszerek, peptidek, DNS és RNS – nem toxikus intracelluláris transzportjára. A szállított anyagok CPP által mediált bejuttatásának direkt, azaz a plazmamembránon történő közvetlen permeáción alapuló, illetve endocitotikus mechanizmusa is magában foglalja a membránokkal való kölcsönhatást – következésképp a dipólpotenciál, illetve az abból származó elektromos erőter nagysága befolyásolhatja ezen folyamatok hatékonyságát. Kutatócsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy a dipólpotenciál phloretin, valamint a koleszterinszintet csökkentő atorvastatin által kiváltott csökkenése a CPP-k sejtekbe történő megnövekedett felvételét, illetve különösen az endolizoszomális rendszerből való fokozott kiszabadulását eredményezi. Ezek alapján megalapozottan feltételezhető, hogy a CPP-k felvétele és a dipólpotenciál közötti kapcsolat alaposabb karakterizálása, valamint új, fiziológiás, a dipólpotenciál értékét csökkentő vegyületek felderítése hozzájárulhat a CPP-k bejutását, azaz végső soron a hordozott terápiás hatással bíró molekulák aktivitásának fokozását eredményező kezelési módszerek és protokollok felkutatásához és optimalizálásához.

III. Célkitűzések

A dipólpotenciál megismerését különösen élő sejtekben nagyban megnehezíti a rendelkezésre álló módszerek igencsak szűkös tárháza, mint azt a bevezető fejezetben tárgyaltuk.

Az alapkutatásokat, ezáltal reményeink szerint a későbbiekben majd a klinikai minták elemzését is elősegítendő célul tűztük tehát ki egy új, áramlási citometriás mérési módszer kidolgozását és optimalizálását, mely a kedvező spektrális tulajdonságokkal rendelkező F66 feszültségérzékeny fluorofór használatán alapszik és lehetővé teszi nagyszámú, élő, egyedi sejt vizsgálatát, a mintákban esetlegesen előforduló alpopulációk elkülönítésének lehetőségével. Módszerünk általános alkalmazhatóságát alátámasztandó célunk volt továbbá azt több különböző sejtvonalon validálni, illetve bizonyítani, hogy az valóban elsősorban a dipólpotenciál nagyságát kvantifikálja.

A dipólpotenciál különböző patológiás állapotokban betöltött szerepének megértéséhez elengedhetetlen először is az abban bekövetkező esetleges változások sejtfunkciókra gyakorolt hatásainak megismerése. A dipólpotenciált csökkentő fiziológias vegyületet ismereteink szerint azonban eddig nem írtak le, így célunk volt egy erre alkalmas kezelési mód felderítése is.

A sejtpenetráló peptidek a molekuláris terápia egy egyelőre kevésbé karakterizált, de rendkívül ígéretes szegletét képezik, mivel segítségükkel lehetőség adódik különböző – egyébként a plazmamembrán szempontjából impenetrábilis – molekulák citoszolba vagy különféle organellekbe történő bejuttatására. A dipólpotenciál hatását tudomásunk szerint ezidáig csak kevés tanulmány vizsgálta ezen peptidek felvételére, azonban korábbi eredmények már felvetették, hogy a dipólpotenciál kísérletes csökkentése segítheti azok sejtbe jutását – a zsírsavak ilyen hatását azonban egyáltalán nem ismerjük, így célunk volt ezen lipidek lehetséges kedvező hatásainak felderítése.

A sejtekben található különféle organellek membránösszetételében megfigyelhető különbségek számos esetben ismertek – azonban élő sejtek esetében ezen eltérések molekuláris rendezettségre gyakorolt hatása jórészt feltáratlan, amelynek oka az intracelluláris membránok jellemzőinek komparatív tanulmányozására alkalmas technikák hiánya. Munkánk során ezért célunk volt egy új, könnyen alkalmazható módszer optimalizálása, amelynek segítségével lehetségessé válik a plazmamembrán és a különböző intracelluláris organellek kettősrétegeinek összehasonlító elemzése ép, élő sejtekben és ezáltal feltárhatók az egyes kompartmentumok közötti különbségek, illetve a későbbiekben a különféle patológiás állapotokban kialakuló eltérések is.

IV. Anyagok és módszerek

IV/1. Alkalmazott sejtvonalak

A munkánk során alkalmazott összes sejtvonalat, azaz a JY Epstein-Barr-Vírussal transzformált humán limfoblasztoid, a THP-1 humán monocitoid, az adenovírussal immortalizált és az SV40T-antigént kódoló génnel transzfektált HEK-293T humán embrionális vese, az SKBR-3 humán emlő adenokarcinóma, a HeLa humán cervix adenokarcinóma és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma eredetű sejteket a gyártó útmutatásainak megfelelően tenyésztettük. Az áramlási citométeres és spektrofotométeres kísérletek során a kiindulási sejtszámok úgy kerültek kiválasztásra, hogy az egyes mosási lépések várható veszteségei után legalább 150 000 sejt maradjon egy-egy mintában. A konfokális mikroszkópos mérésekhez a sejteket kb. 80%-os konfluencia eléréséig növesztettük 8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésző kamrákban.

IV/2. Alkalmazott vegyületek és reagensek

A sejtek dipólpotenciáljának megváltoztatására 6-ketokolesztanolt és phloretint, illetve az ezek gyors sejtmembránba épüléséhez Pluronic F-127 nem-ionos detergenst alkalmaztunk. A sejtmembrán szteroltartalmának megváltoztatásához a 6KC, koleszterin és 7DHC M β CD-vel alkotott komplexeit használtuk, a szterolok relatív tömege minden komplexben 5% körül volt. A zsírsavak hatásának tanulmányozásához telített sztearinsavat (SA), többszörösen telítetlen ω -3 α -linolénsavat (ALA) és a többszörösen telítetlen ω -6 γ -linolénsavat (GLA) alkalmaztunk. A dipólpotenciál mérésére di-8-ANEPPS, illetve F66 fluorofórokat használtunk. A sejtmembrán fluiditásának vizsgálatához TMA-DPH-t, a membránhidráció meghatározásához PY3174 fluorofórt alkalmaztunk. A sejtek életképességének vizsgálata során Sytox Green és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V fluorofórokkal végeztük a jelölést. Az intracelluláris organellek vizualizációjához CellLight™ ER-GFP, BacMam 2.0-t, CellLight™ Golgi-RFP, BacMam 2.0-t, LysoTracker™ Deep Red-et, illetve MitoTracker™ Deep Red FM-et használtunk. A kalibrációs pH oldatok alkalmazása során az intra- és extracelluláris pH kiegyenlítését valinomicin és nigericin segítségével biztosítottuk.

IV/3. A sejtmembrán összetételének és dipólpotenciáljának módosítása

Kísérleteink során az új mérési módszerünk validálása és a korábban publikált eredményekkel való összehasonlíthatóság érdekében a THP-1 és JY sejtek membránjának dipólpotenciálját 6KC segítségével növeltük, csökkentésére pedig phloretint alkalmaztunk különböző koncentrációkban. A két vegyület sejtmembránba történő beépülésének gyorsítására és ezáltal

az inkubációs idő lerövidítésére a kezeléseket Pluronic F-127 detergens jelenlétében végeztük. A fenti vegyületek az alkalmazott koncentrációkban korábbi méréseink alapján nem befolyásolják érdemben sem a sejtek életképességét, sem pedig a nyugalmi transzmembrán potenciál értékét.

A sejtmembrán szteroltartalmának módosítására sejteinket 60 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten 6KC, koleszterin (CHOL) és 7-dehidrokoleszterin (7DHC) M β CD-vel alkotott komplexeivel normál Ringer oldatban különböző koncentrációk mellett. Kontrollként ekvivalens koncentrációjú, „üres”, azaz szterolokat nem tartalmazó M β CD-vel kezeltük a sejteket.

A különböző zsírsavak hatásának vizsgálatához a THP-1 és JY sejteket 48 órán át telített SA-t, többszörösen telítetlen ω -3 ALA-t és többszörösen telítetlen ω -6 GLA-t különböző koncentrációkban tartalmazó médiumokban inkubáltuk.

IV/4. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása di-8-ANEPPS és spektrofluorimetria segítségével

A kezeletlen, illetve a fenti módon kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után di-8-ANEPPS-sel jégen jelöltük, majd mosást követően a mérést közvetlenül megelőzően a mintákat 37°C-ra melegítettük. A méréseket Fluorolog-3 spektrofluoriméterrel végeztük úgy, hogy a mintatartó küvetákat 37°C-os vízfürdő segítségével tartottuk állandó hőmérsékleten. A dipólpotenciálban bekövetkező változások detektálására gerjesztési spektrumot rögzítettünk: a mintákat mérés során 5 nm-es szélességű tartományban gerjesztettük úgy, hogy a gerjesztési hullámhosszt 380 és 550 nm között 1 nm-es lépésközzel folyamatosan változtattuk, míg az emissziót állandó hullámhosszon, 660 nm-en detektáltuk. Irodalmi adatok alapján a dipólpotenciál nagysága pozitívan korrelál a 410 és 440 nm között, valamint a 490 és 520 nm közötti tartományban történő gerjesztést követően detektálható fluoreszcencia intenzitások integráljainak hányadosával.

IV/5. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása F66 és áramlási citometria segítségével

A kezeletlen, illetve a fenti módon kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után jégen F66-tal jelöltük, majd mosást követően a mérést közvetlenül megelőzően a mintákat 37°C-ra melegítettük. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását FACS Aria III áramlási citométerrel vizsgáltuk 37°C-on. A mintákat 405 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, majd az F66 által emittált intenzitást a fluorofór N* és tautomer T* gerjesztett állapotainak megfelelően

rendre 480/20 nm-es, valamint 585/42 nm-es sávszűrők segítségével detektáltuk. Az adatok elemzését FCS Express szoftverrel végeztük. A dipólpotenciál meghatározásához az FSC-SSC sűrűségplotokon végzett kapuzással kiválasztottuk a normál morfológiát mutató, élőnek tekinthető sejteket, majd az egyedi sejtekben kiszámítottuk az N*/T* emissziós arány hányadosát, végül pedig mintánként meghatároztuk az arány átlagos értékét. Korábbi adatok alapján az N*/T* emissziós arány negatívan korreál a dipólpotenciál nagyságával.

IV/6. A sejtek életképességének meghatározása

Az általunk alkalmazott, dipólpotenciált és sejtmembrán-összetételt módosító kezelések esetleges citotoxicitását vizsgálándó a kontroll, illetve a fent leírt módon kezelt THP-1 és JY sejteket Sytox Green, illetve Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált annexin V markerekkel jelöltük ún. annexinkötő pufferoldatban, szobahőn. Az egyedi sejtek vizsgálatát ezt követően NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel végeztük. A gerjesztéshez, illetve az emittált intenzitások detektálásához a Sytox Green esetében 488 nm-es hullámhosszúságú lézert és 530/30 nm-es sávszűrőt, míg az Alexa Fluor 647-annexin V esetében 640 nm-es hullámhosszúságú lézert és 660/20 nm-es sávszűrőt alkalmaztunk. Az adatelemzést ebben az esetben is az FCS Express szoftver segítségével végeztük, amely során valamennyi minta esetén kiszámítottuk a mind a Sytox Green, mind pedig az annexin V markerre nézve negatív, élő sejtek arányát az összes sejthez képest.

IV/7. A sejtmembrán fluiditásának meghatározása TMA-DPH és spektrofлуorimetria segítségével

A sejtmembrán fluiditásának meghatározásához a szakirodalomban leginkább elfogadott módszernek megfelelően a kezeletlen, illetve a fenti módon kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után Hank's pufferben szuszpendáltuk, TMA-DPH-val jelöltük szobahőn, majd mosás nélkül a mérést közvetlenül megelőzően a mintákat 37°C-ra melegítettük. A méréseket Fluorolog-3 spektrofлуoriméterrel végeztük úgy, hogy a mintatartó küvetákat ebben az esetben is 37°C-os vízfürdő segítségével tartottuk állandó hőmérsékleten. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiáját (r) az alábbi képlet segítségével számítottuk ki 352 nm-es hullámhosszon történő gerjesztést követően 430 nm-es hullámhosszon végzett detektálással:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}$$

ahol I_{vv} a fluoreszcencia vertikális, míg I_{vh} a horizontális komponensét jelenti vertikálisan polarizált fénnel történő gerjesztést követően, G pedig a mérőműszerre jellemző korrekciós

együttható, mely a rendszer horizontális és vertikális polarizációjú fotonok detektálásában észlelhető eltérő érzékenységet hivatott korrigálni. Kiszámítása a

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

képlet segítségével történik, ahol I_{hv} és I_{hh} rendre a vertikális és horizontális fluoreszcencia intenzitások horizontálisan polarizált fotonokkal történő gerjesztést követően.

IV/8. A sejtmembrán hidrációjának meghatározása PY3174 és konfokális mikroszkópia segítségével

A sejtmembrán hidrációjának meghatározásához a kezeletlen, illetve a fent leírtaknak megfelelően kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után PY3174 fluorofórral jelöltük szobahőn, majd mosást követően LSM880 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtekről a középsíkjuknak megfelelően. A gerjesztést 488 nm-es hullámhosszúságú lézerrel végeztük, míg az emissziót két hullámhossz-tartományban, 500 és 540 nm ($I_{kék}$), valamint 630 és 735 nm (I_{piros}) között detektáltuk. Az elkészült felvételek kvantitatív elemzéséhez a Matlab szoftvert alkalmaztuk. A képfeldolgozás során egy, a munkacsoportunk által korábban kidolgozott vízfeltöltéses (ún. „watershed”) algoritmus segítségével azonosítottuk a plazmamembránnak megfelelő régiókat, majd kizárólag ezen pixelek adatainak felhasználásával számítottuk ki a membrán hidrációjának mértékével fordítottan arányos generalizált polarizáció (GP) értékét az egyedi pixelekből az alábbi képlet segítségével:

$$GP = \frac{I_{kék} - I_{piros}}{I_{kék} + I_{piros}}$$

ahol $I_{kék}$ és I_{piros} a fentebb definiált hullámhossz-tartományokban a háttérrel korrigált, plazmamembrán pixelekből mért fluoreszcencia intenzitások. Ezt követően számítottuk ki a plazmamembrán pixelek adataiból a felvételeken a GP átlagos értékét.

IV/9. A penetratin szintézise és jelölése fluorofórokkal

A penetratint manuálisan állította elő kollaborációs partnerünk, Dr. Mándity István (Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország) TentaGel R RAM polisztrén PEG kopolimer gyantán a szilárdfázisú Merrifield standard Fmoc technikával. Az utolsó arginin csoport konjugációját követően az előállított penetratinhoz AFDye532 N-hidroxiszukcinimid észtert vagy 5(6)-karboxinaftofluoreszcein (NF) N-szukcinimidil észtert konjugáltunk. A reakció végbementét Kaiser teszttel ellenőriztük, melyet követően a vegyületet leoldottuk a gyantáról. Filtrációt és hideg dietil-éterrel való precipitációt követően a nyers terméket C18-as

oszlopon tisztítottuk preparatív fordított fázisú HPLC eljárással, majd liofilizáltuk. Az így kapott végtermék tisztaságát C18-as analitikai oszloppal, fordított fázisú HPLC eljárással teszteltük és az 95% fölöttinek adódott. A jelölt peptidek jelenlétét Bruker elektropray ionizációs tömegspektrometriával erősítettük meg.

IV/10. A penetratinok felvételének és endolizoszomális felszabadulásának vizsgálata áramlási citométerrel

A penetratinok felvételének és endolizoszomális felszabadulásának vizsgálatára a THP-1 és JY sejteket SA-t, ALA-t vagy GLA-t tartalmazó médiumban inkubáltuk, majd FACS Aria III áramlási citométerrel vizsgáltuk úgy, hogy a mérés előtt közvetlenül 5 μ M AFDye532-penetratint és 5 μ M NF-penetratint pipettáztunk a sejtekhez és azonnal mérni kezdtük az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitásait. A gerjesztési hullámhosszok és a detektálási tartományok az AFDye532-penetratin esetében 488 nm és 530/30 nm, míg az NF-penetratinnál 561 nm és 670/14 nm voltak. Minden minta esetén a mérés közvetlenül a penetratinok hozzáadását követően kezdődött és 15 percen keresztül zajlott állandó, 37°C-os hőmérsékleten, amelyet temperált mintatartó segítségével biztosítottunk.

Az adatok elemzését először FCS Express segítségével végeztük. Az FSC-SSC sűrűségplotokon kapuzott normál morfológiájú, élő sejtek időkorrelált fluoreszcencia intenzitás adatait exportáltuk, majd egy erre a célra készített Matlab algoritmus segítségével kiszámítottuk azok 10 másodperces időablakkal vett mozgóátlagait, illetve azok hányadosát. Az AFDye532-penetratin a sejtbe került penetratin teljes mennyiségéről szolgáltat információt, míg az NF-penetratin az endolizoszomális rendszerből kikerült, nem savas közegben található penetratin mennyiségét jelzi, következésképp az NF/AFDye532 hányados értékéből az endolizoszomális felszabadulás mértékére következtethetünk. Az elemzés során a fluoreszcencia intenzitásokat a kontroll minták első időablakban mért értékére normáltuk, majd ezt követően számítottuk ki a fluoreszcencia intenzitás arányokat a normált értékekből.

IV/11. A sejtek jelölése intracelluláris organelum markerekkel és a dipólpotenciálra szenzitív F66 fluorofórral

Az endoplazmás retikulum és a Golgi jelöléséhez a 8-lyukú fedőlemez aljú kamrákban növesztett SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejteket CellLight™ ER-GFP, BacMam 2.0, illetve CellLight™ Golgi-RFP, BacMam 2.0 reagensekkel transzdukáltuk. A lizoszómákat LysoTracker™ Deep Red, míg a mitokondriumokat MitoTracker™ Deep Red FM segítségével vizualizáltuk. Az intracelluláris organelumok dipólpotenciáljának meghatározásához kettős

jelölési protokollt alkalmaztunk: a sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk 10 nM F66-tal, amelyet a sejtenyésző médiumba adagoltunk, biztosítva a fluorofór megfelelő dúsulását az intracelluláris membránokban, majd a plazmamembrán egyértelmű azonosításának érdekében az inkubáció utolsó 10 percében további 10 nM F66-ot adtunk a sejtekhez. Az F66 spektrális tulajdonságai pH-függésének elemzésekor az utóbbi jelölést, illetve a konfokális mikroszkópos felvételek készítését 5,5 és 7,5 közötti pH értékkel rendelkező kalibrációs puffer oldatokban végeztük, amelyek 10 μ M valinomicint és 10 μ M nigericint tartalmaztak. Utóbbi két vegyületet az extra- és intracelluláris pH kiegyenlítése érdekében alkalmaztuk.

IV/12. A celluláris membránok dipólpotenciáljának meghatározása F66 és konfokális mikroszkópia segítségével

A fentebb leírt módon kezelt és jelölt SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtek középsíkjának megfelelően LSM880 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal konfokális felvételeket készítettünk. A dipólpotenciál meghatározásához az F66 fluorofórt 405 nm-en gerjesztettük, az emissziót pedig a festék normál N* és tautomer T* gerjesztett állapotainak megfelelően rendre 463-527 nm és 543-589 nm tartományokban detektáltuk. Ugyanezen sejteken szekvenciálisan az intracelluláris organellek azonosításához alkalmazott GFP-t 488 nm-en, az RFP-t 543 nm-en, a Deep Red fluorofórt pedig 633 nm-en gerjesztettük, míg az emissziót rendre a 495-550 nm-es, 570-640 nm-es, illetve 650-735 nm-es sávokban detektáltuk.

Az elkészült felvételek kvantitatív elemzéséhez a Matlab szoftvert használtuk. A plazmamembránnak megfelelő pixelek azonosításához, illetve egy, az intracelluláris régiót kijelölő maszk létrehozásához a munkacsoportunk által írt, kézi kijelölésű vízfeltöltéses algoritmust alkalmaztuk. Az organellek azonosításához az intracelluláris régió pixeleinek adott markerhez tartozó fluoreszcencia intenzitását vizsgáltuk. Úgynevezett „maximum entrópia” algoritmus segítségével, manuális ellenőrzést követően meghatároztunk egy határértéket, mely fölött az adott pixelt a vizsgált organellel tartozóként definiáltuk, majd minden pixelben a háttérintenzitások levonása után kiszámítottuk a dipólpotenciál nagyságával pozitív korrelációt mutató F66 T*/N* arányt és meghatároztuk az arány medián értékét minden egyes egyedi sejt esetén külön-külön a plazmamembránnak, illetve az adott organellel membránjának megfelelő pixelek adataiból. A különböző intracelluláris régiók közötti relatív különbségek elemzése céljából kiszámítottuk az adott organellel membránjában az F66 T*/N* emissziós arány mediánjának az ugyanazon sejt plazmamembránjában kapott medián arányra normált értékét.

IV/13. Statisztikai elemzés

A spektrofлуориметрия, illetve áramlási citometria során legalább öt (n) független kísérletből nyert adatokat elemeztünk. Az áramlási citométerrel végzett mérések során minden független kísérletben mintánként legalább 20 000 sejtet elemeztünk, míg a spektrofлуориметриás minták átlagosan 150 000 sejtet tartalmaztak. A szterol-M β CD komplexekkel végzett kísérletekben a kapott értékeket az ekvivalens mennyiségű natív M β CD-vel kezelt mintákra, míg zsírsavak esetében az etanolos kontrollokkal kapott értékekre normáltuk. A PY3174 generalizált polarizációjának konfokális mikroszkópos vizsgálatakor a különböző kezelések esetében öt független kísérletben készült n=20 egyedi kép átlagos generalizált polarizációs értékeit elemeztük. Minden kép 10-15 normál morfológiájú sejtre vonatkozó adatokat tartalmazott, kezelésként összesen 200-300 sejttel. A celluláris membránok dipólpotenciáljának vizsgálata során öt független kísérletből származó, n=107-154 normál morfológiájú egyedi sejt medián F66 T*/N* emissziós arányértékeit elemeztük.

A statisztikai elemzések során a p értékeket általában Tukey-féle HSD-próbával számítottuk, amennyiben előzetes ANOVA elemzés során a csoportok közötti hatásokra nézve szignifikáns különbségeket kaptunk. Az celluláris membránok dipólpotenciáljának vizsgálata során a plazmamembrán és az adott organelum F66 arányainak összehasonlításakor a p értékeket Welch-féle t-próbával számítottuk. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ -nek adódott. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism programban végeztük.

V. Eredmények és diszkusszió

V/1. A phloretin és a 6-ketokolesztanol dipólpotenciálra gyakorolt hatása

Az új, áramlási citometriás dipólpotenciál mérési eljárásunk kidolgozásához és validálásához referenciaként a szakirodalomban erre a célra leggyakrabban használt di-8-ANEPPS fluorofórt alkalmaztuk egy általánosan elterjedt spektrofluorimetriás eljárás, valamint a dipólpotenciál módosítására leggyakrabban alkalmazott vegyületek, a phloretin és a 6KC segítségével. A molekulák membránba történő beépülését Pluronic F-127, egy hidrofil, nem ionos detergens jelenlétében történő inkubációval segítettük elő. Méréseink során a korábbi irodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a 6KC dózisfüggően növelte az emissziós spektrum két szélső, alacsonyabb (410-440 nm) és magasabb (490-520 nm) hullámhosszúságú tartományaiban mért, integrált fluoreszcencia intenzitások arányát ($R_{exc, di-8-ANEPPS}$), azaz a dipólpotenciál értékét mindkét általunk vizsgált sejtvonalban, THP-1, illetve JY sejtekben egyaránt. A phloretin ezzel ellentétes hatást gyakorolt, azaz dózisfüggően csökkentette az excitációs arányt, azonban az itt tapasztalt eltérés – bár statisztikailag szignifikánsnak bizonyult – jelentősen kisebb volt a 6KC által okozott változásokhoz képest.

Az F66 fluorofór alkalmazhatóságát alátámasztandó THP-1 és JY sejteket a fentiekhez hasonlóan 6KC-val és phloretinnel kezeltünk különböző koncentrációkban, majd jelölést követően áramlási citométerrel meghatároztuk a fluorofór normál N^* és tautomer T^* gerjesztett állapotainak megfelelő tartományokban (rendre 470-490 nm és 564-606 nm) mért fluoreszcencia intenzitásainak arányát ($R_{em, F66 N^*/T^*}$), mely fordítottan arányos a dipólpotenciál nagyságával. Korábbi, di-8-ANEPPS-sel kapott eredményeinkkel összhangban azt találtuk, hogy a 6KC dózisfüggően, szignifikánsan csökkentette az $R_{em, F66 N^*/T^*}$ arányt mindkét vizsgált sejtvonal esetében, mely a dipólpotenciál növekedését jelzi. Bár a phloretin mindkét esetben növelte az $R_{em, F66 N^*/T^*}$ arányt, azaz csökkentette a dipólpotenciált, azonban a változás JY sejtvonal esetében nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

V/2. Különböző szterolszármazékok dipólpotenciálra gyakorolt hatása

A dipólpotenciál nagyságát alapvetően befolyásolja a sejtmembránban található szterolok, elsősorban a koleszterin mennyisége, így kézenfekvő volt módszerünk validálása különböző szterolok (7DHC, CHOL és 6KC) M β CD-vel alkotott komplexeivel történő kezelések segítségével. Korábbi, elsősorban modellmembránok tanulmányozása során nyert adatok alapján mindhárom szterol képes növelni a dipólpotenciál nagyságát. Spektrofluorimetriás méréseink ezen irodalmi adatokkal összhangban azt mutatták, hogy mindhárom szterol

dózisfüggő módon növelte az $R_{\text{exc, di-8-ANEPPS}}$ értékét, azaz a dipólpotenciál nagyságát. A leghatékonyabb származéknak a 6KC bizonyult, ezt követte a CHOL, majd a 7DHC mindkét vizsgált sejtvonal esetében, azaz a THP-1 és JY sejtekben azonos eredményeket kaptunk.

A kezeléseket megismételve F66-tal történő jelölést követően áramlási citométerrel is elvégeztük méréseinket. Mindkét sejtvonal esetében – a di-8-ANEPPS-sel kapott eredményeinkkel teljes összhangban – valamennyi szterolszármazék dózisfüggően növelte a dipólpotenciál nagyságát, mely az $R_{\text{em, F66 N}^*/\text{T}^*}$ arány csökkenéséből látható és a szterolok hatékonyságbeli sorrendje is azonosnak adódott.

V/3. Különböző zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatása

THP-1 és JY sejtekben a többszörösen telítetlen ω -3 ALA, az ω -6 GLA és telített analógjuk, az SA hatására bekövetkező változásokat tanulmányoztuk. A sejteket az adott zsírsavat különböző koncentrációban tartalmazó médiumban inkubáltuk 48 órán keresztül, majd meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságát mind a referenciaként alkalmazott spektrofluorimetriás, mind az új áramlási citometriás eljárással.

Azt találtuk, hogy az ALA kezelés dózisfüggően csökkentette a dipólpotenciál nagyságát – mely az $R_{\text{exc, di-8-ANEPPS}}$ csökkenéséből látható – mind a THP-1, mind a JY sejtvonalak esetében. Az SA esetében ezzel ellentétes módon kissé emelkedett $R_{\text{exc, di-8-ANEPPS}}$ értékeket találtunk, mely a dipólpotenciál növekedésére utalhat, azonban az általunk leírt változások nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak egyik sejtvonal esetében sem. Várakozásainkkal ellentétben a GLA hatására az $R_{\text{exc, di-8-ANEPPS}}$, azaz a dipólpotenciál szignifikánsan emelkedett mind THP-1, mind pedig JY sejtekben.

A fentebb tárgyalt zsírsavakkal történő kezelések hatását megvizsgáltuk az újonnan kidolgozott áramlási citometriás módszerünk segítségével is. A referenciamódszerrel egybevágó eredményeket kaptunk mindkét vizsgált sejtvonal esetében. Mind THP-1, mind pedig JY sejtekben ugyanis az ALA dózisfüggően, szignifikánsan növelte $R_{\text{em, F66 N}^*/\text{T}^*}$ arányt – azaz csökkentette a dipólpotenciál nagyságát –, míg a GLA és SA ezzel ellentétes hatást fejtett ki.

V/4. Szterolok és zsírsavak sejtek életképességére, valamint a sejtmembrán fluiditására és hidrációjára gyakorolt hatásai

Azt a lehetőséget kizárandó, hogy az F66 N^*/T^* emissziós arányában általunk megfigyelt eltérések esetlegesen a sejtek károsodásának tulajdoníthatók, teszteltük a fenti kezelések életképességre gyakorolt hatását Sytox Green nekrozis és Alexa Fluor 647-tel konjugált annexin V apoptózis markerek segítségével. Áramlási citométerrel nyert eredményeink alapján

a sejtmembrán összetételét módosító, általunk alkalmazott kezelések a legnagyobb koncentrációkban sem befolyásolták a kettős negatív, azaz élőnek tekinthető populáció arányát, vagyis a sejtek életképességét THP-1 és JY sejtekben sem.

Vizsgáltuk azt is, hogy az F66 N*/T* emissziós arány változásai háttérében állhatnak-e a membránok fluiditásának a kezelések által kiváltott eltérései. Ennek tanulmányozására a kontroll és kezelt THP-1 és JY sejteket TMA-DPH-val jelöltük és spektrofluoriméter segítségével meghatároztuk a festék fluoreszcencia anizotrópiáját, mely fordítottan arányos a membránok fluiditásának mértékével. Mindkét sejtvonal esetében azt tapasztaltuk, hogy az általunk alkalmazott maximális dózisban a CHOL és 7DHC szignifikánsan emelte az anizotrópia mértékét, azaz csökkentette a fluiditást, míg a 6KC esetében tapasztalt változás nem mutatkozott szignifikánsnak. A változások egymáshoz viszonyított mértéke tehát jelentősen különbözött a vegyületek dipólpotenciálra gyakorolt hatásainak vizsgálata esetén megfigyeltekhez képest. A zsírsavak közül az ALA szignifikánsan csökkentette az anizotrópiát, míg sem az SA, sem a GLA nem változtatta azt szignifikáns mértékben.

Vizsgáltuk a kezelések membránhidrációra gyakorolt hatását is. Ehhez a sejteket PY3174 fluorofórral jelöltük, mely irodalmi adatok alapján a lokális hidrofobicitás mértékére érzékeny próba és kedvező spektrális tulajdonságai révén megbízható módon alkalmas konvencionális mikroszkóppal történő mérésekre. Konfokális mikroszkópia és kvantitatív képanalízis segítségével számszerűsítettük a festék generalizált polarizációját, amely arányos a lokális mikrokörnyezet hidrofobicitásával, azaz negatív korrelációt mutat a hidráció mértékével. A mérések során mindkét vizsgált sejtvonal esetében egybevágó eredményeket kaptunk, a szerolszármazékok ugyanis növelték a generalizált polarizáció mértékét: leginkább a 6KC, annál kisebb mértékben a CHOL és legkevésbé a 7DHC. A zsírsavak közül az SA kismértékű, pozitív irányú eltérést okozott, míg mind a GLA, mind az ALA ezzel ellentétes hatást mutatott, azaz növelték a membránok hidrációját. Valamennyi fent leírt eltérés statisztikailag szignifikánsnak mutatkozott, kivéve a JY sejtekben a 7DHC és SA kezelések által okozott hatások nagyságát.

V/5. A sejtmembrán összetételét megváltoztató kezelések által a vizsgált fluorofórok spektrális paramétereiben okozott változások közötti korreláció mértéke

Újronnan leírt áramlási citometriás eljárásunknak a dipólpotenciál mérésére való alkalmazhatóságát alátámasztandó, a különböző kezeléseket követően az F66 N*/T* emissziós arányának tanulmányozása során kapott eredményeinket összevetettük a referenciaként alkalmazott spektrofluorimetriás eljárással és di-8-ANEPPS fluorofór gerjesztési arányának

vizsgálatával kapott adatainkkal. A lineáris regressziós analízissel kapott R^2 és p értékek igen erős, pozitív, statisztikailag szignifikáns korrelációt mutattak módszereink között mindkét vizsgált sejtvonal esetében, mely igazolta az újonnan kidolgozott eljárásunk alkalmazhatóságát a dipólpotenciál nagyságának meghatározására.

Fenti eredményeinket alátámasztja az F66 N^*/T^* emissziós arány és a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia kapcsolatának vizsgálata, ugyanis e kettő között nem találtunk érdemi korrelációt, amely egyértelműen cáfolja a membránfluiditásban bekövetkező változások jelentős szerepét az F66 emissziós spektrumának a sejtmembrán összetételét megváltoztató kezelések által kiváltott eltéréseiben.

A dipólpotenciál és a membránhidráció kapcsolatát vizsgálva ugyanakkor az F66 N^*/T^* emissziós arány és a PY3174 generalizált polarizációja között erőteljes és statisztikailag szignifikáns pozitív korreláció adódott, mely alátámasztja a két membránbiofizikai jellemző korábbi tanulmányok által is felvetett szoros összefüggését.

V/6. Zsírsavakkal történő előkezelés hatása a dipólpotenciál koleszterin által kiváltott növekedésére

Megvizsgáltuk a koleszterin és a zsírsavak kombinált hatását a dipólpotenciál nagyságára az általunk leírt áramlási citometriás eljárással. A sejteket előkezelésként ALA-val, GLA-val, illetve SA-val dúsított médiumban inkubáltuk 48 órán keresztül, majd CHOL-lal kezeltük.

Eredményeink alapján az ALA-val történő előkezelés mindkét vizsgált sejttípus esetében szignifikánsan mérsékelte a koleszterin dipólpotenciált növelő hatását, míg mind az SA, mind a GLA fokozta a CHOL kezelés dipólpotenciált emelő hatását – bár ezen esetekben a változások nem minden esetben érték el a statisztikailag szignifikáns különbség mértékét.

V/7. A zsírsavak hatása a penetratin celluláris felvételére és endolizoszomális kiszabadulására

A sejtpenetráló peptidek (CPP-k) ígéretes terápiás lehetőséget jelentenek a sejtek számára egyébként impermeábilis molekulák citoszolba és intracelluláris kompartmentumokba történő bejuttatására. A CPP-k bejutásának mechanizmusaiiban, vagyis a plazmamembránon át történő közvetlen transzlokációban, valamint az endocitózisban és az azt követő endolizoszomális felszabadulásban is szerepet játszanak a membránnal történő elektrosztatikus kölcsönhatások, következésképpen mindkét útvonal hatékonyságát befolyásolhatja a dipólpotenciál, illetve az abban bekövetkező változás. Ezzel összhangban megvizsgáltuk az ALA, GLA és SA hatását a

penetratin, egy kationos CPP felvételének és endolizoszomális rendszerből történő felszabadulásának hatékonyságára.

Áramlási citométeres mérések során azt találtuk, hogy a vizsgált zsírsavak egyike sem befolyásolta szignifikáns mértékben az AFDye532-konjugált penetratin normált fluoreszcencia intenzitását, azaz a sejtek teljes penetratin felvételét, a kontroll sejtekkel összehasonlítva. Ezzel szemben az ω -3 többszörösen telítetlen ALA és a dipólpotenciál általa kiváltott csökkenése következtében jelentősen növekedett a pH-érzékeny NF-konjugált penetratin fluoreszcencia intenzitása a sejtekben, vagyis a penetratin citoplazmába való bejutásának mértéke, míg a teljesen telített SA és az ω -6 többszörösen telítetlen GLA, amelyek inkább emelik a dipólpotenciált, nem változtatták érdemben azt. Ezekkel párhuzamosan az NF/AFDye532 hányados értékét, azaz a penetratin endolizoszomális kiszabadulását jelentősen, szignifikáns mértékben növelte az ALA, míg az SA és GLA ebben a paraméterben sem mutatott szignifikáns hatást. Ezen eredményeink megerősítik, hogy a dipólpotenciál nagysága befolyásolja a CPP-k felvételének hatékonyságát elsősorban az endolizoszomális kiszabadulás fokozása révén és hangsúlyozzák az ω -3 többszörösen telítetlen zsírsavak dipólpotenciált csökkentő hatását, illetve annak sejtélettani jelentőségét.

V/8. A dipólpotenciál heterogenitása az intracelluláris membránrendszerekben

Az élő sejtek membránrendszereinek lipidösszetételének nagyfokú heterogenitásából várhatóan következik, hogy azok dipólpotenciálja is eltér egymástól. Ennek alátámasztására első lépésben a fentebbi kísérletekben a dipólpotenciál meghatározására megbízhatóan alkalmazható F66 fluorofór és kettős jelölési protokoll segítségével vizsgáltuk SKBR-3 sejtek celluláris membránjait konfokális lézerpásztázó mikroszkópia és kvantitatív képelemzés során.

Eredményeink alapján az F66 T*/N* emissziós arány, vagyis a dipólpotenciál nagysága nagy variabilitást mutatott a celluláris membránokban: a plazmamembránban, valamint a sejt perifériás régiókban elhelyezkedő membránokban ugyanis jelentősen nagyobbak adódott a belsőbb membránokéhoz képest. A dipólpotenciál értékeinek eloszlását vizsgálva továbbá a plazmamembránhoz képest az intracelluláris membránokban jóval nagyobb heterogenitás mutatkozott, utalva a különféle organellek kettősrétegei között megfigyelhető érdemi különbségekre.

V/9. A dipólpotenciál nagysága a lizoszómák membránjában

Az intracelluláris organellek közötti specifikus eltérések tanulmányozása során kísérleteink első részében a lizoszomális membránok dipólpotenciálját határoztuk meg a

plazmamembránhoz viszonyítva. F66-tal történő kettős jelöléssel párhuzamosan a sejteket LysoTracker™ Deep Red jelenlétében inkubáltuk a lizoszómák vizualizációja céljából. A konfokális felvételek elemzése során lizoszomális membránnak azon pixeleket tekintettük, melyek az intracelluláris maszk által kijelölt régióba estek és egy általunk meghatározott fluoreszcencia intenzitás-határértéket meghaladtak az organellum marker képen, majd kiszámítottuk a dipólpotenciál nagyságával pozitív korrelációt mutató F66 T*/N* emissziós arány medián értékét külön-külön a plazmamembránnak, illetve a lizoszomális membránoknak megfelelő pixelekből ugyanazon sejtben. SKBR-3 humán emlőtumor sejtekben azt tapasztaltuk, hogy a lizoszómák esetében számított F66 T*/N* arány szignifikáns mértékben alacsonyabb volt a plazmamembránhoz képest, mely alacsonyabb dipólpotenciálra utal az előbbieket esetén. Bár logikusnak tűnik, hogy a plazma- és a lizoszomális membránok közötti különbség bármely típusú sejt általános tulajdonsága lehet, két egymástól lényegesen eltérő sejtvonalban is elvégeztünk hasonló méréseket, hogy alátámasszuk ezt a feltételezést. Teljesen hasonló eredményeket kaptunk mind HeLa humán cervixkarcinóma, mind pedig SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtekben is.

V/10. A dipólpotenciál nagysága a Golgi-membránrendszerben

Az intracelluláris membránrendszerek vizsgálatát a Golgi-készülék membránjaival folytattuk. Ehhez a sejteket F66-tal történő kettős jelölés mellett CellLight™ Golgi-RFP, BacMam 2.0 markerrel transzdukáltuk. A sejtek középsíkjának megfelelően konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk az F66 fluorofór N* és T* állapotainak megfelelő emissziós tartományokban, illetve a Golgi-membránt jelölő RFP tag-nek megfelelő beállításokkal. A plazma- és Golgi-membránnak megfelelő régiókat a lizoszómák vizsgálatánál ismertetett módon azonosítottuk. Méréseinket ugyanazon a három sejtvonalon (SKBR-3, HeLa, SH-SY5Y) végeztük, mint a lizoszómák vizsgálata esetén és mindhárom esetben azt tapasztaltuk, hogy a Golgi-membránokban a dipólpotenciál lényegesen alacsonyabb, mint a plazmamembránban.

V/11. A dipólpotenciál nagysága az endoplazmás retikulum membránjában

Következő lépésben a szintén a szekréciós útvonalhoz tartozó endoplazmás retikulum membránjának vizsgálatával folytattuk kísérleteinket. F66-tal történő kettős jelölés mellett a sejteket CellLight™ ER-GFP, BacMam 2.0 markerrel transzdukáltuk. Konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével a Golgi-membránok vizsgálatához hasonlóan felvételeket készítettünk a sejtek középsíkjában az F66 fluorofór N* és T* állapotainak

megfelelő emissziós tartományokban, illetve az endoplazmás retikulum membránját jelölő GFP tag-nek megfelelő beállítások mellett. A plazmamembránnak és az endoplazmás retikulum membránjának megfelelő régiókat szintén a korábban ismertetett módon jelöltük ki. Méréseink során azt találtuk, hogy az endoplazmás retikulum membránjának esetében számított F66 T*/N* arány szignifikánsan kisebb volt a plazmamembránhoz képest, mely alacsonyabb dipólpotenciálra utalt mindhárom sejtvonalban, azaz SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtekben is.

V/12. A dipólpotenciál nagysága a mitokondriális membránokban

Kísérletsorozatunk utolsó lépéseként vizsgálat alá vettük a mitokondriális membránokat is. Az F66-tal történő kettős jelölés mellett a lizoszómáknál leírtakhoz hasonló módon a sejteket MitoTracker™ Deep Red-del inkubáltuk és konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtek középsíkjában az F66 N* és T* állapotainak, illetve a mitokondriális membránt jelölő Deep Red fluorofórnak megfelelő beállításokkal. A plazma- és mitokondriális membránoknak megfelelő régiókat a felvételeken a fentebb leírt módon azonosítottuk. A korábbi megfigyeléseinkhez hasonlóan ezen méréseink során is azt találtuk, hogy a plazmamembránhoz képest alacsonyabb dipólpotenciált tükrözve az F66 T*/N* arány szignifikánsan kisebb volt minden vizsgált sejtvonal esetén a mitokondriumok membránjaiban, így SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtekben is.

V/13. Az intracelluláris organellek membránjaiban mérhető dipólpotenciál nagyságának összehasonlítása

Az egyes, fentebb vizsgált organellek membránjaiban mért dipólpotenciál nagyságának összehasonlításához az organellek membránjai esetén számított medián F66 T*/N* arányokat normáltuk az adott sejt plazmamembránjából számított medián értékekre minden egyes sejt esetén. Ezzel a lépéssel az egyes mérések, illetve sejtek közti különbségeket küszöböltük ki és meghatározhatóvá váltak az egyes kompartmentumok közötti relatív különbségek. A mért eredményeket ezzel a módszerrel elemezve azt találtuk, hogy a dipólpotenciál nagysága a plazmamembrántól az endoplazmás retikulum membránjáig a szekréciós/endocitotikus útvonal mentén befelé csökkenő gradienst mutatott.

A legmagasabb F66 T*/N* emissziós arányt, azaz dipólpotenciált, a plazmamembránban találtuk, mely a lizoszómák > Golgi > endoplazmás retikulum útvonalon csökkent minden vizsgált sejttípusban. Az egyes organellek közti különbségek mindhárom sejtvonalban szignifikánsnak adódtak egy kivételtől, a HeLa sejtek esetében az endoplazmás retikulum és a Golgi membránjai közti eltéréstől eltekintve. A mitokondriális membránokban mért F66 T*/N*

arány nagysága SKBR-3 és HeLa sejtek esetében a lizoszómák membránjaihoz hasonlóan adódott, míg SH-SY5Y sejtek esetében azoktól szignifikáns mértékben magasabb volt.

V/14. Az F66 T*/N* emissziós arány pH-függése

Az F66 működési elvére (gerjesztett állapotú intramolekuláris proton transzfer reakció) tekintettel felmerült, hogy a fluorofór T*/N* emissziós arányában fentebb leírt különbségek – különösen a savas kémhatású lizoszómák esetében – a fluorofór pH-érzékenységének tudhatók be. Ennek tesztelésére SKBR-3 sejteket különböző pH-jú kalibrációs pufferekkel kezeltünk valinomicin és nigericin jelenlétében, ezen vegyületekkel biztosítva, hogy az extracellulárisan alkalmazott kalibrációs oldatok és az intracelluláris tér között megtörténjen a pH kiegyenlítődése. A sejteket ezzel párhuzamosan F66-tal jelöltük, majd konfokális mikroszkóppal felvételt készítettünk a sejtek középsíkjában a fluorofór tautomer T* és normál N* gerjesztett állapotainak megfelelő beállításokkal. Kvantitatív képelemzés során a korábban ismertetett módon azonosítottuk a membránpixelet, majd kiszámítottuk a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló F66 T*/N* emissziós arányt, mely az általunk vizsgált, 7,5 és 5,5 közötti pH tartományban nem mutatott szignifikáns eltéréseket.

VI. Új megállapítások, új eredmények

1. A munkánk során kidolgozott, F66 fluorofóron alapuló áramlási citometriás módszer alkalmazhatónak bizonyult a dipólpotenciál megbízható, jól reprodukálható meghatározására több, különböző sejtvonal és dipólpotenciált, membránösszetételt módosító kezelés esetében is a referenciamódszerrel történő összehasonlítás alapján.
2. A kísérleteink során vizsgált szterolszármazékok, azaz a koleszterin, 6-ketokolesztanol és 7-dehideokoleszterin esetében igazoltuk azok dipólpotenciált növelő hatását élő sejtek esetében is és feltártuk a szterolok hatékonysága közötti relatív különbségeket is.
3. Különböző zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatásának vizsgálatakor azt találtuk, hogy a telített sztearinsav és a többszörösen telítetlen ω -6 γ -linolénsav növelte, míg az ω -3 α -linolénsav csökkentette azt. Utóbbi vegyület képes volt kombinált kezelések során a koleszterin hatását is ellensúlyozni. Fentiek alapján az ω -3 α -linolénsav ígéretes, fiziológias alternatívát jelenthet a dipólpotenciál kísérletes csökkentésére.
4. Az ω -3 α -linolénsav, illetve az általa előidézett dipólpotenciál-csökkenés fokozta egy sejtpenetráló peptid, a penetratin celluláris felvételét, elsősorban annak endolizoszomális felszabadulását, hangsúlyozva a dipólpotenciál-csökkentés biológiai relevanciáját.
5. Munkánk során sikerrel adaptáltunk egy, az F66 fluorofóron alapuló kettős jelölési protokollt, melynek segítségével konfokális mikroszkópos képalkotással kimutattuk, hogy az intracelluláris membránrendszerek dipólpotenciálja nagyfokú heterogenitást mutat.
6. Az intracelluláris membránrendszerek egyes alkotóinak dipólpotenciálját F66 és specifikus organelum-markerek segítségével meghatároztuk és összehasonlítottuk a plazmamembránéval – valamennyi vizsgált sejttalkotó, így a lizoszóma, Golgi-készülék, endoplazmás retikulum és mitokondriumok membránjainak dipólpotenciálja alacsonyabbnak adódott a plazmamembránéhoz képest, melyet élő sejtekben eddig nem igazoltak.
7. Konfokális mikroszkópos eljárásunk komparatív analízist is lehetővé tett, így az egyes sejttalkotók dipólpotenciáljának nagyságát össze tudtuk hasonlítani. Eredményeink alapján a dipólpotenciál a szekréciós/endocitotikus útvonalon „befelé” haladva csökken a lizoszóma > Golgi-készülék > endoplazmás retikulum sorrendben. A mitokondriális membránokban mérhető dipólpotenciál nagysága a lizoszómákéhoz adódott hasonlóan. Fenti eredményeink több, egymástól nagyban különböző humán sejtvonal esetében is egybevágtak, így általános szabályszerűséget sejtetnek.

VII. Összefoglalás

A sejtmembránt alkotó foszfolipidek, szterolok és az ahhoz asszociált határfelületi vízmolekulák molekuláris dipólusainak rendezett orientációjából eredő dipólpotenciál megismerését nagymértékben hátráltatja az élő, egyedi sejtek vizsgálatára alkalmas mérési módszerek, valamint a nagyságának kísérletes csökkentésére használható, fiziológiásan is előforduló vegyületek hiánya. Ezért a disszertáció első felében bemutatott munkánk során kidolgoztunk és optimalizáltunk egy, a dipólpotenciálra szenzitív F66 fluorofór emissziós spektrumában bekövetkező eltolódás vizsgálatán alapuló, nagy áteresztőképességű áramlási citometriás eljárást, mellyel nagyszámú, egyedi, élő sejtről nyerhetünk kvantitatív információt a dipólpotenciál nagyságáról. Módszerünk alkalmazhatóságát több, különböző sejtvonal és kezelés segítségével, illetve a dipólpotenciál tanulmányozására leggyakrabban használt és leginkább elfogadott módszerrel történő összehasonlítással támasztottuk alá. Vizsgálataink során emellett élő sejtekben igazoltuk különböző szterolszármazékok, így a 6KC, 7DHC és koleszterin dipólpotenciált növelő hatását. Ezen kívül módszerünkkel különböző telített és többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelések hatását vizsgálva kimutattuk, hogy az α -linolénsav, egy ω -3 többszörösen telítetlen zsírsav, mely a humán sejtek membránjában élettani körülmények között is megtalálható, képes volt csökkenteni a dipólpotenciál nagyságát, míg a telített sztearinsav és – érdekes módon – az ω -6 többszörösen telítetlen γ -linolénsav is ezzel ellentétes hatást fejtett ki. Az α -linolénsav ezen kedvező hatása megfigyelhető volt koleszterin jelenlétében is, ellensúlyozva utóbbi hatását. A kezelések által a dipólpotenciálban kiváltott változások biológiai relevanciáját egy sejtpenetráló peptid, a penetratin felvételére, különösen endolizoszomális felszabadulására gyakorolt hatásával bizonyítottuk.

Az F66 kedvező spektrális tulajdonságainak köszönhetően kitűnően alkalmazható együtt más fluorofórokkal – így fluoreszcens intracelluláris organelum-markerekkel is. Ezek alapján a disszertáció második felében ismertetett munkánk során optimalizáltunk egy konfokális mikroszkópián és kvantitatív képanalízisen, illetve az F66 fluorofór emissziós aránymérésén alapuló módszert, mellyel élő, egyedi sejtekben komparatív módon tanulmányozható a plazmamembrán, illetve a különböző sejt szervecskék membránjainak dipólpotenciálja. Új technikánk segítségével több, egymástól jelentősen különböző humán sejtvonalban is kimutattuk, hogy a dipólpotenciál nagysága a plazmamembránban a legnagyobb, míg az intracelluláris membránrendszerekben a szekréciós/endocitotikus útvonalon „befelé” haladva csökken a lizoszóma > Golgi-készülék > endoplazmás retikulum sorrendben. A mitokondriális membránokban mérhető dipólpotenciál nagysága némileg váratlanul a lizoszómákéhoz adódott hasonlóan. Módszerünk hasznos eszköz lehet azon organelumok azonosítására, amelyekben

a megváltozott lipidszintekkel járó betegségek során patofiziológiai szempontból jelentős membránbiofizikai változások következnek be.

VIII. Publikációk



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/252/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Máté

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, M.**, Cs. Szabó, B., Kurtán, K., Varga, Z., Panyi, G., Nagy, P., Zákány, F., Kovács, T.: Look Beyond Plasma Membrane Biophysics: revealing Considerable Variability of the Dipole Potential Between Plasma and Organelle Membranes of Living Cells.
Int. J. Mol. Sci. 26 (3), 1-20, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26030889>
IF: 4.9 (2024)
2. Zákány, F., **Szabó, M.**, Batta, G., Kárpáti, L., Mándity, I. M., Fülöp, P., Varga, Z., Panyi, G., Nagy, P., Kovács, T.: An [omega]-3, but Not an [omega]-6 Polyunsaturated Fatty Acid Decreases Membrane Dipole Potential and Stimulates Endo-Lysosomal Escape of Penetratin.
Front. Cell. Dev. Biol. 9, 1-17, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.647300>
IF: 6.081

További közlemények

3. Cs. Szabó, B., **Szabó, M.**, Nagy, P., Varga, Z., Panyi, G., Kovács, T., Zákány, F.: Novel insights into the modulation of the voltage-gated potassium channel KV1.3 activation gating by membrane ceramides.
J. Lipid Res. 65 (8), 1-17, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlr.2024.100596>
IF: 4.1

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,081

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,981

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.05.04.

