

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**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**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Rövidítések jegyzéke                                                                                                      | 4  |
| 1. Bevezetés                                                                                                              | 6  |
| 2. Irodalmi áttekintés                                                                                                    | 8  |
| 2.1. A transzmembrán szemlélettől az intramembrán régiókig                                                                | 8  |
| 2.2. A dipólpotenciál nagyságát meghatározó tényezők és kísérletes növelésének lehetőségei                                | 10 |
| 2.3. A dipólpotenciál kísérletes csökkentésének lehetőségei                                                               | 13 |
| 2.4. A dipólpotenciál meghatározása élő sejtek esetében                                                                   | 14 |
| 2.5. A különböző celluláris membránok eltérő összetétele és dipólpotenciálja                                              | 18 |
| 2.6. A dipólpotenciál biológiai relevanciája és a sejtpenetráló peptidek                                                  | 19 |
| 3. Célkitűzések                                                                                                           | 23 |
| 4. Anyagok és módszerek                                                                                                   | 25 |
| 4.1. Alkalmazott sejtvonalak, tenyésztésük                                                                                | 25 |
| 4.2. Alkalmazott vegyületek és reagensek                                                                                  | 25 |
| 4.3. A sejtmembrán összetételének és dipólpotenciáljának módosítása                                                       | 26 |
| 4.4. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása di-8-ANEPPS és spektrofлуориметрия segítségével                      | 27 |
| 4.5. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása F66 és áramlási citometria segítségével                              | 27 |
| 4.6. A sejtek életképességének meghatározása                                                                              | 28 |
| 4.7. A sejtmembrán fluiditásának meghatározása TMA-DPH és spektrofлуориметрия segítségével                                | 28 |
| 4.8. A sejtmembrán hidrációjának meghatározása PY3174 és konfokális mikroszkópia segítségével                             | 29 |
| 4.9. A penetratin szintézise és jelölése fluorofórokkal                                                                   | 29 |
| 4.10. A penetratinok felvételének és endolizoszomális felszabadulásának vizsgálata áramlási citométerrel                  | 30 |
| 4.11. A sejtek jelölése intracelluláris organelum markerekkel és a dipólpotenciálra szenzitív F66 fluorofórral            | 31 |
| 4.12. A celluláris membránok dipólpotenciáljának meghatározása F66 és konfokális mikroszkópia segítségével                | 32 |
| 4.13. Statisztikai elemzés                                                                                                | 33 |
| 5. Eredmények                                                                                                             | 35 |
| 5.1. A phloretin és a 6-ketokolesztanol dipólpotenciálra gyakorolt hatása                                                 | 35 |
| 5.2. Különböző szterolszármazékok dipólpotenciálra gyakorolt hatása                                                       | 37 |
| 5.3. Különböző zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatása                                                                | 38 |
| 5.4. Szterolok és zsírsavak sejtek életképességére, valamint a sejtmembrán fluiditására és hidrációjára gyakorolt hatásai | 40 |

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5. A sejtmembrán összetételét megváltoztató kezelések által a vizsgált fluorofórok spektrális paramétereiben okozott változások közötti korreláció mértéke | 43 |
| 5.6. Zsírsavakkal történő előkezelés hatása a dipólpotenciál koleszterin által kiváltott növekedésére                                                        | 44 |
| 5.7. Zsírsavak hatása a penetratin celluláris felvételére és endolizoszomális felszabadulására                                                               | 45 |
| 5.8. A dipólpotenciál heterogenitása az intracelluláris membránrendszerekben                                                                                 | 49 |
| 5.9. A dipólpotenciál nagysága a lizoszómák membránjában                                                                                                     | 50 |
| 5.10. A dipólpotenciál nagysága a Golgi-membránrendszerben                                                                                                   | 53 |
| 5.11. A dipólpotenciál nagysága az endoplazmás retikulum membránjában                                                                                        | 55 |
| 5.12. A dipólpotenciál nagysága a mitokondriális membránban                                                                                                  | 57 |
| 5.13. Az intracelluláris organellumok membránjaiban mérhető dipólpotenciál nagyságának összehasonlítása                                                      | 59 |
| 5.14. Az F66 T*/N* emissziós arány pH-függése                                                                                                                | 61 |
| 6. Megbeszélés                                                                                                                                               | 63 |
| 6.1. A biológiai membránok biofizikai jellemzői és a leggyakrabban használt, környezeti paraméterekre érzékeny fluorofórok                                   | 63 |
| 6.2. A membránbiofizikai tulajdonságok vizsgálata élő sejtekben                                                                                              | 64 |
| 6.3. A dipólpotenciál vizsgálata egy új, az F66 fluorofór és áramlási citometria alkalmazásán alapuló módszerrel                                             | 65 |
| 6.4. A szterolok és zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatásai és azok relevanciája                                                                        | 67 |
| 6.5. A zsírsavak hatása a penetratin celluláris felvételére és endolizoszomális kiszabadulására                                                              | 70 |
| 6.6. Az intracelluláris organellumok membránjainak lipidösszetétele és strukturális szerveződése                                                             | 71 |
| 6.7. Az intracelluláris organellumok membránjainak vizsgálata környezeti paraméterekre szenzitív fluorofórokkal                                              | 72 |
| 6.8. Az intracelluláris organellumok membránjainak rendezettségében megfigyelt különbségek jelentősége és a módszer biológiai relevanciája                   | 75 |
| 7. Összefoglalás                                                                                                                                             | 78 |
| 8. Summary                                                                                                                                                   | 79 |
| 9. Irodalomjegyzék                                                                                                                                           | 80 |
| 10. Tárgyszavak                                                                                                                                              | 93 |
| 11. Köszönetnyilvánítás                                                                                                                                      | 94 |
| 12. Függelék                                                                                                                                                 | 95 |

## Rövidítések jegyzéke

|                   |                                                                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3-HF:             | 3-hidroxiflavon                                                                                               |
| 6KC:              | 6-ketokolesztanol (3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -kolesztan-6-on)                                             |
| 7DHC:             | 7-dehidrokoleszterin (5,7-kolesztadien-3 $\beta$ -ol)                                                         |
| ABC transzporter: | ATP-kötő kazettát tartalmazó transzporter                                                                     |
| ALA:              | $\alpha$ -linolénsav                                                                                          |
| ANOVA:            | „Analysis of variance”, varianciaanalízis                                                                     |
| $\beta$ CD:       | hét $\alpha$ -1,4-D-glükopiranoz egységből felépülő ciklodextrin                                              |
| CD:               | ciklodextrin                                                                                                  |
| CHOL:             | koleszterin                                                                                                   |
| CPP:              | „cell-penetrating peptide”, sejtpenetráló peptid                                                              |
| di-4-ANEPPS:      | 4-(2-[6-(dibutilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só                             |
| di-8-ANEPPS:      | 4-(2-[6-(dioktilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só                             |
| DMEM:             | Dulbecco's Modified Eagle Medium sejtenyésztő médium                                                          |
| ESIPT:            | „Excited State Intramolecular Proton Transfer”, gerjesztett állapotú intramolekuláris protontranszfer         |
| F66:              | N-[3-(40-dihexilamino-3-hidroxi-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só     |
| FCS:              | fetális borjúsérum                                                                                            |
| FSC:              | forward scatter”, mintán áthaladó, előre szórt fény                                                           |
| GFP:              | zöld fluoreszcens fehérje                                                                                     |
| GLA:              | $\gamma$ -linolénsav                                                                                          |
| GP:               | generalizált polarizáció                                                                                      |
| HEK-293T:         | adenovírussal immortalizált és az SV40T-antigént kódoló génnel transzfektált humán embrionális vese sejtvonal |
| HeLa:             | humán cervix adenokarcinóma eredetű sejtvonal                                                                 |
| hERG:             | humán „Ether-à-go-go-Related Gene” feszültségkapuzott káliumcsatorna                                          |
| JY:               | Ebstein-Barr-Vírussal transzformált humán limfoblasztoid sejtvonal                                            |
| K <sub>v</sub> :  | feszültségkapuzott káliumcsatorna                                                                             |

|                                 |                                                                                                                     |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Laurdan:                        | 6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin                                                                               |
| M $\beta$ CD:                   | metil- $\beta$ -ciklodextrin                                                                                        |
| N*:                             | normál gerjesztett állapot                                                                                          |
| PBS:                            | foszfát puffer oldat                                                                                                |
| Pgp:                            | P-glikoprotein                                                                                                      |
| PUFA:                           | „polyunsaturated fatty acid”, többszörösen telítetlen zsírsav                                                       |
| PY3174:                         | 4-[2-(6-dibutilamino-5-fluoro-naftalen-2-il)-vinil]-1-(3-trietilammonio-propil)-piridinium dibromid                 |
| r:                              | fluoreszcencia anizotrópia                                                                                          |
| R <sub>em, F66 N*/T*</sub> :    | az F66 normál és tautomer formájának megfelelő hullámhossz-tartományokban mért fluoreszcencia intenzitásainak arány |
| R <sub>exc, di-8-ANEPPS</sub> : | a di-8-ANEPPS két különböző hullámhosszúságú gerjesztést követően mért fluoreszcencia intenzitások aránya           |
| RFP:                            | vörös fluoreszcens fehérje                                                                                          |
| RPMI 1640 médium:               | Roswell Park Memorial Institute 1640 sejttenyésztő médium                                                           |
| SA:                             | sztearinsav                                                                                                         |
| SH-SY5Y:                        | humán neuroblasztóma eredetű sejtvonalakat                                                                          |
| SKBR-3:                         | humán emlő adenokarcinóma eredetű sejtvonal                                                                         |
| SSC:                            | side scatter” mintán megtört, oldalirányú fényszórás                                                                |
| T*:                             | tautomer gerjesztett állapot                                                                                        |
| THP-1:                          | humán monocitoid leukémia eredetű sejtvonal                                                                         |
| TMA-DPH:                        | 4'-(trimetilammonio)-difenilhexatrién                                                                               |

## 1.Bevezetés

Az utóbbi években általánosan elfogadottá vált nézet a biológiai membránokra már nem csupán „télrelválasztó”, passzív határoló elemekként tekint, hanem elismeri, sőt, fókuszba helyezi a membránt alkotó lipidek transzmembrán fehérjék szerkezetére, funkciójára gyakorolt aktív hatását. A krio-elektronmikroszkópia, nagyfelbontású röntgenkristallográfia és molekuláris dinamikai szimulációs módszerek fejlődésének köszönhetően elsősorban a közvetlen lipid-fehérje kölcsönhatások szerepe került előtérbe, míg a holisztikusabb, a membránok biofizikai tulajdonságainak megváltozása által mediált, indirekt mechanizmusok fontosságát is hangsúlyozó szemléletmód ugyanakkor jellemzően háttérbe szorult. Számos tanulmány alátámasztja azonban utóbbiak szerepét különböző ioncsatornák, elsődlegesen aktív pumpák és ATP-kötő kazetta (ABC) transzporterek, egyéb transzporterek, G-fehérje kapcsolt receptorok, receptor-tirozinkinázok, valamint a membránokba inkorporálódó peptidek esetében is, így ezen mechanizmusok felderítése kulcsfontosságú a fehérjék funkcionális modulációjának jobb megértése szempontjából. A lipidek által közvetített szabályozó folyamatok megértése különösen fontos lehet a membránok lipidösszetételének megváltozásával patológiás állapotok, így különféle tumorok, metabolikus, neurodegeneratív és lizoszomális tárolási betegségek esetén, hiszen ezen kórképekben a membránokban megjelenő lipideltérések, illetve azok következményei alapvető patogenetikai szereppel bírhatnak.

A lipidek fehérjefunkciókra gyakorolt indirekt hatásainak hátterében az áll, hogy a membránok strukturális szerveződése, amelyet leginkább azok lipidösszetétele határoz meg, jelentősen befolyásolja a transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék szerkezetét, így azok funkcionális aktivitását is. A membrán szerkezetét leíró biofizikai paraméterek közül a membránfluiditás, illetve hidráció viszonylag széles körben ismert és vizsgált, a harmadik alapvető biofizikai tulajdonság, a dipólpotenciál azonban még jórészt ismeretlen fogalom. A dipólpotenciál biológiai jelentősége is lényegében feltáratlan, annak ellenére, hogy az utóbbi időben publikált kísérletes eredmények és elméleti megfontolások alapján az intramembrán kölcsönhatások meghatározó tényezője lehet. Ezen körülményeknek és paradigmaváltásnak köszönhetően került munkacsoportunk kutatásainak 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 – utóbbira példaként említhetők a membránok lipidtutaj mikrodoménjei. 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 – és hozzájárulhat ahhoz, hogy ugyanaz a fehérje eltérő aktivitással bírjon a különféle membránokban, illetve membránrégiókban.

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) megváltozásával járó eltéréseket még *in vitro* sem derítették fel részletesen, illetve az intracelluláris organellek, membránrendszerek is lényegében feltérképezetlenül maradtak.

A dipólpotenciál kísérletes módosítására rendelkezésre álló módszerek száma is erősen limitált, ami nehezíti ezen membránbiofizikai paraméter tanulmányozását. A leggyakrabban alkalmazott eljárások jellemzően exogén, az élő szervezetben meg nem jelenő vegyületeken alapulnak. Bár kivételként megemlíthető, hogy a fiziológiai körülmények között is a sejtmembránban nagy mennyiségben jelen levő koleszterin növeli a dipólpotenciál nagyságát, ezzel ellentétes hatású, élő sejtekben is előforduló és a dipólpotenciál nagyságának kísérletes csökkentésére alkalmas, fiziológiai molekulát még nem írtak le.

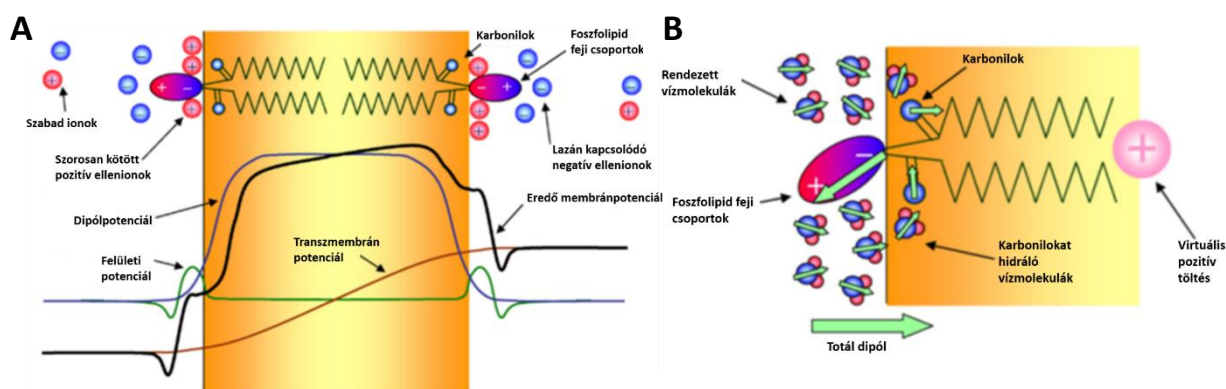
A dipólpotenciál mérése sem tekinthető megoldottnak élő sejtekben. Az „aranystandard” spektrofluoriméteres és konfokális mikroszkópos eljárások hátránya, hogy előbbi esetén az egyedi sejtek nem vizsgálhatók, míg utóbbi, bár ad információt az egyedi sejtekre vonatkozóan, lassú és munkaigényes technika. Ezek miatt jelentős igény mutatkozik egy nagy áteresztőképességű, egyedi élő sejtek vizsgálatára alkalmas mérőmódszere – 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 ismertetem az általunk kidolgozott új méréstechnikai lehetőségeket, amelyek segítségével a dipólpotenciál – mint a sejtek funkcióit alapvetően befolyásoló tényező – jelentősége a továbbiakban még részletesebben tanulmányozható.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A transzmembrán szemlélettől az intramembrán régióig

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 (1. ábra) (1-4).



**1. ábra: A membránpotenciálok triumvirátusa és a dipólpotenciál nagyságát leginkább meghatározó tényezők**

(A) A jelenleg elfogadott általános nézet szerint az eredő membránpotenciál (fekete) a transzmembrán (piros), a felületi (zöld) és a dipólpotenciál (kék) szummációjá révén alakul ki. A transzmembrán potenciált a mobilis ionok eltérő megoszlása és permeabilitása, míg a felületi potenciált a felszíni töltések inkomplett neutralizációja hozza létre. (B) A dipólpotenciált a membránban, illetve az ahhoz asszociáltan található intramolekuláris dipólusok hozzák létre. Ezek közül a legjelentősebbek a foszfolipidek feji és karbonil csoportjainak, a szteroloknak, valamint az ezekhez és a membrán felszínéhez asszociált vízmolekuláknak a dipoláros szegmentumai, amelyek nem véletlenszerű, rendezett térbeli orientációja révén jön létre a dipólpotenciál. Az ábra a (1) közlemény 2. és 3. ábrája alapján készült.

A transzmembrán potenciál két, az adott membrán által elválasztott kompartment között jön létre töltéssel rendelkező ionok (elsősorban  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és  $\text{Cl}^-$ ) koncentrációgradiense, illetve eltérő transzmembrán permeabilitása által, fenntartásában pedig elsősorban az adott ionokra szelektív ioncsatornák funkcionális aktivitása játszik alapvető szerepet. Eukarióta sejtek esetében általánosságban az intra- és extracelluláris térrészek között értelmezzük (bár például a mitokondriális vagy lizoszomális transzmembrán potenciálnak is fontos funkcionális szerepe van), nyugalmi értéke sejtípustól függően jellemzően az intracelluláris oldal felől nézve  $-80$  és  $-40$  mV között változik. A felületi potenciált ezzel szemben a membrán-víz határfelület közelében, a vizes fázisban töltéssel rendelkező – és nem neutralizált – ionok, valamint kémiai csoportok negatív töltése hozza létre.

Nagysága a membrán felszíne és az azt körülvevő oldat között mérve 30 mV körüli értéknek adódik (2, 3).

A harmadik, legkevésbé ismert és karakterizált dipólpotenciált a membránban található szterolok, foszfolipidek és a membránhoz asszociált, interfaciális vízmolekulák molekuláris dipóljainak nem-random 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. Fontos megjegyezni, hogy míg például a transzmembrán potenciál a membrán két oldala között, azaz a kettősréteg teljes vastagságán, kb. 5-10 nm-es távolságon keresztül jön létre, a dipólpotenciál gradiense ennél jóval kisebb, kb. 1 nm-es hatótávolságban figyelhető meg. Ennek eredményeképpen az utóbbi által létrehozott  $10^8$ – $10^9$  V/m-es elektromos erőter – ami az elektromos potenciál térbeli deriváltja – rendkívül nagy, 2-3 nagyságrenddel meghaladja a transzmembrán ( $2,5 \times 10^7$  V/m) és felületi potenciálok által ( $10^6$  V/m) generált erőterek nagyságát (2-4).

Bár a fentiekből látható, hogy a dipólpotenciál lényegében egy elektromos potenciál, emellett egy, az intramembrán régióra lokalizálódó és annak strukturális szerveződését jellemző tulajdonság is egyben, így az alaposabb megértéséhez kénytelenek vagyunk a méretbeli nagyságrend elemzésén felül szemléletmódot is váltani. A dipólpotenciál nagyságát ugyanis elválaszthatatlanul meghatározza a lipid kettősréteg molekuláris összetétele és a vízmolekulák jelenléte, illetve rendeződése, így az egyúttal a membrán szerkezetét leíró biofizikai paraméternek is tekinthető, hasonlóan a membránfluiditáshoz és -hidrációhoz (5-8).

A sejtmembrán fluiditása (vagy ellentétes szemszögből nézve viszkozitása) a membránt alkotó molekulák mozgási, elsősorban forgási szabadsága, amely a pakolódási sűrűségtől és a környezet hőmérsékletétől függ. Míg utóbbit biológiai rendszerekben szigorúan szabályozottnak és állandónak tekintjük, a pakolódási sűrűség nagyfokú dinamikus változatosságot mutat elsősorban a lipidösszetétel függvényében. Példaként említhetők a sejtmembrán lipidtutaj régiói, melyek fokozott koleszterinkoncentrációjuk révén csökkent fluiditású, azaz gátolt mozgási szabadsággal rendelkező területeket képeznek, hozzájárulva ezzel az eukarióta sejtek plazmamembránját jellemző laterális heterogenitáshoz. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a lipidtutaj régiókban a dipólpotenciál nagysága is eltér az egyéb sejtmembránbeli régiókhoz képest. A sejtmembrán hidrációja alatt értjük a vízmolekulák mélyebb, hidrofób intramembrán régiókba történő penetrációjának mértékét. Bizonyos értelmezések szerint ezen molekulák nem csupán oldószerként vannak jelen, hanem a membrán alapvető struktúrájának kialakításában is jelentős szerepük van, többek között a

kettősréteg vastagságának, fázisátmeneti hőmérsékletének, permeabilitásának, illetve a membránfehérjék funkciójának befolyásolása révén (5-9).

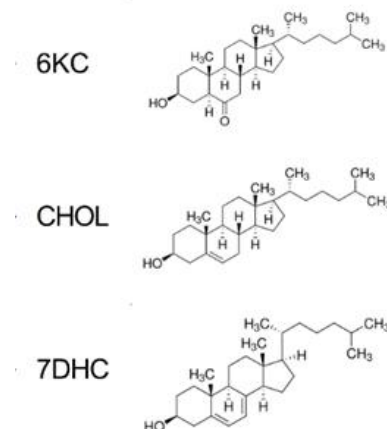
Bár a fenti három membránbiofizikai paraméter, azaz a fluiditás, hidráció és dipólpotenciál elválaszthatatlanul összefügg a molekulák szerkezeti rendeződésével, azaz egymással is, a szerkezeti szerveződést eltérő nézőpontból írják le. Ezzel összhangban elméleti megfontolások alapján tekinthetünk rájuk a sejtmembrán eltérő „mélységét” jellemző tulajdonságként is: előbbi kettő a kettősréteg belső, hidrofób részéről, míg a dipólpotenciál a felszín közeli hidrofil régiók szerkezetéről nyújthat kvantitatív információt, ily módon a dipólpotenciál feltárása egyben közelebb vihet bennünket a membránok szerveződésének, illetve az indirekt lipid-fehérje kölcsönhatások megértéséhez is (5, 8, 10).

## 2.2. 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 azt alkotó foszfo- és szfingolipidek típusa, bizonyos telítetlen vagy telített zsírsavak jelenléte, azok koncentrációja, valamint a koleszterin és származékainak koncentrációja.

A foszfolipidek dipólpotenciálra gyakorolt hatásának vizsgálata során azt találták, hogy amennyiben azonos farokrésszel, azonban különböző feji csoporttal rendelkező foszfolipidekből képeztek modellmembránokat, az eltérő foszfatidilcsoportoknak köszönhetően jelentős különbség tapasztalható a dipólpotenciál nagyságában (11). Molekuláris dinamikai szimulációk során – korábbi kísérletes megfigyelésekkel összhangban – kimutatták a glicerol vázban található éter és észter kötések jelentőségét is: az észter kötések jelenléte növelte a dipólpotenciál nagyságát (12). Hasonló módszerekkel végzett elemzés során az is nyilvánvalóvá vált, hogy a zsírsavláncban jelenlévő kettőskötések szerepe sem elhanyagolható, azok jelenléte ugyanis csökkenti a dipólpotenciál nagyságát (13). Emellett az is kiderült, hogy a (gliko)szfingolipidek szintje is befolyásolja a dipólpotenciál értékét, hiszen például míg a glükoszilceramid felhalmozódása jelentősen növeli azt (10, 14), a ceramid szintjének emelkedése meglepő módon – valószínűleg a membránhoz asszociált vízmolekulák mennyiségének csökkentése révén – alacsonyabb dipólpotenciálhoz vezet (10). A fentiek mellett a dipólpotenciál nagyságát alapvetően meghatározza a membránokban található koleszterin mennyisége, ugyanis – elsősorban modellmembránokban végzett mérések, valamint molekuláris dinamikai szimulációk alapján – a koleszterin mennyiségének növekedésével a dipólpotenciál értéke is jelentősen emelkedik, míg a koleszterin kivonására nagysága csökken (15-19). A koleszterinnel rokon szterolvegyületek esetében is hasonló jelenség figyelhető meg – a szerkezetileg alig különböző 7-

dehidrokoleszterin (7DHC, 5,7-kolesztadien-3 $\beta$ -ol) és 6-ketokolesztanol (6KC, 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -kolesztan-6-on) jelenlétében modellmembránokban szintén a dipólpotenciál nagyságának növekedéséről számoltak be és utóbbi esetén a koleszterinhez képest jelentősebb emelkedés mutatkozott (15, 20). A szterolok hatásában tapasztalható különbségek, mivel kémiai szerkezetükből önmagában nem következne (2. ábra), a molekulák lipid kettősrétegbe történő inkorporációjának eltérő módjával magyarázhatók, amint arra a későbbiekben még visszatérünk.



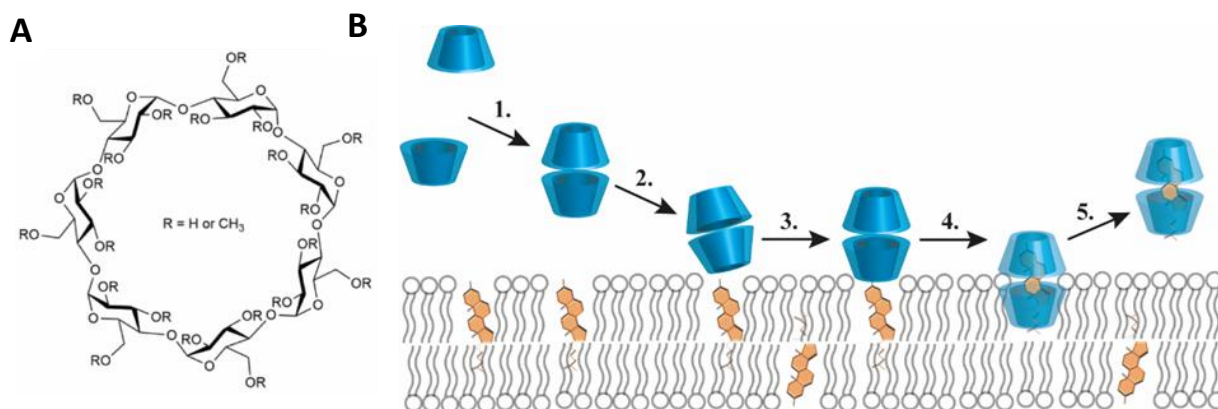
**2. ábra: A 6-ketokolesztanol (6KC), a koleszterin (CHOL) és a 7-dehidrokoleszterin (7DHC) kémiai szerkezete**

A disszertációban ismertetett kísérletek során használt három szterolszármazék, a 6KC, a CHOL és a 7DHC kémiai szerkezetét vizsgálva azok között csupán néhány csoportban találunk különbséget – a 6KC esetén egy extra ketocsoport, míg a 7DHC-nél egy extra kettős kötés –, azonban a dipólpotenciál nagyságára gyakorolt hatásuk között drámai eltérések mutatkoztak modellmembránokban végzett kísérletek, illetve molekuláris dinamikai szimulációkon alapuló vizsgálatok során. Ezen különbségek hátterében a kismértékben eltérő szerkezetből fakadó különböző dipólusmomentum és membránbeli orientáció, valamint a membrán-víz határfelületen elhelyezkedő vízmolekulák rendeződésére gyakorolt eltérő hatások állhatnak.

A dipólpotenciál nagyságának kísérletes változtatása a membránok lipidösszetételének módosításával lehetséges. A növelés tekintetében viszonylag egyszerűbb a helyzet, ugyanis – ahogy fentebb említettük – a szterolok magasabb szintje a korábban leírtaknak megfelelően a dipólpotenciál emelkedését eredményezi. Ennek megfelelően a dipólpotenciál növelése főleg a szterolok membránokba történő inkorporációjával történik. Erre célra elsősorban az eddig leírt leghatékonyabb származékot, az emberi szervezetben fiziológiás körülmények között nem megtalálható 6KC-t alkalmazzák mind modellmembránokban, mind pedig élő sejtek esetén – a 6KC használata lényegében a dipólpotenciál növelésének „aranystandard”, legelterjedtebben használt módjának tekinthető (14, 21-24).

Mivel a koleszterin, illetve az egyéb szterolok erőteljesen hidrofób vegyületek, a sejtek ezen anyagokkal történő kezelése speciális vivőanyagokkal lehetséges. A biológiai membránokban található szterolok mennyisége hatékonyan megváltoztatható ciklodextrinekkal (CD-k), amelyek leggyakrabban

hét  $\alpha$ -1,4-D-glükopiranoz egységből ( $\beta$ CD-k) felépülő, üreges, csonkakúp alakú szerkezetet alkotó, belső hidrofób és külső hidrofíl felülettel rendelkező ciklikus oligoszacharidok (**3. ábra A panel**) (5, 25, 26). A  $\beta$ CD-k vízzel oldható, nem kovalens inklúziós komplexeket hoznak létre vízben egyébként rosszul oldódó, hidrofób anyagokkal, például különböző gyógyszerekkel és szterolokkal, így előszeretettel használják azokat különféle gyógyszerformulációkban vivőanyagként (25, 27). Ennek megfelelően az üres  $\beta$ CD-k, azok közül is különösen a leggyakrabban alkalmazott és egyben leghatékonyabb származék, a véletlenszerűen metilált származék (M $\beta$ CD), képesek arra, hogy hatékonyan kivonják a koleszterinmolekulákat a biológiai membránokból, ezért széles körben alkalmazzák őket a membránban található koleszterin mennyiségének kísérletes csökkentésére (**3. ábra B panel**) (5, 28, 29). Másrészt prekomplexált formában, a szterolokkal töltött M $\beta$ CD hatékonyan képes a sejtmembrán szteroltartalmát megnövelni, amint azt korábban a koleszterin, a 7DHC és a 6KC esetében is kimutatták (24, 29-31). Ezeknél az alkalmazásoknál azonban fontos szem előtt tartani azt, hogy a prekomplexálás folyamata során, illetve a kísérletes inkubáció alatt kialakuló egyensúlyban a natív, üres M $\beta$ CD és az M $\beta$ CD-szterol komplexek keveréke jön létre. Emiatt a sejtek kezelése során két folyamat zajlik egyszerre: azaz az üres M $\beta$ CD „kiszedi” a membránokból a koleszterint, míg a prekomplexált M $\beta$ CD növeli a membránban található szterolok mennyiségét. Ennek eredményeként a CD alkalmazott koncentrációja, a komplexben lévő szterolok relatív mennyisége, valamint a membránokban található koleszterin kezdeti szintje együttesen határozzák meg a kezelés végeredményét. A kísérletekben kontrollként célszerű tehát üres M $\beta$ CD-vel történő kezelést alkalmazni, olyan CD koncentráció mellett, amely megegyezik az M $\beta$ CD-szterol komplexekben található CD mennyiségével és az utóbbi kezelések hatását az üres M $\beta$ CD esetén tapasztaltakra normálni (24, 29, 30).



**3. ábra: A metil- $\beta$ -ciklodextrin (M $\beta$ CD) szerkezete és kölcsönhatása a membránokban található koleszterinnel**

**(A)** A metil- $\beta$ -ciklodextrin (M $\beta$ CD) hét darab  $\alpha$ -1,4-D-glükopiranoz egységből felépülő csonkakúp alakú ciklikus oligoszacharid. A külső hidrofíl felszín, illetve belső hidrofób üreg alkalmassá teszi, hogy vízben hidrofób anyagokkal, így különféle gyógyszermolekulákkal és szterolokkal szolúbilis komplexet alkosson. **(B)** A lipid kettősrétegben található koleszterin és az M $\beta$ CD molekulák közötti kölcsönhatás a következő főbb lépésekben történik: két, gyűrűs szerkezetű M $\beta$ CD vízben dimert alkot (1.), amely a kettősréteg-víz határfelülethez először dőlt (2.), majd arra merőleges (3.)

orientációban rögzül. Ezt követően egy, a membránban található koleszterin molekula mintegy „belecsúszik” és bezáródik a dimer hidrofób üregébe (4.) és a komplex végül leválik és eltávolodik a membrántól (5.). Az ábra a (5) közlemény 1. és 2. ábrája alapján készült.

### 2.3. A dipólpotenciál kísérletes csökkentésének lehetőségei

A dipólpotenciál hatékony csökkentése jóval nehezebb feladatot jelent. Mesterségesen előállított, egymáshoz nagyon hasonló szerkezetű hidrofób kationok és anionok modellmembránokon keresztül történő permeabilitásának összehasonlítása során leírták, hogy egy, a természetben is előforduló flavonszármazék, a phloretin (3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)-1-propanon) hatására a két hidrofób ion penetrációs képessége közötti különbség lecsökken, amely arra utal, hogy a kationnal szemben permeációs gátat képző dipólpotenciál nagysága is jelentősen alacsonyabbá válik (32). Modellmembránokban végzett NMR spektroszkópiás mérések alapján a vegyület hatásának hátterében a molekula membránban történő rögzülése állhat, ugyanis dipólusmomentuma a dipólpotenciállal ellentétes irányban áll, valamint megváltoztathatja a membránhoz asszociált határfelületi vízmolekulák mennyiségét és térbeli rendeződését (33). A phloretin dipólpotenciált csökkentő hatását a későbbiekben megerősítették egyéb modellmembránokban, valamint élő sejtekben is, bár a legtöbb esetben a változások mértéke alacsonynak bizonyult (14, 21-23). Ennek ellenére továbbra is a phloretin a leginkább elfogadott dipólpotenciált csökkentő vegyület.

A dipólpotenciál nagysága és a membránok koleszterintartalma közötti szoros összefüggés és korábbi eredmények alapján a dipólpotenciál csökkentésére alkalmas lehet a sejtek koleszterintartalmát csökkentő statinokkal történő kezelés is, azonban a kísérletes adatok némileg ellentmondásosak (17, 34) és a statinok sem tekinthetők az élő szervezetben előforduló, teljes mértékben fiziológiás alternatívának. A korábban már említett ciklodextrinek a koleszterint kivonó hatásuk révén képesek a dipólpotenciált is csökkenteni (16, 17, 19, 35) és bár általánosságban jól tolerálható vegyületek, használatukat bizonyos esetekben limitálja, hogy főleg hatékonyabb származékaik hemolízist okozhatnak (28, 36-38).

A fenti vegyületekhez képest sokkal fiziológiásabb alternatívát jelenthetnek bizonyos zsírsavak. Általánosságban a többszörösen telítetlen  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 zsírsavak, például  $\alpha$ -linolénsav (ALA) vagy  $\gamma$ -linolénsav (GLA) (valamint származékaik, mint az eikozapentaénsav és dokozahexaénsav, illetve az arachidonsav) a koleszterinnel ellentétes hatást gyakorolnak a membránbiofizikai paraméterekre: növelik a lipid kettősrétegek fluiditását (39-41) és hidráció fokát (42), valamint csökkentik a kettősréteg vastagságát és fokozzák a hajlítási rugalmasságukat (41, 43). Mindezek alapján várható, hogy a dipólpotenciál nagyságát is befolyásolhatják, azonban ezt a hatást élő sejteken ezidáig még nem vizsgálták.

## 2.4. A dipólpotenciál meghatározása élő sejtek esetében

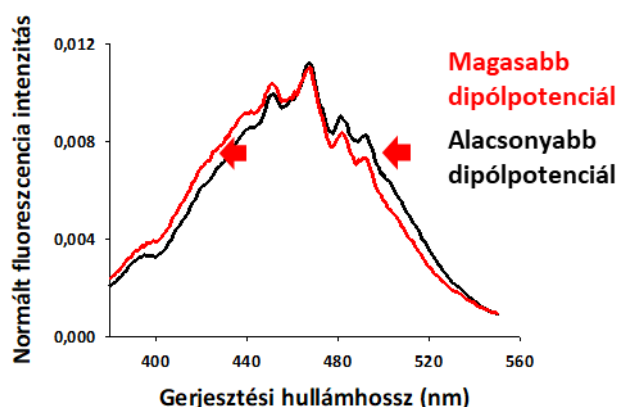
A dipólpotenciál meghatározása – intramembrán potenciálról lévén szó – annak elméleti definiálása óta nehézségekbe ütközött. A kvantitatív jellemzésére alkalmazott technikák, úgymint a krio-elektronmikroszkópia (44), atomerő mikroszkópia (45), vibrációs Stark-effektus spektroszkópia (46) vagy molekuláris dinamikai szimulációs módszerek (47-49) 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 hatására,  $10^{-6}$ - $10^{-9}$  s időskálán. Ezzel szemben a „lassú” szenzorok a kompartmentek közti megoszlás vagy dimerizáció révén megváltozó fluoreszcens tulajdonságaik által tükrözik az erőter változását  $1$ - $10^{-3}$  s időskálán (50).

A gyors feszültség-szenzorok legkorábban leírt és legígéretesebb csoportját a 4-p-aminosztiril-1-piridinium származékok képezték (51). Esetükben az elektronszerkezet megváltozásával járó elektrokrómos hatás, másnéven Stark-effektus következtében megváltozik a molekula gerjesztési és emissziós spektruma is. Transzmembrán vagy dipólpotenciál meghatározására azon vegyületek bizonyultak alkalmasnak, melyek elektronszerkezete a molekula elmozdulása nélkül is képes átrendeződni. A próbák egyes potenciálokra való érzékenységet a molekula membránban való elhelyezkedése határozza meg (52). Ezek a molekulák ugyanis a membrán síkjára merőleges pozícióban rögzülnek, azaz az elektromos erőter vektor irányával párhuzamosan helyezkednek el, mely előnyös a Stark-effektus maximalizálása szempontjából. A dipólpotenciál vizsgálatára kedvezőbbnek bizonyult a gerjesztési spektrum vizsgálata: a magasabb térerősség, azaz pozitívabb potenciálok esetében alacsonyabb hullámhossztartományok felé történő (azaz kék irányú), míg a kevésbé pozitív potenciálok esetében hosszabb tartományok felé történő (azaz vörös irányú) eltolódás figyelhető meg (53). Bár az emissziós spektrumban is általánosságban hasonló – komplementer – változások figyelhetők meg, azonban azok jóval érzékenyebbek bizonyultak egyéb paraméterekre – elsősorban a fluiditás változásaira és a molekula rotációjára, valamint a festék koncentrációjára (54).

A sztirliszármazékok közül a leggyakrabban, kezdetben elsősorban a transzmembrán potenciál mérésére használt di-4-ANEPPS (4-(2-[6-(dibutilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só) továbbfejlesztett és a dipólpotenciál mérésére széleskörűen alkalmazott változata a di-8-ANEPPS (4-(2-[6-(dioktilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só) nevű fluorofór. Szerkezetéből, a molekula membránba történő rögzítéséért felelős, a korábbi származékokhoz képest hosszabb szénláncából adódóan a fluorofór merevebb, illetve az elektronok elmozdulásukkor hosszabb utat tesznek meg, mely által kedvezően nő

az elektrokrómos effektus az egyéb zavaró tényezők erősödése nélkül (55). A fluorofór emellett lassabban internalizálódik, illetve az egyéb származékoknál kedvezőbb jel-zaj aránnyal is rendelkezik (56). A dipólpotenciál mérésére gerjesztési aránymérési eljárás során alkalmazható. A molekulát két hullámhosszon (spektrális tulajdonságai alapján optimálisan 460 és 520 nm körül) gerjesztve azonos hullámhosszon (580 nm fölött) detektálva az emittált fotonokat, a két esetben mérhető fluoreszcencia intenzitások hányadosa a magasabb térerősség következtében, az gerjesztési spektrumban bekövetkező kék irányú eltolódás (4. ábra) miatt erőteljes pozitív korrelációt mutat a dipólpotenciál nagyságával (22).



#### 4. ábra: A di-8-ANEPPS gerjesztési spektrumának változása a dipólpotenciál függvényében

THP-1 sejtek di-8-ANEPPS fluorofórral történő jelölése után spektrofluoriméterrel gerjesztési spektrumot rögzítettünk kontroll (fekete) és a dipólpotenciál nagyságát növelő 6-ketokolesztanollal (piros) történő kezelést követően. A gerjesztés hullámhosszát 380 és 550 nm között változtattuk, míg az emissziót 670 nm-en detektáltuk. A reprezentatív spektrumokon jól megfigyelhető a molekula gerjesztési spektrumának a magasabb dipólpotenciál következtében az alacsonyabb hullámhossz-tartományok irányába történő eltolódása.

A di-8-ANEPPS-et részletesebben vizsgálva felfedezték, hogy a gerjesztési aránymérés során az emissziót 580 nm fölötti tartományban detektálva az arány magasabbnak adódott, mint 670 nm fölött. Az 580 nm fölött mért gerjesztési arány értékét emellett érdemi mértékben befolyásolta a membrán fluiditása is – a fázisátalakulási hőmérséklet alatt a hőmérséklet növelésével emelkedett, míg az olvadási pont fölött tovább emelve csökkent. Hasonló jelenséget 670 nm fölötti detektálás esetében nem figyeltek meg – ekkor valószínűleg az a festékpopuláció vizsgálható, mely a gerjesztett állapot legalsó energiaszintjén helyezkedik el, így kevésbé érzékeny a festék membránban történő „elmozdulására”. A fluiditás zavaró hatásának kiküszöbölése érdekében célszerű tehát ebben a magasabb hullámhossz-tartományban vizsgálni a fluorofórt (21).

Szintetikus modellmembránokon végzett mérések további bizonyítékkal szolgáltak a di-8-ANEPPS dipólpotenciál mérésében való alkalmazhatóságáról. Ezek alapján a fluorofór fotont kibocsátó része épp a membrán azon régiójában helyezkedik el, ahol a dipólpotenciál hatása a legkifejezettebb,

ugyanakkor a felületi potenciál kis hatótávolsága miatt már nem érvényesül, a transzmembrán potenciál pedig kisebb elektromos erőtere révén nem képes jelentős hatást gyakorolni (15). Mindezekkel összhangban élő sejtek esetében jelenleg a di-8-ANEPPS használatán és a gerjesztéses aránymérésen alapuló módszer tekinthető a dipólpotenciál legelfogadottabb mérési módjának mind spektrofotometriás (11, 15, 21, 22, 30, 34, 57, 58), mind pedig mikroszkópos technika (10, 14, 23, 59) alkalmazásával.

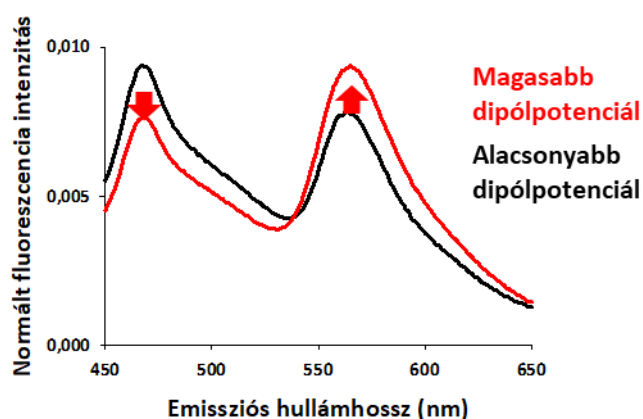
A fluorofórok emissziós spektrumának vizsgálata során fontos előny, hogy – mivel elegendő a festékeket egy hullámhossz-tartományban gerjeszteni – a gerjesztéses aránymérési eljárással szemben egyidejűleg két detektorral történhet az emittált intenzitások mérése (60). A di-8-ANEPPS emissziós spektrumának vizsgálata során azonban jelentős varianciát találtak a hőmérséklet és gerjesztési hullámhossz változtatásakor, melyet a szomszédos molekulák dipóljainak átrendeződésével magyaráztak. Ezáltal kiderült, hogy a di-8-ANEPPS – és egyéb sztirilszármazékok – esetén a megfigyelt, emissziós spektrumot érintő változásokat egyéb membránbiofizikai tényezők is befolyásolják, emiatt pedig ezek a molekulák nem alkalmasak a dipólpotenciál meghatározására megbízható és reprodukálható módon emissziós aránymérés során (61).

A dipólpotenciál meghatározásának újabb lehetőségét biztosítják a nemrégiben karakterizált 3-hidroxi-flavon (3-HF) származékok, melyek közös tulajdonsága, hogy emissziós spektrumuk jelentősen megváltozik a membránlipidek mennyiségének, illetve a membránok biofizikai tulajdonságainak módosulása esetén. Ezek a festékek a membránban hidofil csoportjaiknak köszönhetően a víz-membrán interfaciális régióban helyezkednek el, ahol hosszú szénláncuk rögzíti őket és korlátozza mobilitásukat (62). Későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy a 3-HF származékok egy alcsoportja alkalmazható lehet a dipólpotenciál meghatározására.

Ennek biofizikai alapját a fluorofórok gerjesztett állapotában bekövetkező, úgynevezett gerjesztett állapotú intramolekuláris protontranszfer („Excited State Intramolecular Proton Transfer” – ESIPT) reakció képezi, amelynek hatására kétféle gerjesztett állapot, a normál ( $N^*$ ) és tautomer ( $T^*$ ) forma jön létre. Ezen festékek emissziós spektrumában így két jól elkülöníthető emissziós sáv figyelhető meg, amelyek a kétféle állapotnak feleltethetők meg. A két, egymástól jelentősen különböző dipólusmomentummal rendelkező állapot relatív betöltöttségét a fluorofórt körülvevő lokális elektromos erőter jelentősen befolyásolja: míg a  $T^*$  forma elektroneloszlására nincs jelentős hatása, addig az  $N^*$  forma esetében ennek ellentéte tapasztalható, ez utóbbi forma sokkal nagyobb dipólusmomentumának köszönhetően. Az  $N^*$  gerjesztett állapot  $T^*$ -hez viszonyított relatív stabilitását, következésképp a két populációnak megfelelő emittált fotonok relatív intenzitást is nagymértékben befolyásolja a lokális elektromos erőter nagysága. Az  $N^*$  gerjesztett állapot esetében emellett a

sztirilszármazékoknál tapasztalt elektrokrómos effektus is megfigyelhető, azaz az ES IPT reakció elektrokrómosan is moduláltnak tekinthető. Fentiek alapján a 3-HF származékok ígéretes vegyületcsoportnak tűntek a membránbiofizikai paraméterek vizsgálata szempontjából, különösen mivel a szénlánc hosszúságának befolyásolásával könnyen változtatható a membránban történő rögzülés mélysége is (63).

A származékok modellmembránokban történő részletes összehasonlító vizsgálata alapján a dipólpotenciál meghatározására legmegbízhatóbb változatnak az N-[3-(40-dihexilamino-3-hidroxi-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só (F66) bizonyult. Ezen mérések során modellmembránokat jelöltek különböző 3-HF fluorofórokkal a dipólpotenciált növelő 6KC jelenlétében vagy anélkül, majd emissziós aránymérési eljárást alkalmaztak – azaz a fluorofórokat egy adott hullámhosszon gerjesztve az N\* és T\* sávok intenzitásának arányát mérték. A vizsgálatok során az F66 mutatkozott a legérzékenyebb és legmegbízhatóbb variánsnak – az eredmények függetlennek mutatkoztak a felületi potenciál nagyságától, valamint 5-9 közötti tartományban a környezeti pH-tól is. A kísérleti eredmények alapján az F66 alkalmazhatónak bizonyult a dipólpotenciál meghatározására mind spektrofluoriméteres, mind konfokális lézerpásztázó mikroszkópos módszerekkel – sőt, a di-8-ANEPPS-hez képest nagyobb szenzitivitással –, ugyanis az N\*/T\* arány egyértelmű negatív korrelációt mutatott a dipólpotenciál nagyságával (5. ábra) (14, 16, 64, 65). A dipólpotenciál emissziós arányméréssel történő meghatározása pedig különösen ígéretesnek tűnt, hiszen ezáltal lehetőség adódik áramlási citométer alkalmazására, azaz egyedi sejtek nagy áteresztőképességű elemzésére, amelyet azonban korábban még nem vizsgáltak. Emellett az F66 másik jelentős előnye, hogy kedvező spektrális tulajdonságai (UV közeli tartományban történő gerjeszthetőség) által jól kombinálható lehet egyéb, konvencionális fluorofórokkal.



**5. ábra: F66 emissziós spektrumának változása a dipólpotenciál függvényében**

THP-1 sejtek F66 fluorofórral történő jelölése után spektrofluoriméterrel emissziós spektrumot rögzítettünk kontroll (fekete) és 6-ketokolesztanollal (piros) történő kezelést követően. A festéket 405 nm-en gerjesztettük, az emittált intenzitásokat pedig 450 és 650 nm között detektáltuk. A

reprezentatív spektrumokon jól megfigyelhető a festékre jellegzetes két, jól elkülönült emissziós tartomány – amelyek közül az alacsonyabb hullámhossztartományú a normál (N\*), míg a magasabb tartományú a tautomer (T\*) gerjesztett állapotnak feleltethető meg. A 6-ketokolesztanol által eredményezett magasabb dipólpotenciál következtében az N\* állapot relatív stabilitása, így betöltöttsége, és az ehhez tartozó sáv relatív fluoreszcencia intenzitása alacsonyabbá válik a T\* állapothoz képest.

## 2.5. A különböző celluláris membránok eltérő összetétele és dipólpotenciálja

A korábban leírtaknak megfelelően a dipólpotenciált alapvetően meghatározza a membránok lipidösszetétele. Ezzel összhangban korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy nagysága jelentős heterogenitást mutat a plazmamembránban, így az ott található, jellegzetes összetétellel rendelkező, koleszterinben és szfingolipidekben gazdag lipidtutaj mikrodoménekben értéke jelentősen magasabb, mint az egyéb membránrégiókban (14, 16). Összességében elmondható, hogy a dipólpotenciállal – illetve általánosságban a membránbiofizikai paraméterekkel, így fluiditással, hidrációval – kapcsolatos kutatások élő sejtekben eddig a plazmamembrán vizsgálatára fókuszáltak, az intracelluláris organellumok lipid kettősrétegeiről, azok strukturális szerveződéséről azonban sokkal kevesebbet tudunk.

Ez annak ellenére van így, hogy az egyes intracelluláris kompartmentumok membránjai egymástól különböző lipidösszetétellel, és ezáltal feltehetően egyedi membránbiofizikai tulajdonságokkal rendelkeznek. A szekréciós útvonalon belül például az endoplazmás retikulum és a Golgi-apparátus membránjairól általában azt feltételezik, hogy alacsony pakolódási sűrűségűek, mivel koleszterinben és komplex szfingolipidekben szegények – míg a plazmamembrán ezzel szemben a fokozott mechanikai stabilitás érdekében nagy mennyiségben tartalmazza ezeket a lipideket. Az endocitotikus útvonal mentén a korai endoszómák membránjának összetétele várhatóan hasonlít a plazmamembrán összetételéhez, míg a lizoszómákat a koleszterin alacsonyabb mennyisége és több jellegzetes lipidfajta jelenléte jellemzi. A mitokondriális membránok pedig olyan egyedi lipideket tartalmaznak, mint a kardiolipin vagy a foszfatidilglicerol, amelyekhez általában alacsony koleszterintartalom társul (66-68).

Bár különféle lipidomikai vizsgálatok bizonyítékot szolgáltatnak ezekre a jellegzetes összetételbeli eltérésekre, többnyire nem világos, hogy ezek megnyilvánulnak-e (és ha igen, milyen módon) az élő, ép sejtek membránbiofizikai tulajdonságainak megváltozásában. A különböző intracelluláris organellumok membránjainak ilyen paramétereit csak szórványosan vizsgálták, például az endoplazmás retikulum (69, 70), a Golgi-apparátus (71), a lizoszómák (72) vagy a mitokondriumok (73, 74) esetén izoláltan, a különféle kompartmentumokat általában nem összevetve egymással. Következésképp ezeknek a jellemzőknek – és ezáltal a dipólpotenciálnak – az átfogó és összehasonlító elemzése még nem történt meg az élő sejtekben.

## 2.6. A dipólpotenciál biológiai relevanciája és a sejtpenetráló peptidek

A sejtmembrán lipidösszetételének megváltozásával járó kórképek pontos patomechanizmusának megértéséhez, a potenciális terápiás célpontok azonosításához elengedhetetlen a betegség szempontjából releváns molekulák kölcsönhatásainak megértése. A kórképekre példaként említhetők a hiperkoleszterinémia különböző formái (familiáris, diétával vagy egyéb kórképekkel asszociált) és az egyéb metabolikus kórképek (75-77), a csökkent koleszterin-, azonban emelkedett 7DHC-szinttel járó Smith-Lemli-Opitz szindróma (78), különféle neurodegeneratív betegségek (79, 80), bizonyos tumorok (6, 81-83) vagy a  $\beta$ -glükocerebrozidáz enzim defektusa révén a glükozilceramid felhalmozódásával jellemezhető Gaucher-kór (84, 85).

Ezen patológias állapotokban a membránösszetétel eltérései miatt jelentősen megváltozhatnak a lipid kettősrétegek biofizikai tulajdonságai is, amely patofiziológiai szempontból is fontos lehet, hiszen egyre több bizonyíték támasztja alá a sejtmembrán, és különösen az abban található lipid komponensek aktív szerepét a transzmembrán fehérjék szerkezetének és működésének, így végső soron a különböző sejtfunkciók szabályozásában. Általánosságban a lipidek közvetlen receptor-ligandszerű kölcsönhatásokon és/vagy közvetett mechanizmusokon, azaz a membránok biofizikai paramétereinek változásain keresztül befolyásolják a fehérjék szerkezetét és funkcionális aktivitását. Bár a lipidek direkt kötődés által kifejtett hatásai a nagy felbontóképességű röntgen-krisztallográfiás és krio-elektronmikroszkópos technikák, valamint a molekuláris dinamikai szimulációs módszerek révén viszonylag intenzíven kutatott témát képviselnek napjainkban, az indirekt mechanizmusok jóval kevésbé ismertek és sokkal inkább elhanyagolt területnek számítanak annak ellenére, hogy számos fehérje esetén leírták azok szerepét (7, 86, 87). Az ilyen jellegű tanulmányok alacsony száma legalábbis részben összefüggésbe hozható azzal a ténnyel, hogy élő sejtekben a membránbiofizikai paraméterek vizsgálatára alkalmas módszerek száma és alkalmazhatósága limitált.

A membránok biofizikai tulajdonságai közül talán a leginkább rejtélyes paraméter a dipólpotenciál, amely – intramembrán potenciálról lévén szó – elsősorban a fehérjék transzmembrán doménjére hatva befolyásolhatja azok funkcióját. A fehérjék ugyanis jellemzően többnyire egyenetlen töltéseloszlással bírnak, így a dipólpotenciál által kialakuló hatalmas elektromos erőtér fontos szerepet játszhat a töltött, illetve poláris aminosavakra gyakorolt hatások révén a különböző konformációs állapotok stabilitásának és ezáltal a proteinek funkcionális aktivitásának szabályozásában (2, 7, 88).

A dipólpotenciál léte, illetve annak fontos biológiai szerepére először közel 50 éve publikált eredmények utaltak. Ellentétes töltésű, de nagyon hasonló szerkezettel bíró hidrofób anionok és kationok modellmembránokon történő penetrációjának összehasonlítása során ugyanis azt találták, hogy előbbiek sokkal hatékonyabban képesek átjutni a lipid kettősrétegeken. Ezek alapján vetették fel

egy, a hidrofób kationok permeabilitását gátló pozitív elektromos barrier, a dipólpotenciál létét, amelyről elméleti megfontolások alapján hamar belátták, hogy a membránt alkotó lipidek, illetve az azokhoz asszociált vízmolekulák dipóljainak rendezett térbeli orientációja alakítja ki (89-91).

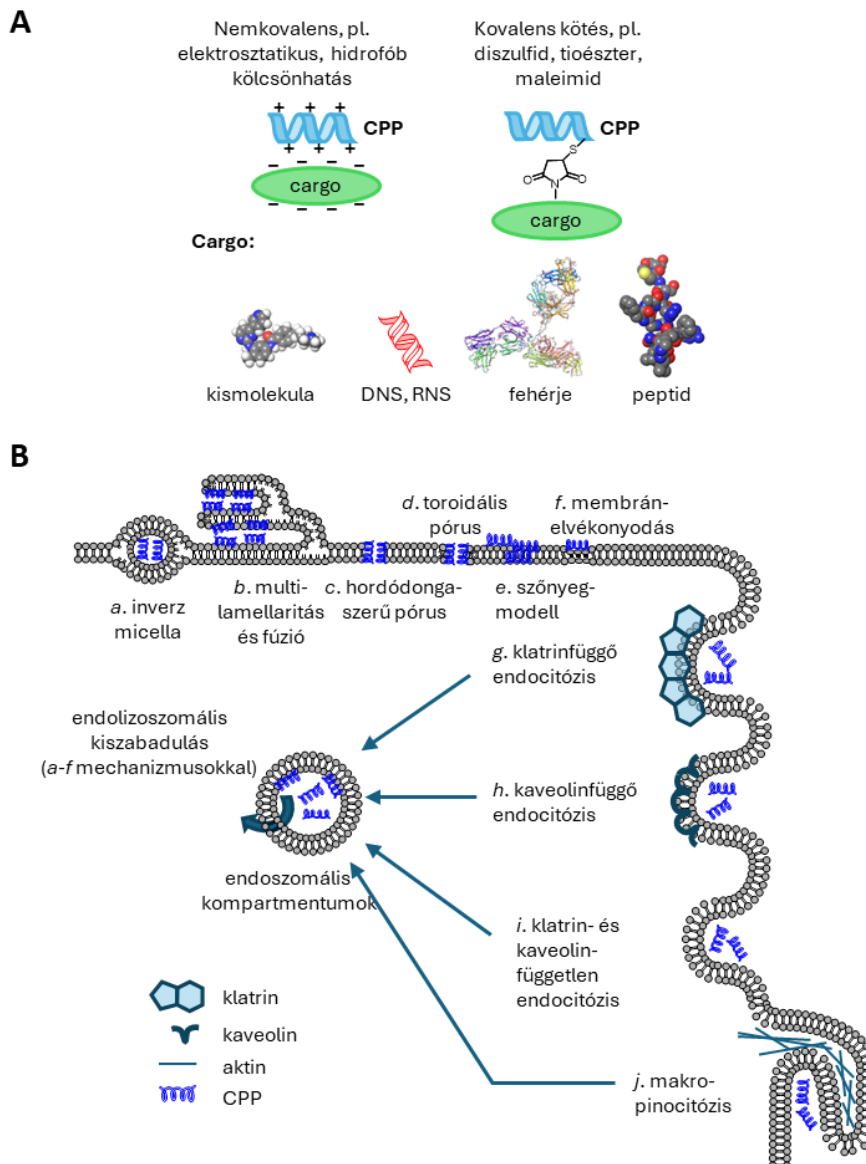
A későbbiekben kiderült, hogy a dipólpotenciál nagysága számos transzmembrán doménnel rendelkező fehérje működését befolyásolhatja. A membránfehérjék egyik, a dipólpotenciál által modulált csoportját képezik az ioncsatornák. Viszonylag hamar leírták ugyanis, hogy a dipólpotenciál nagyságának függvényében megváltozik különféle bakteriális ionofórok asszociációja és konduktanciája is (92). Emellett molekuláris dinamikai szimulációk során azt mutatták ki, hogy a hERG káliumcsatorna esetén a transzmembrán és a dipólpotenciál között dinamikus kölcsönhatás áll fenn, amely hatást gyakorol a csatorna kapuzására, valamint aktivációs és deaktivációs folyamataira. Különböző kismolekulájú csatornamodulátorok vizsgálata során azt találták, hogy a vegyületek hatékonyságát meghatározza azok dipólusmomentuma (93). A fentiekkel összhangban munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy a dipólpotenciál változtatása hozzájárulhat a koleszterin és 7DHC  $K_v1.3$  és  $K_v10.1$  feszültségkapuzott káliumcsatornák kapuzására gyakorolt gátló hatásaihoz (31), illetve magyarázhatja, hogy a ceramid és glükoszilceramid miért gátolja eltérő hatásmechanizmussal és különböző intramolekuláris támadásponton – a feszültség szenzor, illetve a pórusdoménen – hatva a  $K_v1.3$  kapuzását és feszültségérzékenységét (10).

Az ioncsatornák mellett a dipólpotenciál az aktív transzporterek működését is modulálhatja. Az aktív transzportfolyamatok kapcsán a legszélesebb körben vizsgált  $Na^+/K^+$  ATPáz kinetikájának tanulmányozása során viszonylag hamar felmerült az intramembrán töltések szerepe (94). Ezzel összhangban a különböző emlősfajok vesesejtjeiből izolált transzporterek esetében pozitív korrelációt találtak a membránok dipólpotenciáljának nagysága és a  $Na^+/K^+$  ATPáz aktivitása között (95). A jelenség hátterében feltételezett mechanizmussal kapcsolatban a későbbi vizsgálatok során kapott eredmények alapján azt feltételezték, hogy a dipólpotenciál a pumpa okkludált és szabad állapotainak stabilitását eltérő módon befolyásolja és ezen keresztül módosítja annak aktivitását (96). Egy másik ATPáz, 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 között pozitív korrelációt (58, 97).

A transzporterekén kívül azonban más fehérjék, így a jelátviteli folyamatok során központi szerepet játszó különféle transzmembrán receptorok esetén is kimutatták a dipólpotenciál jelentőségét. Munkacsoportunk nemrégiben a receptor tirozinkináz családba tartozó ErbB fehérjék aktivációját vizsgálva például azt találta, hogy a dipólpotenciál nagyságának 6KC-val történő növelése a transzmembrán doménen hatva – a ligand iránti affinitás csökkentése ellenére – fokozza a receptorok

dimerizációját, klaszterizációját és következményesen a daganatos proliferációban fontos jelátviteli útvonalak beindulását is, míg a dipólpotenciált csökkentő phloretinnel történő kezelés esetén jellemzően eltérő hatások figyelhetők meg. Ennek hátterében az állhat, hogy a dipólpotenciál csökkenésének hatására lecsökken a transzmembrán domének között létrejövő aktív dimer forma relatív stabilitása, illetve megnő a receptor aktivációját gátló, pozitívan töltött aminosavakban gazdag juxtamembrán doménnek az intracelluláris kináz domén gátlását eredményező beágyazódása a membránban (23).”. Hasonló módon a dipólpotenciál nagysága összefüggést mutat bizonyos G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, így a szerotonin receptorok ligand iránti affinitásával és jelátviteli aktivációjával (57).

A dipólpotenciál értéke emellett jelentősen befolyásolhatja különféle molekulák membránhoz történő kötődésének, illetve lipid kettősrétegekbe történő penetrációjának hatékonyságát. Hasonló hatásokat kimutattak gyógyszer-molekulák (35),  $\beta$ -amiloid (98) és más peptidek (99, 100) esetén is. Utóbbi megfigyelések különösen érdekesek annak fényében, hogy egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik bizonyos peptidek iránt, melyek alkalmazhatóak lehetnek különféle gyógyszerek sejtekbe történő bejuttatására. Ezek közül az úgynevezett sejtpenetráló peptidek („cell-penetrating peptides”, CPP) ígéretes alternatívát jelenthetnek az egyébként a sejtmembrán szempontjából impermeábilis vegyületek – különböző gyógyszerek, peptidek, DNS és RNS – nem toxikus intracelluláris transzportjára (8, 101) (**6. ábra A panel**). Alkalmazásukat korlátozza azonban a viszonylag alacsony biológiai hozzáférhetőségük (8, 102). A szállított anyagok CPP által mediált, a célhelyre, azaz jellemzően a citoplazmába vagy a sejtmagba történő bejuttatásának két útja ismert. A CPP-k ugyanis bekerülhetnek a célsejtbe direkt, plazmamembránon történő transzlokációs mechanizmusok, illetve endocitózis, majd az azt követő endolizoszomális kiszabadulás révén (8, 101, 103) (**6. ábra B panel**). Tekintettel arra, hogy mindkét fenti mechanizmus magában foglalja a membránokkal való kölcsönhatást, jogos lehet az a feltételezésünk, hogy a dipólpotenciálból származó elektromos erőter befolyásolhatja a CPP-k sejtekbe történő bejutását – különös tekintettel az egyik legígéretesebb terápiás potenciállal bíró, töltéssel rendelkező, kationos CPP-re, a penetratinra. Ezzel összhangban kutatócsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy a phloretin, valamint a koleszterinszintet csökkentő atorvastatin által kiváltott dipólpotenciál csökkenés a penetratin sejtekbe történő megnövekedett felvételét, illetve különösen az endolizoszomális rendszerből való fokozott kiszabadulását eredményezi (34). Ezen eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a dipólpotenciál csökkentése fokozhatja a CPP-k celluláris felvételét, így végső soron azok terápiás hatékonyságát is – vagyis a CPP-k felvétele és a dipólpotenciál közötti kapcsolat alaposabb karakterizálása és új, fiziológias, a dipólpotenciál nagyságát csökkentő vegyületek felderítése rendkívül hasznos lehet a CPP-k hatékonyságának javítása szempontjából.



## 6. ábra: A sejtpenetráló peptidek (CPP-k) mint hordozómolekulák és célsejtekbe történő bejutásuk mechanizmusai

(A) A CPP-k rövid, általában kevesebb mint 30 aminosavból felépülő peptidek, amelyek képesek átjutni a biológiai membránokon és hordozómolekulaként különféle terápiás szempontból releváns vegyületeket, például kismolekulákat (kinázgátlókat, ioncsatorna-inhibitorokat), nukleinsavakat, peptideket vagy akár teljes fehérjéket a sejtekbe juttatni. Ehhez a rakomány CPP-hez történő konjugációja nemkovalens vagy kovalens kölcsönhatásokkal is történhet. Előbbi célra különösen alkalmasak a kationos CPP-k, mint a család prototípus vegyületének tekinthető penetratin is. (B) A CPP-k a biológiai membránokon átjuthatnak energiafüggetlen mechanizmusokkal (a–f), illetve energiafüggő módon, a sejt aktív közreműködését igényelve. Számos különböző mechanizmust vetettek fel a CPP-k közvetlen membránon való átjutásának magyarázatára, többek között az inverz micellák képződését, a multilamellaritás indukcióját, a hordódonga-szerű vagy toroidális porusok kialakulását, a szőnyegszerű borítást és a membrán eltérnyodását. A biológiaiilag aktív, energiafüggő felvételi mechanizmusok közé tartoznak a klatrin- vagy kaveolinfüggő endocitotikus útvonalak, a klatrin- és kaveolin-független endocitózis, valamint a makropinocitózis. Még ha a CPP-k valamelyik energiafüggő mechanizmussal jutnak is be a sejtekbe, a citoszolikus kompartment eléréséhez az endolizoszomális kompartment membránján valamelyik közvetlen transzlokációs mechanizmussal kell átjutniuk. Az ábra a (8) közlemény 1. és 2. ábrája alapján készült.

### 3. Célkitűzések

A dipólpotenciál – többek között a transzmembrán doménnel rendelkező fehérjék működését alapvetően meghatározó elektromos tényező és egyben a lipid kettősréteg rendezettségét is jellemző paraméter – megismerését, különösen élő sejtekben, nagyban megnehezíti a rendelkezésre álló módszerek igencsak szűkös tárháza, mint azt a bevezető fejezetben tárgyaltuk. Élő sejtek esetében a dipólpotenciál – az eddig publikált tanulmányok alapján – feszültségérzékeny fluorofórok és spektrofluorimetria, illetve konfokális mikroszkópia segítségével vizsgálható. Ezen módszerek közül bár konfokális mikroszkópiával egyedi sejtek is vizsgálhatók, az csak alacsony áteresztőképességgel lehetséges, míg spektrofluorimetria során ugyan nagyszámú sejt tanulmányozható egyidejűleg, azonban nem nyerünk információt az egyedi sejtekre vonatkozólag, illetve nem lehetséges az élő és elhalt sejtek, valamint a mintán belüli alpopulációk elkülönítése. Az áramlási citometria ötvözi a két technika előnyeit, azaz nagymennyiségű, élő, egyedi sejt fluoreszcencia paraméterei mérhetők, azonban tudomásunk szerint áramlási citometrián alapuló, membránbiofizikai paramétereket, főleg dipólpotenciált mérő módszer még nem került publikálásra.

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 alkalmazhatóságát alátámasztandó emellett célunk volt, hogy azt különböző sejtvonalakon validáljuk, illetve bizonyítsuk, hogy az valóban elsősorban a dipólpotenciál nagyságát kvantifikálja, nem pedig egyéb membránbiofizikai paraméterekről, így a membránok fluiditásának és hidrációjának mértékéről szolgáltat információt.

A dipólpotenciál különböző patológiás állapotokban betöltött szerepének megértéséhez elengedhetetlen először is az abban bekövetkező esetleges változások megismerése, illetve a dipólpotenciál nagyságát megváltoztató, fiziológiásnak tekinthető kezelési módok feltárása. A dipólpotenciál kísérletes emelése viszonylag egyszerűbb. Például korábban modellmembránokon végzett mérések és *in silico* szimulációkkal nyert adatok szerint a dipólpotenciált növelő, az emberi szervezetben fiziológiásan is előforduló lipid a koleszterin. Ezzel szemben ***a dipólpotenciált csökkentő fiziológiás molekulát*** ismereteink szerint eddig nem írtak le, így munkánk során célunk volt egy erre alkalmas kezelési mód felderítése. Erre a célra elméleti megfontolások alapján ígéretes jelölteknek tűntek a többszörösen telítetlen zsírsavak, így ezek hatását is vizsgáltuk – a különféle szterolszármazékok, így koleszterin mellett – az általunk felállított mérési rendszerben élő sejtekben.

A zsírsavak által okozott **dipólpotenciál-változások biológiai relevanciáját is tesztelni kívántuk**. Ehhez a kezeléseknek a **penetratin, egy sejtpenetráló peptid sejtekbe történő felvételére gyakorolt hatásait** tanulmányoztuk. A sejtpenetráló peptidok a molekuláris terápia egy egyelőre kevésbé karakterizált, de rendkívül ígéretes szegletét képezik. Segítségükkel lehetőség adódik különböző – egyébként a plazmamembrán szempontjából impenetrábilis – molekulák citoszolba vagy sejtmagba történő bejuttatására, ezáltal új dimenziókat nyitva például a neurodegeneratív vagy tumoros betegségek kezelésében. A dipólpotenciál hatását tudomásunk szerint ezidáig csak kutatócsoportunk vizsgálta ezen peptidok felvételére, amely munkánk során felvetettük, hogy a dipólpotenciál csökkentése segítheti azok sejtbe jutását – a zsírsavak ilyen hatását azonban egyáltalán nem ismerjük, így célunk volt ezen lipidek lehetséges kedvező hatásainak felderítése.

A membránbiofizikai paraméterek elemzése során nem csupán a minél nagyobb számú egyedi sejt vizsgálata a cél, hanem a szubcelluláris membránrendszerek tanulmányozása is biológiai relevanciával bír. A sejtorganellek membránösszetételében megfigyelhető különbségek számos esetben ismertek – azonban élő sejtek esetében ezen eltérések molekuláris rendezettségére gyakorolt hatása jórészt feltáratlan, amelynek oka elsősorban a membránbiofizikai jellemzők intracelluláris membránokban történő tanulmányozására alkalmas módszerek hiánya. Munkánk során ezért **célunk volt egy új, könnyen alkalmazható módszer optimalizálása, amelynek segítségével lehetségessé válik a plazmamembrán és a különböző intracelluláris organellek kettősrétegeinek komparatív elemzése ép, élő sejtekben** és ezáltal feltárhatók az egyes kompartmentumok közötti különbségek, illetve a későbbiekben a különféle patológiás állapotokban kialakuló eltérések is.

Ehhez az F66 feszültség-szenzitív fluorofórt használtuk, amely kedvező spektrális tulajdonságai révén – a leggyakrabban alkalmazott hagyományos, környezeti paraméterekre szenzitív festékekkel ellentétben – jól kombinálható különféle fluoreszcens organellek markereivel, így kvantitatív konfokális mikroszkópos emissziós aránymérés során hipotézisünk szerint szelektíven tanulmányozhatóvá válik a különböző sejt-szervecskék membránjainak dipólpotenciálja, azaz a kettősrétegek strukturális szerveződése. Hipotézisünk bizonyítása és egyben módszerünk validálása céljából ezért három, egymástól alapvetően különböző, és egyben patofiziológiai jelentőséggel bíró lipideltérésekkel járó betegségek modellrendszereiként gyakran alkalmazott sejt-típus esetén tanulmányoztuk a dipólpotenciál nagyságát a plazmamembránban és a lizoszómák, a Golgi-apparátus, az endoplazmás retikulum és a mitokondriumok membránjaiban.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Alkalmazott sejtvonalak, tenyésztésük

A munkánk során alkalmazott összes sejtvonalat az American Type Culture Collections-től (ATCC, Manassas, VA, Egyesült Államok) szereztük be és a gyártó útmutatásainak megfelelően tenyésztettük 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> jelenlétében. A JY Epstein-Barr-Vírussal transzformált humán limfoblasztoid sejtvonalat Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 médiumban inkubáltuk, míg a THP-1 humán monocitoid sejtvonal tenyésztése szintén RPMI 1640 médiumban történt, amelyet 0,05 mM 2-merkaptóetanollal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok) szupplementáltunk. A HEK-293T adenovírussal immortalizált és az SV40T-antigént kódoló génnel transzfektált humán embrionális vese, az SKBR-3 humán emlő adenokarcinóma, a HeLa humán cervix adenokarcinóma és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma eredetű sejtvonalakat Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) tenyésztettük. A sejttenyésztő médiumokat minden esetben 10% fetális borjúsérummal (FCS), 1%-os L-glutaminnal és 50 µg/ml gentamicinnel egészítettük ki. Az áramlási citometriás és spektrofлуoriméteres 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 sejttenyésztő kamrákban (ibidi, Gräfelfing, Németország).

### 4.2. Alkalmazott vegyületek és reagensek

A sejtek dipólpotenciáljának megváltoztatására használt 6-ketokolesztanol (6KC, 3 $\beta$ -hidroxil-5 $\alpha$ -kolesztan-6-on) és phloretint (3-(4-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)propan-1-on), valamint az ezek gyors sejtmembránba épüléséhez alkalmazott Pluronic F-127 nem-ionos detergenst a Sigma-Aldrich-től rendeltük. A sejtmembrán szteroltartalmának megváltoztatásához a 6KC, koleszterin (CHOL, Sigma-Aldrich) és 7-dehidrokoleszterin (7DHC, 5,7-kolesztadien-3 $\beta$ -ol) random metil- $\beta$ -ciklodextrinnel (M $\beta$ CD) alkotott komplexeit használtuk, melyeket a Cyclolab Kft. (Budapest, Magyarország) állított elő számunkra. A komplexekben a szterolok relatív tömege 5% körül volt. A telített sztearinsavat (SA), többszörösen telítetlen  $\omega$ -3  $\alpha$ -linolénsavat (ALA) és a többszörösen telítetlen  $\omega$ -6  $\gamma$ -linolénsavat (GLA) szintén a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

A dipólpotenciál mérésére használt di-8-ANEPPS (4-(2-[6-(dioktilamino)-2-naftalenil]etenil)-1-(3-szulfopropil)piridinium belső só) festéket a Thermo Fisher-től (Waltham, MA, Egyesült Államok) vásároltuk, míg az F66 (N-[3-(40-dihexilamino-3-hidroxil-flavonil-6-oxi)-propil]-N,N-dimetil-N-(3-szulfopropil)-ammónium, belső só) Andrey Klymchenko (Université de Strasbourg, Strasbourg, Franciaország) ajándéka volt. A sejtmembrán fluiditásának vizsgálatához használt TMA-DPH (4'-(trimetilammonio)-difenilhexatrién) a Sigma-Aldrich-től rendeltük. A membránhidráció

meghatározásához használt PY3174 (4-[2-(6-dibutilamino-5-fluoro-naftalen-2-il)-vinil]-1-(3-trietilammonio-propil)-piridinium dibromid) fluorofór Leslie M. Loew (University of Connecticut, CT, USA) ajándéka volt. A sejtek életképességének vizsgálata során használt Sytox Green és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V fluorofórokat a Thermo Fisher-től szereztük be.

Az intracelluláris organellek vizualizációjához használt vegyületeket, így a CellLight™ ER-GFP, BacMam 2.0-t, a CellLight™ Golgi-RFP, BacMam 2.0-t, a LysoTracker™ Deep Red-et, illetve a MitoTracker™ Deep Red FM-et a Thermo Fisher-től rendeltük.

A kalibrációs pH oldatok elkészítéséhez alkalmazott valinomycin és nigericin a Sigma-Aldrich-től származott.

#### 4.3. A sejtmembrán összetételének és dipólpotenciáljának módosítása

Kísérleteink során új mérési módszerünk validálása és a korábban publikált eredményekkel való összehasonlíthatóság érdekében a THP-1 és JY sejtek membránjának dipólpotenciálját az arra széleskörben alkalmazott vegyületekkel módosítottuk (21, 22). A dipólpotenciál növelésére 6KC-t, csökkentésére pedig phloretint alkalmaztunk különböző, 20, 40, 80, 120, 160 és 200  $\mu\text{M}$  koncentrációkban. A két vegyület sejtmembránba történő beépülésének gyorsítására és ezáltal az inkubációs idő lerövidítésére a kezeléseket 0,05% (v/v) Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) oldószer jelenlétében végeztük. A detergens micellákat képez az alkalmazott vegyületekkel, ezáltal azok könnyedén a sejtmembrán külső rétegébe épülhetnek és így a hatékony inkorporációhoz szükséges idő korábbi kísérletek alapján mindössze 10 percre csökken (104, 105). A fenti vegyületek az alkalmazott koncentrációkban korábbi méréseink alapján nem befolyásolják jelentősen sem a sejtek életképességét, sem pedig a nyugalmi transzmembrán potenciál értékét (14, 23). A kísérleteknél az ekvivalens mennyiségű Pluronic F-127 vegyülettel kezelt mintát tekintettük kontrollnak

A sejtmembrán szteroltartalmának módosítására a THP-1 és JY sejteket 60 percre inkubáltuk szobahőmérsékleten CHOL, 7DHC és 6KC M $\beta$ CD-vel alkotott komplexeivel normál Ringer oldatban (összetétele mM-ban: 145 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 5,5 glükóz, 2,5 CaCl<sub>2</sub> és 1 MgCl<sub>2</sub>; pH 7,35) különböző, 12,5, 25, 50, 100 és 200  $\mu\text{g}$  szterol/ml koncentráció mellett. Kontrollként ekvivalens koncentrációjú, „üres”, azaz szterolokat nem tartalmazó M $\beta$ CD-vel kezeltük a sejteket.

A különböző zsírsavak hatásának vizsgálatához a THP-1 és JY sejteket 48 órán át 12,5, 25 és 50  $\mu\text{M}$  SA, ALA vagy GLA jelenlétében inkubáltuk. A zsírsavakat a kezelés során a sejtenyésző médiumba adagoltuk.

#### 4.4. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása di-8-ANEPPS és spektrofлуориметрия segítségével

A kezeletlen, illetve a fenti módon kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után 2  $\mu$ M koncentrációjú di-8-ANEPPS-sel jelöltük 20 percig jégen, majd mosást követően a mérést közvetlenül megelőzően a mintákat 37°C-ra melegítettük. A méréseket Fluorolog-3 spektrofлуоримéterrel (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, Egyesült Államok) végeztük úgy, hogy a mintatartó küvettákat 37°C-os vízfürdő segítségével tartottuk állandó hőmérsékleten. A di-8-ANEPPS dipólpotenciál iránti szenzitivitása az elektrokrómos vagy Stark-effektuson alapszik, azaz a molekula gerjesztési és emissziós spektruma eltolódik a lokális elektromos térben bekövetkező változások hatására. A dipólpotenciálban bekövetkező változások detektálására gerjesztési spektrumot rögzítettünk, mivel irodalmi adatok szerint azt jóval kevésbé befolyásolják egyéb membránbiofizikai paraméterek, például a fluiditás (21). 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 integráljának hányadosával (11, 15, 21, 22, 30, 34, 57, 58).

#### 4.5. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása F66 és áramlási citometria segítségével

A kezeletlen, illetve a fenti módon kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után 10 nM koncentrációjú F66-tal jelöltük 20 percig jégen, majd mosást követően a mérést közvetlenül megelőzően a mintákat 37°C-ra melegítettük. Ezután az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását FACS Aria III áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Mountain View, CA, Egyesült Államok) vizsgáltuk 37°C-on. A festék használata a gerjesztett állapotú intramolekuláris protontranszfer (ESIPT) reakción alapul, mely átmenetet jelent a molekula normál ( $N^*$ ) és tautomer ( $T^*$ ) gerjesztett állapotai között és az  $N^*$  és  $T^*$  állapotokból történő relaxáció két, jól elkülönülő emissziós tartományt eredményez. A mintákat ezért 405 nm hullámhosszúságú lézerrel gerjesztettük, majd az F66 által emittált intenzitást pedig a fluorofór  $N^*$  és  $T^*$  gerjesztett állapotainak megfelelően rendre 480/20 nm-es, valamint 585/42 nm-es sávszűrők segítségével detektáltuk. Az adatok elemzését FCS Express szoftverrel (De Novo Software, Los Angeles, CA, Egyesült Államok) 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, melyet a lokális elektromos erőternek az ESIPT reakcióra gyakorolt hatása magyaráz (14, 16).

#### 4.6. A sejtek életképességének meghatározása

Az általunk alkalmazott dipólpotenciált és sejtmembrán-összetételt módosító kezelések esetleges citotoxicitását vizsgálendő THP-1 és JY sejteket 24-lyukú kamrákban tenyésztettünk, majd a kontroll, illetve a fent leírt módon kezelt mintákat 5  $\mu\text{M}$  koncentrációjú Sytox Green, illetve 1:20 arányban hígított AlexaFluor647-annexin V markerekkel jelöltük ún. annexinkötő pufferoldatban 15 percig, szobahőn, az egyéb tanulmányainkban is alkalmazott módon (10, 106). Az egyedi sejtek vizsgálatát ezt követően NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel végeztük (ACEA Biosciences, San Diego, CA, Egyesült Államok). A gerjesztéshez, illetve az emittált intenzitások detektálásához 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 annexin V markerre nézve negatív, élő sejtek arányát az összes sejthez képest.

#### 4.7. A sejtmembrán fluiditásának meghatározása TMA-DPH és spektrofлуорimetria segítségével

A sejtmembrán fluiditásának meghatározásához a szakirodalomban leginkább elfogadott módszernek megfelelően (10, 34, 107-110) a kezeletlen, illetve a fenti módon kezelt THP-1 és JY sejteket mosás után Hank's pufferben oldottuk fel, 10  $\mu\text{M}$  koncentrációjú TMA-DPH-val jelöltük 20 percig szobahőn, majd mosás nélkül a mérést közvetlenül megelőzően a mintákat 37°C-ra melegítettük. A méréseket Fluorolog-3 spektrofлуорiméterrel végeztük úgy, hogy a mintatartó küvettákat 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.

#### 4.8. 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 10  $\mu$ M koncentrációjú PY3174 fluorofórral jelöltük 20 percig szobahőn, majd mosást követően 8-lyukú fedőlemez aljú kamrákba cseppentettük. Ezután LSM880 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) felvételeket készítettünk a sejtekről a középsíkjuknak megfelelően. Mivel a festék emissziós spektruma a lokális hidrofobicitás, azaz a membrán hidrációjának függvényében eltolódik (108, 111), 488 nm-es hullámhosszúságú lézerrel történő gerjesztést követően az emisszió detektálását két hullámhossz tartományban, 500 nm és 540 nm ( $I_{kék}$ ), valamint 630 nm és 735 nm ( $I_{piros}$ ) között végeztük. Az elkészült felvételek kvantitatív elemzéséhez a Matlab (Mathworks, Natick, MA, Egyesült Államok) 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.

#### 4.9. A penetratin szintézise és jelölése fluorofórokkal

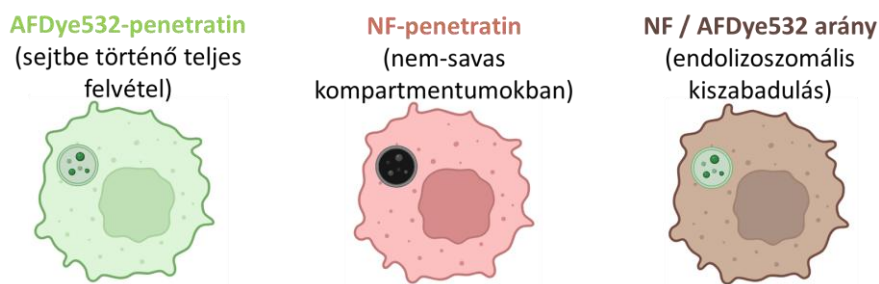
A penetratint (aminosavsorrendje: RQIKIWFQNRRMKWKK, molekulatömege 2245,75 g/mol) manuálisan állította elő kollaborációs partnerünk, Dr. Mándity István (Simmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország) TentaGel R RAM polisztrén PEG kopolimer gyantán (Rapp Polymere, Tübingen, Németország) a szilárdfázisú Merrifield standard Fmoc technikával, munkacsoportunk korábbi közleményében részletesen ismertetett módon (34). Az utolsó arginin csoport konjugációját követően az előállított penetratinhoz AFDye532 N-hidroxisukcinimid észtert (molekulatömeg 723,77 g/mol, Fluoroprobes, Scottsdale, AZ, Egyesült Államok), vagy 5(6)-karboxinaftofluoreszcein N-

szukcinimidil észtert (molekulatömeg 573,51 g/mol, Setareh, Eugene, OR, Egyesült Államok) 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 (JASCO, Victoria, BC, Kanada) eljárással, majd liofilizáltuk. Az így kapott végtermék tisztaságát C18-as analitikai oszloppal, fordított fázisú HPLC (JASCO) eljárással teszteltük és az 95% fölöttinek adódott. A jelölt peptidek jelenlétét Bruker elektropray ionizációs tömegspektrometriával erősítettük meg és az AFDye532, illetve az NF-konjugált penetratinok molekulatömege 2983,548 és 2832,5 g/mol volt, amely értékek jó egyezést mutattak az elméletileg várható értékekkel (2983,59 és 2833,33 g/mol).

#### 4.10. A penetratinok felvételének és endolizoszomális felszabadulásának vizsgálata áramlási citométerrel

A penetratinok felvételének és endolizoszomális felszabadulásának vizsgálatára szolgáló módszert munkacsoportunk korábbi munkája során optimalizálta és publikálta (34). A zsírsavak ezen folyamatok hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálatára a THP-1 és JY sejteket a fentebb leírt módon inkubáltuk SA-t, ALA-t vagy GLA-t 50  $\mu$ M-os koncentrációban tartalmazó médiumban. Ezután a sejteket FACS Aria III áramlási citométerrel vizsgáltuk úgy, hogy a mérés előtt közvetlenül 5  $\mu$ M AFDye532-penetratint, 5  $\mu$ 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 szórásképen 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 fluoreszcencia intenzitását érdemben nem befolyásolja a pH változása, így az a sejtbe került penetratin teljes mennyiségéről szolgáltat információt. Ezzel szemben az NF-penetratin fluoreszcencia intenzitása csökken a savasabb pH hatására, így az az endolizoszomális rendszerből kikerült, nem savas közegben található penetratin mennyiségét jelzi, míg NF/AFDye532 hányados értékéből az endolizoszomális felszabadulás mértékére következtethetünk (112). **(7. ábra)** 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.



#### 7. ábra: A penetratin sejtbe történő felvételének és endolizoszomális kiszabadulásának vizsgálata

A szintetizált penetratin egyik felét AFDye532, a másik felét pedig naftofluorescein (NF) fluorofórral konjugáltuk. Az AFDye532 fluoreszcencia intenzitását a környező pH nem befolyásolja érdemi mértékben, így áramlási citometria során az adott sejt esetén meghatározott intenzitás a sejtbe jutott penetratin teljes mennyiségéről ad információt, függetlenül a penetratin szubcelluláris lokalizációjától. Az NF ezzel szemben egy pH-szenzitív fluorofór, intenzitása jelentősen csökken a savasabb pH hatására, így az az endolizoszomális rendszerből kikerült, nem savas közegben található penetratin mennyiségét jelzi. A két fluorofór intenzitásának arányának (NF / AFDye532) értékéből ezáltal az endolizoszomális felszabadulás mértékére következtethetünk.

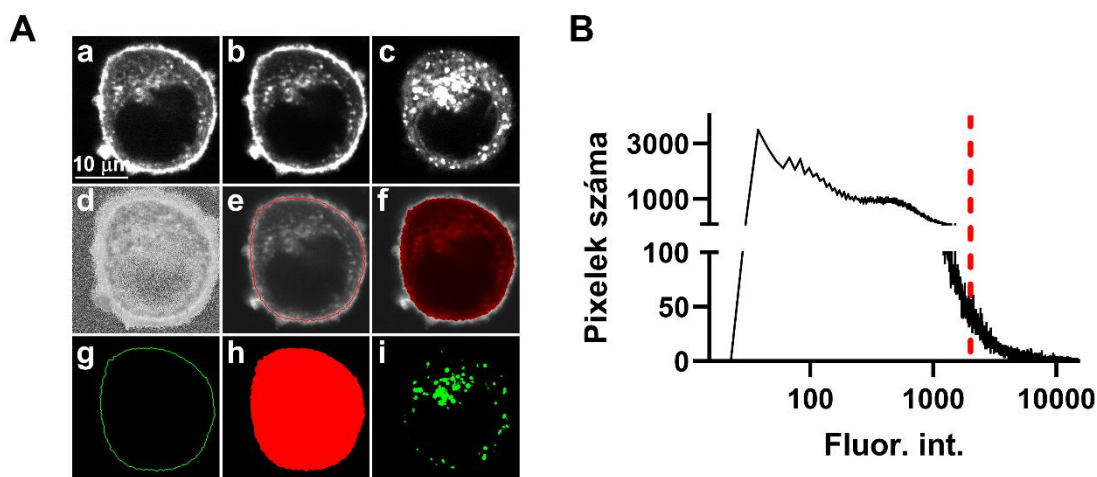
#### 4.11. A sejtek jelölése intracelluláris organelum markerekkel és a dipólpotenciálra szenzitív F66 fluorofórral

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, melyhez a sejttenyésztő médiumokat 30 részecske/sejt koncentrációban dúsítottuk a vegyületekkel, melyet 24 órán keresztül 37°C-on 5%-os CO<sub>2</sub> jelenlétében történő inkubáció követett a megfelelő expresszió érdekében. A lizoszómákat LysoTracker™ Deep Red, míg a mitokondriumokat MitoTracker™ Deep Red FM segítségével vizualizáltuk. Mindkét fenti vegyületet 50 nM-os koncentrációban adtuk a sejttenyésztő médiumhoz, a sejteket 45 percig 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubálva. Az intracelluláris organelumok dipólpotenciáljának meghatározásához kettős jelölési protokollt alkalmaztunk. A sejteket egyrészt 24 órán keresztül inkubáltuk 10 nM F66-tal, amelyet a sejttenyésztő médiumba adagoltunk, biztosítva a fluorofór megfelelő dúsulását az intracelluláris membránokban. Másrészt, a plazmamembrán egyértelmű azonosításának érdekében, az inkubáció utolsó 10 percében további 10 nM F66-ot adtunk a sejtekhez. Utóbbi jelölés normál Ringer oldatban történt. 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 µM valinomicint és 10 µM nigericint tartalmaztak. Utóbbi két vegyületet az extra- és intracelluláris pH kiegyenlítése érdekében alkalmaztuk, hasonlóan korábbi tanulmányunkhoz (106).

#### 4.12. 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 lézerpásztázó mikroszkóppal konfokális felvételeket készítettünk. A dipólpotenciál meghatározásához az F66 fluorofórt 405 nm-en gerjesztettük, az emissziót pedig a festék normál és tautomer gerjesztett állapotainak megfelelően rendre 463-527 nm és 543-589 nm között detektáltuk. Ugyanezen sejteken szekvenciálisan az intracelluláris organellumok 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, 570-640 nm, illetve 650-735 nm-es sávokban detektáltuk. Az egyes sejtekről 512x512 pixel felbontású, pixelenként 52 nm méretű felvételek készültek, mely pixelenként 8,24  $\mu$ s-ot vett igénybe, azaz egy kép rögzítésének teljes ideje 2,16 s volt.

Az elkészült felvételek kvantitatív elemzéséhez a Matlab szoftvert alkalmaztuk és a folyamat főbb lépéseit a **8. ábrán** foglaltuk össze. A plazmamembránnak megfelelő pixelek azonosításához, illetve egy, az intracelluláris régiót kijelölő maszk létrehozásához a fentebb említett, munkacsoportunk által írt kézi kijelölésű vízfeltöltéses algoritmust alkalmaztuk, melynek első lépéseként a felhasználó az F66-ról készült konfokális képen felismerhető valamennyi sejt belsejébe pontot helyez. Az algoritmus ezután a felvételt domborzati térképként kezeli, ahol az egyes pixelek „magassága” azok fluoreszcencia intenzitásától függ – vagyis az egyedi sejtek plazmamembránjainak megfelelő, magas intenzitással rendelkező „hegyek” határolják az intracelluláris „medence” régiókat. Az algoritmus a képet a manuálisan elhelyezett pontokból indulva „feltölti” vízzel és sejthatáráként azon régiókat azonosítja, ahol két medence között „átcsap” a víz. A felhasználó által rögzített pontokra a túlszegmentáció elkerülése érdekében van szükség. Az organellumok azonosításához ezután a fenti algoritmus által kijelölt intracelluláris régió pixeleinek adott markerhez tartozó fluoreszcencia intenzitását vizsgáltuk. Egy úgynevezett „maximum entrópia” algoritmus segítségével – manuális ellenőrzést követően – meghatároztunk egy határértéket, mely fölött az adott pixelt a vizsgált organellumhoz tartozóként definiáltuk. Ezt követően minden pixelben a háttérintenzitások levonása után kiszámítottuk a dipólpotenciál nagyságával pozitív korrelációt mutató F66  $T^*/N^*$  arányt, majd meghatároztuk az arány medián értékét minden egyes egyedi sejt esetén külön-külön a plazmamembránnak, illetve az adott organellum membránnak megfelelő pixelek adataiból. A különböző intracelluláris régiók közötti relatív különbségek elemzése céljából kiszámítottuk az adott organellumok membránjában az F66  $T^*/N^*$  emissziós arány mediánjának az ugyanazon sejt plazmamembránjában kapott medián arányra normált értékét.



**8. ábra: Az intracelluláris organellemek membránrégióinak azonosítása organellem-specifikus markerek fluoreszcencia intenzitása alapján konfokális mikroszkópos felvételeken kvantitatív képelemzés során**

8-lyukú, fedőlemez aljú sejttenyésztő kamrákban SKBR-3 sejteket tenyésztettünk, majd F66 és LysoTracker Deep Red fluorofórokkal jelöltünk. (A) Egy adott sejt középvonalának megfelelő síkban konfokális mikroszkópos felvételeket készítettünk az F66 N\* normál (a) és T\* tautomer (b) gerjesztett állapotának, illetve a LysoTracker Deep Red fluorofórnak (c) megfelelő beállításoknak megfelelően, ahogy a reprezentatív képeken is látható. A kvantitatív képanalízis során a háttérintenzitásra történő korrekciót követően pixelenként meghatároztuk a dipólpotenciállal pozitívan korreláló T\*/N\* emissziós arányt (d). Kézi kijelölésű vízfeltöltési algoritmus segítségével a képeket plazmamembrán (e) és intracelluláris (f) pixelrégiókra osztottuk, egyúttal definiáltunk egy, a plazmamembránt (g), illetve az intracelluláris területet (h) magába foglaló maszkot. A LysoTracker Deep Red-del (c) készült felvételen „maximum entrópia” algoritmus segítségével meghatároztunk egy határértéket, mely fölött az adott pixelt a további adatelemzés szempontjából a vizsgált organellem membránjaihoz tartozó területként definiáltuk (i). (B) Az intracelluláris területen pixelenként mért, organellem-marker fluoreszcencia intenzitásának eloszlását bemutató reprezentatív hisztogramon a piros vonal a maximum entrópia algoritmus által megadott határértéket mutatja, mely feletti intenzitásértékkel bíró pixeleket az adott organellem membránrégiójaként definiáltuk. Az egyedi sejtekben a medián F66 T\*/N\* emissziós arányt a plazma- és organellem membránoknak megfelelő pixelek adataiból külön-külön határoztuk meg.

#### 4.13. Statisztikai elemzés

A spektrofluorimetria, illetve áramlási citometria során a legalább öt (n) független kísérletből nyert adatokat átlag  $\pm$  SD formájában tüntettük fel. Az áramlási citométerrel végzett mérések során minden független kísérletben mintánként legalább 20 000 sejtet elemeztünk, míg a spektrofluorimetriás minták átlagosan 150 000 sejtet tartalmaztak. A szterol-M $\beta$ CD komplexekkel végzett kísérletekben az értékeket az ekvivalens mennyiségű natív M $\beta$ 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, valamint ezek átlagértékeit ( $\pm$  SD) ábrázoltuk.

Minden kép 10-15 normál morfológiájú sejtre vonatkozó adatokat tartalmazott, kezelésként összesen 200-300 sejttel. A celluláris membránok dipólpotenciáljának vizsgálata során a mért adatokat általánosságban hegedűdiagramon ábrázoltuk, amelyeken a mediánértékeket és a kvartiliseket is jelöltük, és amelyeket öt független kísérletből származó,  $n=107-154$  normál morfológiájú egyedi sejt medián  $F66\ T^*/N^*$  emissziós arányértékei alapján készítettünk.

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 organellum  $F66$  arányainak összehasonlításakor (**18-21. ábrák**) 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 (La Jolla, CA, Egyesült Államok) végeztük.

## 5. Eredmények

### 5.1. A phloretin és a 6-ketokolesztanol dipólpotenciálra gyakorolt hatása

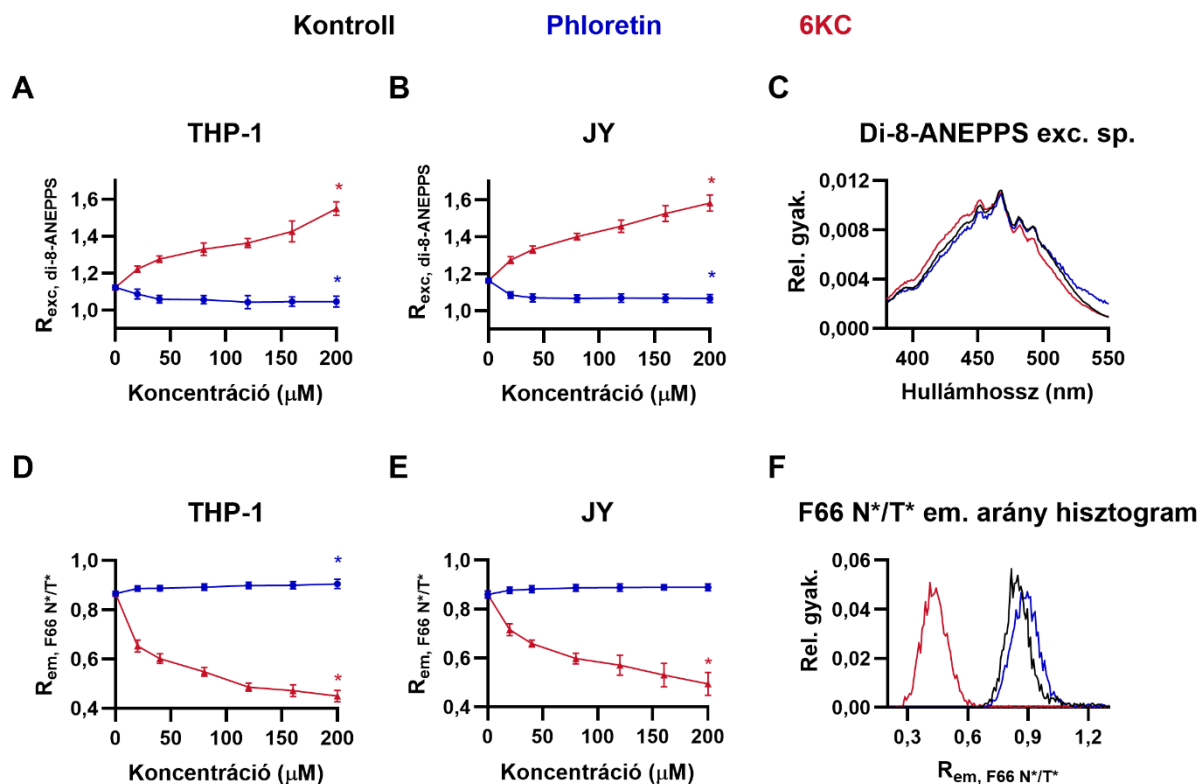
Az új, áramlási citometriás dipólpotenciál mérési eljárásunk kidolgozásához és validálásához szükségünk volt egy referenciamódszere – a szakirodalomban erre a célra leggyakrabban használt di-8-ANEPPS fluoroforra esett választásunk, melyet egy általánosan elterjedt spektrofлуorimetriás eljárással vizsgáltunk (11, 15, 21, 22, 30, 34, 57, 58). Először a dipólpotenciál módosítására leggyakrabban alkalmazott phloretin és 6KC (14, 21-23) hatását vizsgáltuk az általunk felállított mérési rendszerekben. A vegyületek membránba történő beépülését elősegítendő az inkubáció Pluronic F-127, egy hidrofil, nem ionos detergens jelenlétében történt (104, 105).

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 (**9. ábra A, illetve B panel**). A legnagyobb változásokat a vizsgált maximális dózis, 200  $\mu$ M esetében tapasztaltuk. 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-val szemben a maximális, 200  $\mu$ M-os koncentrációnál is. A leírt változások jól megfigyelhetők a reprezentatív gerjesztési spektrumok kék, illetve vörös irányú eltolódásán is a 6KC, illetve a phloretin hatására (**9. ábra C panel**).

Bizonyos 3-hidroxiflavon származékok emissziós spektruma megváltozik a lokális elektromos erőter függvényében (14, 16, 63-65), így elméletben alkalmazhatóak a dipólpotenciál nagyságának áramlási citométerrel történő vizsgálatára. Ezt alátámasztandó THP-1 és JY sejteket a fentiekhez hasonlóan 6KC-val és phloretinnel kezeltünk különböző koncentrációkban, majd a festékcsalád egy újonnan leírt tagjával, az F66-tal jelölve őket 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 (14, 16, 64).

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 (**9. ábra D és E panel**), 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 a JY sejtvonal esetében nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A maximális, 200  $\mu$ M-os kezelési koncentrációk hatására bekövetkező

változásokat szemléltetik a bemutatott reprezentatív  $N^*/T^*$  emissziós arány hisztogramok, melyeken jól látható a 6KC által okozott negatív, illetve a phloretin hatására létrejövő pozitív irányú eltolódás (9. ábra F panel).



**9. ábra: phloretin és 6-ketokolesztanol dipólpotenciál nagyságára gyakorolt hatása.**

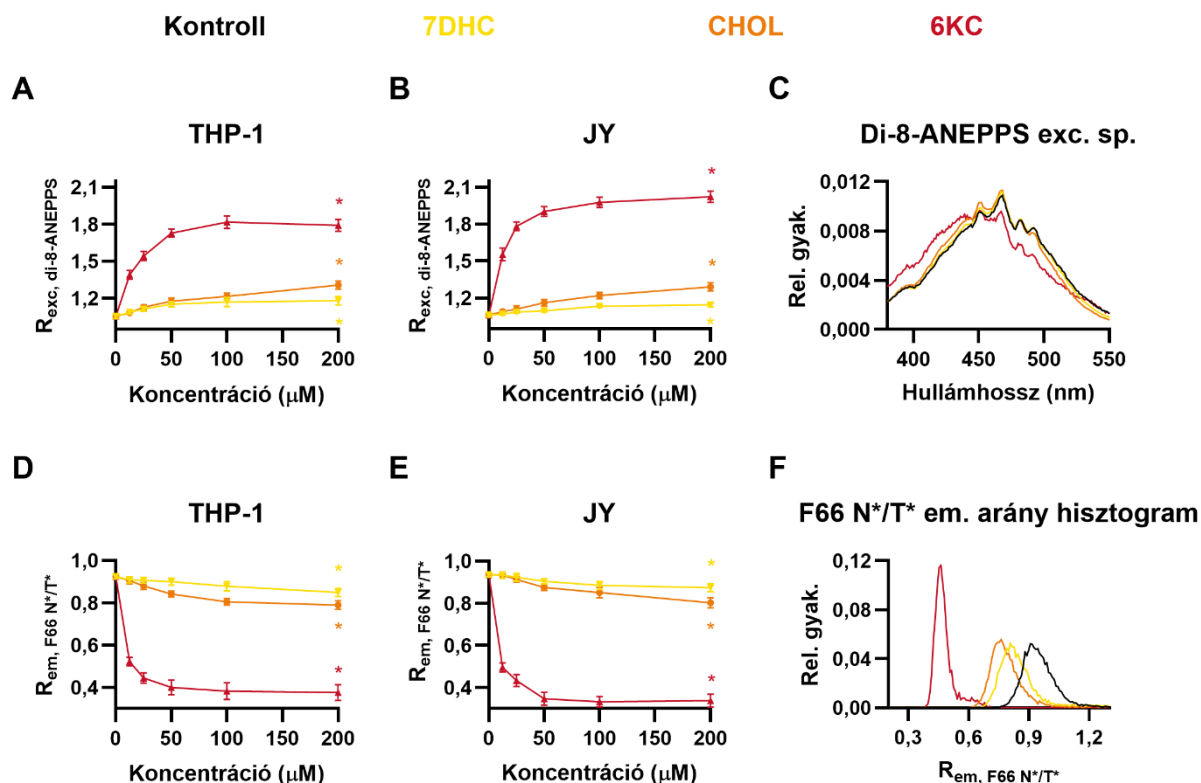
THP-1 (A) és JY (B) sejteket 20 és 200  $\mu M$  koncentrációtartományban phloretin és 6-ketokolesztanol (6KC) vegyületekkel kezeltünk és di-8-ANEPPS-sel jelöltünk, majd spektrofluoriméter segítségével meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló integrált fluoreszcencia intenzitás arányt ( $R_{exc, di-8-ANEPPS}$ ), melyet két szélső, egy alacsonyabb (410-440 nm) és egy magasabb (490-520 nm) hullámhosszúságú tartományban mértünk. Öt független mérés átlagát ( $\pm SD$ ) ábrázoltuk a koncentráció függvényében phloretin (sötétkék) és 6KC (vörös) esetében. A gerjesztési spektrumban a kontrollhoz (fekete) képest bekövetkező változások jól megfigyelhetők a rögzített reprezentatív spektrumokon (C). A phloretinnel és 6KC-vel történő kezeléseket megismételve a THP-1 (D) és JY (E) sejteket F66-tal jelöltük, majd áramlási citométer segítségével legalább 20 000, az FSC-SSC szóráskepen normál morfológiát mutató, azaz élőnek tekinthető sejt esetében meghatároztuk a fluorofór normál ( $N^*$ ) és tautomer ( $T^*$ ) gerjesztett állapotainak megfelelő (rendre 470-490 nm és 564-606 nm) tartományokban mért fluoreszcencia intenzitásainak arányát ( $R_{em, F66 N^*/T^*}$ ). Öt független mérés átlagát ( $\pm SD$ ) ábrázoltuk a koncentráció függvényében phloretin és 6KC esetében. Az emissziós spektrumban a kontrollhoz (fekete) képest bekövetkező változások jól megfigyelhetők az  $R_{em, F66 N^*/T^*}$  reprezentatív hisztogramokon (F). A csillagok (\*) a maximális kezelési koncentrációk mellett tapasztalt statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

## 5.2. Különböző szterolszármazékok dipólpotenciálra gyakorolt hatása

A dipólpotenciál nagyságát alapvetően befolyásolja a sejtmembránban található szterolok, elsősorban a koleszterin mennyisége (15, 17, 18), így kézenfekvő volt módszerünk validálása különböző szterolok (7DHC, CHOL és 6KC) M $\beta$ CD-vel alkotott komplexeivel történő kezelések segítségével. Bár, amint azt az 5.1. fejezetben leírtuk, a 6KC membránba történő beépülése elérhető Pluronic F-127 segítségével is, ezen kísérleteinkben az eredmények összehasonlíthatóságának biztosítása érdekében a 6KC-t is M $\beta$ CD-vel juttattuk a sejtmembránba. Korábbi, elsősorban modellmembránok tanulmányozása során nyert adatok alapján mindhárom szterol képes növelni a dipólpotenciál nagyságát – ebből a szempontból a leghatékonyabb származék a 6KC, míg legkevésbé hatékony a 7DHC (15, 18, 19, 113).

Spektrofluorimetriás méréseink ezen irodalmi adatokkal összhangban azt mutatták, hogy mindhárom szterol dóziszfüggő módon növelte az  $R_{exc}$ , di-8-ANEPPS értékét, azaz a dipólpotenciált és a változások az alkalmazott maximális, 200  $\mu$ M koncentrációban statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak (**10. ábra A, illetve B panel**). A leghatékonyabb származéknak a 6KC bizonyult, ezt követte a CHOL, majd a 7DHC. Hasonló eredményeket tapasztaltunk mindkét vizsgált sejtvonal esetében, azaz a THP-1 és JY sejtekben is. A szterolok hatására bekövetkező, jelentős mértékű, alacsonyabb hullámhosszok felé történő eltolódás jól megfigyelhető a reprezentatív di-8-ANEPPS gerjesztési spektrumokon is (**10. ábra C panel**).

A kezeléseket megismételve, F66-tal történő jelölést követően áramlási citométerrel is elvégeztük méréseinket. THP-1 sejtek esetében – a di-8-ANEPPS-sel kapott eredményeinkkel teljes összhangban és azokhoz hasonló mértékben – valamennyi szterolszármazék dóziszfüggően növelte a dipólpotenciál nagyságát, mely az  $R_{em}$ , F66  $N^*/T^*$  arány csökkenéséből látható (**10. ábra D panel**). A változás maximális, 200  $\mu$ M-os kezelési koncentráció mellett mindhárom vizsgált vegyület esetében statisztikailag szignifikánsnak adódott. JY sejtek esetében is a THP-1 sejtvonalnál, illetve a di-8-ANEPPS-sel végzett méréseink során tapasztaltakkal egybecsengő eredményeket kaptunk és mindhárom vizsgált vegyület ebben az esetben is szignifikáns eltéréseket produkált (**10. ábra E panel**). A leírt változásokat szemléltetik a bemutatott reprezentatív F66  $N^*/T^*$  emissziós arány hisztogramok is, melyeket maximális, 200  $\mu$ M-os kezelési koncentrációk mellett készítettünk és amelyeken jól megfigyelhetők a különböző szterolszármazékok hatására bekövetkező, negatív irányú eltolódások (**10. ábra F panel**).



**10. ábra: 7-dehidrokoleszterin, koleszterin és 6-ketokolesztanol dipólpotenciálra gyakorolt hatása.** THP-1 (A) és JY (B) sejteket 12,5 és 200  $\mu\text{M}$  koncentrációtartományban 7-dehidrokoleszterin (7DHC), koleszterin és 6-ketokolesztanol (6KC) vegyületekkel kezeltünk és di-8-ANEPPS-sel jelöltünk, majd spektrofotométer segítségével meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló integrált fluoreszcencia intenzitás arányt ( $R_{\text{exc, di-8-ANEPPS}}$ ), melyet két szélső, egy alacsonyabb (410-440 nm) és egy magasabb (490-520 nm) hullámhosszúságú tartományban mértünk. Öt független mérés átlagát ( $\pm\text{SD}$ ) ábrázoltuk a koncentráció függvényében 7DHC (citromsárga), koleszterin (narancssárga) és 6KC (vörös) esetében. A gerjesztési spektrumban a kontrollhoz (fekete) képest bekövetkező változások jól megfigyelhetők a rögzített reprezentatív spektrumokon (C). A 7DHC-val, koleszterinnel és 6KC-vel történő kezeléseket megismételve THP-1 (D) és JY (E) sejteket F66-tal jelöltük, majd áramlási citométer segítségével legalább 20 000, az FSC-SSC szórásképen normál morfológiát mutató, azaz élőnek tekinthető sejt esetében meghatároztuk a fluorofór normál ( $N^*$ ) és tautomer ( $T^*$ ) gerjesztett állapotainak megfelelő (rendre 470-490 nm és 564-606 nm) tartományokban mért fluoreszcencia intenzitásainak arányát ( $R_{\text{em, F66 } N^*/T^*}$ ). Öt független mérés átlagát ( $\pm\text{SD}$ ) ábrázoltuk a koncentráció függvényében 7DHC, koleszterin és 6KC esetében. Az emissziós spektrumban a kontrollhoz (fekete) képest bekövetkező változások jól megfigyelhetők az  $R_{\text{em, F66 } N^*/T^*}$  reprezentatív hisztogramokon (F). A csillagok (\*) a maximális kezelési koncentrációk mellett tapasztalt statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

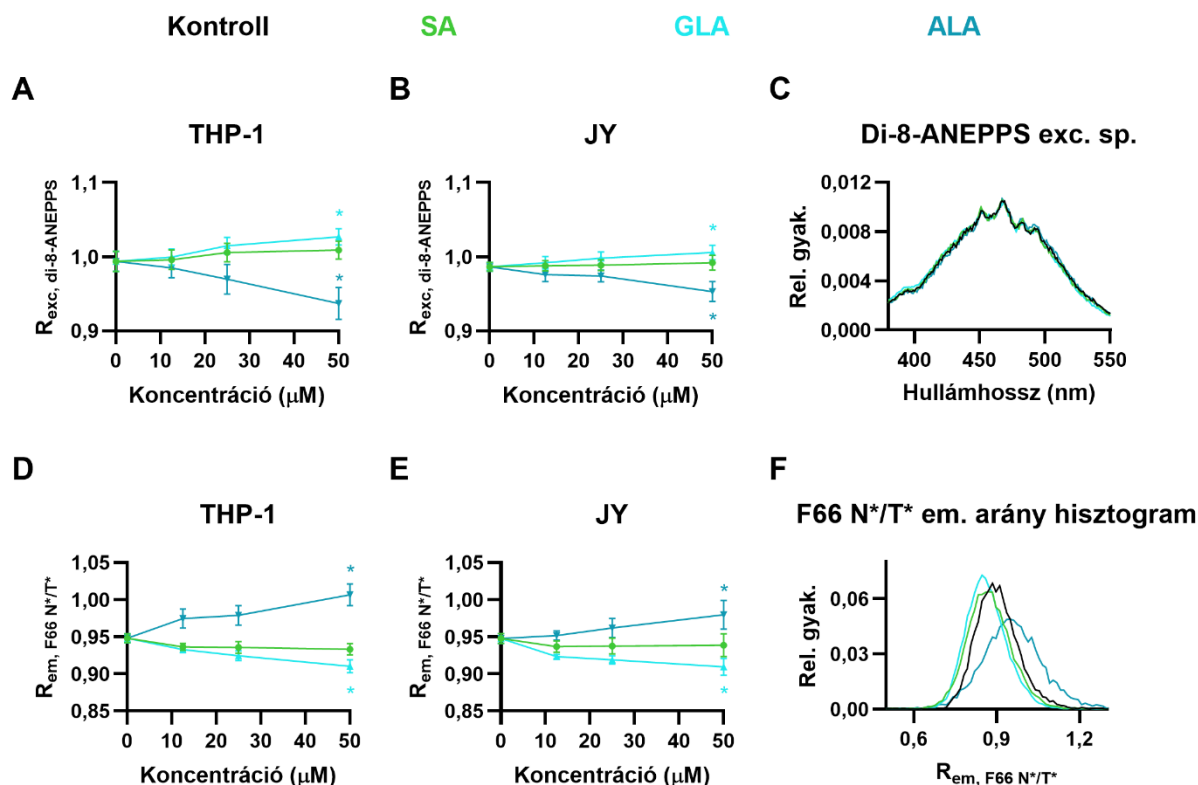
### 5.3. Különböző zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatása

A dipólpotenciált leginkább meghatározó tényezőként a szterolszármazékokat tartjuk számon, azonban egyéb membránlipidek, például foszfo- és szingolipidek is befolyásolhatják nagyságát (10, 11), ezért következő lépésben megvizsgáltuk ezen lipidek fontos alkotóelemeinek, különböző

zsírsavaknak a dipólpotenciálra gyakorolt hatását. A THP-1 és JY sejtekben a többszörösen telítetlen  $\omega$ -3  $\alpha$ -linolénsavval (ALA), az  $\omega$ -6  $\gamma$ -linolénsavval (GLA) és telített analógjukkal, a sztearinsavval (SA) történő kezelések 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 dóziszfüggően, az általunk vizsgált maximális, 50  $\mu$ M-os koncentráció mellett szignifikánsan csökkentette a dipólpotenciál nagyságát – mely az  $R_{exc, di-8-ANEPPS}$  csökkenéséből látható – mind a THP-1, mind a JY sejtvonalak esetében (**11. ábra A, illetve B panel**). Az SA esetében ezzel ellentétes módon kissé emelkedett  $R_{exc, di-8-ANEPPS}$  értékeket találtunk, mely a dipólpotenciál növekedésére utalhat, azonban az általunk leírt változások nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak egyik sejtvonal esetében sem. Várakozásainkkal ellentétben ugyanakkor a GLA esetében az  $R_{exc, di-8-ANEPPS}$ , azaz a dipólpotenciál szignifikánsan emelkedett mind THP-1, mind pedig JY sejtekben. A zsírsavaknál észlelt, relatíve kisebb mértékű változások megfigyelhetők a reprezentatív di-8-ANEPPS gerjesztési spektrumok ellentétes irányú eltolódásán is ALA és GLA hatására (**11. ábra C panel**).

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 dóziszfüggően, szignifikánsan növelte  $R_{em, F66 N^*/T^*}$  arányt – azaz a dipólpotenciát csökkentette –, míg a GLA és SA ezzel ellentétes hatást mutatott (utóbbi ebben az esetben sem érte el a szignifikancia küszöbét) (**11. ábra D, illetve E panel**). Az  $R_{em, F66 N^*/T^*}$  arányban észlelt változásokat, illetve azok hiányát ezesetben is jól szemléltetik a reprezentatív F66  $N^*/T^*$  emissziós arány hisztogramok, ugyanis ALA hatására pozitív, míg GLA hatására negatív eltolódás figyelhető meg, míg az SA nem befolyásolja érdemben a hisztogramot még a legnagyobb alkalmazott koncentrációs esetében sem (**11. ábra F panel**).



**11. ábra:  $\alpha$ -linolénsav,  $\gamma$ -linolénsav és sztearinsav dipólpotenciál nagyságára gyakorolt hatása**  
 THP-1 (A) és JY (B) sejteket 12,5 és 50  $\mu$ M koncentrációtartományban  $\alpha$ -linolénsav (ALA),  $\gamma$ -linolénsav (GLA) és sztearinsav (SA) vegyületekkel kezeltünk és di-8-ANEPPS-sel jelöltünk, majd spektrofotométer segítségével meghatároztuk a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló integrált fluoreszcencia intenzitás arányt ( $R_{exc, di-8-ANEPPS}$ ), melyet két szélső, egy alacsonyabb (410-440 nm) és egy magasabb (490-520 nm) hullámhosszúságú tartományban mértünk. Öt független mérés átlagát ( $\pm$ SD) ábrázoltuk a koncentráció függvényében ALA (kék), GLA (ciánkék) és SA (zöld) esetében. A gerjesztési spektrumban a kontrollhoz (fekete) képest bekövetkező változások jól megfigyelhetők a rögzített reprezentatív spektrumokon (C). Az ALA-val, GLA-val és SA-val történő kezeléseket megismételve THP-1 (D) és JY (E) sejteket F66-tal jelöltük, majd áramlási citométer segítségével legalább 20 000, az FSC-SSC szóráskepen normál morfológiát mutató, azaz élőnek tekinthető sejt esetében meghatároztuk a fluorofór normál (N\*) és tautomer (T\*) gerjesztett állapotainak megfelelő (rendre 470-490 nm és 564-606 nm) tartományokban mért fluoreszcencia intenzitásainak arányát ( $R_{em, F66 N^*/T^*}$ ). Öt független mérés átlagát ( $\pm$ SD) ábrázoltuk a koncentráció függvényében ALA, GLA és SA esetében. Az emissziós spektrumban a kontrollhoz (fekete) képest bekövetkező változások jól megfigyelhetők az  $R_{em, F66 N^*/T^*}$  reprezentatív hisztogramokon (F). A csillagok (\*) a maximális kezelési koncentrációk mellett tapasztalt statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik (p < 0,05, ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

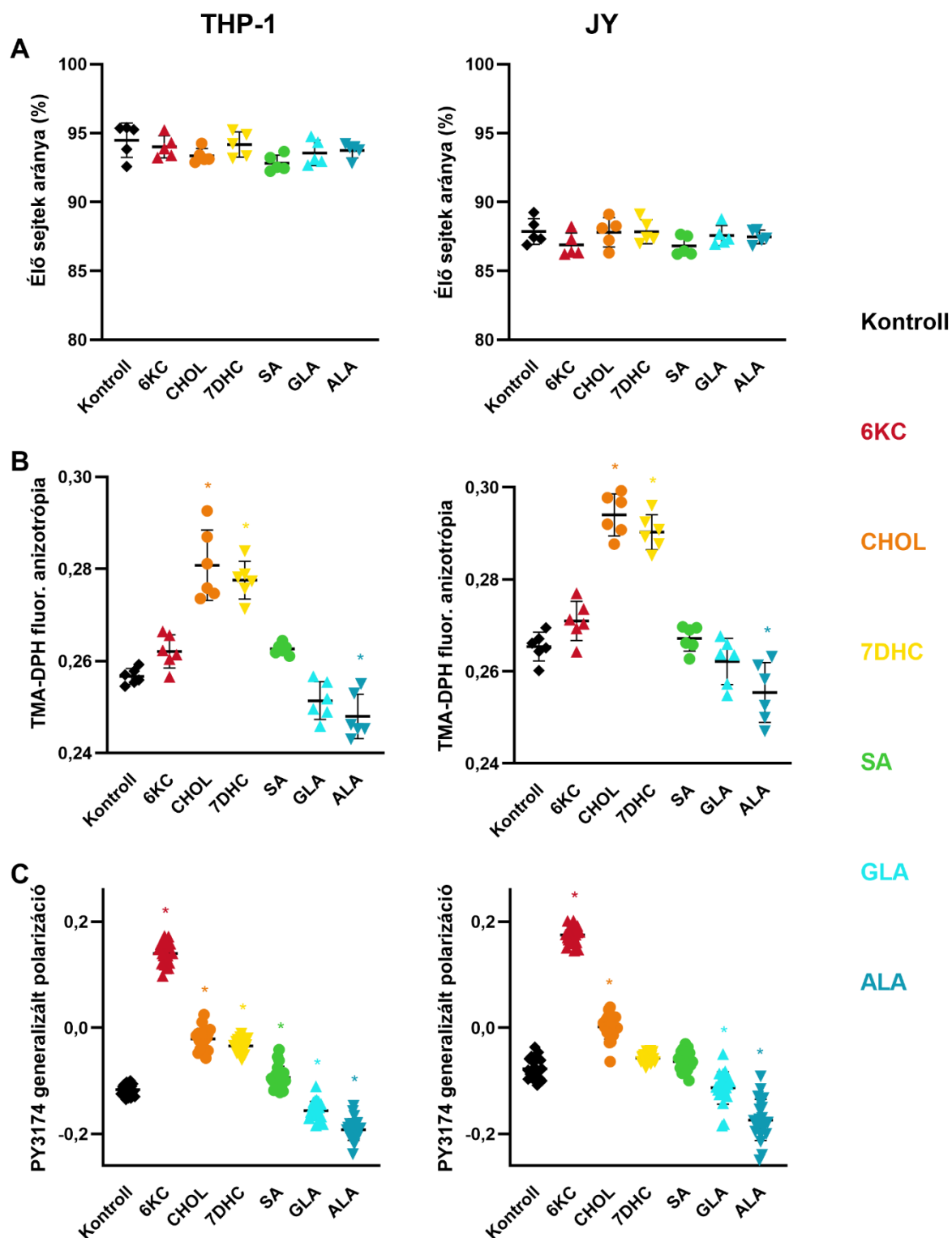
#### 5.4. Szterolok és zsírsavak sejtek életképességére, valamint a sejtmembrán fluiditására és hidrációjára gyakorolt hatásai

A lokális mikrokörnyezetre érzékeny fluorofórokat, így az F66-ot is, befolyásolhatják a dipólpotenciálon kívül egyéb membránbiofizikai tulajdonságok: így például apoptózison áteső sejtek esetében is leírták

az F66 spektrális tulajdonságainak megváltozását (64). Azt a lehetőséget kizárando, hogy az F66 N\*/T\* emissziós spektrumában általunk megfigyelt eltérések esetlegesen a sejtek károsodásának tulajdoníthatók, teszteltük a fenti kezelések életképességre gyakorolt hatását. Ehhez a kezeléseket követően sejtjeinket Sytox Green nekrozis és Alexa Fluor 647-tel konjugált annexin V apoptózis markerrel jelöltük, ahogy azt más tanulmányokban is sikerrel alkalmaztuk (10, 106). 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 esetében sem (**12. ábra A panel**).

Ezután azt vizsgáltuk, 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 (10, 34, 107-110). Mindkét sejtvonala esetében azt tapasztaltuk, hogy 200  $\mu$ M CHOL és 7DHC szignifikánsan emelte az anizotrópia mértékét, azaz csökkentette a fluiditást, míg a 6KC esetében tapasztalt változás nem mutatkozott szignifikánsnak (**12. ábra B panel**). A változások egymáshoz viszonyított mértéke tehát jelentősen különbözött a vegyületek dipólpotenciálra gyakorolt hatásától. A zsírsavak közül az ALA szignifikánsan csökkentette az anizotrópiát, míg sem az SA, sem a GLA nem változtatta azt szignifikáns mértékben, bár utóbbi esetén szintén egy membránfluiditást növelő tendencia volt megfigyelhető.

Ahogy az korábban említettük, a dipólpotenciál nagyságát jelentős mértékben befolyásolja a membránhoz asszociált, a membrán-víz határfelületen elhelyezkedő vízmolekulák mennyisége és orientációja (2-4, 7), így megvizsgáltuk a kezelések membránhidrációra gyakorolt hatását is. Ehhez a sejteket PY3174 fluorofórral jelöltük, mely irodalmi adatok alapján a szélesebb körben használt Laurdanhoz hasonló, a lokális hidrofobicitás mértékére érzékeny fluorofór, azonban kedvezőbb spektrális tulajdonságai révén megbízható módon alkalmas konvencionális mikroszkóppal történő mérésekre (108, 111). Konfokális mikroszkópia és kvantitatív képanalízis segítségével vizsgáltuk a festék generalizált polarizációját, amely arányos a lokális mikrokörnyezet hidrofobicitásával, azaz negatív korrelációt mutat a hidráció mértékével. A mérések során mindkét vizsgált sejtvonala esetében egybevágó eredményeket kaptunk, a szterolszármazékok ugyanis növelték a generalizált polarizáció mértékét: leginkább a 6KC, annál kisebb mértékben a CHOL és legkevésbé a 7DHC (**12. ábra C panel**). A zsírsavak közül az SA kismértékű, pozitív irányú eltérést okozott, míg mind a GLA, mind az ALA ezzel ellentétes hatást mutatott: csökkentették a festék generalizált polarizációját, 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.



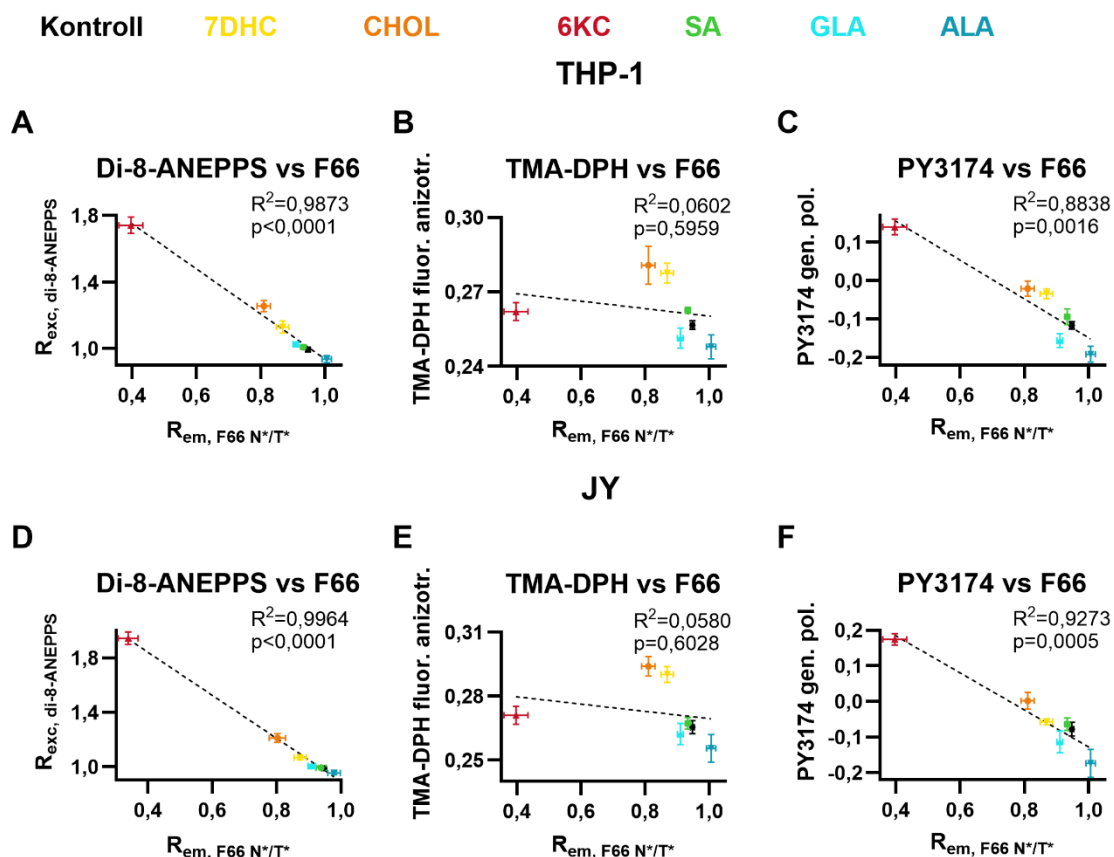
**12. ábra: különböző szterolok és zsírsavak sejtek életképességére, membránfluiditásra és membránhidrációra gyakorolt hatása.**

**(A)** THP-1 és JY sejteket kezeltünk 200  $\mu\text{M}$  koncentrációban 7-dehidrokoleszterinnel (7DHC, citromsárga), koleszterinnel (CHOL, narancssárga) és 6-ketokoleszتانollal (6KC, vörös) 1 órán keresztül, illetve 50  $\mu\text{M}$  koncentrációban  $\alpha$ -linolénsavval (ALA, kék),  $\gamma$ -linolénsavval (GLA, ciánkék) és sztearinsavval (SA, zöld) 48 órán keresztül, majd jelöltünk Sytox Green nekrozis és Alexa Fluor 647 festékkel konjugált annexin V apoptózis markerekkel. Az egyes sejtek fluoreszcencia intenzitását

áramlási citométerrel vizsgáltuk és a kettős negatív sejtek arányát az egyes kezelések esetében legalább 20 000 sejt elemzésével határoztuk meg. Az ábrákon az élő sejtek öt független mérés során meghatározott arányát, illetve azok átlagát ( $\pm$ SD) mutatjuk be. **(B)** THP-1 és JY sejteket a fenti kezelések követően TMA-DPH-val jelöltünk és spektrofлуоримéter segítségével meghatároztuk a fluorofórnak a sejtmembrán fluiditásával negatívan korreláló fluoreszcencia anizotrópiáját. A különböző kezelések esetén a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia hat független kísérlet során meghatározott értékeit, valamint azok átlagát ( $\pm$ SD) ábrázoltuk a különböző kezelések esetében. **(C)** THP-1 és JY sejteket a fenti kezelések követően PY3174-gyel jelöltünk, majd konfokális mikroszkópia és kvantitatív képelemzés segítségével meghatároztuk a fluorofór generalizált polarizációját, kizárólag a plazmamembránnak megfelelő pixelek adatainak felhasználásával. A különböző kezelések esetén öt független kísérlet során készített 20 felvétel elemzése során meghatározott átlagos PY3174 generalizált polarizáció értékeit, valamint azok átlagát ( $\pm$ SD) ábrázoltuk. Minden felvétel átlagosan 10-15 sejtet tartalmazott, így az ábra a különböző kezelések esetén összesen mintegy 200-300 sejt adatai alapján készült. A csillagok (\*) a statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

## 5.5. A sejtmembrán összetételét megváltoztató kezelések által a vizsgált fluorofórok spektrális paramétereiben okozott változások közötti korreláció mértéke

Újonnan leírt áramlási citometriás eljárásunknak a dipólpotenciál mérésére való alkalmazhatóságát alátámasztandó a különböző kezelések követően az F66 N\*/T\* emissziós arányának tanulmányozása során kapott eredményeinket összevetettük a referenciaként alkalmazott spektrofлуоримetriás eljárással és di-8-ANEPPS fluorofór gerjesztési arányának vizsgálatával kapott adatainkkal. Lineáris regressziós analízissel kapott  $R^2$  és  $p$  értékek igen erős, pozitív, statisztikailag szignifikáns korrelációt mutattak módszereink között mindkét vizsgált sejtvonala esetében, mely erőteljesen alátámasztotta az újonnan kidolgozott eljárásunk alkalmazhatóságát a dipólpotenciál nagyságának meghatározására (**13. ábra A és D panel**). 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 (**13. ábra B és E panel**). A dipólpotenciál és 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 kapcsolatát (**13. ábra C és F panel**).



**13. ábra: az F66 N\*/T\* emissziós arány di-8-ANEPPS gerjesztési arányával, TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájával és PY3174 generalizált polarizációjával való összefüggése.**

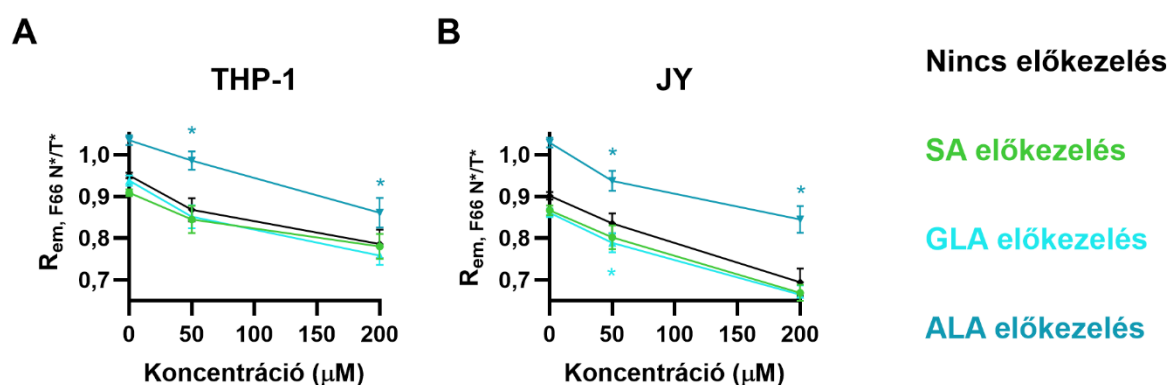
THP-1 (A-C) és JY (D-F) sejteket kezeltünk 200  $\mu$ M 7-dehidrokoleszterinnel (7DHC, citromsárga), koleszterinnel (CHOL, narancssárga) és 6-ketokolesztanollal (6KC, vörös) 1 órán keresztül, illetve 50  $\mu$ M koncentrációban  $\alpha$ -linolénsavval (ALA, kék),  $\gamma$ -linolénsavval (GLA, ciánkék) és sztearinsavval (SA, zöld) 48 órán keresztül, melyet F66-tal, di-8-ANEPPS-sel, TMA-DPH-val vagy PY3174-gyel történő jelölés, illetve rendre az N\*/T\* emissziós arány, a gerjesztési arány, a fluoreszcencia anizotrópia vagy a generalizált polarizáció meghatározása követetett. Az F66 N\*/T\* emissziós aránynak a kísérletek során a különböző kezelések esetén meghatározott átlagát ( $\pm$ SD) ábrázoltuk a di-8-ANEPPS gerjesztési arány (A, D), TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia (B, E) vagy PY3174 generalizált polarizáció (C, F) átlagos értéke ( $\pm$ SD) függvényében. A lineáris regressziós analízis során kapott  $R^2$  és  $p$  értékek is láthatók a paneleken.

## 5.6. Zsírakkal történő előkezelés hatása a dipólpotenciál koleszterin által kiváltott növekedésére

Ezek után megvizsgáltuk a koleszterin és zsírsavak kombinált hatását a dipólpotenciál nagyságára az általunk leírt áramlási citometriás eljárással. A sejteket előkezelésként 50  $\mu$ M ALA-val, GLA-val, illetve SA-val dúsított médiumban inkubáltuk 48 órán keresztül, majd 50 és 200  $\mu$ M-os koncentrációjú CHOL-lal kezeltük 1 órán át a fentebb leírt módon. Az egyes vegyületek önállóan alkalmazva a korábban részletezett változásokat idézték elő, azaz a CHOL szignifikánsan növelte a dipólpotenciál nagyságát, a

GLA és SA nem változtatta szignifikáns mértékben azt, bár mindkét vegyület hatására enyhe növekvő tendencia volt megfigyelhető, míg az ALA hatására szignifikánsan alacsonyabb értékeket találtunk mind THP-1, mind pedig JY sejtekben (14. ábra A és B panel).

A kombinált kezelések hatásainak vizsgálat során az ALA-val történő előkezelés mindkét vizsgált sejtípus esetében szignifikánsan mérsékelte a koleszterin dipólpotenciált növelő képességét, hiszen 50  $\mu\text{M}$  ALA előkezelés lényegében kivédte a 200  $\mu\text{M}$  CHOL által kiváltott növekedést. Ezzel szemben 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.



**14. ábra:  $\alpha$ -linolénsav,  $\gamma$ -linolénsav és sztearinsav dipólpotenciál nagyságára gyakorolt hatása koleszterin jelenlétében**

THP-1 (A) és JY (B) sejteket 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -linolénsavval (ALA),  $\gamma$ -linolénsavval (GLA) vagy sztearinsavval (SA) történő előzetes inkubációt követően 50 vagy 200  $\mu\text{M}$  koncentrációjú koleszterinnel kezeltünk, majd F66-tal történő jelölés után áramlási citométer segítségével legalább 20 000, az FSC-SSC szórásképen normál morfológiát mutató, azaz élőnek tekinthető sejt esetében meghatároztuk a fluorofór normál ( $N^*$ ) és tautomer ( $T^*$ ) gerjesztett állapotainak megfelelő (rendre 470-490 nm és 564-606 nm) tartományokban mért fluoreszcencia intenzitásainak arányát ( $R_{\text{em, F66 } N^*/T^*}$ ). Öt független mérés átlagát ( $\pm\text{SD}$ ) ábrázoltuk az alkalmazott koleszterin koncentráció függvényében ALA (kék), GLA (ciánkék) és SA (zöld) esetében. A csillagok (\*) az előkezelés nélküli sejtekhez viszonyított statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

## 5.7. Zsírsavak hatása a penetratin celluláris felvételére és endolizoszomális felszabadulására

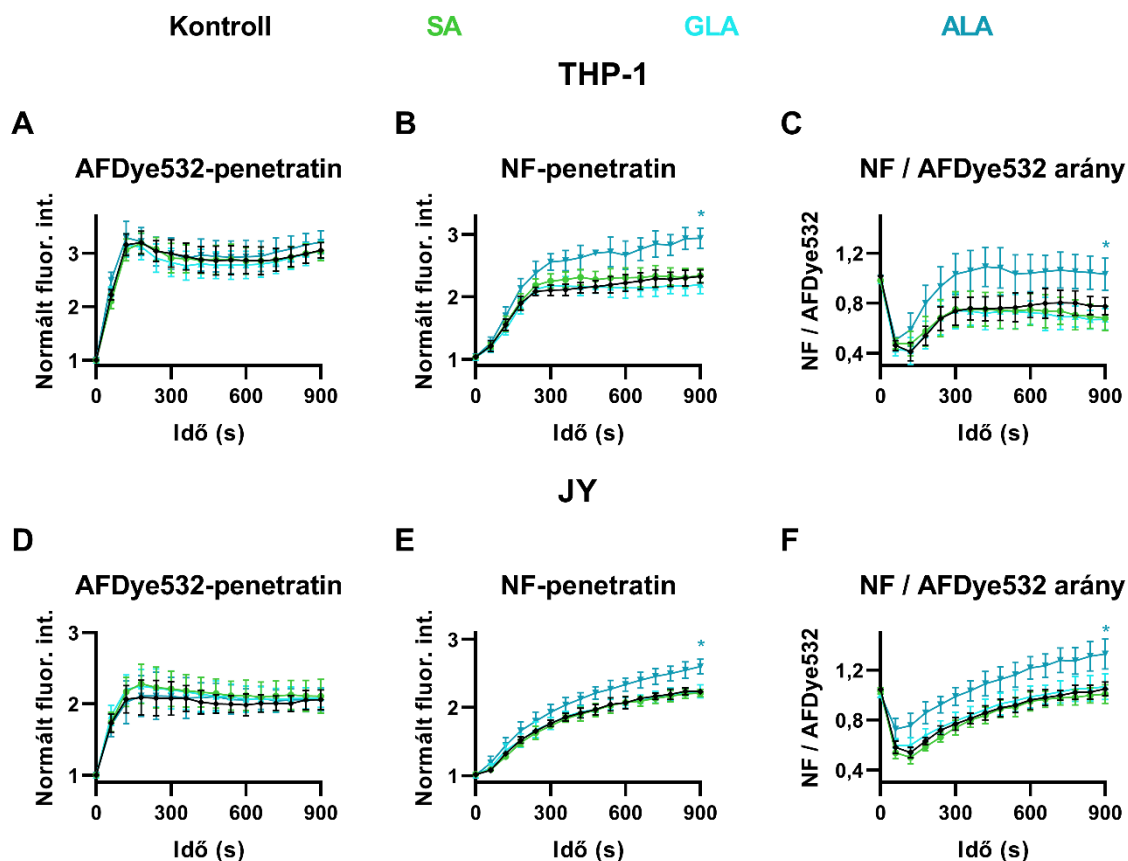
A zsírsavak által kiváltott dipólpotenciál-változások biológiai relevanciájának alátámasztása érdekében megvizsgáltuk az ALA, GLA és SA hatását a penetratin, egy kationos CPP felvételének és endolizoszomális rendszerből történő felszabadulásának hatékonyságára. Munkacsoportunk korábban kimutatta ugyanis, hogy a dipólpotenciál phloretinnel történő csökkentése, illetve a koleszterin

szintézis atorvastatinnal történő gátlása fokozza a penetratin citoplazmába kerülését – főként az endolizoszomális felszabadulás elősegítése révén (34).

A disszertációban ismertetett kísérleteink során THP-1 és JY sejteket ALA-t, GLA-t, illetve SA-t 50  $\mu$ M-os koncentrációban tartalmazó médiummal kezeltünk 48 órán keresztül, majd AFDye532, illetve NF fluorofórokkal konjugált penetratinok ekvimoláris elegyével kevertük össze a mintát és áramlási citométerrel meghatároztuk az FSC-SSC szórás képen normál morfológiájú, azaz élőnek tekinthető sejtek AFDye532, illetve NF fluoreszcencia intenzitását időfüggő módon. A mérést a penetratinok hozzáadását követően azonnal indítottuk és a mintát 37°C-on tartva 15 percig folytattuk. Az AFDye532 fluoreszcencia intenzitása pH-független, következésképp arányos a sejt által felvett penetratin teljes mennyiségével. Ezzel szemben az NF-fel jelölt molekula fluoreszcencia intenzitása csökken savas pH tartományban, azaz a savas endolizoszomális kompartment organelumaiban, így főként a citoszolban jelenlévő penetratin mennyiségéről nyújt információt. A két fluoreszcencia intenzitás hányadosa, azaz az NF/AFDye532 arány a penetratin endolizoszomális rendszerből való felszabadulásának mértékét mutatja meg (**7. ábra**).

A penetratin teljes celluláris felvételének és endolizoszomális felszabadulásának dinamikáját vizsgálva mind THP-1, mind pedig JY sejtekben a korábban más sejttípusokban megfigyeltekhez hasonló karakterisztikát tapasztaltunk. Az AFDye532 fluoreszcencia intenzitása 120-180 másodpercnél szaturációt mutatott (**15. ábra A és D panel**), míg a sejtplazmában jelenlévő mennyiséget tükröző NF intenzitása ehhez képest jelentősen eltérő kinetikát mutatott, és először 180-240 másodperc között mutatott éles emelkedést, melyet ezt követően egyenletes növekedés követett (**15. ábra B és E panel**). Az NF/AFDye532 intenzitás hányadosa, mely a citoszolban található penetratinnak a teljes sejtben található mennyiséghez viszonyított arányát mutatja, eleinte csökkent az endolizoszómákba kerülő penetratin miatt, majd fokozatos növekedést mutatott, tükrözve a penetratin endolizoszomális rendszerből történő felszabadulásának mértékét (**15. ábra C és F panel**).

A zsírsavak hatását vizsgálva azt találtuk, hogy azok nem befolyásolták szignifikáns mértékben az AFDye532 normált fluoreszcencia intenzitását, azaz a sejtek teljes penetratin felvételét, a kontroll sejtekkel összehasonlítva (**15. ábra A és D panel**). Ezzel szemben az NF intenzitása szignifikánsan emelkedett ALA kezelést követően, míg az SA és GLA esetében nem következett be érdemi változás (**15. ábra B és E panel**). Ezekből következően az NF/AFDye532 hányados értékét jelentősen, szignifikáns mértékben növelte az ALA, míg az SA és GLA itt sem mutatott szignifikáns hatást (**15. ábra C és F panel**). Teljesen egybeeső eredményeket kaptunk mind THP-1, mind pedig JY sejtekben. Ezen eredményeink arra engednek következtetni, hogy a penetratin endolizoszomális felszabadulását az ALA jelentősen elősegítette a teljes celluláris penetratinfelvétel érdemi befolyásolása nélkül.

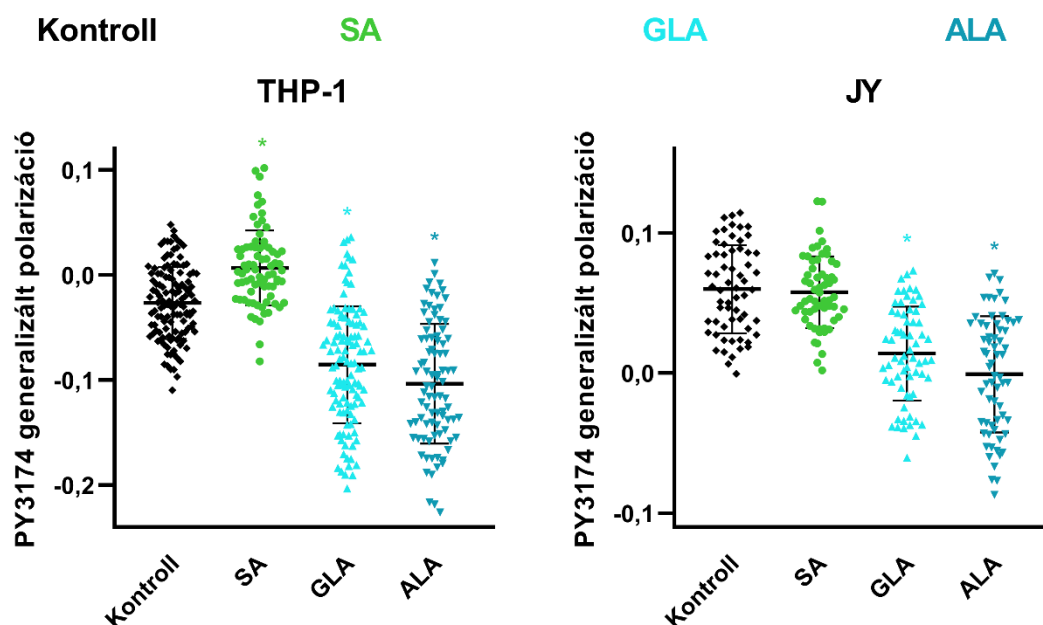


**15. ábra:  $\alpha$ -linolénsav,  $\gamma$ -linolénsav és sztearinsav penetratin celluláris felvételére és endolizoszomális felszabadulására gyakorolt hatása**

THP-1 (A-C) és JY (D-F) sejteket kezelés nélkül (fekete), illetve 50  $\mu$ M  $\alpha$ -linolénsavval (ALA, kék),  $\gamma$ -linolénsavval (GLA, ciánkék) és sztearinsavval (SA, zöld) dúsított médiumban inkubáltunk 48 órán keresztül. Ezt követően a sejtekhez 5  $\mu$ M AFDye532- és 5  $\mu$ M NF-jelölt penetratin keverékét adtuk, majd az egyes sejtek fluoreszcencia intenzitását időkorrelált áramlási citometriás eljárással határoztuk meg. Az adatelemzés során az FSC-SSC szórás képen normál morfológiát mutató, azaz élőknek tekinthető sejtek kapuzása után meghatároztuk az átlagos AFDye532 (A, D), NF (B, E) fluoreszcencia intenzitásokat, illetve azok hányadosát (C, F) 10 másodperces időablakokban. A kezelésként öt független kísérlet adataiból az így számított értékeket az első időablakban nyert átlagértékekre normáltuk. Az ábrán a minden hatodik időintervallum esetén meghatározott átlagértékeket ( $\pm$ SD) ábrázoltuk az eltelt idő függvényében. A csillagok (\*) a kontroll sejtekhez viszonyított statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik a 900 másodperces időpontban ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

Az ALA és GLA esetében tapasztalt, fentebb leírt, a penetratin endolizoszomális kiszabadulásának mértékében megfigyelhető alapvetően eltérő változásokat magyarázhatja egyrészt a két zsírsav dipólpotenciált ellentétesen befolyásoló hatása, másrészt elméletileg az a lehetőség is, hogy az ALA-val ellentétben a GLA nem jut el a lizoszómák membránjába és ezáltal nem képes csökkenteni ott a dipólpotenciál mértékét. Utóbbi feltételezést cáfolják azonban azon konfokális mikroszkópos eredményeink, melyek szerint mind az ALA, mind pedig a GLA kezelések hatására szignifikáns és

hasonló mértékben csökkent a PY3174 generalizált polarizációja a lizoszomális membránokban (16. ábra). A méréseket ebben az esetben is elvégeztük THP-1 és JY sejteken is úgy, hogy a lizoszomális membránoknak megfelelő régiókat a PY3174-gyel párhuzamosan alkalmazott LysoTracker™ Deep Red jelöléssel azonosítottuk a felvételeken. Ezen megfigyeléseink mindkét sejtvonal esetén cáfolják, hogy az általunk megfigyelt különbségek abból fakadnának, hogy a zsírsavak eltérő hatékonysággal jutnak el az endolizoszomális membránokba és ezért változtatják meg eltérően azok szerkezeti szerveződését. Ezzel szemben sokkal inkább azt támasztják alá, hogy az ALA és GLA alapvetően különböző módon befolyásolja a dipólpotenciál nagyságát.



**16. ábra:  $\alpha$ -linolénsav,  $\gamma$ -linolénsav és sztearinsav lizoszomális membránok hidrációjára gyakorolt hatása**

THP-1 és JY sejteket kezelés nélkül (fekete), valamint 50  $\mu$ M  $\alpha$ -linolénsavval (ALA, kék),  $\gamma$ -linolénsavval (GLA, ciánkék) és sztearinsavval (SA, zöld) dúsított médiumban inkubáltunk 48 órán keresztül, majd LysoTracker Deep Red és PY3174 fluorofórokkal jelöltünk. A lizoszómák membránjának azonosítása, illetve azok generalizált polarizációjának meghatározása konfokális mikroszkópos felvételeken végzett kvantitatív képanalízissel történt. A folyamat során a felvételeken a PY3174 próba fluoreszcencia intenzitása alapján azonosítottuk a plazmamembránnak megfelelő pixeleket és ezáltal az egyedi sejteket, míg a LysoTracker Deep Red fluoreszcencia intenzitása alapján pedig a lizoszómáknak megfelelő pixeleket – a PY3174 generalizált polarizációjának átlagos értékét kizárólag ezen pixelek adataiból számítottuk minden egyes sejt esetén. Öt független kísérlet során kezelésenként 70-110 normál morfológiájú, egyedi sejt átlagos PY3174 generalizált polarizáció értékeit, valamint azok átlagát ( $\pm$ SD) ábrázoltuk. A csillagok (\*) kontroll sejtekhez viszonyított statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján).

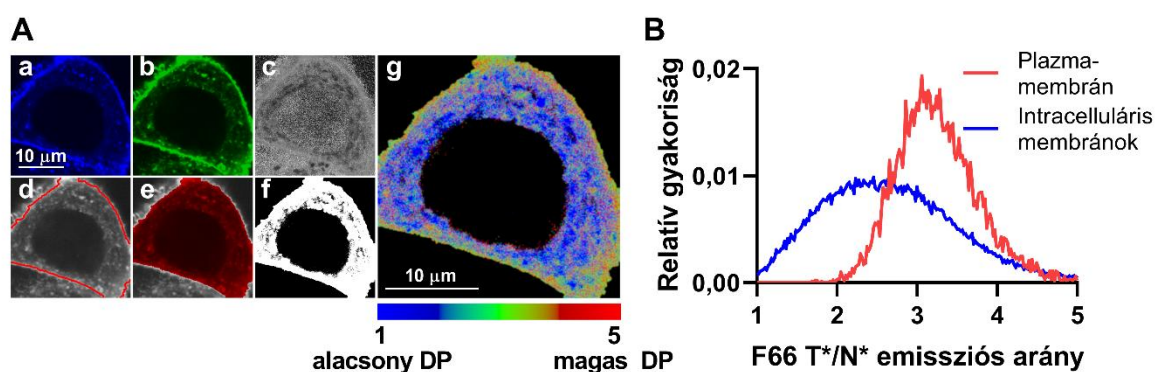
## 5.8. A dipólpotenciál heterogenitása az intracelluláris membránrendszerekben

Ismert, hogy az élő sejtek membránrendszereinek lipidösszetételét nagyfokú heterogenitás jellemzi (2, 4, 7), illetve a dipólpotenciál nagyságát alapvetően meghatározza a kettősrétegek összetétele (66-68). Ezen két megfigyelés alapján jogos lehet tehát az a felvetés, hogy az élő sejtek organellumainak membránjaiban jelentősen eltérő lehet a dipólpotenciál nagysága, amit azonban még nem mutattak ki korábban.

Ennek alátámasztására első lépésben a fentebbi kísérletek során a dipólpotenciál meghatározására megbízhatóan alkalmazhatónak bizonyult F66 fluorofór segítségével vizsgáltunk SKBR-3 sejteket. A sejteket a 4.11. fejezetben részletesen ismertetett kettős jelölésnek vetettük alá, azaz egyrészt 24 órán át tartó inkubációval biztosítottuk, hogy a festék biztosan bekerüljön az intracelluláris organellumok membránjaiba, majd ezt követően a hagyományos, 10 perces jelölést is alkalmaztuk, hogy egyértelműen azonosítható legyen a plazmamembrán is. Ezután a sejtek középsíkjának megfelelő régiókról konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a fluorofór N\* és T\* sávjának megfelelő beállításokkal, azaz 405 nm-en történő gerjesztés mellett rendre 463-527 nm és 543-589 nm közötti tartományokban detektáltuk a fluoreszcencia intenzitásokat (**17. ábra A panel a és b kép**). Korábbi tanulmányainkkal összhangban (14, 16) a festék alkalmazása nem okozott felismerhető membránkárosodást vagy bármiféle eltérést a sejtek morfológiájában, azaz a sejtek jól tolerálták azt, még a hosszabb inkubáció ellenére is. A kvantitatív képelemzés során ezen kísérletsorozatban az F66 didaktikai szempontból könnyebben értelmezhető T\*/N\* emissziós arányát számítottuk ki minden pixelben (**17. ábra A panel c kép**), amely pozitív korrelációt mutat a dipólpotenciál nagyságával (14, 16, 64). Ezt követően kézi kijelölésű vízfeltöltéses algoritmus segítségével azonosítottuk a plazmamembránnak megfelelő pixeleket (**17. ábra A panel d kép**) és ezáltal az egyedi sejtek intracelluláris régióit is (**17. ábra A panel e kép**). Az F66 jele alapján meghatároztunk egy küszöbértéket – a sejten kívüli átlagos háttérintenzitás négyszeresét – és az intracelluláris területen intracelluláris membránnak definiáltuk azon területeket, amelyek fluoreszcencia intenzitása magasabb volt, mint ezen küszöbérték (**17. ábra A panel f kép**). Ezután az F66 T\*/N\* arányt elemeztük a plazmamembránnak, illetve intracelluláris membránoknak megfelelő pixelekből, amely sejten belüli jellemző eloszlását egy reprezentatív képen mutatjuk be, színskálán jelölve az adott pixelekből megfigyelhető arányértékeket (**17. ábra A panel g kép**).

A reprezentatív képen jól látható, hogy az F66 T\*/N\* emissziós arány, vagyis a dipólpotenciál nagysága nagy variabilitást mutat a celluláris membránokban. A plazmamembránban, valamint a sejt perifériás régiókban elhelyezkedő membránokban ugyanis jelentősen nagyobb a dipólpotenciál, amit ezen pixelek dominánsan vörös-zöldes színe jelez, míg a belsőbb membránokban alacsonyabb, amit ezen

régiók jellemzően kék színe mutat (17. ábra A panel g kép). A plazmamembrán és az intracelluláris membránok közötti különbség jól megmutatkozik a reprezentatív F66 T\*/N\* emissziós arány hisztogramokon is, az intracelluláris membránpixelek görbéje ugyanis jelentősen balra, az alacsonyabb értékek felé tolódik a plazmamembrán görbéjéhez képest (17. ábra B panel). Emellett az is egyértelműen látszik, hogy a plazmamembránhoz képest az intracelluláris membránokban a dipólpotenciál nagyságának heterogenitása jóval nagyobb, amelyet egyrészt alátámaszt a reprezentatív képen az intracelluláris pixelek jóval változatosabb színe (17. ábra A panel g kép), másrészt pedig az F66 T\*/N\* emissziós arány hisztogram kiszélesedése is (17. ábra B panel).



**17. ábra: A plazmamembránban és intracelluláris membránrendszerekben mérhető F66 emissziós arányok közti különbségek.**

(A) SKBR-3 sejteket 8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésztő kamrákban tenyésztettünk és F66 fluorofórral történő kettős jelölésnek vetettük alá, majd konfokális mikroszkópos felvételeket készítettünk a sejtek középsíkjának megfelelően. A reprezentatív képeken szemléltetjük az F66 normál N\* (a) és tautomer T\* (b) gerjesztett állapotának megfelelő fluoreszcencia intenzitásokat. A T\*/N\* emissziós arányt pixelenként számítottuk ki a háttérintenzitásokra történő korrekciót követően (c). Ezután kézi kijelölésű vízfeltöltési algoritmus segítségével azonosítottuk a felvételeken a sejtek plazmamembránjának (d) és intracelluláris terének (e) megfelelő régiókat. Az intracelluláris membránrégiók definiálásakor az intracelluláris területben vizsgáltuk az F66 fluoreszcencia intenzitását. Amennyiben az egyes pixelek intenzitása magasabb volt, mint egy bizonyos határérték, membránpixelnek tekintettük őket (f). Az intracelluláris membránpixelek F66 T\*/N\* arányát, mely a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korrelál, reprezentatív színskálán ábrázoltuk (g). (B) A reprezentatív hisztogramok az F66 T\*/N\* emissziós arány pixelenkénti megoszlását mutatják a plazmamembránnak, illetve az intracelluláris membránrendszereknek megfelelő régiókban.

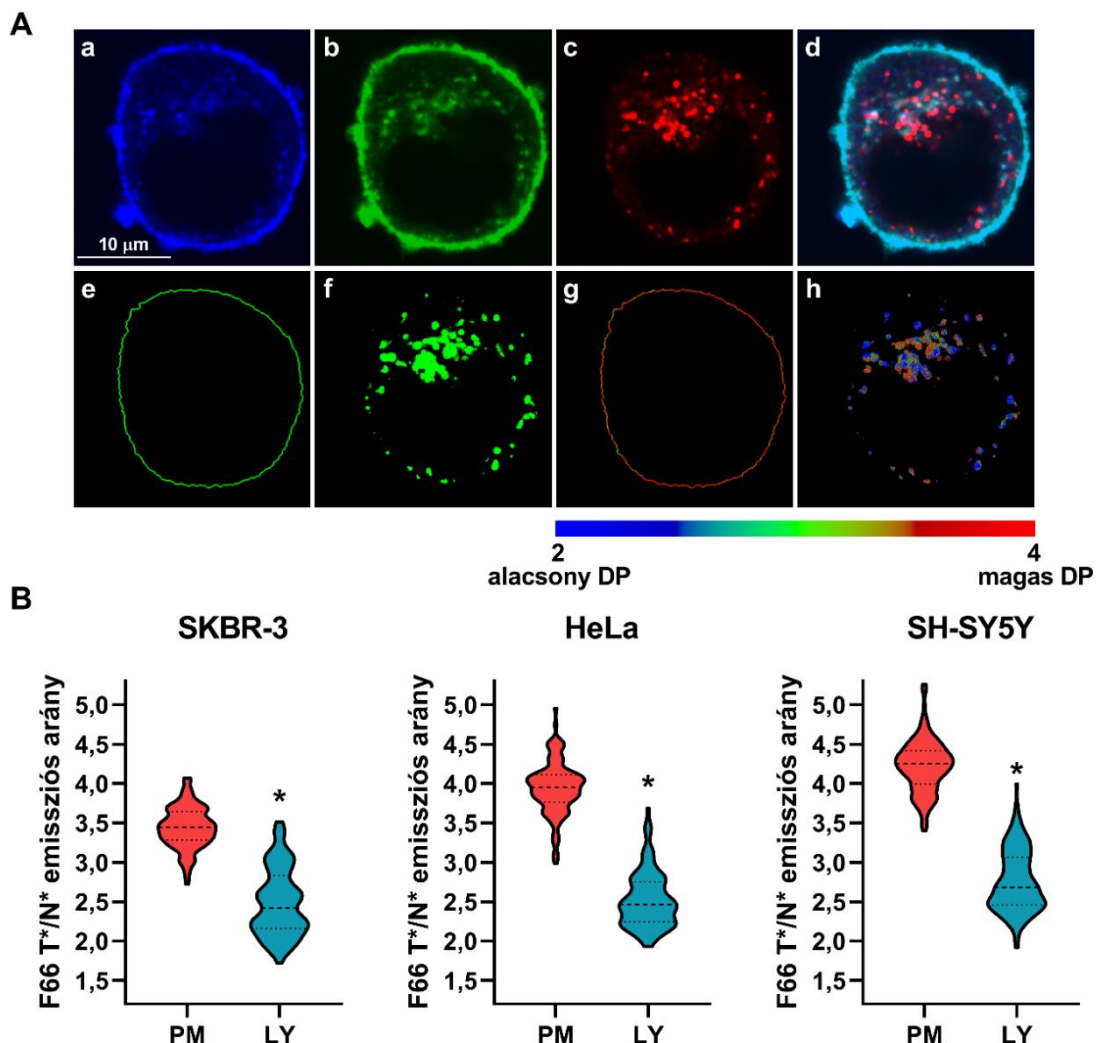
## 5.9. A dipólpotenciál nagysága a lizoszómák membránjában

Bár a fentebb ismertetett eredményeink egyértelműen alátámasztották, hogy a dipólpotenciál nagysága alacsonyabb az intracelluláris organellek membránjaiban a plazmamembránhoz képest, arra is rámutattak, hogy jelentős heterogenitás figyelhető meg a különböző kompartmentumok között – arról azonban nem szolgáltatott információt, hogy milyen specifikus eltérések lehetnek a különböző

organellumok között. Ezek tanulmányozására az F66-alapú konfokális mikroszkópos dipólpotenciál mérési módszerünket kombináltuk különböző, az intracelluláris kompartmentumokat szelektíven jelölő fluoreszcens organellum markerek alkalmazásával.

Ezen kísérleteink első részében a lizoszomális membránok dipólpotenciálját határoztuk meg, a plazmamembránhoz viszonyítva. A fentebb ismertetett F66-tal történő kettős jelöléssel párhuzamosan a sejteket LysoTracker™ Deep Red jelenlétében inkubáltuk a lizoszómák vizualizációja céljából. Konfokális lézerpasztázó mikroszkóp segítségével felvételt készítettünk az F66 N\* és T\* gerjesztett állapotainak megfelelő emissziós tartományokban, illetve a lizoszóma markernek megfelelő beállítások mellett is a sejtek középsíkjának megfelelően (**18. ábra A panel a-d képek**). A kvantitatív képelemzés során a plazmamembránnak, illetve az intracelluláris régióknak megfelelő pixeleket a fentebb ismertetett vízfeltöltési algoritmus segítségével azonosítottuk az F66 felvételeken (**18. ábra A panel e kép**). 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 (**18. ábra A panel f kép**). Ezután kiszámítottuk a dipólpotenciál nagyságával pozitív korrelációt mutató F66 T\*/N\* emissziós arány medián értékét külön-külön a plazmamembránnak, illetve a lizoszomális membránoknak megfelelő pixeleken ugyanazon sejtben, amelyek jellemző eloszlását egy színskálával ellátott reprezentatív felvételen szemléltettük (**18. ábra A panel g és h képek**).

Méréseinket először elvégeztük SKBR-3 humán emlőtumor sejtekben és azt tapasztaltuk, hogy a lizoszómák esetében számított F66 T\*/N\* arány szignifikáns mértékben alacsonyabb volt a plazmamembránhoz képest ( $2,488 \pm 0,424$  vs.  $3,441 \pm 0,263$ ,  $n = 107$ ,  $p < 0,0001$ ), mely alacsonyabb dipólpotenciálra utal az előbbieket esetén (**18. ábra B panel**). 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, azaz az F66 T\*/N\* arány – vagyis a dipólpotenciál – a lizoszomális membránokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a plazmamembránban mind HeLa humán cervixkarcinóma (lizoszómák:  $2,518 \pm 0,351$  vs. plazmamembrán:  $3,947 \pm 0,333$ ,  $n = 115$ ,  $p < 0,0001$ ), mind pedig SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtekben is (lizoszómák:  $2,759 \pm 0,391$  vs. plazmamembrán:  $4,224 \pm 0,330$ ,  $n = 154$ ,  $p < 0,0001$ ).



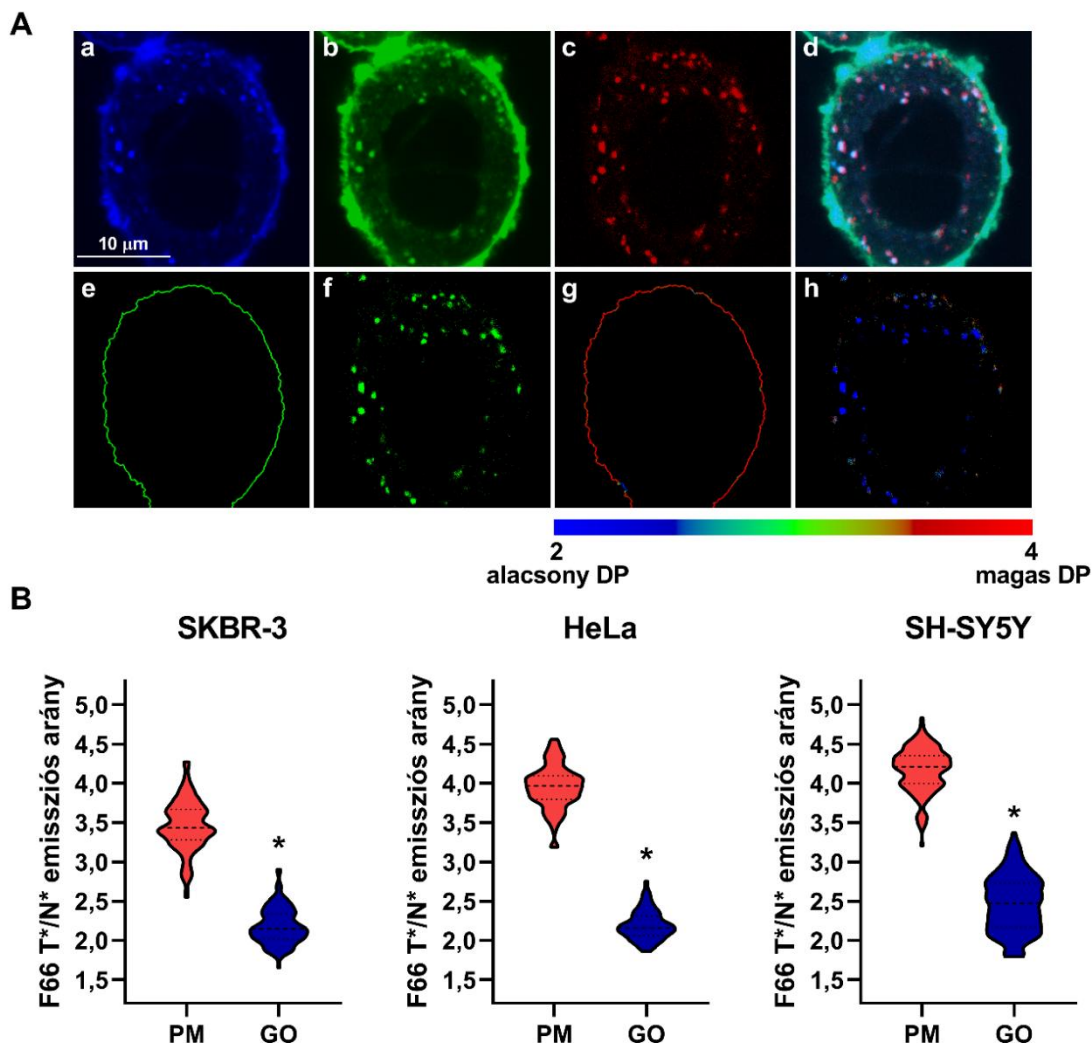
**18. ábra: A plazmamembrán és lizoszomális membránok F66 T\*/N\* emissziós arányában tapasztalható különbségek.**

SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejteket 8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésztő kamrákban tenyésztettünk, majd F66 és LysoTracker™ Deep Red fluorofórokkal jelöltünk. **(A)** A sejtek középsíkjának megfelelően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. Az SKBR-3 sejtekről készített reprezentatív képeken szemléltetjük az F66 fluorofór N\* normál **(a)** és T\* tautomer **(b)** gerjesztett állapotainak, valamint a LysoTracker Deep Red-nek **(c)** megfelelő beállításokkal készített felvételeket külön-külön, illetve egymásra vetítve **(d)**. Kézi kijelölésű vízfeltöltési algoritmus segítségével azonosítottuk a sejtek plazmamembrán („PM”, **e**) régióit. Lizoszomális membránok azon pixeljeit tekintettük a vízfeltöltéssel azonosított intracelluláris térnek megfelelő területen belül, melyek LysoTracker Deep Red fluoreszcencia intenzitása egy adott határérték fölé esett („LY”, **f**). A dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló F66 T\*/N\* emissziós arányt háttérkorrekciót követően pixelenként kiszámítottuk és reprezentatív színkódolt képeken szemléltettük a plazmamembrán **(g)** illetve lizoszomális membránok **(h)** megfelelő pixeljei esetében. **(B)** Az SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtek plazmamembránjának és lizoszomális membránjainak megfelelő pixeljei adataiból meghatároztuk a medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékét a két területen külön-külön minden egyes sejt esetén. Az öt független kísérletből származó 107-154 normál morfológiájú sejt esetén meghatározott medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékeket ábrázoltuk hegedűdiagramon, a medián és kvartilis értékek feltüntetésével. A csillagok (\*) a plazmamembrán és lizoszomális membránok közti szignifikáns különbséget jelzik ( $p < 0.05$ , Welch-féle t-próba alapján).

## 5.10. A dipólpotenciál nagysága a Golgi-membránrendszerben

Az intracelluláris membránrendszerek vizsgálatát a Golgi-készülék membránjaival folytattuk. Ehhez a sejteket az 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 részletesen ismertetett módon azonosítottuk (**19. ábra A panel**).

Méréseinket ugyanazon a három sejtvonalon elvégeztük, mint a lizoszómák vizsgálata esetén és mindhárom esetben azt tapasztaltuk, hogy a Golgi-membránokban a dipólpotenciál lényegesen alacsonyabb, mint a plazmamembránban. A meghatározott F66 T\*/N\* arány ugyanis szignifikánsan kisebb volt a Golgi-membránokban a plazmamembránhoz képest SKBR-3 (Golgi:  $2,178 \pm 0,226$  vs. plazmamembrán:  $3,460 \pm 0,321$ ,  $n = 137$ ,  $p < 0,0001$ ), HeLa (Golgi:  $2,193 \pm 0,182$  vs. plazmamembrán:  $3,952 \pm 0,272$ ,  $n = 133$ ,  $p < 0,0001$ ), és SH-SY5Y (Golgi:  $2,468 \pm 0,359$  vs. plazmamembrán:  $4,170 \pm 0,282$ ,  $n = 138$ ,  $p < 0,0001$ ) sejtekben is (**19. ábra B panel**).



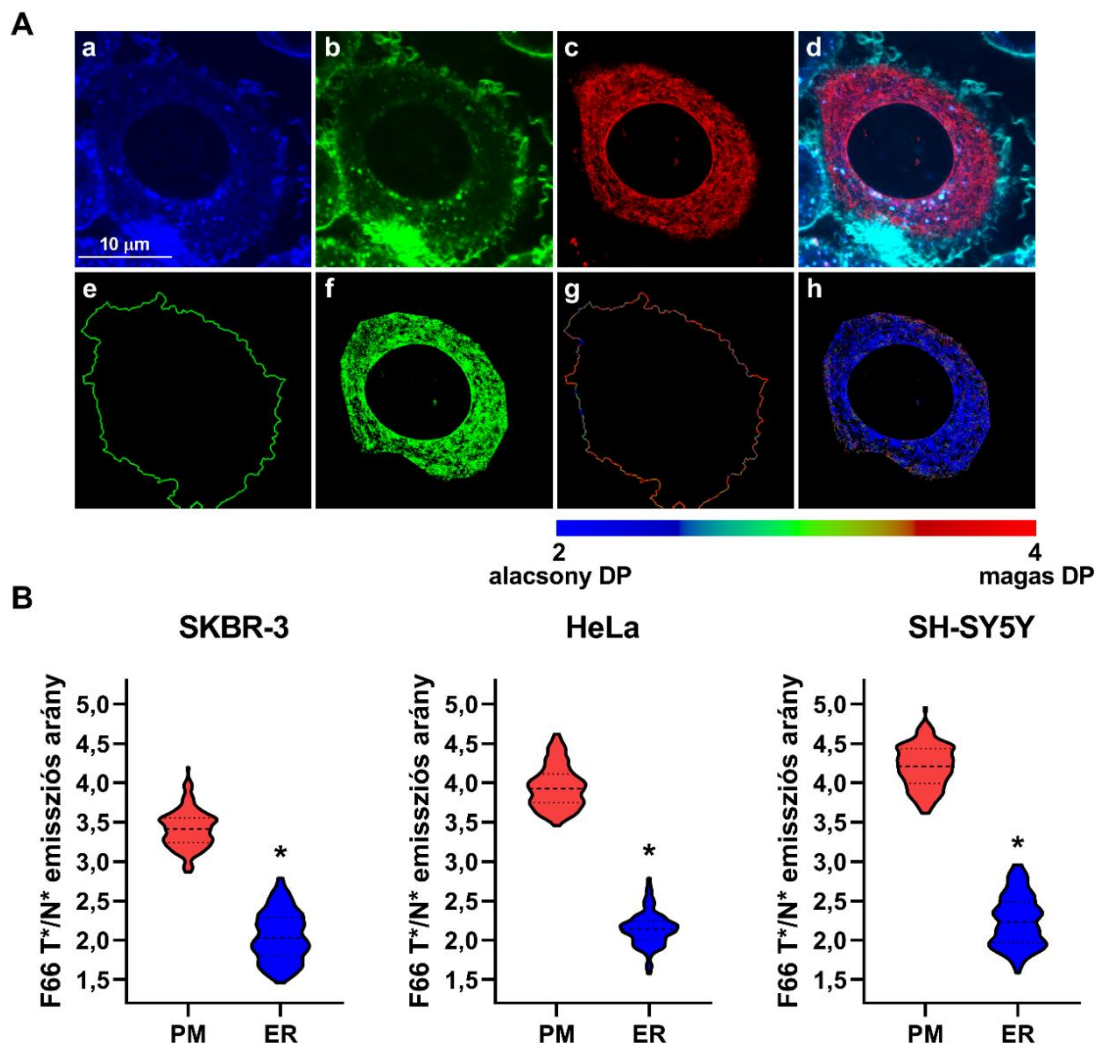
**19. ábra: A plazmamembrán és Golgi-membránrendszer F66 T\*/N\* emissziós arányában tapasztalható különbségek.**

8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésztő kamrákban tenyésztett SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejteket CellLight™ Golgi-RFP, BacMam 2.0 markerrel transzdukáltunk, majd F66 fluorofórral jelöltünk. **(A)** A sejtek középsíkjának megfelelően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. Az SKBR-3 sejtekről készített reprezentatív képeken szemléltetjük az F66 fluorofór N\* normál **(a)** és T\* tautomer **(b)** gerjesztett állapotainak, valamint a Golgi-RFP tag-nek **(c)** megfelelő beállításokkal készített felvételeket külön-külön, illetve egymásra vetítve **(d)**. Kézi kijelölésű vízfeltöltési algoritmus segítségével azonosítottuk a sejtek plazmamembrán („PM”, **e**) régióit. Golgi-membránnak azon pixeleket tekintettük a vízfeltöltéssel azonosított intracelluláris térnek megfelelő területen belül, melyek Golgi-RFP fluoreszcencia intenzitása egy adott határérték fölé esett („GO”, **f**). A dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló F66 T\*/N\* emissziós arányt háttérkorrekciót követően pixelenként kiszámítottuk és reprezentatív színekódolt képeken szemléltettük a plazmamembránnak **(g)** illetve Golgi-membránoknak **(h)** megfelelő pixelek esetében. **(B)** Az SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtek plazmamembránjának és Golgi-membránjainak megfelelő pixelek adataiból meghatároztuk a medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékét a két területen külön-külön minden egyes sejt esetén. Az öt független kísérletből származó 133-138 normál morfológiájú sejt esetén meghatározott medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékeket ábrázoltuk hegedűdiagramon, a medián és kvartilis értékek feltüntetésével. A csillagok (\*) a plazmamembrán és Golgi-membránok közti szignifikáns különbséget jelzik ( $p < 0.05$ , Welch-féle t-próba alapján).

### 5.11. A dipólpotenciál nagysága az endoplazmás retikulum membránjában

Következő lépésben a szintén a szekréciós útvonalhoz tartozó endoplazmás retikulum membránjának vizsgálatával folytattuk kísérleteinket. Ehhez az 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 (**20. ábra A panel**).

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 (endoplazmás retikulum:  $2,047 \pm 0,310$  vs. plazmamembrán:  $3,414 \pm 0,240$ ,  $n = 152$ ,  $p < 0,0001$ ), HeLa (endoplazmás retikulum:  $2,143 \pm 0,213$  vs. plazmamembrán:  $3,946 \pm 0,265$ ,  $n = 114$ ,  $p < 0,0001$ ) és SH-SY5Y (endoplazmás retikulum:  $2,246 \pm 0,321$  vs. plazmamembrán:  $4,207 \pm 0,270$ ,  $n = 139$ ,  $p < 0,0001$ ) sejtekben is (**20. ábra B panel**).



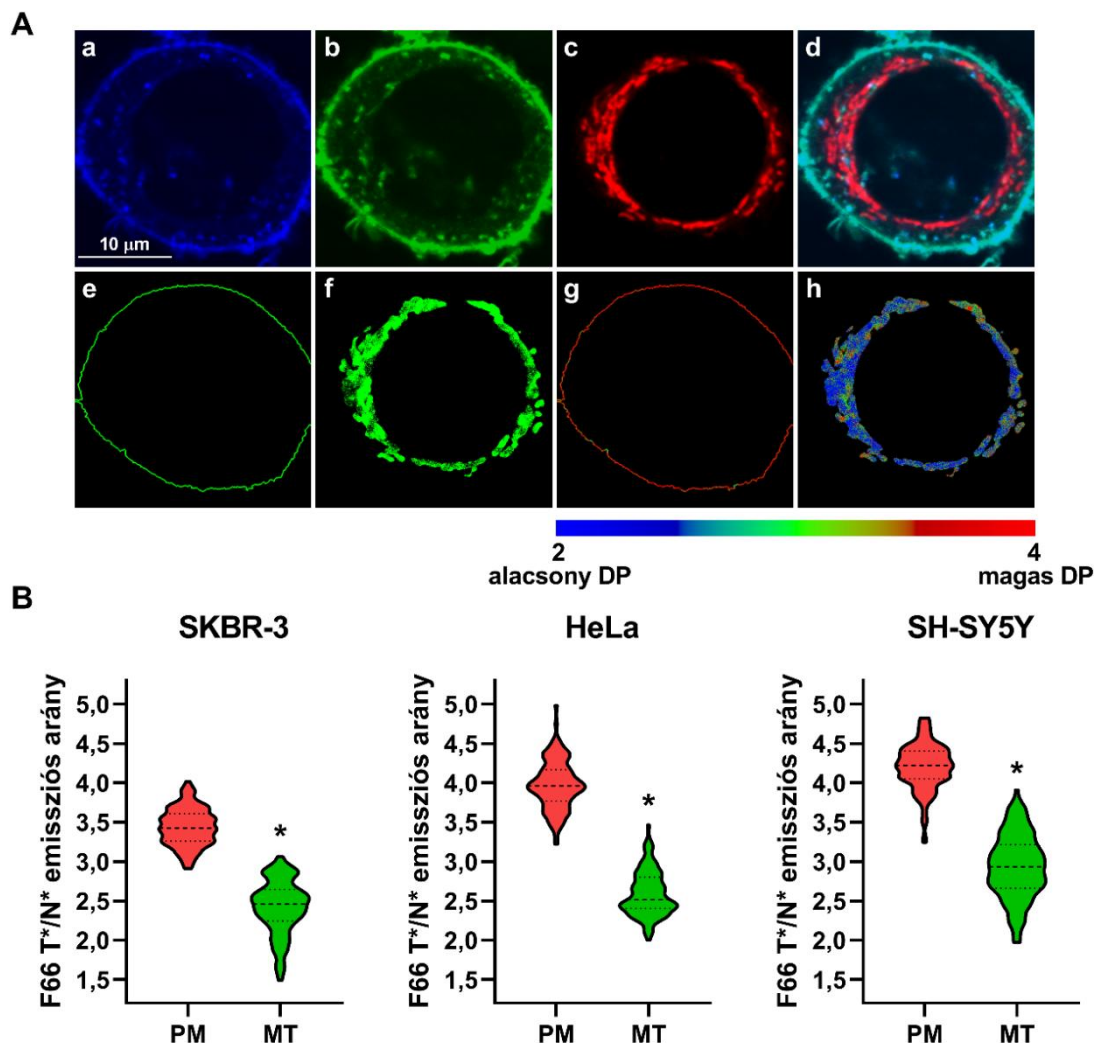
**20. ábra: A plazmamembrán és endoplazmás retikulum membránrendszer F66 T\*/N\* emissziós arányában tapasztalható különbségek.**

8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésző kamrákban tenyésztett SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejteket CellLight™ ER-GFP, BacMam 2.0 markerrel transzdukáltunk, majd F66 fluorofórral jelöltünk. **(A)** A sejtek középsíkjának megfelelően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. Az SKBR-3 sejtekről készített reprezentatív képeken szemléltetjük az F66 fluorofór N\* normál **(a)** és T\* tautomer **(b)** gerjesztett állapotainak, valamint a ER-GFP tag-nek **(c)** megfelelő beállításokkal készített felvételeket külön-külön, illetve egymásra vetítve **(d)**. Kézi kijelölésű vízfeltöltési algoritmus segítségével azonosítottuk a sejtek plazmamembrán („PM”, **e**) régióit. Endoplazmás retikulum membránnak azon pixeleket tekintettük a vízfeltöltéssel azonosított intracelluláris térnek megfelelő területen belül, melyek ER-GFP fluoreszcencia intenzitása egy adott határérték fölé esett („ER”, **f**). A dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló F66 T\*/N\* emissziós arányt háttérkorrekciót követően pixelenként kiszámítottuk és reprezentatív színekódolt képeken szemléltettük a plazmamembránnak **(g)** illetve endoplazmás retikulum membránoknak **(h)** megfelelő pixelek esetében. **(B)** Az SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtek plazmamembránjának és endoplazmás retikulum membránjainak megfelelő pixelek adataiból meghatároztuk a medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékét a két területen külön-külön minden egyes sejt esetén. Az öt független kísérletből származó 114-152 normál morfológiájú sejt esetén meghatározott medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékeket ábrázoltuk hegedűdiagramon, a medián és kvartilis értékek feltüntetése mellett. A csillagok (\*) a plazmamembrán és endoplazmás retikulum membránok közti szignifikáns különbséget jelzik ( $p < 0.05$ , Welch-féle t-próba alapján).

## 5.12. A dipólpotenciál nagysága a mitokondriális membránban

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 (**21. ábra A panel**).

A korábban a lizoszómák, a Golgi és az endoplazmás retikulum membránjainál megfigyeltekhez 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 (mitokondriummembrán:  $2,421 \pm 0,342$  vs. plazmamembrán:  $3,438 \pm 0,236$ ,  $n = 110$ ,  $p < 0,0001$ ), HeLa (mitokondriummembrán:  $2,588 \pm 0,282$  vs. plazmamembrán:  $3,975 \pm 0,309$ ,  $n = 108$ ,  $p < 0,0001$ ), és SH-SY5Y (mitokondriummembrán:  $2,938 \pm 0,405$  vs. plazmamembrán:  $4,206 \pm 0,290$ ,  $n = 135$ ,  $p < 0,0001$ ) sejtekben is (**21. ábra B panel**).



**21. ábra: A plazmamembrán és mitokondriális membránok F66 T\*/N\* emissziós arányában tapasztalható különbségek.**

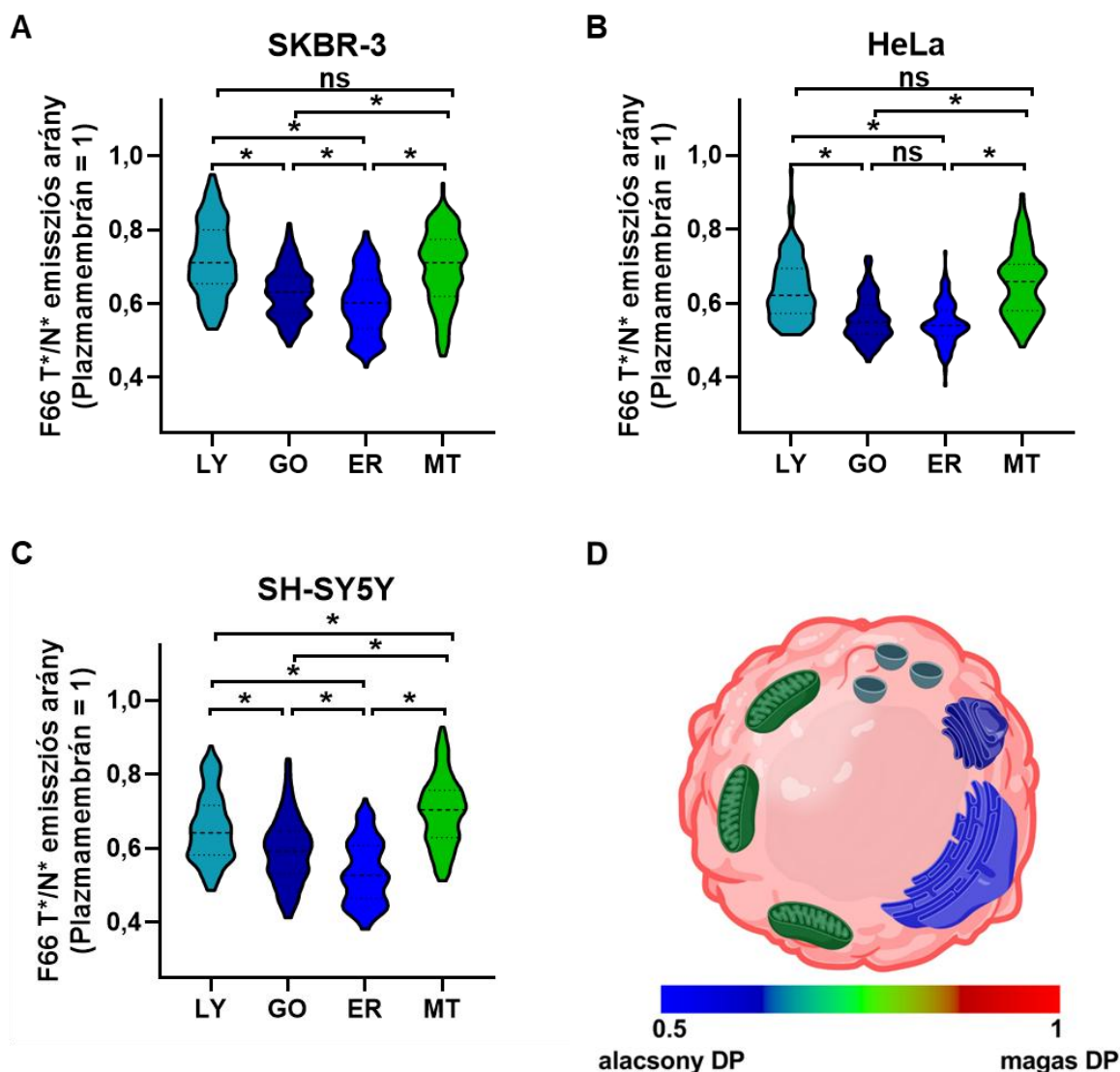
SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejteket 8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésztő kamrákban tenyésztettünk, majd F66 és MitoTracker™ Deep Red fluorofórokkal jelöltünk. **(A)** A sejtek középsíkjának megfelelően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. Az SKBR-3 sejtekről készített reprezentatív képeken szemléltetjük az F66 fluorofór N\* normál **(a)** és T\* tautomer **(b)** gerjesztett állapotainak, valamint a MitoTracker Deep Red-nek **(c)** megfelelő beállításokkal készített felvételeket külön-külön, illetve egymásra vetítve **(d)**. Kézi kijelölésű vízfeltöltési algoritmus segítségével azonosítottuk a sejtek plazmamembrán („PM”, **e**) régióit. Mitokondriális membránnak azon pixeleket tekintettük a vízfeltöltéssel azonosított intracelluláris térnek megfelelő területen belül, melyek MitoTracker Deep Red fluoreszcencia intenzitása egy adott határérték fölé esett („MT”, **f**). A dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló F66 T\*/N\* emissziós arányt háttérkorrekciót követően pixelenként kiszámítottuk és reprezentatív színekódolt képeken szemléltettük a plazmamembránnak **(g)** illetve mitokondriális membránoknak **(h)** megfelelő pixelek esetében. **(B)** Az SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejtek plazmamembránjának és mitokondriális membránjainak megfelelő pixelek adataiból meghatároztuk a medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékét a két területen külön-külön minden egyes sejt esetén. Az öt független kísérletből származó 108-135 normál morfológiájú sejt esetén meghatározott medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékeket ábrázoltuk hegedűdiagramon, a medián és kvartilis értékek feltüntetése mellett. A csillagok (\*) a plazmamembrán és mitokondriális membránok közti szignifikáns különbséget jelzik ( $p < 0.05$ , Welch-féle t-próba alapján).

### 5.13. Az intracelluláris organellumok membránjaiban mérhető dipólpotenciál nagyságának összehasonlítása

Az előző fejezetekben ismertetett eredmények egyértelműen megmutatták, hogy a dipólpotenciál jelentősen alacsonyabb az intracelluláris organellumok, így a lizoszómák, a Golgi, az endoplazmás retikulum és a mitokondriumok membránjaiban, mint a plazmamembránban – a kompartmentumok adatai azonban nem voltak közvetlenül összevethetők egymással. Az egyes, fentebb vizsgált organellumok membránjaiban mért dipólpotenciál nagyságának összehasonlításához ezért egy alternatív módszert alkalmaztunk a kvantitatív kiértékeléshez. Az organellumok 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, így 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 (**22. ábra A-C panelek**). A legmagasabb  $F66\ T^*/N^*$  emissziós arányt, azaz dipólpotenciált, a plazmamembránban találtuk, mely a lizoszómák > Golgi > endoplazmás retikulum útvonalon csökkent minden vizsgált sejt típusban, így SKBR-3 (lizoszómák:  $0,722 \pm 0,101$ ,  $n = 107$ ; Golgi:  $0,633 \pm 0,070$ ,  $n = 137$ ; és endoplazmás retikulum:  $0,600 \pm 0,084$ ,  $n = 152$ ), HeLa (lizoszómák:  $0,640 \pm 0,086$ ,  $n = 115$ ; Golgi:  $0,558 \pm 0,061$ ,  $n = 133$ ; és endoplazmás retikulum:  $0,545 \pm 0,058$ ,  $n = 114$ ), és SH-SY5Y (lizoszómák:  $0,655 \pm 0,093$ ,  $n = 154$ ; Golgi:  $0,594 \pm 0,089$ ,  $n = 138$ ; és endoplazmás retikulum:  $0,536 \pm 0,084$ ,  $n = 128$ ) sejtekben is. Az egyes organellumok közti különbségek mindhárom sejt vonalban szignifikánsnak adódtak egy kivételtől, HeLa sejtek esetében az endoplazmás retikulum és a Golgi membránjai közti eltéréstől eltekintve. A mitokondriális membránokban mért  $F66\ T^*/N^*$  arány nagysága SKBR-3 ( $0,698 \pm 0,100$ ,  $n = 110$ ) és HeLa sejtek ( $0,655 \pm 0,091$ ,  $n = 108$ ) esetében a lizoszómák membránjaihoz hasonlóan adódott, míg SH-SY5Y sejtek esetében azoktól szignifikáns mértékben nagyobb ( $0,699 \pm 0,093$ ,  $n = 135$ ) volt.

Összefoglalva, az általunk vizsgált sejt típusok esetében az alábbi sorrend állítható fel az egyes membránrendszerek között a bennük mérhető dipólpotenciál nagyságának vonatkozásában: plazmamembrán >> mitokondrium  $\geq$  lizoszóma > Golgi > endoplazmás retikulum (**22. ábra D panel**), amely különbségek – tekintve, hogy az elemzésünkbe jelentős mértékben különböző sejt vonalakat vontunk be – feltételezéseink szerint a sejtek általános jellemzőinek tekinthetők.



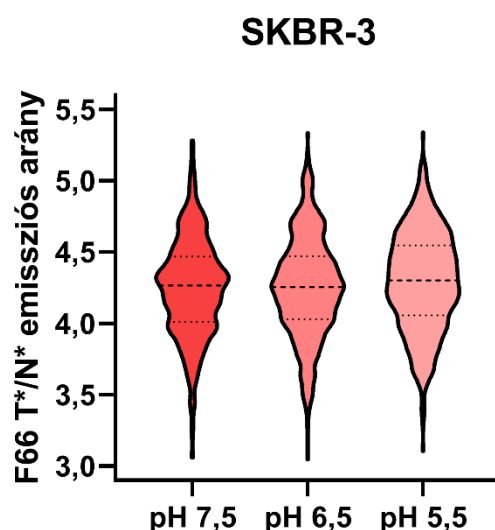
**22. ábra: Az intracelluláris membránrendszerek F66 T\*/N\* emissziós arányában mérhető különbségek**

SKBR-3, HeLa és SH-SY5Y sejteket 8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésző kamrákban tenyésztettünk, majd F66, LysoTracker™ Deep Red, CellLight™ Golgi-RFP BacMam 2.0, CellLight™ ER-GFP BacMam 2.0, illetve MitoTracker™ Deep Red fluorofórokkal, illetve markerekkel jelöltünk, konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk, majd kvantitatív képelemzés segítségével meghatároztuk a dipólpotenciál (DP) nagyságával pozitívan korreláló medián F66 T\*/N\* emissziós arányt a plazmamembránnak és a specifikus markerekkel jelölt organelumok, így a lizoszómák („LY”), Golgi-készülék („GO”), endoplazmás retikulum („ER”) és mitokondrium („MT”) membránjainak megfelelő régiókban. Az egyes organelumokban számított F66 T\*/N\* emissziós arány medián értékét az adott sejt plazmamembránjában meghatározott medián értékre normáltuk, mely adatokat hegedűdiagramon ábrázoltuk, a medián és kvartilis értékek feltüntetése mellett. A panelek öt független kísérletről származó 107-154 normál morfológiájú SKBR-3 **(A)**, HeLa **(B)**, illetve SH-SY5Y **(C)** sejt adatait tartalmazzák. A csillagok (\*) az egyes membránrendszerek közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik ( $p < 0,05$ , ANOVA analízist követő Tukey-féle HSD teszt alapján). **(D)** Az egyes organelumok között az F66 T\*/N\* emissziós értékében, azaz a dipólpotenciál nagyságában tapasztalt relatív különbségeket egy színskóddal ellátott sematikus ábrán is szemléltetjük, amelyen az organelumok színét a három sejtvonal esetében az egyes organelumok membránjainak plazmamembránhoz viszonyított relatív különbségeinek átlagos értéke határozza meg.

#### 5.14. 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 – nem a dipólpotenciál nagyságában megfigyelhető eltéréseknek tulajdoníthatók, hanem a fluorofór pH-érzékenységeinek tudhatók be. Fenti feltételezésnek ellentmond, hogy az általunk alkalmazott F66 a membránokba inkorporálódik, ahol várhatóan szabad protonok érdemben nem fordulnak elő, illetve modellmembránokon végzett mérések alapján a fluorofór spektrális tulajdonságai 5,5 és 7,5 pH értékek között változatlanok maradnak.

Mindezek ellenére azt megerősítendő, hogy a megfigyelt különbségek valóban nem a lokális pH eltéréseiből fakadnak, kontrollkísérleteket végeztünk, amelyek során 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 (**23. ábra**).



**23. ábra:** Az F66 fluorofór T\*/N\* emissziós arányának függése a membránt körülvevő vizes oldat pH-jától

SKBR-3 sejteket 8-lyukú, fedőlemez aljú sejtenyésző kamrákban tenyésztettünk, majd F66 fluorofórral jelöltünk és ezzel egyidejűleg 7,5 és 5,5 közötti tartományban különböző pH-jú kalibrációs

pufferekkel kezeltünk. Az intra- és extracelluláris pH kiegyenlítődsét valinomicin és nigericin hozzáadásával biztosítottuk. A sejtek középsíkjának megfelelően konfokális mikroszkóppal készített felvételeken kézi kijelölésű vízfeltöltés algoritmus segítségével azonosítottuk a sejtek plazmamembrán régióit, majd ezen pixelekből háttérkorrekciót követően kiszámítottuk a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló F66 T\*/N\* emissziós arányt. A három független kísérletből származó 497-623 normál morfológiájú sejt esetén meghatározott medián F66 T\*/N\* emissziós arány értékeket ábrázoltuk hegedűdiagramon a különböző pH-jú kalibrációs oldatokkal kezelt sejtek esetén, a medián és kvartilis értékek feltüntetése mellett. ANOVA analízis során nem találtunk szignifikáns különbségeket a minták között, mely arra utal, hogy az F66 T\*/N\* emissziós arány értéke nem függ a membránt körülvevő vizes oldatok pH-jától 7,5 és 5,5 közötti tartományban.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. A biológiai membránok biofizikai jellemzői és a leggyakrabban használt, környezeti paraméterekre érzékeny fluorofórok

A biológiai membránok lipidösszetétele és a kettősrétegek ezzel szorosan összefüggő molekuláris szerveződése alapvetően befolyásolja a membránba ágyazódó transzmembrán fehérjék működését. Bár a közvetlen lipid-fehérje kölcsönhatások a strukturális és szimulációs vizsgálati módszerek ugrásszerű fejlődése révén viszonylag jól dokumentáltak, a lipidösszetételtől függő membránbiofizikai jellemzők és a fehérjefunkciók közötti kapcsolatáról jóval kevesebbet tudunk, annak ellenére, hogy szerepüket már számos fehérje esetén felvetették (7, 87). Ennek – legalábbis részben – a rendelkezésre álló megfelelő mérési technikák hiánya az oka. Az élő sejtek membránbiofizikai karakterizálására leggyakrabban három paramétert, a fluiditást, a hidrációt és a dipólpotenciált használják, amelyek a membránok szerveződését eltérő nézőpontokból jellemzik. Ezek közül a fluiditás a membránokban található molekulák rotációs szabadságaként definiálható, a hidráció a vízmolekulák kettősrétegbe történő behatolásának mértékére utal, míg a dipólpotenciál egy nagy, pozitív intramembrán potenciált jelent, amely a membrán-víz határfelületen található molekuláris dipólusok nem véletlenszerű orientációjából ered (2, 4, 5, 8). Mivel ezek a tulajdonságok szorosan összefüggenek egymással, gyakran általánosságban „membránrendezettségként” hivatkoznak rájuk, és egyenértékűnek tekintik azokat, annak ellenére, hogy bizonyos megfigyelések alapján a membránok összetételének változása esetén azok nem feltétlenül egymással párhuzamosan változnak (10, 34). Utóbbi adatok egyértelműen arra utalnak, hogy célszerű ezeket a paramétereket elkülönítetten, vagy legalábbis egymással párhuzamosan vizsgálni a membránok szerkezetének leírására, ugyanis a három tényező eltérő mélységben jellemzi a molekuláris rendezettséget a membránban – a fluiditás a legmélyebb hidrofób régiókban, a dipólpotenciál a membrán-víz határfelületen, míg a hidráció főleg a kettő között (5, 8, 24).

Élő sejtekben ezen membránbiofizikai jellemzők tanulmányozása leginkább környezeti paraméterekre szenzitív fluorofórokkal történik, amelyek közös jellemzője, hogy fluoreszcens tulajdonságaik a lokális mikrokörnyezet függvényében megváltoznak. Ezeket a festékeket rutinszerűen az érzékelésük mechanizmusa alapján osztályozzák – a három legnagyobb családot a viszkozitásérzékeny próbák, a lokális hidrofobicitásra érzékeny szolvatokrómos festékek és az elektromos erőter nagyságát érzékelő, feszültség-szenzitív elektrokrómos fluorofórok alkotják (114, 115). A membránok fluiditásának vizsgálatára alkalmas viszkozitásérzékeny próbák közül a leggyakrabban használt a TMA-DPH, amely fluoreszcencia anizotrópiája negatívan korrelál a festék mozgási szabadságával, azaz a membránfluiditással (10, 34, 107-110). A szolvatokrómos próbák prototípusa a Laurdan (6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin), amely emissziós spektruma a lokális hidrofobicitás függvényében változik,

így a festék spektrális eltolódását számszerűsítő generalizált polarizációja negatívan korrelál a víz membránba történő penetrációjának mértékével (10, 34, 107, 108, 116-120). A Laurdan hátránya azonban, hogy UV-tartományba eső fotonokkal gerjeszthető és alacsony fotostabilitással rendelkezik, így az utóbbi időben több, kedvezőbb fotofizikai tulajdonságokkal rendelkező funkcionális alternatíváját is leírták. Az egyik ilyen vegyület a PY3174, ami szintén alkalmasnak bizonyult a membránhidráció vizsgálatára (108, 111). A feszültségszenzitív elektrokrómos próbákra pedig általában az jellemző, hogy gerjesztési spektrumuk alacsonyabb hullámhosszok felé tolódik el a lokális intramembrán térerősség függvényében. A 2.4. fejezetben leírtaknak megfelelően ezen vegyületek közül a legelterjedtebb a di-8-ANEPPS, amelyet jellemzően gerjesztési aránymérés során használnak a dipólpotenciál nagyságának becslésére (10, 11, 14, 15, 21-23, 30, 34, 58, 59).

## 6.2. A membránbiofizikai tulajdonságok vizsgálata élő sejtekben

Bár a fenti fluorofórokat gyakran használják a biológiai membránok szerkezetének jellemzésére, alkalmazásukat számos tényező limitálja. A viszkozitásérzékeny próbák, így a TMA-DPH legnagyobb hátránya, hogy a fluoreszcencia anizotrópia mérése hagyományos konfokális mikroszkópia vagy áramlási citometria során nem lehetséges, a festéket szinte kizárólag spektrofluorimetria során használják (10, 34, 107-110). A Laurdan alkalmazhatóságát kedvezőtlen spektrális tulajdonságai korlátozzák, nevezetesen az, hogy gerjesztési spektruma a közeli UV-tartományba esik, illetve fotostabilitása nagyon alacsony. Ezért a vegyület generalizált polarizációját jellemzően szintén spektrofluorimetriával (10, 34, 108), illetve ritkábban kétfoton-mikroszkópiával (107, 117, 118, 121) vizsgálják. Előbbi módszer nagy hátránya, hogy nem nyújt információt az egyedi sejtekre vonatkozóan és a halott sejtek sem különíthetők el, míg utóbbi nem érhető el széles körben. Bár a Laurdan-t elvétele használták – a limitáló, illetve a megbízhatóságot megkérdőjelező tényezők hangsúlyozása mellett – konfokális mikroszkópia során (122-125), az általános vélekedés szerint sem a TMA-DPH, sem pedig a Laurdan nem alkalmas élő sejtek hagyományos képalkotáson, illetve áramlási citometrián alapuló megbízható tanulmányozására. A TMA-DPH-val és a Laurdan-nal ellentétben a di-8-ANEPPS (10, 14, 23, 59) kiválóan használható konvencionális mikroszkópia során, így segítségével az egyedi, élő sejtek membránbiofizikai jellemzése is lehetséges. A hagyományos konfokális mikroszkópos módszerek hátránya ugyanakkor, hogy nem alkalmasak nagy áteresztőképességű vizsgálatokra. Az áramlási citometria az a módszer, ami egyesíti a spektrofluorimetria és konfokális mikroszkópia előnyeit, azaz segítségével nagymennyiségű egyedi sejt tanulmányozható, a mintákban esetlegesen előforduló különböző sejtpopulációk elkülönítésének lehetőségével. Ebből a szempontból ugyanakkor rendkívül hátrányos, hogy a dipólpotenciál kvantifikációjára a di-8-ANEPPS gerjesztési aránymérés során használható megbízhatóan – áramlási citometrián alapuló kvantitatív arányméréshez ugyanis sokkal kedvezőbb lenne az emissziós arány elemzése, azaz azonos hullámhosszon történő gerjesztést

követően a fluoreszcencia intenzitást két emissziós tartományban egyidejűleg mérni. A di-8-ANEPPS vizsgálata során már korán kiderült, hogy a molekula nem alkalmas a dipólpotenciál meghatározására megbízható és reprodukálható módon emissziós aránymérés során (61). Sőt, ezidáig egyáltalán nem írtak le áramlási citometrián vagy egyéb technikán alapuló, élő, egyedi sejtek nagy áteresztőképességgel történő vizsgálatára alkalmas módszert, ami pedig a jövőben lehetővé tenné akár klinikai minták elemzését is.

### 6.3. A dipólpotenciál vizsgálata egy új, az F66 fluorofór és áramlási citometria alkalmazásán alapuló módszerrel

A disszertációban bemutatott munkánk első részében fentiekkel összhangban egy új, áramlási citometrián alapuló, membránbiofizikai tulajdonságok vizsgálatára alkalmas mérési módszer kidolgozását tűztük ki célul. A korábban tárgyaltaknak megfelelően a leggyakrabban alkalmazott, környezeti paraméterekre szenzitív próbák – így a TMA-DPH, Laurdan vagy di-8-ANEPPS – erre a célra nem voltak alkalmasak. Nagyon ígéretesnek tűntek azonban a viszonylag újonnan leírt 3-hidroxiflavon származékok, amelyek közös tulajdonsága, hogy az emissziós spektrumuk nagymértékben megváltozik a lokális intramembrán erőter, vagyis a dipólpotenciál nagyságának függvényében (62, 63, 65). A festékcsoport tagjai közül – fotofizikai tulajdonságai miatt – az F66 nevű származék tűnt a legalkalmasabbnak élő sejtek tanulmányozására. Az F66 – és az egyéb 3-hidroxiflavon próbák – jellemzője, hogy gerjesztett állapotban egy ESIPT reakció megy végbe, ami  $N^*$  normál és  $T^*$  tautomer gerjesztett állapotú formák megjelenését eredményezi, amelyek jelentősen eltérő hullámhossz-tartományba eső fotonokat bocsátanak ki, következésképp a fluorofór emissziós spektrumában jól elkülönülő sávok jelennek meg a két formának megfelelően. Bár az  $N^*$  és  $T^*$  emissziós sávok mérsékelt elektrokrómos és szolvatokrómos eltolódásokat is mutatnak, egymáshoz viszonyított relatív intenzitásaikban sokkal kifejezettebb változások következhetnek be, mivel az ESIPT reakciót – és ezáltal a két forma relatív gyakoriságát is – jelentősen modulálja a lokális elektromos tér erőssége. Ez annak köszönhető, hogy míg az  $N^*$  nagy dipólusmomentummal jellemezhető, addig a  $T^*$  formáé igen kicsi. Ennek eredményeként a lokális elektromos tér nagyságának változásai jelentősen módosítják az  $N^*$  állapot energiáját, miközben a  $T^*$  formáét csak marginálisan befolyásolják, ami az  $N^*$  állapot relatív stabilizációjához vagy destabilizációjához vezet a  $T^*$ -hoz képest. Ennek megfelelően a lokális elektromos tér befolyásolja a gerjesztett formák  $N^*$  és  $T^*$  állapotok közötti eloszlását, ami ezáltal relatív emissziójuk megváltozásához vezet (63, 65). Fentiekkel összhangban korábban kimutatták, hogy az F66  $N^*/T^*$  emissziós aránya erős negatív korrelációt mutat a dipólpotenciál nagyságával (14, 16, 64). Mindezek alapján logikus volt a feltételezés, hogy az F66  $N^*/T^*$  emissziós arányának vizsgálata alkalmas lehet a dipólpotenciál nagyságának áramlási citometriával történő tanulmányozására.

Munkánk első részében ezzel összhangban egy, az F66 és áramlási citometria alkalmazásán alapuló emissziós aránymérési módszert dolgoztunk ki, optimalizáltunk és validáltunk a dipólpotenciál mérésére. Kísérletsorozatunk során a módszerünk megbízhatóságát több bizonyíték is alátámasztotta: (i) a 6KC, illetve a phloretin, vagyis a dipólpotenciál növelésére, illetve csökkentésére legszélesebb körben alkalmazott két vegyület (14, 21-23), a várakozásoknak megfelelően rendre csökkentette, illetve növelte az F66  $N^*/T^*$  emissziós arányát (**9. ábra**); (ii) három különböző szterol, a 6KC, a koleszterin és a 7DHC, a dipólpotenciálra gyakorolt, a szakirodalomban korábban leírt hatásaiknak (15-20) megfelelően dóziszfüggően, ugyanakkor eltérő mértékben csökkentették az F66  $N^*/T^*$  arányát (**10. ábra**); (iii) ezen változások konzisztens módon megjelentek két különböző sejtvonalban is; valamint (iv) az F66  $N^*/T^*$  arányában az áramlási citometriával megfigyelt változások és a dipólpotenciál mérése során „aranystandard” módszernek tekintett, a di-8-ANEPPS gerjesztési arányának spektrofotometriás meghatározásával kapott eltérések közötti lineáris regressziós analízis során meghatározott korrelációs együtthatók értéke közel volt az egyhez (**13. ábra**), azaz közöttük kiváló korreláció volt megfigyelhető.

Munkánk során azt is megvizsgáltuk, hogy a dipólpotenciálon kívül milyen más jellemzők és mekkora mértékben járulhatnak hozzá az F66  $N^*/T^*$  emissziós arányában az általunk alkalmazott, a sejtmembrán összetételét módosító kezelések révén bekövetkező változásokhoz. Korábban kimutatták, hogy az apoptózis során a membránban megjelenő eltérések jelentősen módosíthatják az F66 spektrális jellemzőit (64). Ennek a méréseinket zavaró hatását azonban ki tudtuk zárni, mivel a kezelések a kísérletek során még a legmagasabb koncentrációkban sem eredményeztek szignifikáns változást a sejtek életképességében (**12. ábra A panel**). Tekintettel a membránok dipólpotenciálja, fluiditása és hidrációja közötti szoros kapcsolatra (2-5, 7, 8), megvizsgáltuk az általunk alkalmazott lipidek által ezekben a paraméterekben előidézett változások közötti korrelációt is. Bár a membránfluiditásban megfigyelt eltérések összhangban voltak a korábban publikált adatokkal (40, 126, 127), nem mutattak szignifikáns korrelációt a meghatározott F66 emissziós arányokkal, ami az F66 emissziós spektrumában bekövetkező változásokhoz való jelentős mértékű hozzájárulásuk ellen szól (**13. ábra**). Ezekben a kísérletekben a TMA-DPH egyensúlyi fluoreszcencia anizotrópiáját mértük, mivel ez a festék az eredeti kiindulási vegyülethez, a DPH-hoz képest egy extra, ionos csoporttal rendelkezik, így a feltételezések szerint a lipid-víz határfelülethez közelebbi membránrégió fluiditásáról szolgáltat információt (128-130). A TMA-DPH viszonylag lassú internalizációt mutat (131), ezért fluoreszcenciája szinte kizárólag a sejtmembránból származik, hasonlóan az F66-hoz, amelyről korábban kimutattuk, hogy kísérleti körülményeink között a sejtek plazmamembránjában marad (14, 16), így nem a két festék eltérő szubcelluláris lokalizációja okozza a köztük megfigyelhető különbséget. Ugyanakkor szignifikáns korrelációkat találtunk a PY3174 generalizált polarizációja és az F66  $N^*/T^*$  aránya között (**13. ábra**),

ami elméleti megfontolások alapján is egyértelműen várható, figyelembe véve a membránhoz asszociált, rendezett vízmolekulák szerveződése és a dipólpotenciál nagysága közötti erős kapcsolatot (2-4, 7, 18, 19, 113).

Áramlási citométeres mérési módszerünk hátránya lehet, hogy amennyiben csupán az  $F66\ N^*/T^*$  emissziós arány átlagértékét határozzuk meg a mintákban előforduló összes sejtre vonatkoztatva, a kapott értékek mögött nagyfokú heterogenitás rejtőzhet és az esetlegesen jelenlevő alpopulációk rejtve maradhatnak. Ugyanakkor módszerünk a di-8-ANEPPS-en alapuló hagyományos spektrofluorimetriás vizsgálatokkal szemben lehetőséget biztosít ezen szubpopulációk azonosítására és elkülönítésére is az előre irányuló és oldalirányú fényszórási paraméterek, esetleg egyéb fluoreszcens jelölések kombinációi alapján. A mérések során az átlagértékek kizárólagos vizsgálata mellett más statisztikai paramétereket, például a szórást vagy az átlag standard hibáját is érdemes figyelembe venni, mivel ezek is releváns biológiai információt hordozhatnak – így például a jelentősen megnövekedett variancia a vizsgált sejtpopuláció nagyfokú heterogenitását jelezheti. Nem hagyható figyelmen kívül ugyanakkor a dipólpotenciál sejtmembránon belüli, funkcionálisan releváns laterális heterogenitása sem (14, 16), melynek vizsgálatára azonban ez az áramlási citometriás eljárás önmagában nem alkalmas, arra a konfokális mikroszkópia használható. E megfontolások alapján egy multimodális megközelítés, amely egyaránt ötvözi az áramlási citometriát és a konfokális mikroszkópiát, lehet a leginkább alkalmas arra, hogy feltárja a dipólpotenciál nagyságában bekövetkező eltérések részleteit a membránösszetétel változásai esetén.

#### 6.4. A szterolok és zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatásai és azok relevanciája

Áramlási citométeres módszerünk validációja során a dipólpotenciál csökkentésére leggyakrabban használt vegyület, a phloretin (14, 21-23, 32, 33) mellett három különböző szterolt, a koleszterint, a 7DHC-t és a 6KC-t is alkalmaztuk. Korábbi irodalmi adatok alapján ezen szterolok mindegyike növeli a dipólpotenciál nagyságát, azonban eltérő mértékben. A koleszterin a membránban rögzül úgy, hogy a molekula hossz tengelye merőlegesen áll a membrán síkjához képest, mely pozícióban képes erősíteni a szénhidrogén láncok közti kölcsönhatásokat, megnyújtja a láncok hosszanti kiterjedését, csökkenti a lipidek átlagos keresztmetszeti terület és növeli a membrán rendezettségét és vastagságát (113). Ezáltal egyúttal csökkenti a membránfluiditást (14, 109, 132-135), illetve a -hidrációt is a vízmolekulák behatolásának csökkentésével (116, 117, 119, 120). Emellett a dipólpotenciál nagyságát is növeli, amiben szerepet játszik saját dipólusmomentuma, a foszfolipidek feji csoportjainak kondenzációja, továbbá a membránhoz társult vízmolekulák mennyiségének és orientációjának, illetve a membrán dielektromos állandójának megváltoztatása (14-16, 22, 34, 47, 58, 59). A legtöbb tekintetben a 7DHC, amely csupán egy extra kettős kötést tartalmaz a szterolgyűrű 7. pozíciójában, általában hasonló

biofizikai hatásokat fejt ki a fluiditásra és a hidrációra (127). A dipólpotenciált növelő hatásai azonban jóval kisebbek, mint a koleszteriné (15, 30), aminek oka lehet eltérő dipólusmomentumuk, membránbeli dőlésszögük, illetve membránhoz asszociált vízmolekulákra gyakorolt hatásuk (15). A 6KC ezzel szemben a koleszterinhez képest dőltebb, a membrán síkjával párhuzamosabb helyzetben rögzülhet, mivel mind a keto- mind a hidroxilcsoportja számára energetikailag kedvezőbb a hidrofíl határfelülethez való közelség (18, 113). Ez az orientáció magyarázza a membrán vastagságára, a lipidek rendezettségére gyakorolt kisebb hatást a membrán mélyebb rétegeiben, egyúttal azt is, hogy a felszínközeli vízmolekulákkal kialakított jóval kiterjedtebb kölcsönhatás jelentősen, a koleszterinhez képest is sokkal nagyobb mértékben növeli a dipólpotenciál nagyságát, amelyhez hozzájárul nagyobb dipólusmomentuma is (21-23, 34). Mind F66 és áramlási citometria, mind pedig di-8-ANEPPS és spektrofluorimetria során a fentiekkel egybecsengő eredményeket kaptunk, azaz a 6KC a dipólpotenciál jóval nagyobb növekedését eredményezte, mint a koleszterin, míg legkisebb mértékű hatásokat a 7DHC eredményezett (**10. ábra**). A kísérleteink során megfigyelt hatások relevanciájára utal, hogy korábbi tanulmányok alapján a dipólpotenciál hasonló mértékű változása jelentősen befolyásolja a transzmembrán fehérjék, illetve a membránokkal kölcsönható peptidek viselkedését (16, 23, 34). Kísérleteink potenciális biológiai jelentőségét ezek mellett az általunk alkalmazott kezelési koncentrációk is alátámasztják: korábbi eredmények alapján ugyanis a kísérletek során alkalmazott protokollok a membránban található koleszterin mennyiségében hasonló mértékű változásokat okoznak, mint ami hiperkoleszterinémias betegekben is megfigyelhető (136). Emellett, mivel a sejtek M $\beta$ CD-komplexekkel történő kezelése során a 7DHC és koleszterin hatékonysága nagyjából azonos (137), az okozott szteroleltérések mértéke is várhatóan összevethető. Az, hogy korábbi megfigyelések szerint a Smith-Lemli-Opitz-szindrómás betegekből származó limfociták membránjában a 7DHC szintje összevethető a kontrollszemélyek limfocitáinak membránjában található koleszterin mennyiségével (138), szintén az alkalmazott 7DHC koncentrációk relevanciája mellett szól.

Miután igazoltuk az új, áramlási citometrián alapuló dipólpotenciál mérési módszerünk alkalmazhatóságát és megbízhatóságát, segítségével további kísérleteink során elemeztük különböző zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatását is. Kimutattuk, hogy az  $\omega$ -3 többszörösen telítetlen ALA jelentősen csökkentette a dipólpotenciál nagyságát, míg a telített SA, és – meglepetésünkre – az  $\omega$ -6 többszörösen telítetlen GLA ezzel ellentétes hatást fejtett ki, azaz enyhén növelte azt (**11. ábra**). A koleszterin és a zsírsavak hatását együttesen vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az ALA képes volt ellensúlyozni, míg az SA és a GLA inkább enyhén fokozta a koleszterin dipólpotenciált növelő hatását (**15. ábra**).

Eredményeink első pillantásra meglepőnek tűntek annak fényében, hogy az  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 többszörösen telítetlen zsírsavakról általában úgy gondolják, hogy mind minőségileg, mind mennyiségileg hasonló

változásokat idéznek elő a biológiai membránok biofizikai tulajdonságaiban, így növelik azok fluiditását (39-41) és hidrációját (42), valamint csökkentik a kettősrétegek vastagságát és fokozzák azok hajlítási rugalmasságát (41, 43). Ezek mellett korábbi publikációk alapján mind az  $\omega$ -3, mind az  $\omega$ -6 PUFA-k hasonlóan kedvező hatást mutatnak az iszkémiás szívbetegség prevalenciájára és lefolyására, amit részben a szérumban található lipidszintekre gyakorolt hatásaiknak tulajdonítanak (139-145). Fentiekkel ellentétben egyes beszámolók szerint az  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 PUFA-k nem minden tekintetben egyenértékűek, mivel az  $\omega$ -6 származékok – az  $\omega$ -3 PUFA-kal ellentétben – inkább növelhetik a kardiovaszkuláris rendellenességek kockázatát (146-149). Felvetették azt is, hogy az  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 PUFA-k ellentétes módon befolyásolhatják a malignus daganatok incidenciáját (150-152), illetve egy tanulmány szerint az  $\omega$ -3 PUFA-k képesek lehetnek a tumorsejtek szelektív apoptózisát indukálni (153). Bár az  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 PUFA-k fent említett, ellentétes hatásait általában főként oldható származékaik jelátviteli útvonalakra és génexpresszióra gyakorolt eltérő hatásainak tulajdonítják, néhány közelmúltban megjelent publikáció felvetette, hogy az ezen zsírsavak által előidézett membránbiofizikai változások is hozzájárulhatnak a transzmembrán fehérjékre gyakorolt hatásaikhoz és azok funkcionális következményeihez a sejt működésére nézve (154-156). Mivel a dipólpotenciál elválaszthatatlanul összefügg a sejtmembrán összetételével és szerkezetével, így az általunk vizsgált  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt ellentétes hatásából következhet, hogy azok eltérően befolyásolhatják a membrán biofizikai tulajdonságait. Bár többszörösen telítetlen szerkezetükből adódóan mindkét típusú zsírsav hasonlóan „lazítja” a membránok hidrofób magját (39-41) különböző konformációjuk révén a lipid-víz határfelületen eltérő hatással bírhatnak. Molekuláris szerkezete alapján várható, hogy az ALA hidrofób szénhidrogénlánc (PubChem ID: 5280934) igen jelentős mértékben visszahajlik a hidrofíl feji rész felé, míg ugyanez a GLA esetében (PubChem ID: 5280933) jóval kevésbé kifejezett lehet. Molekuláris dinamikai szimulációk ezt megerősítették, ugyanis azt találták, hogy az ALA hidrofób lánc hajlamos arra, hogy megközelítse a lipid-víz határfelületet (157). Fentiek alapján ezért azt feltételezzük, hogy az ALA hidrofób szénhidrogén lánc a lipid-víz határfelület közelébe férkőzve megzavarja a lipidek feji csoportjai és a membránhoz asszociált határfelületi vízmolekulák szabályos elrendeződését, ami a dipólpotenciál csökkenéséhez vezet. A GLA hidrofób részének ezzel szemben kisebb lehet a hajlama arra, hogy megközelítse a lipid-víz határfelületet, így nem képes csökkenteni a dipólpotenciál nagyságát. Feltételezésünkkel összhangban egy nemrég megjelent molekuláris dinamikai szimulációs tanulmányban kimutatták, hogy az  $\omega$ -3 PUFA-k a membránba épülve a modellezett kettősrétegek dózisfüggő laterális tágulásának és elvékonyodásának indukálása, illetve rendezettségének csökkentése mellett jelentősen fokozták a vízmolekulák bejutását a hidrofób régiókba, ezáltal csökkentve a lipid-víz határfelületek távolságát és jelentősen módosítva a koleszterin eloszlását a membránban. Az  $\omega$ -3 PUFA-k hiányában a koleszterinmolekulák főként közvetlenül a foszfolipidek feji csoportjai alatt helyezkedtek el, hidratált hidroxilcsoportjuk pedig

hidrogénkötéseket alakított ki a foszfolipidek glicerol vázával. Ezzel szemben  $\omega$ -3 PUFA-k jelenlétében a koleszterin diffúzabb módon oszlott el a kettősréteg hidrofób magjában, ami csökkent rendezettséget eredményezett. Ez összefügghet azzal, hogy utóbbi esetben hidroxilcsoportja a fokozott vízpermeáció miatt a mélyebb membránrégiókban is hidratált marad (158). Az  $\omega$ -6 PUFA-k kissé eltérő molekulaszervezetükből adódóan az  $\omega$ -3 PUFA-khoz képest várhatóan másképpen helyezkednek el a membránban, így különbözően is befolyásolhatják a koleszterin- és vízmolekulák eloszlását. Ezt a feltevést a jövőben olyan molekuláris dinamikai szimulációk erősíthetnék meg, amelyek feltárják az  $\omega$ -6 PUFA-k intramembrán lokalizációjának és molekuláris szerveződésre gyakorolt hatásainak részleteit.

Kísérletes eredményeink relevanciáját két tényező adja. Egyrészt a kezelések során a zsírsavak általunk alkalmazott koncentrációi egy tartományba estek azokkal a szérumszintekkel, amelyeket az  $\omega$ -3 PUFA-k étrendi kiegészítésének hatásait vizsgáló tanulmányokban mértek (159, 160). Ezek alapján az általunk megfigyelt eltérések biológiai értelemben relevánsnak tekinthetők és a megfigyelt különbségek akár hozzájárulhatnak az  $\omega$ -3 és  $\omega$ -6 PUFA-k eltérő élettani hatásaihoz is. Másrészt új áramlási citometriás módszerünkkel sikerült találnunk egy olyan vegyületet, amely fiziológiás körülmények között is nagy mennyiségben fordul elő az emberi szervezetben és egyben képes a dipólpotenciál nagyságának kísérletes csökkentésére.

## 6.5. A zsírsavak hatása a penetratin celluláris felvételére és endolizoszomális kiszabadulására

Bár már eddig is számos sejtfunkcióról kiderült – és várakozásaink szerint még többről ki fog derülni a jövőben –, hogy a dipólpotenciál nagysága befolyásolja, talán az egyik legszélesebb körben tanulmányozott jelenség bizonyos anyagok, köztük gyógyszerek (35),  $\beta$ -amiloid (98) és más peptidok (99, 100) sejthez való kötődése és felvétele. Ezzel összhangban munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a dipólpotenciál phloretinnel vagy atorvastatinnal történő csökkentése növeli a penetratin, egy kationos sejtpenetráló peptid sejtekbe való felvételét, elsősorban az endolizoszomális kiszabadulás fokozása révén (34).

A CPP-k ígéretes terápiás lehetőséget jelentenek a sejtek számára egyébként impermeábilis molekulák citoszolba és intracelluláris kompartmentumokba történő bejuttatására (8, 101, 161-163). Klinikai alkalmazhatóságukat azonban korlátozza alacsony biohasznosulásuk (102), így valamennyi, a felvételüket potenciálisan fokozni képes vegyület vagy kezelési mód közvetlen orvosi jelentőséggel bírhat. A CPP-k citoszolba és intracelluláris kompartmentumokba való bejutásának mindkét mechanizmusának, vagyis a plazmamembránon át történő közvetlen transzlokációnak (101), valamint

az endocitózisnak és az azt követő endolizoszomális felszabadulásnak (20, 103) közös jellemzője, hogy a membránnal történő elektrosztatikus kölcsönhatások szerepet játszanak a folyamatban (164, 165).

Következésképpen mindkét útvonal hatékonyságát befolyásolhatja a dipólpotenciál által keltett elektromos erőter nagysága, illetve az abban bekövetkező változás. Ezzel a hipotézissel összhangban azt találtuk, hogy az  $\omega$ -3 többszörösen telítetlen ALA és az általa kiváltott dipólpotenciál csökkenés jelentősen fokozta egy kationos CPP, a penetratin endolizoszomális kiszabadulását (**15. ábra**). Mivel az ALA által fokozott kiszabadulás megnöveli a citoszolikusán elérhető penetratin mennyiségét, így logikus az a feltételezés, hogy az ahhoz konjugált farmakon koncentrációja, vagyis a terápiás szer biohasznosulása is növekedhet. Ugyanakkor a telített SA és az  $\omega$ -6 többszörösen telítetlen GLA, amelyek inkább emelik a dipólpotenciált, nem változtatták érdemben a penetratin citoplazmába való bejutását (**15. ábra**). Ezen eredményeink megerősítik, hogy a dipólpotenciál nagysága befolyásolja a CPP-k felvételének hatékonyságát és hangsúlyozzák az  $\omega$ -3 többszörösen telítetlen zsírsavak dipólpotenciált csökkentő hatását, illetve annak sejtelettani jelentőségét.

Kísérleteinkben a dipólpotenciál változásainak a CPP-k sejtekbe történő felvételére és endolizoszomális kiszabadulására gyakorolt hatásainak számszerűsítésére fluorofórral konjugált penetratinokat vizsgáltunk áramlási citometriás eljárás segítségével. Irodalmi adatok alapján ugyanakkor egyes fluorofórok CPP-khez történő konjugációja befolyásolhatja ezen peptidok membránokhoz való kötődését és azokon történő átjutását (166), ami kiküszöbölhető jelölésmentes technikák, például NMR spektroszkópia (166), a molekulák intrinszc fluoreszcenciájának mérése (167) vagy tömegspektrometria (168) alkalmazásával. Fentiek ellenére a fluoreszcenciaalapú mérési megközelítések továbbra is a leggyakrabban használt technikák maradnak a CPP-k felvételének tanulmányozására egyedi, elvitathatatlan előnyeik miatt. Ezek közé tartozik a nagy áteresztőképességű vizsgálatokra való alkalmasság, az egyszerűbb alkalmazhatóság, a CPP-szintek becslésének lehetősége a különböző intracelluláris kompartmentekben, valamint az élő és elhalt sejtek megkülönböztetésének lehetősége. Ez utóbbi tényező lényeges ezekben a kísérletekben, különös tekintettel nemrégiben tett megfigyeléseinkre, miszerint a károsodott vagy halott sejtek membránjához jóval nagyobb mértékben, azonnal kötődik a penetratin, ugyanakkor időfüggő felvételük sokkal kisebb mértékben növekszik az intakt, élő sejtekhez képest (34). Habár a fluoreszcensen jelölt penetratinokat alkalmazó módszerekkel kapott eredmények értelmezése nagy körültekintést igényel, ugyanakkor ezen mérési módszerek – jelenlegi ismereteink szerint – még mindig a legcélravezetőbbnek tekinthetők.

## 6.6. Az intracelluláris organellek membránjainak lipidösszetétele és strukturális szerveződése

A sejten belül minden egyes kompartmentumot egyedi, sajátos lipidösszetétellel rendelkező membrán vesz körül, ami a lipidek topográfiai korlátozott szintézisének, jellegzetes lokális, az adott kompartmentumokra specifikus metabolizmusának, valamint a vezikulák segítségével vagy közvetlen kontaktushelyeken keresztül megvalósuló szelektív organellek közötti transzportjának köszönhető (66-68, 169). A legtöbb lipid, például a foszfolipidek, a koleszterin és a komplex szfingolipidek prekursoraként szolgáló ceramidok az endoplazmás retikulumban szintetizálódnak, ugyanakkor a koleszterin és a szfingolipidek gyorsan más organellekbe szállítódnak. Következésképpen az endoplazmás retikulumot határoló kettősrétegben kevés ilyen molekula marad és ezért ezen sejtsejtszervecske membránja várhatóan lazább pakolódást mutat, ami kedvezhet az újonnan szintetizált lipidek és fehérjék membránba épülésének és transzportjának. A Golgi-készülék, amely a szekréciós útvonalban a lipidek szortírozó állomásaként is működik, és „köztes lipidommal” jellemezhető, szintén a lipidszintézis jelentős helyének tekinthető. Ebben az organelumban azonban jellemzően a komplexebb szfingolipidek, például a szfingomielin, a glükoszilceramidok és a magasabb rendű glikoszfingolipidek szintézise történik, amelyek ezután főleg a plazmamembránba transzportálódnak. A plazmamembrán, amely az extracelluláris tér felé a sejtet határolja, ezen funkciója miatt inkább fizikai értelemben a stabilitásra épül, ugyanis nagy mennyiségű szfingolipidet és koleszterint tartalmaz, ami sokkal nagyobb pakolási sűrűséget, rendezettséget és mechanikai stresszel szembeni ellenállóképességet eredményez. Az endocitotikus útvonalban a korai endoszómák membránjainak összetétele várhatóan a plazmamembránéhoz hasonló, míg az útvonal belső elemei, például a lizoszómák, ettől eltérő összetétellel, például alacsonyabb koleszterin- és szfingolipid-mennyiséggel rendelkezhetnek. A mitokondriális membránok egyedi, baktériumokra emlékeztető összetételt mutatnak, beleértve az érdeklődésben egyedül ebben az organelumban előforduló kardiopilin magas szintjét, a foszfatidilglicerol bőséges jelenlétét, a magas foszfatidiletanolamin/foszfatidilkolin arányt és általában az alacsony koleszterinszintet. Bár a mitokondriumokban a lipidek szintézisét végző enzimek egyedi készlete van jelen, jelentős lipidcsere zajlik a közvetlen endoplazmás retikulum-mitokondrium kontaktushelyeken. Noha az organellek membránjainak ezen sajátos lipidösszetétele várhatóan tükröződik azok szerveződésében és biofizikai tulajdonságaiban is, az intracelluláris sejtsejtszervecskék ilyen tulajdonságai alig dokumentáltak, különösen ép, élő sejtekben, mivel a legtöbb, az intracelluláris membránokat tanulmányozó kísérletet korábban izolált organelleken vagy egy adott kompartmentum összetételét utánzó modellmembránokon végezték (66-68, 169).

## 6.7. Az intracelluláris organellek membránjainak vizsgálata környezeti paraméterekre szenzitív fluorofórokkal

Élő sejtekben az intracelluláris organellek membránjainak, illetve azok biofizikai tulajdonságainak tanulmányozása általánosságban az alábbi négy fő stratégia szerint végezhető. i) Specifikusan egy adott organellekben felhalmozódó fluorofórok laterális mozgási szabadságának elemzése információt adhat az adott kettősréteg jellemzőiről, amint azt GFP-konjugált endoplazmás retikulum-rezidens lipidek vagy fehérjék (69, 70), illetve a mitokondriumokban dúsuló TMRM (74) laterális diffúziójának vizsgálata során kimutatták. ii) Egy lokális mikrokörnyezeti paraméterekre érzékeny fluorofór megfelelő molekuláris csoporttal konjugálva szintén preferenciálisan akumulálódhat egy adott organellekben. Ilyen megközelítést korábban alkalmaztak annak igazolására, hogy a Golgi-membrán szerkezeti plaszticitása fokozottabb a merevebb plazmamembránokhoz képest, amit egy Golgi-specifikus C6-NBD-ceramid próba spektrális relaxációja alapján mutattak ki (71). Hasonló elvek mentén egy molekuláris rotoron végzett fluoreszcencia-élettartam képalkotással tárták fel a mitokondriális belső membrán fluiditása és a sejtlegzés közötti dinamikus kapcsolatot (73), illetve egy amin-kapcsolt, kettős emissziójú, polaritásérzékeny próba segítségével a lizoszomális hasadás és fúzió során a lizoszomális membránokban bekövetkező fluiditásváltozásokat (72). Ezen módszerek közös hátránya azonban, hogy specifikusan csak egy adott organellek vizsgálatára használhatók, így nem teszik lehetővé a különféle sejtszervecskék kettősrétegeinek összehasonlító elemzését. iii) Egy harmadik megközelítést jelent, ha egy környezetérzékeny fluorofór szisztematikusan módosítható úgy, hogy különböző organellekben dúsuljon, így a jelölt kompartmentumok tulajdonságai közvetlenül összehasonlíthatók egymással. Ezt a rendkívül ígéretes megközelítést alkalmazták organellek-célzott c-Laurdan molekulák előállítására (170), illetve olyan, Nile Red szolvatokrómos festéken alapuló vegyületek létrehozására, amelyek specifikus célzást biztosító ligandumokat hordoznak az endoplazmás retikulum, a mitokondriumok, a lizoszómák, a Golgi-készülék, a plazmamembránok és a lipidcseppek membránjainak szelektív jelölésére (114, 171, 172). Bár ez a megközelítés kétségtelenül óriási potenciált rejt, komparatív elemzések során azt kell feltételezni, hogy a molekula kémiai módosítása nem változtatja meg az eredeti szolvatokrómos fluorofór alapvető tulajdonságait, illetve a módosított származékok előállítása kémiai értelemben nehézkes lehet. iv) A harmadik megközelítés sokkal egyszerűbb alternatívája, amelyet a jelen vizsgálatainkban is alkalmaztunk, az, hogy egy valamennyi celluláris membránban felhalmozódó, kedvező spektrális tulajdonságú környezetérzékeny fluorofórt — esetünkben az F66-ot — fluoreszcens organellek-markerekkel kombinálunk. Ezt követően kvantitatív képanalízissel elkülöníthetők a kompartmentumok egymástól az organelleket jelölő markerek jele alapján, és meghatározható kizárólag az adott sejtszervecskének megfelelő

régióban a biofizikai paraméter értéke. E módszer fő előnye a iii) pontban leírtakkal szemben az, hogy ugyanazon sejtek organellumainak tulajdonságai hasonlíthatók össze egymással.

A iv) módszerhez elméletben bármely, a disszertációban eddig említett környezeti paraméterekre szenzitív fluorofór használható lehet, gyakorlati megfontolások alapján azonban a lehetséges opciók száma erőteljesen korlátozott. A két, talán leggyakrabban használt próba, a lokális mikroviszkozitásra, azaz a fluiditásra érzékeny TMA-DPH (10, 34, 107-110), illetve a hidrációra érzékeny szolvatokrómos Laurdan (10, 34, 107, 108, 116-120) közös hátránya az alacsony fotostabilitás és az UV-tartományba eső gerjeszthetőség. Hagyományos lézerekkel és optikai elrendezésekkel történő képalkotásra sokkal inkább alkalmas a szolvatokrómos PY3174 (108, 111), valamint az elektrokrómos di-8-ANEPPS (10, 11, 14, 15, 21-23, 30, 34, 58, 59), illetve kémiai rokon vegyületük, a gyakran használt és kereskedelmi forgalomban is elérhető, szolvatokrómosnak tartott di-4-ANEPPDHQ (24, 173, 174). Mindhárom próba közös tulajdonsága, hogy rendkívül széles gerjesztési és emissziós spektrummal rendelkeznek és ezáltal a leggyakrabban alkalmazott fluorofórokkal, így például GFP-vel vagy RFP-vel jelentős spektrális átfedést mutatnak, mely megnehezíti más, széles körben használt fluorofórokkal, illetve az azokkal konjugált organellummarkerekkel való kombinált alkalmazásukat. A dipólpotenciál áramlási citométerrel történő meghatározására fentebb használt F66 próbának ezzel szemben fő előnye, hogy a közeli UV-tartományban, például a mikroszkópokban általánosságban használt 405 nm-es lézerekkel hatékonyan gerjeszthető (14, 16, 64), így gerjesztési spektruma jól elkülönül más, széles körben alkalmazott fluorofóroktól, például a GFP-től, az RFP-től vagy a vörös-távoli vörös festékektől, amelyeket gyakran konjugálnak az intracelluláris organellum-markerekhez.

Kísérleteink során az intracelluláris organellumok membránbiofizikai jellemzőinek komparatív analíziséhez a iv) megközelítést választottuk. Ehhez hagyományos konfokális mikroszkópos képalkotást és kvantitatív képanalízist alkalmazva az F66-ot széles körben elfogadott, gyakori fluorofórokat —GFP-t, RFP-t és Deep Redet — hordozó organellum-markerekkel egyidejűleg használtuk. Kimutattuk, hogy bár valamennyi intracelluláris membrán esetén a plazmamembránhoz képest alacsonyabb F66  $T^*/N^*$  emissziós arány tapasztalható – ami alacsonyabb dipólpotenciálnak, vagyis a membrán-víz határfelületen kisebb mértékű molekuláris rendezettségnek felel meg – a különböző kompartmentumok kettősrétegei jelentős változatosságot mutatnak (**17. ábra**). Összhangban a különböző organellumok eltérő koleszterintartalmára vonatkozó irodalmi adatokkal (66-68, 169), valamint azzal az általánosan elfogadott megfigyeléssel, mely szerint a membránban található koleszterin mennyisége jellemzően jól korrelál a dipólpotenciál nagyságával (14-16, 22, 34, 47, 58, 59), három, egymástól alapvetően különböző sejttypusban is a szekréciós/endocitotikus útvonal mentén befelé csökkenő dipólpotenciál-gradienst találtunk a membránokban, amely ugyanazt a sorrendet követte, mint a koleszterin mennyisége: plazmamembrán >> lizoszóma > Golgi-készülék > endoplazmás

retikulum (**18-22. ábra**). Figyelemre méltó volt még, hogy valamennyi vizsgált sejttípus esetén a mitokondriális membránok dipólpotenciálja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a plazmamembráné, ugyanakkor — alacsony feltételezett koleszterintartalmuk alapján némileg váratlanul — szignifikánsan magasabb volt, mint a Golgi-készülék és az endoplazmás retikulum membránjaié, SH-SY5Y sejtekben pedig még a lizoszómák kettősrétegeiben tapasztaltnál is magasabbnak bizonyult, ami a szelektíven a mitokondriumban megtalálható lipidek fontos szerepére utalhat.

Tekintettel arra, hogy az F66 alkalmazása a gerjesztett állapotban zajló intramolekuláris protontranszfer reakción alapul, felmerülhetne, hogy ez a reakció érzékeny lehet a környező vizes fázisok környezeti pH-jára, és ebben az esetben — figyelembe véve az intracelluláris organelleket, például a lizoszómák eltérő pH-ját — a megfigyelt különbségek egyszerűen ezekkel a megváltozott pH-értékekkel lennének magyarázhatók. Ez azonban valószínűtlennek tűnik, mivel a reakcióban részt vevő molekuláris csoportok a membrán belsejében helyezkednek el, ahol szabad protonok várhatóan nem fordulnak elő. Ennek megfelelően — és összhangban az F66 analógokkal modellvezikulákban korábban kapott eredményekkel, amelyek szerint az 5 és 9 közötti pH-tartományban nem mutathatók ki spektrális változások (65) — nem észleltünk szignifikáns különbséget az F66 T\*/N\* emissziós arányában, ha a sejtekben a lokális pH-t 5,5 és 7,5 közötti tartományban változtattuk (**23. ábra**).

Bár az F66 és a GFP vagy RFP közötti spektrális átfedés elméletileg lehetővé teheti a fluorofórok között a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) megjelenését, ami megzavarhatná a kvantitatív eredményeink értelmezését, ilyen zavaró hatás rendkívül valószínűtlen. Ennek oka az, hogy a „donor” F66 jóval nagyobb mennyiségben van jelen, mint az „akceptor” GFP vagy RFP — ami a mikroszkópos képeken megfigyelt fluoreszcencia intenzitásokból nyilvánvaló —, továbbá kicsi a valószínűsége annak, hogy a membránba ágyazott F66 és a vizes fázisban lokalizált mobil GFP vagy RFP FRET-távolságon belül kolokalizáljon.

Eredményeink, amelyek jelentős különbségeket mutatnak a különböző organelleket membránjainak dipólpotenciálja, azaz strukturális rendezettsége között, kiváló összhangban vannak a HeLa-eredetű KB sejtek intracelluláris kettősrétegeinek organelleket-célzott Nile Red festékek alkalmazásával meghatározott lipidrendezettségi paramétereivel (171), valamint a HeLa-sejtek kompartmentjeiben organelleket-célzott c-Laurdan vegyületekkel kapott generalizált polarizáció értékekkel (170), ami módszerünk független validációjának tekinthető. Eredményeink, valamint további kutatócsoportok megfigyelései (170, 171) szerint a mitokondriális membránokban más intracelluláris organellekhöz képest viszonylag magas a molekuláris rendezettség és a dipólpotenciál mértéke, mely első pillantásra meglepőnek tűnhet a koleszterin ebben a sejtstruktúrában korábban feltételezett alacsony szintje miatt. Megfigyeléseinket azonban magyarázhatja, hogy a koleszterin mennyisége bizonyos

szteroidhormonokat termelő sejtek és neuronok mitokondriumaiban magasabb, valamint a belső mitokondriális membrán rendezettsége is fokozott lehet, amely magas fehérje- és kardiolipintartalmának tulajdonítható (175, 176).

## 6.8. Az intracelluláris organellumok membránjainak rendezettségében megfigyelt különbségek jelentősége és a módszer biológiai relevanciája

A disszertációban korábban is említettük, hogy a transzmembrán fehérjék különböző funkcionális állapotaihoz vezető konformációváltozások a környező kettősréteg permisszív és kooperatív részvételével mennek végbe, következésképpen azok ki vannak téve a membránlipidek moduláló hatásainak. A közvetlen kötődés mellett a lipidek a lokális mikrokörnyezet biofizikai tulajdonságainak módosításán keresztül is hatnak a fehérjékre (7, 86, 87). A mélyebb rétegek molekuláris rendezettsége, vagyis a fluiditás és a hidráció, befolyásolhatja bizonyos fehérjekonformerek aggregációs állapotát, a konformációváltozások sebességét, a másodlagos szerkezetet és a relatív stabilitást (5, 7, 177, 178); míg a membrán-víz határfelületen az intramolekuláris dipólusok nem-véletlenszerű elrendeződése által létrehozott dipólpotenciál a poláris vagy töltött aminosavakkal való kölcsönhatás révén szintén befolyásolhatja a konformációs stabilitásokat, következésképp a közöttük bekövetkező átmeneteket is (2, 4, 7, 88). Felvetették például, hogy a dipólpotenciál nagysága befolyásolja a feszültségfüggő káliumcsatornák feszültségérzékelését és aktivációs kapuzását (10, 31, 93), a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPáz (96) és a P-glikoprotein (58) ATPáz- és pumpaaktivitását, valamint az ErbB fehérjék (23) és a szerotoninreceptorok (57) ligandkötését, asszociációját, autofoszforilációját és downstream jelátvitelét. Sejtes vizsgálatokban az F66 emissziós arányának azon változásai, amelyek a dipólpotenciál biológiai hatások kiváltására képes eltéréseivel társultak, 10% és 40% közöttiek voltak (14, 16). Jelen kísérleteinkben az intracelluláris organellumok és a plazmamembrán közötti relatív különbségek a ~25–45% tartományba estek, ami alátámasztja, hogy a dipólpotenciál celluláris membránok közötti variabilitása biológiai jelentőséggel bírhat, mivel a fehérjék várhatóan pontos lokalizációjuktól függően funkcionális eltéréseket mutathatnak az eltérő, membránbeli lokális mikrokörnyezet függvényében. E hipotézisünket azonban a jövőben még tesztelni kell.

Összefoglalva, egy új, a legtöbb hagyományos konfokális mikroszkópon könnyen megvalósítható mérési módszert optimalizáltunk az intracelluláris organellumok membránbiofizikai tulajdonságainak vizsgálatára ép, élő, egyedi sejtekben. E mérési technika biológiai jelentősége abból fakad, hogy potenciálisan alkalmazható egy adott organellumban bizonyos patológiás állapotokban kialakuló biofizikai eltérések feltárására. Mivel a membránbiofizikai tulajdonságokat általánosságban, a dipólpotenciált pedig különösen, jelentősen meghatározzák a membránlipidek – például a különböző foszfolipidek (11), glükoszilceramid és ceramidok (10, 14), valamint a koleszterin (14-17, 22, 23, 34, 47,

58) kvalitatív és kvantitatív jellemzői –, ezek megváltozott szintjei a kettősrétegek biofizikai jellemzőinek módosulásához vezethetnek. Ilyen lipideltéréseket széles körben leírtak humán kórképekben, többek között metabolikus (75-77), neurodegeneratív betegségekben (79, 80) és lizoszomális tárolási betegségekben (84), valamint daganatokban is (6, 81-83). – az intracelluláris organellumok rendellenességei lényegesen hozzájárulhatnak e kórállapotok patomechanizmusához is. Ennek megfelelően az intracelluláris organellumok biofizikai eltéréseinek feltárása a jövőben ezen kóros állapotok patofiziológiájának jobb megértéséhez, terápiás célpontok azonosításához és új terápiás megközelítések kidolgozásához vezethet. Az olyan könnyen használható környezetérzékeny fluorofórok és mérési technikák fejlesztése pedig, mint az itt bemutatott módszer, a jövőben értékes eszköz lehet ezen célok eléréséhez.

## 7. 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 élő sejtekben igazoltuk különböző szterolszármazékok, így a 6KC, 7DHC és koleszterin dipólpotenciált növelő hatását. Módszerünkkel különböző telített és többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelések hatását vizsgálva kimutattuk, hogy az  $\alpha$ -linolénsav, egy  $\omega$ -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  $\omega$ -6 többszörösen telítetlen  $\gamma$ -linolénsav is ezzel ellentétes hatást fejtett ki. Az  $\alpha$ -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 hangsúlyoztuk.

Az F66 kedvező spektrális tulajdonságainak köszönhetően kitűnően alkalmazható együtt más fluorofórokkal – így fluoreszcens intracelluláris organelum-markerekkel is. 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 sejtszervecskék 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.

## 8. Summary

Characterization of the dipole potential arising from the ordered orientation of molecular dipoles of membrane phospholipids, sterols, and membrane-associated interfacial water molecules has remained difficult due to the lack of measurement methods suitable for investigating living individual cells, as well as the absence of physiologically relevant compounds capable of experimentally lowering its magnitude. Therefore, in the first part of the work presented in this dissertation, we developed and optimized a high-throughput flow cytometric method based on quantifying the shift in the emission spectrum of the dipole-potential-sensitive F66 fluorophore. This method enables the acquisition of quantitative information on the magnitude of the dipole potential from large numbers of individual living cells. The applicability of our method was validated using several cell lines and treatments, as well as through comparison with the most widely accepted method for studying dipole potential. In our experiments, we also demonstrated the dipole-potential-increasing effects of various sterol derivatives, including 6KC, 7DHC, and cholesterol in living cells. Furthermore, by examining different saturated and polyunsaturated fatty acids, we showed that  $\alpha$ -linolenic acid, an  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid naturally present in human cell membranes under physiological conditions, was capable of reducing the magnitude of the dipole potential, whereas saturated stearic acid and—interestingly—the  $\omega$ -6 polyunsaturated  $\gamma$ -linolenic acid exerted the opposite effect. The beneficial action of  $\alpha$ -linolenic acid was also observable in the presence of cholesterol, counteracting the latter's effect. The biological relevance of these changes in dipole potential was demonstrated through their impact on the uptake and particularly the endolysosomal escape of the cell-penetrating peptide penetratin.

Due to the favorable spectral properties of F66, it can be excellently combined with other fluorophores, including fluorescent intracellular organelle markers. Based on this, in the work presented in the second part of this dissertation, we optimized a method based on confocal microscopy, quantitative image analysis, and emission ratio measurements of the F66 fluorophore, which enables the comparative investigation of the dipole potential of the plasma membrane and the membranes of various intracellular organelles in living individual cells. Using our novel technique, we demonstrated in several markedly different human cell lines that the magnitude of the dipole potential is highest in the plasma membrane, whereas within intracellular membrane systems it decreases progressively “inward” along the secretory/endocytic pathway in the order lysosome > Golgi apparatus > endoplasmic reticulum. Somewhat unexpectedly, the magnitude of the dipole potential in mitochondrial membranes proved to be similar to that of lysosomes. Our method may serve as a useful tool for identifying organelles in which pathophysiologically significant membrane biophysical changes occur during diseases associated with altered lipid levels.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Demchenko AP, Yesylevskyy SO. Nanoscopic description of biomembrane electrostatics: results of molecular dynamics simulations and fluorescence probing. *Chem Phys Lipids*. 2009;160(2):63–84.
2. O'Shea P. Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: kinetics and imaging. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 5):990–6.
3. O'Shea P. Physical landscapes in biological membranes: physico-chemical terrains for spatio-temporal control of biomolecular interactions and behaviour. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2005;363(1827):575–88.
4. Wang L. Measurements and implications of the membrane dipole potential. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:615–35.
5. Kovacs T, Nagy P, Panyi G, Szente L, Varga Z, Zakany F. Cyclodextrins: Only Pharmaceutical Excipients or Full-Fledged Drug Candidates? *Pharmaceutics*. 2022;14(12).
6. Kovacs T, Zakany F, Nagy P. It Takes More than Two to Tango: Complex, Hierarchical, and Membrane-Modulated Interactions in the Regulation of Receptor Tyrosine Kinases. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4).
7. Zakany F, Kovacs T, Panyi G, Varga Z. Direct and indirect cholesterol effects on membrane proteins with special focus on potassium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(8):158706.
8. Zakany F, Mandity IM, Varga Z, Panyi G, Nagy P, Kovacs T. Effect of the Lipid Landscape on the Efficacy of Cell-Penetrating Peptides. *Cells*. 2023;12(13).
9. Disalvo EA. Membrane Hydration: A Hint to a New Model for Biomembranes. *Subcell Biochem*. 2015;71:1–16.
10. Cs Szabo B, Szabo M, Nagy P, Varga Z, Panyi G, Kovacs T, et al. Novel insights into the modulation of the voltage-gated potassium channel K(V)1.3 activation gating by membrane ceramides. *J Lipid Res*. 2024;65(8):100596.
11. Starke-Peterkovic T, Clarke RJ. Effect of headgroup on the dipole potential of phospholipid vesicles. *Eur Biophys J*. 2009;39(1):103–10.
12. Shinoda K, Shinoda W, Baba T, Mikami M. Comparative molecular dynamics study of ether- and ester-linked phospholipid bilayers. *J Chem Phys*. 2004;121(19):9648–54.
13. Orsi M, Michel J, Essex JW. Coarse-grain modelling of DMPC and DOPC lipid bilayers. *J Phys Condens Matter*. 2010;22(15):155106.
14. Kovacs T, Batta G, Zakany F, Szollosi J, Nagy P. The dipole potential correlates with lipid raft markers in the plasma membrane of living cells. *J Lipid Res*. 2017;58(8):1681–91.

15. Haldar S, Kanaparthi RK, Samanta A, Chattopadhyay A. Differential effect of cholesterol and its biosynthetic precursors on membrane dipole potential. *Biophys J*. 2012;102(7):1561–9.
16. Kovacs T, Kurtan K, Varga Z, Nagy P, Panyi G, Zakany F. Veklury(R) (remdesivir) formulations inhibit initial membrane-coupled events of SARS-CoV-2 infection due to their sulfobutylether-beta-cyclodextrin content. *Br J Pharmacol*. 2023;180(16):2064–84.
17. Sarkar P, Chakraborty H, Chattopadhyay A. Differential Membrane Dipolar Orientation Induced by Acute and Chronic Cholesterol Depletion. *Sci Rep*. 2017;7(1):4484.
18. Simon SA, McIntosh TJ, Magid AD, Needham D. Modulation of the interbilayer hydration pressure by the addition of dipoles at the hydrocarbon/water interface. *Biophys J*. 1992;61(3):786–99.
19. Starke-Peterkovic T, Turner N, Vitha MF, Waller MP, Hibbs DE, Clarke RJ. Cholesterol effect on the dipole potential of lipid membranes. *Biophys J*. 2006;90(11):4060–70.
20. Franklin JC, Cafiso DS. Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles. *Biophys J*. 1993;65(1):289–99.
21. Clarke RJ, Kane DJ. Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1323(2):223–39.
22. Gross E, Bedlack RS, Jr., Loew LM. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophys J*. 1994;67(1):208–16.
23. Kovacs T, Batta G, Hajdu T, Szabo A, Varadi T, Zakany F, et al. The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency. *Sci Rep*. 2016;6:35850.
24. Kothalawala RC, Makay C, Szente L, Varga Z, Panyi G, Nagy P, et al. Disorder in Order-Related Membrane Biophysical Parameters: An In-Depth Analysis of Di-4-ANEPPDHQ Generalized Polarization. *J Phys Chem Lett*. 2026;17(16):4723–31.
25. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(12):1023–35.
26. Szente L, Fenyvesi E. Cyclodextrin-Lipid Complexes: Cavity Size Matters. *Structural Chemistry*. 2017;28(2):479–92.
27. Kali G, Haddadzadegan S, Bernkop-Schnurch A. Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: New developments, relevant clinical trials, and advanced products. *Carbohydr Polym*. 2024;324:121500.
28. Szente L, Singhal A, Domokos A, Song B. Cyclodextrins: Assessing the Impact of Cavity Size, Occupancy, and Substitutions on Cytotoxicity and Cholesterol Homeostasis. *Molecules*. 2018;23(5).
29. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(6):1311–24.

30. Singh P, Haldar S, Chattopadhyay A. Differential effect of sterols on dipole potential in hippocampal membranes: implications for receptor function. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(3):917–23.
31. Zakany F, Pap P, Papp F, Kovacs T, Nagy P, Peter M, et al. Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(3):312–25.
32. Andersen OS, Finkelstein A, Katz I, Cass A. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. *J Gen Physiol*. 1976;67(6):749–71.
33. Bechinger B, Seelig J. Interaction of electric dipoles with phospholipid head groups. A <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P NMR study of phloretin and phloretin analogues in phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*. 1991;30(16):3923–9.
34. Batta G, Karpati L, Henrique GF, Toth G, Tarapcsak S, Kovacs T, et al. Statin-boosted cellular uptake and endosomal escape of penetratin due to reduced membrane dipole potential. *Br J Pharmacol*. 2021.
35. Asawakarn T, Cladera J, O'Shea P. Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of Caco-2 cells. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38457–63.
36. Kiss T, Fenyvesi F, Bacskay I, Varadi J, Fenyvesi E, Ivanyi R, et al. Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(4):376–80.
37. Malanga M, Szeman J, Fenyvesi E, Puskas I, Csabai K, Gyemant G, et al. "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. *J Pharm Sci*. 2016;105(9):2921–31.
38. Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem*. 1989;186(1-2):17–22.
39. Calder PC, Yaqoob P, Harvey DJ, Watts A, Newsholme EA. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem J*. 1994;300 ( Pt 2):509–18.
40. Leifert WR, McMurchie EJ, Saint DA. Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol*. 1999;520 Pt 3:671–9.
41. Rajamoorthi K, Petrache HI, McIntosh TJ, Brown MF. Packing and viscoelasticity of polyunsaturated omega-3 and omega-6 lipid bilayers as seen by (2)H NMR and X-ray diffraction. *J Am Chem Soc*. 2005;127(5):1576–88.
42. Huster D, Jin AJ, Arnold K, Gawrisch K. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by <sup>17</sup>O NMR. *Biophys J*. 1997;73(2):855–64.

43. Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J*. 2000;79(1):328–39.
44. Wang L, Bose PS, Sigworth FJ. Using cryo-EM to measure the dipole potential of a lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(49):18528–33.
45. Yang Y, Mayer KM, Wickremasinghe NS, Hafner JH. Probing the lipid membrane dipole potential by atomic force microscopy. *Biophys J*. 2008;95(11):5193–9.
46. Shrestha R, Anderson CM, Cardenas AE, Elber R, Webb LJ. Direct Measurement of the Effect of Cholesterol and 6-Ketocholestanol on the Membrane Dipole Electric Field Using Vibrational Stark Effect Spectroscopy Coupled with Molecular Dynamics Simulations. *The journal of physical chemistry B*. 2017;121(15):3424–36.
47. Shen H, Deng M, Wu Z, Zhang J, Zhang Y, Gao C, et al. Effect of Cholesterol on Membrane Dipole Potential: Atomistic and Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput*. 2018;14(7):3780–95.
48. Ding W, Palaioikostas M, Wang W, Orsi M. Effects of Lipid Composition on Bilayer Membranes Quantified by All-Atom Molecular Dynamics. *The journal of physical chemistry B*. 2015;119(49):15263–74.
49. Harder E, Mackerell AD, Jr., Roux B. Many-body polarization effects and the membrane dipole potential. *J Am Chem Soc*. 2009;131(8):2760–1.
50. Waggoner A. Optical probes of membrane potential. *J Membr Biol*. 1976;27(4):317–34.
51. Loew LM, Bonneville GW, Surow J. Charge shift optical probes of membrane potential. Theory. *Biochemistry*. 1978;17(19):4065–71.
52. Loew LM, Scully S, Simpson L, Waggoner AS. Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature*. 1979;281(5731):497–9.
53. Loew LM, Simpson LL. Charge-shift probes of membrane potential: a probable electrochromic mechanism for p-aminostyrylpyridinium probes on a hemispherical lipid bilayer. *Biophys J*. 1981;34(3):353–65.
54. Fluhler E, Burnham VG, Loew LM. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry*. 1985;24(21):5749–55.
55. Montana V, Farkas DL, Loew LM. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochemistry*. 1989;28(11):4536–9.
56. Rohr S, Salzberg BM. Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale. *Biophys J*. 1994;67(3):1301–15.
57. Bandari S, Chakraborty H, Covey DF, Chattopadhyay A. Membrane dipole potential is sensitive to cholesterol stereospecificity: implications for receptor function. *Chem Phys Lipids*. 2014;184:25–9.

58. Davis S, Davis BM, Richens JL, Vere KA, Petrov PG, Winlove CP, et al. alpha-Tocopherols modify the membrane dipole potential leading to modulation of ligand binding by P-glycoprotein. *J Lipid Res.* 2015;56(8):1543–50.
59. Sarkar P, Rao BD, Chattopadhyay A. Cell Cycle Dependent Modulation of Membrane Dipole Potential and Neurotransmitter Receptor Activity: Role of Membrane Cholesterol. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11(18):2890–9.
60. Bullen A, Saggau P. High-speed, random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes. *Biophys J.* 1999;76(4):2272–87.
61. Vitha MF, Clarke RJ. Comparison of excitation and emission ratiometric fluorescence methods for quantifying the membrane dipole potential. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(1):107–14.
62. Duportail G, Klymchenko A, Mely Y, Demchenko A. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 2001;508(2):196–200.
63. Klymchenko AS, Duportail G, Mely Y, Demchenko AP. Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11219–24.
64. Darwich Z, Kucherak OA, Kreder R, Richert L, Vauchelles R, Mely Y, et al. Rational design of fluorescent membrane probes for apoptosis based on 3-hydroxyflavone. *Methods Appl Fluoresc.* 2013;1(2):025002.
65. Shynkar VV, Klymchenko AS, Duportail G, Demchenko AP, Mely Y. Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1712(2):128–36.
66. Casares D, Escriba PV, Rossello CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
67. Sarmiento MJ, Llorente A, Petan T, Khnykin D, Popa I, Nikolac Perkovic M, et al. The expanding organelle lipidomes: current knowledge and challenges. *Cell Mol Life Sci.* 2023;80(8):237.
68. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112–24.
69. Shyu P, Jr., Ng BSH, Ho N, Chaw R, Seah YL, Marvalim C, et al. Membrane phospholipid alteration causes chronic ER stress through early degradation of homeostatic ER-resident proteins. *Sci Rep.* 2019;9(1):8637.
70. Volkmar N, Gawden-Bone CM, Williamson JC, Nixon-Abell J, West JA, St George-Hyslop PH, et al. Regulation of membrane fluidity by RNF145-triggered degradation of the lipid hydrolase ADIPOR2. *EMBO J.* 2022;41(19):e110777.

71. Lajevardipour A, Chon JW, Chattopadhyay A, Clayton AH. Imaging Cellular Dynamics with Spectral Relaxation Imaging Microscopy: Distinct Spectral Dynamics in Golgi Membranes of Living Cells. *Sci Rep*. 2016;6:37038.
72. Wang H, Shi C, Dong B, Tian M. Dual-emissive near-infrared fluorescent probe revealing fluidity changes in lysosomal membranes during lysosomal fission and fusion. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2025;422:136550.
73. Singh G, George G, Raja SO, Kandaswamy P, Kumar M, Thutupalli S, et al. A molecular rotor FLIM probe reveals dynamic coupling between mitochondrial inner membrane fluidity and cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(24):e2213241120.
74. Zhou D, Liu H, Zheng L, Liu A, Zhuan Q, Luo Y, et al. Metformin alleviates cryoinjuries in porcine oocytes by reducing membrane fluidity through the suppression of mitochondrial activity. *Commun Biol*. 2024;7(1):925.
75. Choi RH, Tatum SM, Symons JD, Summers SA, Holland WL. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(10):701–11.
76. Hammerschmidt P, Bruning JC. Contribution of specific ceramides to obesity-associated metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(8):395.
77. Pilon M. Revisiting the membrane-centric view of diabetes. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):167.
78. Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieden R, Chen TS, et al. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med*. 1994;330(2):107–13.
79. Chew H, Solomon VA, Fonteh AN. Involvement of Lipids in Alzheimer's Disease Pathology and Potential Therapies. *Front Physiol*. 2020;11:598.
80. Wang X, Li H, Sheng Y, He B, Liu Z, Li W, et al. The function of sphingolipids in different pathogenesis of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2024;171:116071.
81. Butler LM, Perone Y, Dehairs J, Lupien LE, de Laat V, Talebi A, et al. Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:245–93.
82. Huang B, Song BL, Xu C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Metab*. 2020;2(2):132–41.
83. Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(1):4–22.
84. Grabowski GA, Antommaria AHM, Kolodny EH, Mistry PK. Gaucher disease: Basic and translational science needs for more complete therapy and management. *Mol Genet Metab*. 2021;132(2):59–75.
85. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).

86. Corradi V, Sejdiu BI, Mesa-Galloso H, Abdizadeh H, Noskov SY, Marrink SJ, et al. Emerging Diversity in Lipid-Protein Interactions. *Chem Rev.* 2019;119(9):5775–848.
87. Levental I, Lyman E. Regulation of membrane protein structure and function by their lipid nano-environment. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(2):107–22.
88. Richens JL, Lane JS, Bramble JP, O'Shea P. The electrical interplay between proteins and lipids in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848(9):1828–36.
89. Andersen OS, Fuchs M. Potential energy barriers to ion transport within lipid bilayers. Studies with tetraphenylborate. *Biophys J.* 1975;15(8):795–830.
90. Lauger P, Stark G. Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1970;211(3):458–66.
91. Liberman EA, Topaly VP. [Permeability of bimolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions]. *Biofizika.* 1969;14(3):452–61.
92. Ostroumova OS, Efimova SS, Schagina LV. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS One.* 2012;7(1):e30261.
93. Pearlstein RA, Dickson CJ, Hornak V. Contributions of the membrane dipole potential to the function of voltage-gated cation channels and modulation by small molecule potentiators. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2017;1859(2):177–94.
94. Klodos I, Fedosova NU, Plesner L. Influence of intramembrane electric charge on Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* 1995;270(9):4244–54.
95. Starke-Peterkovic T, Turner N, Else PL, Clarke RJ. Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase molecular activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(3):R663–70.
96. Clarke RJ. Dipole-Potential-Mediated Effects on Ion Pump Kinetics. *Biophys J.* 2015;109(8):1513–20.
97. Luker GD, Flagg TP, Sha Q, Luker KE, Pica CM, Nichols CG, et al. MDR1 P-glycoprotein reduces influx of substrates without affecting membrane potential. *J Biol Chem.* 2001;276(52):49053–60.
98. Hertel C, Terzi E, Hauser N, Jakob-Rotne R, Seelig J, Kemp JA. Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9412–6.
99. Cladera J, O'Shea P. Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide. *Biophys J.* 1998;74(5):2434–42.
100. Zhan H, Lazaridis T. Influence of the membrane dipole potential on peptide binding to lipid bilayers. *Biophys Chem.* 2012;161:1–7.
101. Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(4):406–24.

102. Wang F, Wang Y, Zhang X, Zhang W, Guo S, Jin F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J Control Release*. 2014;174:126–36.
103. Futaki S. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers*. 2006;84(3):241–9.
104. Lojewska Z, Loew LM. Insertion of amphiphilic molecules into membranes is catalyzed by a high molecular weight non-ionic surfactant. *Biochim Biophys Acta*. 1987;899(1):104–12.
105. Zhang J, Davidson RM, Wei MD, Loew LM. Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons. *Biophys J*. 1998;74(1):48–53.
106. Kovacs T, Cs Szabo B, Kothalawala RC, Szekelyhidi V, Nagy P, Varga Z, et al. Inhibition of the H(V)1 voltage-gated proton channel compromises the viability of human polarized macrophages in a polarization- and ceramide-dependent manner. *Front Immunol*. 2024;15:1487578.
107. Batta G, Soltesz L, Kovacs T, Bozo T, Meszar Z, Kellermayer M, et al. Alterations in the properties of the cell membrane due to glycosphingolipid accumulation in a model of Gaucher disease. *Sci Rep*. 2018;8(1):157.
108. Kovacs T, Sohajda T, Szente L, Nagy P, Panyi G, Varga Z, et al. Cyclodextrins Exert a Ligand-like Current Inhibitory Effect on the K(V)1.3 Ion Channel Independent of Membrane Cholesterol Extraction. *Front Mol Biosci*. 2021;8:735357.
109. Oncul S, Klymchenko AS, Kucherak OA, Demchenko AP, Martin S, Dontenwill M, et al. Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: effects of cholesterol depletion and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1798(7):1436–43.
110. Pinto SN, Laviad EL, Stiban J, Kelly SL, Merrill AH, Jr., Prieto M, et al. Changes in membrane biophysical properties induced by sphingomyelinase depend on the sphingolipid N-acyl chain. *J Lipid Res*. 2014;55(1):53–61.
111. Kwiatek JM, Owen DM, Abu-Siniyeh A, Yan P, Loew LM, Gaus K. Characterization of a new series of fluorescent probes for imaging membrane order. *PLoS One*. 2013;8(2):e52960.
112. Qian Z, Dougherty PG, Pei D. Monitoring the cytosolic entry of cell-penetrating peptides using a pH-sensitive fluorophore. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(11):2162–5.
113. Smondyrev AM, Berkowitz ML. Effects of oxygenated sterol on phospholipid bilayer properties: a molecular dynamics simulation. *Chem Phys Lipids*. 2001;112(1):31–9.
114. Klymchenko AS. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res*. 2017;50(2):366–75.
115. Klymchenko AS. Fluorescent Probes for Lipid Membranes: From the Cell Surface to Organelles. *Acc Chem Res*. 2023;56(1):1–12.
116. Ma Y, Benda A, Kwiatek J, Owen DM, Gaus K. Time-Resolved Laurdan Fluorescence Reveals Insights into Membrane Viscosity and Hydration Levels. *Biophys J*. 2018;115(8):1498–508.

117. Parasassi T, Gratton E, Yu WM, Wilson P, Levi M. Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophys J*. 1997;72(6):2413–29.
118. Varela AR, Ventura AE, Carreira AC, Fedorov A, Futerman AH, Prieto M, et al. Pathological levels of glucosylceramide change the biophysical properties of artificial and cell membranes. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;19(1):340–6.
119. Owen DM, Williamson DJ, Magenau A, Gaus K. Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat Commun*. 2012;3:1256.
120. Sezgin E, Waithe D, Bernardino de la Serna J, Eggeling C. Spectral imaging to measure heterogeneity in membrane lipid packing. *Chemphyschem*. 2015;16(7):1387–94.
121. Gaus K, Zech T, Harder T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol*. 2006;23(1):41–8.
122. Arribas Perez M, Beales PA. Dynamics of asymmetric membranes and interleaflet coupling as intermediates in membrane fusion. *Biophys J*. 2023;122(11):1985–95.
123. Gutowska-Owsiak D, Podobas EI, Eggeling C, Ogg GS, Bernardino de la Serna J. Addressing Differentiation in Live Human Keratinocytes by Assessment of Membrane Packing Order. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:573230.
124. Jenkins E, Santos AM, O'Brien-Ball C, Felce JH, Wilcock MJ, Hatherley D, et al. Reconstitution of immune cell interactions in free-standing membranes. *J Cell Sci*. 2018;132(4).
125. Malacrida L, Astrada S, Briva A, Bollati-Fogolin M, Gratton E, Bagatolli LA. Spectral phasor analysis of LAURDAN fluorescence in live A549 lung cells to study the hydration and time evolution of intracellular lamellar body-like structures. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(11):2625–35.
126. Chattopadhyay A, Paila YD, Jafurulla M, Chaudhuri A, Singh P, Murty MR, et al. Differential effects of cholesterol and 7-dehydrocholesterol on ligand binding of solubilized hippocampal serotonin<sub>1A</sub> receptors: implications in SLOS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(3):800–5.
127. Shrivastava S, Paila YD, Dutta A, Chattopadhyay A. Differential effects of cholesterol and its immediate biosynthetic precursors on membrane organization. *Biochemistry*. 2008;47(20):5668–77.
128. do Canto A, Robalo JR, Santos PD, Carvalho AJP, Ramalho JPP, Loura LMS. Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: A comparative molecular dynamics simulation study. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(11):2647–61.
129. Prendergast FG, Haugland RP, Callahan PJ. 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties, and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. *Biochemistry*. 1981;20(26):7333–8.
130. Engel LW, Prendergast FG. Values for and significance of order parameters and "cone angles" of fluorophore rotation in lipid bilayers. *Biochemistry*. 1981;20(26):7338–45.

131. Kubina M, Kuhry JG, Duportail G, Coupin G, Bronner C, Poindron P, et al. TMA-DPH as Specific Plasma Membrane Fluidity Probe for Intact Cells and its Limitation. In: Freysz L, Dreyfus H, Massarelli R, Gatt S, editors. *Enzymes of Lipid Metabolism II*. Boston, MA: Springer US; 1986. p. 403–5.
132. Chakraborty S, Doktorova M, Molugu TR, Heberle FA, Scott HL, Dzikovski B, et al. How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(36):21896–905.
133. de Santis A, Scoppola E, Ottaviani MF, Koutsioubas A, Barnsley LC, Paduano L, et al. Order vs. Disorder: Cholesterol and Omega-3 Phospholipids Determine Biomembrane Organization. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10).
134. Leeb F, Maibaum L. Spatially Resolving the Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophys J*. 2018;115(11):2179–88.
135. Mills TT, Toombes GE, Tristram-Nagle S, Smilgies DM, Feigenson GW, Nagle JF. Order parameters and areas in fluid-phase oriented lipid membranes using wide angle X-ray scattering. *Biophys J*. 2008;95(2):669–81.
136. Somodi S, Balajthy A, Szilagyi O, Petho Z, Harangi M, Paragh G, et al. Analysis of the K<sup>+</sup> current in human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in hypercholesterolemic state. *Cell Immunol*. 2013;281(1):20–6.
137. Singh P, Paila YD, Chattopadhyay A. Differential effects of cholesterol and 7-dehydrocholesterol on the ligand binding activity of the hippocampal serotonin(1A) receptor: implications in SLOS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(2):495–9.
138. Balajthy A, Somodi S, Petho Z, Peter M, Varga Z, Szabo GP, et al. 7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pflugers Arch*. 2016;468(8):1403–18.
139. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr*. 1980;33(12):2657–61.
140. Del Gobbo LC, Imamura F, Aslibekyan S, Marklund M, Virtanen JK, Wennberg M, et al. omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies. *JAMA Intern Med*. 2016;176(8):1155–66.
141. Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton P, Rudel LL, Appel LJ, et al. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2009;119(6):902–7.
142. Li J, Guasch-Ferre M, Li Y, Hu FB. Dietary intake and biomarkers of linoleic acid and mortality: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2020;112(1):150–67.

143. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(5):1146–55.
144. O'Mahoney LL, Matu J, Price OJ, Birch KM, Ajjan RA, Farrar D, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids favourably modulate cardiometabolic biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17(1):98.
145. Watanabe Y, Tatsuno I. Prevention of Cardiovascular Events with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Mechanism Involved. *J Atheroscler Thromb.* 2020;27(3):183–98.
146. Hamley S. The effect of replacing saturated fat with mostly n-6 polyunsaturated fat on coronary heart disease: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutr J.* 2017;16(1):30.
147. Nishizaki Y, Shimada K, Tani S, Ogawa T, Ando J, Takahashi M, et al. Association between the ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids and acute coronary syndrome in non-obese patients with coronary risk factor: a multicenter cross-sectional study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2020;20(1):160.
148. Ramsden CE, Zamora D, Leelarthaepin B, Majchrzak-Hong SF, Faurot KR, Suchindran CM, et al. Use of dietary linoleic acid for secondary prevention of coronary heart disease and death: evaluation of recovered data from the Sydney Diet Heart Study and updated meta-analysis. *BMJ.* 2013;346:e8707.
149. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(6):674–88.
150. Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut.* 2012;61(1):135–49.
151. de Lorgeril M, Salen P. New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *BMC Med.* 2012;10:50.
152. Fabian CJ, Kimler BF, Hursting SD. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Res.* 2015;17:62.
153. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J Clin Med.* 2016;5(2).
154. Bruno MJ, Koeppe RE, 2nd, Andersen OS. Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(23):9638–43.
155. Caires R, Sierra-Valdez FJ, Millet JRM, Herwig JD, Roan E, Vasquez V, et al. Omega-3 Fatty Acids Modulate TRPV4 Function through Plasma Membrane Remodeling. *Cell Rep.* 2017;21(1):246–58.
156. Romero LO, Massey AE, Mata-Daboín AD, Sierra-Valdez FJ, Chauhan SC, Cordero-Morales JF, et al. Dietary fatty acids fine-tune Piezo1 mechanical response. *Nat Commun.* 2019;10(1):1200.

157. Gawrisch K, Soubias O, Mihailescu M. Insights from biophysical studies on the role of polyunsaturated fatty acids for function of G-protein coupled membrane receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008;79(3-5):131–4.
158. Ayee MAA, Bunker BC, De Groot JL. Chapter Two - Membrane modulatory effects of omega-3 fatty acids: Analysis of molecular level interactions. In: Levitan I, Trache A, editors. *Current Topics in Membranes*. 86: Academic Press; 2020. p. 57–81.
159. Conquer JA, Holub BJ. Effect of supplementation with different doses of DHA on the levels of circulating DHA as non-esterified fatty acid in subjects of Asian Indian background. *J Lipid Res*. 1998;39(2):286–92.
160. Kuriki K, Nagaya T, Imaeda N, Tokudome Y, Fujiwara N, Sato J, et al. Discrepancies in dietary intakes and plasma concentrations of fatty acids according to age among Japanese female dietitians. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(6):524–31.
161. Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S, Teng L, Lee RJ, et al. Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. *Front Pharmacol*. 2020;11:697.
162. Zhou M, Zou X, Cheng K, Zhong S, Su Y, Wu T, et al. The role of cell-penetrating peptides in potential anti-cancer therapy. *Clin Transl Med*. 2022;12(5):e822.
163. Zorko M, Jones S, Langel U. Cell-penetrating peptides in protein mimicry and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;180:114044.
164. Poon GM, Garipey J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 4):788–93.
165. Thoren PE, Persson D, Esbjorner EK, Goksor M, Lincoln P, Norden B. Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry*. 2004;43(12):3471–89.
166. Christensen MV, Kongstad KT, Sondergaard TE, Staerk D, Nielsen HM, Franzyk H, et al. (19)F-substituted amino acids as an alternative to fluorophore labels: monitoring of degradation and cellular uptake of analogues of penetratin by (19)F NMR. *J Biomol NMR*. 2019;73(3-4):167–82.
167. Jobin M-L, Alves ID. Label-free quantification of cell-penetrating peptide translocation into liposomes. *Analytical Methods*. 2016;8(23):4608–16.
168. Burlina F, Sagan S, Bolbach G, Chassaing G. Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005;44(27):4244–7.
169. Sassano ML, Felipe-Abrio B, Agostinis P. ER-mitochondria contact sites; a multifaceted factory for Ca(2+) signaling and lipid transport. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:988014.
170. Wong AM, Budin I. Organelle-Targeted Laurdans Measure Heterogeneity in Subcellular Membranes and Their Responses to Saturated Lipid Stress. *ACS Chem Biol*. 2024;19(8):1773–85.

171. Danylchuk DI, Jouard PH, Klymchenko AS. Targeted Solvatochromic Fluorescent Probes for Imaging Lipid Order in Organelles under Oxidative and Mechanical Stress. *J Am Chem Soc.* 2021;143(2):912–24.
172. Pelletier R, Danylchuk DI, Benaissa H, Broch F, Vauchelles R, Gautier A, et al. Genetic Targeting of Solvatochromic Dyes for Probing Nanoscale Environments of Proteins in Organelles. *Anal Chem.* 2023;95(22):8512–21.
173. Lorent JH, Levental KR, Ganesan L, Rivera-Longworth G, Sezgin E, Doktorova M, et al. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat Chem Biol.* 2020;16(6):644–52.
174. Panconi L, Euchner J, Tashev SA, Makarova M, Herten DP, Owen DM, et al. Mapping membrane biophysical nano-environments. *Nat Commun.* 2024;15(1):9641.
175. Elustondo P, Martin LA, Karten B. Mitochondrial cholesterol import. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017;1862(1):90–101.
176. Goicoechea L, Conde de la Rosa L, Torres S, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial cholesterol: Metabolism and impact on redox biology and disease. *Redox Biol.* 2023;61:102643.
177. Brown MF. Soft Matter in Lipid-Protein Interactions. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:379–410.
178. Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1666(1-2):62–87.

## 10. Tárgyszavak

### **Tárgyszavak:**

dipólpotenciál

áramlási citometria

konfokális mikroszkópia

kvantitatív képelemzés

membránbiofizika

koleszterin

szterolok

többszörösen telítetlen zsírsavak

penetratin

intracelluláris organellek

### **Keywords:**

dipole potential

flow cytometry

confocal microscopy

quantitative image analysis

membrane biophysics

cholesterol

sterols

polyunsaturated fatty acids

penetratin

intracellular organelles

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kovács Tamásnak, hogy egyetemi éveimtől, 2015-től kezdve témavezetőm, mi több, mentorom volt és bevezetett nem csupán a kísérletes, laboratóriumi munka rejtelseibe, de a tudományos élet minden szegmensében irányt mutatott.

Hasonlóképpen kiemelt köszönet illeti Dr. Zákány Florinát is, aki témavezetőmmel egyetemen végigkísérte és támogatta eddigi tudományos utamat.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet jelenlegi és korábbi vezetőinek, Prof. Dr. Panyi Györgynek és Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, valamint a Kvantitatív receptoranalízis kutatócsoport vezetőjének, Prof. Dr. Nagy Péternek, hogy megtiszteltek bizalmukkal és lehetőséget biztosítottak az Intézetben való tudományos munkára és megteremtették a folyamatos magas színvonalú kutatás és szakmai fejlődés feltételeit.

Köszönet illeti Vágóné Toldi Hajnalka, Utasi-Szabó Rita, Szilágyi Anikó kollégáimat, valamint kollaborációs partnereimet, Dr. Cs. Szabó Bencét, Dr. Batta Gyulát, Dr. Mándity Istvánt és Dr. Fülöp Pétert a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen technikai segítségükért, az általuk biztosított reagensekért, tanácsokért.

Hálás vagyok családomnak – szüleimnek és feleségemnek, hogy feltétlen támogatásban, szeretetben hordoztak és biztosították azt az otthoni légkört, mely elengedhetetlen a tudományos munkában való elmélyüléshez és kiteljesedéshez.

Ajánlom értekezésemet kislányomnak, Millának, aki – ha nem is első olvasmányaként – reményeim szerint érdeklődéssel fogja kézbe venni dolgozatomat.

## 12. Függelék



**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.

