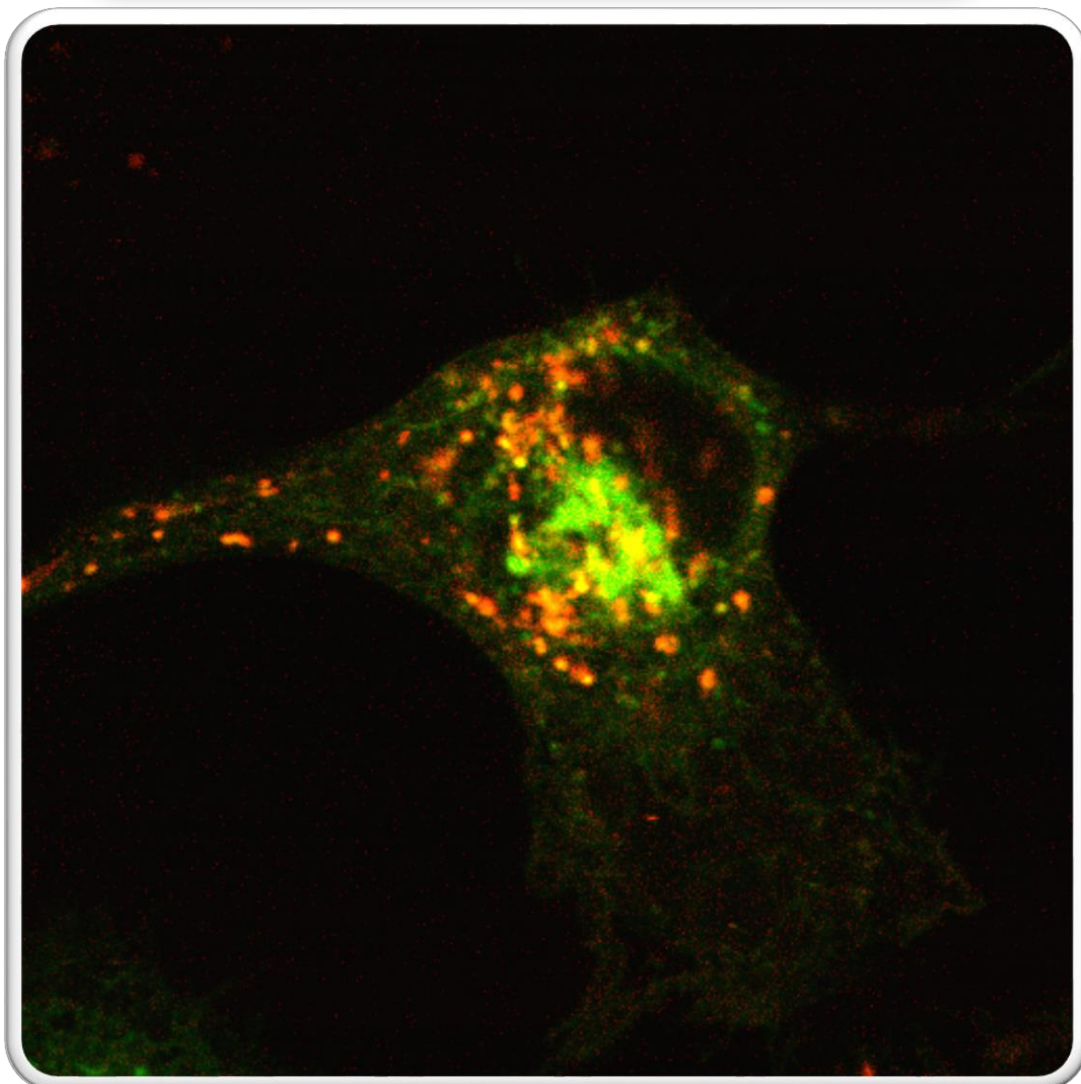




A MAGYAR BIOFIZIKAI TÁRSASÁG  
**XXVII. KONGRESSZUSA**



**DEBRECENI**  
EGYETEM

*2019. augusztus 26 – 29.*

*Debrecen*

*Debreceni Egyetem*

*Élettudományi Központ*

## A dipólpotenciál mérése membránösszetétel-változással járó betegségek membránbiofizikai modellrendszereiben új áramlási citométeres módszerrel (E7)

Szabó Máté, Zákány Florina, Cs. Szabó Bence, Varga Zoltán, Nagy Péter, **Kovács Tamás**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A membrán dipólpotenciálja (DP) a lipidekhez asszociált interfaciális vízmolekulák, illetve a foszfolipidek és szterolok dipoláris szegmentumainak rendezett térbeli orientációjából ered. A dipólok elrendeződése révén  $\approx 300$  mV-os pozitív potenciál jön létre, amely a transzmembrán és felületi potenciáloknál jóval nagyobb intramembrán elektromos erőteret eredményez, befolyásolva a membránfehérjék konformációját és funkcióit. A DP nagyságát főleg a membrán lipidösszetétele, különösen a szterolok mennyisége határozza meg. Elhelyezkedése miatt mérése rendkívül nehéz, erre főleg a feszültség-szenzitív di-8-ANEPPS fluorofórt használják spektrofluoriméteres vagy konfokális mikroszkópos excitációs aránymérési assay során. Ezen módszerek azonban jelentős hátrányokkal rendelkeznek, így célul tűztük ki egy új DP mérési módszer kifejlesztését.

Kísérleteink során egy újonnan leírt 3-hidroxiflavon-származék használatával kidolgoztunk és optimalizáltunk egy áramlási citometriás technikát a DP mérésére. Alkalmazásának alapja, hogy excitáció után a fluorofórban gerjesztett állapotú intramolekuláris proton transzfer reakció megy végbe. Az így kialakuló normál és tautomer forma emissziója elkülönül és mivel a két forma relatív előfordulása az intramembrán elektromos erőter függvénye, a fluorofór alkalmas a DP meghatározására emissziós aránymérési assay segítségével.

Ismert DP-t módosító kezelések (phloretin, 6-ketocholestanol) használatával bizonyítottuk módszerünk alkalmazhatóságát, di-8-ANEPPS-sel végzett spektrofluorimetriás referenciamérések mellett. JY lymphoblastoid és THP-1 monocita sejtekben kimutattuk, hogy a membrán koleszterin, illetve 7-dehidro-koleszterin tartalmának metil- $\beta$ -ciklodextrin/szterol komplexekkel történő növelése dóziszfüggő módon növeli a DP nagyságát.

A munkánk során optimalizált új áramlási citometriás módszer alkalmazható nagy mennyiségű élő sejt DP-jának gyors, egyszerű és megbízható mérésére.

## Szterolok és többszörösen telítetlen zsírsavak dipólpotenciálra gyakorolt hatásának vizsgálata új áramlási citometriás módszerrel (P2)

Szabó Máté, Zákány Florina, Cs. Szabó Bence, Varga Zoltán, Nagy Péter, Kovács Tamás<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A dipólpotenciál (DP) +300 mV-os intramembrán potenciál, amely jelentősen befolyásolja a transzmembrán fehérjék konformációját és funkcióit. A membrán szterol tartalmának emelése növeli a DP nagyságát, így hiperkoleszterinémiában (HC), illetve Smith-Lemli-Opitz szindrómában (SLOS), ahol a membrán koleszterin, illetve 7-dehidrokoleszterin (7DHC) tartalma emelkedik, várható a DP patofiziológiai jelentőséggel bíró növekedése. A DP mérésére a legelterjedtebb módszer a di-8-ANEPPS fluorofórt alkalmazó spektrofluoriméteres vagy mikroszkópos excitációs aránymérés, melynek alkalmazhatósága azonban erőteljesen korlátozott, így célunk volt egy hatékony DP mérési módszer fejlesztése és tesztelése a fenti betegségek membránbiofizikai modelljeiben.

Munkánk során kidolgoztunk egy F66 feszültség-szenzitív fluorofórt alkalmazó, emissziós aránymérésen ( $R_{em}$ ) alapuló áramlási citométeres technikát a DP mérésére, összevetve eredményeinket spektrofluorimetriás referenciaméréseink adataival. Ismert DP-t módosító kezelések (phloretin, 6-ketocholestanol) használatával bizonyítottuk módszerünk alkalmazhatóságát, az F66  $R_{em}$  negatív korrelációt mutatott a DP nagyságával (szenzitivitás: kb. -15%/100 mV). Ezután JY és THP-1 sejtvonalakon és humán PBMC-ken létrehoztuk a fenti betegségek modelljeit és meghatároztuk a DP nagyságát új módszerünkkel.

A HC, illetve SLOS modelljében kimutattuk, hogy a membrán koleszterin, illetve 7DHC tartalmának növelése a megfelelő metil-béta-ciklodextrin/szterol komplexekkel dóziszfüggő módon növelte a DP nagyságát ( $\Delta R_{em,max}$  -14%, illetve -8%). A HC terápiájában kiegészítésként használt magas telítetlen zsírsav tartalmú diéta hatásának vizsgálata során omega-3 zsírsav alkalmazása dóziszfüggően csökkentette, míg omega-6 zsírsav növelte a DP-t ( $\Delta R_{em,max}$  +10%, illetve -5%).

Új áramlási citometriás módszerünk alkalmazható nagyszámú élő sejt DP-jának gyors, egyszerű és megbízható mérésére és a sejtmembrán összetételének megváltozásával járó betegségek vizsgálatára.

## **A sejtmembrán szterol tartalmának változtatása módosítja a Kv1.3 ioncsatorna lipiddutajok és egyéb membrán mikrodomének közötti megoszlását (P47)**

**Cs. Szabó Bence**, Szabó Máté, Zákány Florina, Varga Zoltán, Nagy Péter, Kovács Tamás

*Debreceni Egyetem ÁOK Biofizikai és Sejtbiológia Intézet*

A limfociták aktivációjában szerepet játszó Kv1.3 ioncsatornáról ismert, hogy preferenciálisan a lipiddutajokban helyezkedik el. A lipiddutajokban található jelátviteli környezet szerepet tölthet be az ioncsatorna működésének szabályozásában. Munkacsoportunkban korábban kimutatták, hogy a membrán szterol tartalmának szelektív növelése megváltoztatja a Kv1.3 elektrofiziológiai jellemzőit. A töltések során bevitt szterolok és a csatorna kölcsönhatásának pontos mechanizmusa azonban nem ismert.

Célunk volt a membrán szterol tartalmának szelektív manipulálása után a Kv1.3 és a lipiddutajok közötti kolokalizáció vizsgálata. Ehhez HEK-293 sejtekben a koleszterin vagy 7-dehidrokoleszterin (7DHC) mennyiségét növeltük a megfelelő szterol/metil-béta-ciklodextrin (MBCD) komplexekkel, illetve koleszterint vontunk ki a sejtek membránjából MBCD alkalmazásával. Ezután jelöltük a sejtekbe transzfektált Kv1.3-FLAG csatornákat anti-FLAG antitesttel és a lipiddutajokat koleratoxin B alegységével, majd konfokális, illetve stimulált emisszió kioltás (STED) mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. Kvantitatív képanalízis során meghatároztuk a Kv1.3, illetve dutaj jelölők intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs együttható értékét.

Méréseink alapján a kontrollhoz ( $0,416 \pm 0,013$ ,  $n=27$ ) képest a membrán koleszterin, illetve 7DHC tartalma növelésének hatására a Kv1.3 dutajokkal történő kolokalizációja szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) növekedett (koleszterin esetén  $0,492 \pm 0,013$ ,  $n=34$ ; 7DHC mellett  $0,500 \pm 0,015$ ,  $n=32$ ), míg MBCD kezelés után szignifikánsan csökkent ( $0,338 \pm 0,014$ ,  $n=30$ ). Konfokális mikroszkópos eredményeinket a nagyobb feloldóképességgel bíró STED mikroszkópiával is megerősítettük (kontroll:  $0,274 \pm 0,025$ ,  $n=25$ ; koleszterin:  $0,361 \pm 0,019$ ,  $n=32$ ; 7DHC:  $0,366 \pm 0,019$ ,  $n=28$ ; MBCD:  $0,219 \pm 0,022$ ,  $n=24$ ).

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a Kv1.3 membrán mikrodomének közötti megoszlása függ a sejtmembrán szterol tartalmától, ami mediálhatja a szterolok ioncsatornákra kifejtett hatásait.