

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Feszültségkapuzott ioncsatornák és ceramidok
kapcsolatának vizsgálata**

Dr. Cs. Szabó Bence

Témavezető: Dr. Zákány Florina



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2026

Feszültségkapuzott ioncsatornák és ceramidok kapcsolatának vizsgálata

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

Írta: Dr. Cs. Szabó Bence okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja keretében

Témavezető: Dr. Zákány Florina

Az értekezés bírálói:

Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD
Dr. Tóth Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD
Dr. Tóth Balázs, PhD
Dr. Gaál Botond Ágoston, PhD
Dr. Szabó-Meleg Edina, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2026. október 15. 13:00 óra
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme

I. Előszó

A feszültségkapuzott ioncsatornák és a lipidek közötti kapcsolat igen összetett. Egyrészt transzmembrán fehérjék révén az ioncsatornák a membránba ágyazódnak, így az aktivációjukkor az aktivációs kapu nyitásával járó nagy konformációs változások mind a membránban, a környező lipidmolekulák szoros együttműködésével zajlanak. Ez lehetőséget teremt arra, hogy a lipidek mind ligandszerű, direkt molekuláris kölcsönhatások révén, mind pedig indirekt, a lipidek által meghatározott membránbiofizikai tényezőkön keresztül befolyásolják a csatornák működését. Ismert, hogy a koleszterin, foszfoinozítidok és a többszörösen telítetlen zsírsavak is jelentős hatással vannak a feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_v) aktivációs kapuzására, amelyek háttérében mind direkt kölcsönhatásokat, mind indirekt, membránbiofizikai tényezőkön keresztüli hatásokat valószínűsítettek a lipidek által kiváltott komplex hatások mögött. A membránban található ceramidok, köztük a C16-ceramid (Cer) és a glükozilceramidok, így például a C16-glükozilceramid (GlcCer) feszültségkapuzott ioncsatornák, köztük a $K_v1.3$ ioncsatornák aktivációs kapuzására gyakorolt hatásairól és azok mechanizmusáról keveset tudunk, annak ellenére, hogy a $K_v1.3$ kulcsfontosságú szerepét vetették fel többek között neurodegeneratív betegségekben, amelyekben a ceramidok szintje megnő a membránban.

A lipidek és az ioncsatornák közötti kapcsolat kétirányúságát jelzi, hogy nemcsak a lipidek képesek a feszültségkapuzott ioncsatornák működésére hatni, hanem a feszültségkapuzott ioncsatornák aktivitása is képes lehet a lipidek, ezen belül a ceramidok szintjét módosítani azok szintézisének, illetve lebontásának befolyásolásán keresztül. Több sejttípusban is felvetették, hogy a feszültségkapuzott protoncsatorna (H_v1) gátlószerei a sejtek életképességét csökkenthetik, amit többek között kísérletesen kimutattak T-limfocitákban, korion eredetű mezenhimális őssejtekben, mieloid eredetű szuppresszor sejtekben vagy különböző tumorsejtek esetében, viszont nem vizsgálták makrofágok esetében. A H_v1 gátlószerek ezen hatása pedig akár azok terápiás, akár mellékhatása szempontjából fontos lehet. Továbbá az is ismert, hogy a sejtekben a ceramidszint növekedése gyakran jár együtt a sejthalál indukciójával. Mivel számos ceramidszintetizáló enzim pH-függő aktivitással bír, ezért lehetséges, hogy a H_v1 gátlása révén az intracelluláris pH változása fokozhatja ezen ceramidszintetizáló enzimek aktivitását és ezáltal növelheti a ceramidszintet, ami végül sejthalálhoz vezet, viszont a kettő közti kapcsolatot eddig nem vizsgálták részleteiben.

II. A doktori értekezés előzményei, bevezetés

II./1. A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna szerkezete, kapuzása és élettani szerepe

A Kv1.3 ioncsatorna szerkezetében és működésében a feszültségkapuzott káliumcsatornák szupercsaládjának egyik prototípusa. Négy alfa alegységből épül fel, amelyek mindegyike hat transzmembrán helikális szegmentumot (S1-S6) tartalmaz, amelyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze egymással. Az S1-S4-es szegmentumok alkotják a csatorna feszültség szenzor doménjét (VSD), míg az S5-S6-os szegmentumok a pórusdomént (PD). Az aktivációs kapuzás során a sejtmembrán depolarizációjának hatására a VSD S4 hélice a benne található pozitív töltésű aminosavaknak köszönhetően a sejtmembrán síkjából kifelé, az extracelluláris tér irányába mozdul el, ami végül, a két domén közti funkcionális csatolási mechanizmus révén az aktivációs kapura áttevődve, annak kinyílását eredményezi a PD intracelluláris végénél. A Kv1.3 ioncsatorna élettani szerepét több sejttypusban leírták, többek között immunsejtekben (T- és B-limfocitákban, makrofágokban, mikrogliaokban, dendritikus sejtekben) fontos szerepet kap a sejtek aktivációjában, neuronokban a nyugalmi és akciós potenciál finomhangolásában, a belső mitokondriális membránban levő ioncsatorna pedig az apoptózis szabályzásában fontos.

II./2. A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna gátlószerei, a gátlás terápiás jelentősége

A Kv1.3 ioncsatorna farmakológiai gátlószerei két nagy csoportját alkotják a kismolekulájú, illetve a peptid típusú gátlószerek. A kismolekulájú gátlószerek közül a legjelentősebb csoport a pszoraléneké, amelynek legfontosabb tagjai a Psora-4 (5-4-fenilbutoxi-pszoralén), valamint a klinikai vizsgálatokban is alkalmazott leghatékonyabb pszoralén a PAP-1 (5-4-fenoxibutoxi-pszoralén). A gátlószerek másik nagy típusát alkotják a peptid típusú gátlószerek. A csoport legjelentősebb tagjai a munkacsoportunk által is vizsgált Vm24, illetve a klinikai vizsgálatokban is alkalmazott dalazatid. A Kv1.3 ioncsatorna gátlásának terápiás potenciálja autoimmun, neurodegeneratív és daganatos betegségekben merült fel, de ezidáig egyik gátlószer alkalmazása sem lépett be a klinikai gyakorlatba.

II./3. A Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna szerkezete, kapuzása és élettani szerepe

Szemben a Kv csatornák szerkezetével a Hv1 olyan homodimerként van jelen a membránban, amelyben az egyes alegységeket egyenként négy transzmembrán helikális szegmentum (S1-S4) építi fel. Az alegységek szerkezete nagyban emlékeztet a Kv csatornák feszültség szenzor doménjére, de azokkal szemben egyszerre működnek feszültség szenzorként, valamint felelnek a fiziológias körülmények között a citoplazmából kifelé irányuló

protonvezető útvonalként, ugyanis hiányzik belőlük a fentebb bemutatott, S5-S6 hélixek által formált klasszikus PD. Amikor a sejtmembrán depolarizálódik, vagy amikor megnő a citoszólban a protonkoncentráció, tehát a citoszól savasodik vagy ellentétesen, az extracelluláris tér lúgosodik, a protoncsatorna aktiválódik. A Hv1-nek elsősorban két sejtfunkcióban van kiemelt szerepe. Egyrészt nélkülözhetetlen a NADPH-oxidáz megfelelő működéséhez, és ezáltal a reaktív oxigéngyökök (ROS) termelésének fenntartásához, másrészt pedig fő feladata az intracelluláris pH szabályozása.

II./4. A makrofágokról általában, a Hv1 ioncsatorna szerepe makrofágokban

A makrofágok, a veleszületett immunrendszer alapvető tagjaiként igen plasztikus és heterogén sejtek, ezáltal differenciációjukat és aktivációjukat számos különböző inger válthatja ki. A makrofágok a szövetekbe lépő monocitákból differenciálódnak. Általánosságban a makrofágokat M1, azaz klasszikus, illetve M2, azaz alternatív útvonalon polarizált alcsoportokba sorolhatjuk. Az aktivált M1 makrofágok proinflammatorikus citokineket és mediátorokat termelnek, amely révén részt vesznek a patogének és tumorok elleni védekezésben, míg az M2 makrofágok inkább a gyulladás feloldódásában, az apoptotikus sejtek és törmelékek eltávolításában, a szöveti remodellingben vesznek részt. Bár a fenti dichotóm osztályozás terjedt el leginkább az irodalomban, az M1 és M2 fenotípusok úgy képzelhetők el, mint a lehetséges funkcionális állapotok kontinuumának szélsőségei, amelyek a mikrokörnyezeti tényezőktől függően dinamikusan egymásba alakulhatnak. A Hv1 alapvető szerepe széles körben dokumentált humán makrofágokban, ahol összefüggésbe hozták a csatornát a sejtek intracelluláris pH egyensúlyának, illetve ROS termelésének szabályozásával és ezáltal azok antimikrobiális és proinflammatorikus aktivitásával.

II./5. A Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna gátlószerei, a gátlás terápiás jelentősége

A Hv1 ioncsatorna gátlószerei között vannak ionok, kismolekulájú és peptidtípusú gátlószerek egyaránt. A Zn^{2+} a Hv1 ioncsatorna aspecifikus gátlószereinek tekinthető, az első leírt Hv1 inhibitor az irodalomban. A kismolekulájú Hv1 gátlószerek közül a guanidínium-alapú vegyületek máig az egyik legjelentősebb csoportnak számítanak, amely két legjelentősebb tagja a 2-guanidinbenzimidazol (2GBI) és az annak módosításával létrehozott 5-kloro-2-guanidinbenzimidazol (ClGBI). Kedvező tulajdonságai, elsősorban nagy affinitása miatt mai napig a ClGBI-t használják a legszélesebb körben a Hv1 farmakológiai gátlására, valamint a csatorna funkciójának és biológiai jelentőségének kísérletes vizsgálatára, ezért kísérleteink során mi is ezt a vegyületet alkalmaztuk. A peptidtípusú gátlószerek közé tartozik az AGAP (antitumor analgézis peptid) és a Hanatoxin. Számos olyan patológias állapot ismert,

amelyekben a protoncsatorna túlzott működése kulcsfontosságú szereppel bír, ezáltal szelektív gátlásában jelentős terápiás potenciál rejlik. Ezzel összhangban kedvező hatását már felvetették akut tüdőkárosodásban, iszkémiás sztrókbán, agy- és gerincvelősérülések esetén, szklerózis multiplexben és különböző daganatos megbetegedésekben is.

II./6. A főbb membránbiofizikai paraméterek, mérések és biológiai jelentőségük

A lipidek befolyásolhatják a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák működését közvetlen, ligandszerű lipid-fehérje kötődés révén, valamint indirekt módon, a membránok molekuláris rendezettségéhez kapcsolódó biofizikai tulajdonságainak megváltoztatásán keresztül. Utóbbiak közé tartozik a fluiditás, hidráció és dipólpotenciál, amelyek a membránok szerkezeti szerveződését különböző mélységben jellemzik és élő sejtekben lokális mikrokörnyezetre érzékeny fluorofórok és fluoreszcencia alapú mérőmódszerekkel vizsgálhatók. Erre a célra a leggyakrabban használt módszerek rendre a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájának, a Laurdan generalizált polarizációjának és a di-8-ANEPPS gerjesztési arányának meghatározása, amelyek segítségével felderíthetők a különféle lipidek membránok szerveződésére gyakorolt hatásai, így tanulmányozhatóvá válnak a lipidek membránfehérjékre gyakorolt esetleges indirekt hatásai is.

II./7. A ceramidok membránbiofizikai jellegzetességei

A membránok szerveződését és így biofizikai tulajdonságait főleg azok lipidösszetétele határozza meg. A ceramidok jellegzetes kémiai szerkezetük és extrém hidrofobicitásuk révén nagymértékben fokozzák a membránt alkotó molekulák pakolódási sűrűségét és a kettősrétegek molekuláris rendezettségét, illetve jellegzetes fizikai tulajdonságokkal rendelkező membrán mikrodoméneket, úgynevezett ceramidplatformokat hoznak létre. A glükoszilceramidok szintén általánosságban fokozzák a membránok rendezettségét, valamint hozzájárulnak a lipidtuajok létrejöttéhez. Mindezen hatások révén mind a ceramidok, mind pedig a glükoszilceramidok hozzájárulhatnak a membránban található fehérjék funkcionális aktivitásának modulációjához. Modellmembránokban végzett tanulmányok ugyanakkor felvetették, hogy a ceramidok és glükoszilceramidok membránbiofizikai hatásaiban, illetve azok mértékében eltérések lehetnek, amelyek révén fehérjékre gyakorolt hatásaik is különbözhetnek. Ezt azonban élő sejtekben még nem bizonyítottak.

II./8. A ceramidok feszültségkapuzott káliumcsatornákra kifejtett elektrofiziológiai hatásai

A K_v szupercsalád különböző tagjai, így a K_v1.3 esetén is felvetették, hogy a ceramidok általában gátló jellegű hatásokat fejtenek ki az ioncsatornák többségére, amelyek jellemzően csökkent teljes sejt áramokban, alacsonyabb egyedi csatorna nyitási valószínűségeken, illetve a konduktancia-feszültség görbe magasabb membránpotenciálok felé tolódásában nyilvánulnak meg. Az azonban lényegében teljesen feltáratlan, hogy a ceramidok milyen hatásmechanizmussal, a csatornák melyik doménjén hatva fejtik ki hatásukat. A glükoszilceramidok K_v csatornákra gyakorolt hatásai pedig teljesen ismeretlenek.

II./9. Lipidek hatásmechanizmusának vizsgálata

A kételektródás voltage-clamp fluorimetria az elektrofiziológiai és fluoreszcencián alapuló technikák egyedülálló kombinációja, amely segítségével az ionáramok mérésével és a csatorna VSD-jébe pontmutációval bejuttatott cisztein fluorofórral történő jelölésével és a fluoreszcencia nyomonkövetésével egyidejűleg vizsgálható az ioncsatornák PD-jének és VSD-jének működése. Ezáltal a technika kivételes lehetőséget kínál a lipidek összetett hatásmechanizmusának vizsgálatára, illetve annak eldöntésére, hogy a csatorna melyik doménje a lipidek elsődleges intramolekuláris célpontja. Emellett a ceramidok és glükoszilceramidok indirekt, a membrán biofizikai tulajdonságainak megváltozásán keresztül megvalósuló hatásai tanulmányozhatók a fentebb említett környezeti paraméterekre szenzitív fluorofórokkal. Ennek vizsgálata különösen releváns annak fényében, hogy a csatorna aktivációs kapuzása során bekövetkező konformációváltozások abban a régióban történnek, amelyben a lipidek mennyiségében fellépő eltérések alapvető szerkezeti átrendeződéseket eredményezhetnek, amint azt egyéb ioncsatornák esetén ki is mutatták.

II./10. A ceramidok szintézise, patofiziológiai jelentősége, szerepük a sejthalál során

Mind a ceramidok, mind pedig a glükoszilceramidok bioaktív vegyületnek tekinthetők, azaz mennyiségük pontosan szabályozott és annak megváltozása következményesen különböző célmolekulák szintjét és aktivitását befolyásolja. Fiziológiás mennyiségük így nélkülözhetetlen a sejtek normális működése szempontjából. A ceramidok a szfingolipidek metabolizmusának központi vegyületét jelentik. Bár fiziológiás körülmények között elenyésző mennyiségben fordulnak elő a plazmamembránban, a komplexebb szfingolipidek alapvegyületét képezik, illetve mennyiségük nagymértékben megnőhet különféle stimulusok, elsősorban stresszingerek hatására, ami jelátviteli folyamatok aktivációjához vezet és sok esetben a sejthalálhoz vezető folyamatok elindulását eredményezi. A glükoszilceramidok a ceramidokból

keletkeznek és a bonyolultabb glikoszfinolipidek, gangliozidok előalakjait képezik. Fiziológias körülmények között is nagy mennyiségben található a sejtmembránban, hozzájárulva annak laterális szerveződéséhez. Fontos biológiai szerepükkel összhangban számos patológias kórképben jellemző ezen lipidek szintjének megváltozása. A ceramidok patofiziológiai jelentőséggel bíró felhalmozódása megfigyelhető különféle neurodegeneratív kórképekben, míg számos tumorban ezzel éppen ellentétes módon a ceramidok termelődése nem váltható ki. Mindkét eltérés jellemzően a sejthalálhoz vezető útvonalak zavarával társul. A glükoszilceramidok mennyiségének megnövekedése pedig szintén számos kórképben, így neurodegeneratív, lizoszomális tárolási vagy tumoros megbetegedésekben is előfordul, ami gyakran hozzájárul bizonyos fehérjék ezen állapotokban jellemző abnormális működéséhez. Mivel minden említett kórképre egyúttal jellemző az ioncsatornák működési zavara is, a két tényező közötti kapcsolat felderítése hozzájárulhat a betegségek jobb megértéséhez és új terápiás célpontok felderítéséhez is.

III. Célkitűzések

A disszertációban bemutatott kutatások két kérdéskör köré csoportosultak:

1. *A disszertációban ismertetett első kutatásunk fő célja az volt, hogy modern elektrofiziológiai és membránbiofizikai módszerekkel vizsgáljuk, hogyan módosítja a membránba ágyazódó C16-ceramid (Cer) és C16-glükoszilceramid (GlcCer) a Kv1.3 ioncsatornák aktivációs kapuzását.*

Ennek érdekében célunk volt, hogy i) megvizsgáljuk ezen lipidek elektrofiziológiai hatásait a Kv ioncsatorna szupercsalád egyik jellegzetes tagjára, a Kv1.3 ioncsatornára; ii) azonosítsuk a csatorna azon szerkezeti elemét, a VSD-t vagy a PD-t, amelyen keresztül ezen lipidek elektrofiziológiai hatásai közvetítődnek; és iii) alátámasszuk vagy kizárjuk az indirekt, membránbiofizikai paraméterek megváltozása által közvetített hatások hozzájárulását az egyes lipidek hatásmechanizmusához. A *Xenopus laevis* oocita expressziós rendszert és exogén Cer és GlcCer töltéseket alkalmazó kételektródás voltage-clamp fluorimetriás méréseink során azokat a fő elektrofiziológiai paramétereket határoztuk meg, amelyek ezen ceramidok ionáramra kifejtett hatásait írják le. A VSD mozgását monitorozó fluoreszcens jel változásának vizsgálata pedig lehetővé teszi ezen lipidek intramolekuláris célpontjának feltárását, betekintést nyújtva a hatásmechanizmusba. Azt, hogy a ceramidok hatásai tekintetében mennyire játszanak szerepet a lipidek szintjének változásából fakadó indirekt hatások, a Cer és GlcCer töltések membránbiofizikai hatásainak vizsgálatával jellemeztük kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteken. Ehhez olyan festékeket alkalmaztunk, amelyek spektrofluorimetriás vagy konfokális mikroszkópos mérések során a membrán különböző rétegeiben képesek jellemezni a membránbiofizikai változásokat, így karakterizálva a legbelső rétegekben a fluiditás, majd a hidráció, míg a legkülső, membrán víz-határfelületen a dipólpotenciál eltéréseit.

2. *A disszertációban ismertetett második kutatásunk fő célja az volt, hogy megvizsgáljuk, a Hv1 ioncsatorna gátlása hogyan befolyásolja humán polarizált makrofágok életképességét és feltárjuk a ceramidok szerepét a folyamatban.*

Ennek érdekében célunk volt, hogy i) áramlási citometria segítségével humán THP-1 monocitoid sejtvonal eredetű, polarizált makrofágok esetén megvizsgáljuk, hogy a Hv1 ionáram CIGBI általi gátlása hogyan befolyásolja a sejtek életképességét; ii) a különböző irányban polarizált sejtek ceramidszintjeinek meghatározása révén tanulmányozzuk, hogy a Hv1 ionáram gátlása hogyan befolyásolja a sejtekben a pH-érzékeny ceramid szintézist; valamint iii) bizonyítsuk a Hv1 csatorna gátlása kapcsán fellépő életképesség-csökkenés és a

ceramidszintek változása közti közvetlen kapcsolatot azáltal, hogy megvizsgáljuk, hogy a csatorna gátlásával egyidejűleg a ceramidszintézis gátlása képes-e kivédeni a makrofágok életképességbeli változásait.

IV. Anyagok és módszerek

IV./1. Ceramidok elektrofiziológiai és membránbiofizikai hatásainak tanulmányozására alkalmazott sejtek, expressziós rendszerek, molekuláris biológia

A ceramidok elektrofiziológiai hatásainak tanulmányozása során humán Kv1.3 (KCNA3, Uniprot B2RA23) A309C mutáns csatornát alkalmaztunk. A csatornát kódoló mRNS szintéziséhez a mutáns csatornát kódoló plazmidot a HindIII enzimmel linearizáltuk, majd az Invitrogen mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) segítségével mRNS-sé írtuk át.

A TEVCF kísérletekhez a *Xenopus laevis* afrikai karmosbéka oocitákat az EcoCyte Bioscience-től (Dortmund, Németország) szereztük be. A petesejteket 30-50 nl ~1 µg/µl mRNS-sel injektáltuk, majd 18 °C-on 1-3 napig ND93-ban (93 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 50 mg/l Gentamycin, pH=7,4) inkubáltuk. Az oldatok elkészítéséhez használt összes vegyszert a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok) cégtől vásároltuk.

A ceramid és glükoszilceramid töltések hatására a membránbiofizikai paraméterekben bekövetkező változásokat CHO sejtvonalon vizsgáltuk. A sejtvonalat az American Type Culture Collection-től (Manassas, VA, Egyesült Államok) szereztük be és a specifikációknak megfelelően tenyésztettük. A spektrofлуорimetriás mérésekhez a 80-90%-os konfluenciát mutató sejteket tripszin kezeléssel választottuk fel, míg a konfokális mikroszkópiához a sejteket 8-lyukú fedőlemez aljú kamrákban (ibidi, Gräfelfing, Németország) növesztettük.

IV./2. A sejtmembrán ceramid és glükoszilceramid töltése

A ceramid és glükoszilceramid töltésekhez a C16-ceramidot (Cer, d18:1/16:0, N-palmitoil-D-eritro-szfingozin) és a C16-glükoszilceramidot (GlcCer, d18:1/16:0, D-glükoszil-β-1,1'-N-palmitoil-D-eritro-szfingozin) az Avanti Polar Lipids-től (Alabaster, AL, Egyesült Államok) szereztük be. A lipideket közvetlenül abszolút etanolban oldottuk fel, a kezelések során az etanol legfeljebb 0,5%-os végkoncentrációban volt jelen. A Cer és GlcCer töltéseket 40 µM koncentrációban 24 órán keresztül végeztük úgy, hogy a lipideket ND93-ban (elektrofiziológiához) vagy médiumban (spektrofлуорimetriához és mikroszkópiához) hígítottuk. A CHO sejtekben végzett életképességmérések során egyéb töltési koncentrációkat is alkalmaztunk. Az inkubáció 18 °C-on történt az oociták, míg 37 °C-on a CHO sejtek esetében.

IV./3. Kételektródás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF)

A TEVCF mérésekhez az oocitákat 30 percig jégen $10\text{ }\mu\text{M}$ 2-((5(6)-tetrametil-rodamin)karboxi-amino)-etil-metántioszulfonáttal (TAMRA-MTS, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada) jelöltük. A festéket egy depolarizáló oldatban (110 mM KCl , $1,5\text{ mM MgCl}_2$, $0,8\text{ mM CaCl}_2$, $0,2\text{ mM EDTA}$ és 10 mM HEPES , $\text{pH}=7,1$) hígítottuk. A festést követően ND93-mal történő alapos mosás után a petesejteket jégen, sötétben tároltuk a mérés kezdetéig. A mérésekhez használt pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegkapillárisokból (Harvard Apparatus, Kent, Egyesült Királyság) húztuk, ellenállásuk $2\text{--}3\text{ M}\Omega$ volt. A mérések során külső oldatként a mérőkamrában ND93 oldatot alkalmaztunk, míg a pipettákban 3 M KCl oldatot használtunk belső oldatként.

A TEVCF során az oociták membránpotenciáljának beállítását és az ionáramok mérését Oocyte Clamp OC-725C erősítővel (Warner Instruments, Hamden, CT, Egyesült Államok) végeztük, míg a fluoreszcens jelek intenzitását egy Nikon Eclipse FNI mikroszkópra (Nikon, Tokió, Japán) szerelt $40\times$, $0,8\text{-NA}$ CFI Plan Fluor Nikon vízimmerziós objektívvel és egy fotodiódával (PIN-040A; United Detector Technology, OSI Optoelectronics, Hawthorne, CA, Egyesült Államok) mértük. A TAMRA-MTS jelének detektálásához $545/25$ gerjesztési szűrőt, 565LP dikroikus tükröt és $605/70$ emissziós szűrőt használtunk. A fotodióda jelét egy Axopatch 200A erősítővel amplifikáltuk és az ionáramokkal együtt az adatokat pClamp10 programcsomag (Molecular Devices, San Jose, CA, Egyesült Államok) által vezérelt Axon Digidata 1550 (Molecular Devices) illesztőegységgel digitalizáltuk.

IV./4. A TEVCF adatok elemzése

A $K_v1.3$ A309C ioncsatornán végzett TEVCF mérések során az ionáramok és fluoreszcens jelek mérése esetén a mintavételezés 5 kHz frekvenciával történt 1 kHz -en történő szűrőzés mellett. A fluoreszcens jelek nagyságát a $\Delta F/F$ százalékos arányában fejeztük ki, ahol ΔF a fluoreszcens jel amplitúdójának változása, F pedig az adott tartófeszültségen mérhető fluoreszcencia alapvonalát (baseline) jelöli. A fotoelhalványítás okozta torzító hatások kiküszöbölése érdekében a különböző membránpotenciálokon nyert fluoreszcencia adatokból kivontuk a feszültségfüggő változásokat nem mutató alapvonalbeli fluoreszcencia intenzitás átlagos értékét. Ezt követően az F_{norm} -V görbék előállításához a fluoreszcens jelek egyensúlyi komponenseit normáltuk a maximális intenzitásra és a kapott értékeket a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk.

Az áramerősség-feszültség (I-V) görbék generálásához a csúcsáramokat határoztuk meg, korrigáltuk a szivárgó áramra, és az így kapott értékeket ábrázoltuk a tesztpotenciál

függvényében. Ezt követően a konduktancia-feszültség (G-V) görbék $V_{1/2}$ és k paramétereit úgy határoztuk meg, hogy az alábbi egyenletet

$$I = \frac{V \times G_{max} \times (1 - e^{-\frac{V - E_{rev}}{25}})}{(1 - e^{-\frac{V}{25}}) \times \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}}} \quad (1.)$$

illesztettük az I-V görbékre, amely kombinálja a Goldman-Hodgkin-Katz rektifikációt a Boltzmann-feszültségfüggéssel. A képletben V a feszültséget, I az áramerősséget jelenti, és a függvény szabad paramétere a maximális konduktancia (G_{max}), az egyensúlyi potenciál (E_{rev}), valamint a Boltzmann-függvény félaktivációs feszültsége ($V_{1/2}$) és meredekségi együtthatója (k). A 25-ös szám a Goldman-Hodgkin-Katz egyenletből az egyetemes gázállandó és abszolút hőmérséklet szorzatának, illetve az ion töltésének és a Faraday-állandó szorzatának hányadosa mV-ban mérve. Ezt követően az adott tesztpotenciálok esetén a normált G_{norm} értékeket minden sejt esetén az alábbi függvény alapján számítottuk ki:

$$G(V) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}} \quad (2.)$$

Itt a $G(V)$ az adott tesztpotenciálon számított konduktanciát, V az aktuális membránpotenciált, $V_{1/2}$ a félaktivációs feszültséget, k pedig a meredekségi együtthatót jelölik. A G meghatározása az oocitákban történő mérések esetén azért történik másképp, mint a hagyományos patch-clamp méréseknél, mivel az oocitákban méretüknél fogva nem ismerjük adott belső oldat alkalmazása mellett az intracelluláris káliumkoncentrációt, így az egyensúlyi potenciál értékét sem.

Az ionáramok aktivációs időállandóinak meghatározásához az áramgörbék emelkedő szakaszára egykomponensű, elsőfokú, telítésbe futó exponenciálisan emelkedő függvényt illesztettünk:

$$I = I_0 \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{akt}}}\right) + C \quad (3.)$$

ahol I az áramamplitúdó, I_0 a maximális áramamplitúdó, τ_{akt} az aktivációs időállandó, C pedig egy konstans, nem időfüggő áramkomponens. A fluoreszcens jeleknél a gyors ($\tau_{akt,f}$) és lassú ($\tau_{akt,s}$) időállandók meghatározásához a következő kétkomponensű, telítésbe futó, exponenciális függvényt illesztettük a mért adatokra:

$$I = I_{0f} \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{akt,f}}}\right) + I_{0s} \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{akt,s}}}\right) + C \quad (4.)$$

Az F_{norm} -V görbékét az alábbi Boltzmann-függvény illesztésével számszerűsítettük:

$$y = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}} \quad (5.)$$

és a $V_{1/2}$ és k értékeket határoztuk meg az egyedi sejtek illesztéseiből.

A Cer és GlcCer kezelések áramamplitúdókra gyakorolt hatásainak vizsgálatához +40 mV-os depolarizáló impulzusok által kiváltott csúcsáramokat határoztunk meg, amiket a szivárgási árammal korrigáltunk. Ezt követően ezeket az értékeket sejtenként a kontroll oociták szivárgással korrigált áramainak adott napi átlagára normáltuk, ezáltal a kapott relatív áramamplitúdók mentesek az ionáramok mérési napok között esetlegesen tapasztalható változékonyságtól, így a különböző napokon mért eredmények jól összehasonlíthatóak.

Az elektrofiziológiai adatok elemzését a Clampfit (v10; Molecular Devices), SigmaPlot (v10; Systat Software, San Jose, CA, Egyesült Államok) és Excel (Microsoft, Redmond, WA, Egyesült Államok) szoftverek segítségével végeztük.

IV./5. A sejtmembrán fluiditásának és hidrációjának vizsgálata

A sejtmembrán fluiditásának vizsgálatához a kontroll, illetve Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt CHO sejteket 4'-(trimetil-ammonio)-difenil-hexatriénnel (TMA-DPH; Sigma-Aldrich) jelöltük, majd a festék fluoreszcencia anizotrópiáját (r) Fluorolog-3 spektrofluorométerrel (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ, Egyesült Államok) határoztuk meg 37 °C-on 352 nm-es gerjesztés és 430 nm-en történő mérés után a következő képlet szerint:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}} \quad (6.)$$

ahol I_{vv} és I_{vh} a vertikálisan polarizált fény által gerjesztett fluoreszcencia vertikális, illetve horizontális komponense, G pedig egy műszerspecifikus korrekciós tényező, amely a detektáló rendszer eltérő érzékenységét jellemzi a vertikális, illetve horizontális irányban polarizált fényre az alábbi képlet szerint:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (7.)$$

amelyben I_{hv} és I_{hh} a horizontálisan polarizált fény által történő gerjesztés után a fluoreszcencia vertikális és horizontális komponense.

A sejtmembrán hidrációjának tanulmányozásához a fentiek szerint kezelt sejteket 6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilaminnal (Laurdan; Sigma-Aldrich) jelöltük, majd a festéket 350 nm-en gerjesztettük, emisszióját az emissziós spektrum két tartományában, 435 nm-en (I_{blue}) és 500 nm-en (I_{red}) detektáltuk spektrofluorométerrel 37 °C-on és generalizált polarizációját (GP) számszerűsítettük a következő képlet szerint:

$$GP = \frac{I_{blue} - I_{red}}{I_{blue} + I_{red}} \quad (8.)$$

IV./6. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása

A sejtmembrán dipólpotenciáljának vizsgálatára kontroll, illetve Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt CHO sejteket di-8-ANEPPS (4-(2-[2-[6-(dioktilamino)-2-naftalinil]etenil)-1-(3-szulfopropil)]piridinium belső só; Thermo Fisher Scientific) fluorofórral jelöltük, majd a sejtek közepsíkájában LSM880 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) felvételeket készítettünk. A festéket 458 nm-en és 514 nm-en gerjesztettük, és a kibocsátott fluoreszcencia intenzitását 584 és 686 nm között mértük (rendre I_{blue} és I_{red}). A kvantitatív képelemzés során kizárólag a vízfeltöltés algoritmustal azonosított membránpixelek adataiból számítottuk ki a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló fluoreszcencia-intenzitás arány ($R_{exc} = I_{blue} / I_{red}$) átlagértékét a háttérintenzitások kivonása után.

IV./7. A sejtmembránban található ceramid és glükoszilceramid mennyiségének vizsgálata

A sejtmembrán ceramid tartalmának vizsgálatára kontroll, illetve Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt CHO sejteket 15B4 anti-ceramid (Sigma-Aldrich), majd fluorofórral konjugált anti-egér IgM másodlagos antitestekkel (Thermo Fisher Scientific) jelöltünk. A glükoszilceramid mennyiségének meghatározása során hasonlóan anti-glükoszilceramid elsődleges (Glycobiotech, Kukels, Németország), majd fluorofórral konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitesteket (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk. Ezután mindkét esetben NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel (ACEA Biosciences, San Diego, CA, Egyesült Államok) mértük az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását, majd az FCS Express programban (De Novo Software, Los Angeles, CA, Egyesült Államok) végzett elemzés során a normál morfológiát mutató sejtek átlagos, kontroll mintákra normált fluoreszcenciáját határoztuk meg.

IV./8. A ceramid és glükoszilceramid sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata

A már szuszpenzióban levő, valamint tripszines emésztéssel felválasztott kontroll, illetve különböző koncentrációjú Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt CHO sejteket Sytox Green Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific) és fluorofórral konjugált annexin V (Thermo Fisher Scientific) markerekkel jelöltük a nekrozis és apoptózis detektálására. Ezután NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását és FCS Express programban számszerűsítettük a mindkét markerre negatív, élőnek tekinthető sejtek összes sejthez viszonyított arányát minden minta esetén.

IV./9. THP-1 sejtek tenyésztése, differenciációja és a makrofágok polarizációja

A humán akut monocitás leukémiából származó THP-1 (American Type Culture Collection) sejteket 24 órán át makrofágokká differenciáltattuk 10 ng/ml forbol-12-mirisztát-

13-acetáttal (PMA; Sigma-Aldrich), amit 24 órás nyugalmi időszak követett PMA hiányában. A differenciált M0 makrofágokat ezután 24-48 órán át klasszikus M1 makrofágokká polarizáltuk 100 ng/ml lipopoliszachariddal (LPS; E. coli O111:B4 ultratiszta, Sigma-Aldrich) és 20 ng/ml interferon- γ kezeléssel (IFN- γ ; Thermo Fisher Scientific), vagy M2 makrofágokká 20 ng/ml interleukin-4 (IL-4; Thermo Fisher Scientific) és 20 ng/ml interleukin-13 (IL-13; Thermo Fisher Scientific) segítségével.

IV./10. A CD markerek expressziójának elemzése polarizált makrofágokban

A differenciált és polarizált THP-1 makrofágokat Accutase-zal felválasztottuk, Fc-receptoraikat humán FcR blokkoló reagenssel (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) blokkoltuk, majd a sejteket fluorofórral konjugált anti-CD64, anti-CD71, anti-CD80, anti-CD86 vagy anti-CD206 antitestekkel (mind Thermo Fisher) jelöltük. Az egyedi sejtek fluoreszcencia-intenzitását NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük és átlagos fluoreszcencia-intenzitásukat FCS Express programban számítottuk ki. Az antitestek nonspecifikus kötődésének hiányát azonos körülmények között alkalmazott izotípus kontroll antitestekkel mutattuk ki.

IV./11. Ioncsatorna-gátlók polarizált makrofágok életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata

A differenciált és polarizált THP-1 makrofágokat 24 órán át kezeltük a következő ioncsatorna-inhibitorokkal: 16-256 μ M 5-kloro-2-guanidinobenzimidazol (ClGBI; Sigma-Aldrich), 20 pM Vm24 skorpiótoxin (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael), 20 nM tetrodotoxin (TTX; Alomone Labs), 1 mM tetraetilammónium (TEA⁺; Sigma-Aldrich), vagy 1 mM névleges koncentrációjú ZnCl₂ (Sigma-Aldrich). A ClGBI által kiváltott toxicitással szemben a ceramid termelését gátló előkezelések potenciális védőhatásának vizsgálatához 1 μ M myriocint, 2 μ M GW4869-et vagy 5 μ M ARC39-et (mind Sigma-Aldrich) adtunk a polarizált M0, M1 és M2 makrofágokhoz 30 perccel a ClGBI alkalmazása előtt. Az életképes sejtek arányát ezután a IV./8. alfejezetben leírtak szerint határoztuk meg, azzal a különbséggel, hogy a letapadó sejtek felválasztását nem tripszinnel, hanem Accutase-zal végeztük.

IV./12. A Hv1 expresszió meghatározása polarizált makrofágokban

A differenciált és polarizált THP-1 makrofágokat Accutase-zal felválasztottuk, metanollal (Sigma-Aldrich) fixáltuk, majd 0,1%-os Triton X-100-ban (Sigma-Aldrich) történő permeabilizálás után humán FcR blokkoló reagenssel és 5% BSA-val blokkoltuk. Ezután a sejteket anti-Hv1 antitestekkel (Thermo Fisher Scientific), majd fluorofórral konjugált kecske

nyúlelleses IgG antitestekkel jelöltük 1% BSA és 0,1% Triton X-100 jelenlétében. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük és átlagos fluoreszcencia-intenzitásukat FCS Express-ben számítottuk ki. Az antitestek nemspecifikus kötődésének hiányát azonos körülmények között alkalmazott izotípus kontroll antitestekkel mutattuk ki.

IV./13. A CIGBI polarizált makrofágok plazmamembránban található ceramid szintjére gyakorolt időfüggő hatásának elemzése

A differenciált és polarizált THP-1 makrofágokat 1, 4 vagy 18 órán keresztül 50 vagy 100 μ M CIGBI-vel kezeltük, Accutase-zal felválasztottuk, humán FcR blokkoló reagenssel blokkoltuk, majd ceramidellenes antitesttel és fluorofórral konjugált kecske egérelleses IgM antitesttel jelöltük. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük és átlagos fluoreszcencia-intenzitásukat FCS Express-ben számítottuk ki. Az antitestek nemspecifikus kötődésének hiányát azonos körülmények között alkalmazott izotípus kontroll antitestekkel mutattuk ki.

IV./14. Statisztikai elemzés

Minden elektrofiziológiai kísérletet legalább 4 különböző békából származó oocitákon végeztük. A spektrofluorometria során a három független kísérletből nyert minták mindegyike körülbelül 100000 sejtet tartalmazott. A ceramidtöltéses kísérleteknél a konfokális mikroszkópos elemzés során minden kezelés esetén öt független kísérletből származó képeket rögzítettünk, amelyek felvételenként átlagosan 30-40 sejtet tartalmaztak. A makrofágok vizsgálatát célzó konfokális mikroszkópos méréseknél az eredmények öt független kísérletből nyert sejtekből származnak. Az áramlási citométerrel végzett méréseknél a legalább három független kísérletből származó minták mindegyike legalább 10000 sejtet tartalmazott. A statisztikai elemzés során a p értékeket Tukey-féle HSD-teszttel (honestly significant difference) határoztuk meg, amennyiben az előzetes ANOVA analízis során a csoportok között szignifikáns különbségeket kaptunk. Az eltéréseket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ -nek adódott.

V. Eredmények és diszkusszió

V./1. A C16-ceramid és C16-glükoszilceramid hasonló elektrofiziológiai hatásokat fejtenek ki a Kv1.3 ioncsatornára annak ellenére, hogy az ioncsatornán belüli támadáspontjuk különbözik, ami részben magyarázható a két lipid eltérő membránbiofizikai tulajdonságaival

Kísérleteink során először a Cer és GlcCer töltések elektrofiziológiai hatásait vizsgáltuk a PD és VSD mozgását reprezentáló ionáramok és fluoreszcens jelek egyidejű rögzítésével, amelyek segítségével meghatároztuk a Kv1.3 pórusnyitását és VSD aktivációját jellemző egyensúlyi aktivációs és kinetikai paramétereket. Méréseink során a TEVCF technikát használtuk a Cer és GlcCer töltések által kiváltott elektrofiziológiai hatások leírására és a lipidek intramolekuláris célpontjának azonosítására. Kísérleteinkhez az A309C pontmutációval rendelkező Kv1.3 ioncsatornát *Xenopus laevis* afrikai karmosbéka petesejtekben fejeztük ki. Ez a vad típusú csatornához hasonló elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkezik és korábbi munkánk alapján optimálisan alkalmazható az MTS-TAMRA jelöléshez, így a TEVCF technikával történő mérésekhez. Eredményeink alapján a sejtmembrán Cer és GlcCer töltése gátló jellegű hatást fejt ki a Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kapuzására. A TEVCF mérések során kimutattuk, hogy bár mindkét lipid jobbra, azaz pozitívabb membránpotenciálok felé tolja a csatorna egyensúlyi aktivációját jellemző G-V görbét, lassítja az áram aktivációs kinetikáját és csökkenti az áram amplitúdóját, ezek a lipidek valószínűleg különböző molekuláris mechanizmusokon keresztül fejtik ki hatásukat, amelyeket a VSD mozgását nyomon követő fluoreszcens jel és a PD-t jellemző ionáramok párhuzamos mérése révén különítettünk el. Eredményeink alapján a Cer hatását a VSD-n fejt ki, amit a fluoreszcens jel egyensúlyi aktivációját jellemző F-V görbék G-V görbékkel párhuzamos jobbra tolódása és a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájának lassulása mutat. Ezzel szemben a GlcCer nem idéz elő ilyen változásokat a fluoreszcens jelben, ezáltal elsődlegesen közvetlenül a PD-re hat. A kezeléseink hatására megfigyelt változások relevanciáját mutatja, hogy az ezen paraméterekben bekövetkezett eltérések nagyságrendje hasonló volt a korábban a kutatócsoportunk által ugyanebben a kísérletes rendszerben vizsgált koleszterinre adott válaszok nagyságához.

A TEVCF mérések arra utalnak, hogy a Cer elsődlegesen a VSD-n keresztül fejt ki hatását, a GlcCer pedig közvetlenül a PD-n keresztül, ami felveti, hogy a két lipid eltérő hatásmechanizmussal, különböző intramolekuláris célponttal befolyásolhatja a Kv1.3 kapuzását. Annak eldöntésére, hogy a Cer és a GlcCer eltérő hatásmechanizmusához hozzájárulnak-e a két lipid esetlegesen eltérő membránbiofizikai hatásai, élő CHO sejtekben

vizsgáltuk a lipidtöltéseket követő változásokat a sejtmembrán rendezettségét jellemző biofizikai paraméterekben. A kétféle ceramid komplex membránbiofizikai hatásait a lipidkettősréteg három különböző mélységi rétegében a fluiditásra, hidrációra és dipólpotenciálra gyakorolt hatások számszerűsítésével vizsgáltuk, rendre a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájának, a Laurdan generalizált polarizációjának és a di-8-ANEPPS gerjesztési arányának meghatározásával. A plazmamembránban bekövetkező változások vizsgálatához rövid festési periódusokat és gyors mérési időket alkalmaztunk a TMA-DPH-val és a Laurdan-nal végzett spektrofluorimetriás méréseknél, hogy elkerüljük a festékek internalizációját, míg a di-8-ANEPPS-sel végzett vizsgálataink során használt kvantitatív képelemzés lehetővé tette, hogy kizárólag a plazmamembrán régiójából érkező fluoreszcens jeleket vizsgáljuk és így a dipólpotenciál mértékét exkluzív módon csak ott határozzuk meg. Membránbiofizikai méréseink során kimutattuk, hogy míg mindkét lipid hasonló módon változtatja meg a membrán szerveződését a belső rétegekben, amit a membrán fluiditásának és hidrációjának csökkenése tükröz, addig a Cer drámai változásokat indukál a membrán-víz határfelületen, ami a Cer töltés hatására bekövetkező lecsökkent dipólpotenciálban nyilvánul meg. Ez utóbbi, elsőre váratlan eredmény paradox módon egy erősen rendezett helyi mikrokörnyezetre utalhat, amely az aktivációs kapuzás során a VSD átrendeződése, konformációváltozása ellen hathat ebben a határfelületi régióban.

A ceramidok K_v ioncsatornák aktivációs kapuzására kifejtett hatásainak tanulmányozása, valamint a potenciális indirekt, membránbiofizikai hatások feltárása a folyamatban biológiai jelentőséggel bír. Számos betegségben megváltozik ugyanis a membránok ceramid és glükoszilceramid szintje, ami jelentősen befolyásolhatja az ioncsatornák működését, hozzájárulva akár a kóros állapotok patomechanizmusához is. Például a ceramidok megemelkedett mennyiségét és annak patofiziológiai jelentőségét széles körben leírták a szív- és érrendszeri, valamint neurodegeneratív rendellenességekben, míg a ceramidok szintje és termelése csökken különféle tumorokban, ami hozzájárul az apoptózissal szembeni rezisztenciájukhoz. Másrészt a glükoszilceramidok kórosan felhalmozódnak Gaucher- és Parkinson-kórban, valamint emelkedett szintjük hozzájárulhat tumorokban a multidrog-rezisztencia kialakulásához. A kóros állapotokban betöltött jelentőségük mellett ezeknek a lipideknek alapvető élettani szerepet is tulajdonítanak. A ceramidok jellemzően nagyon alacsony mennyiségben találhatók a sejtmembránban, de bizonyos stressz stimulusok, így a tumor nekrozis faktor- α , ionizáló sugárzás és számos kemoterápiás gyógyszerek hatására szintjük nagymértékben megnő, ami elősegíti a sejthalál különböző formáihoz, így autofágiához, mitofágiához, apoptózishoz és az öregedéshez vezető jelátviteli mechanizmusok

beindulását. Ezzel szemben a glükoszilceramidok meglehetősen nagy mennyiségben vannak jelen a sejtmembránban és fontos elemek a lipidkettősrétegek laterális szerveződésében. Tekintettel arra, hogy a Kv csatornák gyakorlatilag az összes fent leírt kóros állapot és sejtélettani folyamat fontos szereplői, a megváltozott lipidszintek és a Kv csatornák konduktív funkcióiban megjelenő eltérések közötti kapcsolat feltárása jelentős mértékben segítheti ezen rendellenességek jobb megértését, egyben új molekuláris célpontok azonosítását és terápiás megközelítések kifejlesztését.

V./2. A Hv1 protoncsatorna gátlása csökkenti a humán THP-1-eredetű polarizált makrofágok életképességét, amelynek kulcsfontosságú lépése a pH-szenzitív savas szfingomielináz által termelt ceramidok felhalmozódása

A disszertáció második részében a Hv1 ioncsatorna gátlásának hatását vizsgáltuk polarizált humán makrofágok életképességére. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a ClGBI, a Hv1 ioncsatorna máig is a legszélesebb körben alkalmazott gátlószere, biológiailag releváns dózisokban, dóziszfüggően csökkenti a humán THP-1 sejtvonal eredetű polarizált makrofágok életképességét. Eredményeink alapján a különböző irányokba polarizált makrofágok vegyület iránti érzékenysége különbözik: az M1 sejtek bizonyultak a legérzékenyebbek, míg az M2 makrofágok a legkevésbé érzékenyek. Eredményeink arra utalnak, hogy a ClGBI elsősorban a Hv1 gátlásán keresztül váltja ki ezt a hatást, mivel i) az M0, M1 és M2 makrofágok ClGBI iránti érzékenysége erős pozitív korrelációt mutat a sejtek Hv1 expressziójának mértékével, illetve a csatornát legmagasabb mennyiségben kifejező M1 makrofágok a legérzékenyebbek a vegyület iránt; ii) más, a makrofágokban kifejeződő egyéb releváns és a ClGBI által potenciálisan szintén gátolt ioncsatornák gátlószerei nem okoznak érdemi életképesség-csökkenést; illetve iii) a Zn^{2+} , egy másik nem specifikus Hv1 inhibitor, hasonlóan befolyásolja a különbözően polarizált makrofágok életképességét, mint a ClGBI.

További kísérleteink során bizonyítottuk a ceramidok kulcsfontosságú szerepét a Hv1 gátlás által kiváltott életképesség-csökkenésben. Ezt támasztotta alá, hogy a ClGBI-re adott válaszként időfüggő emelkedést figyeltünk meg a membránban található ceramid mennyiségében. Érdekes módon már ClGBI kezelés nélkül is magasabb ceramidszinteket találtunk az M1 makrofágokban az M0 és M2 sejtekhez képest, ami a neutrális és különösen a savas szfingomielináz túlexpressziójából és aktivációjából származhat, amelyek a klasszikus M1 polarizáció tipikus jellemzői is egyben. Az eleve magasabb ceramidszint egyben fokozhatja az M1 makrofágok ceramid-túltermelésre való hajlamát is és így hozzájárulhat e sejtek Hv1 gátlószerek által kiváltott életképesség-csökkenéssel szembeni nagyobb érzékenységéhez. Ezen

túlmenően, hogy egyértelműen bizonyítsuk a ceramidszint emelkedésének okozati szerepét a folyamatban, megvizsgáltuk a ceramidot termelő enzimek potenciális hozzájárulását specifikus inhibitorok segítségével. Ehhez a szerin-palmitoiltranszferázt myriocinnal, a neutrális szfingomielináz GW4869-cel, a savas szfingomielináz pedig ARC39-cel gátoltuk. A vizsgált inhibitorok közül az ARC39 jelentős védelmet nyújtott a CIGBI által kiváltott sejthalállal szemben, 50-70%-kal csökkentette ugyanis a Hv1 gátló által indukált toxicitást, valamint a ceramid felhalmozódását a plazmamembránban, főként az M1 sejtekben. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy polarizált makrofágokban a Hv1 gátlása polarizációfüggő módon a sejtek életképességének csökkenéséhez vezet, amelyben kulcsfontosságú szerepet kaphatnak a pH-érzékeny savas szfingomielináz aktivitásának hatására a sejtekben felhalmozódó, majd sejthalált indukáló ceramidok.

Tekintettel arra, hogy a Hv1 gátlása terápiás potenciállal bírhat különböző humán patológiás állapotokban, így neuroinflammatorikus és daganatos betegségekben, a különböző útvonalon polarizált makrofágok életképességére gyakorolt hatások felderítése döntő fontosságú a csatorna gátlószereinek mind terápiás, mind pedig lehetséges mellékhatásai szempontjából. A Hv1 gátlószerek alkalmazása nagyon ígéretesnek tűnik a neuroinflammatorikus folyamatokkal összefüggő patológiás állapotokban. A mikrogliaokban a Hv1 által közvetített protonkiáramlás alapvető fontosságú a ROS-t termelő NADPH-oxidáz töltésáramlással járó aktivitásából eredő acidózis ellensúlyozásához. Ennélfogva a Hv1-mediált protonkiáramlás lehetővé teszi a fokozott ROS-termelés fenntartását, amely döntő szerepet játszik a neuroinflammatorikus folyamatokban és az ebből következő neuronpusztulásban is. Ennek megfelelően egér betegségmodellekben a Hv1 funkcionális hiánya csökkentette a neuronok elhalását, az agykárosodást és a motoros deficitet iszkémiás sztrókban, az agyi artériák szűkülete által kiváltott fehérállomány-károsodást és a demielinizációt szklerózis multiplex modellekben, valamint a neuronális apoptózist és fájdalom iránti túlérzékenységet traumás agy- és gerincvelő-sérülés modellekben. Figyelembe véve a mikroglia sejtek és a makrofágok közötti funkcionális hasonlóságokat, a Hv1 gátlása által kiváltott életképesség-csökkenés kísérleteink során felderített molekuláris mechanizmusa a fent leírt kedvező hatásokhoz is hozzájárulhat. A jövőben azonban a Hv1 blokkolók fenti indikációkban történő alkalmazásakor figyelembe kell venni azok makrofágok funkcióira gyakorolt lehetséges káros hatásait is. A rosszindulatú tumorok a betegségek egy másik olyan csoportját alkotják, amelyben a Hv1 gátlók potenciálisan kedvezően használhatók lehetnek. A gyorsan proliferáló daganatos sejtek általában enyhén depolarizáltak és acidotikusak a gyakran Warburg-effektusnak nevezett jellegzetes metabolikus eltolódás miatt. Ráadásul ezek a sejtek jellemzően

fokozott mennyiségben fejezik ki a Hv1 csatornát, ami rendkívül előnyös, ugyanis hatékony módot biztosít a protonok sejtplazmából történő eltávolítására. Ez a mechanizmus így védelmet nyújt az intracelluláris acidózissal szemben és egyben savas extracelluláris mikrokörnyezetet hoz létre, amely kedvez az extracelluláris mátrix lebontásának, megkönnyítve az inváziót és hozzájárul az immunrendszeri aktiváció elkerüléséhez is. A Hv1 túlexpressziója következetesen összefügg a betegség súlyosságával és rossz prognózisával különféle daganatokban, így emlőrákban és kolorektális karcinómában. Ezzel összhangban a csatorna farmakológiai gátlása *in vitro* kísérletekben csökkentette a tumoros sejtek életképességét és migrációját. Eredményeink szerint ugyanakkor a Hv1 gátlása a polarizált makrofágok, elsősorban a tipikusan tumorellenes aktivitással rendelkező M1 sejtek életképességét is csökkentheti és ezáltal kedvezhet az M2-szerű tumorasszociált makrofágok domináns intratumorális megjelenésének, ami az M1-M2 egyensúly felborulását eredményezi és hozzájárulhat a daganatos sejtek immunrendszerrel szembeni védekezéséhez. Ezeket a lehetséges hatásokat a jövőben tanulmányozni szükséges, ezen vizsgálatok ugyanis rámutathatnak arra, hogy a Hv1 gátlószerek alkalmazásához személyre szabott, szelektív, tumorsejteket célzó megközelítésre van szükség.

VI. Új megállapítások, új eredmények

1. Kételektrodás voltage-clamp fluorimetria technikával (TEVCF) kimutattuk, hogy mind a sejtek exogén C16-ceramid (Cer), mind pedig a C16-glükoszilceramid (GlcCer) töltése a pozitívabb membránpotenciál értékek irányába tolja el a *Xenopus laevis* oocitákban expresszáltatott Kv1.3 ioncsatorna egyensúlyi aktivációját jellemző konduktancia-feszültség (G-V) görbét, lassítja az ionáram aktivációs kinetikáját, és csökkenti az ionáram amplitúdóját. Ezáltal a két lipid hasonló, összességében gátló jellegű hatást fejt ki a csatorna aktivációs kapuzására.
2. Eredményeink alapján a Cer hatását a feszültség-szenzor doménen (VSD-n) keresztül fejt ki, amit a TEVCF mérések során mért fluoreszcens jel egyensúlyi aktivációját jellemző fluoreszcencia intenzitás-feszültség (F-V) görbék G-V görbékkel párhuzamos jobbra tolódása és a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájának lassulása mutat.
3. Ezzel szemben a GlcCer nem változtatja meg a fluoreszcens jel ezen paramétereit, ezáltal elsődlegesen közvetlenül a pórusdoménen (PD-n) keresztül fejt ki hatását anélkül, hogy a VSD mozgását módosítaná.
4. Lokális környezeti paraméterekre szenzitív próbák és fluoreszcencia alapú módszerek segítségével kínai hörcsög ovárium sejtvonalon kimutattuk, hogy bár mindkét lipid hasonló módon és mértékben fokozza a membrán rendezettségét a mélyebb rétegekben, a Cer képes olyan robosztus szerkezeti átrendeződést indukálni a membrán-víz határfelületen, amely gátolhatja a VSD mozgását a csatorna aktivációja során, magyarázva a két lipid eltérő ioncsatornán belüli támadáspontját.
5. Kimutattuk, hogy a Hv1 ioncsatornát gátló 5-kloro-2-guanidinbenzimidazol (ClGBI) dózis- és polarizációfüggően csökkenti a humán THP-1 sejtvonal eredetű makrofágok életképességét. Áramlási citometriával nyert eredményeink alapján a klasszikus útvonalon polarizált M1 sejtek bizonyultak a legérzékenyebbnak, míg az M2 makrofágok a legkevésbé érzékenyek a vegyület iránt.
6. Azt találtuk, hogy a ClGBI ezen hatását a Hv1 gátlásán keresztül fejt ki, mivel a sejtek életképességének csökkenése jól korrelál azok Hv1 expressziójának mértékével, továbbá más, makrofágokban jelen levő ioncsatornákat gátló szelektív inhibitorok nem okoznak érdemi életképesség-csökkenést.
7. A ClGBI életképességet csökkentő hatásában kulcsfontosságú a sejtmembránban a ceramid felhalmozódása, ugyanis a vegyület hatására nemcsak megnő annak

mennyisége, hanem a citotoxikus hatása is jelentősen mérsékelhető a ceramidszintetizáló savas szfingomielináz enzim egyidejű gátlásával.

VII. Összefoglalás

A feszültségkapuzott ioncsatornák és a lipidek közötti kapcsolat kétirányú. Egyrészt transzmembrán fehérjék révén az aktivációs kapuzás során az ioncsatornában végbemenő nagy szerkezeti átrendeződéseket a sejtmembrán lipidjei képesek befolyásolni. Másrészt az ioncsatornák számos sejtleletani folyamatot modulálnak, ezáltal közvetve a sejt lipidszintjeit is képesek finomhangolni. Bár a ceramidok igen fontos élettani és kórélettani szereppel bírnak, feszültségkapuzott ioncsatornákkal fennálló potenciális kapcsolataikat korábban részletesen nem tanulmányozták.

A disszertáció első felében azt vizsgáltuk, hogy a C16-ceramid (Cer) és C16-glükoszilceramid (GlcCer) hogyan befolyásolja a Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kapuzását. Kételektródás voltage-clamp fluorimetria segítségével azt találtuk, hogy a sejtek exogén töltését követően mindkét lipid hasonló, gátló jellegű hatásokat fejt ki a csatorna pórusdoménjét (PD) jellemző paraméterekre, míg a feszültségszenzor domén (VSD) mozgására csak a Cer van hasonló hatással. Ez a két lipid ioncsatornán belüli eltérő támadáspontjára utal, a Cer ugyanis elsődlegesen a VSD-t, míg a GlcCer a PD-t targetálja. Lokális környezeti paraméterekre szenzitív próbák és fluoreszcencia alapú módszerek segítségével kimutattuk, hogy míg a Cer és a GlcCer hasonlóan növeli a molekuláris rendezettséget a lipidkettősréteg belső, hidrofób régióiban, addig a Cer egyedülálló módon erőteljes molekuláris átrendeződést indukál a membrán-víz határfelületen, ahol a depolarizáció során a VSD-ben található, pozitívan töltött aminosavakat tartalmazó S4 szegmentumnak a membrán síkjából kifelé történő elmozdulása történik. Ez az eltérő membránbiofizikai hatás magyarázhatja a Cer GlcCer-től különböző, elsődlegesen VSD-t targetáló hatásmechanizmusát.

A disszertáció második felében arra mutattunk rá áramlási citometria segítségével, hogy a legszélesebb körben alkalmazott Hv1 protoncsatorna gátlószer, az 5-klór-2-guanidinobenzimidazol (ClGBI) biológiailag releváns dózisokban csökkenti a human THP-1-eredetű polarizált makrofágok életképességét, oly módon, hogy az M1-makrofágok a legérzékenyebbek, az M2-sejtek pedig a legkevésbé érzékenyek erre a vegyületre. A ClGBI Hv1 gátláson keresztüli specifikus hatásait jelzi, hogy a polarizált makrofágok érzékenysége jól korrelál a sejtek Hv1 expressziós szintjével, valamint más, makrofágokon releváns ioncsatorna gátlószerrel közül egyedül egy másik Hv1 gátló, a Zn^{2+} fejtett ki hasonló hatásokat. Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy a csatorna gátlása elsősorban a pH-érzékeny savas szfingomielináz működésén keresztül a ceramidok túlzott termelődéséhez vezet, ami végül sejthalált indukál.

VIII. Publikációk



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/234/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Cs. Szabó Bence
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10098535

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, T., **Cs. Szabó, B.**, Kothalawala, R. C., Székelyhidi, V., Nagy, P., Varga, Z., Panyi, G., Zákány, F.: Inhibition of the HV1 voltage-gated proton channel compromises the viability of human polarized macrophages in a polarization- and ceramide-dependent manner.
Front. Immunol. 15, 1-18, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1487578>
IF: 5.9
2. **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





**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

További közlemények

3. 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)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,9

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

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

Debrecen, 2026.04.27.

