

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Feszültségkapuzott ioncsatornák és ceramidok kapcsolatának vizsgálata

Dr. Cs. Szabó Bence

Témavezető: Dr. Zákány Florina



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
I. BEVEZETÉS	8
I./1. Általános bevezetés	8
I./2. A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna szerkezete, kapuzása és élettani szerepe ..	9
I./3. A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna gátlószerei, a gátlás terápiás jelentősége	11
I./4. A Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna szerkezete, kapuzása és élettani szerepe	15
I./5. A makrofágokról általában, a Hv1 ioncsatorna szerepe makrofágokban.....	18
I./6. A Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna gátlószerei, a gátlás terápiás jelentősége....	20
I./7. A főbb membránbiofizikai paraméterek, mérésük és biológiai jelentőségük bemutatása	24
I./8. A ceramidok membránbiofizikai jellegzetességei.....	26
I./9. A ceramidok feszültségkapuzott káliumcsatornákra kifejtett elektrofiziológiai hatása	28
I./10. Lipidek hatásmechanizmusának vizsgálata: a lipidek ioncsatornákon belüli támadáspontjának meghatározása kételektródás voltage-clamp fluorimetriával	28
I./11. Lipidek hatásmechanizmusának vizsgálata: A direkt és indirekt lipidhatások	29
I./12. A ceramidok szintézise, patofiziológiai jelentősége, szerepük a sejthalál során	30
II. CÉLKITŰZÉSEK	35
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	38
III./1. Ceramidok elektrofiziológiai és membránbiofizikai hatásainak tanulmányozására alkalmazott sejtek, expressziós rendszerek, molekuláris biológia	38
III./2. A sejtmembrán ceramid és glükoszilceramid töltése	38
III./3. Kételektródás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF).....	39
III./4. A TEVCF adatok elemzése	40
III./5. A sejtmembrán fluiditásának és hidrációjának vizsgálata.....	41
III./6. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása	42
III./7. A sejtmembránban található ceramid és glükoszilceramid mennyiségének vizsgálata	43
III./8. A ceramid és glükoszilceramid kezelések CHO sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával	43
III./9. THP-1 sejtek tenyésztése, differenciációja és a makrofágok polarizációja	44
III./10. A CD markerek plazmamembrán-expressziójának elemzése polarizált makrofágokban	44

III./11. Ioncsatorna gátlószerek polarizált makrofágok életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával.....	45
III./12. A Hv1 expresszió meghatározása polarizált makrofágokban.....	46
III./13. A ClGBI polarizált makrofágok plazmamembránban található ceramid szintjére gyakorolt időfüggő hatásának elemzése	46
III./14. Statisztikai elemzés	47
IV. EREDMÉNYEK	48
IV./1. A Cer és a GlcCer hatása a Kv1.3 ioncsatorna pórusdoménjének és feszültség-szenzor doménjének egyensúlyi aktivációjára.....	48
IV./2. A Cer és a GlcCer hatása az ionáram és a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájára...	50
IV./3. A Cer és a GlcCer hatása a Kv1.3 áramamplitúdójára.....	52
IV./4. A Cer és GlcCer hatása a membrán fluiditására és hidrációjára	53
IV./5. A Cer és a GlcCer hatása a membrán dipólpotenciáljára.....	56
IV./6. A Cer és a GlcCer kezelések hatása a CHO sejtek életképességére	58
IV./7. A Cer és a GlcCer kezelések hatása a CHO sejtek plazmamembránjában található ceramidok mennyiségére	59
IV./8. THP-1-eredetű polarizált makrofágok létrehozása és validálása	61
IV./9. A Hv1 inhibitor ClGBI dózis- és polarizációfüggően csökkenti a polarizált makrofágok életképességét.....	63
IV./10. A ClGBI a Hv1 ioncsatorna gátlásán keresztül csökkenti a polarizált makrofágok életképességét	66
IV./11. A ClGBI által kiváltott életképesség-csökkenés a plazmamembrán ceramid szintjének időfüggő emelkedésével jár együtt.....	69
IV./12. A ClGBI által kiváltott sejtéletképesség-csökkenést mérsékli a savas szfingomielináz enzim egyidejű gátlása	71
V. DISZKUSSZIÓ.....	74
V./1. A membránbeli C16-ceramid és C16-glükoszilceramid hasonló elektrofiziológiai hatásokat fejt ki a Kv1.3 ioncsatornára annak ellenére, hogy az intramolekuláris támadáspontjuk valószínűleg különbözik.....	74
V./2. A C16-ceramid és C16-glükoszilceramid eltérő membránbiofizikai tulajdonságai magyarázhatják azok Kv1.3 ioncsatornán belüli eltérő támadáspontját.....	75
V./3. A kísérletek során alkalmazott ceramid-töltési protokollok alkalmazásának okai	77
V./4. Kísérleteink egyik fő limitációja a direkt kölcsönhatások vizsgálatának hiánya	80

V./5. A C16-ceramid és C16-glükozilceramid Kv1.3 ioncsatorna kapuzására kifejtett hatásainak lehetséges modellje	81
V./6. A Hv1 protoncsatorna gátlása csökkenti a humán THP-1-eredetű polarizált makrofágok életképességét.....	82
V./7. A kísérleteink során alkalmazott THP-1-alapú polarizált makrofágmodell előnyei ...	84
V./8. A ClGB1 a Hv1 protoncsatorna gátlásán keresztül fejt ki az életképességet csökkentő hatását	86
V./9. A Hv1 gátlása révén létrejövő életképesség-csökkenés kulcsfontosságú lépése a pH-szenzitív enzimek által szintetizált ceramidok felhalmozódása	87
V./10. Általános összefoglalás, eredményeink biológiai relevanciája	87
VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	92
VII. SUMMARY	93
VIII. REFERENCIÁK.....	94
IX. TÁRGYSZAVAK.....	116
X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	117
XI. FÜGGELÉK.....	118

Rövidítések jegyzéke

AGAP: antitumor analgézias peptid

α -KTx: alfa-káliumcsatorna toxin

ARC39: (1-aminooktán-1,1-diil)bisz(foszfonsav)

ASM: savas szfingomielináz

BK: nagy konduktanciájú káliumcsatorna

C6: Corza6

CBE: konduritol-B-epoxid

Cer: C16-ceramid

CHO: kínai hörcsög ovárium sejtvonal

ClGBI: 5-kloro-2-guanidinbenzimidazol

cryo-EM: krio-elektronmikroszkópia

di-8-ANEPPS: 1-(3-szulfonatopropil)-4-[β [2-(di-n-oktilamino)-6-naftil]vinil]piridinium betain

ErbB: a madár-eritroblasztózis vírus erbB onkogénje

E_{rev} : egyensúlyi potenciál

$\Delta F/F$: fluoreszcens jel nagyságának relatív változása az adott tartófeszültségen mérhető fluoreszcencia alapvonalához viszonyítva

F_{norm} -V: normált fluoreszcencia intenzitás-feszültség görbe

GBA1: β -glükocerebrozidáz

2GBI: 2-guanidinbenzimidazol

GlcCer: C16-glükozilceramid

G_{max} : maximális konduktancia

G_{norm} : normált konduktancia

GM-CSF: granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor

GP: generalizált polarizáció

G_{norm} -V: normált konduktancia-feszültség görbe

GW4869: N,N'-Bisz[4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-3,3'-p-fenilén-bisz-akrilamid dihidroklorid

HaTx: Hanatoxin

HIF: 3-(2-amino-5-metil-1H-imidazol-4-il)-1-(3,5-difluorofenil)-propán-1-on

Hv1: feszültségkapuzott protoncsatorna

IC₅₀: félmaximális gátló koncentráció
IFN- γ : interferon-gamma
IL: interleukin
I-V: áramerősség-feszültség görbe
k: meredekségi együttható
K_v: feszültségkapuzott káliumcsatorna
Laurdan: 6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin
LPS: bakteriális lipopoliszacharid
M0 makrofág: nyugalmi állapotban levő differenciált makrofág
M1 makrofág: klasszikus útvonalon polarizált makrofág
M2 makrofág: alternatív útvonalon polarizált makrofág
NMR: magmágneses rezonancia
NSM: neutrális szfingomielináz
PAP-1: 5-4-fenoxibutoxi-pszoralén
PD: pórusdomén
PDB kód: Protein Data Bank kód
PMA: forbol-12-mirisztát 13-acetát
Psora-4: 5-4-fenilbutoxi-pszoralén
PP: protein foszfatáz
r: fluoreszcencia anizotrópia
R_{exc458/514}: 458 és 514 nm-en történő gerjesztést követően mért emissziók hányadosa
ROS: reaktív oxigéngyök
ShK-186: dalazatid
SPT: szerin-palmitoiltranszferáz
STAT: „Signal Transducer and Activator of Transcription” transzkripció faktorcsalád
 τ_{akt} : aktivációs időállandó
 $\tau_{akt,f}$: a fluoreszcens jel gyors komponensének aktivációs időállandója
 $\tau_{akt,s}$: a fluoreszcens jel lassú komponensének aktivációs időállandója
TAMRA-MTS: 2-((5(6)-tetrametil-rodamin)karboxi-amino)-etil-metántioszulfonát
TEA⁺: tetraetilammónium

T_{EM}: effektor memória T-limfocita

TEVCF: „two-electrode voltage-clamp fluorometry” kételektrodás voltage-clamp fluorimetria

T_{h1}: 1-es típusú segítő limfocita

T_{h2}: 2-es típusú segítő limfocita

THP-1: humán monocita eredetű sejtvonal

TMA-DPH: 4'-(trimetil-ammonio)-difenil-hexatrién

TNF- α : tumor nekrosis faktor-alfa

TTX: tetrodotoxin

YHV98-4: N-(4-klorofenil-2-(3-oxo-3,4-dihidro-benzotiazin-2-acetamid)

V_{1/2}: félaktivációs feszültség

Vm24: *Vaejovis mexicanus smithi* skorpió toxinja, a Kv1.3 szelektív gátlószere

VDAC: feszültségkapuzott anioncsatorna

VRAC: térfogatszabályozott anioncsatorna

VSD: feszültség szenzor domén

I. BEVEZETÉS

I./1. Általános bevezetés

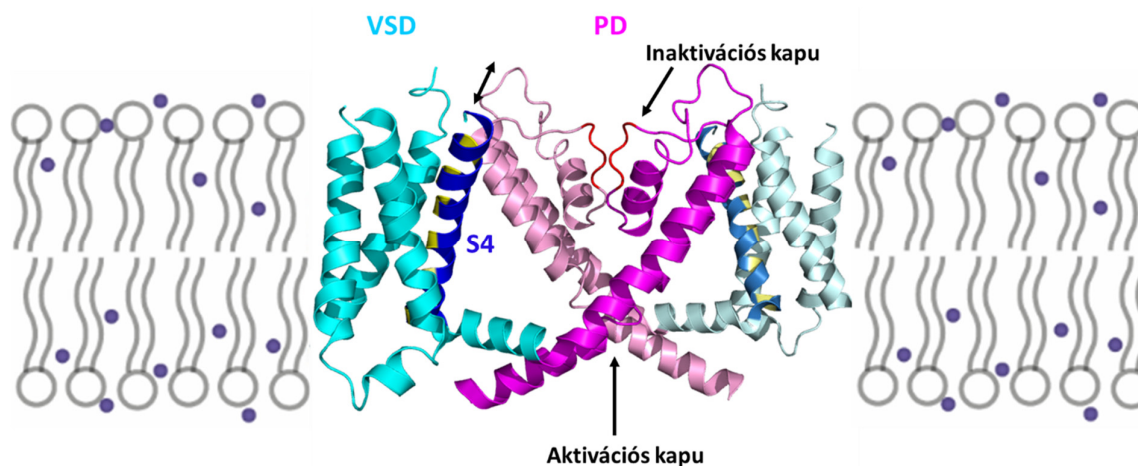
Az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, ezáltal a csatornák ionáramot vezető, illetve nem-vezető állapotai közötti kapuzási átmenetek a környező lipidkettősréteg kooperativitásával a csatornában létrejövő komplex konformációváltozások révén következnek be. A sejtmembránban található lipidek ezeket az intramolekuláris átrendeződéseket és ezáltal az ioncsatornák működését számos direkt (azaz közvetlen ligand - receptorszerű lipid - fehérje kölcsönhatás) és indirekt kölcsönhatás (azaz a sejtmembrán biofizikai tulajdonságainak megváltozása) révén befolyásolhatják (1, 2). Ilyen elektrofiziológiai hatásokat és azok lehetséges hatásmechanizmusait már széles körben dokumentálták számos membránban található lipid esetében. Például a koleszterin (2, 3), foszfinozidok (4-7) és a többszörösen telítetlen zsírsavak (8, 9) is jelentős hatással vannak a feszültségkapuzott káliumcsatornák (Kv) működésére, amelyek háttérben mind direkt kölcsönhatásokat, mind indirekt membránbiofizikai tényezők által mediált változásokat valószínűsítettek a lipidek által kiváltott komplex hatások mögött. Ezzel szemben az, hogy a membránban található ceramidok és glükoszilceramidok hogyan és milyen mechanizmussal képesek ugyanezen ioncsatornák aktivitását befolyásolni, jórészt ismeretlen, annak ellenére, hogy emelkedett szintjük számos betegség patomechanizmusához szorosan kapcsolódik. Ceramidok és glükoszilceramidok emelkedett szintjének patognomikus relevanciáját felvetették többek között lizoszomális tárolási betegségeknél (10, 11), továbbá neurodegeneratív (12) és különböző metabolikus betegségeken egyaránt (13, 14).

Az ioncsatornák számos sejtlejtani folyamat szabályozásában részt vesznek, ezek közül kiemelkedő a feszültségkapuzott protoncsatorna (Hv1) szerepe a sejtek intracelluláris pH egyensúlyának szabályozása szempontjából. Több sejttypusban is felvetették (15-19), hogy a Hv1 ioncsatorna gátlószerei a sejtek életképességét csökkenthetik, ami ezen gátlószerek akár terápiás, akár mellékhatásai 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 Hv1 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. A fentieknek megfelelően a disszertációban célunk volt ezen két kérdéskör részletes vizsgálata annak érdekében, hogy jobban megértsük a feszültségkapuzott ioncsatornák és a ceramidok komplex kölcsönhatását.

I./2. A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna szerkezete, kapuzása és élettani szerepe

A Kv1.3 ioncsatorna szerkezetében és működésében a feszültségkapuzott káliumcsatornák szupercsaládjának egyik prototípusa (20). A Kv1.3, a többi Kv csatornához hasonlóan, négy alfa alegységből épül fel, amelyeket nemkovalens kötések tartanak össze. Az egyes alfa alegységek mindegyike hat transzmembrán helikális szegmentumot (S1-S6) tartalmaz, amelyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnek össze egymással (**1. ábra**). Az S1-S4 hélixek és a köztük levő intra- és extracelluláris hurkok alkotják a csatorna feszültségszenzor doménjét (VSD), míg az S5-S6 hélixek és az azokat összekötő hurok a pórusdomént (PD). A PD több, az ioncsatorna működése szempontjából kulcsfontosságú szerkezeti elemet tartalmaz. Az S5-S6 hélixet összekötő hurokszekvencia tartalmazza a csatorna káliumionok iránti szelektivitásáért felelős szelektivitási szűrőt. A szelektivitási szűrőben elhelyezkedő kitüntetett aminosavak összessége, amelyeket szokás „signature” szekvenciának is hívni, felelős a csatorna nagymértékű káliumszelektivitásáért más kationokkal, köztük a káliumnál kisebb méretű nátriumionokkal szemben. A Kv1.3 esetében a szelektivitási szűrőt a G446, Y447, G448, D449 aminosavak alkotják (21, 22). A csatorna működése szempontjából kulcsfontosságú szerkezeti elem a csatorna aktivációs és inaktivációs kapuja. Az aktivációs kapu a pórus intracelluláris szájadéka felől helyezkedik el és az S6 szegmentumok kereszteződése alakítja azt ki. Az úgynevezett C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapu a pórus extracelluláris szájadékánál található, részben átfedően a szelektivitási szűrővel, a Y447, G448, D449 és W436 aminosavak kiemelt szerepet kapnak a kialakításában (22). A VSD-ben központi szerepet kap az S4 hélix a benne levő pozitív töltésű aminosavai révén, amelyek a membránpotenciál érzékelésében és az ioncsatorna aktivációs kapuzásában kulcsfontosságúak. Az S1-S3 hélixeknek a bennük található negatív töltésű aminosavak révén fontos stabilizáló szerepük van a kapuzás során az S4 hélixek mozgásának biztosításában (23). A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kapuzása során a sejtmembrán depolarizációjának hatására a VSD S4 hélice a pozitív töltésű aminosavaknak (R364, R367, R370, R373, K376 és R379) 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, ezáltal a csatorna funkcionálisan vezető állapotba kerül (24-26). A hosszan tartó depolarizáció során a csatorna inaktivációs kapuja záródik a pórus extracelluláris szájadékánál, így létrehozva a csatorna ionáramot nem vezető, inaktivált állapotát (22, 24, 27, 28). A legújabb tanulmányok alapján az inaktivációs kapu nem klasszikus módon záródik, ezáltal nem fizikális gátként zárja el a

káliumionok útját, hanem ezzel szemben kitágul, így megbontva a káliumionok koordinálására alkalmas sztérikus egyensúlyt a szelektivitási szűrő extracelluláris szájadéknál (21).



1. ábra: A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna szerkezete.

A tetramer szerkezetű humán Kv1.3 ioncsatorna egyes alegységeit hat transzmembrán hélix (S1-S6) alakítja ki, a krio-elektronmikroszkópos (krio-EM) szerkezet alapján meghatározott két, egymással szemben fekvő alegységet oldalnézetből ábrázoltuk (Protein Data Bank kód (PDB): 7EJ1 (20)). A funkcionálisan jól megkülönböztethető feszültségszenzor domént (VSD) alkotó S1-S4 héliceket az alegységeken kék színnel, míg a pórusdomént (PD) alkotó S5-S6 héliceket lila színnel ábrázoltuk. A VSD S4 hélicei sötétkékekkel vannak kiemelve, benne a pozitív töltésű aminosavakat sárga színnel jelöltük. A pórusban a szelektivitási szűrőt alkotó aminosavakat pirossal jelöltük. Az aktivációs kaput az S6 hélixek C-terminális kereszteződése alakítja ki, a C-típusú inaktivációs kapu a pórus extracelluláris szájadéknál, a szelektivitási szűrő közelében található. Depolarizáció során a membrán intracelluláris oldalán felhalmozódó pozitív töltések hatására az S4 hélixek kifelé mozognak a membrán síkjából (fekete nyíl), amely konformációváltozás áttevődve a PD intracelluláris bejáratánál lévő aktivációs kapura a csatorna nyitásához vezet. Ezek az események a környező sejtmembrán közreműködésével és kooperativitásával következnek be. Ezáltal a sejtmembrán elsősorban lipidösszetétele által meghatározott molekuláris szerveződése közvetett, indirekt módon befolyásolhatja ezeket az átmeneteket, amiket a dolgozatban is vizsgálunk. Az ioncsatorna membránba való beágyazódását, annak mértékét, a Kv1.2-Kv2.1 lipid nanodiszkben meghatározott elektronmikroszkópos szerkezete alapján vázoltuk fel hozzávetőlegesen (PDB: 6EBK (22)). Az ábra ioncsatornát ábrázoló részét a PyMol programmal készítettük.

A Kv1.3 ioncsatorna élettani szerepét több sejttípusban leírták. Az ioncsatornát eredetileg a T-limfocitákban azonosították, amelyekben döntő szerepet játszik a sejtek aktiválódásának és differenciálódásának szabályozásában. A T-limfocitákban az antigént prezentáló sejtek által történő aktiválás során a plazmamembránban lokalizálódó Kv1.3 kiemelt jelentőségű a kalciumjel kialakításában azáltal, hogy a rajta keresztül végbemenő káliumkiáramlás biztosítja a megfelelő hajtóerőt a kalcium citoszólba történő beáramlásának. Amennyiben a Kv1.3 ioncsatornán keresztüli ionáramot legátoljuk, megfelelő kalciumjel hiányában a sejtek aktivációja is elmarad, ami a sejtek csökkent citokintermelésében is megmutatkozik, ez az alapja számos, lentebb bemutatott, szelektív Kv1.3 ioncsatorna gátlószer terápiás alkalmazásának is (29-32). A Kv1.3 más immunsejtekben is expresszálódik, beleértve a B-limfocitákat, a dendritikus sejteket, a makrofágokat, valamint a mikrogliaikat, ahol szintén fontos szabályzója a sejtek proliferációjának, migrációjának és citokintermelésének (31, 33).

Neuronokban fontos szerepet kap az idegsejtek nyugalmi membránpotenciáljának fenntartásában és az akciós potenciál finomhangolásában (34). A belső mitokondriális membránban lokalizálódó Kv1.3 ioncsatorna a mitokondriális membránpotenciál kialakításában, a reaktív oxigéngyökök (ROS) termelésében és az apoptózis szabályozásában játszik kulcsfontosságú élettani szerepet (35, 36).

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

A Kv1.3 ioncsatorna farmakológiai gátlószerei két nagy csoportját alkotják a kismolekulájú, illetve a peptidtípusú gátlószerek. Mivel biológiai és kórélettani jelentősége miatt a Kv1.3 az egyik legnépszerűbb terápiás célpont a Kv1 szupercsaládban, számos szelektív gátlószert írtak le és tanulmányozták mind *in vitro*, mind *in vivo* állatkísérletekben, illetve egyes molekulák humán klinikai kísérletekben is szerepelnek. Az intenzív és sikeres preklinikai kísérletek ellenére még egyik gátlószert sem alkalmazzák a mindennapi betegellátásban. A dolgozatban a legjelentősebb, szelektív Kv1.3 gátlószerek bemutatására szorítkozunk (**2. ábra**).

A kismolekulájú gátlószerek közül a legjelentősebb csoport a pszoraléneké. A pszoralének a népi gyógyászatból kerültek a kutatások célkeresztjébe, miután ismert volt, hogy a dél-amerikai indiánok által kedvelt tea, amit a kerti ruta (*Ruta graveolens*) nevű növényből főznek, kedvező hatással van a sclerosis multiplex tüneteire (37, 38). A növény kivonatainak aktív hatóanyagáról, az 5-metoxipszoralénról kimutatták, hogy hatékonyan blokkolja *in vitro* kísérletekben T-limfocitákon a Kv1.3 ionáramot (37), ami megalapozta azt az ötletet, hogy a pszoralének további módosított verziói segítségével szelektív és hatékony gátlószerek fejleszthetők. Így hozták létre először a Psora-4-et (5-4-fenilbutoxi-pszoralén), ami az alapvegyülettől eltérően a hidroxipszoralén gyűrű 5-ös pozíciójában egy négy darab metilencsoportból álló linkert tartalmaz. A Psora-4 kétféle típusú kötőhellyel is rendelkezik a csatornán belül. Egyrészt a molekula képes a csatorna központi üregébe kötődni, fizikailag eltömítve a pórust, míg további molekulák kooperatív módon képesek a pórus egy vagy több oldalsó zsebébe is bekötődni, ami egy inaktivációszerű molekuláris átrendeződést indukálva tovább képes gátolni az ionáramot. Kimutatták, hogy először a centrális kötőhely telítődik, majd ezt követően az oldalsó zsebek, amelyeket az S5-S6 hélixek VSD felé tekintő aminosavai, illetve az S4-S5 linker aminosavai együttesen formálnak. A kétféle kötőhely kooperatív, egyidejű telítése a csatorna igen stabil, szelektív, nagy affinitású, használatfüggő gátlását teszi lehetővé (39, 40). A klinikai vizsgálatokban is alkalmazott leghatékonyabb pszoralén a PAP-1 (5-4-fenoxibutoxi-pszoralén). A gátlószert igen nagy affinitású, mintegy 2 nM-os félmaximális gátló koncentráció (IC₅₀) értékkel, valamint a többi Kv1 ioncsatornához viszonyítva 33-125-

szőrös Kv1.3 iránti szelektivitással bír (37, 41). Kettő vagy több kumaringyűrű hat kölcsön a központi üregben a káliumkötőhelyeken levő káliumionokkal, míg a molekula oldalláncai benyúlva az oldalsó zsebekbe stabilizálódnak (39, 40, 42). A PAP-1-et 2013-ban elindították egy 1-es fázisú klinikai vizsgálatban psoriázisos betegekben lokálisan alkalmazva (43). Ebben a tanulmányban végül placebo kontrollhoz viszonyítva nem bizonyult hatásosabbnak, aminek okai között szerepelhet, hogy az anyag nem volt képes elég mélyre hatolni a psoriázisos bőrben, illetve igen rövid ideig (12 nap) és igen kis bőrfelületen (1 cm²) tesztelték csak.

A gátlószerek másik nagy típusát alkotják a peptidtípusú gátlószerek. Ezek előnye a kismolekulájú gátlószerekkel szemben, hogy nagyobb felületen kötődnek a csatornához, ami révén növelhető a más Kv1 csatornákkal szembeni Kv1.3 szelektivitás, továbbá kevésbé kitétek a vesék általi kiválasztásnak, és a kismolekulákkal szemben lebontásuk során nem képződnek belőlük toxikus metabolitok (44). A peptidtípusú gátlószerekben közös, hogy extracellulárisan kötődnek a csatornához, mivel kémiai természetüknél fogva nem képesek átjutni a sejtmembránon. A fejezet végén bemutatott MrVIII nevű póktoxin kivételével, ami a csatorna VSD-jéhez kötődik, mindegyik peptid a csatorna PD-jéhez kötődik, ami révén fizikai akadályt képezve mintegy „eltömítik” a pórust, ezáltal gátolják a káliumáramot. A legjelentősebb két Kv1.3-at gátló toxin, a dalazatid (ShK-186), illetve a Vm24 az alfa-káliumcsatorna toxin (α -KTx) toxincsaládba tartoznak. A csoport tagjaiban közös, hogy típusosan 23-42 aminosavból épülnek fel, sajátos $\alpha\beta$ -redő szerkezettel rendelkeznek, amelyet típusosan 3-4 diszulfid híd stabilizál. A gátlás szempontjából kulcsfontosságú elem bennük az úgynevezett ’funkcionális diád’, amelyet típusosan egy pozitívan töltött lizin, illetve egy aromás fenilalanin vagy triptofán alkot. Ezek az aminosavak a pórusba benyúlva mintegy eltömítik azt, kialakítva az ionáram gátlását (38, 43).

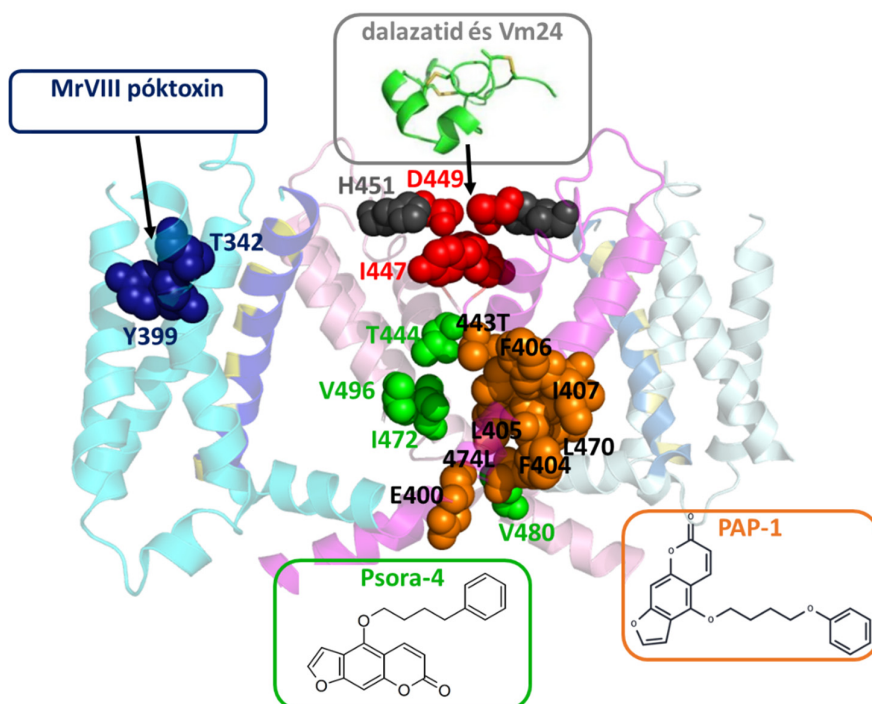
A dalazatid (ShK-186) egy 37 aminosavból álló peptidszármazék, amelynek eredeti formáját a *Stichodactyla helianthus* tengeri rózsából izolálták. Az eredeti toxinhoz képest több ponton módosították, aminek köszönhetően a Kv1.3-hoz szerkezetileg igen hasonló, főleg neuronokban kifejeződő Kv1.1 csatornához képest mintegy ezerszeres szelektivitásbeli növekedést értek el, a vegyület a Kv1.3 ioncsatorna pikomólos affinitású gátlószere (IC₅₀ = 69 pM) (45-47). A kötés során a toxin K22-es pozícióban levő pozitívan töltött lizinje a Kv1.3 szelektivitási szűrőjében levő Y447 tirozinjával hat kölcsön, mintegy helyettesítve a szelektivitási szűrőben a káliumiont. A stabil kötődés szempontjából kiemelten fontos a toxin R24-es argininje, ami a csatorna D449 és H451-es aminosavaihoz kötődik (22). Fázis Ib klinikai vizsgálatban először psoriázisos betegcsoporton mutatták ki szubkután injekcióban alkalmazva hatékonyságát és biztonságos alkalmazhatóságát, továbbá azon túl, hogy eredményesnek

bizonyult a bőrléziók mérséklésében, a betegek vérmintáiban is csökkentette a gyulladásos markerek mennyiségét és a memória T-sejtek aktivációját (48).

A 36 aminosavból álló Vm24 a *Vaejovis mexicanus smithi* skorpió toxinja, amelynek azonosításában és leírásában a laboratóriumunk is részt vett, mai napig az egyik legnagyobb affinitású ($IC_{50} = 2.9 \text{ pM}$) és szelektivitású (~1500-szoros $K_v1.3$ iránti szelektivitás más K_v csatornákkal szemben) $K_v1.3$ peptidinhibitor (49, 50). Számos *in vitro*, és *in vivo* állatkísérletben sikeresen alkalmazták az effektor memória T-limfociták (T_{EM}) aktivációjának specifikus gátlására, ami alkalmassá teszi, hogy a későbbiekben akár terápiás szerként is alkalmazható legyen (32, 49). A Vm24 kötődése a $K_v1.3$ -hoz alapjaiban megegyezik a dalazatidnál leírtakkal, annyi különbséggel, hogy míg a dalazatid blokkoló mechanizmusának részeként a csatorna szelektivitási szűrőjében a Y447 tirozin aminosav oldalláncok befelé rotálódnak, ami stabilizált nem vezető állapotot eredményez, addig a Vm24 esetében nem a szelektivitási szűrő konformációs átrendeződése dominál, hanem egy jobb szterikus komplementaritás alakul ki a toxin és a kötőhely között, amelynek központi eleme a Y447-es aminosav, ezáltal fejtve ki hatékonyabb gátlást (22, 51).

Viszonylag új irányt jelent az antitest alapú gátlószerek fejlesztése, amelyek között szerepelnek klasszikus monoklonális antitestek (52), "nanotestek", azaz egy variabilis domént tartalmazó mini-antitestek (21, 53), és úgynevezett 'knotbody'-k, amelyekben az antitest komplementaritást meghatározó régióiba a fenti toxinok egyikét helyezik (54). Bár ezen megoldások is biztató kísérletes eredményeket adnak, ezek közül még egyik gátlószer klinikai alkalmazása sem kezdődött el.

A K_v1 szupercsalád peptidtípusú gátlószerei között egyedülálló a *Macrothele raveni* pók nemrég felfedezett toxinja, az MrVIII, amely szemben a fentebb bemutatott peptidtípusú gátlószerekkel, nem a csatorna pórusához, hanem a VSD-hez kötődik, ezáltal nem egy fizikai akadályt képez a pórusban, mint a többi peptidtípusú gátlószer, hanem a csatorna kapuzását módosítva gátolja az ionáramot. Alanin-szken mutagenézis segítségével kimutatták, hogy a $K_v1.3$ ioncsatornán a kötéséért az extracelluláris S3-S4 hurok Y339 aminosava tehető felelőssé, továbbá fontos stabilizáló szerepet tulajdonítanak a T342 treoninnak. Kötődése a zárt állapotban rögzíti a VSD-t, ami révén a csatorna nyitása a pozitívabb membránpotenciálok felé tolódik (55).



2. ábra: A Kv1.3 feszültségkapuzott káliumcsatorna legfontosabb gátlószerei.

A humán Kv1.3 ioncsatorna krio-EM szerkezet alapján meghatározott két, egymással szemben fekvő alegységet oldalnézetből ábrázoltuk (PDB: 7EJ1 (20)). A pórusdomént (PD) alkotó S5-S6 héliceit lila színnel ábrázoltuk. A VSD S4 hélicei sötétkékekkel vannak kiemelve, benne a pozitív töltésű aminosavakat sárga színnel jelöltük. Az ábrán az egyes gátlószerek kötésében legfontosabb, az irodalomban leírt aminosavak kerültek feltüntetésre a teljesség igénye nélkül. A jobb láthatóság esetében a Psora-4 (5-4-fenilbutoxi-pszoralén), PAP-1 (5-4-fenoxibutoxi-pszoralén) és MrVIII esetében a kötőhelyek csak az egyik alegységen lettek jelölve. A dalazatid (ShK-186) és Vm24 kötésében szerepet játszó azon aminosavak, amelyek a csatorna szelektivitási szűrőjének részét képezik, pirossal lettek feltüntetve. A kis inzert csak a dalazatid szerkezetét mutatja. Az ábrát a PyMol programmal készítettük.

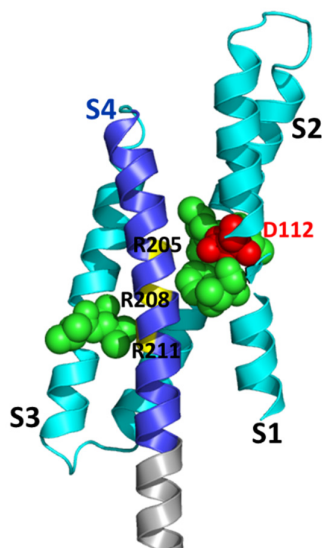
A Kv1.3 ioncsatorna gátlásának terápiás potenciálja autoimmun, neurodegeneratív és daganatos betegségekben merült fel, de ezidáig egyik gátlószer alkalmazása sem lépett be a klinikai gyakorlatba. Az autoimmunitás szempontjából központi szerepet kapnak a T_{EM} limfociták, amelyek szemben a centrális memória T sejtekkel, igen magas Kv1.3 expresszióval bírnak, így a Kv1.3 szelektív gátlószereivel kedvező módon elsősorban a kórosan aktiválódott T_{EM} sejtek működése gátolható (56). Autoimmun betegségek esetében a Kv1.3 gátlás terápiás jelentőségére az egyik legerősebb evidenciát a már fentebb is említett psoriázisos betegekben végzett klinikai vizsgálatok adták (43). Emellett a gátlószereket intenzíven tesztelik rheumatoid arthritisz, 1-es típusú diabétesz mellitusz és autoimmun glomerulonephritisz esetében is, de ezidáig ezeken a területeteken csak *in vitro* sejtes vagy állatkísérletes kedvező eredményeket írtak le (57). Az elsődlegesen a központi idegrendszert érintő betegségek között elsőként sclerosis multiplexben merült fel a Kv1.3 gátlás terápiás jelentősége. A betegség állatmodelljében és betegek perifériás vérmintáiban is kimutatták, hogy a mielinhüvelyt pusztító autoreaktív T-limfociták igen magas Kv1.3 expresszióval bírnak (58, 59). A

neurodegeneratív betegségek közül mind Alzheimer- mind Parkinson-kórban felvetették a kórosan aktiválódott mikrogliaikon megnövekedett számban található Kv1.3 központi szerepét, ezáltal a gátlás potenciális terápiás jelentőségét (60). A Kv1.3 gátlása csökkentette az amiloid plakkok kialakulását, aggregációját, valamint a mikrogliaák proinflammatorikus funkcióit *in vitro* kísérletekben, illetve az Alzheimer-kór *in vivo* egérmodelljében (61, 62). *In vitro* sejtes, valamint *in vivo* egérszövetekkel, valamint posztmortem betegminták vizsgálatával kimutatták, hogy Parkinson-kórban az aggregált α -szinuklein hatására a mikrogliaák kórosan aktiválódnak, ami során megnő a felszínükön a Kv1.3 expresszója, továbbá a Kv1.3 ioncsatorna aktivitása közvetlenül kapcsolatba hozható a mikrogliaák gyulladásos citokintermelésével, amely végül a dopaminerg neuronok pusztulásához vezet. Ezt az is alátámasztja, hogy a csatorna gátlásával a mikrogliaák citokintermelése csökkenthető, és állatmodellekben a neuronpusztulás mérsékelhető (63). Daganatos megbetegedésekben mind a plazmamembránban, mind pedig a mitokondrium belső membránjában található Kv1.3 ioncsatorna gátlásának fontos terápiás jelentősége lehet. Előbbi a sejtek proliferációjának gátlásával, utóbbit a daganatsejtek apoptózisának fokozásával hozzák összefüggésbe. Számos daganatos betegségben sikerült kimutatni a Kv1.3 gátlásának antiproliferatív és proapoptotikus hatásait *in vitro* sejt- vagy állatmodellekben, ezek közül a legelőrehaladottabb kutatások melanóma, pancreas ductalis adenocarcinóma és B-sejtes krónikus limfocitás leukémia esetében vannak (64, 65).

I./4. A Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna szerkezete, kapuzása és élettani szerepe

A humán feszültségkapuzott protoncsatorna (Hv1) szerkezete egyedülálló a feszültségkapuzott ioncsatornák között. Szemben a fentebb bemutatott Kv csatornák szerkezetével a Hv1 olyan homodimerként van jelen a membránban, amelyben az egyes alegységeket egyenként négy transzmembrán helikális szegmens (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 fiziológiai körülmények között a citoplazmából kifelé irányuló protonvezető útvonalként, ugyanis hiányzik belőlük a fentebb bemutatott S5-S6 hélixek által formált klasszikus PD (66, 67) (**3. ábra**). A dimerizációért az alegységek C-terminálisán intracellulárisan elhelyezkedő hélix felelős. A csatorna további sajátossága, hogy aktivitását a membránpotenciál és a pH egyaránt szabályozza. Amikor a sejtmembrán depolarizálódik, vagy amikor megnő a citoszólban a protonkoncentráció, tehát a citoszól savasodik vagy ellentétesen, az extracelluláris tér lúgosodik, a protoncsatorna aktiválódik (66-69). A membránpotenciál érzékeléséért az S4

szegmentumban található három pozitívan töltött arginin aminosav felelős (R205, R208 és R211) (70), amelyek depolarizáció hatására a membrán síkjából kifelé mozdulnak el hasonlóan a Kv csatornáknál bemutatottakhoz. Az intracelluláris pH érzékeléséért az S2-S3 linkerben található H168 tehető felelőssé, míg az extracelluláris pH-t a H140 és H193 aminosavak protonációjának változása jelzi. Ezen hisztidenek protonáltsága, valamint az S4-en található feszültségérzékeny arginin aminosavak aktuális állapota révén indukált konformációváltozások kooperatív módon határozzák meg a csatorna vezető, azaz nyitott, vagy nem vezető, azaz zárt állapotát (68, 71). A Hv1 nem inaktiválódó csatorna, így esetében nem beszélhetünk inaktivált kapuzási állapotról (72). A dimer csatornában mindkét alegységben található egy protonvezető útvonal. A két alegység között szoros kooperativitás figyelhető meg a protonvezetés tekintetében, ugyanis a dimer csatorna csak akkor képes a protonok vezetésére amennyiben mindkét alegység aktiválódott (69, 73, 74). Különleges sajátosságai miatt a protonvezetés mechanizmusát részleteiben tanulmányozták. A protonvezetés az úgynevezett Grotthuss mechanizmussal írható le, amelynek lényege, hogy a H^+ ionok nagyrészt egy, a VSD-ben végigfutó vízmolekulák és aminosavak közötti hidrogénkötések révén formált „vízvezetékben” (water wire) haladnak, majd a csatorna „száraz részeihez” érve, ahol ez a vízvezeték szerű struktúra megszakad, a megfelelő aminosav-oldalláncok időleges protonációja révén történik a protonok mozgása (75-77). A protoncsatorna igen szelektív H^+ ionokra. Ebben kulcsfontosságú szerepe van az S1 szegmentumban található D112 aminosavnak, valamint az S4 szegmentumban található egyik arginin aminosavnak (R211 vagy R208) (78, 79), amelyek együtt egy szűkületet formálnak a protonvezető útvonalban (80).



3. ábra: A monomer humán Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna szerkezete

Az ábrán a humán Hv1 protoncsatorna egyik alegysége került feltüntetésre a csatorna magmágneses rezonancia (NMR) struktúrája alapján (PDB: 5OQK, AlphaFold: AF-Q96D96-F1) (81). Az ábrán az S1-S2-S3 (világoskék),

valamint az S4 (sötétkék) helikális szegmentumok lettek részleteikben feltüntetve. A jobb szemléltetés kedvéért a fehérje N-terminális részét teljes egészében nem ábrázoltuk, míg a C-terminálisan, intracellulárisan elhelyezkedő, dimerizációért felelős hélixnek (szürke) csupán a kezdeti aminosavait tüntettük fel. Sárga színnel jelöltük az S4 hélixen található, feszültségérzékelésben résztvevő arginineket (R205, R208, R211). Piros színnel került kiemelésre a protonszelektivitás szempontjából meghatározó aszparagin aminosav (D112). A protonvezetés szempontjából meghatározó aminosavak zölddel kerültek feltüntetésre (V109, I146, L147, F150, V177, V178). Az ábra a PyMol program segítségével készült.

A Hv1 számos humán sejttypusban megtalálható, amelyekben elsősorban két fő sejtfunkcióban van kiemelt szerepe. Egyrészt, a Hv1-en keresztül megvalósuló, citoplazmából kifelé történő protonvezetés biztosítja a töltéskompenzációt a NADPH-oxidáz megfelelő működéséhez, ami ezáltal nélkülözhetetlen a reaktív oxigéngyökök termelésének fenntartásához. Ezáltal a Hv1 csatornát összefüggésbe hozták a neutrofil granulociták oxidatív burst folyamatával és ezen sejtek baktériumok elleni védekezésével (82-84), a B-limfociták antitesttermelésével (85), szívizomsejtekben a CO₂ transzportmediált eltávolításával (86), a mieloid eredetű szuppresszor sejtek immunszuppresszív aktivitásával (15) és a T-limfociták különböző effektor funkcióival is (87). Makrofágokbeli fiziológiás szerepét a következő, I.5. fejezetben tárgyaljuk részleteiben. A ROS-termelés szabályozásán túl a Hv1 által közvetített protonkiáramlás másik fő feladata az intracelluláris pH szabályozása. Az intracelluláris pH fiziológiás tartományon belül tartása gyakorlatilag minden sejtfunkcióhoz elengedhetetlen. A Hv1 kulcsfontosságú ebből a szempontból, mivel a protonok gyors és hatékony kiáramlását biztosítja a citoplazmát akut módon savasító folyamatok, mint például az immunsejtekben megfigyelhető oxidatív burst vagy a rosszindulatú sejtek Warburg-effektusa során (88). Ennek megfelelően korábban kimutatták, hogy a csatorna hiánya vagy gátlása savasodást idéz elő Jurkat T-limfocitákban (16), izolált nem aktivált és aktivált egér T-limfocitákban (87), humán spermiumokban (89), kutya kamrai szívizomsejtekben (86), egér dorzális gyöki ganglion eredetű neuronokban (90), egér és humán mikrogliá sejtekben (17), emlőtumoros (19, 91, 92), kolorektális karcinóma (93) és glioblastoma multiforme sejtekben (18). A Hv1 funkcionális hiánya által kiváltott kóros savasodás a legtöbb esetben a sejtek életképességének csökkenésével járt együtt. Ilyen összefüggést azonban korábban nem vizsgáltak makrofágokban. Míg néhány tanulmány már felvetette a Hv1 expresszióját és fiziológiás szerepét a makrofágok fagoszómáiban (94, 95), a csatorna gátlásának hatásait még nem tanulmányozták lizoszómákban, amely organelumok a különböző, sejthalálhoz vezető útvonalak fontos komponenseinek tekinthetők (96, 97). A citoplazmatikus és a lizoszomális pH-változásokhoz kapcsolódó molekuláris mechanizmusok nagyon összetettek és jelenleg hiányosan ismertek (97, 98), illetve ezek tisztázása meghaladja a jelen disszertáció kereteit. Az intracelluláris pH szabályozásán keresztül a Hv1 csatornáknak kiemelt jelentősége van továbbá

még a spermiumok motilitása és kapacitációja szempontjából (84, 89, 99) vagy a korion eredetű mezenhimális össejtek migrációja és mátrixtermelése tekintetében is (100).

I./5. A makrofágokról általában, a Hv1 ioncsatorna szerepe makrofágokban

Az immunsejtek az immunrendszer alapvető sejtjes elemei, kiemelt szerepük van a patogének elleni védekezésben, a károsodott és daganatos sejtek eltávolításában és a szövetek homeosztázisának fenntartásában. Ezeket a sejteket két csoportba sorolhatjuk annak alapján, hogy a veleszületett vagy a szerzett immunrendszer kialakításában vesznek részt. A veleszületett immunitás gyors, hatékony és nem specifikus válaszokat képes kialakítani, legfontosabb sejtjes elemei a granulociták, monociták és makrofágok, dendritikus sejtek és a természetes ölüsejtek. Ezzel szemben a szerzett immunitás sejtjes elemei, a T-és B-limfociták igen specifikus és hosszantartó immunitás kialakítására képesek. Amennyiben az immunrendszer egyes sejtjeinek funkciója vagy a köztük levő kommunikáció felborul, az számos betegség kialakulásához vezethet, így az immunrendszer diszfunkciója figyelhető meg immundeficienciákban, autoimmun és daganatos megbetegedésekben egyaránt (101).

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 M1 makrofágok polarizációját elsősorban a T_H1 (1-es típusú segítő limfocita) citokinek, például interferon- γ (IFN- γ), és Toll-like receptor ligandok, például a bakteriális lipopoliszacharid (LPS) aktiválják. Az aktivált M1 makrofágok proinflammatorikus citokinek és mediátorokat termelnek, amely révén részt vesznek a patogének és tumorok elleni védekezésben. Ezzel szemben a T_H2 (2-es típusú segítő limfocita) eredetű gyulladáscsökkentő citokinek, például az interleukin-4 (IL-4), interleukin-13 (IL-13) vagy interleukin-10 (IL-10) által polarizált M2 makrofágok inkább a gyulladás feloldódásában, az apoptotikus sejtek és törmelékek eltávolításában és a szöveti remodellingben vesznek részt (102, 103). Bár a fenti dichotóm osztályozás terjedt el leginkább az irodalomban, az utóbbi időben bizonyítást nyert, hogy az nagymértékben önkényes és leegyszerűsíti a valós helyzetet, ugyanis az M2 makrofágok tovább oszthatók különböző funkcionális alpopulációkra. Ezáltal az M1 és M2 fenotípusok úgy képzelhetők el, mint a lehetséges funkcionális állapotok kontinuumának szélsőségei, amelyek a mikrokörnyezeti tényezőktől függően dinamikusan egymásba alakulhatnak (104-106). Mindezek ellenére az M1-M2 felosztás didaktikai szempontból továbbra is elfogadott osztályozási keretrendszer, különösen mivel a makrofágok

polarizációjának felborulása gyakran összefügg különböző betegségek kialakulásával és progressziójával. A makrofágpolarizáció egyensúlyának proinflammatorikus irányba történő, M1 dominanciával együtt járó felborulását összefüggésbe hozták az atherosclerosis, az elhízás és különféle anyagcserezavarok, valamint autoimmun betegségek (például a Crohn-betegség, a rheumatoid arthritis, a sclerosis multiplex vagy az autoimmun hepatitis) esetén megfigyelhető fokozott gyulladásos folyamatokkal. Ezzel szemben az M2 túlsúly hozzájárulhat az allergiás légúti gyulladások és az asztma kialakulásához. A tumorokat infiltráló, normál esetben M1 fenotípusú makrofágok M2-szerű, úgynevezett tumorasszociált makrofágokká történő átalakulása gátolhatja a rosszindulatú daganatos sejtek immunsejtek általi felismerését és elpusztítását. Ezért a makrofágpolarizáció egyensúlyának befolyásolása potenciális terápiás célpontnak tekinthető ezekben a betegségekben. Így a polarizációt szabályozó tényezők és a folyamatban résztvevő fehérjék szerepének megértése kiemelt orvosi biológiai jelentőséggel bír (105, 107).

A Hv1 alapvető szerepe széles körben dokumentált humán makrofágokban. Egér peritoneális makrofágokban már régen leírták a membránpotenciál és a pH által szabályozott hatékony protonvezető útvonal jelenlétét, amelyről feltételezték, hogy hozzájárul a citoplazma lúgosításához, ezáltal védelmet nyújtva az ezen sejtek aktivációjával és mikrobiocid mechanizmusaival együtt járó intracelluláris savasodással szemben (108). Hasonló Hv1 ionáramokat találtak a THP-1 humán monocita eredetű sejtvonalból forbol-12-mirisztát 13-acetát (PMA) segítségével differenciált, nem polarizált makrofágokban is (109). A Hv1 ionszarnának az oxidatív burst folyamat során nélkülözhetetlen kompenzációs töltésmozgásban játszott feltételezett szerepével összhangban egér csontvelőből származó makrofágokban a csatorna Zn^{2+} általi gátlásának hatására csökkent a PMA és tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) által indukált tartós ROS termelés mértéke (110), míg a csatorna genetikai hiánya a fagoszómák késleltetett savasodását és a sejtek alacsonyabb ROS termelését eredményezte (95). Továbbá, a Hv1-et genetikai okból nem tartalmazó egér csontvelőből származó makrofágok alacsonyabb ROS termelés mellett csökkent védelmet mutattak a *Histoplasma capsulatum* intracelluláris, gombás kórokozó által okozott fertőzéssel szemben (111). Emellett humán perifériás monocita-eredetű makrofágokban a Hv1 Zn^{2+} -kel történő gátlása módosította a fagoszómális pH savasodását, illetve kimutatták azt is, hogy a csatorna feltételezhetően hozzájárul az M1 és M2 útvonalak mentén polarizált makrofágok eltérő fagoszómális pH szabályozásához és ROS-termelő képességéhez (94).

I./6. A Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna gátlószerei, a gátlás terápiás jelentősége

A Hv1 ioncsatorna esetében eddig számos gátlószert írtak le, ezek között vannak ionok, kismolekulájú és peptidtípusú gátlószerek egyaránt. Az alábbiakban ezeket szeretném röviden bemutatni, a legnagyobb hangsúlyt fektetve a kísérleteinkben is használt Hv1 gátlószerekre. A **4. ábra** a dolgozatban bemutatott legfontosabb Hv1 gátlószereket, és az azok kötődésében résztvevő kulcsfontosságú aminosavakat összegzi.

A Zn^{2+} a Hv1 ioncsatorna aspecifikus gátlószerének tekinthető, az első leírt Hv1 inhibitor az irodalomban, félmaximális gátló koncentrációja μM -os nagyságrendű (66, 112). Kimutatták, hogy a Zn^{2+} a csatorna zárt állapotában kötődik, csökkentve a csatorna nyitási valószínűségét, stabilizálva annak nem vezető állapotát (113). A Zn^{2+} gátló hatása függ az extracelluláris pH-tól, míg az intracelluláris pH esetében ilyen összefüggést nem írtak le, ami arra utal, hogy a protonok és a Zn^{2+} között kompetíció lép fel az extracelluláris kötőhelyek iránt (112, 114). Az S3-S4 hélixeket összekötő extracelluláris hurkon található két hisztidin aminosav, a H140 and H193 bizonyítottan meghatározó szerepű a csatorna Zn^{2+} -mediált gátlása tekintetében (113, 115-117). Érdekes, hogy a monomeren belül a két hisztidin igen távol helyezkedik el egymástól, míg a dimerek esetében az egyes alegységek megfelelő aminosavai látszólag kedvezőbb szterikus helyzetbe kerülnek. Amikor a H140 and H193 aminosavakat különböző kombinációkban elmutálták tandem dimereken azt találták, hogy a Zn^{2+} gátló hatása csak abban az esetben érvényesült, amennyiben mindkét monomer legalább az egyik kulcsfontosságú hisztidint tartalmazta. Ez arra utal, hogy a vad típusú Hv1 csatornában a Zn^{2+} H140 és H193 aminosavak által meghatározott kötőhelyét a két monomer együttesen határozza meg, nem pedig egy monomeren belül helyezkedik el (114, 117).

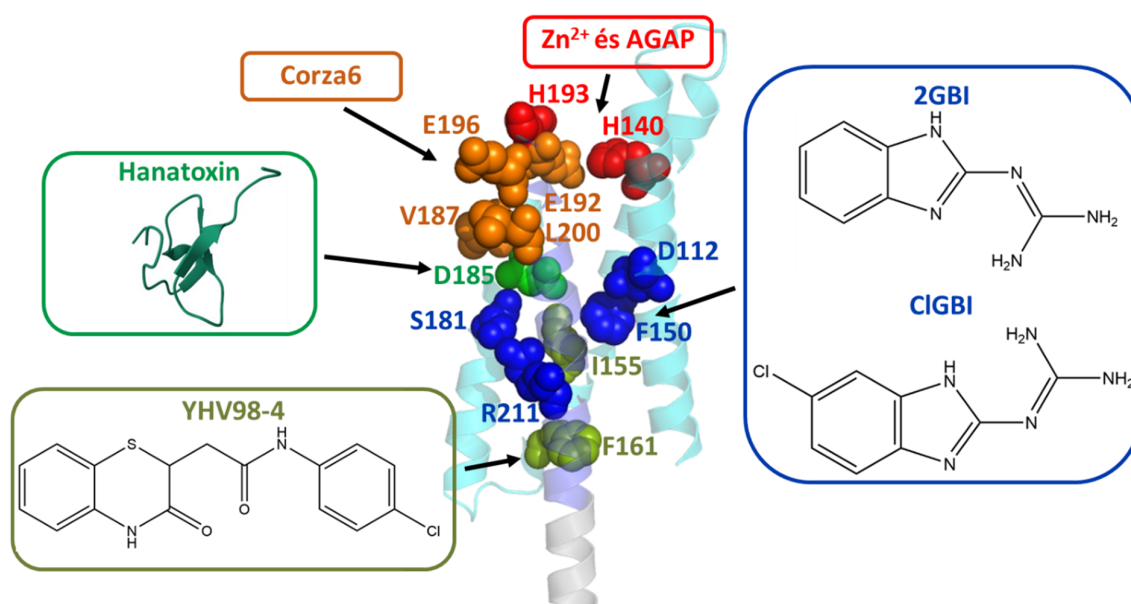
A kismolekulájú Hv1 gátlószerek közül a guanidínium-alapú vegyületek máig az egyik legjelentősebb csoportnak számítanak. A 2-guanidinbenzimidazolról (2GBI) kimutatták, hogy szemben a Zn^{2+} -kel, a nyitott csatornához kötődve gátolja azt. A kötőhely intracellulárisan helyezkedik el, a D112, F150, S181, és R211 aminosavak formálják azt (118, 119). Mivel a vegyület erősen poláros, nem képes átjutni a membránon, így csak intracellulárisan alkalmazható, ami jelentősen korlátozta gyakorlati hasznosítását (118, 120). Ezt oldották fel a 2GBI egyik módosított verziójának kifejlesztésével, az 5-kloro-2-guanidinbenzimidazzal (ClGBI), ami képes a kötőhelyet a membrán extracelluláris oldala felől is elérni és az alapvegyületnél nagyobb affinitással képes kötődni a csatornához (119). Jövőbeli terápiás alkalmazhatóságát némileg limitálja, hogy egy újabb tanulmány szerint a ClGBI a Hv1 mellett más ioncsatornákat is gátol, így nem tekinthető szelektív gátlószernak (121). Kedvező tulajdonságai és nagy affinitása miatt viszont mai napig a ClGBI-t használják a legszélesebb

körben a Hv1 farmakológiai gátlására, valamint a csatorna funkciójának és biológiai jelentőségének kísérletes vizsgálatára (15-17, 19, 86, 89, 100, 122, 123). A HIF (3-(2-amino-5-metil-1H-imidazol-4-il)-1-(3,5-difluorofenil)-propán-1-on) egy másik guanidínium-alapú vegyület, ami érdekes módon a csatorna nyitott és zárt konformációjához is képes kötődni. A HIF a 2GBI-hez és ClGBI-hez hasonlóan a nyitott állapotbeli kötőhelyéhez kötődve a protonáram gátlását eredményezi, míg a nehezebben hozzáférhető zárt állapotbeli kötőhelyén keresztül nehezíti a csatorna aktiválhatóságát (124, 125).

Számítógépes szimulációk eredményeként született meg a szintén kismolekulájú YHV98-4 (N-(4-klorofenil-2-(3-oxo-3,4-dihidro-benzotiazin-2-acetamid) nevű Hv1 gátlószer, ami intracelluláris, de a guanidínium-vegyületektől eltérő kötőhellyel rendelkezik (I155, F161, és S219) és érdekes módon a csatorna zárt és aktivált állapota közötti köztes, intermediér állapotában képes kötődni (90, 126). Több a klinikumban széles körben alkalmazott kismolekulájú gyógyszerről is kimutatták, hogy aspecifikus módon képes a Hv1-et gátolni. Így többek között az antipszichotikumként alkalmazott haloperidol és klórpromazin (127), valamint a klozapin és olanzapin (128) esetében is leírtak Hv1 gátló hatásokat. A lokális anesztéziában használt lidokain és a bupivakain szintén aspecifikusan gátolják a protoncsatornát. Ezek gyenge bázikus sajátosságú vegyületek, amelyek a membránon történő átjutásukat követően intracellulárisan képesek protonokat megkötni, ezáltal növelve a sejten belüli pH-t. Valószínűsíthetően ez eredményezi ezen gyógyszermolekulák aspecifikus Hv1-t gátló hatását, ugyanis ahogy azt fentebb is bemutattuk, az intracelluláris pH növekedése gátolja a csatorna működését (129). A nem guanidínium-alapú kismolekulájú gátlók közül kiemelendő még több, a csatornát a zárt állapotában stabilizáló gátlószer, úgymint az Oxophench (130), a PNX61442 (131), a „13-as molekula” (132), bár ezen esetekben a gátlás molekuláris mechanizmusa kevésbé feltárt és kevesebb kísérletes eredmény is született alkalmazásukkal. Viszonylag új irányt jelent az 5-fenil-2-aminoimidazol-alapú Hv1 gátlók megjelenése, amelyeket a nyitott csatornán a 2GBI kötőhelyen végzett számítógépes szimulációk eredményeként fejlesztettek ki (133).

A kismolekulájú Hv1 inhibitorok melletti másik csoport a peptidtípusú gátlók családja. Az AGAP (antitumor analgézias peptid) a *Buthus martensii* skorpió toxinja. Mutált változata, az AGAP W38F a zárt állapotú csatornához kötődik, a deaktivált állapotban stabilizálva az S4 hélixet. Kötőhelye részben átfedést mutat a Zn^{2+} -ével, mindkét esetben a H140 and H193 aminosavak szerepe kiemelkedő, az AGAP kötése viszont a Zn^{2+} -kel szemben nem mutat pH függést (134). A Corza6 (C6) egy szintetikus peptid, amelynek alapkövei három póktoxinban található peptidből származtathatóak (84, 135). A kötőhelye, bár az S3-S4 hurkon

található, különbözik az előző peptid kötőhelyétől, ugyanis a V187, E192, H193, E196, L200 aminosavak alkotják (135). A Hv1 dimerhez kooperatív módon kötődik, aminek hatására az sokkal pozitívabb membránpotenciálok mellett aktiválódik. A Hanatoxin (HaTx) talán az egyik legismertebb póktoxin, a *Grammostola rosea* tarantulából nyerték ki. Elsőként a Kv ioncsatornákon kifejtett gátló hatását és annak hatásmechanizmusát írták le részleteiben (136). A toxin extracellulárisan alkalmazva azonban gátolja a Hv1 áramot is azáltal, hogy a VSD működését gátolva pozitívabb irányba tolja el annak egyensúlyi aktivációját. Különlegessége, hogy egyaránt kötődik a sejtmembránhoz és az ioncsatornához. Kötésében meghatározó a D185 aminosav, amit mutagenézis segítségével bizonyítottak (137).



4. ábra: A humán Hv1 feszültségkapuzott protoncsatorna legismertebb gátlószerei és azok kötődési helyei
Az ábrán a humán Hv1 protoncsatorna egyik alegysége került feltüntetésre a csatorna NMR struktúrája alapján (PDB: 5OQK, AlphaFold: AF-Q96D96-F1) (81). Az ábrán az S1-S2-S3 (világoskék), valamint az S4 (sötétkék) helikális szegmentumok lettek részleteikben feltüntetve. A Zn^{2+} és az AGAP peptid kötődéséért felelős aminosavak piros, a 2GBI és ClGBI kötődéséért felelős aminosavak sötétkék, a Corza6 peptid kötődéséért felelős aminosavak narancssárga, a Hanatoxin (PDB:1D1H, (138)) kötődéséért felelős aminosav sötétzöld, míg az YHV98-4 kötődéséért felelős aminosavak khaki színnel lettek jelölve. Az ábra Hv1-et és Hanatoxint bemutató része a PyMol program segítségével készült. A 2GBI, ClGBI és YHV98-4 kémiai szerkezetét a ChemDraw program segítségével ábrázoltuk.

Ahogy az a fentebbiekből is látszik, bár eddig számos különböző peptid- és kismolekulájú inhibítort írtak le, amelyek képesek a Hv1 ionáramát gátolni (101, 139), a guanidintartalmú vegyületek, különösen a ClGBI, még mindig a legszélesebb körben használt Hv1 gátlószereknek számít (15-17, 19, 86, 100, 119, 122, 123, 131), ezért ezt a vegyületet alkalmaztuk mi is a dolgozatban bemutatott kísérleteink során.

Ahogy azt az előző fejezetben bemutattuk, a Hv1 alapvető celluláris funkciói a ROS-termelés és az intracelluláris pH szabályozása. Számos olyan patológiás állapot ismert, amelyekben a protoncsatorna túlzott működése kulcsfontosságú szereppel bír, ezáltal szelektív gátlásában jelentős terápiás potenciál rejlik. A teljesség igénye nélkül többek között a ROS-túltermelés mérséklése révén a Hv1 gátlása terápiásan kedvező lehet akut tüdőkárosodás (140), ischeamiás stroke (141, 142), agy- és gerincvelősérülések (143-145), valamint perifériás neuropátiás és gyulladásos eredetű fájdalom (90, 146) esetében is. Mivel az immunsejtekben is széles körben expresszálódik, több autoimmun kórképben felvetették gátlásának terápiás relevanciáját, amelyek közül legjelentősebb a sclerosis multiplex esetében történő esetleges alkalmazhatósága (147, 148). Neurodegeneratív kórképekben a Hv1 által is vezérelt ROS-túltermelés hozzájárulhat a mikroglia kóros aktiválásához és gyulladásos citokintermeléséhez (149). Továbbá, a Hv1 gátlásának terápiás jelentőségét a daganatsejtek proliferációját és túlélését serkentő metabolikus acidózis kompenzációjának megakadályozása révén számos rosszindulatú daganat, így például emlőrák (19, 91, 92), colorektális karcinóma (93), glioblastoma multiforme (18) vagy leukémiák (131, 150) esetében is felvetették. Ezen túl a Hv1 szerepe kiemelkedő lehet a daganatsejtek migrációja és metasztázis képzése tekintetében (91), valamint működése hozzájárul a daganatsejtek körüli extracelluláris környezet savasodásához is, ami többek között elnyomja a daganatellenes immunválaszt (88), amelyek tovább hangsúlyozzák a gátlás esetleges tumorelles terápiás potenciálját.

A Hv1-en keresztüli protonkiáramlás farmakológiai gátlása a kialakuló komplex intracelluláris pH-szabályozási zavar révén sejthalálhoz vezethet, ami ezáltal hozzájárulhat a Hv1 gátlószerek akár kedvező terápiás, akár, amennyiben azok nem megfelelően specifikusak az adott célsejtekre, potenciális mellékhatásainak kialakításához egyaránt. A csatorna blokkolása különböző sejttípusokban, többek között Jurkat T-limfocitákban (16), korion eredetű mezenhimális őssejtekben (100), aktivált egér mikroglia sejtekben (17), mieloid eredetű szuppresszor sejtekben (15), illetve emlőtumoros (19) és glioblastoma multiforme sejtvonalakban (18) csökkent életképességet eredményezett. Bár, ahogy azt az előző fejezetben is bemutattuk, a Hv1 expressziója viszonylag jól dokumentált a makrofágokban, gátlásának a polarizált sejtek életképességére gyakorolt hatását korábban nem vizsgálták. A gátlás következtében bekövetkező esetleges csökkent életképesség és az M1-M2 sejtek közötti homeosztatikus egyensúly felborulása nagymértékben hatással lehet a makrofágokhoz kapcsolódó, fentebb is leírt fiziológiás és kóros folyamatokra, ezáltal tovább árnyalva a jövőben terápiásan alkalmazott Hv1 gátlószerek kedvező és mellékhatásait egyaránt.

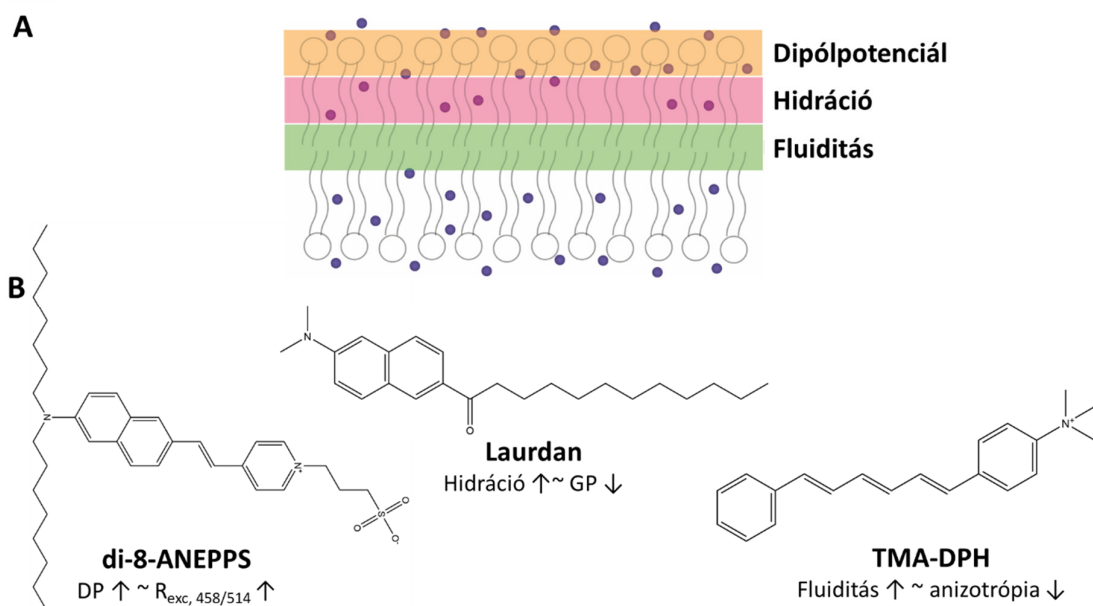
I./7. A főbb membránbiofizikai paraméterek, mérések és biológiai jelentőségük bemutatása

Általánosságban elmondható, hogy a lipidek befolyásolhatják a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák működését direkt módon, azaz ligandszerű lipid-fehérje kötődés révén, valamint a membránok biofizikai tulajdonságainak megváltoztatásán, azaz indirekt mechanizmusokon keresztül (1, 2). Az utóbbi paraméterek lényegében a membrán alkotóelemeinek molekuláris elrendeződéséhez, azok struktúrális rendezettségéhez kapcsolódnak, így azokat alapvetően a kettősréteg lipidösszetétele határozza meg. Élő sejtekben a legszélesebb körben vizsgált három fő biofizikai paraméter a sejtmembrán fluiditása, hidrációja és dipólpotenciálja és bár mindegyikük rendezettséggel kapcsolatos tulajdonságnak tekinthető, együttes vizsgálatuk mégis többletinformációt hordoz, mert a sejtmembrán szerkezeti szerveződését különböző szempontokból jellemzik. Elméleti megfontolások, illetve munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a három tényező a lipidkettősrétegek különböző mélységben elhelyezkedő rétegeinek szerkezetét írja le (151-153) (**5. ábra**). Bár ezek a paraméterek lényegileg összefüggenek egymással, és az általuk jellemzett membránrégiók feltehetően részben átfedik egymást, didaktikai okokból a jelen disszertációban teljesen elkülönült entitásnak tekintjük őket.

A membrán fluiditása, amelyet szűkebb értelemben a membrán alkotóelemeinek mozgási, elsősorban rotációs szabadságaként definiálunk, elsősorban a sejtmembrán belső, lipidoldalláncokat tartalmazó hidrofób magjában lévő struktúrális rendezettséget jellemzi, míg a membrán hidrációja, azaz a vízmolekulák membránba történő penetrációjának mértéke, a sejtmembrán központi és a határfelületi régiók közötti, átmeneti rétegről ad információt (**5. ábra A panel**). Élő sejtekben a két paramétert leggyakrabban a lokális mikrokörnyezetre érzékeny fluorofórok segítségével vizsgálhatjuk. A fluiditás meghatározására a helyi mikroviszkozitásra érzékeny próbák, így a TMA-DPH (4'-(trimetil-ammonio)-difenil-hexatrién) rotációs szabadságával negatív korrelációt mutató fluoreszcencia anizotrópiájának mérése alkalmas (154-158). A hidráció mértékének tanulmányozása ezzel szemben az úgynevezett szolvatokrómiás próbákkal, leggyakrabban a Laurdan-nal (6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin) történik (**5. ábra B panel**). Ezen festékek emissziós spektruma ugyanis eltolódik a lokális környezet hidrofobicitása függvényében, amely a hidrációval negatív korrelációt mutató generalizált polarizáció meghatározásával kvantifikálható (154-156, 159-161). A két legelterjedtebben használt próba közül a TMA-DPH hidrofíl trimetil-ammonium csoportja ellenére úgy épül be a membránba, hogy anizotrópiáját a hidrofób magban lévő membránrégiók rendezettsége határozza meg (162), míg a Laurdan emissziós spektruma

elsősorban a foszfolipidek glicerolrégiója alá beágyazódó, fluoreszcenciáért felelős régióját körülvevő vízmolekulák mennyiségére érzékeny (163). A membránfluiditás és -hidráció által tükrözött belső rendezettség különböző mechanizmusokon keresztül befolyásolhatja a fehérjék működését. Irodalmi adatok alapján többek között módosíthatják a konformációváltozások sebességét vagy befolyásolhatják bizonyos fehérjekomformerek relatív stabilitását a hidrofób mismatch és a rugalmas csatolás (úgynevezett „elastic coupling”) elmélete szerint, valamint a sejtmembrán vastagságának, rugalmasságának és spontán görbületének megváltoztatásán keresztül (151, 153). A fluiditás és hidráció ilyen hatásait korábban felvetették különféle transzmembrán fehérjék, így mechanoszenzitív ioncsatornák (3, 164), receptor tirozin-kinázok (165, 166), a nikotinerg acetilkolin receptor (167) vagy a metabotróp glutatmátreceptor esetén (168).

Az általunk vizsgált három membránbiofizikai paraméter közül a legkevésbé ismert a dipólpotenciál, mely a membránt alkotó lipidek, illetve a membránhoz asszociált vízmolekulák intramolekuláris dipólusainak nem véletlenszerű orientációja miatt keletkezik a membrán-víz határfelületen, amely elrendeződés egy nagy, a hagyományosan ismert transzmembrán potenciálénál jóval nagyobb elektromos erőteret generáló pozitív intramembrán potenciál kialakulásához vezet (**5. ábra A panel**) (2, 169, 170). Élő sejtekben a dipólpotenciál nagyságának változásai elsősorban a membránba ágyazódó feszültségérzékeny fluorofórokkal követhetők nyomon azt kihasználva, hogy ezen festékek fluoreszcencia paramétereit jelentős mértékben befolyásolja a dipólpotenciálból eredő helyi elektromos erőter erőssége. A leggyakrabban alkalmazott ilyen festék a di-8-ANEPPS (1-(3-szulfonatopropil)-4-[β 2-(di-n-oktilamino)-6-naftil]vinil]piridinium betain) (**5. ábra B panel**), amely használata az elektrokrómos Stark-effektuson alapul. A fluorofór gerjesztési spektruma ugyanis jelentősen eltolódik az intramembrán elektromos erőter függvényében és ezáltal a két hullámhosszon történő gerjesztést követően mért emittált intenzitásainak aránya pozitív korrelációt mutat a dipólpotenciál nagyságával (171-175). A dipólpotenciál által keltett elektromos erőter és a membránfehérjék töltött vagy poláris oldalláncainak kölcsönhatása jelentősen módosíthatja a fehérjék különféle konformációs állapotainak egymáshoz viszonyított relatív stabilitását, ezáltal eltolhatja az egyensúlyt a különböző funkcionális aktivitással bíró állapotok között, amely végső soron a fehérje funkciójának megváltozásához vezethet (2, 176). Ilyen hatásokat különféle fehérjék esetén is leírták. Így kimutatták például, hogy a dipólpotenciál nagysága korrelál a Na^+/K^+ pumpa (177), valamint a P-glikoprotein (178) transzport aktivitásával, illetve az ErbB receptor tirozin-kinázok (171), valamint a G-fehérjéhez kapcsolt szerotonin receptorok (179) ligandkötésével, asszociációjával és jelátviteli aktivitásával.



5. ábra: A sejtmembrán különböző rétegeinek biofizikai tulajdonságait jellemző főbb paraméterek és azok mérésére használt festékek.

(A) A biológiai membránok struktúrális szerveződésének leírására használt három fő biofizikai paraméter a fluiditás (zöld színnel), a hidráció (rózsaszín színnel) és a dipólpotenciál (narancssárga színnel), amelyek a membránok rendezettségét eltérő szempontból és különböző mélységben jellemzik. (B) Ezen tulajdonságok vizsgálata élő sejtekben elsősorban környezeti paraméterekre érzékeny fluorofórokkal és fluoreszcencia alapú mérési módszerekkel lehetséges. Az erre a célra leggyakrabban alkalmazott festékek, illetve azok jellegzetes fluoreszcencia paramétere a három tényező esetén rendre a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája, a Laurdan generalizált polarizációja (GP) és a di-8-ANEPPS gerjesztési aránya ($R_{exc, 458/514}$). Ezen paraméterek spektrofluorimetria során vizsgálhatók, míg utóbbi festék kedvezőbb spektrális tulajdonságai révén konfokális mikroszkópia során is tanulmányozható. Az ábrán a kis kék pontok a membránba különböző mélységig behatoló vízmolekulákat jelölik. Az egyes membránbiofizikai paraméterek méréséhez használt festékek szerkezetét a ChemDraw programmal készítettük.

I./8. A ceramidok membránbiofizikai jellegzetességei

Ahogy fentebb is említettük, a membránok szerveződését és ezáltal az ahhoz kapcsolódó biofizikai paramétereket elsősorban azok lipidösszetétele határozza meg. Bár a kettősrétegekben található foszfolipidek képezik a membránok alapvető struktúráját, a biofizikai tulajdonságok szempontjából kiemelt jelentőséggel bírnak egyéb lipidek. Ezek közül talán a legfontosabb a koleszterin szerepe, amely egyrészt speciális összetétellel és szerkezettel bíró, koleszterinben dús mikrodomének, úgynevezett lipidutajak képződését mediálva fontos a membránok laterális heterogenitásának létrejöttében. Másrészt pedig általánosságban fokozza a kettősrétegek rendezettségét, így csökkenti a fluiditást és hidrációt, illetve növeli a dipólpotenciált (1, 2). A membránok laterális szerveződését, valamint biofizikai tulajdonságait azonban egyéb lipidek, így különféle (gliko)szfingolipidek is jelentősen befolyásolják. A ceramidok a legegyszerűbb szerkezetű szfingolipidek, amelyekben a szfingozin bázishoz

amidkötéssel kapcsolódik egy zsírsav. Mivel a molekulához nem kapcsolódik egyéb poláris csoport, mint például a szfingomielinek esetén, jellegzetes tulajdonságuk, hogy nagyon kicsi feji régióval, ennek köszönhetően pedig rendkívül különleges biofizikai jellemzőkkel rendelkeznek, különösen, mivel egyidejűleg számos hidrogénkötést alakíthatnak ki a szomszédos, általában szintén ceramid típusú lipidekkel. Ennek köszönhetően speciális membrándoméneket, úgynevezett ceramidplatformokat hozhatnak létre (180, 181), amelyek (pato)fiziológiai jelentőségéről még a későbbiekben lesz szó (I./12. fejezet). A ceramidok a membránok biofizikai jellemzőit is különleges módon befolyásolják. Kis feji régiójuk révén ugyanis ezen molekulák rendkívüli tulajdonságokkal bírnak, amelyek közé tartozik, hogy extrém mértékben hidrofóbak, a molekulák nagy sűrűségű pakolódását teszik lehetővé, illetve a membránok spontán negatív görbületét facilitálják (182). Ezzel összhangban különböző lipidösszetételű modellmembránokban és különféle mérési módszerekkel is kimutatták, hogy a ceramidok jelenléte nagyban, a koleszterinhez képest is jelentősebb mértékben fokozza a kettősrétegek molekuláris rendezettségét (183). Élő sejtekben is azt találták, hogy a ceramidok termelődésének növekedése a ceramid-szintáz enzim fokozott expressziója vagy bakteriális szfingomielinázal való kezelés által növeli a TMA-DPH és egyéb rendezettségre érzékeny próbák fluoreszcencia anizotrópiáját, azaz a membránok viszkozitását (158), illetve a sejtek exogén ceramidokkal történő kezelése a rendezettség fokozása révén csökkenti a membránban található molekulák laterális diffúziójának sebességét (184).

A membránt alkotó és annak szerveződését meghatározó lipidek egy másik jelentős csoportját képezik a glikoszfinolipidek. Ezen csoport legegyszerűbb szerkezetű tagjai és egyben a bonyolultabb formák prekursorai a glükozilceramidok, amelyekben a ceramid vázhoz egy glükóz molekula kapcsolódik. A glikoszfinolipidek általános tulajdonsága, hogy a sejtmembrán lipidtutaj mikrodoménjeiben dúsulnak és részt vesznek azok szervezésében is (185-189). Elsősorban a koleszterinnel való preferenciális kölcsönhatásuk révén hozzájárulnak a szegregált lipidtutajok kialakulásához, valamint általánosságban fokozzák a kettősréteget alkotó lipidek rendezettségét. Modellmembránokban ugyanis azt figyelték meg, hogy a glükozilceramidok jelenlétében növekedett a molekuláris rendezettségre érzékeny fluorofórok anizotrópiája, azaz a csökkent a fluiditás mértéke (187, 190). Hasonló változásokat figyeltek meg élő sejtekben is. A glükozilceramidok felhalmozódásának hatására ugyanis a sejtmembrán Laurdan-nal történő jelölését követően a festék generalizált polarizációjának emelkedése, azaz a membránok hidrációjának csökkenése volt látható mind humán bőr eredetű fibroblasztokban (190), mind pedig THP-1 monocita eredetű makrofágokban (155). Utóbbi sejtekben kutatócsoportunk korábban azt is kimutatta, hogy a di-8-ANEPPS gerjesztési aránya, azaz a

sejtmembrán dipólpotenciálja is megnő a glükoszilceramidok magasabb szintje esetén (172). Összességében tehát az irodalomban fellelhető eredmények többsége azt támasztja alá, hogy mind a glükoszilceramidok, mind pedig a ceramidok fokozzák a biológiai membránok rendezettségét, bár modellmembránokban végzett összehasonlító elemzések már felvetették, hogy a két lipid hatásaiban, illetve különösen azok mértékében akár jelentős eltérések is lehetnek (187, 188), amelyeket azonban élő sejtekben még nem vizsgáltak.

I./9. A ceramidok feszültségkapuzott káliumcsatornákra kifejtett elektrofiziológiai hatása

Korábbi vizsgálatokban a ceramidok általánosságban gátló jellegű hatásokat fejtettek ki a K_v szupercsalád különböző tagjaira, így többek között a K_v1.5 (191), K_v2.1 (191, 192) és a K_v11.1 ioncsatornák esetében is (193-196). Ezek a tanulmányok azonban jellemzően a csatornák alapvető elektrofiziológiai paramétereire gyakorolt hatások leírására korlátozódtak, a részletes molekuláris mechanizmusok vizsgálata nélkül. Ezen felül a glükoszilceramidok ioncsatornákra gyakorolt hatásai gyakorlatilag teljesen ismeretlenek. Korábbi eredmények alapján a membránban található ceramidok gátló hatást gyakorolnak a K_v1.3 ioncsatornára azáltal, hogy i) gátolják a patch-clamp technikával mért teljes sejt áramokat; ii) csökkentik a csatorna nyitási valószínűségét anélkül, hogy befolyásolnák az egyedi csatorna vezetőképességet (197, 198); valamint iii) az egyensúlyi aktivációt jellemző konduktancia-feszültség görbe (G-V) jobbra történő eltolódását eredményezik, ami révén a csatorna nyitása a pozitívabb membránpotenciál értékeken következik be. (199). Annak ellenére, hogy ezek a jelentős funkcionális változások jól dokumentáltak, a membránban található ceramidok hatásának mechanizmusa jórészt feltáratlan. Nem ismert, hogy a ceramidok elektrofiziológiai hatásai a K_v1.3 ioncsatorna mely molekuláris szerkezeti elemén keresztül érvényesülnek, továbbá az sem tisztázott, hogy a membránban felhalmozódó ceramidok indirekt, membránbiofizikai paraméterek módosításán keresztül kifejtett hatásai milyen mértékben járulnak hozzá a csatorna működésének módosításához. Ezen információk megismerése mind a ceramidok hatásmechanizmusának, mind a K_v1.3 ioncsatorna kapuzásának, mind pedig a különböző patológiás állapotok alaposabb megértése szempontjából is kiemelt jelentőségűek.

I./10. Lipidek hatásmechanizmusának vizsgálata: a lipidek ioncsatornákon belüli támadáspontjának meghatározása kételektródás voltage-clamp fluorimetriával

Az általunk alkalmazott kételektródás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF) az elektrofiziológiai és fluoreszcencián alapuló technikák egyedülálló kombinációja. Különlegessége, hogy lehetővé teszi a VSD és a PD mozgásának egyidejű nyomon követését a teljes kapuzási folyamat során. Előbbit úgy érhetjük el, hogy a VSD extracelluláris részén

található S3-S4 linker régióba pontmutációval létrehozott ciszteinhez egy ciszteinre specifikus fluoreszcens festéket kapcsolunk. Depolarizáció során az S4 hélix kifelé mozdul a membrán síkjából, amit a festék kvantumhatásfokának megváltozása révén a fluoreszcens jel intenzitásváltozásával tudunk detektálni. Eközben a PD mozgását a hagyományos patch-clamp technikához hasonlóan az ionáramok mérésével monitorozhatjuk (200). Ezért a TEVCF kivételes lehetőséget kínál a lipidek összetett hatásmechanizmusának vizsgálatára, kiváltképp annak megválaszolására, hogy a csatorna melyik doménje a ceramidok elsődleges intramolekuláris célpontja: vagyis hogy ezek a sejtmembránban akkumulálódó lipidek a VSD-t vagy a PD-t célozzák-e meg komplex elektrofiziológiai hatásuk kifejtéséhez (2, 9)? Korábbi kísérleteinkben kutatócsoportunk a TEVCF alkalmazásával a membránban található szterolok gátló hatásait, illetve azok intramolekuláris célpontjait vizsgálta különböző Kv csatornákon. Kutatócsoportunk kimutatta, hogy ezen szterolok gátló hatásukat a Kv1.3 és Kv10.1 csatornák VSD-jének módosítása helyett valószínűsíthetően közvetlenül a PD-t célozva fejtik ki (201). A kísérleteken alapuló modell alapján a szterolok a PD működését gátolhatják azáltal, hogy az aktiváció során közvetlenül gátolják a pórus nyitását. Ezen következtetést támasztotta alá a mérések során tapasztalt, a szterolok hatására megfigyelhető lassuló áramaktivációs kinetika, a jobbra tolódott G-V görbe, a csökkent áramamplitúdó és az alacsonyabb egyedi csatorna konduktancia. A mérések során az egyedi csatornák nyitási valószínűségében, vagy a VSD mozgását jellemző fluoreszcens jel egyensúlyi aktivációjában (fluoreszcencia intenzitás-feszültség görbe, F-V görbe) és kinetikájában nem volt megfigyelhető szignifikáns változás. Ilyen vagy hasonló kísérletes eredmények a membránban található ceramidokkal kapcsolatban azonban még nem születtek.

I./11. Lipidek hatásmechanizmusának vizsgálata: A direkt és indirekt lipidhatások

Amíg a TEVCF értékes információt szolgáltat a lipidek ioncsatornákra kifejtett hatásainak intramolekuláris célpontját illetően, a további kísérleteink során használt, fluoreszcencián alapuló technikák és a membrán-mikrokörnyezetre érzékeny fluorofórok segítségével a membrán biofizikai tulajdonságaiban történő változásokat is detektálhatjuk. Ezáltal további betekintést nyerhetünk a hatásmechanizmusba úgy, hogy a sejtmembránban felhalmozódó ceramidok és glükoszilceramidok indirekt, a sejtmembrán biofizikai tulajdonságainak megváltoztatásán keresztüli hatásait is tanulmányozni tudjuk (2, 156, 172, 174). Ahogy azt korábban is bemutattuk, a membránok biofizikai jellemzői szorosan összefüggenek az azokban található lipidek molekuláris elrendeződésével, amelyet leggyakrabban három rendezettséghez kapcsolódó paraméterrel jellemeznek: ezek a membrán

fluiditása, a hidrációja és dipólpotenciálja, amelyek a kettősrétegek különböző mélységi rétegeiben lévő szerkezeti elemek rendezettségét írják le (2, 151-153) (**5. ábra**). Ezen jellemzőket a membránlipidek mennyisége és minősége alapvetően befolyásolja. Például mind a ceramidok, mind a glükoszilceramidok megnövekedett szintjét korábban a membrán fluiditásának és hidrációjának csökkenésével hozták összefüggésbe élő sejtekben végzett kísérletek alapján (155, 158, 184, 190). Figyelembe véve a membránok biofizika tulajdonságai és a membránban található fehérjék működése közötti szoros kapcsolatot (1, 2), felmerül annak a lehetősége, hogy a membránban található ceramidok és glükoszilceramidok indirekt mechanizmusokon keresztül, a membránban zajló szerkezeti átrendeződések módosításával befolyásolhatják az ioncsatorna működését a kapuzás során. A csatorna aktivációs kapuzása során bekövetkező konformációváltozások ugyanis, ahogy azt az **1. ábra** is mutatja, éppen ezekben a membránrégiókban zajlanak.

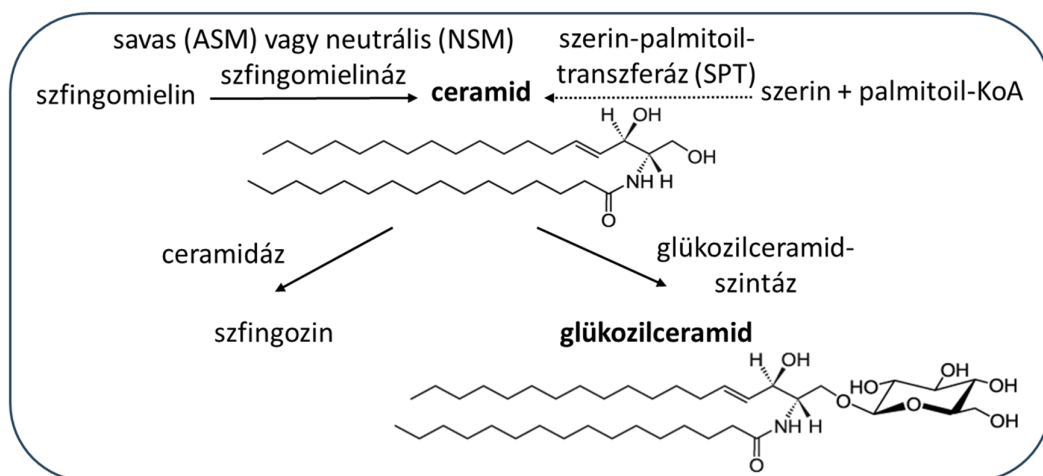
A membránlipidek kvalitatív és kvantitatív változásai képesek módosítani a membrán biofizikai paramétereit, amelyek indirekt mechanizmusokon keresztül befolyásolhatják a csatorna szerkezeti átrendeződéseit, ezáltal az aktivációs kapuzást is (1, 2). Irodalmi adatok szerint például a megváltozott membránfluiditás és -elaszticitás befolyásolhatja különböző ioncsatornák, köztük a Piezo és a térfogatszabályozott anioncsatornák (VRAC) mechanoszenzitív működését (3, 164), a magasabb dipólpotenciál K_v csatornáknál módosíthatja a feszültségérzékelést (202) vagy akadályozhatja a pórus mozgását (201), míg a membránban a csökkent fluiditás és laterális stressz a nagy konduktanciájú káliumcsatorna (BK) zárt állapotának kedvez, ami az egyedi csatornák alacsonyabb nyitási valószínűségéhez vezet (203, 204). Ezzel összhangban kimutatták, hogy a szfingomielináz indukálta endogén ceramidtermelés a Piezo1 csatorna inaktivációs tulajdonságának elvesztését váltja ki endotélsejtekben, ami elsősorban a membránnal kapcsolatos indirekt hatásokból ered, lehetővé téve a csatorna tartós aktiválását és ezáltal hozzájárulva a vérnyomás szabályozásához (205).

I./12. A ceramidok szintézise, patofiziológiai jelentősége, szerepük a sejthalál során

Bár a membránlipideket sokáig pusztán szerkezeti elemeknek tekintették, mára már kiderült, hogy a molekulacsalád számos tagja „bioaktív” vegyület, azaz mennyiségük különféle stimulusokra adott válaszként jelentősen megváltozik és ez következményesen különböző célmolekulák szintjét és aktivitását befolyásolja. Azaz tulajdonképpen ezek a lipidek a sejtfunkciókat szabályozó hálózatok elemeiként, jelátviteli molekulákként viselkednek (206, 207). Ezen lipidek közé tartoznak más szfingolipidek mellett a ceramidok is. Ennek megfelelően a ceramidok és általánosságban a szfingolipidek mennyisége fiziológiás

körülmények között rendkívül szigorúan szabályozott, amelyért számos enzim, illetve különböző intracelluláris organelumot (endoplazmás retikulum, Golgi, lizoszómák, mitokondriumok és maga a plazmamembrán) érintő kompartmentalizációs és transzportfolyamat bonyolult hálózatának összehangolt működése felelős. Leegyszerűsítve, a szfingolipid metabolizmus központi vegyületei a ceramidok, amelyek a többi, bonyolultabb származék (például ceramid-foszfátok, szfingomielinek, szfingozinok és származékaik, glükoszilceramidok és bonyolultabb gangliozidok) alapját képezik. A ceramidok képződése történhet *de novo* szintézis során főleg szerin és palmitoil-CoA felhasználásával, amely egyben a szubsztrátoknak a szfingolipideket érintő metabolikus útvonalakba történő belépési pontját is jelenti, valamint a komplex szfingolipidek lebomlása, egyfajta recirkuláció, újrahasznosítás során. A ceramidokat pedig különféle kináz, illetve szintáz enzimek alakítják át a bonyolultabb származékokká, valamint ceramidázok hidrolizálják szfingozinná (189, 206-209).

Fiziológiás körülmények között a fenti enzimek aktivitása úgy viszonyul egymáshoz, hogy a ceramidok szintjét csökkentő folyamatok dominálnak a termeléssel szemben, így általában ezen molekulák elenyésző mennyiségben vannak jelen a sejtmembránban, jellemzően a teljes membránlipid-tartalom kevesebb, mint 1%-át teszik ki. Bizonyos aktivációs szignálok hatására azonban a termelés és lebontás pontosan szabályozott egyensúlya eltolódik az előbbi irányába, ami a ceramidok felhalmozódásához vezet. Ezt kiválthatják különféle stresszhatások, így a TNF- α , az ionizáló sugárzás vagy citotoxikus vegyületek. Ezen ingerek ugyanis a ceramid termeléséért felelős enzimek aktivációjához vezetnek. Ezen enzimek közé tartozik a *de novo* szintézis sebességmeghatározó lépését katalizáló, főleg az endoplazmás retikulumban található szerin-palmitoiltranszferáz (SPT), illetve az elsősorban a plazmamembránban és a Golgiban található neutrális (NSM) és a főleg az endolizoszomális rendszerbe, illetve kisebb mértékben a plazmamembránba lokalizálódó savas szfingomielináz (ASM). Utóbbi két enzim a membránokban fiziológiásan is nagy mennyiségben előforduló és egyben a leggyakoribb szfingolipideknek tekinthető szfingomielineket bontja ceramiddá és foszfokolinná (152, 206, 209). Mindhárom enzim közös jellemzője, hogy aktivitásuk erősen függ a lokális pH-tól (210-212) (6. ábra).



6. ábra: A C16-ceramid és C16-glükózilceramid szerkezete és termelésük főbb lépései.

A ceramidok két fő útvonalon keresztül termelődhetnek a sejtben. Az egyik útvonal a szfingomielin lebontása a savas vagy neutrális szfingomielináz által, a másik a *de novo* többlépcsős szintézisük szerinből és palmitoil-KoA-ból, amely folyamatnak a legfontosabb, sebességmeghatározó enzime a szerin-palmitoil-transzferáz. A ceramidokból a glükózilceramid-szintáz állítja elő a glükózilceramidokat. Az ábrán a kísérletekben alkalmazott C16-ceramid és C16-glükózilceramid szerkezetét tüntettük fel.

A ceramid mennyisége többszörösére nőhet a membránokban az SPT, az NSM vagy az ASM aktivációjának következtében, amely különböző mechanizmusokon keresztül vezethet a célfehérjék funkciójának modulációjához. Egyrészt a ceramid közvetlenül kötődhet bizonyos proteinekhez megváltoztatva azok aktivitását, amint azt korábban kimutatták a PP1 és PP2A családba tartozó protein foszfatázok (PP) és a foszfolipáz D esetén, ami végül a számos jelátviteli folyamatban szereplő protein kináz B, C és ezrin fehérjék működését és megváltoztathajta (189, 206). Másrészt a ceramidok korábban már említett asszociációs tendenciája révén speciális összetétellel és szerkezettel rendelkező, úgynevezett ceramidplatformokat alakíthatnak ki. Ezekről a membrán mikrodoménekről ismert, hogy rendkívül fontosak a membrán laterális szerveződése szempontjából (181). Kimutatták például, hogy az NSM aktivációja által kiváltott ceramidtermelés és platformképződés szerepet játszik az exoszómák képződésében és szekréciójában, azaz a sejtek kommunikációjában a neurális fejlődés és a neurodegeneráció során (213). Emellett megfigyelték, hogy számos, sejthalálhoz vezető inger, így a TNF- α , Fas, CD40, LPS, az integrin elvesztése, oxidatív stressz, UV fény, ionizáló sugárzás, valamint különféle kemoterapeutikumok, mint a ciszplatin, gemcitabin, doxorubicin vagy etopozid is az ASM vagy NSM aktivációján keresztül a ceramid felhalmozódását és platformok képződését indukálja. Ezek a mikrodomének viszont kompartmentalizálják a transzmembrán receptorokat és más, jelátviteli folyamatokban szereplő molekulákat, facilitálva azok asszociációit, kölcsönhatásait és ezáltal magát a jelátvitelt is. Ez pedig fontos az apoptózis, nekroptózis, nekrozis, sejtöregedés, autofágia és az endoplazmás

retikulum stressz indukciója, valamint a sejtciklus leállítása során számos sejttípus esetén (181, 209).

Ezzel összhangban sokféle patológiás állapotban felvetették a ceramidok, illetve szintjük terápiás módosításának jelentőségét. A ceramidok sejthalálhoz vezető, valamint a sejtciklust leállító folyamatokban játszott szerepével összhangban például azt találták, hogy különféle tumoros sejtekben a normálisnál alacsonyabb a ceramidok szintje és fokozott a ceramidázok aktivitása, illetve kiterjedten vizsgálják utóbbi enzimek gátlásának terápiás lehetőségét (152, 206, 209). Emellett kimutatták a ceramidok magasabb szintjét elhízásban és metabolikus szindrómában, valamint *in vivo* tanulmányok alapján ennek szerepe lehet az inzulin rezisztencia és a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásában is, illetve az SPT inhibitorok kedvezően befolyásolhatják ezen állapotokat (214, 215). A ceramid megnövekedett szintje hozzájárulhat a neuronok pusztulásához és a krónikus gyulladás kialakulásához Alzheimer-kórban és egyéb neurodegeneratív kórképekben is, míg a ceramid metabolizmusának befolyásolása terápiás lehetőséget jelenthet ezen megbetegedésekben (216, 217).

A ceramidokhoz képest bonyolultabb szfingolipidek előbbiektől abban különböznek, hogy a ceramidvázhoz a molekula feji régiójában különféle poláris kémiai csoportok, a glikoszfingolipidek esetén szénhidrátsoportok kapcsolódnak. Utóbbi család legegyszerűbb tagjait képezik a glükozilceramidok, amelyek a további, komplex szénhidrátsoportokat tartalmazó formák, mint a gangliozidok előalakjai is egyben. A glükozilceramidok a ceramidokból képződnek oly módon, hogy a ceramid-glükoziltranszferáz vagy más néven glükozilceramid-szintáz egy glükózt illeszt a ceramid C1 pozícióban található hidroxilcsoportjához, majd azok további lépésekben komplex glikoszfingolipidekké alakulhatnak. A glükozilceramidok ceramidokká történő lebontását a glükozilceramid- β -glükozidáz vagy más néven β -glükocerebrozidáz (GBA) végzi (189, 206, 207, 218). Bár a glükozilceramidok a legtöbb sejt- és szövettípusban sokkal nagyobb mennyiségben fordulnak elő a celluláris membránokban, mégis újabb kísérletes eredmények alapján „bioaktív kandidánsnak” tekinthetők. A glükozilceramidok és más glikoszfingolipidek nagy affinitást mutatnak a membránban található koleszterin molekulák iránt, ugyanis előbbiek viszonylag nagy hidrofil feji csoporttal rendelkeznek, így laterális kapcsolódásuk során a lényegében hidrofil fej nélküli, erősen hidrofób koleszterin hatékonyan képes kitölteni a hidrofób farki régiók közötti teret. Ezáltal a molekulák szoros pakolódása jöhet létre, amely a rigid lipidtutaj mikrodomének képződésének alapfolyamatát képezi. Ezzel összhangban ismert, hogy a glikoszfingolipidek a lipidtutajokban dúsulnak és azok szervezésében, biofizikai tulajdonságainak meghatározásában és a különféle fehérjék ezen mikrodoménekbe történő

akkumulációjában, ezáltal a jelátviteli folyamatokban is fontos szerepet játszanak mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között (185-189).

A glükoszilceramidok fiziológiás szerepével összhangban ismert, hogy az ezen molekulák lebontása szempontjából legfontosabb enzim, a lizoszomális β -glükocerebrozidáz (GBA1) defektusa és a szubsztrát felhalmozódása révén alakul ki a leggyakoribb lizoszomális tárolási betegség, a Gaucher-kór. A betegség leginkább a központi idegrendszer sejtjeit és a makrofágokat érinti és a glükoszilceramidok megnövekedett mennyisége a neuronok fokozott ER stresszával, neurotoxikus behatásokkal szembeni nagyobb érzékenységgel és pusztulásával, valamint a pro- és antiinflammatorikus citokinek közötti egyensúly megbomlása miatt krónikus gyulladásos folyamatok megjelenésével jellemezhető (218, 219). Az is ismert, hogy a GBA1 alulműködése és a glükoszilceramid felhalmozódása a Gaucher-kórral patogenetikai szempontból sok hasonlóságot mutató neurodegeneratív betegség, a Parkinson-kór fontos rizikófaktora és feltételezések szerint patofiziológiai tényezője lehet (220, 221). Emellett számos daganatban kimutatható a glükoszilceramid-szintáz túlműködése, amely a glükoszilceramid mennyiségének megnövekedésén keresztül serkentheti a tumorok növekedését, áttétképzését és a multidrog rezisztencia kialakulását a foszfoinozítid 3-kináz/protein kináz B és mitogén-aktivált protein kináz fehérjék által mediált jelátviteli útvonalak működésének megváltoztatása révén. Emellett a megváltozott glükoszilceramid szinteknek szerepe lehet a daganatokhoz társuló krónikus gyulladás, fokozott oxidatív stressz és metabolikus eltérések kialakulásában is (218, 222). Bár mint látható, mind a ceramidok, mind pedig a glükoszilceramidok szintjének eltérései biológiailag releváns módon megváltoztathatják különféle fehérjék, így végső soron a különböző sejtfunkciók működését is, ezen vegyületek ioncsatornákkal kialakuló esetleges kölcsönhatásai még feltáratlanok. Ezek felderítése azonban számos kórkép esetén hozzájárulhatna akár a betegségek jobb megértéséhez, akár pedig új terápiás lehetőségek felderítéséhez is.

II. CÉLKITŰZÉSEK

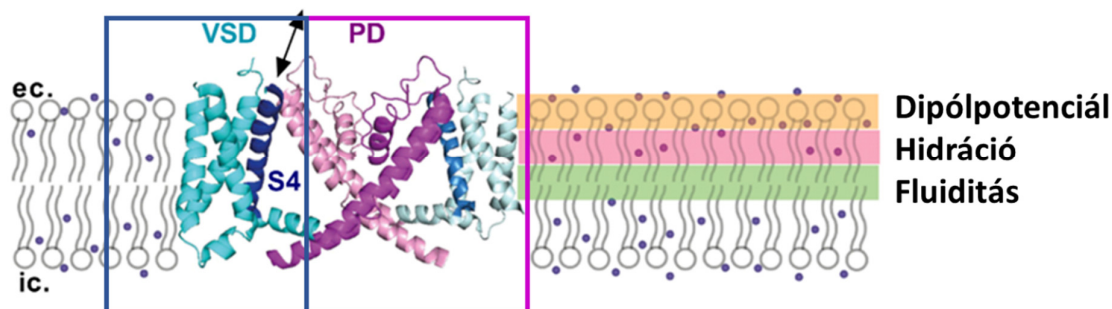
Ahogy azt a bevezetésben is bemutattuk, a feszültségkapuzott ioncsatornák és a lipidek közötti kapcsolat igen összetett. Egyrészt aktivációjukkor az aktivációs kapu nyitásával járó jelentős konformációs változások a környező lipid molekulák szoros együttműködésével zajlanak. Ez lehetőséget teremt arra, hogy a lipidek mind ligandszerű, direkt molekuláris kölcsönhatások révén, mind pedig indirekt, a lipidek által meghatározott membránbiofizikai tényezőkön keresztül befolyásolják a csatornák működését. Míg bizonyos membránlipidek, leginkább a koleszterin feszültségkapuzott ioncsatornák kapuzására kifejtett hatásai és azok mechanizmusa széles körben dokumentált, sokkal kevesebbet tudunk a membránban található ceramidok, köztük a C16-ceramid (Cer) és különösen a glükozilceramidok, így például a C16-glükozilceramid (GlcCer) feszültségkapuzott ioncsatornák aktivációs kapuzására gyakorolt hatásairól és azok mechanizmusáról. A kapcsolat kétirányúságát jelzi, hogy nemcsak a ceramidok képesek a feszültségkapuzott ioncsatornákra hatni, hanem a feszültségkapuzott ioncsatornák aktivitása is képes lehet a ceramidok szintjét módosítani azok szintézisének, illetve lebontásának befolyásolásán keresztül. Mivel a ceramidszintézist a sejten belül pH-szenzitív enzimek végzik, így kézenfekvő, hogy a Hv1 protoncsatorna aktivitása a sejten belüli pH egyensúlyának módosítása révén képes lehet befolyásolni a sejtek ceramidszintjét. Ahogy a bevezetésben is részleteztük, a ceramidok szintjének sejten belüli növekedése pedig számos, akár fiziológiás, akár patofiziológiás folyamat elindulásához vezethet, többek között befolyásolhatja a sejtek életképességét. Szintén ismert, hogy a Hv1 gátlás által okozott komplex intracelluláris pH-szabályozási zavar több sejtípus esetében is együtt jár a sejthalál folyamatainak beindításával (15-19). A Hv1 gátlás és a ceramidszint növekedésének kapcsolatát és annak részleteit azonban még nem sikerült tisztázni egyik sejtípusban sem.

A disszertációban bemutatott kutatások így 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 és C16-glükozilceramid 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 közvetíthetnek; 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 C16-ceramid és C16-glükoszilceramid töltéseket alkalmazó kételektródás voltage-clamp fluorimetriás méréseink során azokat a fő elektrofiziológiai paramétereket határoztuk meg, amelyek ezen ceramidok ionáramra kifejtett hatásait írják le (7. ábra lila négyzet). A VSD mozgását monitorozó fluoreszcens jel változásának vizsgálata pedig lehetővé teszi ezen lipidek intramolekuláris célpontjának feltárását betekintést nyújtva a hatásmechanizmusba (7. ábra kék négyzet). 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 fluiditást (zölden sátirozott terület), majd a hidráció (pirosan sátirozott terület), míg a legkülső, membrán víz-határfelületen a dipólpotenciál (narancssárgán sátirozott terület) eltéréseit.

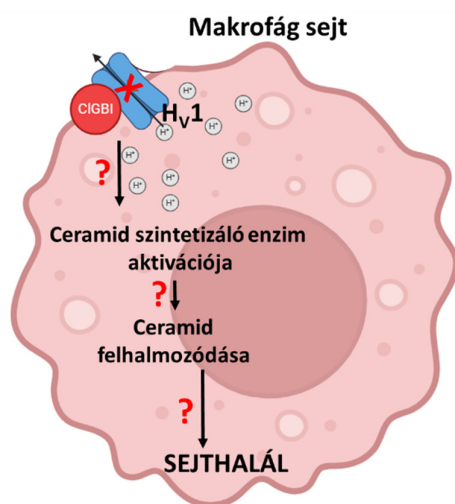


7. ábra: A disszertáció első célkitűzése a membránba ágyazódó C16-ceramid és C16-glükoszilceramid Kv ioncsatornák aktivációs kapuzására kifejtett elektrofiziológiai hatásainak és azok mechanizmusának vizsgálata.

A kétféle ceramid elektrofiziológiai hatásainak vizsgálatára kételektródás voltage-clamp fluorimetria segítségével kontroll esetekben és a membrán ceramidöltését követően meghatároztuk a pórus aktivációját jellemző paramétereket (lila négyzet). Az ionáramok mérésével egyidőben rögzített, a VSD mozgását leíró, fluoreszcens jelet jellemző paramétereknek meghatározásával betekintést nyerhetünk a ceramidok hatásmechanizmusába meghatározva azok intramolekuláris célpontját. A mechanizmus további feltárásának érdekében azt, hogy a kétféle ceramid hatásai tekintetében mennyire játszanak szerepet az ezen lipidek szintjeinek változásából fakadó indirekt hatások, a C16-ceramid és C16-glükoszilceramid membránbiofizikai hatásainak vizsgálatával jellemeztük, karakterizálva a lipidtöltések hatásait a membránt különböző mélységben jellemző fluiditás, hidráció és dipólpotenciál tanulmányozásával.

2. A disszertációban ismertetett második kutatásunk fő célja az volt, hogy vizsgáljuk 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 membránbeli ceramidszintjeinek meghatározása révén meghatározzuk, hogy a Hv1 ionáram gátlása hogyan befolyásolhatja a sejtekben a pH-érzékeny ceramid szintézist; valamint iii) bizonyítsuk a csatorna gátlása kapcsán fellépő életképesség-csökkenés és a ceramidszintek változása közti direkt kapcsolatot azáltal, hogy megvizsgáljuk, hogy a csatorna gátlásával egyidejűleg a ceramidszintézis gátlása képes-e kivédeni a makrofágok életképességbeli változásait (8. ábra).



8. ábra: A disszertáció második célkitűzése az volt, hogy vizsgáljuk, hogy a Hv1 ioncsatorna CIGBI általi gátlása hogyan befolyásolja humán polarizált makrofágok életképességét, és a mechanizmus feltárása érdekében vizsgáljuk a ceramidok szerepét a folyamatban.

Mivel a Hv1 protoncsatorna aktivitása révén képes protonokat kijuttatni a citoplazmából, működése fontos meghatározója a sejtek különböző kompartmentjeiben uralkodó pH-egyensúlynak. Kézenfekvő ezáltal, hogy gátlása így mind a citoplazmatikus, mind pedig a lizoszomális pH befolyásolása révén képes lehet a pH-szenzitív, ceramidot szintetizáló enzimek aktivitását módosítani, ami a ceramid szintjének emelkedése révén sejthalálhoz vezethet. Annak ellenére, hogy a Hv1 ioncsatorna fontos szerepet tölt be humán makrofágok működésében, korábban nem vizsgálták, hogy az ioncsatorna farmakológiai gátlása sejthalálhoz vezet-e ezen sejtekben, illetve a mechanizmusban részt vesz-e a ceramid felhalmozódása.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

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

A különböző ceramidok elektrofiziológiai hatásainak tanulmányozása során humán Kv1.3 (KCNA3, Uniprot B2RA23) A309C mutáns csatornát alkalmaztunk, amire az egyszerűség kedvéért az eredmények bemutatása során Kv1.3 ioncsatornaként hivatkozunk. Ezen csatorna extracelluláris S3-S4 linker régiójában egy pontmutációval bevitt cisztein található, amelyről korábban kutatócsoportunk bebizonyította, hogy optimális a TEVCF mérések számára, ugyanis a mutáció nem befolyásolja a csatorna kapuzását, a bevitt cisztein specifikus jelölése pedig megfelelő fluoreszcens jel-zaj arányt eredményez a TEVCF mérések során (201). A pontmutációt korábban a pBSTA vektorban levő vad típusú csatornából kiindulva állította elő a munkacsoport (QuikChange; Agilent, Santa Clara, CA Egyesült Államok), a mutáció sikerességét a plazmid szekvenálásával igazolták. A csatornát kódoló mRNS szintéziséhez a mutáns csatornát kódoló plazmidot egy helyen hasító HindIII enzimmel linearizáltuk, majd az Invitrogen mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) segítségével mRNS-sé írtuk át. Az mRNS-eket az injektálásig -80 °C-on tároltuk a kelvinátorban.

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 inkubáltuk, amely 93 mM NaCl-t, 5 mM KCl-t, 1,8 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot, 5 mM HEPES-t és 50 mg/l Gentamycin-t tartalmazott, az oldat pH-ját pedig 7,4-re állítottuk. 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 spektrofluorimetriás 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.

III./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 μ M koncentrációban 24 órán keresztül végeztük úgy, hogy a lipideket ND93-ban (elektrofiziológiához) vagy médiumban (spektrofluorimetriához 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. Az általunk alkalmazott lipidtöltési koncentrációk és kezelési időtartamok összhangban vannak számos közelmúltbeli tanulmányban használtakkal (223-225).

III./3. Kételektrodás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF)

A TEVCF kísérletekhez az oocitákat 30 percig jégen 10 μ M 2-((5(6)-tetrametilrodamin)karboxi-amino)-etil-metántioszulfonáttal (TAMRA-MTS, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Kanada) jelöltük. A festéket egy depolarizáló oldatban hígítottuk, amely 110 mM KCl-t, 1,5 mM MgCl₂-ot, 0,8 mM CaCl₂-ot, 0,2 mM EDTA-t és 10 mM HEPES-t tartalmazott, pH-ja 7,1-re volt beállítva. 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 2–3 M Ω volt. A mérések során külső oldatként a mérőkamrában ND93 oldatot alkalmaztunk, míg a pipettákban 3 M KCl oldatot használtunk belső oldatként. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük.

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-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. Az ábrákon a fluoreszcencia görbék egyedi mérések során nyert Gauss-szűrővel filterezett, átlagolás nélküli adatokat mutatnak.

III./4. A TEVCF adatok elemzése

A Kv1.3 ioncsatornán végzett TEVCF mérések során az ionáramok és fluoreszcens jelek mérése esetén a mintavételezés 5 kHz frekvenciával történt 1 kHz-en történő szűrés 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 fotokioltság okozta torzító hatások kiküszöbölése érdekében a különböző membránpotenciálokra nyert fluoreszcencia adatokból kivontuk a feszültségfüggő változásokat nem mutató alapvonalbeli fluoreszcencia intenzitás átlagos értékét. Ezt követően az $F_{\text{norm}}-V$ 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

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

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 paraméterei 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, 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 ($\tau_{akt,s}$) komponensek aktivációs időállandóinak meghatározásához a következő kétkomponensű, 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.

III./5. A sejtmembrán fluiditásának és hidrációjának vizsgálata

A sejtmembrán fluiditásának és hidrációjának vizsgálatához, illetve az ezen paraméterekben a Cer és GlcCer hatására bekövetkező változások meghatározásához a 4'-(trimetil-ammonio)-difenil-hexatrién (TMA-DPH) fluoreszcencia anizotrópiáját, illetve a 6-dodekanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin (Laurdan) generalizált polarizációját (GP) számszerűsítettük a korábban leírt módon (156, 174). A TMA-DPH-t és a Laurdan a Sigma-Aldrich-től vásároltuk. A kontroll, illetve 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel 24 órán keresztül, 37°C-on kezelt CHO sejteket tripszinezés és mosás után Hank's pufferben 10 μ M TMA-DPH-val vagy 2 μ M Laurdan-nal jelöltük 20 percig szobahőmérsékleten. A TMA-DPH-val jelölt sejteket mosás nélkül 10⁶ /ml koncentrációra hígítottuk Hank's pufferben, míg a Laurdan-nal festett sejteket egyszer mostuk és 10⁶ /ml koncentrációban Hank's pufferben reszuszpendáltuk. A megfelelő fluoreszcencia paramétereket Fluorolog-3 spektrofluorométerrel (Horiba Jobin

Yvon, Edison, NJ, Egyesült Államok) mértük oly módon, hogy a küvettatartó hőmérsékletét keringtetett vízfürdővel 37 °C-ra állítottuk be.

A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiáját (r) L-formátumban határoztuk meg 352 nm-es gerjesztés és 430 nm-en történő fluoreszcencia intenzitás 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 érzékenységet 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 Laurdan fluoreszcens festéket 350 nm-en gerjesztettük, és emisszióját az emissziós spektrum két tartományában, 435 nm-en (I_{blue}) és 500 nm-en (I_{red}) detektáltuk. A Laurdan fluoreszcencia generalizált polarizációját (GP) a következő képlet szerint számoltuk ki:

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

III./6. A sejtmembrán dipólpotenciáljának meghatározása

A sejtmembrán dipólpotenciáljának nagyságában bekövetkező változások számszerűsítésére a di-8-ANEPPS (4-(2-[2-[6-(dioktilamino)-2-naftalinil]etenil)-1-(3-szulfopropil)]piridinium belső só) feszültségérzékeny fluorofór használatával és a konfokális mikroszkóppal végzett gerjesztési aránymérési vizsgálatot alkalmaztuk a korábban leírtak szerint (171, 172). A di-8-ANEPPS fluorofórt a Thermo Fisher Scientific-től szereztük be. A konfokális mikroszkópos mérések során a 8-lyukú fedőlemez aljú kamrákban növesztett kontroll, illetve 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel 24 órán keresztül 37 °C-on kezelt CHO sejteket mosás után 2 μ M di-8-ANEPPS-szel jelöltük 20 percig szobahőmérsékleten. A mosás után a sejtek középsíkjáról LSM880 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) felvételeket készítettünk 37°C-on. A di-8-ANEPPS-t 458 nm-en és 514 nm-en gerjesztettük, és a kibocsátott fluoreszcencia intenzitását 584 és 686 nm között mértük (I_{blue} és I_{red} a 458 nm-es, illetve 514 nm-es gerjesztés után). A kvantitatív képelemzés során a felvételeket membrán és nem-membrán pixelekre választottuk szét egy erre a célra készített vízfeltöltési algoritmussal, a MATLAB (MathWorks, Natick, MA, Egyesült Államok)

programkörnyezeten belül. Ezután a jellemzően 30-40 normál morfológiájú sejtet tartalmazó felvételeken kizárólag a sejtmembrán pixelek adataiból számítottuk ki a dipólpotenciál nagyságával pozitívan korreláló fluoreszcencia-intenzitás arány ($R_{exc} = I_{blue} / I_{red}$) átlagértékét, a háttérintenzitások kivonása után minden egyes kép esetén.

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

A sejtmembrán ceramid tartalmában a Cer és GlcCer hatására bekövetkező változások számszerűsítéséhez a 24-lyukú platen növesztett kontroll, illetve 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel 1, illetve 24 órán keresztül 37 °C-on kezelt CHO sejteket tripszinezés és mosás után jelöltük 15B4 anti-ceramid antitestekkel (Sigma-Aldrich) 60 percig szobahőmérsékleten, majd mosás után 20 percen át szobahőn Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált anti-egér IgM másodlagos antitestekkel (Thermo Fisher Scientific). A glükoszilceramid mennyiségének meghatározása során ennek alternatívjaképpen a fentiek szerint kezelt sejteket hasonló körülmények között anti-glükoszilceramid elsődleges (Glycobiotech, Kukels, Németország), majd Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitestekkel (Thermo Fisher Scientific) jelöltük. Ezután mindkét esetben mosást követően NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel (ACEA Biosciences, San Diego, CA, Egyesült Államok) mértük az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását 640 nm-en történő gerjesztést követően 660/20 nm-es emissziós sávszűrő alkalmazásával. Az FCS Express programban (De Novo Software, Los Angeles, CA, Egyesült Államok) végzett kvantitatív elemzés során az FSC-SSC szórásképen kapuzott, normál morfológiát mutató sejtek átlagos fluoreszcenciáját határoztuk meg minden minta esetén, majd normáltuk a kezeletlen, kontroll minták esetén kapott átlagértékekre.

III./8. A ceramid és glükoszilceramid kezelések CHO sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával

A Cer és GlcCer kezelések sejtek életképességére gyakorolt hatásainak vizsgálatához 24-lyukú platen növesztett CHO sejteket kezeltünk 5 és 160 μ M közötti koncentrációkban alkalmazott Cer-rel, illetve GlcCer-rel 24 órán keresztül 37 °C-on. Pozitív kontrollként 1 órán át tartó 0.5% Triton X-100 kezelést használtunk. A kezelések után összegyűjtöttük mind a kezelések során felvált, szuszpenzióban levő, mind pedig a tripszines emésztéssel felválasztott sejteket, majd mosás után a nekrozis detektálására jelöltük azokat 1:1000 hígításban alkalmazott Sytox Green Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific) festékkel, illetve az apoptózis azonosítására 1:20 hígításban alkalmazott Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált annexin V (Thermo Fisher Scientific) markerrel 15 percen át, szobahőmérsékleten. Ezután NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását.

A Sytox Green fluoreszcencia intenzitását 488 nm-es gerjesztést követően 530/30 nm-es emissziós sávszűrővel detektáltuk, míg az Alexa Fluor 647 fluorofór jelét 640 nm-en történő gerjesztést követően 660/20 nm-es emissziós sávszűrő alkalmazásával mértük. Az adatelemzés során FCS Express programban számszerűsítettük a mindkét markerre negatív, élőnek tekinthető sejtek összes sejthez viszonyított arányát minden minta esetén (lásd lentebb a 9. egyenletet).

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

A humán akut monocitás leukémiából származó THP-1 sejtvonalat az American Type Culture Collection cégtől szereztük be és a specifikációknak megfelelően tenyésztettük. A THP-1 sejteket 24 órán keresztül makrofágokká differenciáltattuk forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10 ng/ml végkoncentrációban, hogy elérjük a megfelelő differenciálódást és minimalizáljuk a nem specifikus génexpressziós változásokat (226, 227), amit 24 órás nyugalmi időszak követett PMA hiányában, hogy biztosítsuk az így kialakított makrofágok nyugalmi állapotban levő differenciált makrofág (M0 makrofág) fenotípusát (226, 228). Az M0 makrofágokat ezt követően 24-48 órán keresztül 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, egy széles körben alkalmazott protokoll szerint (229-232). Minden kezelést 37° C-on végeztünk.

III./10. A CD markerek plazmamembrán-expressziójának elemzése polarizált makrofágokban

A 6-lyukú platen növesztett differenciált és polarizált THP-1 makrofágokat mostuk és szobahőmérsékleten 5 percig Accutase-zal (Sigma-Aldrich) kezeltük, hogy a letapadt sejteket kíméletesen felválasszuk a sejtek életképességének veszélyeztetése nélkül (233). A sejttenyésztő médiummal történő leállítást és mosást követően a sejtek Fc-receptorait 20 percig blokkoltuk humán FcR blokkoló reagenssel (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország), amelyet 10 μ g/ml koncentrációban alkalmaztunk. Ezt követően a sejteket a következő antitestek egyikével jelöltük: FITC-konjugált anti-CD64 (4 μ g/ml koncentrációban), Alexa Fluor 647-konjugált anti-CD71 (4 μ g/ml), FITC-konjugált anti-CD80 (4 μ g/ml), PE-Cy5-konjugált anti-CD86 (1 μ g/ml), PE-konjugált anti-CD206 (0,5 μ g/ml). Minden antitestet a Thermo Fisher-től szereztünk be és 20 percig szobahőmérsékleten alkalmaztunk. Mosás után az egyedi sejtek fluoreszcencia-intenzitását NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük

a következő hullámhosszúságú gerjesztés és emissziós szűrők alkalmazása mellett: FITC - 488 nm és 530/30 nm; Alexa Fluor 647 - 640 nm és 660/20 nm; PE-Cy5 - 561 nm és 660/20 nm; PE - 561 nm és 586/20 nm. Az FCS Express programban végzett adatelemzés során minden egyes mintára kiszámítottuk az FSC-SSC pontdiagramon normál morfológiát mutató, legalább 10000 sejt átlagos fluoreszcencia-intenzitását. Az antitestek nemspecifikus kötődésének hiányát alátámasztották a megfelelő fluorofórokkal konjugált egér IgG1 és IgG2b kappa izotípus kontroll antitestekkel (Thermo Fisher) azonos kísérleti körülmények között nyert adatok.

III./11. Ioncsatorna gátlószerek polarizált makrofágok életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával

24-lyukú platen a THP-1 sejteket a fentiek szerint makrofágokká differenciáltattuk és polarizáltuk, majd 24 órán keresztül a sejtek médiumába adagolt ioncsatorna gátlószerekkel kezeltük. A ClGBI (5-kloro-2-guanidinobenzimidazol; Sigma-Aldrich) esetében 16 és 256 μM közötti koncentrációjú hígítási sorozatot használtunk, míg a többi kísérletben a sejteket 20 pM Vm24 skorpiótoxin (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael), 20 nM tetradoxin (TTX; Alomone Labs), 1 mM tetraetilammónium (TEA^+ ; Sigma-Aldrich), vagy 1 mM (névleges koncentrációjú) ZnCl_2 (Sigma-Aldrich) jelenlétében inkubáltuk. A ClGBI által kiváltott toxicitással szemben a ceramid termelését gátló előkezelések potenciális védőhatásának vizsgálatához 1 μM myriocint, 2 μM GW4869-et (N,N'-Bisz[4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-3,3'-p-fenilén-bisz-akrilamid dihidroklorid) vagy 5 μM ARC39-et (1-aminooktán-1,1-diil)bisz(foszfonsav) adtunk a polarizált M0, M1 és M2 makrofágokhoz 30 perccel a ClGBI alkalmazása előtt. Az életképes sejtek arányát a munkacsoportunk által korábban leírtak szerint (173, 174) a következőképpen számoltuk:

$$\text{életképes frakció} = \frac{\text{kettős negatív sejtek száma}}{\text{összes sejt száma}} \quad (9.)$$

Az életképes sejtek frakciójának vizsgálatánál összegyűjtöttük a felülúszót, amely a tenyésztőedény felszínéről felvált sejteket tartalmazta és összekevertük őket az Accutase-zal felválasztott adherens sejtekkel. Ezt a sejtuszpenziót Sytox Green Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific) és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V (Thermo Fisher Scientific) festékekkel jelöltük 1:1000, illetve 1:20 hígításban annexin kötő pufferben 15 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően a mérések a korábbi III./8. pontban bemutatottak szerint zajlottak. Mintánként legalább 10000 egyedi sejt fluoreszcencia intenzitását mértük NovoCyte 3000RYB áramlási

citométerrel. A Sytox Green és az Alexa Fluor 647 fluorofórokat 488, illetve 640 nm-en gerjesztettük és az emittált intenzitásokat 530/30, illetve 660/20 emissziós szűrőkkel mértük. Az adatelemzés során a Sytox Green és annexin V kettős negatív életképes sejtek frakcióját minden egyes minta esetében az FCS Express segítségével számoltuk ki.

III./12. A Hv1 expresszió meghatározása polarizált makrofágokban

A 12-lyukú plateben differenciált és polarizált THP-1 makrofágokat mosás után Accutase-zal felválasztottuk, majd 20 percig jégen metanollal (Sigma-Aldrich) fixáltuk. A 0,1%-os Triton X-100-ban (Sigma-Aldrich) történő permeabilizálás után a sejteket humán FcR blokkoló reagenssel és 5% BSA-val blokkoltuk 30 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejteket anti-Hv1 antitestekkel (5 µg/ml, PA5-24964, Thermo Fisher Scientific) jelöltük 60 percig szobahőmérsékleten, majd mosás után 1:500 hígításban alkalmazott Alexa Fluor 647-konjugált kecske nyúlelleses IgG antitestekkel (Thermo Fisher Scientific) 30 percig szobahőmérsékleten (19). Minden lépést 1% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó oldatban végeztünk. Az egyes sejtek fluoreszcencia intenzitását NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük 640 nm-es gerjesztéssel és 660/20-as emissziós sávszűrővel. A kiértékelés során az FSC-SSC plotokon normál morfológiát mutató legalább 10000 sejt átlagos fluoreszcencia intenzitását számoltuk ki minden egyes mintában FCS Express-ben. Az elsődleges antitest nonspecifikus kötődésének hiányát az azonos kísérleti körülmények között alkalmazott nyúl IgG izotípus kontroll antitesttel (Thermo Fisher) kapott adatok is alátámasztották.

III./13. A ClGBI polarizált makrofágok plazmamembránban található ceramid szintjére gyakorolt időfüggő hatásának elemzése

24-lyukú plateben a THP-1 sejteket makrofágokká differenciáltattuk és polarizáltuk a fentiek szerint, majd ezt követően 1, 4 vagy 18 órán keresztül 50 vagy 100 µM ClGBI-vel kezeltük, amelyet a sejtek médiumához adagoltunk. Mosást, Accutase-zal történő felválasztást és a fentiek szerinti FcR blokkolást követően a kezelt és kontroll M0, M1 és M2 sejteket 4 µg/ml koncentrációban alkalmazott ceramidellenes antitesttel (Sigma-Aldrich) jelöltük 60 percig szobahőmérsékleten, amit mosás és 20 perces festés követett 4 µg/ml Alexa Fluor 647-konjugált kecske egérelleses IgM antitesttel (Thermo Fisher Scientific), szobahőmérsékleten végzett festéssel. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel mértük 640 nm-es gerjesztéssel és 660/20-as emissziós sávszűrővel és az FCS Express programban minden egyes mintában legalább 10000 az FSC-SSC plotokon normál morfológiájú sejt átlagos fluoreszcencia intenzitását számoltuk ki. Az elsődleges antitestek

nemspecifikus kötődésének hiányát alátámasztották a megfelelő fluorofórral konjugált egér IgM izotípus kontroll antitestekkel (Thermo Fisher) azonos kísérleti körülmények között nyert adatok.

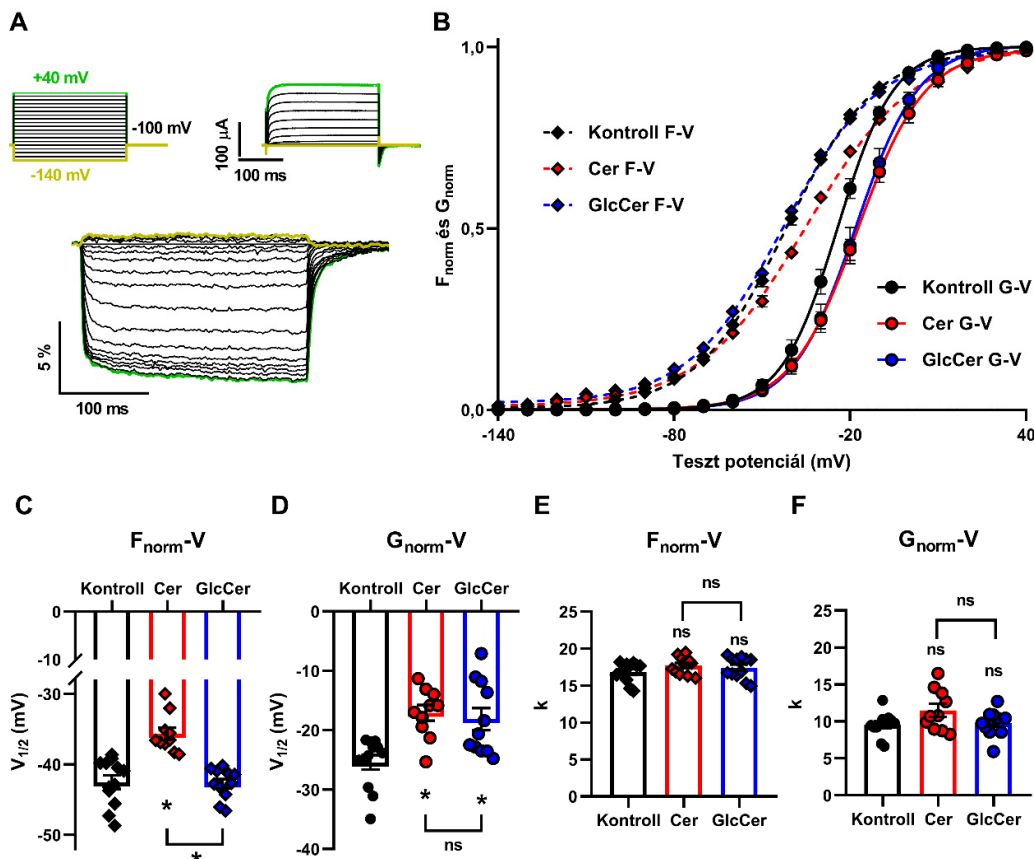
III./14. Statisztikai elemzés

A disszertáció ábráin az adatok átlagát $\pm$ SEM ábrázoltuk, és az adott elemzésekben szereplő független minták számát (n) az ábraaláírásokban jelöltük. Minden elektrofiziológiai kísérletet legalább 4 különböző békából származó n darab oocitán végeztük. A spektrofluorometria során a három független kísérletből nyert n független minta mindegyike körülbelül 100000 sejtet tartalmazott. A ceramidtöltéses kísérleteknél a konfokális mikroszkópos elemzés során minden kezelés esetén öt független kísérletből származó n számú képet rögzítettünk, amelyek felvételenként átlagosan 30-40 sejtet tartalmaztak. A makrofágok vizsgálatát célzó konfokális mikroszkópos méréseknél az eredmények öt független kísérletből nyert n egyedi sejtől származnak. Az áramlási citométerrel végzett méréseknél a legalább három független kísérletből származó n független minta 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 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

IV. EREDMÉNYEK

IV./1. A Cer és a GlcCer hatása a Kv1.3 ioncsatorna pórusdoménjének és feszültség szenzor doménjének egyensúlyi aktivációjára

A TEVCF mérésekhez ugyanazt a kísérleti elrendezést alkalmaztuk, amelyet korábban a koleszterin hatásmechanizmusának vizsgálatára (201). Kísérleteink során olyan mutáns Kv1.3 csatornát fejeztettünk ki *Xenopus laevis* afrikai karmosbeka oocitákban, amely extracelluláris S3-S4 linker szekvenciájában egy pontmutációval bevitt ciszteint tartalmazott (A309C). Az így bevitt cisztein a csatorna S4 hélixének tetejéhez közel, a VSD-ben helyezkedik el. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy ez a mutáns csatorna a vad típusú Kv1.3 ioncsatorna alapvető elektrofiziológiai tulajdonságait mutatja. A VSD mozgásának vizsgálatához a pontmutációval bevitt ciszteint a ciszteinre specifikus MTS-TAMRA-val jelöltük, ami korábbi munkánk alapján szintén nem okoz változást a Kv1.3 elektrofiziológiai paramétereiben (201). Méréseink során a TEVCF segítségével egyidejűleg rögzítettük az ionáramokat, ami alapján az áram-feszültség (I-V), majd konduktancia-feszültség (G-V) görbék határoztuk meg, továbbá külön rögzítettük a fluoreszcens jeleket, ami alapján a relatív fluoreszcencia intenzitás változás-feszültség ($\Delta F/F-V$) görbék határoztuk meg -140 és +40 mV közötti tartományban 10 mV-onként emelkedő depolarizáló impulzusokat alkalmazva. A depolarizáló impulzusok során az oocitákat -100 mV-os tartófeszültségről 250 ms-ig depolarizáltuk az adott teszt-potenciálra 30 másodpercenként (**9A ábra** bal felső panel). A reprezentatív áram- és fluoreszcenciagörbék a **9A ábra** jobb felső és alsó paneljein láthatók. A **9B ábrán** az F_{norm} és a G_{norm} átlagértékeit $\pm$ SEM ábrázoltuk a teszt-potenciálok függvényében, majd a pontokra Boltzmann-függvényt illesztettünk. Az $F_{\text{norm}}-V$ és $G_{\text{norm}}-V$ görbék félaktivációs feszültség értékeit ($V_{1/2}$) és meredekségi együtthatóit (k) az egyedi sejtek illesztéseiből határoztuk meg (**9C-F ábra**). Mivel a VSD aktivációja már a pórus nyitásánál negatívabb membránpotenciál értékeknél is megfigyelhető, az $F_{\text{norm}}-V$ görbék negatívabb teszt-potenciálokon jelennek meg a $G_{\text{norm}}-V$ görbékhez képest már kontroll körülmények között is (ennek megfelelően a kontroll sejtekben az $F_{\text{norm}}-V$ görbe esetében a $V_{1/2} = -42,5 \pm 1,0$ mV $n = 12$, míg a $G_{\text{norm}}-V$ görbék esetében a $V_{1/2} = -25,4 \pm 1,2$ mV, $n = 12$ volt).



9. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükozilceramid (GlcCer) hatása a Kv1.3 feszültségfüggő aktivációját jellemző egyensúlyi kapuzási paramétereire.

(A) A fluoreszcens jelek és az ionáramok egyensúlyi aktivációjának meghatározásához az A309C mutációt hordozó Kv1.3 ioncsatornákat *Xenopus laevis* oocitákban expresszáltattuk, majd MTS-TAMRA-val jelöltük. A kontroll oocitákat és a 24 órán keresztül 40 μM Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt sejteket -100 mV-os tartópotenciálról 250 ms-ig, -140 és +40 mV közötti tesztpotenciálokra depolarizáltuk 10 mV-os lépésekben, 30 másodpercenként. Az ábrán a feszültségprotokollok (bal felső panel), a kiváltott reprezentatív ionáramok (jobb felső panel) és a fluoreszcens jelek (alsó panel) láthatóak. (B) A normált fluoreszcencia intenzitás (F_{norm}) és a normált vezetőképesség (G_{norm}) értékek átlagát $\pm$ SEM értékeit $n = 10$ -12 sejten határoztuk meg, és az alkalmazott tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk (F_{norm} -V és G_{norm} -V görbék). Az ábrán feltüntetett szaggatott F_{norm} -V, valamint folytonos G_{norm} -V görbék az adatpontokra legjobban illeszkedő reprezentatív Boltzmann-függvényeket mutatják. (C-F) Az F_{norm} -V és a G_{norm} -V görbékéből $n = 10$ -12 egyedi sejten meghatározott félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$) és meredekségi együttható (k) átlagos értékei $\pm$ SEM lettek az oszlopdiagramokon ábrázolva. A csillagok (*) a kontrollhoz, vagy a Cer-rel és GlcCer-rel kezelt sejtek egymáshoz képest szignifikáns különbségeit jelezik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

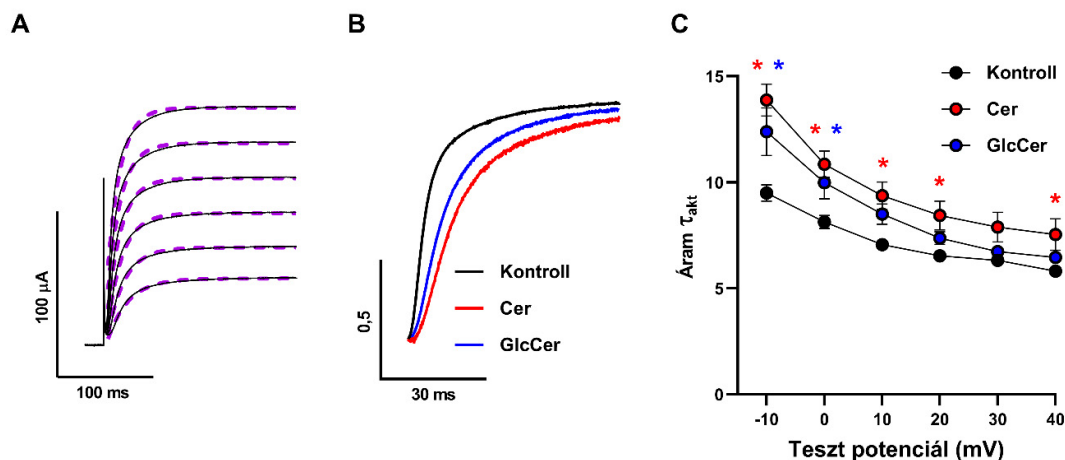
Ezeket a paramétereket olyan oocitákon is meghatároztuk, melyeket előzőleg 24 órán keresztül 40 μM Cer-rel vagy GlcCer-rel kezeltünk, majd az eredményeket összevetettük a kontroll, kezelés nélküli sejtek megfelelő értékeivel. A kontrollhoz képest a Cer a VSD mozgását jellemző F_{norm} -V görbe jobbra tolódását idézte elő, míg a GlcCer esetében ez a hatás az F_{norm} -V görbékben nem volt megfigyelhető (9B ábra). Az F_{norm} -V görbék változásait a görbék félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$) értékeinek meghatározásával számszerűsítettük. A kontroll

sejtekhez képest ($V_{1/2} = -42,5 \pm 1,0$ mV, $n = 12$) a Cer-rel kezelt sejtekben a félaktivációs feszültség értéke szignifikánsan pozitívabb irányba tolódott el ($V_{1/2} = -35,7 \pm 0,9$ mV, $n = 10$, $p < 0,0001$), ezzel szemben a GlcCer-rel kezelt oociták félaktivációs feszültsége statisztikailag nem különbözött ($V_{1/2} = -42,7 \pm 0,7$ mV, $n = 11$, $p = 0,9824$) (**9C ábra**). Ezzel szemben mind a Cer, mind a GlcCer kezelés hatására a pórus nyitásának feszültségfüggését jellemző $G_{\text{norm}}-V$ görbe jobbra tolódott (**9B ábra**), amit a $G_{\text{norm}}-V$ görbék félaktivációs feszültség értékeinek jelentős változása is mutatott. A kontroll sejtekhez képest ($V_{1/2} = -25,4 \pm 1,2$ mV, $n = 12$) szignifikánsan pozitívabb értékeket tapasztaltunk mind a Cer-rel ($V_{1/2} = -17,1 \pm 1,3$ mV, $n = 10$, $p = 0,0013$), mind pedig a GlcCer-rel ($V_{1/2} = -18,2 \pm 1,9$ mV, $n = 11$, $p < 0,0038$) kezelt sejtek esetében (**9D ábra**). Méréseink alapján nem észleltünk szignifikáns változásokat a görbék meredekségét jellemző k értékekben sem az $F_{\text{norm}}-V$ görbék esetében ($k = 16,8 \pm 0,4$, $n = 12$ a kontroll mintákban vs. $k = 17,7 \pm 0,4$, $n = 10$, $p = 0,2658$ a Cer kezelés után; és $k = 17,4 \pm 0,4$, $n = 11$, $p = 0,5167$ a GlcCer esetében), sem pedig a $G_{\text{norm}}-V$ görbék esetében ($k = 9,6 \pm 0,5$, $n = 12$ a kontrollokban vs. $k = 11,5 \pm 0,9$, $n = 10$, $p = 0,0907$ a Cer esetében; és $k = 9,8 \pm 0,5$, $n = 11$, $p = 0,9698$ a GlcCer esetében) (**9E-F ábra**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár a két lipid hasonló hatással van a pórusdomén mozgására és mindkettő a csatorna aktivációs küszöbét pozitívabb membránpotenciál értékek irányába tolja el (amit az egyensúlyi aktivációt jellemző $G_{\text{norm}}-V$ görbék jobbra tolódása mutat), addig csak a Cer gyakorol ugyanilyen hatást a VSD egyensúlyi aktivációjára (melyet a Cer jelenlétében mért $F_{\text{norm}}-V$ görbe jobbra tolódása mutat), míg a GlcCer a VSD helyett elsődlegesen a pórusdoménen fejt ki hatását.

IV./2. A Cer és a GlcCer hatása az ionáram és a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájára

Ezután a Cer és a GlcCer hatását vizsgáltuk a VSD aktivációjának és a pórus nyitásának kinetikájára a **9A ábrán** bemutatott pulzusprotokoll alkalmazásával. A csatorna pórusának nyitását jellemző áramaktivációs kinetika vizsgálatakor a -10 és $+40$ mV közötti tesztpotenciálok által kiváltott áramokat elemeztük, amelyek felszálló szárára egykomponensű exponenciális függvényeket illesztettünk (**10A ábra**), majd az aktivációs kinetikát a τ_{akt} aktivációs időállandóval jellemeztük. Mind a Cer, mind a GlcCer kezelés lassabb áramaktivációs kinetikát eredményezett. Ezt a -10 mV-os tesztpotenciálon mért normált reprezentatív áramgörbék bemutatásával szemléltetjük, amelyeken jól láthatóan az ionáram aktivációja mind a Cer-rel, mind a GlcCer-rel kezelt oociták esetében lassabb volt a kontroll sejtekhez képest (**10B ábra**). Az egyedi sejtekben mért ionáramok aktivációs időállandóinak (τ_{akt}) statisztikai elemzése azt mutatta, hogy a Cer szinte minden alkalmazott tesztfeszültségen a kontroll sejtekhez képest szignifikánsan magasabb τ_{akt} értékeket eredményezett. Ezzel

szemben a GlcCer által okozott τ_{akt} növekedés jellemzően a statisztikai szignifikancia határán volt és csak -10 és 0 mV tesztpotenciálokban mutatott szignifikáns növekedést (**10C ábra**).

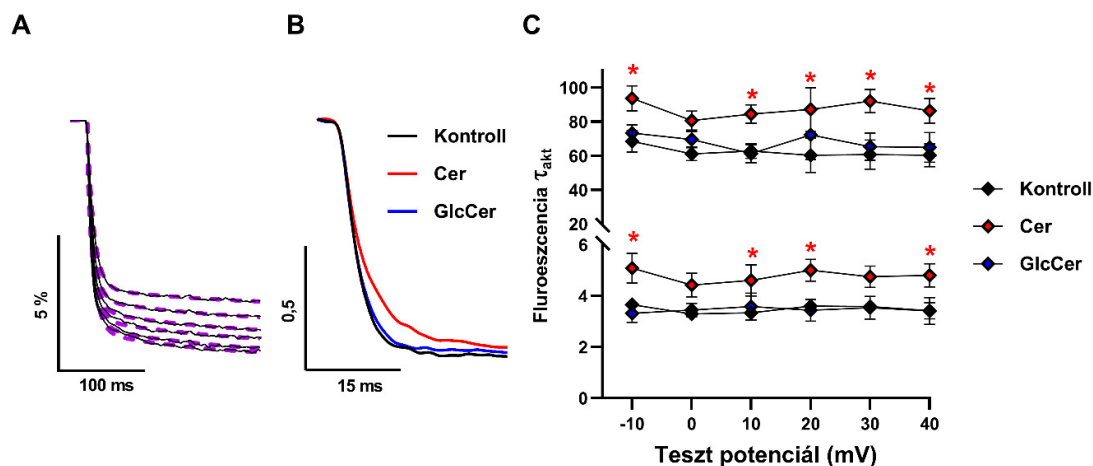


10. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükozilceramid (GlcCer) kezelés hatása a Kv1.3 áramaktivációs kinetikájára.

(A) A *Xenopus laevis* oocitákban történő mérést követően az ionáramokra, amelyeket -100 mV-os tartófeszültségről -10 és +40 mV közötti tartományban 10 mV-os lépésekben megvalósított 250 ms hosszúságú depolarizáló impulzusokkal váltottunk ki 30 másodperces időközökkel, elsőfokú exponenciális függvényt illesztettünk. (B) A panel a -10 mV-os depolarizáció által kiváltott reprezentatív, normált ionáramokat mutatja be kontroll sejtek, valamint 24 órán keresztül 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt oociták esetében. (C) Az $n = 10$ -12 sejt esetében a -10 és +40 mV közötti tesztpotenciálok által kiváltott ionáramok aktivációs időállandóinak (τ_{akt}) meghatározásához az áramokat elsőfokú exponenciális függvénnyel illesztettünk, végül az átlagértékeket $\pm$ SEM ábrázoltuk. A csillagok (*) az adott tesztpotenciálon a kontroll sejtekhez képest szignifikáns különbségeket jelzik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

Ezzel egyidejűleg elemeztük az adott tesztpotenciálokban mért fluoreszcens jelek aktivációs kinetikáját is, amelyek a VSD aktivációját jellemzik. A korábbi vizsgálataink eredményeivel összhangban a fluoreszcens jelek aktivációja esetében két komponenst különíthettünk el: megfigyeltünk egy gyors komponenst, amely az amplitúdó több mint 85%-át tette ki, és egy kisebb amplitúdójú lassú komponenst (201). Ennek megfelelően a fluoreszcens jel aktivációs kinetikáját két exponenciális tag összegét tartalmazó függvénnyel lehetett jól illeszteni (**11A ábra**). A lipidek hatásainak elemzése során azt tapasztaltuk, hogy az áram aktivációs kinetikájával ellentétben csak a Cer lassította a fluoreszcens jel aktivációs kinetikáját a kontrollhoz képest, amit a -10 mV tesztpotenciálon mért normált reprezentatív fluoreszcencia görbék is jól mutatnak. Ezzel ellentétben, a GlcCer-rel töltött oocitákban nem figyeltünk meg ilyen változásokat (**11B ábra**). Ezekkel összhangban, amikor mindkét komponens aktivációs időállandóját kvantitatívan elemeztük, azt találtuk, hogy a Cer kezelés mind a gyors ($\tau_{akt,f}$) mind a lassú ($\tau_{akt,s}$) komponens aktivációs időállandóit növelte. A változások statisztikailag szignifikánsak voltak mindkét időállandó esetében szinte mindegyik

vizsgált tesztpotenciálon. Ezzel szemben a GlcCer kezelés nem eredményezett szignifikáns változást a fluoreszcens jel egyik aktivációs időállandójának értékében sem a vizsgált tesztpotenciálokon (**11C ábra**). Méréseink során a két komponens amplitúdójának aránya nem változott egyik kezelés hatására sem.



11. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükozilceramid (GlcCer) hatása a Kv1.3 feszültség szenzor doménjének aktivációs kinetikájára.

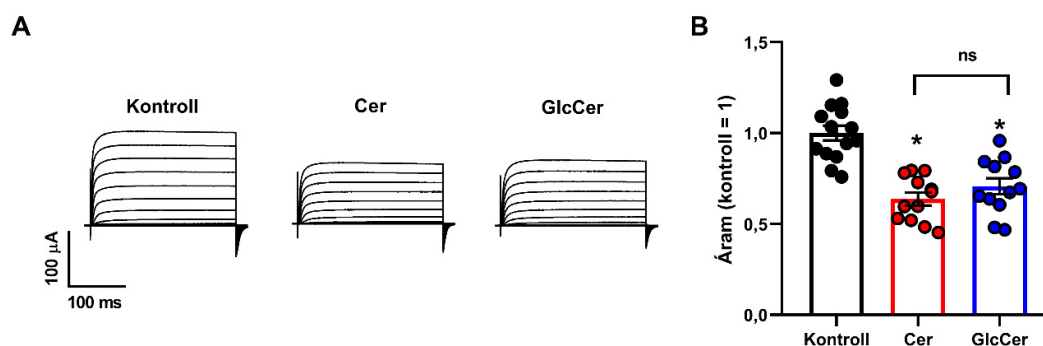
(A) A *Xenopus laevis* oocitákban történő mérést követően a VSD mozgását leíró fluoreszcens jelek illesztése, amelyeket a 10. ábrához hasonló feszültségprotokollal váltottunk ki, két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel történt. (B) A panel a -10 mV-os depolarizáció által kiváltott reprezentatív, normált fluoreszcens jelgörbét mutatja be kontroll sejtek, valamint 24 órán keresztül 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt oociták esetében. (C) Az $n = 10-12$ sejt esetében a -10 és +40 mV közötti tesztpotenciálok által kiváltott fluoreszcens jelek aktivációs időállandóinak (τ_{akt}) meghatározásához a fluoreszcens jelgörbét kétkomponensű, telítésbe futó, exponenciális függvénnyel illesztettük, végül az átlagértékeket $\pm$ SEM ábráztuk. A csillagok (*) az adott tesztpotenciálon a kontroll sejtekhez képest szignifikáns különbségeket jelzik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

Az a megfigyelés, hogy a Cer mind a VSD aktiváció, mind a pórusnyitás kinetikáját lassította, míg a GlcCer csak az utóbbit módosította, alátámasztja azt a hipotézisünket, amelyet a Kv1.3 egyensúlyi aktivációs paramétereinek (G_{norm-V} és F_{norm-V} görbék) vizsgálata alapján felvetettünk, miszerint a Cer közvetlenül képes a VSD-n keresztül hatni, míg a GlcCer elsődlegesen a PD-t befolyásolja anélkül, hogy a VSD működését módosítaná.

IV./3. A Cer és a GlcCer hatása a Kv1.3 áramamplitúdójára

Kísérleteink következő lépésében megvizsgáltuk a Cer és GlcCer töltések hatását a Kv1.3 áramok amplitúdójára *Xenopus laevis* expressziós rendszerben. Méréseink során a sejtkapacitásra vonatkozó információ hiányában nem határoztuk meg az áramsűrűségeket, azonban azonos mennyiségű Kv1.3 mRNS injektálását követően, ugyanazon a napon végeztük el az ionáramok mérését a kontroll és kezelt esetekben, ahogy azt korábbi munkánk során is

tettük (201). Általánosságban elmondható, hogy a mért ionáramok amplitúdója ~ 30-40 %-kal csökkent a kezelt sejtekben minden vizsgált tesztfeszültségen (**12A ábra**). A kiértékelés során a +40 mV-os depolarizáló impulzusok által kiváltott áramokat normáltuk az azonos napon mért kontroll sejtek átlagára ($1,000 \pm 0,041$, $n = 14$). A statisztikai elemzés során kimutattuk, hogy az így normált áramamplitúdó értékek szignifikánsan csökkentek mind a Cer ($0,637 \pm 0,036$, $n = 12$, $p < 0,0001$), mind a GlcCer ($0,707 \pm 0,044$, $n = 12$, $p < 0,0001$) töltés hatására (**12B ábra**) a kontroll sejtekhez képest. Az áramamplitúdók nem különböztek szignifikánsan a Cer-rel és GlcCer-rel kezelt oociták között ($p = 0,4658$).



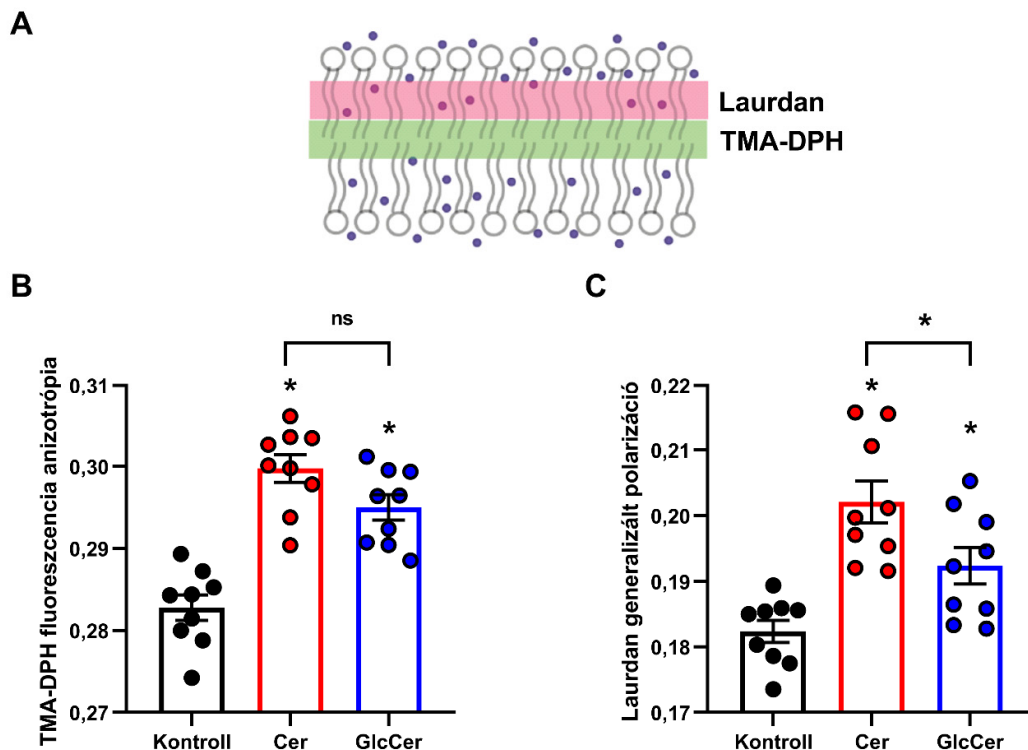
12. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükoszilceramid (GlcCer) hatása a Kv1.3 áramamplitúdóra.

(A) Az ábra 9. ábrán bemutatott feszültségprotokoll által kiváltott reprezentatív áramgörbék mutat, amelyeket ugyanazon a napon mértünk kontroll, valamint 24 órán keresztül 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt *Xenopus laevis* oocitákban. (B) A +40 mV-os depolarizáló impulzusok által kiváltott áramamplitúdókat $n = 12-14$ kontroll, Cer-rel és GlcCer-rel kezelt sejtekben a kontroll sejtek aktuális mérési napján meghatározott átlagára normáltuk, majd az ábrán ezeket a normált átlagértékeket $\pm$ SEM ábrázoltuk. A csillagok (*) a kontrollhoz, vagy a Cer-rel és GlcCer-rel kezelt sejtek egymáshoz képest szignifikáns különbségeit jelzik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

IV./4. A Cer és GlcCer hatása a membrán fluiditására és hidrációjára

A fenti elektrofiziológiai mérések eredményei azt mutatják, hogy a Cer és a GlcCer általánosan gátló hatást fejt ki a Kv1.3 ioncsatorna aktivációjára, azonban a csatorna különböző doménjein fejtik ki a hatásukat és így valószínűleg eltérő mechanizmussal modulálják a csatorna működését. Míg a TEVCF mérések azonosították a két lipid fő intramolekuláris célpontját, azaz a Cer esetében a VSD-t, a GlcCer esetében pedig a PD-t, ezek a kísérletek nem szolgáltatott információt az indirekt lipidhatások esetleges hozzájárulásáról a hatásmechanizmushoz. Ezért indokolt a sejtmembrán biofizikai paramétereinek vizsgálata, amely további betekintést nyújthat a két lipid eltérő hatásmechanizmusába. Bár korábban leírták, hogy a Cer és a GlcCer hatással lehet a lipidkettősrétegek membránbiofizikai tulajdonságaira, az ilyen változások alapos elemzése a sejtmembrán különböző rétegeiben, ahol az ioncsatorna aktivációs kapuzás során végbemenő molekuláris átrendeződése lejátsszódik,

nem történt meg. Ennek vizsgálatára a sejtmembrán különböző rétegeiben elemeztük a membrán biofizikai paramétereinek változását Cer és GlcCer töltést követően. Méréseinket CHO sejtvonalon végeztük el, tekintettel arra, hogy a *Xenopus laevis* oociták méretük, vitellin membránjuk, valamint két, jelentősen eltérő erősen pigmentált, illetve nem pigmentált sejt-pólusuk miatt nem alkalmasak jól reprodukálható fluoreszcencia alapú membránbiofizikai mérésekre. Kísérleteinkben először két, a sejtmembrán molekuláris rendezettségét jellemző paramétert, a fluiditást és a hidrációt vizsgáltuk. A sejtmembrán fluiditása a kettősréteg legbelső hidrofób magjában (**13A ábra**, zöld téglalap), míg hidrációja a mag és a membrán-víz határfelület közötti rétegekben (**13A ábra**, rózsaszín téglalap) lévő molekuláris szerveződést jellemzi (151-153).



13. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükoszilceramid (GlcCer) hatása a membrán fluiditására és hidrációjára.

(A) A membrán fluiditása és hidrációja két, molekuláris rendezettséggel kapcsolatos paraméter, amelyek a szerveződést jellemzik a membrán központi hidrofób magjában, illetve az ezen központi membránrégiók és a membrán-víz határfelület közötti régiókban. Míg a membrán fluiditása a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájának számszerűsítésével vizsgálható, addig a membrán hidrációja a Laurdan generalizált polarizációjának meghatározásával mérhető. (B) A fluiditás vizsgálatához a kontroll és a 24 órán keresztül 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteket TMA-DPH-val jelöltük, majd a fluorofór fluoreszcencia anizotrópiáját spektrofotometriával határoztuk meg. (C) A hidráció vizsgálatához a kontroll, valamint a Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt sejteket Laurdan-nal jelöltük, majd a festék generalizált polarizációját (GP) spektrofotometriával számszerűsítettük. A TMA-DPH anizotrópia és a Laurdan GP értékeit $n = 9$ független, egyenként körülbelül 100000 sejtet tartalmazó mintában határoztuk meg, a mérések átlagértékeit $\pm$ SEM a B és C paneleken ábrázoltuk. A csillagok (*) a kontrollhoz, vagy a Cer-rel és GlcCer-rel kezelt sejtek egymáshoz képest szignifikáns különbségeit jelzik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

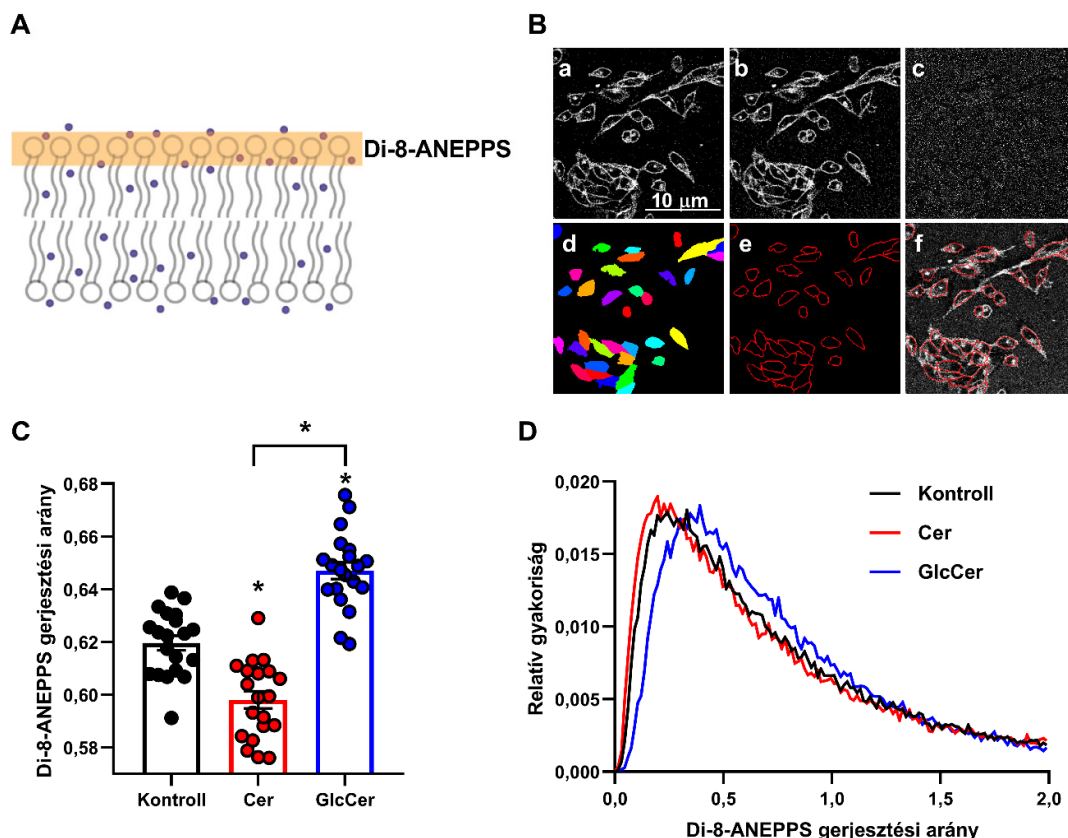
A membrán fluiditásának vizsgálatakor a kontroll, illetve 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel töltött CHO sejteket TMA-DPH-val jelöltük, majd a fluorofór fluoreszcencia anizotrópiáját spektrofotométerrel kvantifikáltuk (156, 174). A kontroll sejtek TMA-DPH anizotrópiájához ($0,283 \pm 0,002$, $n = 9$) képest a Cer és GlcCer kezelések után kapott értékek szignifikánsan magasabbak voltak (Cer esetében $0,300 \pm 0,002$, $n = 9$, $p < 0,0001$; GlcCer esetében $0,295 \pm 0,002$, $n = 9$, $p < 0,0001$), ami a sejtmembrán fluiditásának szignifikáns csökkenésére utal (13B. ábra). A Cer-rel és GlcCer-rel kezelt minták TMA-DPH anizotrópiája nem különbözött szignifikánsan egymástól ($p = 0,1092$).

A lipidkettősréteg hidrációját Laurdan-nal jelölt CHO sejteken vizsgáltuk, amely során a fluorofór generalizált polarizációját (GP) spektrofluoriméter segítségével kvantifikáltuk. (156, 174). A TMA-DPH-val jelölt mintáknál kapott eredményekkel összhangban mind a Cer, mind a GlcCer szintjének növelése magasabb Laurdan GP értékeket eredményezett, mint a kezeletlen sejtek esetében (kontroll esetben $0,182 \pm 0,002$, $n = 9$ vs. Cer esetén $0,202 \pm 0,003$, $n = 9$, $p < 0,0001$; és GlcCer esetén $0,192 \pm 0,003$, $n = 9$, $p = 0,0326$) (**13C ábra**). Ezek az értékek a membrán szignifikánsan csökkent hidrációjára utalnak a Cer és GlcCer töltéseket követően. Továbbá összehasonlítva a két kezelés hatását azt találtuk, hogy a Cer-rel kezelt sejtek szignifikánsan magasabb Laurdan GP értéket, azaz alacsonyabb hidrációt mutattak, mint a GlcCer-rel kezelt sejtek ($p = 0,0388$).

Összefoglalva, a Cer és a GlcCer hasonlóan módosította a sejtmembrán belső rétegeinek rendezettségét, amit a méréseink során tapasztalt csökkent fluiditás és hidráció is alátámaszt.

IV./5. A Cer és a GlcCer hatása a membrán dipólpotenciáljára

Kísérleteink következő lépésében a Cer és GlcCer kezelések hatását vizsgáltuk a dipólpotenciál nagyságára, amely a sejtmembrán egy másik, a molekuláris rendezettséget jellemző paramétere. A dipólpotenciál az előbbieken bemutatott biofizikai paraméterekkel ellentétben azonban a membrán-víz határfelület molekuláris szerveződését jellemzi (**14A ábra**, narancssárga téglalap). A dipólpotenciál méréseink során a kontroll, Cer-rel, illetve GlcCer-rel kezelt CHO sejteket di-8-ANEPPS fluorofórral jelöltük, és konfokális mikroszkópiával számszerűsítettük a festék gerjesztési arányát, amely pozitívan korrelál a dipólpotenciál nagyságával (171, 172, 175). A sejtek középsíkjának megfelelően készített felvételek kvantitatív elemzése során a sejtek plazmamembrán pixeleit azonosítottuk, és kizárólag ezen pixelek adataiból határoztuk meg a di-8-ANEPPS gerjesztési arányát az adott képre vonatkozóan (**14B ábra**), így ez a módszer a korábban alkalmazott TMA-DPH- vagy Laurdan-alapú technikákkal ellentétben szelektíven a sejtmembrán rendezettségéről adott információt.



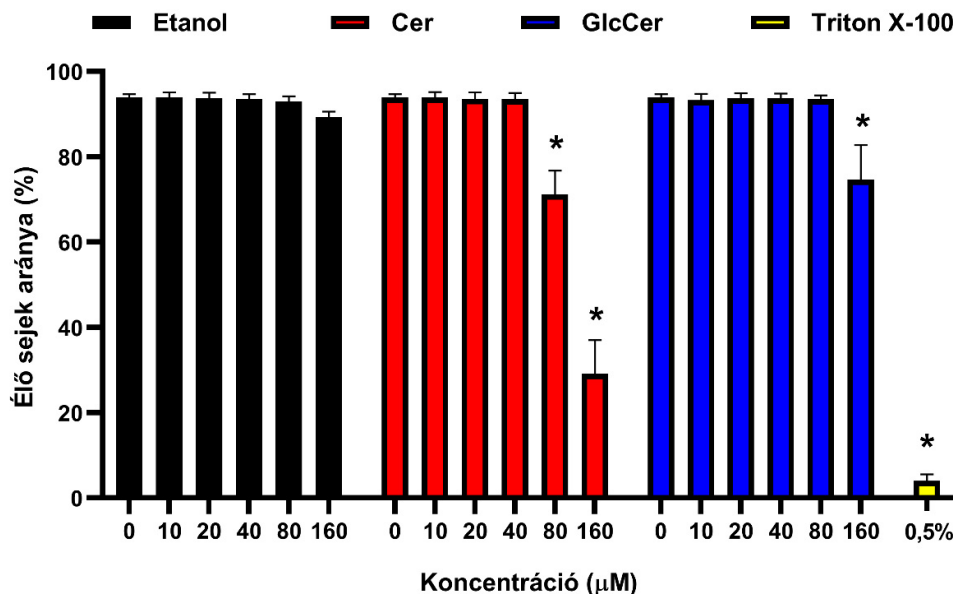
14. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükoszilceramid (GlcCer) hatása a membrán dipólpotenciáljára. (A) A membrán-víz határfelületen, a molekuláris dipólusok nem véletlenszerű orientációja miatt keletkező dipólpotenciál a di-8-ANEPPS feszültségérzékeny fluorofór gerjesztési arányának konfokális mikroszkópos meghatározásával számszerűsíthető. (B) A kontroll, illetve 24 órán keresztül 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteket di-8-ANEPPS-sel jelöltük. Az ábrán a sejtek középsíkjában készült reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételeken a két különböző hullámhosszon történő gerjesztés után mért di-8-ANEPPS intenzitások (a, b) és a pixelenként számított gerjesztési arány (c) látható. A kvantitatív képanalízis során a kutatócsoportunk által írt, manuális „vízfeltöltés” (watershed) algoritmus segítségével azonosítottuk az egyedi sejteket (d), majd a sejtmembránnak megfelelő pixeleket (e). A reprezentatív felvétel a membránmaszk és a rögzített transzmissziós kép egymásra vetítését mutatja (f). (C) A paneleken öt független kísérlet során nyert 20 egyedi kép di-8-ANEPPS gerjesztési arányának átlagértékeit $\pm$ SEM ábrázoltuk a különböző kezelések esetén. Minden kép egyenként 30-40 darab normál morfológiájú sejt plazmamembránjának adatait tartalmazta, kezelésenként összesen 600-800 sejtet. A csillagok (*) a kontrollhoz, vagy a Cer-rel és GlcCer-rel kezelt sejtek egymáshoz képest szignifikáns különbségeit jelzik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt). (D) A reprezentatív hisztogramok a di-8-ANEPPS gerjesztési arány pixelenkénti eloszlását mutatják a kontroll mintákban, valamint a Cer-rel és GlcCer-rel kezelt minták esetén.

Méréseink során a kontroll sejtek plazmamembránjának átlagos di-8-ANEPPS gerjesztési aránya ($0,620 \pm 0,003$, $n = 20$ kép, amelyek egyenként átlagosan 30-40 normál morfológiát mutató egyedi sejt adatait tartalmazták) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a GlcCer-rel kezelt sejteké ($0,647 \pm 0,003$, $n = 20$, $p < 0,0001$), ami arra utal, hogy a plazmamembrán GlcCer szintjének növekedése megemeli a dipólpotenciál nagyságát (14C ábra). Ezzel szemben a sejtmembránban felhalmozódó Cer némileg meglepő módon

alacsonyabb di-8-ANEPPS gerjesztési arányt eredményezett a kontroll sejtekhez képest ($0,598 \pm 0,003$, $n = 20$, $p < 0,0001$), ami arra a váratlan eredményre utalt, hogy a megemelkedett Cer szint hatására lecsökken a sejtek dipólpotenciálja. Ezek a változások az egyes pixelek adatait bemutató reprezentatív di-8-ANEPPS gerjesztési arány hisztogramokon is láthatóak, ahol a fenti eredményt a GlcCer és a Cer hatására történő jobbra, illetve balra tolódás szemlélteti a kontrollhoz képest (**14D ábra**). Tekintettel arra, hogy a dipólpotenciál a fluiditáshoz és a hidrációhoz hasonlóan egy membránrendezettséggel kapcsolatos paraméter, általánosságban az várható, hogy mindhárom egymással párhuzamosan, kongruens módon változik, ahogyan azt a GlcCer esetében megfigyeltük. A di-8-ANEPPS gerjesztési aránymérése során a Cer kezelést követően kapott eredményeink ennek fényében első pillantásra meglepőnek tűnnek és feltehetően a Cer által a membrán-víz határfelületen okozott robosztus szerkezeti átrendeződést tükrözik, amire a későbbiekben, az eredmények megbeszélése során még kitérünk.

IV./6. A Cer és a GlcCer kezelések hatása a CHO sejtek életképességére

Mivel ismert, hogy a sejtmembránban található ceramid felhalmozódása a sejthalálhoz vezető folyamatok egyik komponense (182, 206), felmerülhet, hogy az általunk alkalmazott kezelések az életképesség csökkentésén keresztül is befolyásolhatják a korábban vizsgált paramétereket. Ennek kizárására megvizsgáltuk a Cer és GlcCer kezeléseknek a CHO sejtek életképességére gyakorolt hatását és meghatároztuk azt a maximális kezelési koncentrációt, amely még nem vezet a sejtek károsításához. E célból a CHO sejteket 24 órán át kezeltük különböző koncentrációjú Cer-rel és GlcCer-rel és áramlási citometriával kvantifikáltuk az élő sejtek relatív hányadát az összes sejthez képest úgy, hogy a nekrotikus sejteket Sytox Green, míg az apoptotikus sejteket Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált annexin V markerrel jelöltük. Méréseink során a $40 \mu\text{M}$ Cer még nem csökkentette a sejtek életképességét, csak 80 és $160 \mu\text{M}$ koncentrációban eredményezte a mindkét markerre nézve negatív, élőknek tekinthető sejtek arányának szignifikáns csökkenését (**15. ábra**). Ezzel ellentétben a GlcCer csak $160 \mu\text{M}$ esetén növelte szignifikánsan az elhalt sejtek arányát, míg a lipidek szolubilizálására használt abszolút etanol a kísérletekben alkalmazottakkal ekvivalens koncentrációban nem okozott érdemi hatást az élő sejtek relatív hányadára. Méréseink alapján a sejtek életképességbeli csökkenése kísérleteinkben nem játszik szerepet ezen lipideknek sem a Kv1.3 elektrofiziológiai paramétereire, sem pedig a membrán biofizikai tulajdonságaira gyakorolt hatásaiban az általunk alkalmazott kísérletes protokollok esetén.



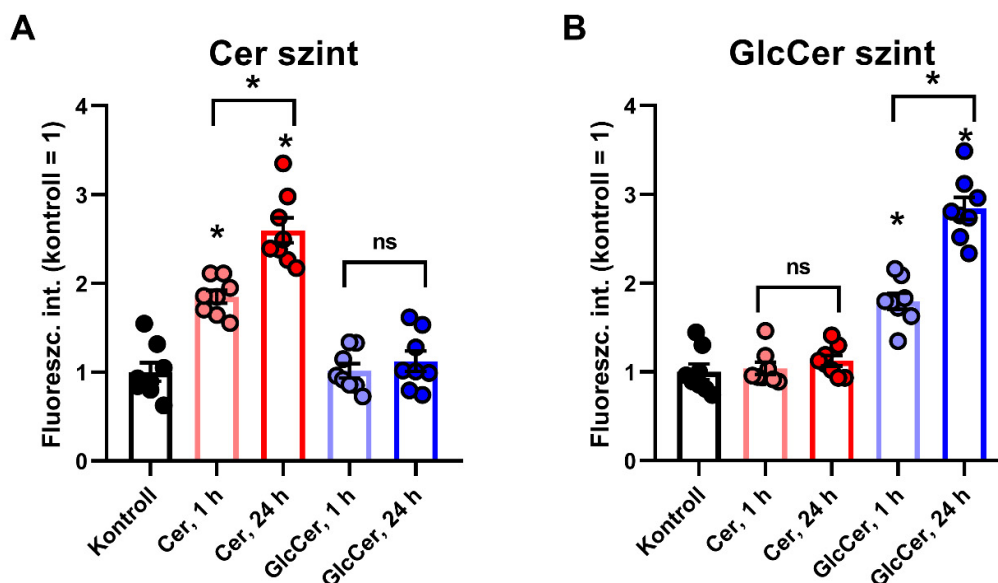
15. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükoszilceramid (GlcCer) kezelések hatása a CHO sejtek életképességére.

A nekrotikus és az apoptotikus sejtek azonosításához a kontroll, valamint a 24 óráig 10-160 µM Cer-rel vagy GlcCer-rel, vagy a lipidtöltések során alkalmazott koncentrációknak megfelelő koncentrációban abszolút etanollal kezelt sejteket Sytox Green és Alexa Fluor 647-tel konjugált annexin V markerekkel jelöltük. Pozitív kontrollként a sejtek egy csoportját 1 órán keresztül 0,5% Triton X-100 jelenlétében inkubáltuk. Az egyedi sejtekhez tartozó fluoreszcencia intenzitás értékeket áramlási citometriával mértük, majd meghatároztuk a duplanegatív, élő sejtek relatív hányadát az egyenként legalább 10000 sejtet tartalmazó mintákban. Az ábrán az egyes kezelési koncentrációkhoz tartozó átlagértékeket $\pm$ SEM tüntettük fel, amelyeket $n = 5$ független kísérlet elemzésével határoztunk meg. A csillagok (*) a kontroll mintákhoz képest szignifikáns különbségeket jelzik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

IV./7. A Cer és a GlcCer kezelések hatása a CHO sejtek plazmamembránjában található ceramidok mennyiségére

Az általunk alkalmazott lipidek, elsősorban a Cer rossz vízoldhatósága miatt az is felmerülhet, hogy a kísérleteinkben az exogén lipidek kicsapódhatnak és esetleg nem képesek beépülni a sejtek membránjába. Bár fenti kísérleteink azt mutatták, hogy a sejtenyésző médium nagy koncentrációjú Cer-rel (és rendkívül magas koncentrációban GlcCer-rel) történő hosszú távú szupplementációja lecsökkentette a sejtek életképességét (15. ábra), és így várhatóan beépül a kezelt sejtek plazmamembránjába, további méréseket végeztünk annak alátámasztására, hogy a lipidek valóban bejutnak a célsejtekbe. E célból CHO sejteket kezeltünk 40 µM Cer-rel, illetve GlcCer-rel 1 és 24 órán keresztül, majd ezt követően indirekt immunfluoreszcens jelölés és áramlási citometria segítségével megvizsgáltuk a ceramid és glükoszilceramid mennyiségének változását a plazmamembránban a kezelések hatására. Eredményeink alapján míg a Cer töltés jelentősen megnövelte a membrán ceramidszintjét mind

1, mind 24 óra kezelési idő esetén, a GlcCer töltés nem eredményezett szignifikáns ceramidszint-emelkedést (**16A ábra**). Ezzel szemben a plazmamembrán glükoszilceramid szintjének vizsgálatakor a GlcCer kezelés mindkét időtartamban alkalmazva szignifikáns emelkedést eredményezett, míg a Cer töltés nem idézett elő szignifikáns változást a plazmamembránban lévő glükoszilceramid mennyiségében (**16B ábra**). A rövid és hosszú távú kezelés után kapott eredmények összehasonlításakor azt találtuk, hogy a 24 órás töltés által eredményezett változások mind a Cer, mind a GlcCer esetében szignifikánsan nagyobbak voltak, mint az 1 órás inkubáció után. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a sejtek exogén Cer-rel vagy GlcCer-rel történő kezelése a plazmamembrán ceramid, illetve glükoszilceramid szintjének hosszú távú emelkedését eredményezte, amely magasabb volt, mint a rövid távú expozíciót követően. Továbbá az a tény, hogy a Cer hatására a glükoszilceramid szintekben nem figyelhető meg releváns eltérés, valamint a GlcCer töltésre a ceramid szintek nem változnak, arra utal, hogy nem történik jelentős Cer-GlcCer átalakulás, ami egyben a ceramid-glükoszilceramid metabolikus útvonalak erős kapcsolódása miatt azok érdemi kompenzatórikus aktiválódásának hiányát jelzi.



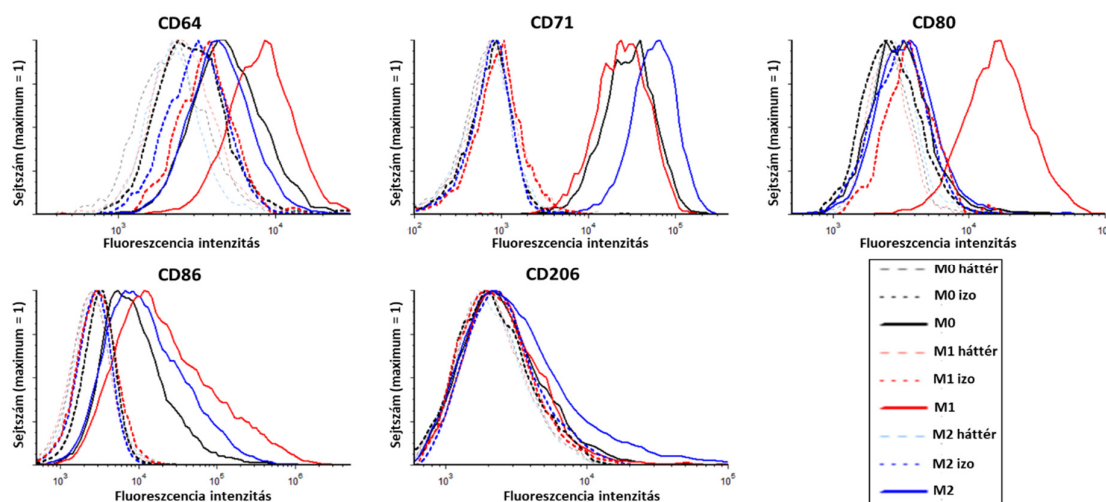
16. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükoszilceramid (GlcCer) kezelések hatása a sejtmembrán ceramid és glükoszilceramid szintjeire.

A kontroll, valamint az 1 vagy 24 óráig 40 μ M Cer-rel vagy GlcCer-rel kezelt CHO sejteket vagy anti-ceramid antitesttel, majd AlexaFluor647-tel konjugált kecske egérellenes IgM antitestekkel (A) vagy anti-glükoszilceramid antitesttel, majd Alexa Fluor 647-tel konjugált kecske nyúlellenes IgG antitestekkel (B) jelöltük. Az egyedi sejtekhez tartozó fluoreszcencia intenzitás értékeket áramlási citometriával mértük, majd meghatároztuk az egyenként legalább 10000 sejtet tartalmazó mintákban az átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeket, amelyeket a kezeletlen kontroll minták átlagára normáltuk. Mindkét panelen a normált fluoreszcencia intenzitások átlagértékeit $\pm$ SEM tüntettük fel, amelyeket egyenként $n = 8$ független minta elemzésével határoztunk meg. A csillagok (*) a kontrollhoz, vagy az 1 és 24 órán keresztül kezelt sejtek egymáshoz képest szignifikáns különbségeit jelezik ($p < 0,05$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt).

IV./8. THP-1-eredetű polarizált makrofágok létrehozása és validálása

A humán polarizált makrofágok egyszerű, hatékony és jól reprodukálható kísérleti modelljének létrehozása érdekében akut monocitás leukémiából származó THP-1 sejteket differenciáltattunk makrofágokká a médium 24 órán keresztüli alacsony, 10 ng/ml-es koncentrációjú PMA-val történő kiegészítése révén. A PMA kezelés során a sejtek a tenyésztőedény aljához tapadtak hasonlóan a korábbi vizsgálatainkban megfigyeltekhez (155, 172), továbbá morfológiájuk is jelentősen megváltozott, a makrofágokra jellemzően csökkent a nukleocitoplazmatikus arányuk. Ezt követően az M0 fenotípus kialakítása érdekében a PMA-val differenciált sejteket további 24 órán át sem PMA-t, sem más aktivátorokat nem tartalmazó médiumban pihentettük. Az így létrehozott M0 sejteket ezt követően vagy a klasszikus M1 aktivációs útvonal szerint polarizáltuk LPS és IFN- γ , vagy az alternatív M2 útvonalon IL-4 és IL-13 segítségével (229-232). Kísérleti modellünk validálása érdekében a megfelelő fenotípus kialakulását 24 vagy 48 óra polarizációt követően a különböző makrofágokra jellemző CD

markerek sejtfelszíni expressziós mintázatának áramlási citometriás vizsgálatával teszteltük (17. ábra).

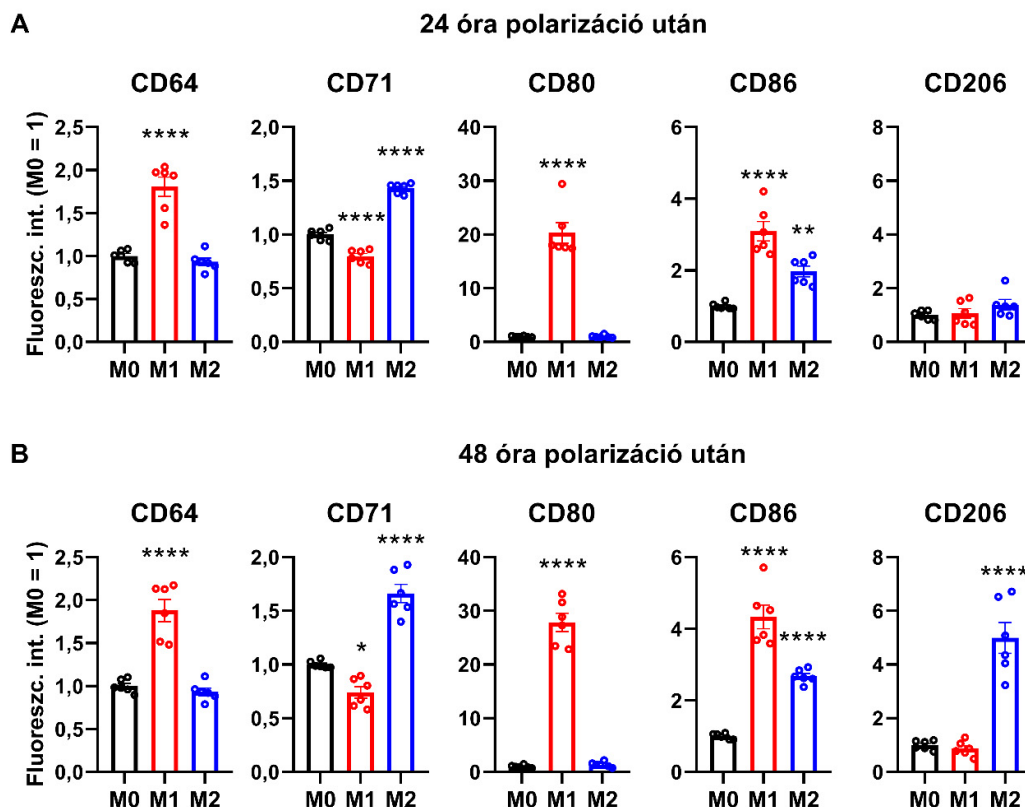


17. ábra: Különböző makrofág differenciációs és polarizációs markerek expressziójának áramlási citometriás hisztogramjai.

A THP-1 sejteket 24 órás, 10 ng/ml PMA kezelés során makrofágokká differenciáltattuk, amit 24 órás pihentetés követett PMA hiányában. Az M0 makrofágokká differenciáltatott sejteket ezt követően 48 órán keresztül polarizáltuk klasszikus M1 makrofágokká 100 ng/ml LPS és 20 ng/ml IFN- γ , illetve M2 makrofágokká 20 ng/ml IL-4 és 20 ng/ml IL-13 kezelés alkalmazásával. Accutase oldattal történő felválasztás és Fc-receptor blokkolás után a sejteket fluorofórral konjugált, az ábracímeknek megfelelő antitestekkel jelöltük. A mintánként legalább 10000 normál morfológiájú egyedi sejt adatait tartalmazó reprezentatív fluoreszcencia hisztogramok a sejtfelszíni CD markerek expressziójának mértékét mutatják (folytonos vonalak), az azonos kísérletes körülmények között alkalmazott izotípus kontroll antitestekkel jelölt (vastag szaggatott vonalak), illetve a nem jelölt sejtekhez képest (vékony szaggatott vonalak).

Az irodalmi adatokkal összhangban a 24 vagy 48 órán keresztül LPS-sel és IFN- γ -val kezelt THP-1-eredetű makrofágok az M1 aktiváció jellegzetes tulajdonságait mutatták, azaz a CD64, CD80 és CD86 sejtfelszíni markerek szintje szignifikánsan emelkedett, amihez nem társult változás a CD206 expressziójában, ezek mellett pedig csökkent a CD71 expressziója (17. és 18. ábra). Ezzel szemben az IL-4-gyel és IL-13-mal 24 vagy 48 órán keresztül kezelt sejtek M2-szerű CD marker expressziós profilt mutattak, aminek megfelelően a sejtfelszíni CD71 és CD86 szintjei jelentősen megnövekedtek, a CD64 és CD80 expressziójának változása nélkül. Ezen kívül az M2 sejtekre specifikus CD206 expressziója is szignifikánsan magasabbnak bizonyult, ami azonban csak 48 óra polarizáció után jelentkezett. Mivel a CD expressziós mintázatok erősen hasonlóak voltak 24 és 48 óra polarizációt követően, összességében megállapíthatjuk, hogy az általunk előállított M1 és M2 sejtek már 24 óra polarizáció után a klasszikusan, illetve alternatív módon aktivált makrofágokra jellemző sejtfelszíni CD expressziós profilokat (234, 235) mutattak, amelyet legalább további 24 óráig,

azaz a polarizáció kezdetétől számított 48 óráig megőriztek. Így a következő fejezetekben leírt kísérleteket a polarizáció kezdetétől számított 24 és 48 óra között, stabilan polarizált makrofágokon végeztük.



18. ábra: Az M0, M1 és M2 THP-1 eredetű makrofágok sejtfelszíni CD marker expressziós profilja.

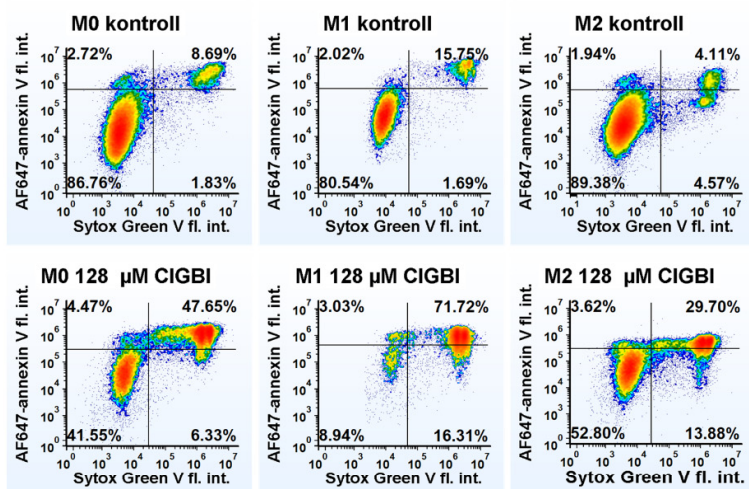
A THP-1 sejteket 24 órás 10 ng/ml PMA kezelés során makrofágokká differenciáltattuk, amit 24 órás pihentetési időszak követett PMA hiányában. Az így kialakított M0 makrofágokat ezt követően 24 (A) vagy 48 (B) órán keresztül polarizáltuk klasszikus M1 makrofágokká 100 ng/ml LPS és 20 ng/ml IFN- γ kezelés, illetve M2 makrofágokká 20 ng/ml IL-4 és 20 ng/ml IL-13 kezelés során. A sejtek Accutase oldattal történő felválasztása és Fc-receptor blokkolás után a differenciált, majd különböző irányokba polarizált makrofágok sejtfelszíni CD marker expresszióját a megfelelő fluorofórokkal konjugált antitestek és áramlási citometria segítségével vizsgáltuk. A kiértékelés során meghatároztuk a mintánként legalább 10000 normál morfológiájú egyedi sejt fluoreszcencia intenzitásának átlagát, amit az M0 minták átlagértékére normáltunk. Az $n = 6$ biológiai replikátumban meghatározott, normált fluoreszcencia intenzitásokat és azok átlagértékeit $\pm$ SEM ábrázoltuk mindkét panelen. A csillagok az M0 mintákhoz képest szignifikáns különbségeket jelzik (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján).

IV./9. A Hv1 inhibitor CIGBI dózis- és polarizációfüggően csökkenti a polarizált makrofágok életképességét

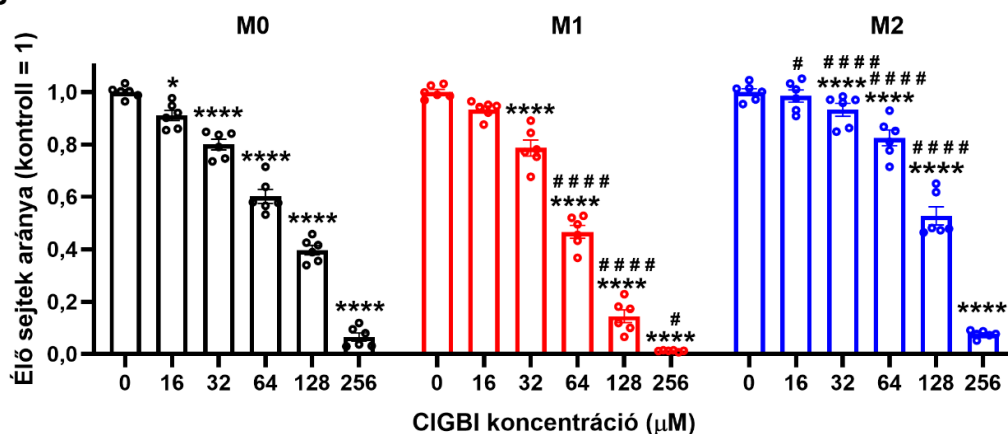
Annak tesztelésére, hogy a Hv1 gátlása befolyásolja-e a polarizált makrofágok életképességét, hasonlóan különböző sejttypusoknál leírtakhoz (15-19, 100), a THP-1 eredetű makrofágokat a fentiek szerint 24 órán keresztül polarizáltuk, majd a polarizáló médiumot a

csatorna széles körben alkalmazott gátlószerével, a ClGBI-vel egészítettük ki (15-17, 19, 86, 100, 119, 122, 123, 131). A 24 órás ClGBI kezelést követően a kezelt és a kontroll sejteket kíméletesen felválasztottuk Accutase-zal, amiről korábban kimutatták, hogy nem befolyásolja a sejtek életképességét (233). Ezt követően pedig Sytox Green fluorofórral a nekrotikus, Alexa Fluor 647-konjugált annexin V-vel pedig az apoptotikus sejteket jelöltük, végezetül pedig a kettős negatív, azaz élő sejtek arányának meghatározására áramlási citometriát alkalmaztunk (173, 174). Mindhárom vizsgált THP-1-eredetű makrofágpopulációban a ClGBI dóziszfüggően csökkentette az élő sejtek arányát (**19. ábra**). Figyelemre méltó, hogy a ClGBI a128 és 256 μM -os koncentrációkban alkalmazva, amelyeket számos sejtípus esetén a Hv1 funkcióit feltáró tanulmányokban széles körben használnak (86, 89, 100, 122, 123), drámaian alacsonyabb sejtéletképességet eredményezett. Eredményeink alapján a különböző makrofágok érzékenysége eltérő, ugyanis a legtöbb vizsgált koncentrációnál az M1 sejtekben kiváltott életképesség-csökkenés szignifikánsan magasabb, míg az M2 makrofágok esetében szignifikánsan alacsonyabb volt az M0 makrofágoknál megfigyeltékhez képest (az ilyen jellegű szignifikáns eltérések kettőskeresztrel jelölve az ábrán).

A



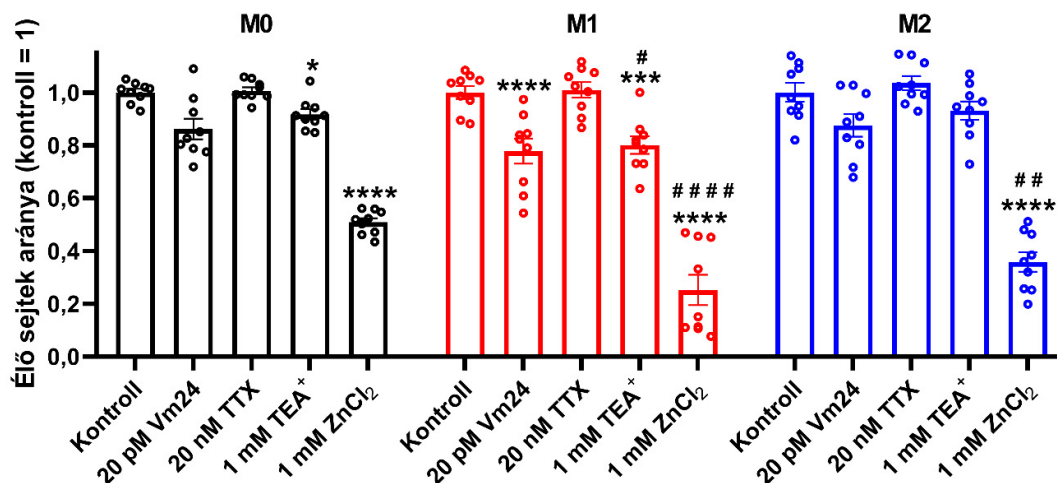
B



19. ábra: A Hv1 ioncsatornát gátló CIGBI dóziszfüggően csökkenti a polarizált makrofágok életképességét. A THP-1 sejteket 24 órás 10 ng/ml PMA kezelés során makrofágokká differenciáltattuk, amit 24 órás pihentetés követett PMA hiányában. Az M0 makrofágokká differenciáltatott sejteket ezt követően 24 órán keresztül polarizáltuk klasszikus M1 makrofágokká 100 ng/ml LPS és 20 ng/ml IFN- γ kezelés, illetve M2 makrofágokká 20 ng/ml IL-4 és 20 ng/ml IL-13 kezelés során. A sejteket ezt követően 24 órán keresztül 16 és 256 μ M közötti koncentrációkban CIGBI-vel kezeltük. A médiumban már úszó, valamint az Accutase segítségével felválasztott sejtek összegyűjtése után jelöltük azokat Sytox Green és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V alkalmazásával a nekrotikus, illetve apoptotikus sejtek azonosításához. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mértük, majd az egyenként legalább 10000 sejtet tartalmazó mintákban meghatároztuk a kettős negatív, azaz élő sejtek relatív arányát, amit a kezeletlen, kontroll mintákban meghatározott átlagértékre normáltunk. (A) A reprezentatív sűrűségplotok a 128 μ M-os CIGBI kezelés hatását mutatják az M0, M1 és M2 makrofágok életképességére. (B) Az ábrán a kezelésenként $n = 6$ biológiai replikátum esetében meghatározott és normált élősejt arányok és azok átlagértékei $\pm$ SEM kerültek bemutatásra. A csillagok az adott sejttípuson belüli kontroll mintákhoz képest (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$), míg a kettőskereszt jelzés az M0 sejtekhez képest szignifikáns különbségeket jelzik adott CIGBI koncentrációk mellett (# $p < 0,05$, #### $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján).

IV./10. A ClGBI a Hv1 ioncsatorna gátlásán keresztül csökkenti a polarizált makrofágok életképességét

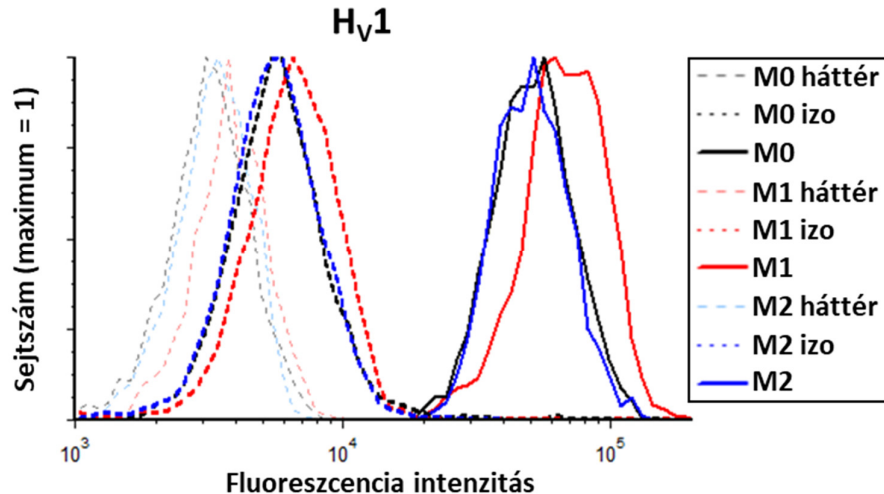
Annak alátámasztására, hogy a ClGBI által kiváltott sejtéletképesség-csökkenést a Hv1 gátlása indukálja és nem a vegyület egyéb, makrofágokon található ioncsatornákra gyakorolt nem specifikus, úgynevezett „off-target” hatásai (121), megvizsgáltuk más releváns ioncsatorna gátlók hatásait a THP-1-eredetű M0, M1 és M2 makrofágok életképességére. Méréseink során a Kv1.3 specifikus gátlószerét, a Vm24 skorpiótoxint (49), a feszültségkapuzott nátriumcsatornák specifikus gátlószerét, a tetrodotoxint (TTX) (236), az aspecifikus káliumcsatorna gátló tetraetil-ammóniumot (TEA^+) (237), és a Hv1 jól ismert nem specifikus gátlószerét, a Zn^{2+} -et (66) alkalmaztuk. A Vm24-et, a TTX-et, a TEA^+ -t és a Zn^{2+} -et az *in vitro* funkcionális vizsgálatokban leggyakrabban használt koncentrációban alkalmaztuk. Ezekben a kísérletekben a TTX nem befolyásolta a sejtek életképességét, a Vm24 és a TEA^+ pedig csak kisebb hatásokat eredményeztek, főként az M1 sejtekben. Ezzel szemben a Hv1 inhibitor Zn^{2+} a ClGBI hatásaihoz hasonlóan figyelemre méltó módon csökkentette a makrofágok életképességét, különösen az M1 sejtekben (**20. ábra**).



20. ábra: Egyéb ioncsatorna gátlószerek hatása a polarizált makrofágok életképességére.

A 19. ábránál leírt módon differenciáltatott M0, M1 és M2 makrofágokat 24 órán keresztül 20 pM Vm24 skorpiotoxinnal, 20 nM TTX-szel, 1 mM TEA⁺-val vagy 1 mM (névleges koncentrációjú) ZnCl₂-vel kezeltük oly módon, hogy a polarizációs médiumot szupplementáltuk az inhibitorokkal. A médiumban már úszó, valamint az Accutase segítségével felválasztott sejtek összegyűjtése után jelöltük azokat Sytox Green és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V alkalmazásával a nekrotikus, illetve apoptotikus sejtek azonosításához. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mértük, majd az egyenként legalább 10000 sejtet tartalmazó mintákban kiszámoltuk a kettős negatív, azaz élő sejtek relatív arányát, amit a kezeletlen, kontroll mintákban kapott átlagértékre normáltunk. Az ábrán a kezelésként n = 9 biológiai replikátum esetében meghatározott és normált élősejt arányok és azok átlagértékei ± SEM kerültek bemutatásra. A csillagok az adott sejtípuson belüli kontroll mintákhoz képest (*p < 0,05, ***p < 0,001, ****p < 0,0001), míg a kettőskereszt jelzés az M0 sejtekhez képest szignifikáns különbségeket jelzik adott gátlószer koncentrációk mellett (#p < 0,05, ##p < 0,01, ####p < 0,000, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján).

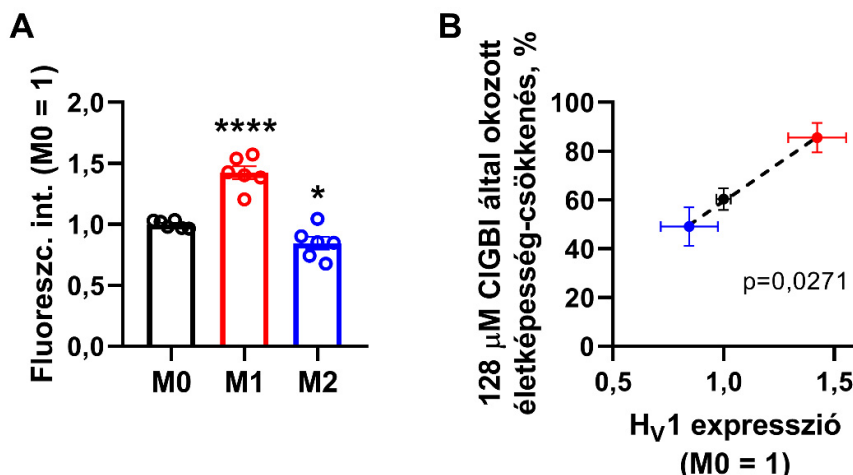
Míg a Zn²⁺ által az M1 makrofágokon kiváltott hatás szignifikánsan nagyobb volt, mint az M0 sejtekre gyakorolt hatás, az M1 és M2 közötti különbség a statisztikai szignifikancia határán mozgott (p=0,0678). A korábban bemutatott, ClGBI alkalmazásával nyert eredmények alapján várható lenne, hogy az M1 makrofágok érzékenysége lényegesen fokozott a Zn²⁺ iránt az M2 sejtekhez képest, ugyanakkor eredményeink ezt nem igazolták egyértelműen. Ennek hátterében az állhat, hogy a Zn²⁺-érzékeny fehérjék nagyon fontos szerepet játszanak az M2 makrofágok működésében, így a Zn²⁺ kezelés a Hv1 gátlásán kívül egyéb más útvonalakon is befolyásolhatja ezen sejtek életképességét (238).



21. ábra: A Hv1 ioncsatorna expressziójának áramlási citometriás vizsgálata különböző útvonalon polarizált makrofágokban.

A 19. ábránál leírt módon differenciáltatott M0, M1 és M2 makrofágok Accutase oldattal történő felválasztását, fixálását, permeabilizálását és az Fc-receptorok blokkolását követően a különböző makrofágok Hv1 expresszióját indirekt immunfluoreszcens jelöléssel és áramlási citometria segítségével hasonlítottuk össze. Az ábrán bemutatott, mintánként legalább 10000 normál morfológiájú egyedi sejt adatait tartalmazó reprezentatív hisztogramok (folytonos vonal) demonstrálják a jelölődés mértékét az azonos kísérletes körülmények között alkalmazott izotípus kontroll antitestekkel jelölt (vastag szaggatott vonalak), illetve a csak másodlagos antitesttel jelölt sejtekhez képest (vékony szaggatott vonalak).

Mivel mindkét vizsgált Hv1 gátlószer, a ClGBI és a Zn^{2+} egyaránt nagyobb mértékben csökkentette az M1 makrofágok életképességét, mint az M0 vagy M2 sejtekét (**19. és 20. ábra**), ezután a megvizsgáltuk a Hv1 expressziójának mértékét a különböző útvonalon polarizált makrofágokban áramlási citometriával. A Hv1 gátlószer nagyobb hatásával összhangban az M1 sejtekben szignifikánsan magasabb Hv1 expressziót találtunk, mint az M0 sejtekben, míg a Hv1 mennyisége az M2 sejtekben bizonyult a legalacsonyabbnak (**21. és 22A ábra**). Az M0, M1 és M2 makrofágok életképességének csökkenése és a Hv1 expressziója között figyelemre méltóan jelentős, statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt találtunk (**22B ábra**). Összességében a más releváns ioncsatorna gátlókkal kapott eredmények (**20. ábra**), valamint a Hv1 expresszió (**21. és 22A ábra**) és a Hv1 gátlása által kiváltott sejtéletképesség-csökkenés mértéke közötti korreláció (**22B ábra**) meggyőzően alátámasztják, hogy a ClGBI által kiváltott hatásokat valószínűleg ténylegesen a gátlószer Hv1 ioncsatornára gyakorolt gátlása okozhatja, nem pedig „off-target” hatások.

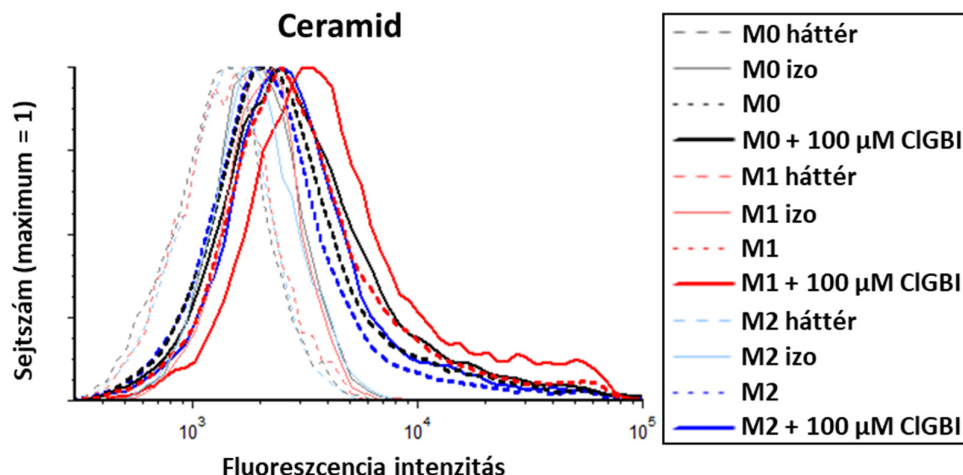


22. ábra: A polarizált makrofágok Hv1 expressziója pozitív korrelációt mutat a CIGBI által kiváltott életképesség-csökkenés mértékével.

(A) A 19. ábránál leírt módon differenciált M0, M1 és M2 makrofágok Accutase oldattal történő felválasztását, fixálását, permeabilizálását és az Fc-receptorok blokkolását követően a különböző makrofágok Hv1 expresszióját indirekt immunfluoreszcens jelölés után áramlási citometria segítségével hasonlítottuk össze. Mintaként legalább 10000 normál morfológiájú egyedi sejt átlagos fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg, amelyet ezt követően az M0 minták átlagértékére normáltuk. A panel az $n = 6$ biológiai replikátumban meghatározott normált fluoreszcencia intenzitásokat és azok átlagértékeit $\pm$ SEM mutatja. A csillagok az M0 mintákhoz képest szignifikáns különbségeket jelzik (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján). (B) Az M0, M1 és M2 makrofágok esetében a 128 μ M CIGBI kezelés által kiváltott relatív életképesség-csökkenés átlagos értékét ($\pm$ SEM) ábrázoltuk az M0 sejtekre normált átlagos Hv1 expresszió ($\pm$ SEM) függvényében. A két paraméter közötti korreláció mértékét Deming-regressziós elemzéssel határoztuk meg, amely az ábrán feltüntetett p-érték alapján szignifikáns korrelációt mutatott ki az életképesség-csökkenés és a Hv1 expresszió mértéke között.

IV./11. A CIGBI által kiváltott életképesség-csökkenés a plazmamembrán ceramid szintjének időfüggő emelkedésével jár együtt

Figyelembe véve a megnövekedett ceramidszint és a sejthalál különböző formái közötti ismert kapcsolatot (206, 209), valamint azt a tényt, hogy a ceramid sejten belüli termelődéséért pH-érzékeny enzimek felelősek (210-212), azt feltételeztük, hogy a sejtmembrán ceramidszintjének emelkedése hozzájárulhat a Hv1 ioncsatornát gátló CIGBI életképesség-csökkentő hatásához. Ennek tesztelése érdekében először a ceramid mennyiségének időfüggő változásait határoztuk meg a korábbi munkánk során már alkalmazott ceramidellenes antitesttel történő jelölést követően áramlási citometria segítségével (23. ábra).



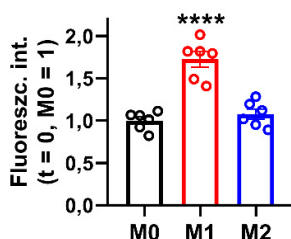
23. ábra: A membrán ceramidszintjének meghatározása áramlási citometriával.

A 19. ábránál leírt módon differenciáltatott M0, M1 és M2 makrofágokat 18 órán át 50 vagy 100 μM ClGBI-vel kezeltük. Accutase oldattal történő felválasztás és Fc-receptor blokkolás után a sejteket ceramidellenes antitestekkel, majd Alexa Fluor 647-konjugált kecskében termelt egérelles IgM antitestekkel jelöltük. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását ezt követően áramlási citometriával határoztuk meg, az ábrán a mintánként legalább 10000 normál morfológiájú egyedi sejt adatait tartalmazó reprezentatív hisztogramok kerültek bemutatásra. Az ábra a fluoreszcencia intenzitás ClGBI hatására (vastag folytonos vonal) bekövetkező eltolódását szemlélteti a kezeletlen jelölt sejtekhez (vastag szaggatott vonalak), az azonos kísérletes körülmények között alkalmazott izotípus kontroll antitestekkel jelölt (vékony folytonos vonalak), illetve a csak másodlagos antitesttel jelölt sejtekhez képest (vékony szaggatott vonalak).

Először is összehasonlítottuk a kezeletlen sejtek ceramidszintjét és azt találtuk, hogy a ceramid mennyisége a sejtmembránban szignifikánsan magasabb volt az M1 sejtekben, mint az M0 vagy M2 makrofágokban (**23. ábra és 24A ábra**). Továbbá méréseink során a ClGBI az M0, M1 és M2 makrofágokban is a plazmamembránban található ceramid szintjének jelentős időfüggő növekedését eredményezte és a legnagyobb relatív emelkedést az M1 sejtekben tapasztaltuk 100 μM ClGBI hatására (**23. ábra és 24B ábra**). Ezek a kísérletek meggyőzően kimutatták, hogy a Hv1 gátlásának hatására a plazmamembrán ceramidszintje megnövekedett, azonban nem szolgáltatott információt arra vonatkozóan, hogy milyen molekuláris mechanizmus vezet a ceramid fokozott termelődéséhez a csatorna gátlását követően.

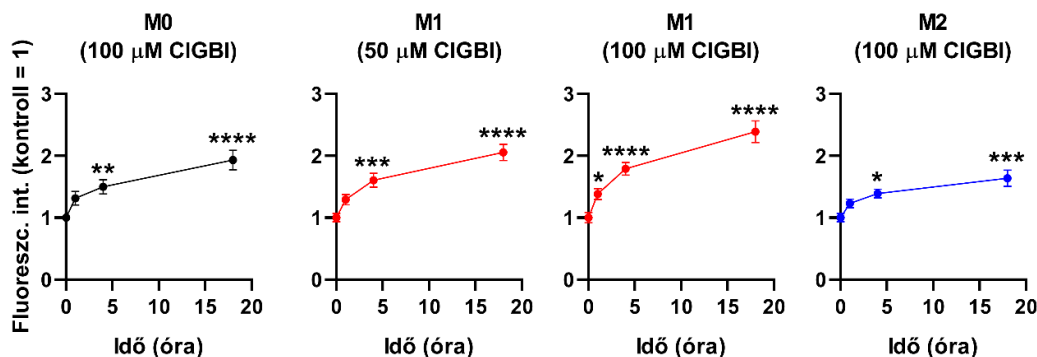
A

Nyugalmi membránceramid szintek



B

CIGBI által okozott változás a membránceramid szintekben



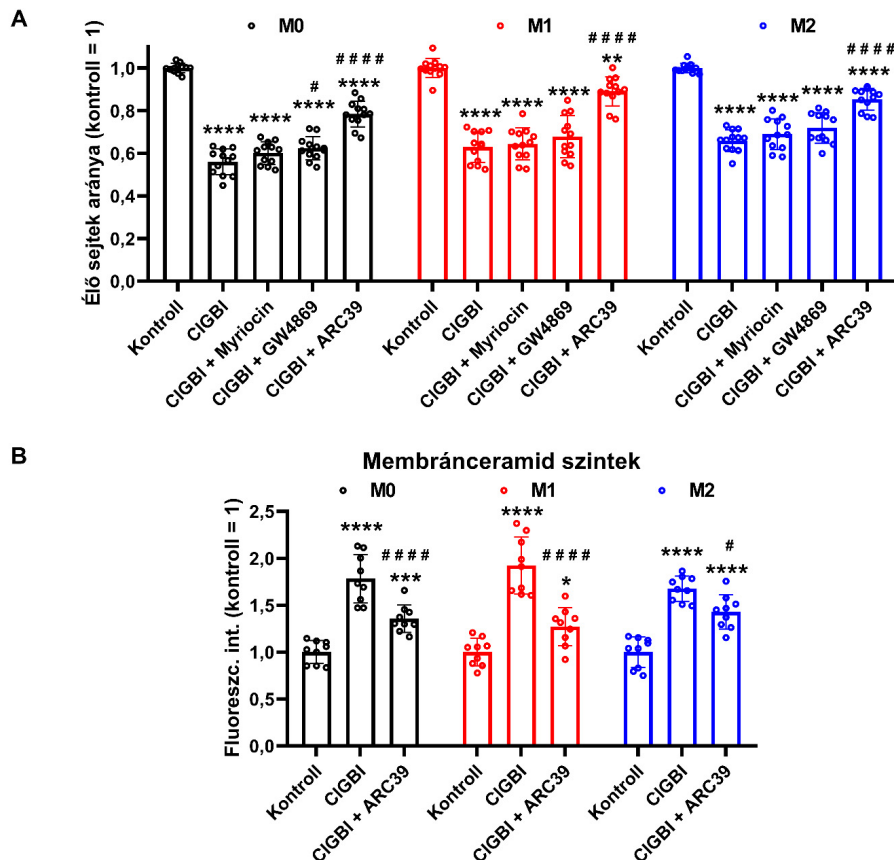
24. ábra: A CIGBI a polarizált makrofágok plazmamembránjában található ceramid mennyiségének időfüggő emelkedését idézi elő, amely legkifejezettebb az M1 sejtekben.

A 19. ábránál leírt módon differenciált M0, M1 és M2 makrofágokat 1, 4 vagy 18 órán át 50 vagy 100 μM CIGBI-vel kezeltük. Az Accutase oldattal történő felválasztást és az Fc-receptorok blokkolását követően a sejteket ceramidellenes antitestekkel, majd AlexaFluor647-konjugált kecskében termelt egérellenes IgM antitestekkel jelöltük. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását ezt követően áramlási citometriával mértük és mintaként legalább 10000 normál morfológiájú sejt átlagos fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg. (A) Az egyes kezelt minták átlagos fluoreszcencia intenzitását ezt követően normáltuk a kezelt M0 makrofágokban számított átlagértékre, majd az $n = 6$ biológiai replikátumban meghatározott, normált fluoreszcencia intenzitásokat és azok átlagértékeit ($\pm$ SEM) ábrázoltuk. A csillagok az M0 mintákhoz képest szignifikáns különbségeket jelzik (**** $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján). (B) Alternatíváként minden egyes sejt típus esetében az egyes minták átlagos fluoreszcencia intenzitását a kezelt, kontroll mintában számított átlagértékre normáltuk. Az ábrán az $n = 6$ biológiai replikátumban meghatározott normált fluoreszcencia intenzitások átlagértékeit ($\pm$ SEM) ábrázoltuk. A csillagok a kezelt kontroll mintákhoz viszonyított szignifikáns különbségeket jelzik minden sejt típus esetén (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján).

IV./12. A CIGBI által kiváltott sejtéletképesség-csökkenést mérsékli a savas szfingomielináz enzim egyidejű gátlása

Amennyiben a plazmamembrán megemelkedett ceramidszintje valóban hozzájárul a Hv1 gátlása következtében kialakuló életképesség-csökkenéshez, akkor várhatóan a CIGBI ezen hatását a ceramid termelésének párhuzamos gátlásával mérsékelni lehet. Mivel a ceramid termelése elsősorban *de novo* szintézis vagy a neutrális és savas szfingomielinázok aktivitása révén történik (152, 206, 209), megvizsgáltuk ezen útvonalak gátlószereinek lehetséges védőhatását. Nevezetesen a *de novo* szintézisben sebességmeghatározó szerin-

palmitoiltranszferázt myriocinnal (239), a neutrális szfingomielinázt GW4869 használatával (225), a savas szfingomielinázt pedig ARC39-cel gátoltuk (240). Ezekben a kísérletekben a THP-1-eredetű makrofágokat 30 percig előkezeltük ezekkel az inhibitorokkal, majd a médiumot 24 órára az M0 és M2 sejtek esetében 100 μ M, míg az M1 makrofágok esetében 50 μ M ClGBI-vel egészítettük ki, ezt követően pedig meghatároztuk az élő sejtek arányát a korábbi kísérleteink során alkalmazott módon (**19. ábra**). Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban a ClGBI nagymértékben csökkentette az életképességet az M0, M1 és M2 sejtekben egyaránt (**25A ábra**). Azonban amennyiben a ClGBI-t együtt alkalmaztuk az egyes gátlószerekkel, azt tapasztaltuk, hogy a ceramidot termelő enzimek inhibitorai részleges védelmet nyújtottak a ClGBI hatásai ellen. Míg a szerin-palmitoiltranszferázt gátló myriocin és a neutrális szfingomielinázt blokkoló GW4869 által kiváltott védőhatások biológiai szempontból elhanyagolhatóak voltak, addig a savas szfingomielináz specifikus gátlószere, az ARC39 szignifikánsan mérsékelte a ClGBI által kiváltott életképesség-csökkenést mindhárom sejttípusban, kiváltképp az M1 makrofágokban. Továbbá kimutattuk, hogy az ARC39 minden makrofág altípusban mérsékelte a plazmamembrán ceramidszintjének a ClGBI hatására bekövetkező növekedését is (**25B ábra**). Összességében ezek az eredmények megerősítették, hogy a Hv1 ioncsatorna gátlása a sejtek életképességének csökkenését a ceramidszint emelkedésén keresztül váltja ki, amely enzimatikusan elsősorban a savas szfingomielináz aktivitásán keresztül valósulhat meg.



25. ábra: A ceramid termelését gátló szerek védő hatással bírnak a CIGBI által kiváltott toxicitással szemben polarizált makrofágokban

(A) A 19. ábránál leírt módon differenciáltatott M0, M1 és M2 makrofágokat 1 μ M szerin-palmitoiltranszferáz inhibitor myriocinnal, 2 μ M neutrális szfingomielináz inhibitor GW4869-cel vagy 5 μ M savas szfingomielináz inhibitor ARC39-cel előkezeltük 30 percig, majd a kezelőoldatot 24 órán át M0 és M2 sejtek esetén 100 μ M, míg M1 makrofágoknál 50 μ M CIGBI-vel egészítettük ki. A médiumban már úszó, valamint az Accutase segítségével felválasztott sejtek összegyűjtése után a mintát Sytox Green és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V markerekkel jelöltük a nekrotikus, illetve apoptotikus sejtek azonosításához. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mértük, majd az egyenként legalább 10000 sejtet tartalmazó mintákban meghatároztuk a kettős negatív, azaz élő sejtek relatív arányát, amit a kezeletlen, kontroll mintákban meghatározott átlagértékre normáltunk. Az ábrán a kezelésként $n = 12$ biológiai replikátum esetében meghatározott és normált élősejt arányok és azok átlagértékei ($\pm$ SEM) kerültek bemutatásra. A csillagok az adott sejttípuson belül a kezeletlen, kontroll mintákhoz képest szignifikáns különbségeket jelzik (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$), míg a kettős kereszt jelzés a csak CIGBI-vel kezelt sejtekhez képest tapasztalt szignifikáns különbségeket mutatja ($^{\#}p < 0,05$, #### $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján). (B) A fentiek szerint differenciált, pihentetett és polarizált THP-1 sejteket 5 μ M ARC39-cel előkezeltük 30 percig, ezt követően a kezelőoldatot 24 órán át M0 és M2 sejtek esetén 100 μ M, míg M1 makrofágoknál 50 μ M CIGBI-vel egészítettük ki. Az Accutase oldattal történő felválasztást és az Fc-receptorok blokkolását követően a sejteket ceramidellenes antitestekkel, majd Alexa Fluor 647-konjugált kecskében termelt egérelles IgM antitestekkel jelöltük. Az egyedi sejtek fluoreszcencia intenzitását ezt követően áramlási citometriával mértük és mintánként legalább 10000 normál morfológiájú sejt átlagos fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg. Minden egyes sejttípus esetében az egyes minták átlagos fluoreszcencia intenzitását a kezeletlen, kontroll mintában meghatározott átlagértékre normáltuk. Az ábrán az $n = 9$ biológiai replikátumban meghatározott normált fluoreszcencia intenzitások átlagértékeit ($\pm$ SEM) ábrázoltuk. A csillagok a kezeletlen, kontroll mintákhoz képest szignifikáns különbséget jelzik (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$), míg a kettős kereszt jelzés a csak CIGBI-vel kezelt sejtekhez képest szignifikáns különbséget mutatja ($^{\#}p < 0,05$, #### $p < 0,0001$, ANOVA, majd Tukey-féle HSD teszt alapján).

V. DISZKUSSZIÓ

V./1. A membránbeli C16-ceramid és C16-glükoszilceramid hasonló elektrofiziológiai hatásokat fejt ki a Kv1.3 ioncsatornára annak ellenére, hogy az intramolekuláris támadáspontjuk valószínűleg különbözik

Ahogy azt a bevezetésben is bemutattuk, mivel a Kv1.3 feszültségkapuzott ioncsatorna aktivációja jelentős konformációváltozásokkal, mind a VSD-t, mind pedig a PD-t alkotó transzmembrán szegmensek masszív molekuláris átrendeződésével jár együtt, a plazmamembrán lipidösszetételében bekövetkező eltérések jelentős moduláló hatást gyakorolhatnak a csatorna aktivációs kapuzására (**1. ábra**).

Ezzel összhangban kísérleteink során először a Cer és GlcCer kezelések 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 kezelések által kiváltott elektrofiziológiai hatások leírására és a lipidek intramolekuláris célpontjának azonosítására (200). Munkánkhoz az A309C pontmutációval rendelkező Kv1.3 ioncsatornát használtuk, amely a vad típusú csatornához hasonló elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkezik és korábbi munkánk alapján optimálisan alkalmazható az MTS-TAMRA jelöléshez, így a TEVCF technikával történő mérésekhez (201). Kísérleteink során mind a Cer, mind a GlcCer jobbra tolta a pórus egyensúlyi aktivációját jellemző $G_{\text{norm}}-V$ görbéket, azaz a csatorna aktivációs küszöbének pozitívabb membránpotenciálok felé történő eltolódását eredményezte a félaktivációs feszültségeket jellemző $V_{1/2}$ értékek megegyező irányú eltolódásával párhuzamosan (**9. ábra**). Továbbá mindkét lipid jelentősen lassította az áram aktivációs kinetikáját, amit a magasabb τ_{akt} időállandók és a jelentősen csökkent teljessejt ionáramok mutattak (**10. és 12. ábra**). A kezeléseink hatására megfigyelt eltérések relevanciáját mutatja, hogy az ezen paraméterekben bekövetkezett változások nagyságrendje hasonló volt a korábban a kutatócsoportunk által ugyanebben a kísérletes rendszerben vizsgált koleszterinre adott válaszok nagyságához (201). A csatorna kapuzása során bekövetkező VSD mozgások vizsgálata során a fluoreszcens jel tesztfeszültségtől való függésének elemzésekor azt találtuk, hogy a Cer az $F_{\text{norm}}-V$ görbék jobbra tolódását eredményezte, hasonlóan a $G_{\text{norm}}-V$ görbénél megfigyelthez (**9. ábra**). Ezzel párhuzamosan a VSD aktivációs kinetikája is jelentősen lassult, amit a megnövekedett fluoreszcens jel aktivációs időállandó értékek mutatnak (**11. ábra**). A Cer-nél megfigyelttel szemben, a GlcCer esetében nem tapasztaltunk ilyen változásokat a

VSD mozgást jellemző paraméterek egyikében sem (**9. és 11. ábra**). Összességében a TEVCF méréseink arra utalnak, hogy bár mind a Cer, mind a GlcCer kezelés általánosságban gátló hatást gyakorol a Kv1.3 aktivációjára, pontos hatásmechanizmusuk jelentősen eltér egymástól, mivel azok a csatorna különböző doménjein keresztül hatnak. Nevezetesen, a Cer a csatorna aktivációs kapuzását elsődlegesen a VSD-re hatva módosítja, míg a GlcCer közvetlenül a PD-n keresztül fejt ki hatását.

A TEVCF mérések során megfigyelt ceramid felhalmozódás indukálta változások (a $G_{\text{norm}}-V$ görbe jobbra tolódása, az áram aktivációs kinetikájának lassulása és az áramamplitúdó csökkenése) összhangban vannak a ceramid Kv1.3 ioncsatornára kifejtett hatásait leíró korábbi eredményekkel (197, 198). Azt a megfigyelésünket, hogy a ceramid közvetlenül befolyásolja a VSD mozgását, egy korábbi tanulmány is alátámasztja, amely kimutatta, hogy a ceramidok képesek csökkenteni az egyedi Kv1.3 ioncsatornák nyitási valószínűségét anélkül, hogy befolyásolnák azok egyedi vezetőképességét (198). A GlcCer közvetlenül a PD-n keresztül megvalósuló hatásait alátámasztja az a tény, hogy a GlcCer a vizsgált áram- és fluoreszcens jel paramétereket a koleszterinnel azonos mintázatban módosítja. Korábban ugyanezt az A309C Kv1.3 mutáns és TEVCF kísérleti elrendezést használva munkacsoportunk kimutatta, hogy a membránban található koleszterin mennyiségének növelése csökkent teljessejt ionáramokat, lassult áramaktiválási kinetikát és a $G_{\text{norm}}-V$ görbe szignifikáns eltolódását eredményezett, anélkül, hogy az $F_{\text{norm}}-V$ görbére vagy a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájára bármilyen hatással lett volna. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a koleszterin a csatorna aktivációs kapuzására gyakorolt hatását elsődlegesen a PD-t célozva fejt ki, anélkül, hogy a VSD működését módosítaná (201).

V./2. A C16-ceramid és C16-glükozilceramid eltérő membránbiofizikai tulajdonságai magyarázhatják azok Kv1.3 ioncsatornán belüli eltérő támadáspontját

A TEVCF mérések kimutatták, hogy a Cer elsődlegesen a VSD-n , a GlcCer pedig közvetlenül a PD-n keresztül hat (**9-11. ábra**), ami arra utal, hogy a két lipid eltérő hatásmechanizmussal, különböző intramolekuláris célponttal befolyásolja 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 lipid kezeléseket követő változásokat a sejtmembrán rendezettségét jellemző biofizikai paraméterekben.

Méréseink során a membrán különböző mélységű rétegeinek szerkezeti rendezettségét jellemző fluiditását, hidrációját és dipólpotenciálját rendre a TMA-DPH fluoreszcencia

anizotrópiájának, a Laurdan generalizált polarizációjának és a di-8-ANEPPS gerjesztési arányának számszerűsítésével vizsgáltuk. 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.

A membránbiofizikai méréseink során megnövekedett TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia (**13B ábra**) és Laurdan generalizált polarizáció (**13C ábra**) értékeket figyeltünk meg a sejtmembrán exogén Cer töltésének hatására, amelyek a sejtmembrán csökkent fluiditására, illetve hidrációjára utalnak. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi tanulmányokkal, amelyekben azt találták, hogy a membránban megnövekedett Cer koncentráció általánosan növeli a lipidkettősrétegek molekuláris rendezettségét. Ezen megfigyelést modellmembránokban (241, 242) és élő sejtekben is kimutatták bakteriális szfingomielinázal történő kezelés során, továbbá a ceramid-szintáz enzim expressziójának fokozása révén, illetve Cer töltésre adott válaszként egyaránt (158, 184). Ismert, hogy a GlcCer növeli a rendezettséget modell lipidkettősrétegekben (187, 190), illetve fibroblasztokban és makrofágokban a kémiai indukált GlcCer felhalmozódás csökkent fluiditást és hidrációt, valamint emelkedett dipólpotenciált eredményez (155, 172, 190). Méréseink során hasonló változásokat figyeltünk meg a CHO sejtek kívülről történő GlcCer töltésének hatására (**13. és 14. ábra**). Ezek a membránbiofizikai változások egybecsengenek a korábban kutatócsoportunk által megfigyelt, koleszterin által okozott változásokkal (156, 174). Mindezekkel párhuzamosan a GlcCer a Kv1.3 elektrofiziológiai paramétereit is módosította (**9-12. ábra**), amelyek figyelemre méltóan hasonlóak voltak kutatócsoportunk korábbi, koleszterin töltést követően ugyanazon kísérleti elrendezésben megfigyelt eredményeihez (201). Az a tény, hogy a GlcCer és a koleszterin, két, szerkezetileg nem rokon lipid, Kv1.3-ra kifejtett elektrofiziológiai hatásai közel azonosak voltak, arra utal, hogy a membrán biofizikai tulajdonságai, így a fluiditás, a hidráció és a dipólpotenciál hasonló változásai jelentősen hozzájárulhatnak ezen lipidek hatásmechanizmusához, ami kiemeli az indirekt lipidhatások fontosságát a csatornaműködés modulációjában. Kísérleteinkben a hidrofób régiót érintő membránbiofizikai eltéréseket tekintve a Cer által kiváltott változások valamivel nagyobb mértékűek voltak a GlcCer által okozottakhoz képest, a kettő közötti különbség a membránhidráció vizsgálatkor elérte a statisztikai szignifikancia szintjét (**13C ábra**).

Bár a Cer és a GlcCer kezelés hatására a sejtmembrán hidrofób belső magjában előidézett, fent leírt szerkezeti változások nagyjából hasonlóan mutatkoztak, a membrán dipólpotenciáljára gyakorolt hatásuk lényegesen különbözött (**14. ábra**). A GlcCer felhalmozódásával ellentétben a Cer kezelés alacsonyabb di-8-ANEPPS gerjesztési arányt eredményezett, ami a dipólpotenciál csökkenésére utal és így a két lipid membrán-víz határfelületre gyakorolt lényegesen eltérő hatására következtethetünk. Ez a megfigyelés első pillantásra meglepő lehet, tekintve a dipólpotenciál és a lipidek rendezettsége közötti esszenciális kapcsolatot (2, 176). A látszólagos ellentmondás magyarázata hipotézisünk szerint a Cer molekulák különleges szerkezete. A Cer hidrofil feji része ugyanis rendkívül kicsi, sokkal kisebb átmérőjű, mint a hidrofób farok szélessége, és az így létrejövő sajátos, kúp alakú struktúrája révén különleges módon befolyásolhatja a molekuláris szerveződést a membrán-víz határfelületen. Speciális alakjából adódóan ugyanis a Cer jól kitölti a foszlipidek zsírsav oldalláncai közötti tereket, ami a molekuláris rendezettség nagymértékű növekedéséhez vezet és kedvez a lipidkettősréteg spontán negatív görbületének kialakulásában (182, 243). Továbbá, a diacilglicerinhez képest extra hidroxil csoportja miatt a Cer molekulák feji csoportjai a szfingomielin molekulák feji csoportjaival többszörös hidrogénkötések olyan sűrű intermolekuláris hálózatát hozzák létre, amelyre más típusú lipidek nem képesek (244, 245). Ezen túlmenően molekuláris dinamikai szimulációk eredményei alapján a Cer molekulákhoz vízmolekulák nem képesek szorosan kötődni, csupán nagyon mobilis módon, így nem következik be a Cer feji csoportjainak más lipidek esetén gyakran létrejövő rendezett hidrációja, ehelyett azok jellemzően dehidrált állapotban találhatók (182, 246). Következésképpen a szerkezetileg rendezett orientációjú határfelületi vízmolekulák mennyisége nagyon alacsony lehet a Cer jelenlétében és ez, tekintetbe véve, hogy a rendezett vízmolekulák jelentős mértékben hozzájárulnak a dipólpotenciál kialakulásához (2, 176), végül alacsonyabb dipólpotenciált eredményezhet. Mindezek alapján a di-8-ANEPPS-sel kapott eredményeink arra utalnak, hogy a Cer töltés molekuláris rendezettséget fokozó, drámai hatása a membrán-víz határfelületen jelentősen eltérhet a GlcCer vagy a koleszterin által kiváltott hatásoktól.

V./3. A kísérletek során alkalmazott ceramid-töltési protokollok alkalmazásának okai

A sejtmembrán lipidszintjeinek módosítása általában kétféle módon érhető el. Habár az egyik megszokott módszer a lipid anyagcserében részt vevő enzimek aktivitásának specifikus inhibitorokkal, aktivátorokkal vagy magukkal az enzimek bevitelével történő modulálása, amelyet gyakran tekintenek a leginkább (pato)fiziológiai szempontból releváns módszernek, kísérleteinkben mi a másik módszert alkalmaztuk, amely során a sejteket exogén módon,

kívülről töltöttük magukkal a lipidekkel. Döntésünk háttérében három fő indok állt: i) Jelen kutatásunkban a Cer és GlcCer Kv1.3 ioncsatornára és membránbiofizikai paraméterekre gyakorolt hatásainak összehasonlítása volt a fő célunk. Bár a ceramidok esetében létezik egy jól bevált, gyors, szfingomielináz enzimek aktivációján alapuló protokoll a membrán Cer szintjének növelésére (191, 197, 199, 205), a GlcCer esetében még nem írtak le ilyen gyors, enzimátikus módszert. A legszélesebb körben használt, a β -glükocerebrozidáz enzimet gátló konduritol-B-epoxidot (CBE) alkalmazó protokoll csak hosszú távú (jellemzően 72-96 óras) inkubáció esetén vezet a glükozilceramid felhalmozódásához (155, 172, 190). Így az enzimmodosító kezelések nagymértékben eltérő időtartama miatt a szfingomielinázokkal és a CBE-vel kapott eredmények nem lennének összehasonlíthatóak. ii) Az egyes enzimek kívülről történő bevitelkor vagy az endogén enzimek aktivitásának módosításakor legalább két hatás jön létre: egyszerre változik a prekursor szubsztrát és a termék szintje is, ezért mindig kérdéses, hogy a szubsztrát és a termék megváltozott szintje milyen mértékben járul hozzá a megfigyelt hatásokhoz. Ez a bizonytalanság különösen jelentős lenne a CBE kezelés esetében, amely az általunk vizsgált GlcCer szintjét növeli, míg a Cer mennyiségét csökkenti. Továbbá, a bakteriális szfingomielináz moduláló hatásait korábban már leírták *Xenopus laevis* oocitákban kifejezett Kv1.3 csatornára, azonban a hatásokat a prekursor szfingomielin csökkenésének tulajdonították, nem pedig a Cer tartalom emelkedésének (199). iii) Az olyan enzimátikus kezelések, mint a szfingomielináz aktiváció vagy a CBE általában nem lánchossz-specifikusak, és figyelembe véve, hogy a különböző lánchosszúságú ceramidok membránbiofizikai hatásai jelentősen eltérőek lehetnek (242), az eredmények értelmezése nehezebb lenne ezen protokollok alkalmazása esetén.

Vizsgálataink során a sejteket 24 órán keresztül, a sejtek életképességét nem befolyásoló legmagasabb koncentrációban (**15. ábra**) kezeltük a lipidekkel. Hasonló lipidtöltési protokollt korábban más tanulmányokban is hatékonyan alkalmaztak (223-225). A ceramidszintek emelésére szolgáló töltési protokollunk sikeres volt, amit a következők bizonyítottak: i) A sejtek életképessége dóziszfüggő módon csökkent a magasabb lipid koncentrációknál (**15. ábra**), ami összhangban van azon korábbi irodalmi adatokkal, amelyek szerint a ceramidszintek nagymértékű emelkedése sejthalált eredményez (182, 206). ii) A plazmamembrán ceramid és glükozilceramid szintjét áramlási citometria segítségével kvantifikáltuk anti-ceramid vagy anti-glükozilceramid antitestek alkalmazásával, amelyek során szignifikánsan magasabb ceramid és glükozilceramid szinteket mutattunk ki a Cer, illetve GlcCer töltés hatására, mint a kontroll CHO sejtekben (**16. ábra**). A lipidkezelések időtartamának 24 órát választottunk, mivel i) a 24 órás kezelés szignifikánsan nagyobb emelkedést eredményezett, mint az 1 órás kezelés (**15.**

ábra); és ii) a rövidebb inkubációval szemben a hosszabb kezelés a membrán recirkuláció egyensúlyának beállítását eredményezheti, míg az 1 órás töltési protokoll esetén a kezelés időtartamához képest arányosan hosszabb mérési idők nehezítenék az adatok értelmezését. A lipidmetabolitok termelődése főként a hosszabb, de akár a rövidebb inkubációs idejű kívülről történő lipidtöltések esetén is bekövetkezhet, ami akár zavarhatná is a kísérletes következtetéseinket. Bár ezt valóban figyelembe kell venni az eredményeink értelmezésekor, véleményünk szerint ilyen jelentős, zavaró metabolithatások kizárhatók, mivel i) az eredményeink jó összhangban vannak a Cer Kv1.3 és más Kv csatornákra gyakorolt elektrofiziológiai hatását vizsgáló, akár enzimatis kezelések alkalmazó korábbi tanulmányokkal (191-198); ii) a ceramidtöltés dipólpotenciált csökkentő hatást eredményezett (**14. ábra**), míg más szfingolipidektől ennek ellenkezője várható; iii) a ceramid és a glükoszilceramid metabolikus útvonalai közötti erős összekapcsoltság miatt (206) amennyiben jelentős, kompenzáló anyagcsereutak aktiválódnának, egy közös metabolit felhalmozódásának kellene bekövetkeznie, ami eredményeként hasonló változásokat kellene tapasztalnunk a Cer és GlcCer töltések után is. Mi azonban mind a Kv1.3-ra, mind pedig a membránbiofizikai tulajdonságokra gyakorolt hatásokban különböző változásokat figyeltünk meg; végezetül iv) nem észleltünk említésre méltó ceramid felhalmozódást válaszul a GlcCer töltésre, és a glükoszilceramid szintjében sem történt változás a Cer töltés után, még a 24 órás inkubáció esetén sem (**16. ábra**).

Első pillantásra a hosszú láncot tartalmazó C16-Cer-rel való exogén töltés lehetősége ellentmondásosnak tűnhet, mivel a C16-Cer extrém hidrofobicitása miatt ezen vegyület vizes közegben gyakorlatilag oldhatatlan (182). Mindazonáltal irodalmi adatok alapján az általunk alkalmazott exogén töltési protokollról általánosan ismert, hogy sikeresen módosítja a membrán ceramidszintjét (223-225). Bár a hosszú szénláncú ceramidok sejtekbe történő felvételének pontos mechanizmusának feltárása meghaladja jelen disszertáció kereteit, várható, hogy az ilyen ceramidok eltérő, jóval komplexebb módon juthatnak be a sejtekbe, mint a vízben oldódó rövid láncú (C2 vagy C6) társaik. Elképzelhető, hogy a vizes közegben képződött oldhatatlan ceramidrészek a sejtek felszínére ülepednek, és endocitózissal kerülnek a sejtbe, különösen a hosszú távú inkubáció esetén. Felmerülhet az is, hogy különösen a hosszú inkubáció a ceramidok sejten belüli szfingozinná történő esetleges lebomlásához vezethet, ami révén a ceramidtól eltérő, különböző szfingolipidek nagymértékben termelődhetnek megkérdőjelezve a kísérleteink következtetéseit. Bár ez a forgatókönyv nem zárható ki teljes mértékben, az előző bekezdésben tárgyalt számos bizonyíték meggyőzően mutatja, hogy a Cer töltésre adott válaszként valóban elsősorban a membrán ceramidszintje emelkedik meg. Ez azzal

magyarázható, hogy i) a felvett ceramidrészek elkerülhetik az ilyen degradációt; vagy ii) a töltés és a következményes lebomlás révén a szfingozin mennyiségének növekedése reaktív módon aktiválhatja az endogén ceramidtermelést, amint azt korábbi megfigyelések már felvetették (247). Bár az oldhatósági probléma miatt a Cer kezelésünk során várható effektív koncentrációja valószínűleg az alkalmazott 40 μ M alatt van, eredményeink azt mutatják, hogy a membrán ceramidszintje jelentősen megemelkedett a kezelésünkre válaszul és vizsgálatunk következtetései a ceramid hatásaira vonatkozóan a pontos koncentráció ismerete nélkül is érvényesek kell, hogy legyenek.

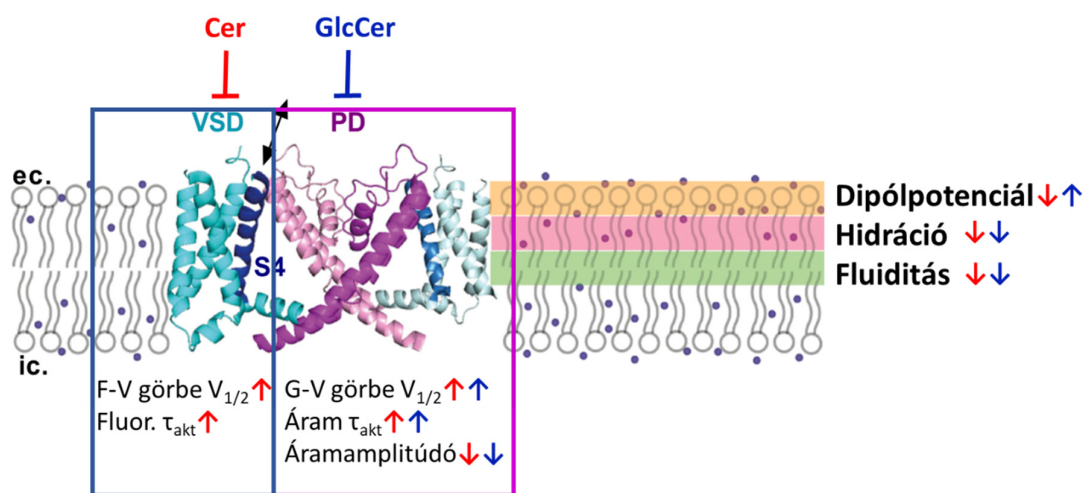
V./4. Kísérleteink egyik fő limitációja a direkt kölcsönhatások vizsgálatának hiánya

Kísérleteink egyik fő limitáló tényezője, hogy nem vizsgáltuk a Kv1.3 és a Cer vagy GlcCer közötti lehetséges direkt, ligandszerű kölcsönhatásokat. Az a tény, hogy a koleszterin és a GlcCer hasonló változásokat okoznak a membrán biofizikai tulajdonságaiban és a csatorna TEVCF mérésekkel meghatározott elektrofiziológiai paramétereiben annak ellenére, hogy két szerkezetileg teljesen különböző lipidről van szó, az indirekt hatások domináns hozzájárulását támasztja alá a lipidek hatásmechanizmusát illetően. A fentebb leírt membránbiofizikai hatások mellett a Cer eltérő intramolekuláris célpontját elvileg magyarázhatja a Kv1.3 VSD és a Cer közötti közvetlen kötődés is. Ilyen közvetlen ceramid-ioncsatorna kölcsönhatásokat leírtak korábban a Piezo2, a feszültségkapuzott anioncsatorna VDAC1 és VDAC2 csatornák molekuláris dinamikai szimulációi során (248, 249). Molekuláris dinamikai szimulációval korábban hasonló specifikus ceramidkötő helyeket derítettek fel a Kv11.1 csatornában is, amelyben a pórus- és feszültségérzékelő domének közötti határfelületen található hidrofób és amfipatikus aminosavdallancok egy, a ceramidmolekulák megkötésére alkalmas zsebet képeznek a VSD közvetlen szomszédságában. Ez a hely ugyanakkor a csatorna egy olyan sajátos, szükületszerű szerkezeti elemében található, amely unikális az úgynevezett „non-swapped” domén topológiája révén (196). Tekintettel arra azonban, hogy a Kv1.3 a hagyományos domén topológiát mutató (ún. „domain-swapped”) szerkezettel rendelkezik, így a VSD-k és PD-k közti tér konformációja a Kv11.1-től alapvetően eltér, hasonló lokalizációjú direkt ceramid kötés valószínűtlen a Kv1.3 esetében. Ezek ellenére a Kv csatornákra gyakorolt lehetséges direkt Cer vagy GlcCer hatások pontos feltárására a jövőben további vizsgálatok szükségesek.

V.5. A C16-ceramid és C16-glükoszilceramid Kv1.3 ioncsatorna kapuzására kifejtett hatásainak lehetséges modellje

A TEVCF méréseink alapján a ceramid módosítja a VSD mozgását (9. és 11. ábra), ami végül gátló hatást fejt ki a csatornán átfolyó ionáramra (12. ábra). Ezzel egyidejűleg, ahogyan azt a membrán biofizikai paramétereinek változásai mutatják, ez a membrán-víz határfelületen történő masszív szerkezeti átrendeződéssel jár együtt (14. ábra). Mi lehet a kapcsolat a két jelenség között, mi lehet a ceramid specifikus hatásmechanizmusa? A depolarizáció hatására az aktivációs kapuzás során az S4 hélixek pozitív töltései a membrán síkjából kifelé mozdulnak (1. ábra), ami a VSD és következésképpen a PD komplex konformációs változását eredményezi, amely végül lehetővé teszi az ionok akadálymentes áramlását a csatornán keresztül. Kísérleteinkben a Cer szignifikánsan jobbra tolta az $F_{\text{norm}}-V$ görbék $V_{1/2}$ értékét (9. ábra C panel), ami a VSD nyugalmi és aktivált állapotainak energiája közötti különbség, azaz a kapuzás során legyőzendő szabadenergia akadály növekedésére utal. Ezzel párhuzamosan az $F_{\text{norm}}-V$ görbék meredekségi együtthatója változatlan maradt (9. ábra E panel), ami viszont azt jelzi, hogy a csatorna kapuzása során a mozgó töltések effektív száma változatlan maradt. A fluoreszcens jel aktivációs időállandójának növekedése ugyanakkor a VSD mozgásának lassulását jelzi (11. ábra). Ezek a változások összességében egy olyan modellel magyarázhatók (26. ábra), amely szerint a ceramid a molekuláris rendezettség jelentős növekedését idézi elő a membrán legkülső, határfelületi rétegében (14. ábra), éppen a sejtmembrán azon régiójában, ahol a VSD aktivációja során végbemenő kezdeti átrendeződések zajlanak, azaz az S4 hélix legfelső részének membrán síkjából történő, kifelé irányuló csúszása is történik (1. ábra). Az ilyen módon megváltozott membránszerkezet ezáltal gátló hatást fejt ki a VSD mozgására, ami a csatorna vezetőképességének gátlásában csúcsosodik ki. Ezzel összhangban Shaker V478W mutánsban a G-V görbe hasonló irányú változásai mellett csökkent ion- és kapuzási áramokról, valamint a kapuzási töltés-feszültség (Q-V) görbe jobbra tolódásáról számoltak be, amelynek meredekségi tényezői nem változtak a ceramid szintet növelő szfingomielináz C kezelés hatására (199). Az abban a tanulmányban javasolt modell szerint a szfingomielin ceramiddá történő átalakulása során a foszfátcsoportok elvesztése az ellentöltések elvesztéséhez vezet, amelyek egyébként megkönnyítenék a kapuzás során a pozitív töltések mozgását. Ez azonban nem zárja ki a mi elméletünket sem, mivel a ceramid megjelenése jelentős membránbiofizikai hatásokkal is jár és a két tényező együttesen járulhat hozzá a ceramid VSD-re gyakorolt hatásához. Elméletileg az is elképzelhető lehetne, hogy a ceramid valójában elsősorban a póruson keresztül hat, ami egy fordított csatolási folyamat során visszahat a VSD-re, mivel a pórusnyitás során az aktivációs kapu mozgása ugyanezen, legkülső

membránrétegben történik, csak éppen az intracelluláris oldalon. Ez a forgatókönyv azonban valószínűtlen, mivel korábbi, egyedi csatornák vezetőképességét és nyitási valószínűségét meghatározó mérések nem mutattak változást az egyedi vezetőképességben, csak az egyedi csatorna nyitási valószínűségének csökkenését mutatták ki ceramidra adott válaszként, ami szintén a VSD elsődleges részvételére utal a PD-re gyakorolt hatások helyett (198). Másrészt a GlcCer által a membrán-víz határfelületen előidézett molekuláris rendezettségben bekövetkező változások, bár feltehetően ugyanabba az irányba hatnak, valószínűleg nem elég nagyok ahhoz, hogy a VSD mozgását megváltoztassák, így ez a lipid csak a Kv1.3 pórusnyitását befolyásolja (26. ábra).



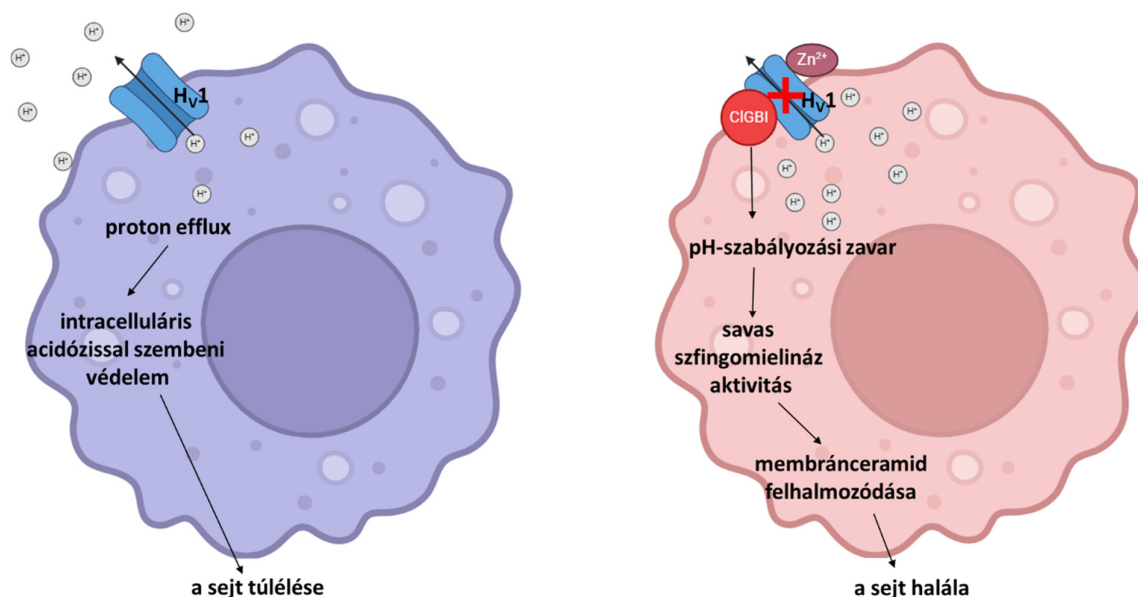
26. ábra: A C16-ceramid (Cer) és a C16-glükozilceramid (GlcCer) elektrofiziológiai és membránbiofizikai hatásainak összefoglalása.

A *Xenopus laevis* oocitákban történő kételektrodás voltage-clamp fluorimetria méréseink segítségével kimutattuk, hogy míg a sejtek Cer (piros nyilak) és GlcCer (kék nyilak) töltése hasonló hatásokat fejt ki a csatorna pórusdoménjén (PD), addig egyedül a Cer módosítja a csatorna feszültség-szenzor doménjét (VSD) jellemző paramétereit, ami arra utal, hogy előbbi valószínűleg elsődlegesen a PD-n, míg utóbbi a VSD-n keresztül fejt ki hatását. Ezzel párhuzamosan a CHO sejtek Cer és GlcCer töltése hasonlóan változtatja a membránrendezettséget a mélyebb rétegekben, ezt jelzi a fluiditás és hidráció hasonló irányú változása. A Cer viszont a membrán-víz határfelületen jelentkező dipólpotenciált ellentétes módon befolyásolja, amely részben magyarázhatja a GlcCer-től eltérő hatásmechanizmusát.

V./6. A Hv1 protoncsatorna gátlása csökkenti a humán THP-1-eredetű polarizált makrofágok életképességét

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. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a Hv1 CIGBI-vel, egy

guanidíniumtartalmú vegyülettel történő gátlása hogyan befolyásolja a polarizált makrofágok életképességét. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a ClGBI, a Hv1 legszélesebb körben használt inhibitora, az *in vitro* funkcionális tesztekben leggyakrabban használt koncentrációkban alkalmazva csökkenti a THP-1-eredetű polarizált makrofágok életképességét és az M1 makrofágok fokozott érzékenységet mutatnak a vegyülettel szemben az M0 és különösen az M2 sejtekhez képest (**19. ábra**). 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 szoros pozitív korrelációt mutat a sejtek Hv1 expressziójának mértékével, illetve a csatornát legmagasabb mennyiségben kifejező M1 makrofágok a legérzékenyebbek a vegyület iránt (**22. ábra**); ii) más, a makrofágok működésében releváns és a ClGBI által potenciálisan szintén blokkolt ioncsatornák gátlószerei nem okoznak érdemi életképesség-csökkenést (**20. ábra**); illetve iii) a Zn^{2+} , egy másik nem specifikus Hv1 inhibitor, hasonlóan befolyásolja a különbözően polarizált makrofágok életképességét, mint a ClGBI (**20. ábra**). A disszertációban nem részletezett kísérleteinkben emellett kimutattuk, hogy a ClGBI a celluláris pH-szabályozás komplex zavarát idézi elő, amely a citoplazma elsavasodásában és a lizoszómák lúgosodásában nyilvánul meg. Ezen pH-változások pedig végül a membránokban található ceramidok felhalmozódását eredményezik (**24. ábra**). A ceramidszintek emelkedésének a ClGBI által kiváltott életképesség-csökkenésben játszott alapvető szerepét bizonyítja, hogy az M0, M1 és M2 makrofágokban is hatékonyan enyhíthető, ha a sejteket előkezeljük ARC39-cel, a pH-érzékeny savas szfingomielináz enzim specifikus inhibitorával (**25. ábra**). Összességében eredményeink arra utalnak, hogy polarizált makrofágokban a Hv1 gátlása polarizációfüggő módon a sejtek életképességének csökkenéséhez vezet, amely egy, a dolgozatban nem részletezett komplex pH-szabályozási zavar és az annak következményeként kialakuló ceramid felhalmozódás miatt következik be, és a folyamatban elsődleges jelentősége van a pH-érzékeny savas szfingomielináz aktivitásának (**27. ábra**). Tekintettel arra, hogy a pH-egyensúly felborulása és a ceramid ebből eredő felhalmozódása várhatóan a Hv1 gátlására adott általános válaszreakciónak tekinthető, a Hv1 gátlószereket alkalmazó *in vitro* funkcionális vizsgálatok eredményeinek értelmezése során mindenképpen figyelembe kell venni, hogy ezen inhibitorok potenciálisan csökkenthetik a vizsgált sejtek életképességét.



27. ábra: A Hv1 gátlása által kiváltott életképesség-csökkenés lehetséges molekuláris mechanizmusa

Fiziológias körülmények között a Hv1 ioncsatornán keresztül megvalósuló, sejtplazmából kifelé történő protonáramlás védelmet nyújt a sejtek számára az intracelluláris acidózissal és az ebből következő sejthalállal szemben. A Hv1 farmakológiai gátlása azonban a sejt egészére kiterjedő, komplex pH-diszregulációt eredményez, amely a citoplazmatikus és lizoszomális kompartmenteket is érintve, elsősorban a savas szfingomielináz aktivitása révén a ceramid túlermeléséhez és következményesen a sejtek halálához vezet.

V./7. A kísérleteink során alkalmazott THP-1-alapú polarizált makrofágmodell előnyei

A disszertációban ismertetett kísérleteink során a polarizált M1 és M2 makrofágok humán THP-1 monocita sejtekből differenciáltatott makrofágokon alapuló modellrendszerét használtuk. A THP-1-eredetű makrofágokat gyakran alkalmazzák az orvosi kutatásokban a legkülönbözőbb célokra (250, 251). Munkánk során a korábbi tanulmányainkhoz hasonlóan (155, 172) először THP-1 sejteket differenciáltattunk makrofágokká PMA, a protein kináz C aktivátora segítségével. A differenciáció során a vegyületet alacsony, 10 ng/ml koncentrációban alkalmaztuk, hogy fenntartsuk a makrofágok másodlagos polarizációs ingerekre való érzékenységét, magasabb PMA dózisok ugyanis olyan nemkívánt génexpressziós változások indukcióját eredményezhetik, amelyek M1-szerű fenotípus kialakulásához vezethetnek (226, 227). Az így nyert differenciált makrofágokat ezt követően további 24 órán át PMA-t nem tartalmazó médiumban pihentettük, hogy biztosítsuk a sejtek primer humán monocitákból származó makrofágokéhoz leginkább hasonlító, M0 fenotípusát és megőrizzük plaszticitásukat a másodlagos ingerek által kiváltott polarizáció iránt (226, 228). A differenciált M0 makrofágokat ezt követően LPS és IFN- γ segítségével klasszikus M1, illetve IL-4 és IL-13 segítségével alternatív útvonalon aktivált M2 makrofágokká polarizáltuk. Bár korábban aggályok merültek fel a THP-1-eredetű makrofágokkal kapott eredmények transzlációs

korlátaival kapcsolatban, főként az alternatív polarizációs útvonalak esetében, azokat összességében továbbra is széles körben alkalmazzák és általánosan elfogadott, egyszerű, megfelelő, megbízható és biológiailag releváns modellrendszernek tekintik (252-254). Ennek oka, hogy számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek közé tartozik könnyű és biztonságos felhasználhatóságuk és tárolásuk, tisztaságuk, jó polarizálhatóságuk, a sejtfenotípus variabilitásának mértékét minimalizáló homogén genetikai hátterük, valamint humán eredetük, amely révén elkerülhetők az egérmodellekkel kapott eredmények humán átültethetőségével kapcsolatos, az emberi és az egér immunrendszer közötti jelentős különbségekből eredő problémák (250, 251). Mindezekkel összhangban kísérleteink során, egyéb, hasonló polarizációs protokollokat alkalmazó tanulmányokhoz hasonlóan (229-232), sikeresen előállítottunk M1 és M2 fenotípusra jellemző CD expressziós profillal rendelkező THP-1-eredetű makrofágokat (234, 235). A sejtekben ugyanis az LPS és IFN- γ által kiváltott polarizáció során az M1 markerek, mint a CD64, CD80 és CD86, míg IL-4 és IL-13 hatására az M2 markerek, mint a CD71 és CD86 magasabb expresszióját mutattuk ki (**18. ábra**). Utóbbi esetben továbbá a CD206, egy hagyományos M2 marker megnövekedett mennyisége is megfigyelhető volt, bár csak a későbbi időpontokban. Noha a CD206 késleltetett megjelenése első pillantásra arra is utalhatna, hogy az M2 modellünk nem megfelelő, ez inkább annak tulajdonítható, hogy a sejteket az áramlási citometriás analízishez Accutase oldattal választottuk fel a sejtenyésző edény aljáról. Korábban ugyanis megfigyelték, hogy az Accutase alkalmazása mesterségesen csökkenti bizonyos markerek, például a CD163 vagy a CD206 sejtfelszíni mennyiségét, miközben az antigénprezentációs markerek, például a CD80 vagy a CD86, illetve az Fc γ R markerek, például a CD64 expresszióját nem befolyásolja (255). Ez magyarázatot adhat arra, hogy méréseink során az M2 sejtekben 24 órás polarizáció esetén a CD206 szintje nem emelkedett számottevően (**18. ábra**). Ezen hátrány ellenére vizsgálataink során végig az Accutase-t használtuk a makrofágok felválasztására, amely különösen az életképesség elemzése során volt lényeges, mivel alkalmazása nem idéz elő jelentős polarizációs és expressziós változásokat, mint a tripszines emésztés, valamint nem vezet csökkent életképességhez, mint az EDTA vagy a sejtkaparási (233). CD marker analízisünk eredményei összességében arra utalnak, hogy a polarizált makrofágok fenotípusai kialakulnak már 24 óra után és legalább 48 óráig fenn is maradnak, azaz stabilnak tekinthetők kísérleteink időtartama alatt. Összefoglalva tehát elmondható, hogy megfelelően szem előtt tartva lehetséges korlátaikat, a humán THP-1-eredetű makrofágokon alapuló kísérleti modellünk alkalmas a Hv1 funkcionális jelentőségének vizsgálatára polarizált makrofágokban.

V/8. A ClGBI a Hv1 protoncsatorna gátlásán keresztül fejt ki az életképességet csökkentő hatását

Vizsgálataink során tehát azt találtuk, hogy a Hv1 inhibitor ClGBI dózisfüggően csökkentette az M0, M1 és M2 fenotípusú THP-1-eredetű makrofágok életképességét (**19. ábra**), és a csatorna biológiai funkcióit elemző sejtes vizsgálatokban széles körben alkalmazott koncentrációkban (15, 86, 89, 100, 122) a sejtek döntő többségének pusztulását eredményezte. Nemrégiben a ClGBI szelektivitásának vizsgálata során azonban kiderült, hogy ez a vegyület különböző feszültségkapuzott kálium- és nátriumcsatornák, így a $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v10.1$, $K_v11.1$, $Nav1.4$ és $Nav1.5$ működését is befolyásolja (121). Ez felveti a kérdést, hogy a ClGBI makrofágok életképességére gyakorolt hatását valóban a Hv1 gátlása eredményezi, különösen, mivel a fenti csatornák fontos szerepet játszanak a makrofágok fagocitózisának, migrációjának és proinflammatorikus aktivitásának szabályozásában (31, 256). Több bizonyíték is alátámasztja azonban, hogy a ClGBI ténylegesen a Hv1-en és nem egyéb ioncsatornán keresztül fejt ki hatását: i) Először is, a makrofágokban kifejeződő egyéb, releváns ioncsatornák gátlószerei nem módosították jelentős mértékben a sejtek életképességét a funkcionális vizsgálatokban jellemzően használt koncentrációkban (**20. ábra**). ii) Másodszor, a Zn^{2+} , egy másik Hv1 gátlószer (66), a ClGBI-hez hasonlóan csökkentette a polarizált makrofágok életképességét (**20. ábra**). iii) Harmadszor, a ClGBI hatásainak mértéke jól korrelált a Hv1 expressziós szintjével. Nevezetesen, a legnagyobb Hv1 csatornaszámmal jellemezhető M1 makrofágok voltak a leginkább, míg a legalacsonyabb expresszióval rendelkező M2 sejtek a legkevésbé érzékenyek a ClGBI iránt (**19. és 20. ábra**). A Hv1 M1 makrofágokban általunk is megfigyelt nagyobb mennyisége és jelentősége összhangban van az irodalmi adatokkal. Korábban kimutatták ugyanis, hogy az M1 citokin TNF- α -val végzett 24 vagy 48 órás kezelés jelentősen megnövelte a protonáramok expresszióját egér csontvelőből származó makrofágokban (110). A GM-CSF, egy másik M1 citokin, szintén fokozta a Hv1 expresszióját STAT3- és STAT5-függő módon ezekben a sejtekben (111). Ezzel összhangban az LPS-ről és az IFN- γ -ról ismert, hogy aktiválják a NADPH-oxidázt (257, 258), ami viszont azt eredményezheti, hogy az M1 sejtek működése nagyobb mértékben függhet a megfelelő protonáramlástól, amelyet elsősorban a Hv1 biztosít. Ez pedig a csatorna fokozott expressziójához, így a sejtek megnövekedett ClGBI iránti érzékenységéhez vezethet az M1 makrofágokban. Továbbá humán perifériás monocita eredetű M1 makrofágokban megfigyelték azt is, hogy a Hv1 Zn^{2+} általi gátlása a pH oszcilláció megszűnéséhez és a fagoszómák tartós lúgosodásához vezetett, míg az M2 sejtekben csak csekély hatást gyakorolt a fagoszómák gyors savasodására (94). Az M2 makrofágok általunk tapasztalt csökkent ClGBI iránti

érzékenységeivel összhangban egér csontvelő eredetű makrofágokban nemrégiben kimutatták, hogy az IL-4 modulálja a Zn^{2+} homeosztázist azáltal, hogy metallothionein- és Zn-export-függő növekedést vált ki a labilis Zn^{2+} -poolban, ami a csatorna fokozott gátlásán keresztül feltehetően alacsonyabb Hv1 konduktanciát eredményezhet (238). iv) Negyedszer, a ClGBI által kiváltott és a Hv1 gátlás által közvetített toxicitás a sejtekben együtt járt a pH-szabályozás kiterjedt zavarával, ez utóbbit a dolgozatban nem mutattuk be.

V./9. A Hv1 gátlása révén létrejövő életképesség-csökkenés kulcsfontosságú lépése a pH-szenzitív enzimek által szintetizált ceramidok felhalmozódása

Mivel a ceramidot termelő enzimek aktivitása erősen pH-függő (210-212), feltételeztük, hogy a pH-szabályozási zavar hatására ezen enzimek aktivitása közötti egyensúly felborulhat, ami a ceramidok fokozott termeléséhez vezethet és ez a Hv1 gátlása által kiváltott sejthalál folyamatában fontos tényező lehet. Ezt a feltételezést támasztotta alá, hogy a ClGBI-re adott válaszként időfüggő emelkedést figyeltünk meg a membránban található ceramid mennyiségében (**24. ábra**). Érdekes módon már ClGBI kezelés nélkül is magasabb ceramid szinteket találtunk 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 (259-261). Az eleve magasabb ceramidszint viszont egyben fokozhatja az M1 makrofágok ceramid-túltermelésre való hajlamát is és így hozzájárulhat e sejtek Hv1 gátlók által kiváltott életképesség-csökkenéssel szembeni nagyobb érzékenységéhez. Ezen túlmenően, hogy egyértelműen bizonyítsuk a ceramid szint emelkedésének okozati szerepét a folyamatban, megvizsgáltuk a ceramidot termelő enzimek potenciális hozzájárulását specifikus inhibitorok segítségével. Ehhez a szerin-palmitoiltranszferázt myriocinnal (239), a neutrális szfingomielinázt GW4869-cel (225), a savas szfingomielináz pedig ARC39-cel (240) gátoltuk. A vizsgált inhibitorok közül az ARC39 jelentős védelmet nyújtott a ClGBI 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 (**25. ábra**).

V./10. Általános összefoglalás, eredményeink biológiai relevanciája

A disszertációban ismertetett eredményeink alapján a sejtmembrán C16-ceramid (Cer) és C16-glükoszilceramid (GlcCer) töltése gátló jellegű hatást fejt ki a *Xenopus laevis* oocitákban kifejezett Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kapuzására. TEVCF mérések során kimutattuk, hogy bár mindkét lipid jobbra, azaz pozitívabb membránpotenciálok felé tolja a csatorna egyensúlyi aktivációját jellemző $G_{\text{norm}}-V$ 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 különíthetünk el. Eredményeink alapján a Cer hatását a VSD-n fejt ki, amit a fluoreszcens jel egyensúlyi aktivációját jellemző $F_{\text{norm}}-V$ görbék $G_{\text{norm}}-V$ görbékkel párhuzamos jobbra tolódása és a fluoreszcens jel aktivációs kinetikájának lassulása mutat. Ezzel szemben a GlcCer nem idéz elő ilyen változásokat, ezáltal elsősorban közvetlenül a PD-re hat. A kétféle ceramid komplex membránbiofizikai hatásait a lipidkettősréteg három különböző mélységi rétegében a fluiditásra, hidrációra és dipólpotenciálra gyakorolt hatások számszerűsítésével vizsgáltuk. Kísérleteink során kimutattuk, hogy bár mindkét lipid hasonló módon változtatja meg a membrán szerveződését a belső rétegekben, amit a membrán fluiditásának és hidratációjának 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 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 patofiziológiai jelentőségét széles körben leírták a szív- és érrendszeri, valamint neurodegeneratív rendellenességekben (12-14), míg a ceramidok szintje és termelése csökken különféle tumorokban, ami hozzájárul az apoptózissal szembeni rezisztenciájukhoz (152, 262). Másrészt a glükoszilceramidok kórosan felhalmozódnak Gaucher- és Parkinson-kórban, valamint emelkedett szintjük hozzájárulhat tumorokban a multidrog-rezisztencia kialakulásához (10, 11, 206). A kóros állapotokban megfigyelt jelentőségük mellett azonban ezeknek a lipidek alapvető élettani szerepet is tulajdonítanak. A ceramidok jellemzően nagyon alacsony mennyiségben találhatók a sejtmembránban, de bizonyos stressz stimulusok, így a $\text{TNF-}\alpha$, ionizáló sugárzás és számos kemoterápiás gyógyszer hatására mennyiségük nagymértékben megnő, ami elősegíti a sejthalál különböző formáihoz, így autofágiához, mitofágiához, apoptózishoz és az öregedéshez vezető jelátviteli mechanizmusok beindulását (182, 206). Ezzel szemben a glükoszilceramidok meglehetősen nagy mennyiségben vannak jelen a sejtmembránban és fontos elemek a lipidkettősrétegek

laterális szerveződésében (155, 218). Tekintettel arra, hogy a Kv csatornák gyakorlatilag az összes fent leírt kóros állapot és sejtfolyamat fontos szereplői, a megváltozott lipid szintek és a Kv csatornák konduktív funkcióiban megjelenő eltérések közötti kapcsolat feltárása jelentős mértékben segítheti ezen rendellenességek jobb megértését és egyben új molekuláris célpontok azonosítását és terápiás megközelítések kifejlesztését.

A disszertáció második részében a Hv1 gátlás 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, dózisfüggően csökkenti a humán THP-1-eredetű polarizált makrofágok életképességét. Eredményeink alapján a különböző útvonalon polarizált makrofágok ClGBI iránti érzékenysége különbözik: az M1 sejtek bizonyultak a legérzékenyebbeknek, míg az M2 makrofágok a legkevésbé érzékenyek a vegyület iránt. Azáltal, hogy a Hv1 ioncsatornát szintén gátló Zn^{2+} hasonló hatásokat okozott, továbbá ezzel párhuzamosan a makrofágok esetében releváns egyéb ioncsatornákat blokkoló szelektív gátlószerek nem csökkentették jelentősen a sejtek életképességét, kísérleti bizonyítékot szolgáltatunk arra is, hogy ez a ClGBI-indukált életképesség-csökkenés valószínűsíthetően túlnyomórészt a Hv1 gátlásán keresztül valósul meg, amely a sejtmembrán ceramidszintjének emelkedéséhez vezet. Továbbá kísérleteink során bizonyítottuk a ceramidok kulcsfontosságú szerepét a Hv1 gátlás által kiváltott életképesség-csökkenésben, ugyanis kimutattuk, hogy a ClGBI hatásai jórészt kivédhetőek az ARC39 vegyülettel, amely szelektíven gátolja a pH-érzékeny savas szfingomielináz aktivitása révén bekövetkező ceramidtermelést. A témában született közleményünkben szerzőtársaim kísérletei továbbá igazolták, hogy a sejtek csökkent életképességéhez jelentősen hozzájárul a pH-egyensúly komplex zavara, amely mind a citoplazmatikus, mind a lizoszomális kompartmenteket érinti. Ezeket a kísérleteket viszont a dolgozatban részleteiben nem tárgyaljuk, ugyanis azok nem tekinthetők saját eredményeimnek.

Eredményeink orvosi relevanciája abból a tényből fakad, hogy a Hv1 gátlók alkalmazása nagyon ígéretesnek tűnik a ROS-túltermeléssel és az ehhez kapcsolódó gyulladásos immunaktivációval és kóros proliferációval összefüggő különböző patológiás állapotokban. A mikrogliaiban például 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 (149). Ennek megfelelően egér betegségmodellekben a Hv1 funkcionális hiánya csökkentette a neuronok elhalását, az agykárosodást és a motoros

deficitet ischeamiás stroke-ban (141, 142), az agyi artériák szűkülete által kiváltott fehérállomány-károsodást (263), a demielinizációt cuprizon vagy lizofoszfatidilkolin által kiváltott sclerosis multiplex modellekben (147, 148), valamint a neuronális apoptózist és piroptózist, funkcionális károsodást és fájdalom iránti túlérzékenységet traumás agy- és gerincvelő-sérülés modellekben (143-146). Továbbá a dorzális gyöki ganglionok perifériás szenzoros neuronjaiban a csatorna farmakológiai gátlása mérsékelte a gyulladásos fájdalmat és a morfium által kiváltott analgetikus toleranciát és hiperalgéziát (90). Ezek a vizsgálatok a Hv1 gátlók jótékony alkalmazhatóságára utalnak a neuroinflammatorikus folyamatokkal összefüggő patológiás állapotokban. 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 bennük gyakran megfigyelhető, 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 hozzájárulva az immunrendszeri aktiváció elkerüléséhez is (88). A Hv1 túlexpressziója következetesen összefügg a betegség súlyosságával és rossz prognózisával különféle daganatokban, így emlőrákban (92) és kolorektális karcinómában is (93). Ezzel összhangban a Hv1 siRNS-indukált downregulációja gátolta emlőrák, kolorektális karcinóma és mieloid szarkóma sejtvonalak proliferációját, migrációját és invázióját, illetve a Hv1 genetikai hiánya késleltette növekedésüket tumoros xenotranszplantátumokban egerekben (91-93, 131). A csatorna farmakológiai gátlása is ígéretesnek tűnik, mivel a Zn^{2+} kezelés csökkentette a humán glioblastoma multiforme sejtek túlélését és migrációját (18), valamint a CIGBI csökkentette az emlőráksejtek életképességét mind egyrétegű, mind háromdimenziós szferoid kultúrákban (19). Eredményeink szerint ugyanakkor a Hv1 gátlása a polarizált makrofágok, elsősorban a tipikusan tumorelles 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, ami ugyanis rámutathat arra, hogy a Hv1 blokkolók alkalmazásához személyre szabott, szelektív, tumorsejteket célzó megközelítésre van szükség. Összességében eredményeink alapján a Hv1 gátlók csökkentik a humán polarizált makrofágok életképességét, amit ezen inhibitorok mind szándékolt, mind pedig káros hatásainak tekintetében figyelembe kell venni.

VI. 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. Kételektrodás 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.

VII. SUMMARY

The relationship between voltage-gated ion channels and lipids is bidirectional. On the one hand, ion channels are transmembrane proteins, therefore, major structural rearrangements resulting in activation are subject to modulatory actions by the lipids of the cell membrane. On the other hand, ion channels can influence numerous cellular processes, thereby indirectly fine-tuning cellular lipid levels. Although ceramides play very important physiological and pathophysiological roles, their potential interactions with voltage-gated ion channels have not been previously studied in detail.

In the first part of the dissertation, we investigated how C16-ceramide (Cer) and C16-glycosylceramide (GlcCer) influence the activation gating of the Kv1.3 ion channel. Using two-electrode voltage-clamp fluorimetry, we found that following exogenous loading of the cells, both lipids exert similar, inhibitory effects on parameters characterizing the channel's pore domain (PD), while only Cer has a similar effect on voltage-sensor domain (VSD) movement. These suggest that the two lipids have distinct intramolecular targets within the ion channel, namely Cer primarily targets the VSD, while GlcCer the PD. Using environment-sensitive fluorophores and fluorescence-based methods, we demonstrated that while Cer and GlcCer similarly increase molecular order in the inner hydrophobic regions of the lipid bilayer, Cer uniquely induces a strong molecular rearrangement at the membrane-water interface, where, during depolarization, the S4 segment of the VSD, containing positively charged amino acids, slides outward from the plane of the membrane. This distinct membrane biophysical effect may explain the unique mechanism of action of Cer, which differs from that of GlcCer, by primarily targeting the VSD.

In the second part of the dissertation, we demonstrated using flow cytometry that the most widely used Hv1 proton channel inhibitor, 5-chloro-2-guanidinobenzimidazole (ClGBI), reduces the viability of polarized macrophages derived from human THP-1 cells at biologically relevant doses, with M1 macrophages being the most sensitive and M2 cells the least sensitive to effects of the compound. The specific effects of ClGBI mediated by Hv1 inhibition are indicated by the fact that the sensitivity of polarized macrophages correlates well with the Hv1 expression levels of the cells. Furthermore, among other ion channel inhibitors relevant to macrophages, only Zn^{2+} , another Hv1 inhibitor, exhibited similar effects. Our results also highlight that inhibition of the channel results in excessive ceramide production via the action of the pH-sensitive acidic sphingomyelinase, which eventually culminates in cell death.

VIII. REFERENCIÁK

1. 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.
2. 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.
3. Beverley KM, Levitan I. Cholesterol regulation of mechanosensitive ion channels. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1352259.
4. Harraz OF, Hill-Eubanks D, Nelson MT. PIP(2): A critical regulator of vascular ion channels hiding in plain sight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(34):20378–89.
5. Lipinsky M, Tobelaim WS, Peretz A, Simhaev L, Yeheskel A, Yakubovich D, et al. A unique mechanism of inactivation gating of the Kv channel family member Kv7.1 and its modulation by PIP2 and calmodulin. *Sci Adv.* 2020;6(51).
6. Rohacs T. Phosphoinositide Regulation of TRP Channels: A Functional Overview in the Structural Era. *Annu Rev Physiol.* 2024;86:329–55.
7. Thompson MJ, Baenziger JE. Ion channels as lipid sensors: from structures to mechanisms. *Nat Chem Biol.* 2020;16(12):1331–42.
8. Bercea CI, Cottrell GS, Tamagnini F, McNeish AJ. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and hypertension: a review of vasodilatory mechanisms of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid. *Br J Pharmacol.* 2021;178(4):860–77.
9. Elinder F, Liin SI. Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front Physiol.* 2017;8:43.
10. 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.
11. Smith L, Schapira AHV. GBA Variants and Parkinson Disease: Mechanisms and Treatments. *Cells.* 2022;11(8).
12. 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.
13. 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.

14. Hammerschmidt P, Bruning JC. Contribution of specific ceramides to obesity-associated metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(8):395.
15. Alvear-Arias JJ, Carrillo C, Villar JP, Garcia-Betancourt R, Pena-Pichicoi A, Fernandez A, et al. Expression of H(v)1 proton channels in myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and its potential role in T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(15):e2104453119.
16. Asuaje A, Smaldini P, Martin P, Enrique N, Orlowski A, Aiello EA, et al. The inhibition of voltage-gated H(+) channel (HVCN1) induces acidification of leukemic Jurkat T cells promoting cell death by apoptosis. *Pflugers Arch.* 2017;469(2):251–61.
17. Hernandez-Espinosa DR, Gale JR, Scrabis MG, Aizenman E. Microglial reprogramming by Hv1 antagonism protects neurons from inflammatory and glutamate toxicity. *J Neurochem.* 2023;165(1):29–54.
18. Ribeiro-Silva L, Queiroz FO, da Silva AM, Hirata AE, Arcisio-Miranda M. Voltage-Gated Proton Channel in Human Glioblastoma Multiforme Cells. *ACS Chem Neurosci.* 2016;7(7):864–9.
19. Ventura C, Leon IE, Asuaje A, Martin P, Enrique N, Nunez M, et al. Differential expression of the long and truncated Hv1 isoforms in breast-cancer cells. *J Cell Physiol.* 2020;235(11):8757–67.
20. Liu S, Zhao Y, Dong H, Xiao L, Zhang Y, Yang Y, et al. Structures of wild-type and H451N mutant human lymphocyte potassium channel KV1.3. *Cell Discov.* 2021;7(1):39.
21. Chandy KG, Sanches K, Norton RS. Structure of the voltage-gated potassium channel K(V)1.3: Insights into the inactivated conformation and binding to therapeutic leads. *Channels (Austin).* 2023;17(1):2253104.
22. Tyagi A, Ahmed T, Jian S, Bajaj S, Ong ST, Goay SSM, et al. Rearrangement of a unique Kv1.3 selectivity filter conformation upon binding of a drug. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(5).
23. Groome JR, Bayless-Edwards L. Roles for Countercharge in the Voltage Sensor Domain of Ion Channels. *Front Pharmacol.* 2020;11:160.
24. Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron.* 2010;67(6):915–28.
25. Matthies D, Bae C, Toombes GE, Fox T, Bartesaghi A, Subramaniam S, et al. Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. *Elife.* 2018;7.
26. Pau V, Zhou Y, Ramu Y, Xu Y, Lu Z. Crystal structure of an inactivated mutant mammalian voltage-gated K(+) channel. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(10):857–65.

27. Szanto TG, Papp F, Zakany F, Varga Z, Deutsch C, Panyi G. Molecular rearrangements in S6 during slow inactivation in Shaker-IR potassium channels. *J Gen Physiol.* 2023;155(7).
28. Szanto TG, Zakany F, Papp F, Varga Z, Deutsch CJ, Panyi G. The activation gate controls steady-state inactivation and recovery from inactivation in Shaker. *J Gen Physiol.* 2020;152(8).
29. Perez-Verdaguer M, Capera J, Serrano-Novillo C, Estadella I, Sastre D, Felipe A. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is a promising multitherapeutic target against human pathologies. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(5):577–91.
30. Selvakumar P, Fernandez-Marino AI, Khanra N, He C, Paquette AJ, Wang B, et al. Structures of the T cell potassium channel Kv1.3 with immunoglobulin modulators. *Nat Commun.* 2022;13(1):3854.
31. Feske S, Wulff H, Skolnik EY. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:291–353.
32. Veytia-Bucheli JI, Jimenez-Vargas JM, Melchy-Perez EI, Sandoval-Hernandez MA, Possani LD, Rosenstein Y. K(v)1.3 channel blockade with the Vm24 scorpion toxin attenuates the CD4(+) effector memory T cell response to TCR stimulation. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1):45.
33. Perez-Garcia MT, Ciudad P, Lopez-Lopez JR. The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018;314(1):C27–C42.
34. Doczi MA, Morielli AD, Damon DH. Kv1.3 channels in postganglionic sympathetic neurons: expression, function, and modulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(3):R733–40.
35. Checchetto V, Azzolini M, Peruzzo R, Capitanio P, Leanza L. Mitochondrial potassium channels in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(1):51–8.
36. Szabo I, Zoratti M, Biasutto L. Targeting mitochondrial ion channels for cancer therapy. *Redox Biol.* 2021;42:101846.
37. Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hansel W, et al. Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol.* 2004;65(6):1364–74.
38. Gubic S, Hendrickx LA, Toplak Z, Sterle M, Peigneur S, Tomasic T, et al. Discovery of K(V) 1.3 ion channel inhibitors: Medicinal chemistry approaches and challenges. *Med Res Rev.* 2021;41(4):2423–73.

39. Marzian S, Stansfeld PJ, Rapedius M, Rinne S, Nematian-Ardestani E, Abbruzzese JL, et al. Side pockets provide the basis for a new mechanism of Kv channel-specific inhibition. *Nat Chem Biol.* 2013;9(8):507–13.
40. Wulff H, Yarov-Yarovoy V. Channels: Sticking to nooks and crannies. *Nat Chem Biol.* 2013;9(8):473–4.
41. Schmitz A, Sankaranarayanan A, Azam P, Schmidt-Lassen K, Homerick D, Hansel W, et al. Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol Pharmacol.* 2005;68(5):1254–70.
42. Zimin PI, Garic B, Bodendiek SB, Mahieux C, Wulff H, Zhorov BS. Potassium channel block by a tripartite complex of two cationophilic ligands and a potassium ion. *Mol Pharmacol.* 2010;78(4):588–99.
43. Lopez-Mateos D, Harris BJ, Hernandez-Gonzalez A, Yarov-Yarovoy V, Wulff H. Recent advances in the pharmacology of voltage-gated ion channels. *Pharmacol Rev.* 2025;77(6):100090.
44. Herzig V, Cristofori-Armstrong B, Israel MR, Nixon SA, Vetter I, King GF. Animal toxins - Nature's evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochem Pharmacol.* 2020;181:114096.
45. Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, et al. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol.* 2005;67(4):1369–81.
46. Chi V, Pennington MW, Norton RS, Tarcha EJ, Londono LM, Sims-Fahey B, et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon.* 2012;59(4):529–46.
47. Tarcha EJ, Chi V, Munoz-Elias EJ, Bailey D, Londono LM, Upadhyay SK, et al. Durable pharmacological responses from the peptide ShK-186, a specific Kv1.3 channel inhibitor that suppresses T cell mediators of autoimmune disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(3):642–53.
48. Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Munoz-Elias EJ, Kruger JG, et al. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180762.
49. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, et al. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol Pharmacol.* 2012;82(3):372–82.

50. Gurrola GB, Hernandez-Lopez RA, Rodriguez de la Vega RC, Varga Z, Batista CV, Salas-Castillo SP, et al. Structure, function, and chemical synthesis of Vaejovis mexicanus peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry*. 2012;51(19):4049–61.
51. Novoseletsky VN, Volyntseva AD, Shaitan KV, Kirpichnikov MP, Feofanov AV. Modeling of the Binding of Peptide Blockers to Voltage-Gated Potassium Channels: Approaches and Evidence. *Acta Naturae*. 2016;8(2):35–46.
52. Bednenko J, Harriman R, Marien L, Nguyen HM, Agrawal A, Papoyan A, et al. A multiplatform strategy for the discovery of conventional monoclonal antibodies that inhibit the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *MAbs*. 2018;10(4):636–50.
53. Stortelers C, Pinto-Espinoza C, Van Hoorick D, Koch-Nolte F. Modulating ion channel function with antibodies and nanobodies. *Curr Opin Immunol*. 2018;52:18–26.
54. Wang RE, Wang Y, Zhang Y, Gabrelow C, Zhang Y, Chi V, et al. Rational design of a Kv1.3 channel-blocking antibody as a selective immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(41):11501–6.
55. Xiao Z, You X, Chen M, Li H, Chen B, Hu Z, et al. A novel spider toxin as a selective antagonist of the Kv1 subfamily of voltage-gated potassium channels through gating modulation. *J Biol Chem*. 2025;301(4):108341.
56. Hu L, Pennington M, Jiang Q, Whartenby KA, Calabresi PA. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;179(7):4563–70.
57. Zhao Y, Huang J, Yuan X, Peng B, Liu W, Han S, et al. Toxins Targeting the Kv1.3 Channel: Potential Immunomodulators for Autoimmune Diseases. *Toxins (Basel)*. 2015;7(5):1749–64.
58. Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11094–9.
59. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, et al. The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest*. 2003;111(11):1703–13.
60. Wang X, Li G, Guo J, Zhang Z, Zhang S, Zhu Y, et al. Kv1.3 Channel as a Key Therapeutic Target for Neuroinflammatory Diseases: State of the Art and Beyond. *Front Neurosci*. 2019;13:1393.

61. Maezawa I, Nguyen HM, Di Lucente J, Jenkins DP, Singh V, Hilt S, et al. Kv1.3 inhibition as a potential microglia-targeted therapy for Alzheimer's disease: preclinical proof of concept. *Brain*. 2018;141(2):596–612.
62. Ramesha S, Rayaprolu S, Bowen CA, Giver CR, Bitarafan S, Nguyen HM, et al. Unique molecular characteristics and microglial origin of Kv1.3 channel-positive brain myeloid cells in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(11).
63. Sarkar S, Nguyen HM, Malovic E, Luo J, Langley M, Palanisamy BN, et al. Kv1.3 modulates neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Clin Invest*. 2020;130(8):4195–212.
64. Szabo I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, et al. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(39):14861–6.
65. Teisseyre A, Palko-Labuz A, Sroda-Pomianek K, Michalak K. Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 as a Target in Therapy of Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:933.
66. Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*. 2006;440(7088):1213–6.
67. Sasaki M, Takagi M, Okamura Y. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science*. 2006;312(5773):589–92.
68. Jardin C, Ohlwein N, Franzen A, Chaves G, Musset B. The pH-dependent gating of the human voltage-gated proton channel from computational simulations. *Phys Chem Chem Phys*. 2022;24(17):9964–77.
69. Musset B, Smith SM, Rajan S, Cherny VV, Morgan D, DeCoursey TE. Oligomerization of the voltage-gated proton channel. *Channels (Austin)*. 2010;4(4):260–5.
70. DeCoursey TE, Morgan D, Musset B, Cherny VV. Insights into the structure and function of Hv1 from a meta-analysis of mutation studies. *J Gen Physiol*. 2016;148(2):97–118.
71. DeCoursey TE. Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, H(V)1. *J R Soc Interface*. 2018;15(141).
72. Musset B, Decoursey T. Biophysical properties of the voltage gated proton channel H(V)1. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 2012;1(5):605–20.
73. Gonzalez C, Koch HP, Drum BM, Larsson HP. Strong cooperativity between subunits in voltage-gated proton channels. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(1):51–6.
74. Tombola F, Ulbrich MH, Kohout SC, Isacoff EY. The opening of the two pores of the Hv1 voltage-gated proton channel is tuned by cooperativity. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(1):44–50.

75. Boytsov D, Brescia S, Chaves G, Koeﬂer S, Hanneschlaeger C, Siligan C, et al. Trapped Pore Waters in the Open Proton Channel H(V) 1. *Small*. 2023;19(16):e2205968.
76. DeCoursey TE, Cherny VV. Deuterium isotope effects on permeation and gating of proton channels in rat alveolar epithelium. *J Gen Physiol*. 1997;109(4):415–34.
77. van Keulen SC, Gianti E, Carnevale V, Klein ML, Rothlisberger U, Delemotte L. Does Proton Conduction in the Voltage-Gated H(+) Channel hHv1 Involve Grotthuss-Like Hopping via Acidic Residues? *J Phys Chem B*. 2017;121(15):3340–51.
78. Berger TK, Isacoff EY. The pore of the voltage-gated proton channel. *Neuron*. 2011;72(6):991–1000.
79. Chamberlin A, Qiu F, Wang Y, Noskov SY, Larsson HP. Mapping the gating and permeation pathways in the voltage-gated proton channel Hv1. *J Mol Biol*. 2015;427(1):131–45.
80. Dudev T, Musset B, Morgan D, Cherny VV, Smith SM, Mazmanian K, et al. Selectivity Mechanism of the Voltage-gated Proton Channel, HV1. *Sci Rep*. 2015;5:10320.
81. Bayrhuber M, Maslennikov I, Kwiatkowski W, Sobol A, Wierschem C, Eichmann C, et al. Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure and Functional Behavior of the Human Proton Channel. *Biochemistry*. 2019;58(39):4017–27.
82. El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, Arnaudeau S, Okamura Y, Demaurex N. VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification. *J Exp Med*. 2010;207(1):129–39.
83. Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, Clapham DE. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7642–7.
84. Zhao R, Kennedy K, De Blas GA, Orta G, Pavarotti MA, Arias RJ, et al. Role of human Hv1 channels in sperm capacitation and white blood cell respiratory burst established by a designed peptide inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(50):E11847–E56.
85. Capasso M, Bhamrah MK, Henley T, Boyd RS, Langlais C, Cain K, et al. HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol*. 2010;11(3):265–72.
86. Ma J, Gao X, Li Y, DeCoursey TE, Shull GE, Wang HS. The HVCN1 voltage-gated proton channel contributes to pH regulation in canine ventricular myocytes. *J Physiol*. 2022;600(9):2089–103.

87. Coe D, Poobalasingam T, Fu H, Bonacina F, Wang G, Morales V, et al. Loss of voltage-gated hydrogen channel 1 expression reveals heterogeneous metabolic adaptation to intracellular acidification by T cells. *JCI Insight*. 2022;7(10).
88. Alvear-Arias JJ, Pena-Pichicoi A, Carrillo C, Fernandez M, Gonzalez T, Garate JA, et al. Role of voltage-gated proton channel (Hv1) in cancer biology. *Front Pharmacol*. 2023;14:1175702.
89. Matamoros-Volante A, Trevino CL. Capacitation-associated alkalization in human sperm is differentially controlled at the subcellular level. *J Cell Sci*. 2020;133(2).
90. Zhang Q, Ren Y, Mo Y, Guo P, Liao P, Luo Y, et al. Inhibiting Hv1 channel in peripheral sensory neurons attenuates chronic inflammatory pain and opioid side effects. *Cell Res*. 2022;32(5):461–76.
91. Wang Y, Li SJ, Pan J, Che Y, Yin J, Zhao Q. Specific expression of the human voltage-gated proton channel Hv1 in highly metastatic breast cancer cells, promotes tumor progression and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;412(2):353–9.
92. Wang Y, Li SJ, Wu X, Che Y, Li Q. Clinicopathological and biological significance of human voltage-gated proton channel Hv1 protein overexpression in breast cancer. *J Biol Chem*. 2012;287(17):13877–88.
93. Wang Y, Wu X, Li Q, Zhang S, Li SJ. Human voltage-gated proton channel hv1: a new potential biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(8):e70550.
94. Canton J, Khezri R, Glogauer M, Grinstein S. Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. *Mol Biol Cell*. 2014;25(21):3330–41.
95. El Chemaly A, Nunes P, Jimaja W, Castelbou C, Demaurex N. Hv1 proton channels differentially regulate the pH of neutrophil and macrophage phagosomes by sustaining the production of phagosomal ROS that inhibit the delivery of vacuolar ATPases. *J Leukoc Biol*. 2014;95(5):827–39.
96. Li SS, Zhang M, Wang JH, Yang F, Kang B, Xu JJ, et al. Monitoring the Changes of pH in Lysosomes during Autophagy and Apoptosis by Plasmon Enhanced Raman Imaging. *Anal Chem*. 2019;91(13):8398–405.
97. Zhang W, Bai J, Hang K, Xu J, Zhou C, Li L, et al. Role of Lysosomal Acidification Dysfunction in Mesenchymal Stem Cell Senescence. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:817877.
98. Mindell JA. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2012;74:69–86.
99. Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*. 2010;140(3):327–37.

100. Meszaros B, Papp F, Mocsar G, Kokai E, Kovacs K, Tajti G, et al. The voltage-gated proton channel hHv1 is functionally expressed in human chorion-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):7100.
101. Yan L, Liu JJ, Hong L. Hv1 channel in immune cells and pharmacology. *Pharmacol Res.* 2025;219:107885.
102. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23–35.
103. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549–55.
104. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):750–61.
105. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:123–47.
106. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958–69.
107. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723–37.
108. Kapus A, Romanek R, Qu AY, Rotstein OD, Grinstein S. A pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *J Gen Physiol.* 1993;102(4):729–60.
109. DeCoursey TE, Cherny VV. Voltage-activated proton currents in human THP-1 monocytes. *J Membr Biol.* 1996;152(2):131–40.
110. Thomas MP, Chartrand K, Reynolds A, Vitvitsky V, Banerjee R, Gendelman HE. Ion channel blockade attenuates aggregated alpha synuclein induction of microglial reactive oxygen species: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2007;100(2):503–19.
111. Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA, Deepe GS, Jr. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity.* 2013;39(4):697–710.
112. Cherny VV, DeCoursey TE. pH-dependent inhibition of voltage-gated H(+) currents in rat alveolar epithelial cells by Zn(2+) and other divalent cations. *J Gen Physiol.* 1999;114(6):819–38.

113. Qiu F, Chamberlin A, Watkins BM, Ionescu A, Perez ME, Barro-Soria R, et al. Molecular mechanism of Zn²⁺ inhibition of a voltage-gated proton channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):E5962–E71.
114. Musset B, Smith SM, Rajan S, Cherny VV, Sujai S, Morgan D, et al. Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating. *J Physiol*. 2010;588(Pt 9):1435–49.
115. De La Rosa V, Bennett AL, Ramsey IS. Coupling between an electrostatic network and the Zn(2+) binding site modulates Hv1 activation. *J Gen Physiol*. 2018;150(6):863–81.
116. Iwaki M, Takeshita K, Kondo HX, Kinoshita K, Okamura Y, Takano Y, et al. Zn(2+)-Binding to the Voltage-Gated Proton Channel Hv1/VSOP. *J Phys Chem B*. 2018;122(39):9076–80.
117. Jardin C, Chaves G, Musset B. Assessing Structural Determinants of Zn(2+) Binding to Human H(V)1 via Multiple MD Simulations. *Biophys J*. 2020;118(5):1221–33.
118. Hong L, Pathak MM, Kim IH, Ta D, Tombola F. Voltage-sensing domain of voltage-gated proton channel Hv1 shares mechanism of block with pore domains. *Neuron*. 2013;77(2):274–87.
119. Hong L, Kim IH, Tombola F. Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9971–6.
120. Pupo A, Gonzalez Leon C. In pursuit of an inhibitory drug for the proton channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9673–4.
121. Szanto TG, Feher A, Korpos E, Gyongyosi A, Kallai J, Meszaros B, et al. 5-Chloro-2-Guanidinobenzimidazole (ClGBI) Is a Non-Selective Inhibitor of the Human H(V)1 Channel. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(5).
122. Cozzolino M, Gyongyosi A, Korpos E, Gogolak P, Naseem MU, Kallai J, et al. The Voltage-Gated Hv1 H(+) Channel Is Expressed in Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7).
123. Gattas MV, Jaffe A, Barahona J, Conner GE. Proton channel blockers inhibit Duox activity independent of Hv1 effects. *Redox Biol*. 2020;28:101346.
124. Zhao C, Hong L, Galpin JD, Riahi S, Lim VT, Webster PD, et al. HIFs: New arginine mimic inhibitors of the Hv1 channel with improved VSD-ligand interactions. *J Gen Physiol*. 2021;153(9).
125. Zhao C, Hong L, Riahi S, Lim VT, Tobias DJ, Tombola F. A novel Hv1 inhibitor reveals a new mechanism of inhibition of a voltage-sensing domain. *J Gen Physiol*. 2021;153(9).

126. Furutani K, Ji RR. Targeting Hv1 proton channel for pain control. *Cell Res.* 2022;32(5):419–20.
127. Shin H, Song JH. Antipsychotics, chlorpromazine and haloperidol inhibit voltage-gated proton currents in BV2 microglial cells. *Eur J Pharmacol.* 2014;738:256–62.
128. Shin H, Kim J, Song JH. Clozapine and olanzapine inhibit proton currents in BV2 microglial cells. *Eur J Pharmacol.* 2015;755:74–9.
129. Matsuura T, Mori T, Hasaka M, Kuno M, Kawawaki J, Nishikawa K, et al. Inhibition of voltage-gated proton channels by local anaesthetics in GMI-R1 rat microglia. *J Physiol.* 2012;590(4):827–44.
130. Petho Z, Pajtas D, Piga M, Magyar Z, Zakany F, Kovacs T, et al. A synthetic flavonoid derivate in the plasma membrane transforms the voltage-clamp fluorometry signal of CiHv1. *FEBS J.* 2024;291(11):2354–71.
131. El Chemaly A, Jaquet V, Cambet Y, Caillon A, Cherpain O, Balafa A, et al. Discovery and validation of new Hv1 proton channel inhibitors with onco-therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2023;1870(3):119415.
132. Piga M, Varga Z, Feher A, Papp F, Korpos E, Bangera KC, et al. Identification of a Novel Structural Class of H(V)1 Inhibitors by Structure-Based Virtual Screening. *J Chem Inf Model.* 2024;64(12):4850–62.
133. Piga M, Domingos GJ, Feher A, Papp F, Bangera KC, Varga Z, et al. Targeting voltage-gated proton channel H(V)1: Optimised 5-phenyl-2-aminoimidazoles with anticancer potential. *Eur J Med Chem.* 2025;297:117936.
134. Tang D, Yang Y, Xiao Z, Xu J, Yang Q, Dai H, et al. Scorpion toxin inhibits the voltage-gated proton channel using a Zn(2+) -like long-range conformational coupling mechanism. *Br J Pharmacol.* 2020;177(10):2351–64.
135. Zhao R, Shen R, Dai H, Perozo E, Goldstein SAN. Molecular determinants of inhibition of the human proton channel hHv1 by the designer peptide C6 and a bivalent derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(23):e2120750119.
136. Swartz KJ. Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon.* 2007;49(2):213–30.
137. Alabi AA, Bahamonde MI, Jung HJ, Kim JI, Swartz KJ. Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature.* 2007;450(7168):370–5.
138. Takahashi H, Kim JI, Min HJ, Sato K, Swartz KJ, Shimada I. Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol.* 2000;297(3):771–80.

139. Borrego J, Meszaros B, Szanto TG, Teshome RT, Korpos E, Varga Z, et al. Modulators of the Human Voltage-Gated Proton Channel H(v)1. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2025;18(10).
140. Zhao R, Lopez B, Schwingshackl A, Goldstein SAN. Protection from acute lung injury by a peptide designed to inhibit the voltage-gated proton channel. *iScience*. 2023;26(1):105901.
141. Tian DS, Li CY, Qin C, Murugan M, Wu LJ, Liu JL. Deficiency in the voltage-gated proton channel Hv1 increases M2 polarization of microglia and attenuates brain damage from photothrombotic ischemic stroke. *J Neurochem*. 2016;139(1):96–105.
142. Wu LJ, Wu G, Akhavan Sharif MR, Baker A, Jia Y, Fahey FH, et al. The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nat Neurosci*. 2012;15(4):565–73.
143. Li X, Yu Z, Zong W, Chen P, Li J, Wang M, et al. Deficiency of the microglial Hv1 proton channel attenuates neuronal pyroptosis and inhibits inflammatory reaction after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):263.
144. Li Y, Ritzel RM, He J, Cao T, Sabirzhanov B, Li H, et al. The voltage-gated proton channel Hv1 plays a detrimental role in contusion spinal cord injury via extracellular acidosis-mediated neuroinflammation. *Brain Behav Immun*. 2021;91:267–83.
145. Ritzel RM, He J, Li Y, Cao T, Khan N, Shim B, et al. Proton extrusion during oxidative burst in microglia exacerbates pathological acidosis following traumatic brain injury. *Glia*. 2021;69(3):746–64.
146. Peng J, Yi MH, Jeong H, McEwan PP, Zheng J, Wu G, et al. The voltage-gated proton channel Hv1 promotes microglia-astrocyte communication and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Mol Brain*. 2021;14(1):99.
147. Chen M, Yang LL, Hu ZW, Qin C, Zhou LQ, Duan YL, et al. Deficiency of microglial Hv1 channel is associated with activation of autophagic pathway and ROS production in LPC-induced demyelination mouse model. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):333.
148. Liu J, Tian D, Murugan M, Eyo UB, Dreyfus CF, Wang W, et al. Microglial Hv1 proton channel promotes cuprizone-induced demyelination through oxidative damage. *J Neurochem*. 2015;135(2):347–56.
149. Shen Y, Luo Y, Liao P, Zuo Y, Jiang R. Role of the Voltage-Gated Proton Channel Hv1 in Nervous Systems. *Neurosci Bull*. 2023;39(7):1157–72.
150. Hondares E, Brown MA, Musset B, Morgan D, Cherny VV, Taubert C, et al. Enhanced activation of an amino-terminally truncated isoform of the voltage-gated proton channel HVCN1 enriched in malignant B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):18078–83.

151. Kovacs T, Nagy P, Panyi G, Szenté L, Varga Z, Zakany F. Cyclodextrins: Only Pharmaceutical Excipients or Full-Fledged Drug Candidates? *Pharmaceutics*. 2022;14(12).
152. 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).
153. 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).
154. 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;178(18):3667–81.
155. 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.
156. Kovacs T, Sohajda T, Szenté 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.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. Sezgin E, Waite D, Bernardino de la Serna J, Eggeling C. Spectral imaging to measure heterogeneity in membrane lipid packing. *Chemphyschem*. 2015;16(7):1387–94.
162. 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.

163. Orlikowska-Rzeznik H, Krok E, Chattopadhyay M, Lester A, Piatkowski L. Laurdan Discerns Lipid Membrane Hydration and Cholesterol Content. *J Phys Chem B*. 2023;127(15):3382–91.
164. Haselwandter CA, MacKinnon R. Piezo's membrane footprint and its contribution to mechanosensitivity. *Elife*. 2018;7.
165. Bocharov EV, Lesovoy DM, Pavlov KV, Pustovalova YE, Bocharova OV, Arseniev AS. Alternative packing of EGFR transmembrane domain suggests that protein-lipid interactions underlie signal conduction across membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(6):1254–61.
166. Zhang J, Li Q, Wu Y, Wang D, Xu L, Zhang Y, et al. Cholesterol content in cell membrane maintains surface levels of ErbB2 and confers a therapeutic vulnerability in ErbB2-positive breast cancer. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):15.
167. daCosta CJ, Dey L, Therien JP, Baenziger JE. A distinct mechanism for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Chem Biol*. 2013;9(11):701–7.
168. Bruno A, Costantino G, de Fabritiis G, Pastor M, Selent J. Membrane-sensitive conformational states of helix 8 in the metabotropic Glu2 receptor, a class C GPCR. *PLoS One*. 2012;7(8):e42023.
169. 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.
170. Wang L. Measurements and implications of the membrane dipole potential. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:615–35.
171. 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.
172. 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.
173. 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.
174. Zakany F, Szabo M, Batta G, Karpati L, Mandity IM, Fulop P, et al. 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*. 2021;9:647300.

175. 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.
176. 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.
177. Clarke RJ. Dipole-Potential-Mediated Effects on Ion Pump Kinetics. *Biophys J*. 2015;109(8):1513–20.
178. 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.
179. 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.
180. Goni FM, Alonso A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(1):169–77.
181. Stancevic B, Kolesnick R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Lett*. 2010;584(9):1728–40.
182. Alonso A, Goni FM. The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annu Rev Biophys*. 2018;47:633–54.
183. Castro BM, Prieto M, Silva LC. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog Lipid Res*. 2014;54:53–67.
184. Gupta A, Muralidharan S, Torta F, Wenk MR, Wohland T. Long acyl chain ceramides govern cholesterol and cytoskeleton dependence of membrane outer leaflet dynamics. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862(3):183153.
185. Merrill AH, Jr. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev*. 2011;111(10):6387–422.
186. van Meer G, Wolthoorn J, Degroote S. The fate and function of glycosphingolipid glucosylceramide. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358(1433):869–73.
187. Varela AR, Goncalves da Silva AM, Fedorov A, Futerman AH, Prieto M, Silva LC. Effect of glucosylceramide on the biophysical properties of fluid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(3):1122–30.
188. Varela ARP, Couto AS, Fedorov A, Futerman AH, Prieto M, Silva LC. Glucosylceramide Reorganizes Cholesterol-Containing Domains in a Fluid Phospholipid Membrane. *Biophys J*. 2016;110(3):612–22.

189. Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS. A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
190. 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.
191. Moral-Sanz J, Gonzalez T, Menendez C, David M, Moreno L, Macias A, et al. Ceramide inhibits Kv currents and contributes to TP-receptor-induced vasoconstriction in rat and human pulmonary arteries. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(1):C186–94.
192. Quiroz-Acosta T, Berneo K, Arenas I, Garcia DE. Inactivation of potassium channels by ceramide in rat pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys.* 2023;735:109520.
193. Bai Y, Wang J, Shan H, Lu Y, Zhang Y, Luo X, et al. Sphingolipid metabolite ceramide causes metabolic perturbation contributing to HERG K⁺ channel dysfunction. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(5):429–40.
194. Chapman H, Ramstrom C, Korhonen L, Laine M, Wann KT, Lindholm D, et al. Downregulation of the HERG (KCNH2) K(+) channel by ceramide: evidence for ubiquitin-mediated lysosomal degradation. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 22):5325–34.
195. Ganapathi SB, Fox TE, Kester M, Elmslie KS. Ceramide modulates HERG potassium channel gating by translocation into lipid rafts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(1):C74–86.
196. Miranda WE, Guo J, Mesa-Galloso H, Corradi V, Lees-Miller JP, Tieleman DP, et al. Lipid regulation of hERG1 channel function. *Nat Commun.* 2021;12(1):1409.
197. Bock J, Szabo I, Gamper N, Adams C, Gulbins E. Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(4):890–7.
198. Gulbins E, Szabo I, Baltzer K, Lang F. Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(14):7661–6.
199. Xu Y, Ramu Y, Lu Z. Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature.* 2008;451(7180):826–9.
200. Cowgill J, Chanda B. The contribution of voltage clamp fluorometry to the understanding of channel and transporter mechanisms. *J Gen Physiol.* 2019;151(10):1163–72.

201. 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.
202. 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.
203. Bolotina V, Omelyanenko V, Heyes B, Ryan U, Bregestovski P. Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca²⁺-dependent K⁺ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. 1989;415(3):262–8.
204. Chang HM, Reitstetter R, Mason RP, Gruener R. Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: an interpretation using structural stress as a unifying concept. *J Membr Biol*. 1995;143(1):51–63.
205. Shi J, Hyman AJ, De Vecchis D, Chong J, Lichtenstein L, Futers TS, et al. Sphingomyelinase Disables Inactivation in Endogenous PIEZO1 Channels. *Cell Rep*. 2020;33(1):108225.
206. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(3):175–91.
207. Hannun YA, Merrill AH, Jr., Luberto C. The bioactive sphingolipid playbook. A primer for the uninitiated as well as sphingolipidologists. *J Lipid Res*. 2025;66(6):100813.
208. Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem*. 2011;286(32):27855–62.
209. Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(1):33–50.
210. Hanada K, Hara T, Nishijima M. Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. *J Biol Chem*. 2000;275(12):8409–15.
211. Muhle C, Kornhuber J. Characterization of a Neutral Sphingomyelinase Activity in Human Serum and Plasma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
212. Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmuller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med*. 2008;14(4):382–91.
213. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244–7.

214. Chaurasia B, Summers SA. Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(10):538–50.
215. Meikle PJ, Summers SA. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(2):79–91.
216. Choudhary P, Kumari S, Bagri K, Deshmukh R. Ceramide: a central regulator in Alzheimer's disease pathogenesis. *Inflammopharmacology.* 2025;33(4):1775–83.
217. Chowdhury MR, Jin HK, Bae JS. Diverse Roles of Ceramide in the Progression and Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biomedicines.* 2022;10(8).
218. Reza S, Ugorski M, Suchanski J. Glucosylceramide and galactosylceramide, small glycosphingolipids with significant impact on health and disease. *Glycobiology.* 2021;31(11):1416–34.
219. 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).
220. Hertz E, Chen Y, Sidransky E. Gaucher disease provides a unique window into Parkinson disease pathogenesis. *Nat Rev Neurol.* 2024;20(9):526–40.
221. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012;11(11):986–98.
222. Zhao X, Pandey MK. Central Roles of Glucosylceramide in Driving Cancer Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2025;26(20).
223. Cai Z, Deng L, Fan Y, Ren Y, Ling Y, Tu J, et al. Dysregulation of Ceramide Metabolism Is Linked to Iron Deposition and Activation of Related Pathways in the Aorta of Atherosclerotic Miniature Pigs. *Antioxidants (Basel).* 2023;13(1).
224. Choi BJ, Park MH, Park KH, Han WH, Yoon HJ, Jung HY, et al. Immunotherapy targeting plasma ASM is protective in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2023;14(1):1631.
225. Zietzer A, Jahnle AL, Bulic M, Gutbrod K, Dusing P, Hosen MR, et al. Activation of neutral sphingomyelinase 2 through hyperglycemia contributes to endothelial apoptosis via vesicle-bound intercellular transfer of ceramides. *Cell Mol Life Sci.* 2021;79(1):48.
226. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods.* 2016;430:64–70.

227. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 2007;56(1):45–50.
228. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1):e8668.
229. Chen Y, Lu J, Xie Z, Tang J, Lian X, Li X. The Mechanism of Alisol B23 Acetate Inhibiting Lung Cancer: Targeted Regulation of CD11b/CD18 to Influence Macrophage Polarization. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:3677–89.
230. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15:577.
231. Yang L, Han P, Cui T, Miao Y, Zhao T, Cui Z, et al. M2 macrophage inhibits the antitumor effects of Lenvatinib on intrahepatic cholangiocarcinoma. *Front Immunol*. 2023;14:1251648.
232. Zhang M, Liu K, Zhang Q, Xu J, Liu J, Lin H, et al. Alpha fetoprotein promotes polarization of macrophages towards M2-like phenotype and inhibits macrophages to phagocytize hepatoma cells. *Front Immunol*. 2023;14:1081572.
233. Song Q, Zhang Y, Zhou M, Xu Y, Zhang Q, Wu L, et al. The Culture Dish Surface Influences the Phenotype and Dissociation Strategy in Distinct Mouse Macrophage Populations. *Front Immunol*. 2022;13:920232.
234. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677–86.
235. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:1084.
236. Duran-Riveroll LM, Cembella AD. Guanidinium Toxins and Their Interactions with Voltage-Gated Sodium Ion Channels. *Mar Drugs*. 2017;15(10).
237. Varga Z, Juhasz T, Matta C, Fodor J, Katona E, Bartok A, et al. Switch of voltage-gated K⁺ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca²⁺-oscillations and cartilage formation. *PLoS One*. 2011;6(11):e27957.
238. Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Divanovic S, Caruso JA, Deepe GS, Jr. IL-4 Induces Metallothionein 3- and SLC30A4-Dependent Increase in

Intracellular Zn(2+) that Promotes Pathogen Persistence in Macrophages. *Cell Rep.* 2016;16(12):3232–46.

239. Monasterio BG, Jimenez-Rojo N, Garcia-Arribas AB, Riezman H, Goni FM, Alonso A. Plasma membrane effects of sphingolipid-synthesis inhibition by myriocin in CHO cells: a biophysical and lipidomic study. *Sci Rep.* 2022;12(1):955.

240. Naser E, Kadow S, Schumacher F, Mohamed ZH, Kappe C, Hessler G, et al. Characterization of the small molecule ARC39, a direct and specific inhibitor of acid sphingomyelinase in vitro. *J Lipid Res.* 2020;61(6):896–910.

241. Maula T, Al Sazzad MA, Slotte JP. Influence of Hydroxylation, Chain Length, and Chain Unsaturation on Bilayer Properties of Ceramides. *Biophys J.* 2015;109(8):1639–51.

242. Pinto SN, Silva LC, Futerman AH, Prieto M. Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: the role of acyl chain length and unsaturation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808(11):2753–60.

243. Peeters BWA, Piet ACA, Fornerod M. Generating Membrane Curvature at the Nuclear Pore: A Lipid Point of View. *Cells.* 2022;11(3).

244. de la Arada I, Gonzalez-Ramirez EJ, Alonso A, Goni FM, Arrondo JR. Exploring polar headgroup interactions between sphingomyelin and ceramide with infrared spectroscopy. *Sci Rep.* 2020;10(1):17606.

245. Kinoshita M, Matsumori N. Inimitable Impacts of Ceramides on Lipid Rafts Formed in Artificial and Natural Cell Membranes. *Membranes (Basel).* 2022;12(8).

246. Gillams RJ, Busto JV, Busch S, Goni FM, Lorenz CD, McLain SE. Solvation and hydration of the ceramide headgroup in a non-polar solution. *J Phys Chem B.* 2015;119(1):128–39.

247. Ogretmen B, Pettus BJ, Rossi MJ, Wood R, Usta J, Szulc Z, et al. Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. *J Biol Chem.* 2002;277(15):12960–9.

248. Dadsena S, Bockelmann S, Mina JGM, Hassan DG, Korneev S, Razzera G, et al. Ceramides bind VDAC2 to trigger mitochondrial apoptosis. *Nat Commun.* 2019;10(1):1832.

249. Lin Y, Buyan A, Corry B. Characterizing the lipid fingerprint of the mechanosensitive channel Piezo2. *J Gen Physiol.* 2022;154(10).

250. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):37–45.

251. Mohd Yasin ZN, Mohd Idrus FN, Hoe CH, Yvonne-Tee GB. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation*. 2022;128:67–82.
252. Rynikova M, Adamkova P, Hradicka P, Stofilova J, Harvanova D, Matejova J, et al. Transcriptomic Analysis of Macrophage Polarization Protocols: Vitamin D(3) or IL-4 and IL-13 Do Not Polarize THP-1 Monocytes into Reliable M2 Macrophages. *Biomedicines*. 2023;11(2).
253. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol*. 2017;88:58–68.
254. Tedesco S, De Majo F, Kim J, Trenti A, Trevisi L, Fadini GP, et al. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol*. 2018;9:71.
255. Chen S, So EC, Strome SE, Zhang X. Impact of Detachment Methods on M2 Macrophage Phenotype and Function. *J Immunol Methods*. 2015;426:56–61.
256. Selezneva A, Gibb AJ, Willis D. The contribution of ion channels to shaping macrophage behaviour. *Front Pharmacol*. 2022;13:970234.
257. Greenlee-Wacker MC, Nauseef WM. IFN-gamma targets macrophage-mediated immune responses toward *Staphylococcus aureus*. *J Leukoc Biol*. 2017;101(3):751–8.
258. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*. 2016;167(2):457–70 e13.
259. Jiang J, Shi Y, Cao J, Lu Y, Sun G, Yang J. Role of ASM/Cer/TXNIP signaling module in the NLRP3 inflammasome activation. *Lipids Health Dis*. 2021;20(1):19.
260. Lu Z, Li Y, Syn WK, Wang Z, Lopes-Virella MF, Lyons TJ, et al. Amitriptyline inhibits nonalcoholic steatohepatitis and atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS through modulation of sphingolipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;318(2):E131–E44.
261. Wang J, Keshava S, Das K, Kolesnick R, Jiang XC, Pendurthi UR, et al. Alterations to Sphingomyelin Metabolism Affect Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(1):64–78.
262. Sheridan M, Ogretmen B. The Role of Ceramide Metabolism and Signaling in the Regulation of Mitophagy and Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10).

263. Yu Y, Luo X, Li C, Ding F, Wang M, Xie M, et al. Microglial Hv1 proton channels promote white matter injuries after chronic hypoperfusion in mice. *J Neurochem.* 2020;152(3):350–67.

IX. TÁRGYSZAVAK

Tárgyszavak:

ceramid

glükózilceramid

feszültségkapuzott káliumcsatorna

feszültségkapuzott protoncsatorna

aktivációs kapuzás

sejtmembrán

membránbiofizika

makrofág

sejthalál

savas szfingomielináz

Keywords:

ceramide

glucosylceramide

voltage-gated potassium channel

voltage-gated proton channel

activation gating

cell membrane

membrane biophysics

macrophage

cell death

acid sphingomyelinase

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Zákány Florinának, hogy témavezetőként gyakorlati és elméleti tanácsaival 2018 szeptembere óta folyamatosan támogatta és segítette fejlődésemet, előrehaladásomat, valamint doktori értekezésem elkészítését.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Panyi Györgynek, hogy lehetőséget adott arra, hogy az Intézetben dolgozhassak és biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munkát és szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönet illeti Utasi-Szabó Rita, Vágóné Toldi Hajnalka és Bagosi Adrienn kollégáimat, valamint kollaborációs partnereimet, Dr. Kovács Tamást, Dr. Szabó Mátét, Dr. Székelyhidi Virágot, Kothalawala Rosemaryt, Prof. Dr. Varga Zoltánt és Prof. Dr. Nagy Pétert a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért, tanácsaikért, baráti támogatásukért.

Végezetül szeretném megköszönni Családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak és feleségemnek, Dr. Borics Fanninak azt a mérhetetlen szeretetet, támogatást és türelmet, amelyet a munkám során kaptam és amely nélkül ez a disszertáció nem valósult volna meg.

A disszertáció elkészítéséhez szükséges kísérletek elvégzését az alábbi pályázati források is biztosították: OTKA FK146740, OTKA FK143400, STARTING 153195, BO/00392/23, BO/00676/24, 2024-1.2.3-HU-RIZONT-2024-00099.

XI. 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/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





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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.04.27.

