

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A TASK-3-csatornák mitokondriális expressziójának,
valamint a sejtek életképességében és proliferációjában
betöltött szerepének vizsgálata melanoma malignum
sejttenyészetben**

Kosztka Livia



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A TASK-3-csatornák mitokondriális expressziójának, valamint a sejtek életképességében és proliferációjában betöltött szerepének vizsgálata melanoma malignum sejttenyészetben

Kosztka Livia

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1 A K ⁺ -csatornákról általában	7
2.2 A TASK-3-csatornák genetikai és molekuláris biológiai jellemzői.....	13
2.3 A TASK-3-csatornák megoszlása és fiziológiás funkciói.....	15
2.4 A TASK-3-csatornák szerepe az apoptózisban	16
2.5 A TASK-3-csatornák szerepe a tumorképződésben.....	18
2.6 A TASK-3-csatornák és a mitokondriális funkció esetleges összefüggései	20
2.7. Célkitűzések	21
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	22
3.1. Alkalmazott sejtvonalak, és azok tenyésztése.....	22
3.1.1. Alkalmazott sejtvonalak	22
3.1.2. Sejttenyésztés	22
3.2. Transzfekciós módszerek	23
3.3. Mitokondriumok preparálása	23
3.3.1. Mitokondriumok izolálása melanoma sejtekből	23
3.3.2. Mitokondriális membránvezikulumok előállítás.....	24
3.4. RNS-preparálás és -manipuláció	25
3.4.1. A TASK-3-specifikus mRNS melanoma sejtekből való izolálása, és szekvenciájának meghatározása.....	25
3.4.2. RT-PCR.....	26
3.4.3. Humán TASK-3-specifikus shRNS kazetták tervezése, és RNS-interferencia alkalmazása	27
3.4.4. TASK-3-specifikus shRNS expressziós vektor előállítás.....	28
3.5. Immunjelölés és mikroszkópia.....	30
3.5.1. Mitokondriális jelölés tenyésztett sejtekben	30
3.5.2. Immuncitokémia.....	31
3.5.3. Az izolált mitokondriumok immunjelölése.....	31
3.5.4. Immunhisztokémia	32
3.5.5. Mikroszkópia.....	33
3.6. Western-blot.....	34
3.7. A sejtszám és sejtméret vizsgálata	35

3.7.1. CyQUANT assay.....	35
3.7.2. MTT-assay	35
3.7.3. A sejtméret meghatározása.....	36
3.8. Funkcionális mérések.....	36
3.8.1. Elektrofiziológiai mérések HEK293 sejteken.....	36
3.8.2. A melanoma sejtek mitokondriális funkciójának mérése	37
3.9. Statisztikai módszerek.....	38
4. EREDMÉNYEK	39
4.1. A TASK-3-csatornák mitokondriális expressziója melanoma sejtekben.....	39
4.2. A humán keratinocyták TASK-3 immunpozitivitása tenyészetben és beágyazott szövetben.....	44
4.3 RNS-interferencia alkalmazása	46
4.4. A TASK-3-expresszió gátlásának hatására megváltozik a tenyészetben fenntartott melanoma sejtek mérete és alakja	50
4.5. A TASK-3-expresszió gátlása a DNS-tartalom és a mitokondriális funkció csökkenését eredményezte	52
5. MEGBESZÉLÉS.....	54
ÖSSZEFOGLALÁS.....	59
SUMMARY	60
IRODALOMJEGYZÉK.....	61
Hivatkozott közlemények jegyzéke	61
Publikációs lista.....	67
TÁRGYSZAVAK.....	69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	70
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	71

1. BEVEZETÉS

A TASK-3-csatornák a K^+ -csatornák legújabban felfedezett családjába tartoznak, amelynek tagjai alegységenként két pórusformáló hurkot tartalmaznak, és dimereket alkotva hozzák létre a funkcionális K^+ -áteresztő pórust. Ismert, hogy a TASK-3-csatornák emlős sejtekben számos fiziológiai funkcióval rendelkeznek. Szerepet játszanak például patkányban az aldosteronszekréció szabályozásában (Czirják és Enyedi, 2002), részt vesznek a neuronok ingerlékenységének beállításában (Han és munkatársai, 2002; Chemin és munkatársai, 2003; Kang és munkatársai, 2003; Meuth és munkatársai, 2003; Berg és munkatársai, 2004; Hopwood és Trapp, 2005), valamint a perifériás kemoreceptorok hypoxia iránti érzékenységének biztosításában (Yamamoto és munkatársai, 2002; Washburn és munkatársai, 2002; Washburn és munkatársai, 2003; Williams és Buckler, 2004). A központi idegrendszerben zajló neurotranszmisszóban szintén fontos szerepet töltenek be, mivel pH-érzékenységük révén módosíthatják a neurotranszmitterek posztszinaptikus hatásait.

Míg a fent említett folyamatokban a TASK-3-csatornák szerepe a nyugalmi membránpotenciálra gyakorolt hatásukon keresztül valósul meg, számos egyéb sejtműködésben is szerepet játszanak, ahol kevésbé világos, hogy hatásukat mily módon fejtik ki. A patkány cerebellum fejlődése során a TASK-3- és TASK-1-alegységeket tartalmazó heterodimer csatornák részt vesznek a külső szemcsesejtes rétegből végleges helyükre vándorló szemcsesejtekben az apoptotikus sejthalál indukciójában, és ily módon azok végleges mennyiségének kialakításában. A TASK-csatornák pro-apoptotikus funkciójának hátterében feltehetően az a mechanizmus áll, hogy a rajtuk keresztül kiáramló káliumionok mozgását víz követi, ami apoptotikus sejttérfogat-csökkenéshez vezet. Emellett az intracelluláris K^+ -koncentráció csökkenése közvetlenül is sejthalálhoz vezethet az apoptotikus folyamatokban részt vevő enzimek (pl. kaspázok) aktiválása révén.

Rendkívül meglepő jelenség, hogy a TASK-3-csatornák mellett, hogy bizonyos sejtípusokban apoptózist kiváltó hatással rendelkeznek, más körülmények között ezzel ellentétben tumorképződést serkentő funkciót mutatnak. A TASK-3-fehérjét kódoló *kcnk9* gén amplifikációját számos különböző daganattípusban leírták, ami a rosszindulatú emlő- és tüdődaganatok jelentős hányadában a fehérjetermék fokozott expressziójával is együtt jár. A csatornafehérje tumorképződést serkentő funkcióját emellett kísérletes adatok is megerősítik, amelyek igazolják, hogy a hatás kifejlődéséhez nem csupán a fehérje jelenlétére, hanem a működőképes, K^+ -permeábilis TASK-3-csatornák kialakulására is szükség van. Habár nem

ismert, hogy a TASK-3-csatornák pontosan mily módon járulnak hozzá a daganatos sejtproliferációhoz, bizonyos felvetések szerint növelik a daganatos sejtek hipoxiával és szérumdeprivációval szembeni ellenállását, ami különösen jelentős lehet a solid tumorok központi, gyengén vascularizált régiójában. Ez a felvetés arra enged következtetni, hogy a TASK-3-csatornák működése és a mitokondriális oxidációs folyamatok között valamilyen összefüggés áll fenn, amit irodalmi adatok is megerősítenek, azonban a jelenség pontos megértéséhez még további vizsgálatokra van szükség.

A jelen disszertációban bemutatott eredményeink igazolják, hogy a tenyészetben fenntartott melanoma sejtekben a TASK-3-csatornák feltehetően mitokondriális elhelyezkedést mutatnak, valamint azt is alátámasztják, hogy *in vitro* körülmények között a TASK-3-csatornák jelenléte és működése kulcsfontosságú a mitokondriális funkció, és ennél fogva a sejtek életképességének fenntartása szempontjából. Ezen megfigyelések hozzájárulnak ahhoz, hogy megértsük a TASK-3-csatornák potenciális tumorképződést serkentő hatásának háttérében álló mechanizmust, ami a jövőben esetleg terápiás szempontból is jelentőséggel bírhat.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A K^+ -csatornákról általában

Az emlős sejtek membránjaiban jelen lévő, K^+ -permeábilis pórusokat kialakító fehérjék valamennyi sejtípusban megtalálhatóak. A K^+ -csatornák számos sejt folyamatban részt vesznek, és az általuk betöltött funkciók különféle csatornatípusokhoz köthetők. A K^+ -csatornákat az őket felépítő alegységek száma és szerkezete alapján három főcsoportba soroljuk. Az alegységek csoportosításának fő szempontja a bennük található transzmembrán szegmensek (TMS) száma, aminek alapján kettő, négy és hat transzmembrán szegmenst tartalmazó alegységek különböztethetők meg. Minden alegységben megtalálható az a konzervatív szekvenciájú hurok, ami a csatorna ionpermeábilis pórusának kialakításáért felelős. A káliumcsatornák főcsaládjait, és azok molekuláris szerkezetének legfontosabb jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.

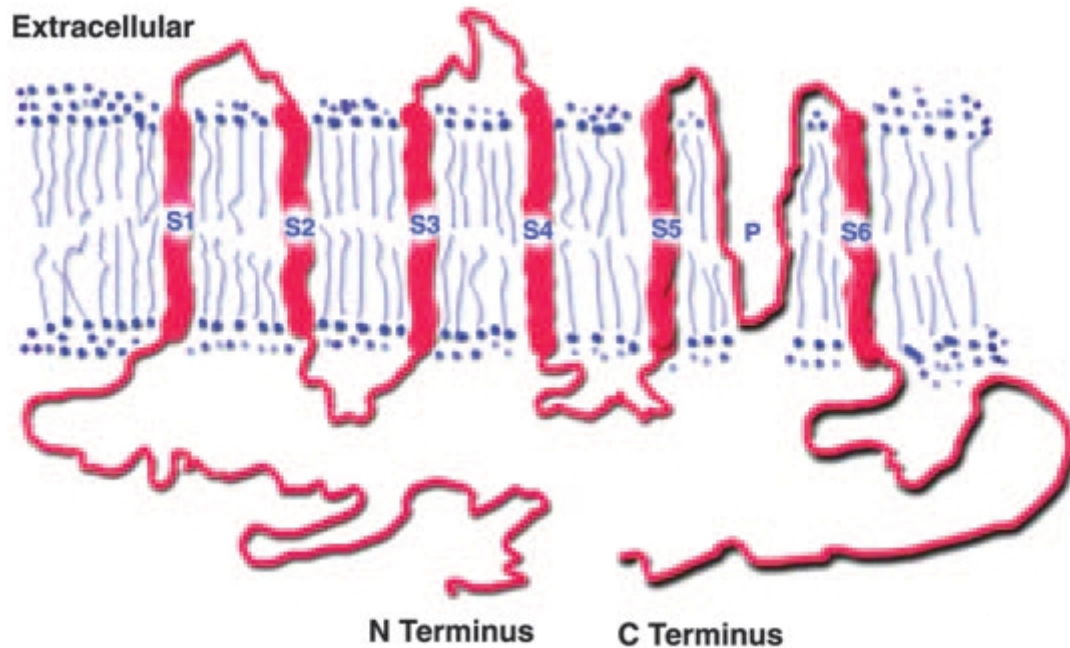
1. táblázat:

A K^+ -csatornák főcsoportjainak molekuláris szerkezete

Csoport	A transzmembrán szegmensek száma	A pórusformáló régiók száma (alegységenként)	Az alegységek száma
Kv	6	1	4
Kir	2	1	4
2P/4TM	4	2	2

A K^+ -csatornák legnépesebb főcsoportját a feszültségvezérelt K^+ -csatornák (Kv-csatornák) alkotják, amelyek négy alegységből épülnek fel, és alegységenként hat transzmembrán régiót tartalmaznak. A Kv-csatornák egy alegységének szerkezetét az 1. ábra mutatja be. Az egyes alegységek C- és N-terminális régiói a citoplazmatikus oldalon helyezkednek el (Jan és Jan, 1997; Sansom és munkatársai, 2002; Yellen, 2002; Armstrong, 2003). Az alegységek N-terminális régiója tartalmaz egy ún. T1-szakaszt, ami az alegységek tetramerizációjáért felelős (Li és munkatársai, 1992; Yu és munkatársai, 1996; Liu és munkatársai, 2005; Robinson és Deutsch, 2005). A csatornák ionpermeábilis pórusát kialakító hurok (H5 vagy P-régió) az S5 és S6 transzmembrán szakasz között helyezkedik el. A pórusformáló hurok különösen fontos része egy glicin-tirozin-glicin (GYG) aminosav-tripletet tartalmazó, igen konzervatív régió, ami döntő jelentőségűnek tűnik a K^+ -szelektivitás kialakításában. A Kv-csatornák a membrán depolarizációjának hatására aktiválódnak, így a

csatornák megnyílása döntően az akciós potenciált követő repolarizációs fázis kialakításában, illetve annak módosításában jelentős (Catterall, 1993).

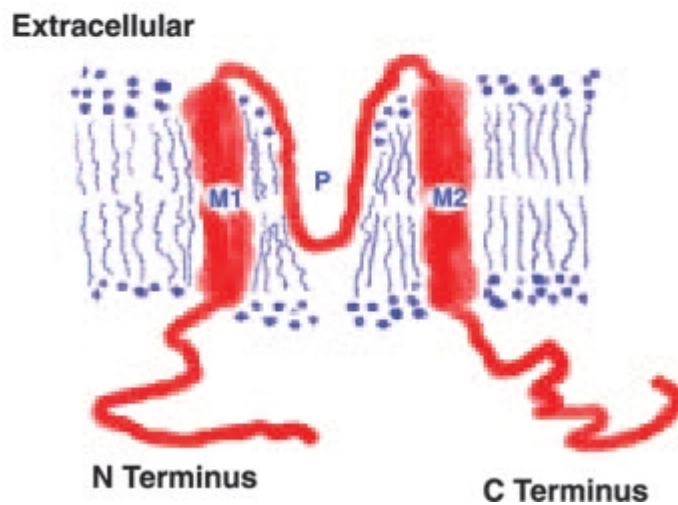


1. ábra: A Kv-csatornák egy alegységének szerkezete

Egy alegység hat transzmembrán szakaszt (S1-S6) és egy pórusformáló régiót (P) tartalmaz. Az amino- és a karboxiláncvég egyaránt a membrán citoplazmatikus oldalán helyezkedik el. A Kv csatornáknak az S4 szakasz tölti be a feszültség-szenzor szerepét. Az aktív csatorna az alegységek tetramerizációja révén alakul ki (az ábra forrása: Herbert és munkatársai, 2005).

Az alegységenként két transzmembrán szakaszt tartalmazó K^+ -csatornák közé tartoznak az úgynevezett befelé egyenirányító (inward rectifier) K^+ -csatornák (Kir-csatornák), amelyek a membrán hiperpolarizációjának hatására aktiválódnak (Katz, 1949). Az alegységekben jelen lévő két transzmembrán szegmens a feszültségvezérelt K^+ -csatornák karboxi-terminális régióján található két TMS-nek felel meg (Kubo és munkatársai, 1993). A Kir-csatornák a nyugalmi membránpotenciál beállításában, és az akciós potenciál lecsengésének terminális fázisában játszanak szerepet. A Kir-csatornák mellett a G-protein által regulált (GIRK) és az ATP-függő K^+ -csatornákra is a két transzmembrán szegmenst tartalmazó alegységszerkezet jellemző. A 2TM K^+ -csatornák alegységszerkezete a 2. ábrán látható.

A fenti két csoportba tartozó K^+ -csatornák közös tulajdonsága, hogy alegységenként egy pórusformáló hurkot tartalmaznak, és a funkcióképes csatorna összeszerelődéséhez az alegységek tetramerizációja szükséges (Doupnik és munkatársai, 1995). A K^+ -csatornák harmadik főcsoportjának tagjai (2P/4TM K^+ -csatornák) ettől eltérően alegységenként két, tandem elhelyezkedésű pórusformáló régiót, és négy transzmembrán szegmenst tartalmaznak



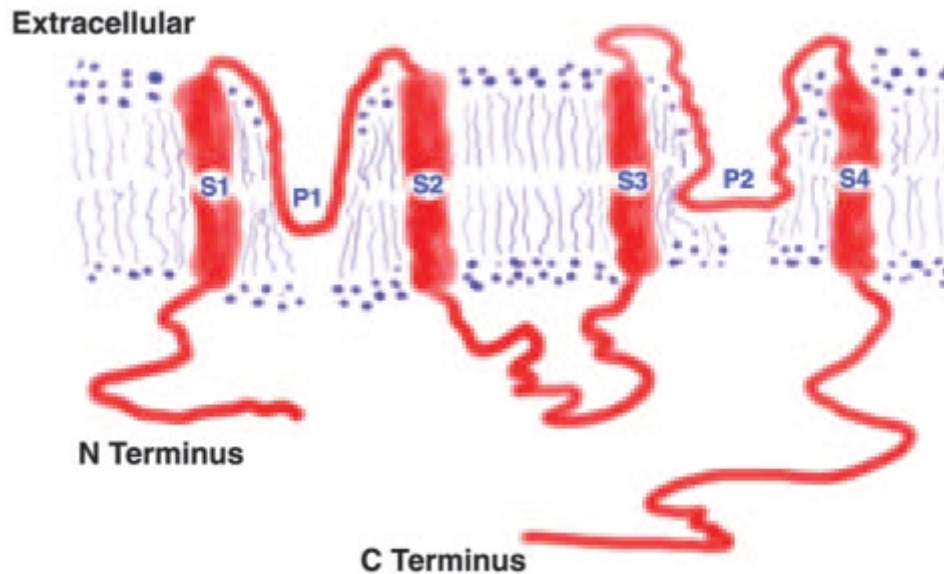
2. ábra: A Kir-csatornák egy alegységének szerkezete

Egy alegység két transzmembrán szakaszt (M1 és M2) és egy pórusformáló régiót (P) tartalmaz. Az amino- és a karboxi-terminális egyaránt a citoplazma felőli oldalon helyezkedik el. A működő csatorna kialakulásához az alegységek tetramerizációja szükséges (az ábra forrása: Herbert és munkatársai, 2005).

(Ketchum és munkatársai, 1995). A funkcióképes csatorna a másik két főcsoport tagjaitól eltérően az alegységek dimerizációja révén alakul ki, így az ionáteresztő pórus kialakításában itt is négy pórusformáló hurok vesz részt. Az ebbe a családba tartozó csatornák egy részében a dimer csatorna kialakításához az első és a második transzmembrán szegmens között elhelyezkedő, 44 aminosavból álló, α -helikális szerkezetű „self interacting domain” (SID) szükséges (Lesage és munkatársai, 1996), ami a család egyes tagjaiban a 69. pozícióban egy cisztein aminosavat tartalmaz. A két alegységben található ciszteinek az összeszerelődött molekulában egymással szemben helyezkednek el, és a közöttük kialakuló diszulfid-kötés stabilizálja a csatornát. Érdeemes ugyanakkor megemlíteni, hogy a család más tagjaiban (pl. a TASK-csoportban) az alegységeket nem kovalens kötés tartja össze. A 2P/4TM K^+ -csatornák egy alegységének szerkezetét a 3. ábra mutatja.

A két pórusformáló hurkot tartalmazó K^+ -csatornákat nyugalmi aktivitásuk miatt szivárgó vagy háttér K^+ -csatornáknak is nevezik. Nyugalmi aktivitásuk révén ezen csatornák növelik a membrán K^+ -permeabilitását, ily módon a membránpotenciált a kálium ekvilibriumpotenciálja körüli értéken stabilizálják. Neuronokban a nyugalmi membránpotenciál szabályozásában, a membrán bemeneti ellenállásának és ingerlékenységének beállításában, valamint az akciós potenciál időtartamának szabályozásában is fontos szerepet játszanak (Patel és Lazdunski, 2004; Patel és Honoré, 2001; Lesage és Lazdunski, 2000). A háttér K^+ -csatornák aktivitása jelentős feszültség- és

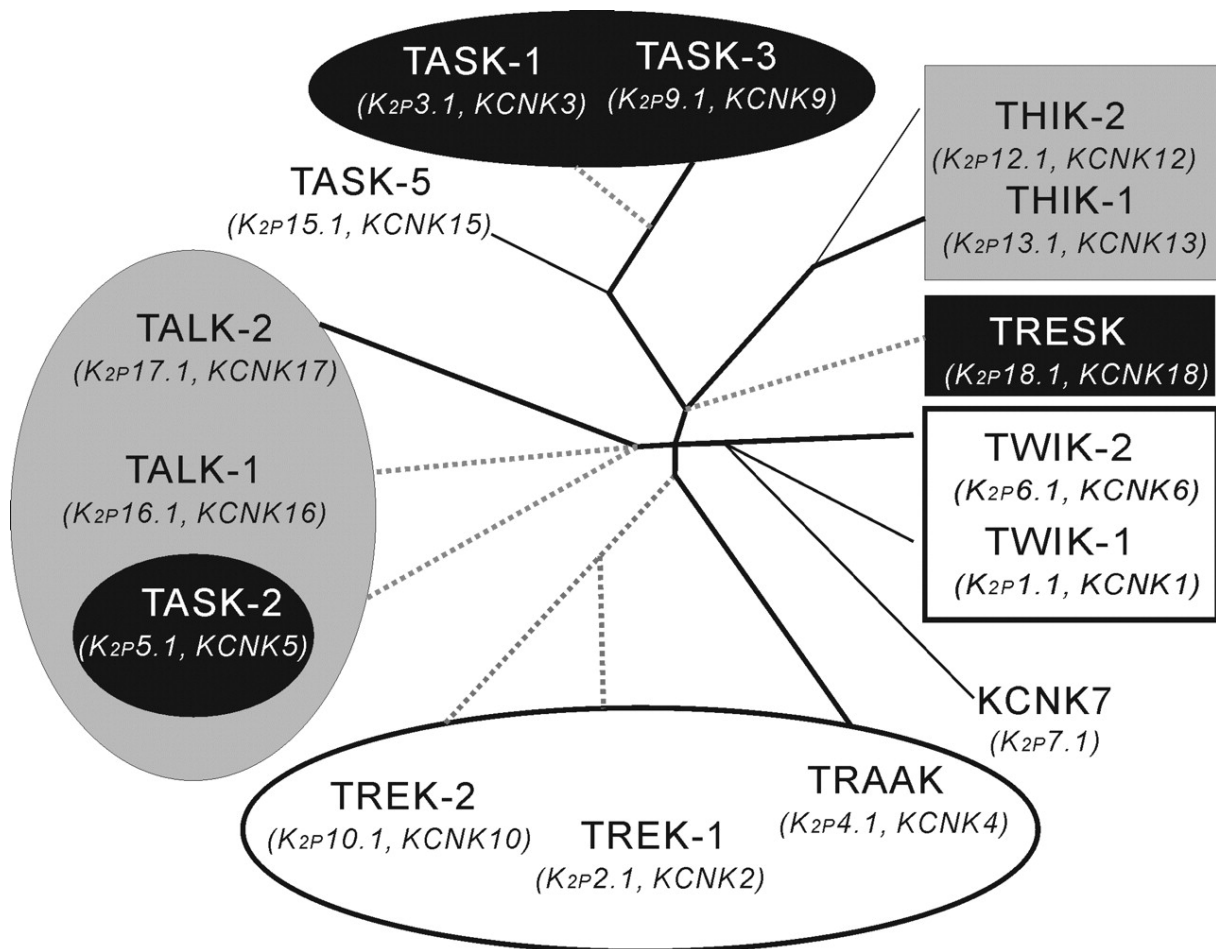
időfüggést nem mutat, és szimmetrikus K^+ -grádiens esetén lineáris áram-feszültség karakterisztika jellemző rájuk. Az ebbe a főcsoportba tartozó csatornák farmakológiai tulajdonságaikat tekintve is jelentősen különböznek a többi K^+ -csatornától, ugyanis érzéketlenek a szokásos K^+ -csatorna-blokkolókra, mint például a tertaetil-ammónium (TEA) és 4-aminopiridin (4-AP).



3. ábra: A két pórusformáló domént tartalmazó K^+ -csatornák egy alegységének szerkezete

Az alegységek 4 transzmembrán régióból (S1-S4) és két, tandem elhelyezkedésű pórusformáló hurokból (P1-P2) épülnek fel. A karboxi- és amino-terminális régiók intracellulárisan helyezkednek el. A funkcióképes struktúra az alegységek dimerizációjával alakul ki, így a pórus kialakításában a többi K^+ -csatornához hasonlóan itt is négy pórusformáló hurok szükséges. A dimerizációban fontos szerepe van az S1 és S2 régió között elhelyezkedő SID („self-interacting domain”) régióknak. A csatornacsalád egyes tagjaiban a dimerizáció kovalens kötéssel történik (a SID régiók egy-egy ciszteinje közötti diszulfid híd révén), míg más esetekben (pl. a TASK-3-csatornák) nem kovalens kapcsolódásról van szó (az ábra forrása: Herbert és munkatársai, 2005).

Eddig 15 olyan csatornát írtak le, amelyek a két pórusformáló hurkot tartalmazó csatornák főcsaládjába tartoznak (4. ábra). Az ezen molekulákat kódoló gének egységesen a *kcnk* jelölést viselik. A főcsoporton belül nagyfokú homológia figyelhető meg az egyes alegységek szerkezetében, valamint a pórusformáló régió szekvenciájában; az ezen kívüli fehérjeszekvenciák közepes fokú homológiát mutatnak. A csatornacsalád tagjai strukturális és funkcionális tulajdonságaik alapján további alcsoportokba oszthatók. Ezek között az alaptípus a két pórusformáló hurkot tartalmazó, gyengén befelé egyenirányító csatornák (TWIK, Tandem of pore domain in weak inward rectifier K⁺-channels) csoportja (Lesage és munkatársai, 1996, Chavez és munkatársai, 1999). Ezen túlmenően az egyes csatornák pH-, arachidonsav- és halotánérzékenysége alapján további osztályok definiálhatók.



4. ábra: A két pórusformáló domént tartalmazó K^+ -csatornák osztályozása

Az ábrán a 2P K^+ -csatornák filogenetikai csoportosítása és a csatornafehérjék különböző elnevezései vannak feltüntetve. A főcsoporton belül hat funkcionális csatornacsaládot különböztetünk meg: TWIK, TREK, TALK, TASK, THIK és TRESK. A TREK-család tagjai (TREK-1, TREK-2, TRAAK) arachidonsavra, telítetlen zsírsavakra és mechanikai feszülésre érzékenyek. A TALK-családba tartozó csatornákat (TALK-1, TALK-2, TASK2) a lúgos pH aktiválja, míg a TASK-csatornákat a savas extracelluláris pH gátolja. A gáznemű altatószerek (pl. halotán, izoflurán) a THIK-csatornákat gátolják, ezzel szemben a TRESK-, TREK-1-, TREK-2-, TASK-2-, TALK-1- és TASK-1-csatornákat aktiválják (pontozott vonal). Egyes 2P K^+ -csatornák expressziója nem eredményez működőképes csatornákat (vékony vonal) (az ábra forrása: Sanders és munkatársai, 2006).

A vizsgálataink tárgyát képező TASK-3-csatorna a TASK- (TWIK-related acid-sensitive K^+ -channels) csatornacsaládba, azaz a savas pH-ra érzékeny, két pórusformáló hurkot tartalmazó K^+ -csatornák alcsoportjába tartozik. A TASK-csatornák családjába jelenleg három típus tartozik (TASK-1, TASK-3 és TASK-5), melyek közül a TASK-5 heterológ expressziós rendszerben nem alkot funkcióképes csatornákat (Kim és Gnateco, 2001; Ashmole és munkatársai, 2001). Az élő szervezetben a TASK-5-alegységek feltehetően TASK-1-, vagy TASK-3-alegységekkel heterodimert alkotva vesznek részt a működő K^+ -csatornák kialakításában. A korábban TASK-csatornaként osztályozott TASK-2 és TASK-4 alegységekről újabb vizsgálatok alapján kiderült, hogy a TASK-1-, TASK-3- és TASK-5-alegységekkel lényegesen alacsonyabb szekvenciahomológiát mutatnak, mint azok

egymással. Ezt a két molekula a jelenleg elfogadott osztályozás szerint a TALK-családba (TWIK-related, alkaline pH activated K^+ -channels) tartozik (Girard és munkatársai, 2001; Decher és munkatársai, 2001).

A TASK-csatornák, mint nevük is mutatja, érzékenyek az extracelluláris pH változásaira. Mind a TASK-1, mind a TASK-3 esetében a savas extracelluláris pH a pórus záródását okozza, azonban a két csatorna pH-érzékenysége különböző; a TASK-1 pK értéke 7,5, míg a TASK-3-csatornáé 6,8 (Kim és munkatársai, 2000; Rajan és munkatársai, 2000). Az extracelluláris pH érzékelésében fontos szerepet játszik a proteínlánc 98-as pozíciójában elhelyezkedő hisztidin aminosav, amely a K^+ -permeábilis pórus külső szájadéknál található (Duprat és munkatársai, 1997; Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kim és munkatársai, 2000).

A TASK-csatornák farmakológiáját tekintve elmondható, hogy a többi 2P/4TM K^+ -csatornához hasonlóan érzéketlenek a K^+ -csatornák szokásos gátlószereire, ugyanakkor bizonyos localanaestheticumok (pl. lidokain), továbbá a Zn^{2+} és a Cu^{2+} gátló hatást fejtenek ki rájuk (Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kindler és munkatársai, 1999). A TASK-csatornák atípusos farmakológiájának klinikai szempontból is jelentős eleme, hogy feltételezések szerint a központi idegrendszerben megtalálható hTASK-csatornák aktiválása lehet a halotán szisztémás anaesthesiás hatásának alapja (Patel és munkatársai, 1999; Lesage és munkatársai, 2000; Talley és Bayliss, 2002). Az anaesthesia során a TASK-csatornák aktiválása a neuronok hiperpolarizációjához vezet, ami az idegrendszer ingerlékenységének csökkenése révén általános narkózist okoz.

A TASK-3-csatornák igen hatékony gátlószere a ruténiumvörös ($E_{50} = 0,7 \mu\text{mol/l}$), ami a TASK-3 homodimerekhez 1-1 glutamát oldalláncon keresztül kötődik, és így a pozitív töltésű molekula a csatorna külső szájadéka fölött elektrosztatikus taszító erőt képez a csatornába belépni kívánó káliumionok számára. A ruténiumvörös gátló hatása sem a TASK-1 homodimerek, sem a TASK-1/TASK-3 heterodimerek esetén nem figyelhető meg, mivel a TASK-1 alegység az adott pozícióban nem tartalmazza a megfelelő glutamát oldalláncot (Czirják és Enyedi, 2003).

Heterológ expressziós rendszerben végzett funkcionális mérések kimutatták, hogy egy TASK-3-csatorna konduktanciája 28 pS (Kim és munkatársai, 2000). A TASK-3-áramot kezdetben idő- és feszültségfüggetlen, nem inaktiválódó, kifelé egyenirányító K^+ -áramként írták le (Kim és munkatársai, 2000), az újabb adatok szerint azonban aktivációjuk egyértelmű, időfüggő növekedést mutat (legalábbis a *Xenopus* oocytákban és HEK-sejtekben expresszált humán TASK-3-csatornák esetében; Meadows és Randall, 2001).

2.2 A TASK-3-csatornák genetikai és molekuláris biológiai jellemzői

A humán TASK-3-csatornát 2000-ben, Chapman és munkatársai azonosították először. A csatorna alegysége egy 374 aminosav hosszúságú protein, ami a 8q24 kromoszómális régióban elhelyezkedő, két exont tartalmazó génről íródik át. A humán 2P-csatornák közül a TASK-1-alegységgel mutatja a legnagyobb mértékű, 62%-os szekvenciaazonosságot. A TASK-5-alegységgel szintén viszonylag nagyfokú (56%) a homológia, míg a 2P-csatornacsalád többi tagjával – köztük a TASK-2- és TASK-4-csatornával – a szekvenciaazonosság mértéke csupán 31-35%. A TASK-3-csatorna szekvenciája erősen konzervált; a szekvenciaazonosság mértéke az egyes fajok között is meglehetősen nagy. A humán és a patkány TASK-3-alegység között a homológia mértéke 74%. Kimutatták azonban, hogy az első 250 aminosav területén, az azonosság mértéke különösen nagy (94%), míg a fennmaradó területen sokkal kevésbé kifejezett (Chapman és munkatársai, 2000). A csatornafehérje funkcionális szempontból legjelentősebb régiói, a két pórusformáló hurok és a négy transzmembrán szakasz egyaránt a nagyfokú homológiát mutató területen találhatóak, míg a fehérjelánc citoszolikus régiói kevésbé konzerváltak. Hasonló mintázatot figyelhetünk meg a humán és a tengerimalac TASK-3-csatorna aminosav-szekvenciájának összevetése során is, bár ebben az esetben a pórusformáló régiókon és a transzmembrán szakaszokon kívül a C-terminális területen is található egy konzervatív szakasz, amely jelentős homológiát mutat a TASK-1-csatorna PDZ motívumával. A transzmembrán fehérjékben gyakran előforduló PDZ motívum a cytoskeletonhoz való rögzítésben, ily módon a szubcelluláris lokalizáció meghatározásában játszik szerepet. A TASK-3-csatorna tengerimalacban csaknem kizárólag neuronális expressziót mutat, és elképzelhető, hogy az említett régió fontos szerepet tölt be a neuronokon belüli szubcelluláris elhelyezkedés meghatározásában (Rajan és munkatársai, 2000).

A csatornafehérjében a két pórusformáló hurok az első és a második, illetve a harmadik és negyedik transzmembrán szegmens között található. Az első transzmembrán szakasz és az első pórusformáló hurok között helyezkedik el az a hosszú, extracelluláris láncrész, amely az alegységek dimerizációjáért felelős „self interacting domain” (SID) régiót tartalmazza. Az emlősök funkcionális 2P K^+ -csatorna alegységeiben a két pórusformáló motívum szekvenciája konzervált, G(Y/F)G, illetve G(F/L)G. A TASK-3-alegység első pórusformáló régiójában a K^+ -csatornákra jellemző „ujjlenyomat” GYG motívum van jelen, a második pórusformáló hurokban azonban a kissé módosult GFG szekvencia vesz részt a K^+ -permeábilis pórus kialakításában (Chapman és munkatársai, 2000; Lesage és Lazdunski,

2000). A TASK-1- és TASK-3-csatorna közötti nagyfokú hasonlóságot az is alátámasztja, hogy mindkét alegységből hiányzik az a konzervatív cisztein aminosav, amely más $2P K^+$ -csatornában a dimer csatorna két alegysége közötti kovalens kötés kialakításáért felelős. A TASK-1- és TASK-3-csatornák alegységeinek összekapcsolódása a cisztein oldallánc hiányában valószínűleg nem kovalens módon történik (Duprat és munkatársai, 1997). A homológ pozícióban egy N-glikozilációs hely található, azonban nem tisztázott, hogy a glikozilációnak van-e szerepe a TASK-3-alegységek dimerizációjában. (Rajan és munkatársai, 2000).

A négy transzmembrán szegmens és a két pórusformáló hurok mellett valamennyi TASK-3-alegység rendelkezik egy rövid, intracelluláris N-terminális résszel, és egy viszonylag hosszú (80-160 aminosavnyi), szintén intracelluláris C-terminális szakasszal. Ezen citoszolikus láncrészek aminosavsorrendje sokkal kevésbé konzervált, mint az úgynevezett „core” régióban található transzmembrán szegmensek és pórusformáló hurkok szekvenciája. A hosszú karboxi-terminális régió feltehetően a csatornafunkció szabályozásában részt vevő elemeket tartalmazza. A különféle $2P K^+$ -csatornában itt találhatók például a local anaestheticumok, az intracelluláris pH, az arachidonsav, illetve a membránfeszülés érzékeléséért felelős régiók (Patel és munkatársai, 1999; Lesage és Lazdunski, 2000; Goldstein és munkatársai, 2001; Kim és munkatársai, 2001; Patel és Honoré, 2001). A C-terminális régió legvégén található egy öt aminosavból álló szekvencia, amely a csatornának a sejtfelszíni membránba való kihelyeződéséért felelős 14-3-3 adapter fehérje kötőhelye. Emlősökben a 14-3-3 fehérjecsaldának 7 izoformája van, amelyek elsősorban az agyban expresszálódnak, és számos különféle szabályozó sejtfolyamatban vesznek részt. Heterológ expressziós rendszerben végzett kísérletek kimutatták, hogy mind a TASK-1-, mind a TASK-3-csatornák esetén a 14-3-3 adapter proteinhez való kötődés képessége feltétlenül szükséges a sejtfelszíni ionáram megjelenéséhez. Az adapter fehérje kötődéséhez elengedhetetlen a láncvégi pentapeptid szakasz intakt volta; a kapcsolódás létrejöttét akár egyetlen C-terminális aminosav deléciónja is megakadályozza, ami a sejtfelszíni TASK-áram amplitúdójának szignifikáns csökkenését okozza. A 14-3-3 fehérje overexpressziója ugyanakkor a TASK-áram amplitúdójának jelentős növekedéséhez vezet (Rajan és munkatársai, 2002). Jelen dolgozatunk szempontjából ez azért különösen jelentős, mert a melanoma sejtekben tapasztalt intracelluláris TASK-3-lokalizáció meglehetősen szokatlan jelenség, ami esetleg összefüggésben állhat a csatornafehérje és az adapter protein közötti kölcsönhatás megváltozásával.

2.3 A TASK-3-csatornák megoszlása és fiziológiai funkciói

A humán TASK-3-csatorna (hTASK-3) jelenlétét mRNS-szinten a központi idegrendszerben és a hypophysisben mutatták ki a legnagyobb mennyiségben. A központi idegrendszeren belül a kisagyban volt különösen magas az mRNS expressziós szintje (Medhurst és munkatársai, 2001). Mindezt megerősítik munkacsoportunk korábbi eredményei, mely szerint az emberi kisagy Purkinje-sejtjei, a molekuláris és szemcsesejtes réteg, továbbá az astrocyták immunhisztokémiai vizsgálattal erőteljes fehérjeszintű TASK-3-expressziót mutatnak (Rusznák és munkatársai, 2004). A TASK-3-csatorna fehérjeszintű expressziója azonban nemcsak a központi idegrendszer területén mutatható ki. Korábbi immunhisztokémiai kísérleteink alapján a hTASK-3 jelen van a gastrointestinalis tractus több szakaszában is. Az expresszió mértéke főleg a gyomor és a vastagbél nyálkahártyájában intenzív, míg a simaizomrétegben mérsékelt TASK-3-expresszió figyelhető meg. Erős TASK-3 immunreakció látható a pancreas endocrin és exocrin sejtjeiben egyaránt, valamint a nyálmirigyek kivezetőcsöveinek hámsejtjeiben is. Az egészséges szövetek mellett a TASK-3-csatornaféhrje expressziója különféle gastrointestinalis tumorokban, például vastagbél- és gyomorráksejtékben is kimutatható (Kovács és munkatársai, 2005).

A TASK-3-expresszió patkányban is elsősorban a központi idegrendszerre jellemző. *In situ* hibridizációval patkányban a kisagyi szemcsesejtékben, a somaticus motoneuronokban, a raphe neuronokban és a locus coeruleus területén mutattak ki különösen intenzív TASK-3-expressziót (Talley és munkatársai, 2001). Immunhisztokémiai módszerrel az agykéreg egyes neuroncsoportjai, a kisagy, a hippocampus és a hypothalamus mutatott erős TASK-3 immunpozitivitást (Callahan és munkatársai, 2004).

A TASK-csatornák élettani szerepe igen sokrétű. A neuronok által expresszált TASK-3-csatornák feltehetően a nyugalmi membránpotenciál beállításáért, valamint a csatornát expresszáló neuronok ingerlékenységének szabályozásáért felelősek. Az egér cerebelláris szemcsesejtjeiben TASK-1- és TASK-3-alegységek alakítják ki a háttér K^+ -áram $[I_{K(SO)}]$ pH-szenzitív komponensét, feltehetően heterodimer csatornákat alkotva. A TASK-csatornák modulációja megváltoztatja a sejtek bemeneti ellenállását, ami nemcsak az ingerlékenység szabályozásában játszik szerepet, de hatással lehet a EPSP-k és IPSP-k időtartamára és amplitúdójára is (Aller és munkatársai, 2005).

A TASK-3-csatornák különösen jelentősek a patkány mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeinek szekretoros funkcióiban, ahol szerepet játszanak az angiotenzin-II által kiváltott aldosteronszekréció kialakulásában. Az angiotenzin-II a TASK-3-csatornákra

kifejtett gátló hatása révén a zona glomerulosa sejtek depolarizációját okozza, ami aldoszteronszekrécióhoz vezet (Czirják és Enyedi, 2002). A TASK-3-csatornák a perifériás kemoreceptorok acidosis és hypoxia iránti érzékenységének biztosításában is fontos szerepet játszanak (Buckler és munkatársai, 2000; Hartness és munkatársai, 2001).

A fentiekén túlmenően a TASK-csatornák fontos szerepet töltenek be a központi idegrendszerben zajló neurotranszmisszió folyamatában is. Több adat szól amellett, hogy a neurotranszmisszió során a szinaptikus résben jelentősen változhat a pH (akár 0,3 egységnyi változás is elképzelhető), ami módosíthatja a pre- és posztzinaptikus membránban elhelyezkedő TASK-csatornák aktivitását, hozzájárulva ezáltal a neurotranszmitterek pre- és posztzinaptikus hatásaihoz egyaránt.

Egyes kísérleti adatok alapján úgy tűnik, hogy a TASK-csatornák a glia- és az idegsejtek közötti kapcsolatban is részt vehetnek: a neuronális aktivitás során jelentős K^+ -kilépés következik be, így az extracelluláris K^+ -koncentráció megemelkedik, ami kiváltja a gliasejtek K^+ -indukált depolarizációját. A gliasejtek depolarizációja stimulálja sejt felszíni membránjuk Na^+/HCO_3^- -symportját, ami az extracelluláris térben HCO_3^- -deplációhoz vezet, csökkentve annak pH-ját. Az így kialakuló acidosis zárja a TASK-csatornákat, ami jelentősen módosítja a neuronok ingerlékenységét és aktivitását (Han és munkatársai, 2003).

2.4 A TASK-3-csatornák szerepe az apoptózisban

A TASK-3-csatornák az előző fejezetben ismertetett, membránpotenciál megváltoztatásán keresztül megvalósuló funkcióik mellett egyéb olyan sejt folyamatokban is részt vesznek, ahol pontos szerepük kevésbé egyértelmű. A K^+ -csatornákra általánosságban nem jellemző módon a sejtek életképességét alapvetően befolyásoló folyamatokban, például az apoptotikus sejthalál szabályozásában is szerepet játszanak. Az erre vonatkozó irodalmi adatok azonban rendkívül ellentmondásosak. Míg egyes tanulmányokban a TASK-3-csatornák apoptózist kiváltó funkciójáról számolnak be, addig más körülmények között a csatornafehérje működésének anti-apoptotikus hatást tulajdonítanak.

Az agy fejlődése során a neuronok sejtmembránjának ingerlékenysége kritikus szerepet játszik a sejtek életképessége szempontjából. Mivel a háttér K^+ -csatornák a nyugalmi membránpotenciál beállításában és az akciós potenciál időtartamának meghatározásában egyaránt kulcsszerepet töltenek be, a csatornák aktivációja következtében fellépő K^+ -kiáramlás döntő jelentőségű lehet a neuronok életben maradása, illetve pusztulása szempontjából. Lauritzen és munkatársai (2003) arról a jelenségről számoltak be, hogy a

patkány kisagyi szemcsesejtjeiben a TASK-1- és a TASK-3-csatornák fontos szerepet játszanak az apoptózis kiváltásában. A patkány cerebellum fejlődése során a szemcsesejtek fokozatosan vándorolnak a külső szemcsesejtes rétegből végleges helyükre, miközben a számuk (a vándorlás során bekövetkező apoptózis miatt) jelentősen csökken. A jelenségnek komoly fiziológiai jelentősége van, hiszen a külső szemcsesejtes réteg területén fejlődő szemcsesejtek száma sokszorosán meghaladja azt a kívánt mennyiséget, amit a Purkinje-sejtekkel való szinaptikus kapcsolatok kialakítása indokol, így a TASK-áram által kiváltott sejtpusztulás tevékenyen hozzájárul a két sejtfeleség számának szinkronizálásához. A fenti szerzők eredményei szerint a kisagyi szemcsesejtek TASK-csatornáit, így azok perzisztens K^+ -áramait gátolva a sejtek apoptotikus pusztulása jelentősen csökkenthető volt. A TASK-csatornáknak az apoptózis indukciójában betöltött szerepét az a megfigyelés is alátámasztja, mely szerint a TASK-1- és TASK-3-csatornákat hippocampalis neuronokban expresszáltatva (ahol fiziológiásan nincsenek jelen) azokban apoptózis indukálható. Számos további adat mutat arra, hogy összefüggés van a sejtek apoptotikus aktivitása, és a sejtfelszíni membránon keresztül történő K^+ -kiáramlás között: ennek egyik példája, hogy magas extracelluláris K^+ -koncentráció oldatban tenyésztve a cerebelláris szemcsesejteket, azok apoptotikus aktivitása jelentősen csökkenthető volt (Lauritzen és munkatársai, 2003). Hasonló hatást eredményezett alacsony pH-jú közeg (pH=6,4) alkalmazása is, ami jelentősen gátolta a folyamatban részt vevő, döntően TASK-3-csatornák aktivitását (Lauritzen és munkatársai, 2003). A jelenség részben azzal magyarázható, hogy a csatornákon keresztül történő K^+ -kiáramlást víz- és Cl^- -mozgás követi, ami apoptotikus sejtterefogat-csökkenéshez (apoptotic volume decrease - AVD) vezet. Ezen túlmenően az intracelluláris K^+ -koncentráció csökkenése az apoptotikus kaszkád elemeit képező specifikus enzimek (kaspázok, nukleázok) aktiválása révén is hozzájárulhat a sejthalált okozó program elindításához.

A fenti kísérletes adatok határozottan alátámasztják, hogy a sejtfelszíni membránban jelen lévő TASK-3-csatornák aktivitása kifejezetten pro-apoptotikus hatású. Más tanulmányok ezzel szemben azt a felvetést támogatják, hogy a TASK-csatornák működése által okozott hiperpolarizáció védelmet jelent a különféle celluláris stresszhatások által kiváltott sejthalállal szemben. Liu és munkatársai (2005) kimutatták, hogy a részlegesen transzformált, egér fibroblast eredetű C8 sejtvonalon a TASK-1-, TASK-2- és TASK-3-csatornák kifejezett védelmet nyújtanak az apoptózis kialakulása ellen hypoxia és szérumdepriváció esetén. Túlélő hippocampalis agyszeletekben azonban a fenti három csatornaféleség közül kizárólag a TASK-3-csatorna jelenléte biztosította ezt a protektív hatást. A szerzők felvetése szerint elképzelhető, hogy ez azért lehetséges, mert a három csatornatípus

közül a TASK-3-csatornák a legkevésbé pH-érzékenyek, így savas extracelluláris környezetben ők tartják fent legtovább a membrán ingerlékenységének csökkenését. A TASK-csatornákhoz sok szempontból hasonlatos, ugyancsak a két pórusformáló domént tartalmazó K^+ -csatornák közé tartozó TREK-1-csatornák aktiválása riluzol (egy neuroprotektív hatóanyag) által szintén határozott antiapoptotikus hatást fejt ki (Duprat és munkatársai, 2000). A lehetséges hatásmechanizmus az, hogy a TREK-csatornák aktivitása a membránt hiperpolarizálja, ezáltal csökkenti a neuronok ingerlékenységét, és így a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák megnyílása miatt bekövetkező Ca^{2+} -belépést is, amitől már egyenes út vezetne a sejthalálhoz. Érdekes és nehezen megmagyarázható ellentmondás, hogy Liu és munkatársai (2005) kísérleteiben a C8 sejtekben kizárólag a TASK-csatornák voltak képesek védelmet biztosítani az apoptózis ellen, míg a TREK-1 csatornák overexpressziója hatástalan volt.

2.5 A TASK-3-csatornák szerepe a tumorképződésben

Az előző fejezetben ismertetett adatok rávilágítanak arra, hogy a TASK-3-csatornák mennyire ellentmondásos szerepet játszanak az apoptotikus sejthalál szabályozásában. A TASK-3-csatornák a sejtek életképességében betöltött szerepe azonban még ennél is sokrétűbb, ugyanis az irodalomban folyamatosan gyűlnek a csatornafehérje tumorképződésben betöltött szerepét hangsúlyozó közlemények. Ezek jelentősége olyannyira nagy, hogy a TASK-3-csatornát kódoló *kcnk9* gén már hivatalosan is protoonkogénnek minősül. A TASK-3-csatorna potenciális onkogén szerepe akkor merült fel, amikor Mu és munkatársai 2003-ban kimutatták, hogy a *kcnk9* gén az általuk vizsgált rosszindulatú emlődaganatok 10%-ában 3-10-szeres amplifikációt mutat. Mivel a *kcnk9* gén a 8q24.3 kromoszómális régióban helyezkedik el, mindössze 10 Mb távolságra a jól ismert *myc* onkogéntól, felmerült annak lehetősége, hogy a *kcnk9* gén kópiaszám-növekedése egyszerű co-amplifikáció eredménye. A specifikus vizsgálatok azonban rámutattak, hogy a *kcnk9* az egyetlen olyan gén, ami teljes hosszában megtalálható az amplifikált régióban. Ugyanezen tanulmányban a genomi amplifikáció mellett a géntermék 5-100 szoros, mRNS-, illetve fehérjeszintű overexpressziójáról is beszámoltak a vizsgált tumorminták 44%-ában, ami nem mutatott korrelációt az ismert tumormarkerek (ösztrogénreceptor, HER-2 onkogén) fokozott expressziójával. Az emlőtumorok mellett tüdődaganatokban az esetek 35%-ában mutattak ki TASK-3-overexpressziót.

A TASK-3-csatorna tumorképződést elősegítő működését több tanulmányban kísérletesen is igazolták. A csatorna expressziója az NMuMG, emlős hámszövet-eredetű sejtvonalban az egérbe injektált sejteknek tumorképződést serkentő funkciót biztosított, továbbá fokozta a C8 embrionális egér fibroblast sejtvonal tumorképző hajlamát, valamint a hypoxia és szérumdepriváció elleni rezisztenciáját is (Mu és munkatársai, 2003). Meuth és munkatársai (2008) a humán glioblastomák által expresszált TASK-3-csatornák funkcionális szerepének vizsgálata során megállapították, hogy *in vitro* körülmények között a TASK-3-csatornák modulálása közvetlenül hatással van a daganatos sejtek életképességére. A magas K^+ -tartalmú közegben tenyésztett glioblastoma sejtek életben maradását jelentős mértékben ($30 \pm 4\%$) csökkentette a TASK-3-csatornák nyitását okozó izoflurán alkalmazása. A csatornát blokkoló bupivakain (TASK-1- és TASK-3-blokkoló), illetve spermin (TASK-3-blokkoló) egyidejű alkalmazása azonban teljes mértékben kivédte ezt a hatást, míg a TASK-1-csatornát szelektíven blokkoló anandamid nem. Az *in vitro* kísérletek mellett a szerzők glioblastoma tumormintákban is igazolták a TASK-3-csatornák jelenlétét mRNS- és fehérjeszinten egyaránt, és felvetették a TASK-3-csatorna mint potenciális terápiás célpont jelentőségét is.

A TASK-3-csatorna onkogén szerepének vonatkozásában fontos hangsúlyozni, hogy kísérletes adatok szerint a tumorképződést serkentő hatás létrejöttéhez szükséges, hogy a csatornafehérje valóban K^+ -permeábilis pórusként funkcionáljon. A TASK-3-csatorna funkcióképes, vad típusának, valamint egy nem K^+ -permeábilis pontmutánsának összehasonlítását célzó vizsgálatok kimutatták, hogy az onkogén szerep a csatornafunkcióhoz kötött (Pei és munkatársai, 2003). A *kcnk9* gént, valamint a funkcióképtelen csatornát kódoló, G95E mutációt hordozó gént expresszáló C8 sejteket immunszuppresszált egerekbe oltva megállapították, hogy a vad típusú TASK-3-csatornát expresszáló sejtek kifejezettebb tumorindukáló hatással rendelkeznek, mint a pontmutáns változat. A tumorképződést serkentő hatás egyik lehetséges mechanizmusának vizsgálata céljából a vad típusú és a mutáns TASK-3-fehérjét embrionális egér fibroblast sejtekben expresszáltatták, majd kimutatták, hogy a működőképes csatorna 50%-kal csökkentette a TNF által indukált apoptózis mértékét a kontrollhoz képest, míg a mutáns csatornafehérje ebben a kísérletben is hatástalan volt. Ezen eredmény szerint a funkcionális TASK-3-csatorna részleges védelmet nyújt a TNF által indukált apoptózis ellen.

Amellett, hogy az apoptózis elleni védelem elősegítheti a daganatos sejtnövekedést, egyéb elképzelések is vannak a TASK-3-csatornák tumorképződést serkentő hatásának mechanizmusára vonatkozóan. Az egyik lehetőség az, hogy a TASK-3-csatornák fokozott

expressziója a membrán hiperpolarizációját okozza, aminek hatására megnő a Ca^{2+} elektrokémiai grádiense. Ennek eredményeként a sejtekbe kalciumionok áramlanak, ami lényegesen befolyásolhatja a sejtek proliferációját és differenciálódását. Egy másik lehetséges magyarázat szerint a sejt felszíni membrán TASK-3-csatornáin keresztül történő K^+ -efflux következtében csökken az intracelluláris K^+ -koncentráció, ami közvetlenül befolyásolhatja egyes enzimek (pl. kaszpázok) aktivitását. Az előző fejezetben már említett hypoxia és szérumdepriváció elleni tolerancia szintén szerepet játszhat a daganatos sejtproliferáció elősegítésében, ami különösen a solid tumorok központi, gyengén vascularizált régióiban lehet jelentős.

2.6 A TASK-3-csatornák és a mitokondriális funkció esetleges összefüggései

Egyelőre nem világos, hogy a TASK-3-csatornák pontosan milyen módon fejtik ki protektív hatásukat hypoxia esetén. Valószínű azonban, hogy ez nincs közvetlen összefüggésben a sejt felszíni membrán TASK-3-csatornáinak működésével, ugyanis hypoxia hatására a sejtmembrán TASK-3-árama csökken (Buckler és munkatársai, 2000), ami alapján feltételezhető, hogy valamilyen intracelluláris mechanizmus állhat a jelenség hátterében. Ebből a szempontból érdekes az a megfigyelés, hogy a mitokondriális respiráció különféle szerekkel történő gátlása a hypoxiához hasonló hatást fejt ki a patkány perifériás kemoreceptor sejtjeiben, gátolva azok sejt felszíni TASK-áramát (Buckler és Vaughan-Jones, 1998). A fenti adatok, valamint jelen munkánk eredményei alapján érdemes fontolóra venni azt a lehetőséget, hogy a TASK-3-csatornák működése és a mitokondriális respirációs folyamatok között valamilyen kapcsolat állhat fenn, ami a sejtek életképességére is hatással van. Ennek klinikai szempontból igen nagy jelentősége lehet, amennyiben figyelembe vesszük, hogy korábbi irodalmi adatok szerint a mitokondriális diszfunkció a melanoma sejtek károsodását, majd halálát okozza. Ennek egyik konkrét példája az úgynevezett fotodinamikus terápia, aminek során a metilénkék származékokkal végzett kezelés, majd megfelelő hullámhosszú fényrel történő besugárzás sejthalálhoz vezető citotoxikus hatást fejt ki a melanoma sejteken (Ball és munkatársai, 1998; Noodt és munkatársai, 1998). Kimutatták, hogy a metilénkékekkel kombinált fénykezelés a mitokondriális oxidatív foszforiláció gátlásán keresztül apoptózist vált ki (Chen és munkatársai, 2008). Az arzén-trioxid és a resveratrol esetén szintén ismert, hogy a mitokondriális funkció károsítása révén fejtik ki citotoxikus hatásukat a melanoma sejtekben, és alkalmazásuk a mitokondriális útvonalon keresztül váltja ki az apoptotikus sejthalált (Wang és munkatársai, 2007; Van

Ginkel és munkatársai, 2008). Jelen munkánk szempontjából ezen adatok azért különösen érdekesek, mert amennyiben a TASK-3-csatornák működése valóban hatással van a mitokondriális funkcióra, a csatorna működését befolyásoló tényezők annak károsodását okozhatják, így ez TASK-3 potenciális célpont lehet a melanoma terápiájában.

2.7. Célkitűzések

Korábbi eredményeink megmutatták, hogy a tenyészeti körülmények között fenntartott melanoma malignum sejtekben intenzív, elsősorban intracelluláris TASK-3 immunpozitivitás figyelhető meg. Ez a jelenség számos kérdést vetett fel, amelyekre a jelen értekezés keretében kerestük a választ.

1. A melanoma sejtekben korábban megfigyelt intracelluláris TASK-3-expresszió mely sejtorganelumhoz köthető?

A csatornafehérje mitokondriális lokalizációját a WM35 sejtenyészeten kettős fluoreszcens jelölés alkalmazásával vizsgáltuk. A mitokondriális expresszió egyértelmű igazolása érdekében melanoma sejtekből izolált mitokondriumokon szintén végeztünk kettős fluoreszcens jelölést, valamint Western-blot kísérletet is.

2. Megfigyelhető-e a melanoma sejtek esetén tapasztalt mintázathoz hasonló jelölődés más, tumoros elfajulást nem mutató sejttypusban is?

A TASK-3-csatorna *in situ*, szöveti expresszióját egészséges bőrből készített metszeteken, immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a bőr különböző sejttypusai, többek között a normál melanocyták és keratinocyták esetén. Ezen kívül tenyészetben fenntartott HaCaT keratinocyta sejt vonalon is végeztünk TASK-3-specifikus immunreakciót, amit mitokondriális jelöléssel egészítettünk ki, az esetleges co-lokalizáció megállapítása céljából.

3. Hozzájárul-e a TASK-3-csatorna a tenyésztett melanoma sejtek életképességének fenntartásához?

A tenyésztett melanoma sejteken RNS interferenciát alkalmaztunk a TASK-3-csatorna expressziós szintjének csökkentésére. A géncsendesített tenyészetek életképességében és proliferációjában bekövetkező változások vizsgálatára CyQUANT és MTT assay-t alkalmaztunk. A mitokondriális funkció jellemzése érdekében a kontroll és a géncsendesített tenyészeteken elvégeztük a nyugalmi és a ROS-indukált (reaktív oxigéngyök, „reactive oxygen species”) ROS-termelést meghatározását.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott sejtvonalak, és azok tenyésztése

3.1.1. Alkalmazott sejtvonalak

A disszertációban bemutatott kísérletekhez az alábbi sejtvonalatokat használtuk fel:

- **WM35:** Humán melanoma malignum sejtvonala, amely egy primer, bőr eredetű, a tumornövekedés radialis fázisát mutató melanoma malignumból származik (Tímár és munkatársai, 1999). Ez a sejtvonala kísérleteinkben a melanoma malignum *in vitro* modelljeként szolgált.
- **HaCaT:** Humán eredetű keratinocita sejtvonala, amelyet a nem rosszindulatúan elfajult humán keratinocyták *in vitro* modelljeként alkalmaztunk.
- **C2C12:** Egérből származó, vázizom myoblast eredetű sejtvonala. A C2C12 sejtek önmaguktól nem expresszálnak TASK-3-csatornát, de egy TASK-3-fehérjét kódoló plazmid bejuttatásával kiváltható bennük a TASK-3 szintézise. A C2C12 sejtek így alkalmasak voltak a TASK-3-ellenes antitest specificitásának ellenőrzésére, valamint a TASK-3-specifikus ellenanyag és a mitokondriális fehérjék közötti esetleges keresztreakció kizárására egyaránt.
- **HEK293:** Humán eredetű, embrionális veséből származó sejtvonala, ami TASK-3-csatornát nem expresszál. Kísérleteinkben a csatornafehérjét kódoló vektorral stabilan transzfektált HEK293 sejteket alkalmaztunk, amelyek módot adtak a TASK-3-csatorna jelenlétének mind immunhisztokémiai, mind elektrofiziológiai módszerrel történő detektálásra. A HEK293 sejteket elsősorban azzal a céllal alkalmaztuk, hogy az shRNA-szekvencia hatásosságát funkcionális kísérletekkel is megerősítsük.

3.1.2. Sejttenyésztés

A kísérletek során alkalmazott valamennyi sejtvonalat egyrétegű, letapadó tenyészet formájában, 75 ml-es tenyésztőedényekben (T75), 5%-os CO₂ parciális nyomás és 100% relatív páratartalom mellett, 37 °C-on tartottuk fenn. A WM35 sejteket RPMI 1640 tápoldatban, a többi sejtvonala DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápoldatban tenyésztettük. A tápoldatokat és a legtöbb vegyszert a Sigma (St. Louis, MO, USA) biztosította, a kivételeket a megfelelő helyen jelöltük. A tápfolyadékokhoz 10% foetalis borjúsérumot (FBS), 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomocint és 1,25 µg/ml fungizont

(TEVA, Debrecen, Magyarország) adtuk. Az RPMI 1640 tápoldatban az L-glutamin koncentrációját 2 mmol/l-re egészítettük ki. A tenyészeteken a tápoldatot minden második nap cseréltük, passzálásokat 80-100% konfluenciánál végeztünk.

3.2. Transzfekciós módszerek

A C2C12 sejteket a humán TASK-3-fehérjét expresszáló pcDNA3 hTASK3/7 plazmiddal transzfektáltuk. (A plazmidot Prof. Peter R. Stanfield és Dr. Ian Ashmole bocsátotta rendelkezésünkre.) A tranziens transzfekciót fedőlemezen tenyésztett C2C12 sejteken végeztük el, SuperFect transzfekciós reagens segítségével (Qiagen Inc., Hilden, Németország), a gyártó utasításainak megfelelően. A transzfekciót a normál (szérumot tartalmazó) tápfolyadékban hajtottuk végre, amely fedőlemezenként 2 µg plazmid DNS-t és 3 µl SuperFect reagenst tartalmazott. A sejteket a transzfekciós reagenssel két órán át inkubáltuk termosztátban, tenyésztési körülmények között, majd az oldatot normál tápfolyadékra cseréltük. A transzfekció után a sejteket még két napig tenyésztettük, majd a fedőlemezen történő fixálást követően immunfestést végeztünk rajtuk.

A humán TASK-3-csatorna cDNS-ével stabilan transzfektált HEK293 sejtvonalat Prof. Arthur H. Weston bocsátotta rendelkezésünkre. A TASK-3-csatornát expresszáló sejteket magas káliumkoncentrációjú (25 mmol/l) DMEM tápoldatban tenyésztettük a 3.1.2. fejezetben leírt módon.

3.3. Mitokondriumok preparálása

3.3.1. Mitokondriumok izolálása melanoma sejtekből

Az izolált mitokondriumokon végzett immunreakciók kivitelezése előtt a Bednarczyk és munkatársai (2004) által leírt mitokondrium izolációs módszert alkalmaztuk. A tenyésztett melanoma sejteket 1,5 mg/ml tripszinnel kezeltük, majd az így felvált sejteket 1000 × g sebességgel 10 percig centrifugáltuk. A maradék tápoldat eltávolítása érdekében a sejttöledéket átmostuk „Puffer 1” oldattal {összetétel: 250 mmol/l mannitol, 75 mmol/l szacharóz, 100 µmol/l K⁺-EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 10 mmol/l K⁺-HEPES [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav], proteázinhibitor koktél 1:100 hígításban}. A sejteket ezután 500 µmol/l K⁺-EGTA-t (etilén-glikol-tetraecetsav) tartalmazó „Puffer 1” oldatban szuszpendáltuk. A sejtszuspenziót jégen 20 percig inkubáltuk, majd üveghomogenizátor segítségével lizáltuk. Amikor a sejteknek körülbelül az 50-70%-a

lizálódott (a lizált sejtek arányát tripánkék festéssel határoztuk meg) a sejtszuspenziót 10 percig centrifugáltuk ($1000 \times g$), majd a felülúszót újra centrifugáltuk ($10\,000 \times g$, 15 perc). A mitokondriális frakciót tartalmazó üledéket 0,5% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó „Puffer 1” oldatban szuszpendáltuk, újra lecentrifugáltuk ($10\,000 \times g$, 15 perc), és „Puffer 1” oldatban felvettük. Az izolált mitokondriumokon végzett immunjelölés előtt a mitokondriumszuspenziót 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, és poli-D-lizinnel bevont fedőlemezeire pipettáztuk.

A Western-blot kísérletekben felhasznált mitokondriális membránvezikulumok előállításához egy másik mitokondriumpreparálási eljárást alkalmaztunk (Rencrona és munkatársai, 1979). Az izoláláshoz konfluens melanoma sejt kultúrákból gyűjtött mintát használtunk, amelyet felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, tápfolyadék nélkül, fagyaszttva tároltunk. Az izolálás napján a sejteket 10 ml jég hideg „A pufferben” (225 mmol/l mannitol, 75 mmol/l szacharóz, 0,5 mmol/l EGTA, 1 mmol/l glutation, 10 mmol/l HEPES, 1 g/l BSA) szuszpendáltuk, majd hozzáadtunk még 20 ml „A puffert”, és a mintát üveghomogenizátorban 5 percen át homogenizáltuk. További 15 ml „A puffer” hozzáadása után a homogenizált mintát 10 percig centrifugáltuk ($500 \times g$). A felülúszót félretettük és jégre helyeztük, az üledéket pedig ismételt homogenizáltuk és centrifugáltuk ($500 \times g$, 10 perc). Ezután a felülúszókat egyesítettük, és $12\,000 \times g$ -n, 10 percig centrifugáltuk, az ebből származó, mitokondriumokat tartalmazó üledéket „A pufferben” szuszpendáltuk, és hozzáadtunk 10 ml Percoll oldatot, amit 400 mg mannitollal és 250 mg szacharózzal egészítettünk ki. A következő lépésben a mitokondriális szuszpenziót magas fordulatszámon centrifugáltuk ($50\,000 \times g$, 40 perc). A Percoll és a puffer között kialakuló, sűrű, enyhén barnás színű oldatot átvittük 20 ml „B pufferbe” (225 mmol/l mannitol, 75 mmol/l szacharóz, 1 mmol/l glutation, 10 mmol/l HEPES, 1 g/l BSA), és ismét centrifugáltuk ($12\,000 \times g$, 10 perc). Az üledéket újra „B pufferben” szuszpendáltuk, majd megismételtük a centrifugálást ($12\,000 \times g$, 10 perc). Végül az üledéket 1 ml „B pufferben” felvettük, és jégen tároltuk. A teljes izolálási eljárás során jég hideg oldatokat használtunk, és minden lépést jégen végeztünk.

3.3.2. Mitokondriális membránvezikulumok előállítása

A mitokondriális membránvezikulumok előállítását korábban már leírt eljárások alapján végeztük, kisebb módosításokkal (Ohlendiek és munkatársai, 1986; Kottke és munkatársai, 1988). Először 10 mmol/l HEPES pufferben oldva különböző töménységű (30, 40, 50 és 60%) szacharózoldatot készítettünk, amelyhez proteázinhibitor koktélt adtunk 1:100 hígításban. A szacharózoldatokat centrifugacsőben egymásra rétegeztük (alulról felfelé a

következő sorrendben: 5 ml 60%-os, 8 ml 50%-os, 10 ml 40%-os és 9 ml 30%-os oldat). A centrifugacsöveket ezután egy éjszakán át hűtőben tároltuk. Az izolált mitokondriumokat 5 ml 10 mmol/l koncentrációjú foszfátpufferben (PB: 100 mmol/l Na₂HPO₄ 100 mmol/l NaH₂PO₄, pH = 7,4) szuszpendáltuk, és 20 percig inkubáltuk. Ezt követően 2 ml 60%-os szacharózoldatot adtunk hozzá, majd további 15 percig inkubáltuk. A mintát felváltva 30 másodpercig szonikáltuk, majd 1 percig inkubáltuk (három cikluson keresztül), 10 percig centrifugáltuk (6 500 × g), a felülúszót átvittük a szacharóz gradiensre, és újra centrifugáltuk 8 órán keresztül (50 000 × g).

A centrifugálás után a gradiens legfelső rétegéből 1 ml oldatot gyűjtöttünk, és a BCA protein assay kit (Pierce, Rockfort, IL, USA) alkalmazásával meghatároztuk annak fehérjekoncentrációját. A mintát akkor használtuk fel a TASK-3-csatornaféherje jelenlétének kimutatására célzó Western-blot kísérletekhez, ha az értékelhető mennyiségű féherjét tartalmazott. A Western-blot metodikájának részletes leírása a 3.6. fejezetben olvasható.

3.4. RNS-preparálás és -manipuláció

3.4.1. A TASK-3-specifikus mRNS melanoma sejtekből való izolálása, és szekvenciájának meghatározása

A melanoma sejtekből teljes RNS-frakciót izoláltunk, amelyből reverz transzkripció útján cDNS-t állítottunk elő. A tisztított mintából a humán TASK-3-csatornát kódoló szakasz felszaporítására PCR primerpárokat terveztük, melyeknek a szekvenciája, és a start kodontól számított kiindulási helye a következő volt:

„Sense”:	5' ATGAAGAGGCAGAACGTGCG	start kodon
„Antisense”:	5' TCGCTGCTGATGTTGTA CTTC	199. bázis
„Sense”:	5' GCGAGGAGGAGAACTCAAAGC	156. bázis
„Antisense”	5' GAGAAGAAGCCCACAGTCACCAT	524. bázis
„Sense”:	5' GCTGAAGCGCATTAAAGAAGTG	466. bázis
„Antisense”	5' AACTGACTTCCGGCGTTTCA	1152. bázis

Az amplifikált PCR termékek (az N-terminust kódoló első 169 bázispár, az első pórusformáló régiót kódoló középső 391 bázispár, valamint a C-terminust kódoló utolsó 708 bázispár) szekvenálását a gélből való extrakció és tisztítás után a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet laboratóriumában végeztettük el.

3.4.2. RT-PCR

Az RT-PCR kísérletekhez a tranziensen transzfektált melanoma sejtekből teljes RNS-frakciót izoláltunk az RNeasy Micro Kit (Qiagen) alkalmazásával, a gyártó utasításainak megfelelően. A kinyert RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Wilmington, DE, USA) ellenőriztük. A teljes RNS-ből reverz transzkripció útján cDNS-t állítottunk elő [OmniScript kit (Qiagen)]; a reakcióelegy 500 ng RNS-t, 0,25 µl RNáz-inhibítort, 0,25 µl oligo(dT)-t, 1 µl dNTP-t (200 µmol/l) és 1 µl M-MLV reverz transzkriptázt tartalmazott, 1× RT pufferrel 20 µl végtérfogatra kiegészítve. A kívánt DNS-szakasz amplifikációját specifikus primerpár alkalmazásával végeztük, amelyet a génbankban hozzáférhető BC075080 kódszámú *Homo sapiens* KCNK9 K⁺-csatorna mRNS szekvenciája alapján terveztünk (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). A primerpár szekvenciája

„Sense”: 5' GTTGACTACCATTTGGGTTCGG

„Antisense” 5' CTAATAGGCGATGGGAAGAGG

volt, és alkalmazása egy 468 bázispár hosszúságú amplimert eredményezett. A PCR reakciót 50 µl térfogatú reakcióelegyben végeztük, amely 2-2 µl „sense” és „antisense” primert, 1 µl dNTP-t (200 µmol/l) és 5 U GoTaq polimerázt (Promega Corporation, Madison, WI, USA) tartalmazott, egyszeres reakciópufferben. A reakció az Eppendorf Mastercycler (Eppendorf-Netheler-Hinz, GmbH, Hamburg, Németország) berendezésben, a következő hőprofil-beállítások mellett zajlott: 3 percig tartó 90 °C-on végzett kezdeti denaturálás után egy 35× ismétlődő ciklus következett, amelynek részei a denaturálás (94 °C, 30 s), a primerkötődés (59,5 °C-os optimalizált hőmérséklet, 60 s) és a lánchosszabbítás (72 °C, 90 s). Az utolsó ciklust követően a mintát még 10 percen át 72 °C-on tartottuk, ami lehetőséget adott további lánchosszabbításra. Az RT-PCR eredmények kvantitatív értékelése céljából a TASK-3 mellett gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz- (GAPDH) amplifikációt is végeztünk a következő beállítások mellett: 2 perc kezdeti denaturálás 95 °C-on, majd 35 cikluson keresztül denaturálás 94 °C-on (30 s), primerkapcsolódás 56 °C-os optimalizált

hőmérsékleten (45 s), és lánchosszabbítás 72 °C-on (90 s). Az utolsó ciklust egy 7 perces további lánchosszabbításra lehetőséget adó szakasz követte (72 °C). A GAPDH felszaporításához használt primerpár szekvenciája a következő volt:

„Sense”: 5' AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG
„Antisense” 5' AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT

A PCR reakciótermékeket etidium-bromiddal festett, 1,5%-os agaróz gélben futtattuk. A gélképen az ImageJ szoftver (v1.42q Java, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) segítségével denzitometriás analízist végeztünk. Annak érdekében, hogy a transzfekció utáni különböző időpontokban a TASK-3-specifikus mRNS mennyisége összehasonlítható legyen, a mért denzitást az azonos mintából származó GAPDH-ra normáltuk. A reakció során alkalmazott primerpárokat a Primer Premier szoftverrel terveztük (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA).

3.4.3. Humán TASK-3-specifikus shRNS kazetták tervezése, és RNS-interferencia alkalmazása

A munkánk során alkalmazott shRNS kazetták olyan PCR termékek, amelyekben a H1 promoter és a terminátor szekvencia között egy hajtúhurkot tartalmazó RNS-t kódoló DNS inszert található. A Genscript Corporations (Piscataway, NJ, USA) szoftvere segítségével három shRNS kazettát terveztünk a TASK-3-csatornát kódoló gén (KCNK9; génbank hozzáférési szám: NM_016601) különböző szakaszai ellen. A kiválasztott szekvenciák nem mutatnak homológiát más ismert génekkel. Az shRNS kazetták célszekvenciái a humán TASK-3-gén start kodonjától számított 639. (1. kazetta), 1072. (2. kazetta) és 309. (3. kazetta) bázisánál helyezkednek el. Az shRNS molekulákat az 5' végen Rodamin Red jelöléssel ellátva (excitációs és emissziós maximum 570, illetve 590 nm) a Sigma-Genosys (Steinheim, Németország) cégtől rendeltük meg. A melanoma sejteken Lipofectamine 2000 reagens és OptiMEM transzfekciós tápfolyadék (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alkalmazásával tranziens transzfekciót végeztünk, a gyártó utasításai szerint. A különböző kazetták hatékonyságát a transzfekciót követő három nap során ellenőriztük. Mind a három szekvencia alkalmazása hasonló változásokat okozott a melanoma sejtek morfológiájában és TASK-3-expressziójában egyaránt. A hatás mértéke a 3. kazetta esetén volt a legkifejezettebb, amelynek szekvenciája a következő volt:

„Sense”: 5' GCTCCTTCTACTTTGCGATCA

„Antisense”: 5' TGATCGCAAAGTAGAAGGAGC

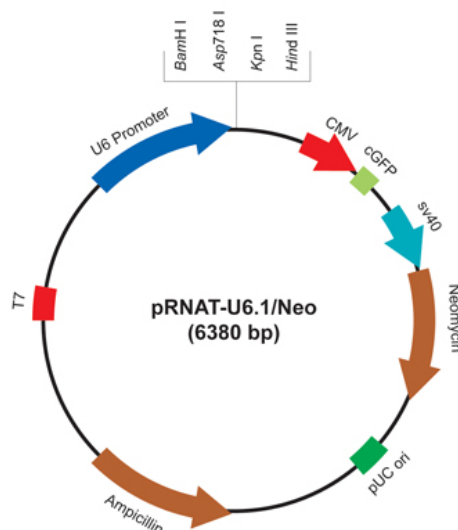
Negatív kontrollként a 3. kazettának megfelelő kevert szekvenciát (scrambled RNS) alkalmaztuk, ugyancsak kazetta formájában, a következő szekvenciával:

„Sense”: 5' TCTCCGGTACACTTCTTGATC

„Antisense”: 5' GATCAAGAAGTGTACCGGAGA

3.4.4. TASK-3-specifikus shRNS expressziós vektor előállítás és alkalmazása

A pRNAT-U6.1/Neo plazmid (GenScript) egy shRNS expressziós vektor, amely emlős sejtek transzfecciójára alkalmas (5. ábra). A vektor eukarióta szelekciós markerként a neomycin (geneticin) elleni rezisztencia génjét hordozta. A plazmid az ampicillin elleni rezisztencia génjét szintén tartalmazta, amely a bakteriális transzformáció során szolgált szelekciós markerként. A plazmidban jelenlévő CMV promoterről átíródó cGFP (coral GFP, green fluorescent protein) zöld fluoreszcens fehérje lehetővé tette a transzfecció hatásfok megítélését. A vektor polilinker régiója számos restriktív endonukleáz, köztük a BamH I. és a Hind III. enzimek hasítási helyét tartalmazta. Az shRNS kazettát, valamint az annak megfelelő scrambled RNS kazettát ezen két hasítási hely közé építettük be. Az inszert expressziója az U6 promoterről történt.



5. ábra: A pRNAT-U6.1/Neo cGFP shRNS expressziós vektor felépítése

A vektor polilinker régiójában helyezkednek el a különféle restriktív hasítási helyek. Az inszerteket a BamH I. és a Hind III. hasítási hely közé illesztettük. Az inszert az U6 promoterről íródik át. Az ábrán fel van tüntetve a vektor replikációs origója (pUC ori), az ampicillin és neomycin (geneticin) elleni rezisztencia, valamint a zöld fluoreszcens fehérje génje (cGFP) is.

Az RNS-interferenciás kísérleteink során alkalmazott TASK-3-specifikus shRNS kazetta (3. kazetta) és a scrambled RNS szekvenciáját a megfelelő komplementer oligonukleotidokkal együtt a Bio-science Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A szekvenciák 5' ill. 3' végére a BamH I. és a Hind III. restriktív enzimek hasítási helyét illesztettük oly módon, hogy a komplementer szálak összekapcsolása után ragadós végű hasítási helyek alakuljanak ki.

Az oligonukleotidok szekvenciái:

shRNS kazetta:

```
5' G|GATC CCGTGATCGCAAAGTAGAAGGAGCTTGATATCCGGCTCCTTCTACTTTGCGATCATTTTTTCCAA|AGCT T
3' C CTAG|GGCTAGCGTTTCATCTTCTCGAACTATAGGCCGAGGAAGATGAAACGCTAGTAAAAAGGTT TCGA|A
```

Scrambled RNS kazetta:

```
5' G|GATC CCGATCAAGAAGTGTACCGGAGATTGATATCCGTCTCCGGTACACTTCTTGATCTTTTTTCCAA|AGCT T
3' C CTAG|GGCTAGTTCTTACATGGCCTCTAACTATAGGCAGAGCCATGTGAAGAACTAGAAAAAGGTT TCGA|A
```

(BamH I. és Hind III. hasítási helyek)

A nukleáz-mentes vízben oldott szimpla szálú oligonukleotidokat ekvimoláris mennyiségben összekevertük a megfelelő komplementer szekvenciával, így módon létrehozva a kettős szálú inszertet, amelyeket ezután az expressziós vektorba illesztettünk. A hibridizációs puffer összetétele a következő volt: 10 mmol/l TrisHCl, 1 mmol/l EDTA, 100 mmol/l NaCl, pH = 8,0. A mintát először 95 °C-on 4 percig denaturáltuk, majd fokozatosan szobahőmérsékletre hűtöttük, és két órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, amely alatt a komplementer szálak összekapcsolódtak.

A cirkuláris plazmidot két lépésben linearizáltuk a két restriktív enzimmel. A reakciók 37 °C-on 60 percen át zajlottak. A reakcióelegy 30 µg plazmid DNS-t, 2 U/µg(DNS) restriktív enzimet és enzimpuffert tartalmazott, nukleáz-mentes vízzel a megfelelő végtérfogatra kiegészítve. Az emésztés hatékonyságát mindkét lépés után agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A linearizált vektort Microcon szűrőegység segítségével nyertük ki a reakcióelegyből, a gyártó utasításait követve (Millipore, Billerica, MA, USA). Az így nyert tiszta DNS koncentrációját fotometriás módszerrel, NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg, és felhasználtuk a ligációhoz.

A dupla szálú inszertet T4 ligáz segítségével építettük a linearizált, tisztított vektorba. A ligációs elegyben a vektor és az inszert 1:3 tömegarányban (50, illetve 150 ng), az enzim 3 U mennyiségben volt jelen. A ligációs elegyet egy éjszakán át, 16 °C-on inkubáltuk. A

restrikciós emésztés és a ligáció során felhasznált enzimeket és reagenseket a Promega cégtől szereztük be. Negatív kontrollként olyan ligációs elegyet állítottunk össze, amely az inszertet nem tartalmazta.

A TASK-3 shRNS és a scrambled RNS inszerteket tartalmazó vektorkonstrukciókkal kompetens *E. coli* baktériumokat transzformáltunk, amelynek során ampicillin elleni rezisztencián alapuló szelekciót alkalmaztunk. A transzformáció első lépéseként a ligációs elegyeket a baktériumszuszpenzióval összekevertük, majd 40 percen át jégen inkubáltuk. Ezután 42 °C-on 45 másodperces hőshokot alkalmaztunk, majd a sejteket 2 percen át újra 4 °C-on tartottuk. A baktériumokat ezután LB Broth tápfolyadékban, 60 percen át, 37 °C-on, rázatás mellett inkubáltuk, majd 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB agarra szélesztettük, és 37 °C-on egy éjszakán át növesztettük. Másnap az agarról egyedi baktériumkolóniákat izoláltunk, és azokat 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB Broth tápfolyadékban, 37 °C-on, 16 órán át rázatva felszaporítottuk. Az egyedi kolóniákból a Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega) segítségével kikaparáltuk a plazmid DNS-t, majd BamH I és Hind III restrikciós emésztés után agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az inszert jelenlétét. Amennyiben a gélképen az inszertnek megfelelő sáv jelen volt, az adott kolóniából származó mintákon szekvenálási reakciót végeztünk az inszert jelenlétének egyértelmű bizonyítása végett. A szekvenálást a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet laboratóriumában végeztettük el.

A TASK-3-géncsendesített melanoma sejtenyészet előállításához a WM35 melanoma sejteket 30 mm átmérőjű Petri csészében, steril fedőlemezen tenyésztettük. A transzfekeciót Lipofectamine 2000 transzfekeciós reagenssel, OptiMEM transzfekeciós tápfolyadékban végeztük (Invitrogen), a gyártó utasításainak megfelelően. A transzfekeciót két párhuzamos tenyészetben végeztük el, melyek közül az egyiket a transzfekeció sikerességének igazolása, és a transzfekeciós hatásfok megítélése céljából 48 óra elteltével metanollal fixáltuk, majd a GFP expresszióját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Amennyiben a transzfekeciós hatásfok megfelelőnek bizonyult, a fenntartott párhuzamos tenyészetet felhasználtuk a további kísérletekhez.

3.5. Immunjelölés és mikroszkópia

3.5.1. Mitokondriális jelölés tenyésztett sejtekben

A mitokondriumok jelölését a MitoTracker Red CMXRos mitokondrium-szelektív festékkel végeztük el (Molecular Probes, Leiden, Hollandia). A festéket a tenyésztőoldatban

oldottuk fel 100 nmol/l végkoncentrációban. A tenyészetet tenyésztési körülmények között, 30 percen át kezeltük a festéket tartalmazó oldattal, majd a sejtek fixálása után immunjelölést hajtottunk végre rajtuk. A mitokondriumfrakció preparálása előtt az esetek egy részében ugyanezt a jelölési eljárást alkalmaztuk.

3.5.2. Immuncitokémia

Az immuncitokémiai kísérleteket steril fedőlemezen tenyésztett sejteken végeztük. Első lépésben a fedőlemezeket PBS-sel (phosphate buffered saline; összetétel: 100 mmol/l NaCl, 125 mmol/l Na₂HPO₄, pH = 7,4) mostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel 15 percig fixáltuk. A fixálást és az immuncitokémiai reakció további lépéseit szobahőmérsékleten, nedves kamrában végeztük. Ezt követően a sejteket 100 mmol/l glicint tartalmazó PBS-sel 3×5 percig mostuk. A sejtmembrán permeabilizálása céljából a sejteket 10 percig 0,1% Triton X-100 tartalmú PBS-sel kezeltük, majd a fedőlemezt PBS-sel háromszor öblítettük. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolására 1% BSA-t tartalmazó PBS-t alkalmaztunk 30 percen át. Ezután a sejteket a blokkoló oldatban hígított (1:200) TASK-3-specifikus monoklonális primer antitesttel (katalógusszám: K0517, klón: KCN-75, Sigma) inkubáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on. Az alkalmazott antitest specificitását egy korábbi munkánkban már igazoltuk (Pocsai és munkatársai, 2006). Másnap a fedőlemezeket PBS-sel háromszor öblítettük, majd a sejteket a PBS-ben hígított másodlagos antitesttel inkubáltuk egy órán át, szobahőmérsékleten. Másodlagos antitestként egér IgG ellen, lóban termeltet, fluoreszcein-izotiocianát- (FITC-) konjugált ellenanyagot használtunk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 1:200 hígításban. Újabb háromszori öblítés (PBS) után a sejteket DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenilindol) tartalmazó beágyazó oldattal (Vectashield mounting medium with DAPI, Vector) fedtük le. A sejtmagok jelölésére szolgáló DAPI excitációs és emissziós maximuma 360, illetve 460 nm volt.

Az immunreakciókkal párhuzamosan rendszeresen végeztünk negatív kontroll kísérleteket az elsődleges ellenanyag elhagyásával.

3.5.3. Az izolált mitokondriumok immunjelölése

Az izolált mitokondriumokon kettős fluoreszcens festést végeztünk, amelyben az egyik szín valamely mitokondrium-specifikus jelölés, míg a másik a TASK-3-specifikus immunreakció eredménye volt. A kettős jelölésre két különböző eljárást alkalmaztunk. Az egyik esetben a sejteket még a mitokondriumok izolálása előtt MitoTracker festékekkel kezeltük a 3.5.1. fejezetben leírtak szerint. Ezek után az izolált, fixált mitokondriális frakción

TASK-3-specifikus immunreakciót végeztünk, amelynek lépései megegyeztek azzal, amit a teljes sejteken végzett immunreakciónál már leírtunk (3.5.2. fejezet).

A másik esetben az izolálási folyamat után a fixált mitokondriumokon kettős immunjelölést végeztünk egy citokrom-c-specifikus, egérben termeltetett monoklonális antitesttel (BD PharMingen, San Diego, CA, USA, 1:100 hígítás), és egy nyúlban termeltetett, poliklonális TASK-3-ellenes antitesttel (Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael, 1:800 hígítás). Másodlagos antitestként egér IgG ellen lóban termeltetett, Texas red fluoreszcens festékkel konjugált, illetve nyúl IgG ellen kecskében termeltetett, FITC-konjugált ellenanyagot alkalmaztunk (Vector).

3.5.4. Immunhisztokémia

A humán mintákon végzett vizsgálatokat a DE OEC Tudományos Bizottságának Regionális és Intézeti Kutatásaitikai Bizottsága jóváhagyásával és engedélyével végeztük. A disszertációban alkalmazott immunhisztokémiai kísérletek metodikája megegyezett azzal, amelyet korábbi munkáink során már alkalmaztunk (Kovács és munkatársai, 2005).

A TASK-3-csatornafehérje kimutatására az immunhisztokémiai reakciók során két különböző TASK-3-specifikus elsődleges ellenanyagot alkalmaztunk. A 3.5.2. fejezetben ismertetett monoklonális ellenanyag (Sigma) mellett egy kecskében termeltetett, poliklonális ellenanyagot (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, CA, USA) is alkalmaztunk. Bár a két antitest eltérő epitópokat ismert fel, azok minden esetben azonos struktúrákat jelöltek.

Az immunhisztokémiai kísérleteket 4 µm vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákon hajtottuk végre, amelyeket a betegekből posztoperatív hisztopatológiai diagnózis céljából távolítottak el. Az esetek egy részében az immunhisztokémiai reakció előtt antigénfeltárást végeztünk, amelynek során a metszeteket vagy 8 mmol/l Tris-pufferben (pH = 8,4) mikrohullámú sütőben melegítettük (15 perc, 750 W), vagy 0,1 mol/l citrát-pufferben (pH = 6,0), kuktában főztük (2 perc). Mindkét eljárás hasonló jelölődést eredményezett, ugyanakkor alkalmazásuk növelte az immunreakció intenzitását. Az endogén peroxidáz aktivitását hidrogén-peroxid 3%-os vizes oldatával gátoltuk (10 perc, szobahőmérséklet). Ezután az aspecifikus kötőhelyek blokkolása következett „Protein Block Serum Free” reagens alkalmazásával (DAKO, Glostrup, Dánia). A szövetmetszeteket egy éjszakán át inkubáltuk valamelyik TASK-3-specifikus primer antitesttel. A primer antitesteket 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben hígítva alkalmaztuk 1:200 (Sigma), illetve 1:100 (Santa Cruz) hígításban. A metszeteket a másodlagos antitesttel való kezelés előtt PBS-ben 3×5 percig mostuk. Az egérben termeltetett elsődleges antitest

alkalmazása esetén másodlagos ellenanyagként EnVision rendszert használtunk (DAKO, 30 perc, szobahő). A kecskében termeltetett elsődleges antitest esetén kecske IgG-t felismerő, nyúlban termeltetett, biotinilált másodlagos ellenanyagot (30 perc, szobahőmérséklet), majd mosás után (PBS, 3×5 perc) tormaperoxidázzal konjugált streptavidint alkalmaztunk szobahőmérsékleten, 30 percen át. Az előhívást mindkét esetben VIP SK4600 kittel végeztük. Az immunfestés végén metilzölddel enyhe háttérfestést alkalmaztunk. Amennyiben másként nem jelöltük, a humán mintákon végzett immunhisztokémiai reakcióhoz használt reagenseket a Vector Laboratories cégtől szereztük be.

Rendszeresen végeztünk negatív kontroll kísérleteket, amik poliklonális antitestek alkalmazása esetén az antitestre specifikus immunizáló fehérjével való előinkubációval, a monoklonális antitest esetén pedig az elsődleges antitest elhagyásával történtek.

3.5.5. Mikroszkópia

A disszertációban bemutatott nem fluoreszcens felvételeket egy Nikon Eclipse 600-W mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán) 4×, 20× vagy 60× objektívvel készítettük. Az objektívek numerikus apertúrája 0,13, 0,5, illetve 1,4 volt. A felvételeket a mikroszkóphoz csatolt „RT colour CCD” kamera és a Spot v3.5 program segítségével rögzítettük.

A fluoreszcens immunreakciók nagy részét egy Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével értékeltük. A felvételeket 40× olajimmerziós, vagy 63× vízimmerziós objektívvel készítettük. A gerjesztő lézer hullámhossza FITC-konjugált másodlagos antitest esetén 488 nm; Texas Red, Rodamin Red, valamint MitoTracker esetén 543 nm; míg DAPI esetén 360 nm volt. A konfokális mikroszkóp segítségével vagy egyetlen (általában 0,5-1,0 μm vastagságú) rétegfelvételt, vagy a vizsgált struktúra teljes vastagságán végighaladó rétegfelvétel-sorozatot készítettünk („Z-stack” képek). Utóbbi esetben az egyes optikai szeletek rétegvastagsága 0,6-1,0 μm között változott. A rétegfelvételekből a Zeiss LSM Image Browser program segítségével állítottuk elő az összesített képet. Az illusztrációk végleges formáját az Adobe Photoshop 7.0 felhasználásával készítettük el. Egyes felvételeknél a láthatóság elősegítése vagy a képminőség javítása érdekében módosítottuk ugyan a fényerősséget és a kontrasztot, de ezekben az esetekben az ábra egészét mindig azonos módon kezeltük.

Bizonyos esetekben (például a stabilan transzfektált HEK sejtekben az shRNS kazetta hatásának vizsgálata során) egyszerű, konvencionális fluoreszcens felvételeket készítettünk az „RT colour CCD” kamerával felszerelt Nikon Eclipse 600-W mikroszkóppal, a Spot v3.5 szoftver segítségével.

3.6. Western-blot

A Western-blot kísérletekhez a kontroll, valamint a tranziensen transzfektált melanoma sejt kultúrákból készített teljes sejt lizátumot használtuk. A teljes sejt lizátum készítése során a letapadt sejteket PBS-sel háromszor öblítettük, majd 100 µl jég hideg lízis pufferben [20 mmol/l TRIS-HCl, 5 mmol/l EGTA, 1 mmol/l 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid 20 µmol/l leupeptin, pH = 7,4] mechanikusan felvettük őket. A szuszpendált sejteket jég hideg környezetben szonikáltuk, majd BCA-kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce) alkalmazásával meghatároztuk fehérjetartalmukat.

A teljes sejt lizátumból készített mintát Na⁺-dodecilszulfát-poliakrilamid- (SDS-PAGE) gélelektroforézis-pufferrel kevertük, és 10 percig főztük. Az így előkészített mintákat 7,5%-os akrilamid-gélen futtattuk. A teljes sejt lizátumból 160 µg-ot vittünk fel az egyes oszlopokra. Az elektroforézis végén a mintákat nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) vittük át. A membránhoz kötődött fehérjéket Ponceau S festékkel tettük láthatóvá, majd 5% tejport és 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS alkalmazásával (PBST) blokkoltuk 30 percig. Az anti-TASK-3 antitestet (Alomone) 1:800 hígításban alkalmaztuk, és egy éjszakán át hagytuk a membránon (4 °C). A következő napon a membránt PBST-vel mostuk, majd tormaperoxidázzal kapcsolt, kecskében termeltetett, nyúl IgG-ellenes másodlagos antitesttel (Bio-Rad; 1:1000) inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A negatív kontroll kísérletekben az elsődleges antitestet előinkubáltuk a rá specifikus blokkoló peptiddel, ami teljes mértékben megakadályozta az immunreaktív csíkok kialakulását.

Az eredmények láthatóvá tételéhez egy kemilumineszcenciás Western-blot detektáló rendszert (Pierce) alkalmaztunk. Az előhívást és az eredmények dokumentálását Fujifilm Labs-3000 sötétkamrával (Tokió, Japán) végeztük. A TASK-3-expresszió mennyiségi értékelése céljából denzitometriás mérést végeztünk, aminek során a TASK-3-specifikus immunpozitív sávokon mért denzitást β-aktinra normáltuk. A β-aktinra specifikus Western-blot reakciót TASK-3-specifikus reakcióval egyidejűleg, és azonos mintákon végeztük. A β-aktin kimutatására nyúlban termeltetett elsődleges ellenanyagot használtunk (Santa Cruz), 1:200 hígításban.

A teljes sejt lizátumon kívül a 3.3.2. fejezetben ismertetett mitokondriális membránfrakcióból készített mintán is végeztünk Western-blot kísérleteket. Ebben az esetben a reakciót szukcinát-dehidrogenáz- (SDHA-) és P₂X₇-ellenes antitestekkel is elvégeztük, annak bizonyítására, hogy a minta valóban tartalmazott mitokondriális membránt, ugyanakkor

sejtfelszíni membránnal nem volt szennyezett. Mind az SDHA-specifikus (Abcam, Cambridge, MA, USA), mind a P₂X₇-specifikus (Alomone) primer antitestet nyúlban termeltetették, hígításuk 1:200 volt. A reakció többi lépése megegyezett a teljes sejtlyázátumból készített minták esetén alkalmazottal.

3.7. A sejtszám és sejtméret vizsgálata

3.7.1. CyQUANT assay

A sejtproliferáció mérést 96 lyukú Greiner tenyésztőedényben (Greiner Bio-One North America Inc., Monroe, NC, USA) végeztük. A sejttenyészet indításakor egy lyukba 2000 sejtet helyeztünk, majd másnap elvégeztük a transzfekciót, és a tenyészetet további három napig tartottuk fenn. A transzfekció utáni negyedik napon a sejteket először kalcium- és magnéziummentes PBS oldattal (CMF PBS: 136,75 mmol/l NaCl, 2,68 mmol/l KCl, 8,1 mmol/l Na₂HPO₄, 1,47 mmol/l KH₂PO₄, pH = 7,4) öblítettük, majd -70 °C-on tartottuk 30 percen át. Ezt követően a sejteket 5 percen át 100 µl DNS-festő oldattal [CyQUANT törzsoldat (Invitrogen) PBS-ben hígítva] inkubáltuk. A fluoreszcens jel mérését egy FlexStation II HTS 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) berendezés segítségével végeztük, 485 nm excitációs és 530 nm emissziós hullámhossz alkalmazásával.

3.7.2. MTT-assay

Az MTT-assay kivitelezése céljából a sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe oltottuk (10 000 sejt/lyuk), másnap transzfectáltuk, majd további 3 napig tenyésztettük. A negyedik napon a sejteket CMF PBS-sel kétszer öblítettük, majd 0,5 mg/ml MTT-reagenst [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid] tartalmazó PBS oldattal inkubáltuk 2-4 órán át 37 °C-on. A reakció során a mitokondriális enzimek a tetrazólium só oldhatatlan formázán kristályokká redukálják. Az inkubációs idő eltelte után a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket MTT szolubilizáló oldattal kezeltük (81% 2-propanol, 9% 1 mol/l HCl, 10% Triton-X-100) 15 percen át, amelynek során a sejtekben kicsapódott formázán kristályok feloldódtak. Az oldat formazántartalmát fotometriás méréssel határoztuk meg (550 nm), egy FlexStation3 (Molecular Devices) berendezés segítségével.

3.7.3. A sejt méret meghatározása

Mivel a melanoma sejtek meglehetősen szabálytalan alakúak, és számos nyúlvánnyal rendelkeznek, a sejtátmérő meghatározása nem adott volna megfelelő információt a sejtek méretéről, ezért inkább a sejt felszín mikroszkóp alatt látható vetületének területét határoztuk meg. A mérés során a sejtekről fluoreszcens és áteső fényvel egyaránt felvételeket készítettünk, és a két képet egymásra vetítettük. Az egyesített felvételen kijelöltük a vizsgálni kívánt régiót (ROI, region of interest), amelynek területét az ImageJ program segítségével határoztuk meg. Ezt a mérést minden lefényképezett látótér minden sikeresen transzfektált (GFP-t expresszáló, azaz zölden fluoreszkáló) sejtjén elvégeztük. Az összehasonlítás céljából az azonos látóterekben látható nem transzfektálódott sejtek méretét is meghatároztuk. A véletlenszerűen kiválasztott kontroll sejtek száma azonos volt az adott látótérben megfigyelhető, és sikeresen transzfektált sejtek számával.

3.8. Funkcionális mérések

3.8.1. Elektrofiziológiai mérések HEK293 sejteken

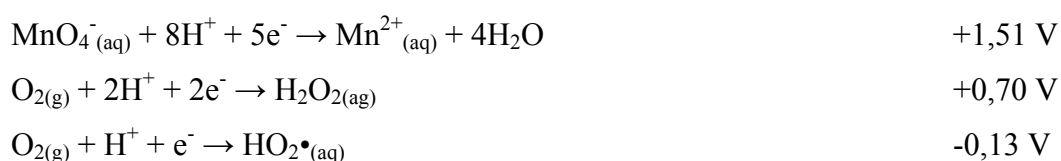
A stabilan transzfektált HEK sejtek felszíni membránjában megjelenő TASK-3-csatornákon folyó K^+ -áram mérését a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjával végeztük. A mérések során alkalmazott mikroelektrodák vékony falú boroszilikát kapillárisok felhasználásával készültek (Clark Elektromedical Instruments, Reading, UK). A belső oldat összetétele 140 mmol/l KCl, 10 mmol/l HEPES, 4 mmol/l $MgCl_2$, 10 mmol/l EGTA volt (pH = 7,3). A mérőelektrodák ellenállása 2-4 $M\Omega$ között változott. Az áramméréseket DigiData 1200 jelátalakítóhoz kapcsolt Axopatch 200A típusú patch-clamp erősítő (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) alkalmazásával végeztük. Az adatgyűjtés és analízis céljára a pClamp 6.0 program szolgált.

Az árammérést a 3. számú shRNS kazettával és a scrambled RNS kazettával transzfektált HEK sejteken a transzfekciót követő 3. napon végeztük. A TASK-3-áram meghatározása során -80 mV tartópotenciál mellett 800 ms hosszúságú „ramp” depolarizációkat alkalmaztunk -120 és +50 mV közötti feszültségtartományban, 0,2 Hz frekvenciával. Minden esetben öt ramp protokollt alkalmaztunk, majd az egyedi válaszok átlagából határoztuk meg az áramamplitúdót, amit a teljes-sejtes kapacitásra normáltunk. Minden sejt típus (kontroll, shRNS-sel, valamint scrambled RNS-sel kezelt sejtek) esetén

meghatároztuk az átlagos áramdenzitást, és az eredményt (\pm SEM) a membránpotenciál függvényében ábrázoltuk.

3.8.2. A melanoma sejtek mitokondriális funkciójának mérése

A mitokondriális funkció mérésének alapjául a sejttenyészetben jelen lévő extracelluláris reaktív oxigényökök (ROS) koncentrációjának meghatározása szolgált. A mérést a munkacsoportunk által kifejlesztett permanganát-alapú ROS-meghatározási módszerrel végeztünk. Az alábbi félreakciók standard redoxpotenciálja közötti különbség azt mutatja, hogy a káliumpermanganát képes oxidálni a peroxidot és a szuperoxidot.



Mivel a klorid és a szerves vegyületek csökkenthetik az oldatban lévő permanganát mennyiségét, a ROS meghatározását kloridot és szerves vegyületeket nem tartalmazó HANK oldatban végeztük, amelynek összetétele 5,8 mmol/l KH_2PO_4 , 7,5 mmol/l Na_2HPO_4 , 0,81 mmol/l MgSO_4 és 146,55 mmol/l NaHCO_3 volt.

A sejteket a mérés előtti napon 24 lyukú tenyésztőedénybe oltottuk (50 000 sejt/lyuk). Közvetlenül a kísérlet előtt a sejteket CMF PBS-sel kétszer öblítettük, majd a módosított HANK oldattal, valamint ezzel párhuzamosan 1,5, 3, illetve 4,5 mmol/l H_2O_2 -t tartalmazó módosított HANK oldattal inkubáltuk. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, és 800/perc fordulatszámra 10 percig centrifugáltuk. Az extracelluláris ROS koncentrációját a felülúszóban mértük. Mivel a nekrozis során felszabaduló szerves vegyületek emissziója mérési hibát okozhat, egy korábban leírt, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz-aktivitás mérésén alapuló módszerrel meghatároztuk a nekrotikus rátát (Tóth és munkatársai, 2009), amely a jelen kísérleti körülmények között elhanyagolhatónak bizonyult.

Az alkalmazott permanganát oldatot minden kísérlet előtt ismert koncentrációjú kálium-oxalát oldat segítségével faktorizáltuk. A káliumpermanganát oldatból hígítási sorozatot készítettünk a 0,1-2,0 mmol/l tartományban, ami a kísérletek során standardként szolgált a maradék káliumpermanganát koncentrációjának meghatározásához. A reakciót 96 lyukú, polisztirolból készült tenyésztőedényben végeztük. A reakcióelegy 50 μl mintát, 50 μl koncentrált H_2SO_4 -oldatot, valamint 100 μl 2 mmol/l koncentrációjú KMnO_4 -oldatot tartalmazott. Minden mintán 8 párhuzamos mérést végeztünk.

Minden mérés során alkalmaztunk pozitív és negatív kontrollt; a negatív kontrollban az 50 μl mintát 50 μl módosított HANK oldattal, a pozitív kontrollban pedig 50 μl 1,5 mmol/l H_2O_2 -t tartalmazó módosított HANK oldattal helyettesítettük. A minták és a pozitív kontroll ROS-koncentrációját mindig a negatív kontrollra korrigálva határoztuk meg. A fotometriás mérést egy Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad) segítségével, 550 nm hullámhosszon végeztük. Mivel a MnO_4^- 550 nm-en mért abszorbanciája nagyon magas, míg a reakció végterméke (Mn^{2+}) szintelen, a mért abszorbanciaértékek alapján a H_2O_2 koncentrációja a 0,1-10 mmol/l tartományban meghatározhatónak bizonyult.

3.9. Statisztikai módszerek

Az eredményeket minden esetben átlag \pm SEM formában adtuk meg. A statisztikai különbségeket a Student-féle t-próba segítségével határoztuk meg, és a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

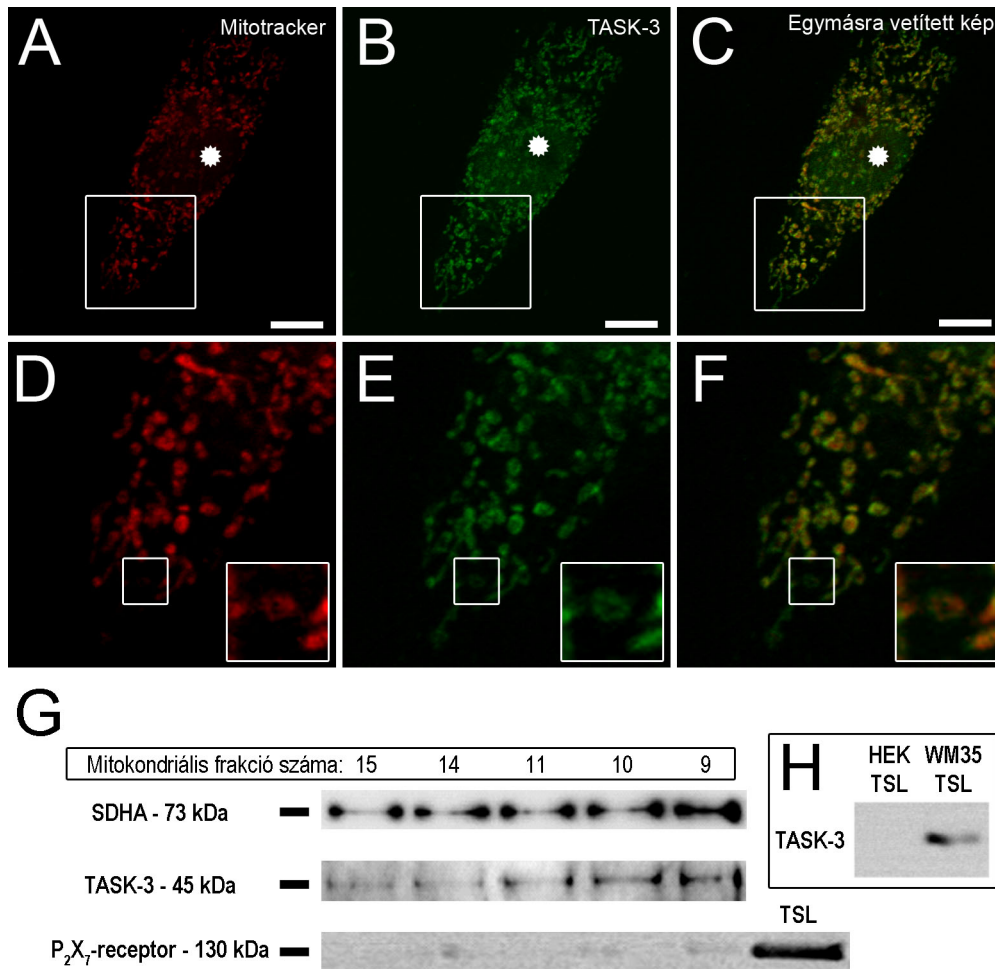
4. EREDMÉNYEK

4.1. A TASK-3-csatornák mitokondriális expressziója melanoma sejtekben

Korábbi munkáinkban (Kovács és munkatársai, 2005, Pocsai és munkatársai, 2006) részletesen tanulmányoztuk a TASK-3-csatornafehérje jelenlétét és megoszlását különböző daganatos sejtekben, mely vizsgálatok egyik fontos megállapítása volt, hogy a TASK-3-specifikus immunpozitivitás elsősorban intracelluláris megjelenést mutat. A jelen vizsgálatsorozat egyik célja annak meghatározása volt, hogy a melanoma sejtekre jellemző intenzív TASK-3-expresszió mely intracelluláris struktúrához köthető. A kérdés megválaszolása érdekében a TASK-3-specifikus immunjelölést melanosoma-, endoplazmatikus retikulum- és mitokondrium-specifikus jelöléssel kombinálva hajtottuk végre. Ezen kísérletek során a melanoma sejtek erős intracelluláris TASK-3 pozitivitása sem a melanosomákkal, sem az endoplazmatikus retikulummal nem volt összefüggésbe hozható (nem bemutatott eredmények), ugyanakkor a mitokondriális jelölés megoszlási mintázata nagymértékű hasonlóságot mutatott a TASK-3-specifikus immunreakcióval (6A-F. ábra). Az erőteljes nukleáris immunjelölődés, amelyről korábban már beszámoltunk (Kovács és munkatársai, 2005, Pocsai és munkatársai, 2006) ez alól természetesen kivételt képezett. A sejtfelszíni membrán gyenge jelölődése ugyanakkor a jelölődési mintázat további, igen meglepő jellegzetessége volt.

A tenyésztett sejteken végzett immuncitokémiai kísérletek után mitokondriumokat izoláltunk a WM35 melanoma sejtvonalból, amikben ugyancsak vizsgáltuk a TASK-3-csatornák jelenlétét. Ezen vizsgálatok során mitokondriális jelölést is végeztünk annak igazolására, hogy az izolált frakció valóban mitokondriumokat tartalmazott. A preparálási folyamat végén egy olyan szuszpenziót kaptunk, amelyben az egyedi granulomok átmérője a 0,5-2 μm tartományba esett; erőteljes MitoTracker jelölődésük alapján ezek a granulomok nagy valószínűséggel egyedi mitokondriumoknak feleltek meg. A szuszpenzió TASK-3 immunpozitivitást is mutatott, amelynek mintázata átfedett a mitokondriális jelöléssel.

A TASK-3-csatornák és a mitokondriumok kettős jelölésére egy másik eljárást is alkalmaztunk, amely az előbbieken leírt módszertől jelentősen eltért. Ennek során a mitokondriumokat egy monoklonális citokróm-c-specifikus ellenanyaggal, a TASK-3-csatornákat pedig egy poliklonális TASK-3-ellenes antitesttel jelöltük. A két eltérő jelölési stratégia hasonló eredményt adott, azaz mindkét módszerrel kimutatható volt a mitokondriumok és a TASK-3-csatornák co-lokalizációja.

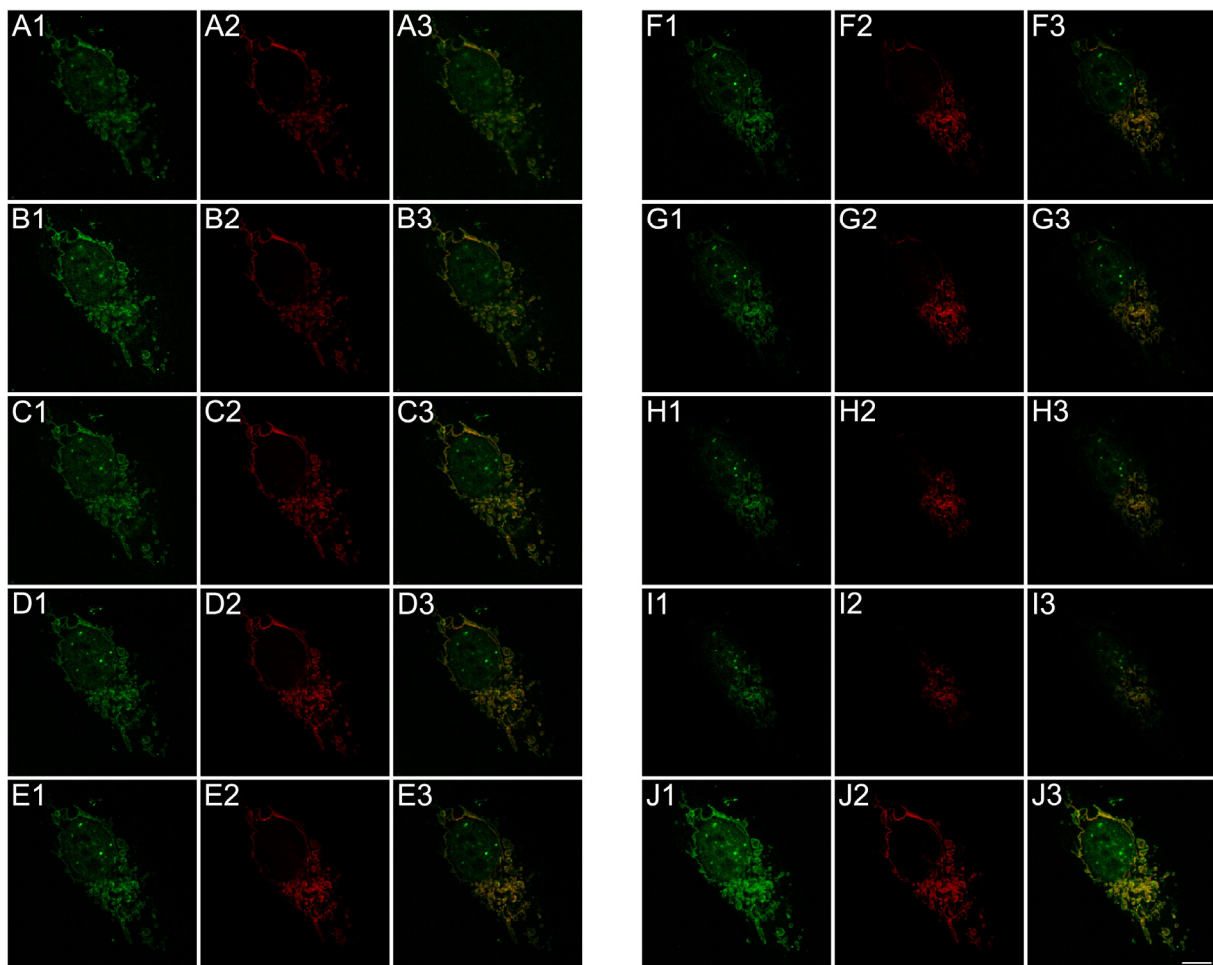


6. ábra: A TASK-3-csatornák mitokondriális expressziója melanoma sejtekben

A: Mitokondrium-specifikus jelölés (MitoTracker) melanoma sejtekben 18 órával a passzálas után. **B:** A TASK-3-specifikus immunjelölés eredménye ugyanazon a látótéren. **C:** Az **A** és **B** ábrarész egymásra vetítve. A csillagok a sejtmagokat jelölik. A fehér négyzettel jelölt területek a **D**, **E** és **F** ábrarészekben nagyítva láthatóak. A kis négyzet által határolt régió az ábra jobb alsó sarkában látható nagyítva, megnövelt fényerősséggel. Kalibráció: 10 μ m. **G:** Izolált mitokondriumfrakció, SDHA- (szukcinát-dehidrogenáz), TASK-3- és P_2X_7 -specifikus antitestekkel végzett Western-blot kísérletek eredménye. A P_2X_7 -specifikus antitesttel melanoma sejtekből készített teljes sejtlizátumon (TSL) is elvégeztük a reakciót, az antitest megfelelő működésének igazolása végett. **H:** Naiv HEK293, illetve WM35 melanoma sejtekből készített teljes sejtlizátumon végzett, TASK-3-specifikus Western-blot reakció eredménye. A kísérletet mindkét sejtvonalból 3-3 mintán végeztük el, és minden esetben hasonló eredményt kaptunk.

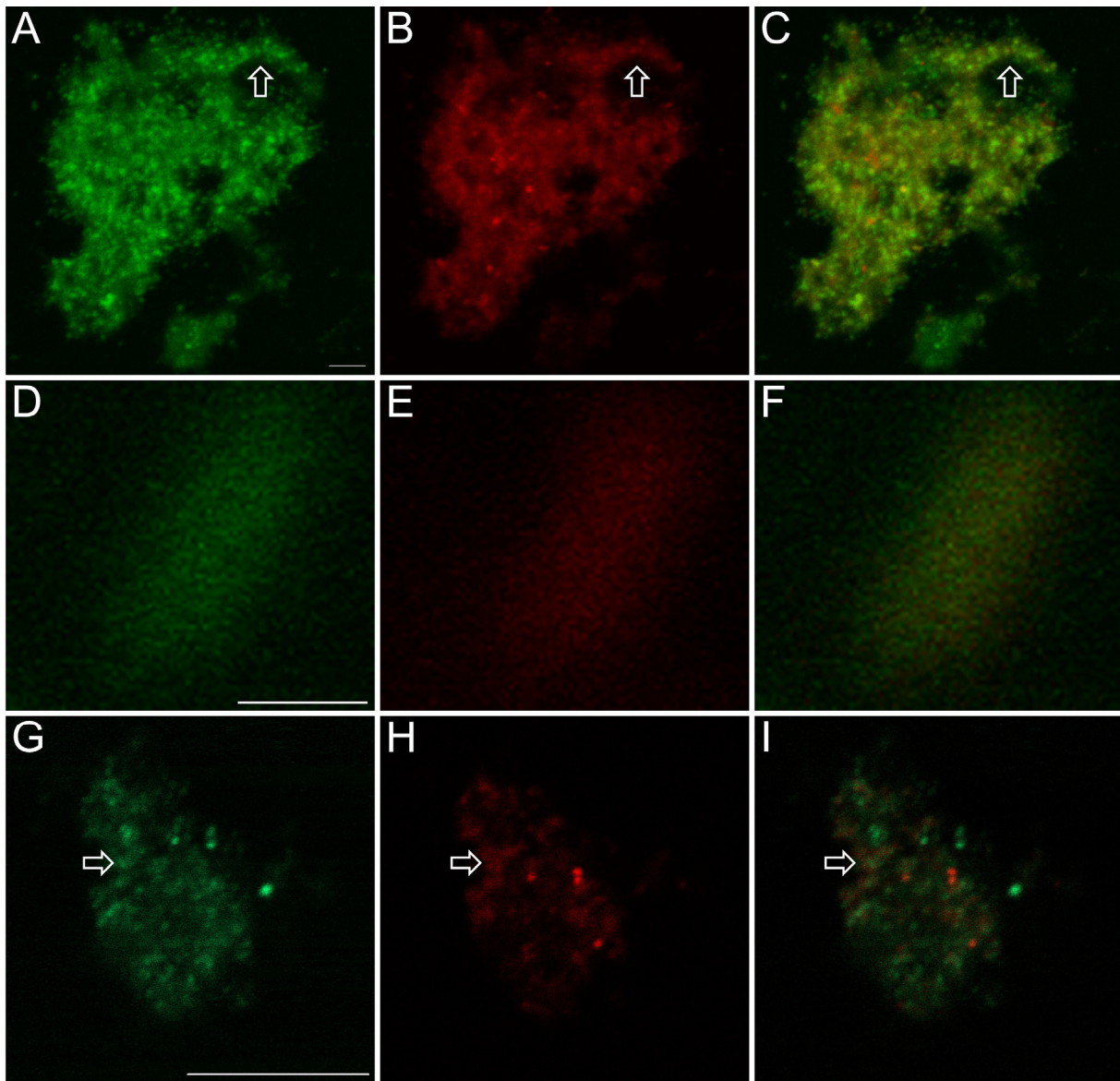
A WM35 melanoma sejtvonalból preparált mitokondriális membránfrakción Western-blot módszerrel is vizsgáltuk a TASK-3-fehérje jelenlétét. A Western-blot kísérletek során szukcinát-dehidrogenáz- (SDHA-), TASK-3- és P_2X_7 -típusú purinerg receptorokra specifikus primer antitesteket alkalmaztunk. A 6G ábrán látható, hogy a mitokondriális membránt tartalmazó mintában megjelent a TASK-3-specifikus sáv, ami igazolta, hogy a csatornafehérje valóban expresszálódott valamelyik mitokondriális membránban. Az SDHA mitokondriális enzimet jelölő antitest alkalmazásával kapott immunpozitív sáv azt igazolta, hogy a minta valóban mitokondriális membránfrakciót tartalmazott, míg a P_2X_7 -jelölődés hiánya azt jelezte,

hogy a minta a sejtfelszíni membránból származó szennyeződéstől mentes volt. A TASK-3-specifikus primer antitest megfelelő működésének alátámasztása céljából egy olyan kontroll kísérletet végeztünk, aminek során a WM35 sejtvonalból készített, teljes sejtlizátumot tartalmazó mintát használtuk fel a Western-blot kísérlethez; a naiv (azaz TASK-3-csatornát nem expresszáló) HEK293 sejtekből készített minta pedig negatív kontrollként szolgált. Megfigyelhető, hogy a WM35 sejtekből származó minta erős TASK-3 jelölődést adott, ezzel szemben a HEK-sejtek nem mutattak jelölődést (6H ábra).



7. ábra: A TASK-3-csatornák és a mitokondriumok co-lokalizációját bemutató konfokális rétegfelvételek

A WM35 sejteken a MitoTracker festékkel végzett mitokondriális jelölést követően a monoklonális TASK-3-specifikus ellenanyaggal immunreakciót végeztünk. A tenyészet fixálását, majd az immunreakciót a passzálás után 12 órával hajtottuk végre. Az ábrán a zöld szín a TASK-3-specifikus immunreakció (A-J1), míg a piros szín a MitoTracker-jelölés eredménye (A-J2). A co-lokalizációs felvételeken a kétféle jelölés egymásra vetülése sárga-narancssárga színt eredményez (A-J3). A rétegfelvételeket a melanoma sejtek legaljától kezdve 0,5 µm-es lépésként készítettük, a sejt teljes vastagságában (A-I). A J1-3 ábrarészekben a rétegfelvételek egymásra vetítésével kapott összesített képek láthatóak. Kalibráció: 10 µm.

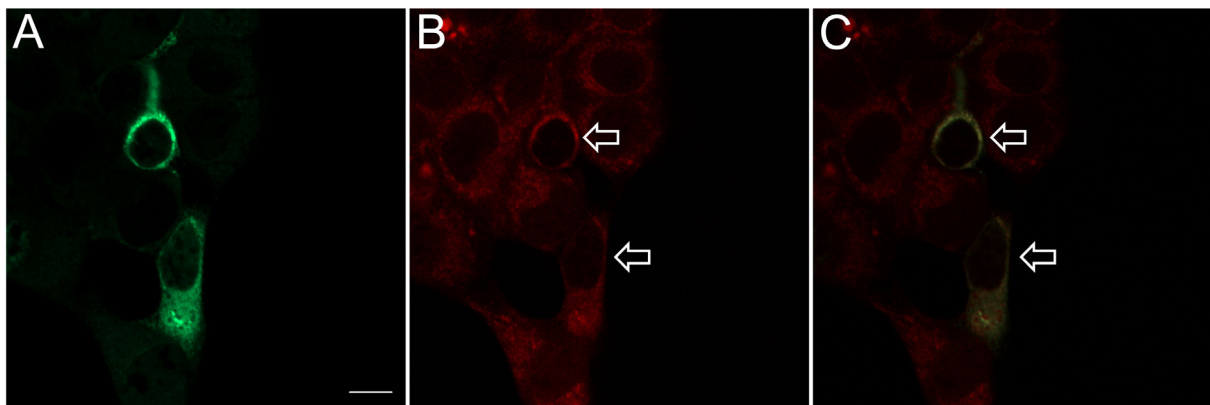


8. ábra: TASK-3 immunreakció melanoma sejtekből izolált mitokondriumokon

A-F: A tenyésztett melanoma sejteket az izolálás előtt MitoTracker festékekkel jelöltük (piros szín, **B** és **D** ábrarész). Az izolálás után a fixált mitokondriumfrakción TASK-3-specifikus immunreakciót végeztünk (zöld szín, **A** és **D** ábrarész). A **C** és **F** ábrarészekben látható a két jelölés egymásra vetített képe. A **D-F** ábrarészekben egy egyedi mitokondriumról készített felvétel látható. **G-I:** A mitokondriális és a TASK-3-specifikus jelölés itt eltérően történt, mint az **A-F** ábrarészeknél. A fixálás után kettős immunjelölés végeztünk egy monoklonális, citokróm-c-ellenes antitesttel (piros szín, **H** ábrarész), valamint egy poliklonális, TASK-3-specifikus ellenanyaggal (zöld szín). Az **I** ábrarész a két jelölés egymásra vetített képét mutatja. A nyilak azokat a területeket jelölik, ahol a TASK-3 immunreakció szemcsés megjelenése különösen szembevető. Kalibráció: 10 μm (alsó és felső sor) és 1 μm (középső sor).

A mitokondriális co-lokalizáció bemutatása céljából a TASK-3 és MitoTracker kettős jelölés után a jelölődés mintázatát konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Ennek során 0,5 μm vastag optikai szeleteket készítettünk a sejtréteg teljes vastagságában (7. ábra). Az így készült felvételek alapján megállapítható, hogy a szoros co-lokalizáció nem a két jelölődési mintázat egymásra vetülésének következménye, hanem az valóban a TASK-3-csatornák mitokondriális membránban való elhelyezkedését tükrözi.

Eredményeink megerősítése céljából számos kontroll kísérletet is terveztünk annak bizonyítására, hogy az immunreakció meglepő mintázata nem valamilyen kísérletes műtermék eredménye volt. Bár a TASK-3 ellenanyag specificitását korábban már körültekintő vizsgálatokkal igazoltuk (Pocsai és munkatársai, 2006), a melanoma sejtek TASK-3-expressziójának kimutatását mRNS-szinten is elvégeztük. Ennek során a WM35 melanoma sejtvonalból mRNS-t izoláltunk, és a szekvenciájának meghatározása céljából PCR-reakcióval előállítottuk a TASK-3 cDNS-ét. A kísérletet ezen kívül két további melanoma sejtvonalon (HT199, HT168-M1) is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy a melanoma sejtvonalakból származó TASK-3-specifikus mRNS szekvenciája teljes mértékben megegyezett a génbankban meghatározott humán TASK-3-szekvenciával (génbank kód: BC075080; Strausberg és munkatársai, 2002). Ez a kísérletünk nemcsak azt a megfigyelésünket erősítette meg, hogy a melanoma sejtek TASK-3-fehérjét expresszálják, hanem azt is igazolta, hogy a csatornafehérje génje nem hordoz mutációt.



9. ábra: C2C12 sejteken végzett transzfekciós kontroll kísérlet

A: A TASK-3-fehérjét expresszáló plazmida transzfektált C2C12 sejteken végzett TASK-3-specifikus immunreakció. A C2C12 sejtek önmaguktól nem expresszálják a TASK-3-csatornát, a transzfekció hatására azonban a sejtek egy részében megjelent a TASK-3-specifikus immunreakció. **B:** MitoTracker jelölés azonos látótérben. A mitokondriális festék a látótérben látható összes sejtet azonos intenzitással jelölte. A nyilak a két sikeresen transzfektálódott, TASK-3 pozitív sejtet mutatják. **C:** Az **A** és a **B** felvétel egymásra vetített képe. A felvételek alapján megállapítható, hogy a TASK-3-specifikus ellenanyag nem jelöli aspecifikus módon a mitokondriális fehérjéket. Kalibráció: 30 μ m

A génexpresszió mRNS-szintű kimutatása fontos eredmény volt a TASK-3-expresszió egyértelmű igazolása szempontjából, viszont további kontroll kísérletek váltak szükségessé annak bizonyítására, hogy az immuncitokémiai kísérleteinkben alkalmazott ellenanyag nem kötődött aspecifikus módon valamely mitokondriális proteinhez. Ennek érdekében a TASK-3-csatornát nem expresszáló C2C12 sejtvonalon tranziens transzfekciót végeztünk a humán TASK-3-csatornát kódoló pcDNA3 hTASK3/7 expressziós vektorral; majd a

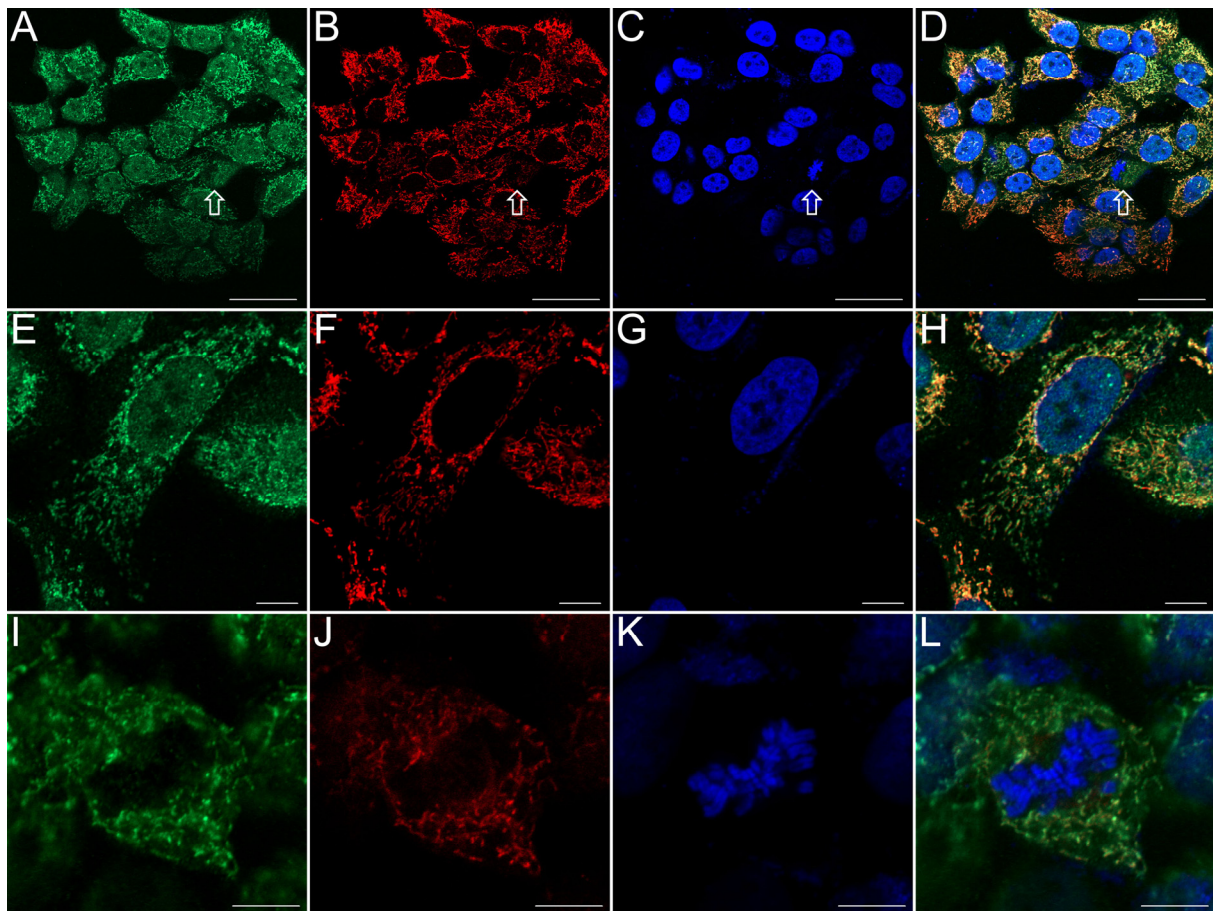
transzfektált tenyészetben elvégeztük a mitokondriumok és a TASK-3-csatornák együttes jelölését (9. ábra). Ezen kísérletekben a transzfektációs hatásfoknak megfelelően csak a sejtek egy (viszonylag kis) része mutatott TASK-3 immunpozitivitást (9A ábra), míg a mitokondriumok jelölődése valamennyi sejtben egyértelműen megfigyelhető volt (9B ábra). A kísérlet eredménye alapján megállapíthattuk, hogy az alkalmazott antitest nem okozta a mitokondriumok aspecifikus jelölődését. A kísérletek ezen fázisában nem pusztán a TASK-3-csatornák mitokondriális expresszióját igazoltuk, de magyarázatot kaptunk azon korábbi megfigyelésünkre, mely szerint az immunreakció a sejtmag körül, többmagvú sejtek esetén a sejtmagok között, továbbá a növekvő nyúlványokban különösen intenzív volt, hiszen ezeken a területeken a mitokondriumok mindig is nagyobb számban és sűrűségben vannak jelen.

4.2. A humán keratinocyták TASK-3 immunpozitivitása tenyészetben és beágyazott szövettani metszetekben

Az eddig bemutatott eredményeink alapján felmerült a kérdés, hogy a mitokondriális TASK-3-expresszió vajon csak a tumorsejtek sajátja, vagy egyéb, egészségesnek tekinthető (nem malignusan transzformált) sejttypusban is megfigyelhető ez a jelenség. Mivel a számos sejttypusra kiterjedő előkísérletes adataink szerint a HaCaT humán keratinocytá sejt vonal erősen TASK-3 immunpozitív, a malignus elváltozást nem mutató sejtek modelljeként ezt a sejt vonalat használtuk. Amint a 10. ábrán látható, a tenyészetben fenntartott HaCaT keratinocytákra intenzív TASK-3 immunpozitivitás volt jellemző. Az immunfestés és a mitokondriális jelölődés mintázatának összevetése arra engedett következtetni, hogy (a melanoma sejtekhez hasonlóan) a TASK-3-csatornák a HaCaT sejtekben is expresszálódnak a mitokondriumokban. A jelölődési mintázat átfedése az osztódó sejtekben különösen szembetűnő volt (10-11. ábra, nyíllal jelölt sejtek).

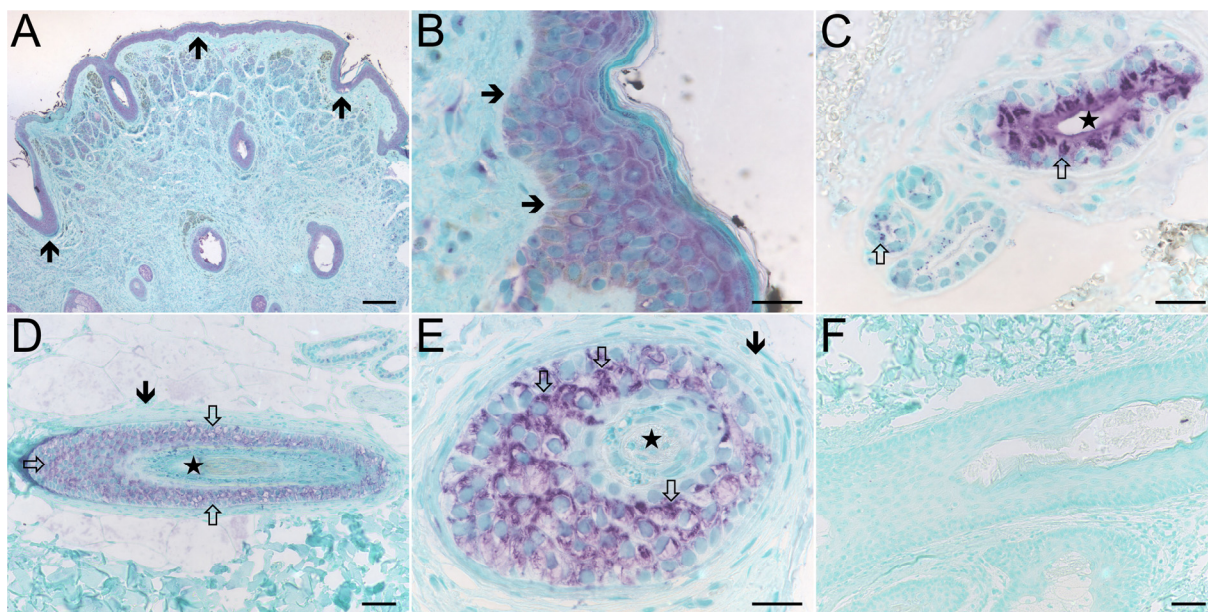
Mivel egy fehérje expressziós mintázata egy tenyészetben fenntartott, immortalizált sejt vonalban nem feltétlenül egyezik meg az eredeti sejtre (jelen esetben a keratinocytákra) jellemző, *in vivo* mintázattal, a TASK-3-expresszió megoszlását egészséges bőrből készült, beágyazott szövettani metszeteken is vizsgáltuk. A 11. ábrán látható, hogy az egészséges bőr számos sejttypusa egyértelműen és intenzíven TASK-3 pozitív volt. A 11A és 11B ábrarészekben az is megfigyelhető, hogy míg a keratinocytákra intenzív TASK-3 jelölődés volt jellemző, a környező kötőszövetben nem jelent meg a TASK-3 immunreakció. A laphámsejtes réteg keratinocytái mellett a szekretoros sejtek (11C ábra) és a szőrtüszők keratinocytái (11D ábra) is TASK-3 pozitívnak bizonyultak. A festődés mintázata hasonló

volt a tenyésztett sejtekben megfigyelték. A TASK-3 immunpozitivitás megoszlása a citoplazmában gyakran kimondottan szemcsés mintázatot mutatott, ami a sejtmag körül volt a legerősebb – a jellegzetes jelölődési mintázat alapján ezen sejtípus esetén is megalapozottnak tűnt a csatornafehérje mitokondriális expressziójának feltételezése. Immunhisztokémiai kísérleteink eredményei különböző, eltérő epitópot felismerő primer antitestekkel is jól reprodukálhatónak bizonyultak. A negatív kontroll kísérletekben (monoklonális primer antitest esetén a primer antitest kihagyása, poliklonális ellenanyagok esetén preadszorpciós kontroll) sohasem tapasztaltuk a fent említett struktúrák érdemi jelölődését (11F ábra).



10. ábra: Tenyésztetben fenntartott HaCaT keratinocyták TASK-3-expressziója

Az ábrán sejtenyészetben fenntartott HaCaT sejteken végzett TASK-3-specifikus immunreakció (A, E, I), MitoTracker jelölés (B, F, J), a DAPI-val végzett sejtmagjelölés (C, G, K), valamint ezek egymásra vetített képe (D, H, L) látható. A-D: A sejtenyészetről készített, kis nagyítású felvétel. A nyíl egy osztódó HaCaT sejtet jelöl. E-H: Nagy nagyítású felvétel egyetlen HaCaT sejtről. I-L: Egy osztódó HaCaT sejtet ábrázoló, nagy nagyítású felvétel. Kalibráció: 50 μm (A-D) és 10 μm (E-L).



11. ábra: Humán bőrmintán végzett TASK-3-specifikus immunhisztokémiai reakció

Az ábrán lila szín (VIP) jelzi a TASK-3 immunreakciót. **A:** Egy jóindulatú naevusról készített, kis nagyítású felvétel. A nyilak az erősen pozitív epidermist mutatják. **B:** Az epidermis nagy nagyítású felvétele. A nyilak a stratum basale erősen pozitív sejteit jelölik. **C:** Egy verejtékmirigy erősen TASK-3 pozitív szekretoros sejtjei. A csillag a mirigy lumenjét jelöli. Az üres nyíl mutatja a TASK-3 immunreakció intenzív, gyakran szemcsés megjelenését. **D:** Egy szőrtüsző hosszszelvényi képe. A hajgyökeret csillag jelöli. Szembetűnő a keratinocyták erős immunpozitivitása (üres nyilak), ugyanakkor a kötőszövet egyáltalán nem jelölődött (tele nyíl). **E:** Egy szőrtüsző keresztmetszetről készített nagy nagyítású felvétel. A TASK-3 negatív hajgyökeret csillag, a kötőszövetet tele nyíl jelöli. Az üres nyilak a keratinocytákban megfigyelhető, erős, gyakran szemcsés megjelenésű TASK-3-specifikus reakciót mutatják. Az immunpozitív granulomok gyakran a sejtmag körül vagy annak közelében helyezkedtek el. **F:** Az elsődleges ellenanyag elhagyásával készített negatív kontroll kísérlet. Kalibráció: 250 μm (A), 50 μm (D, F) és 25 μm (B, C, E).

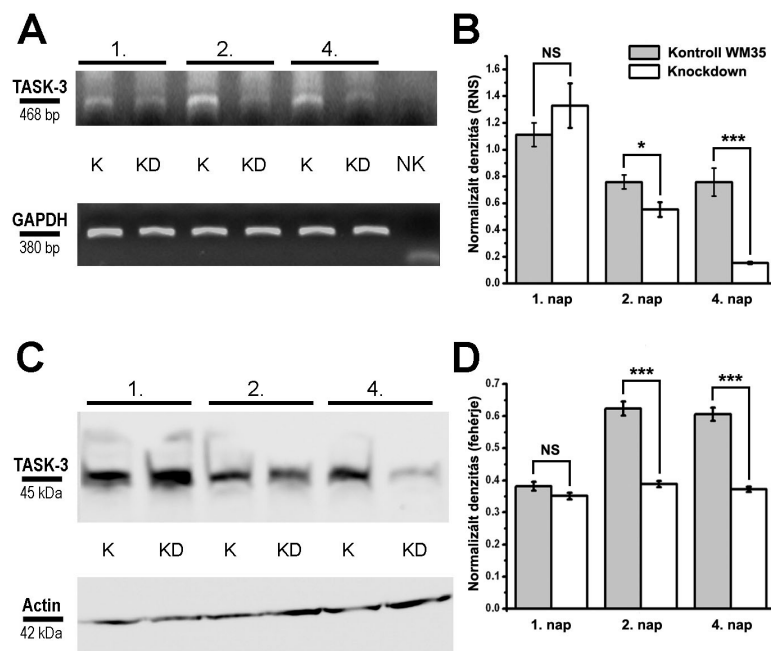
4.3 RNS-interferencia alkalmazása

Bár az immuncitokémiai és Western-blot kísérleteink segítségével meggyőzően demonstráltuk, hogy a TASK-3-csatorna jelen van a mitokondriális membránban, ezen kísérletek nem voltak alkalmasak annak igazolására, hogy a csatornafehérje jelenléte funkcionálisan is jelentős. Ennek vizsgálata céljából RNS-interferenciát alkalmaztunk, és azt figyeltük, hogy a TASK-3 géncsendesítés milyen változásokat idéz elő a tenyésztett fenntartott melanoma sejtek megjelenésében és viselkedésében. Mivel a kísérleti eredmények értékelése szempontjából kulcsfontosságú volt, hogy az alkalmazott shRNS hatékony és specifikus legyen, többféle módszert is alkalmaztunk a csökkent TASK-3-expresszió kimutatására.

Az shRNS-kazettával végzett transzfekció hatására mind a TASK-3-specifikus mRNS (12A-B ábra), mind a csatornafehérje expressziós szintje (12C-D ábra) kimutathatóan csökkent. Vizsgáltuk a hatás időbeli lefolyását is, és megállapítottuk, hogy a transzfekció utáni második napon mind az mRNS-, mind a fehérjeszintű expresszió mértékének

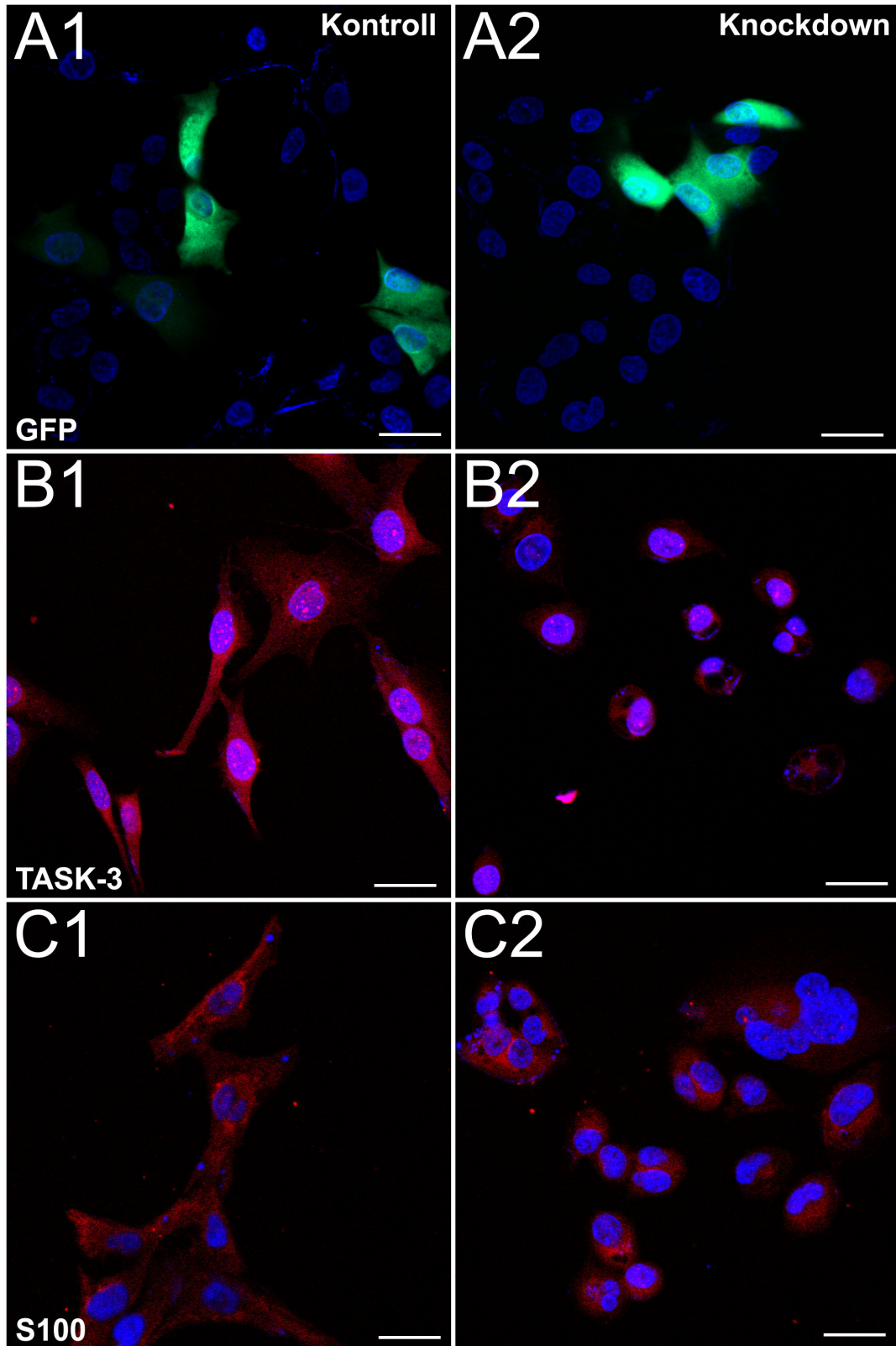
csökkenése szignifikáns volt. A negyedik napon a hatás még mindig látható és szignifikáns volt, azonban innentől kezdve a nem transzfektálódott sejtek rendszerint túlnőtték azokat, amelyekben a TASK-3-szintézis gátolva volt, így a negyedik nap után további méréseket már nem végeztünk.

Az shRNS-kazettát expresszáló vektorral végzett transzfekció sikerességét és hatékonyságát immuncitokémiai kísérletekkel is vizsgáltuk. A 13. ábrán a zöld fluoreszcens szignál (a vektor által expresszált GFP) mutatja a transzfekció sikerességét a scrambled RNS (13A1 ábra) és a TASK-3-specifikus shRNS (13A2 ábra) esetén egyaránt. Az immunreakciók felvételein látható, hogy a TASK-3 géncsökkentett melanoma sejtekben (13B2 ábra) a TASK-3-specifikus immunreakció sokkal kevésbé intenzív, mint a scrambled RNS-t expresszáló vektorral transzfektált tenyészeteken (13B1 ábra). A TASK-3-specifikus immunfestés mellett S100- (egy, a melanoma sejtekben expresszálódó kalciumkötő fehérje) specifikus immunreakciót is végeztünk, amelynek intenzitása és megoszlása nem mutatott jelentős eltérést a kétféle tenyészetben (13C1-2 ábra).



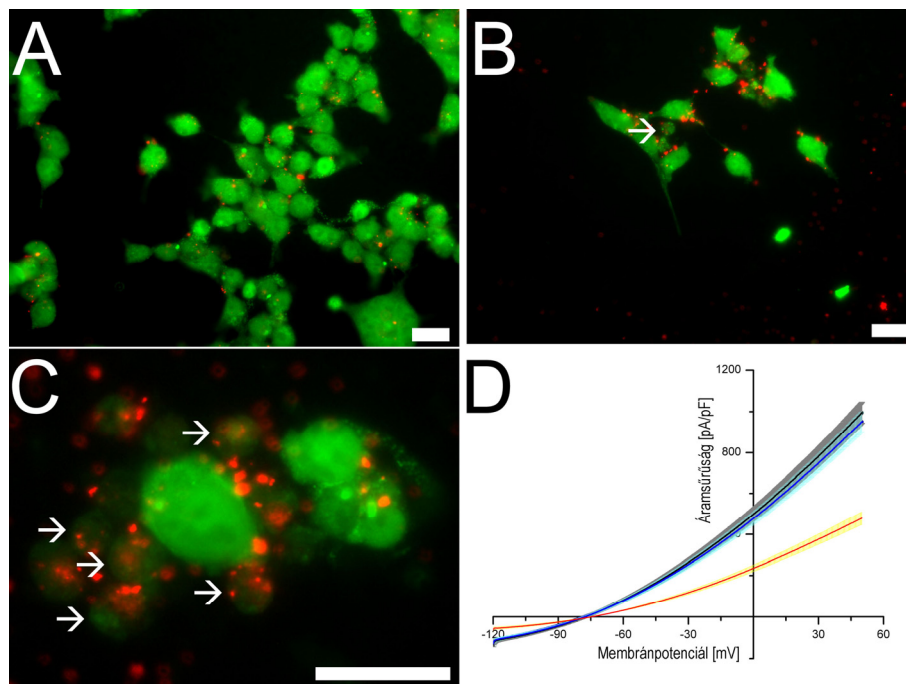
12. ábra: Az shRNS hatása a TASK-3 mRNS- és fehérjeszintű expressziójára

A: Egy reprezentatív RT-PCR kísérlet eredménye, ami a TASK-3 géncsökkentett (knockdown, KD) és kontroll (K) sejtekből a transzfekció utáni 1., 2. és 4. napon izolált mRNS mintákban a TASK-3- és GAPDH-specifikus mRNS mennyiségét mutatja. (NK: non-templát kontroll.) **B:** A TASK-3-specifikus mRNS GAPDH-ra normált expressziós szintjének változását bemutató denzitometriás eredmények (átlag \pm SEM; $n = 3$). A 2. és 4. napon a különbség statisztikailag szignifikáns volt; $p < 0,05$ (*), illetve $p < 0,001$ (***). NS: nem szignifikáns. **C:** Egy reprezentatív Western-blot kísérlet eredménye. A TASK-3-fehérje és az aktin kimutatását a géncsökkentett (KD) és a kontroll (K) sejtekből a transzfekció utáni 1., 2. és 4. napon készített fehérjemintákon végeztük el. **D:** A TASK-3-fehérje aktinra normált expressziós szintjét bemutató denzitometriás eredmények (átlag \pm SEM; $n = 3$). A különbség a 2. és 4. napon statisztikailag szignifikáns volt; $p < 0,001$ (***). NS: nem szignifikáns.



13. ábra: TASK-3- és S100-specifikus immunreakció kontroll és TASK-3 géncsökkentett melanoma sejteken

A: A zöld fluoreszcens fehérje (GFP) jelenléte jelzi a transzfekció sikerességét a kontroll (scrambled RNS kazettával transzfektált) (A1) és a TASK-3 géncsökkentett (A2) melanoma sejtekben egyaránt. **B:** TASK-3-specifikus immunreakció a vizsgált sejtenyészeten. **C:** S100-specifikus immunreakció a vizsgált sejtenyészeten. A B és C ábrarészekben a piros szín a TASK-3- és S100-specifikus immunreakció megoszlását mutatja, a kék szín pedig a sejtmagokat jelöli. Kalibráció: 30 µm.



14. ábra: A TASK-3-specifikus és a scrambled shRNS hatása TASK-3-csatornát expresszáló HEK sejtekre

A: A scrambled shRNS kazettával kezelt HEK sejteken végzett TASK-3-specifikus immunreakció eredménye (3 nappal a transzfekció után). Látható, hogy az immunreakció erősen pozitív, és a scrambled shRNS kazetták jelenléte (piros szemcsék) nem okozott változást sem a sejtek számában, sem azok megjelenésében. **B, C:** A specifikus shRNS kazetta hatása. Piros szemcsék mutatják a kazetta jelenlétét a sejtekben. Megfigyelhető a sejtszám nagymértékű csökkenése (**B**), valamint a sejtek egy részére jellemző erős morfológiai változás (**B** és **C**, nyilakkal jelölt sejtek). Kalibráció (**A-C**): 25 μm . **D:** A TASK-3-specifikus shRNS kazetta alkalmazása erősen csökkentette a HEK sejteken mért TASK-3-áram intenzitását (tömör vonal: átlagértékek, satírozott sáv: SEM). A fekete vonal a kontroll ($n = 13$), a kék vonal a scrambled ($n = 4$), a piros vonal a specifikus shRNS kazettával kezelt sejteken ($n = 4$) mért értékeket mutatja.

Az shRNS-kazetta specificitását és hatékonyságát a TASK-3-csatornafehérje génjével stabilan transzfektált, így TASK-3-csatornát expresszáló HEK293 sejteken is teszteltük. Ez a sejtvonal azért volt különösen hasznos számunkra, mert képalkotó módszerekkel (immuncitokémia) és funkcionális mérésekkel (a sejt felszíni membránon keresztül folyó TASK-3-áram mérése) egyaránt vizsgálhattuk rajta a TASK-3-csatornák jelenlétét. A scrambled és az shRNS kazettával transzfektált tenyészeteken 3 nappal a transzfekciót követően végeztünk TASK-3 immunreakciót. A scrambled shRNS-sel kezelt tenyészetéről készült felvételen (14A ábra) látható, hogy a sejtek erősen TASK-3 pozitívak (zöld szín) voltak. Az ábrán a piros szín a rodaminnal jelölt kazetták jelenlétét mutatja a sejtekben. A scrambled RNS-sel kezelt sejtek alakja és mérete nem tért el a kizárólag transzfekciós reagenssel kezelt sejtektől. A hatékony shRNS-kazettával kezelt tenyészetben (14B ábra) ezzel szemben a sejtek jelentős hányadában erősen csökkent a TASK-3 immunpozitivitás, valamint a sejtek mérete is kisebb lett. A sejtméret csökkenését tükrözte a teljes sejt kapacitás változása, amelynek értéke a kontroll sejteknél $14,6 \pm 0,6 \text{ pF}$ ($n = 13$), a scrambled

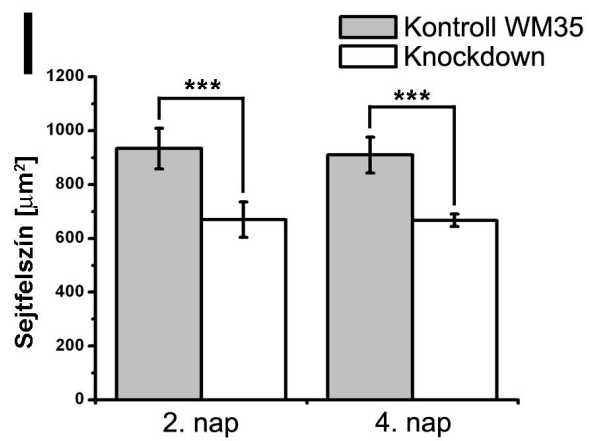
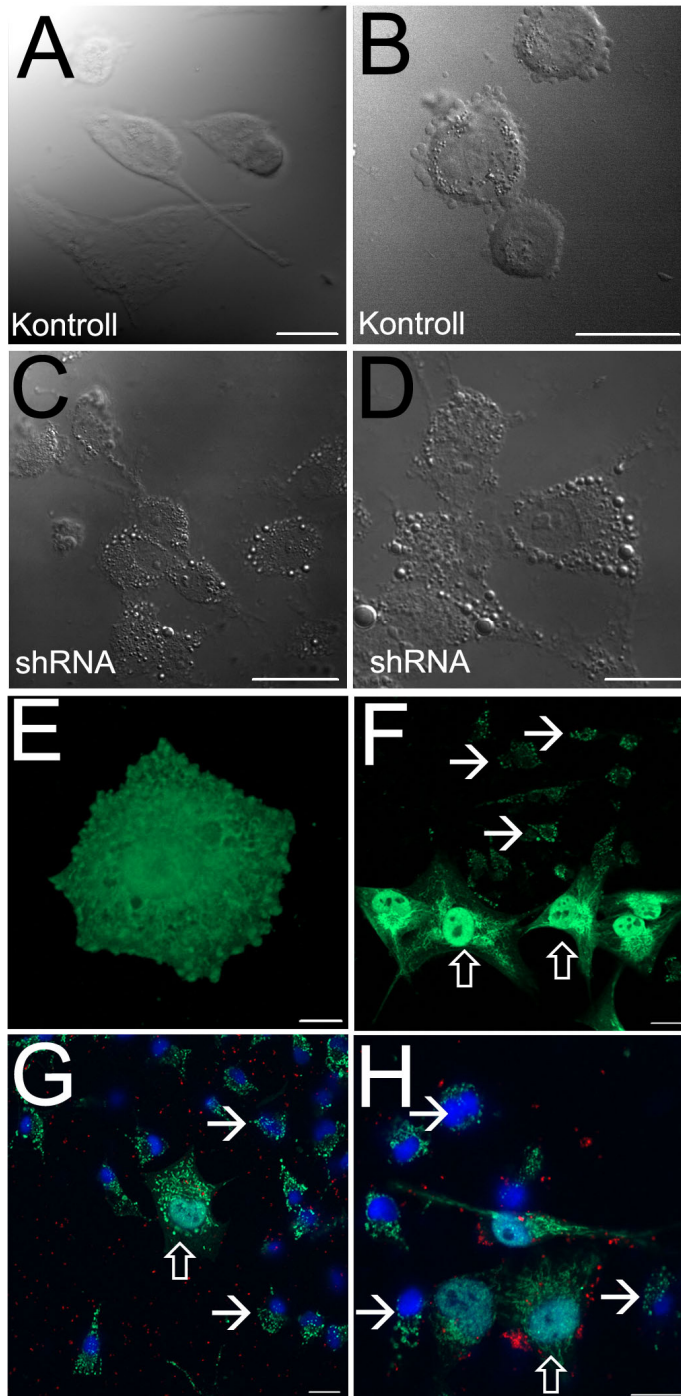
RNS-sel kezelt sejteknél $15,3 \pm 0,9$ pF ($n = 4$), míg az shRNS-sel kezelt sejteknél $8,3 \pm 0,9$ pF ($n = 4$) volt. A sejt méret és a TASK-3 immunreakció csökkenése mellett az shRNS-sel transzfektált sejtekben a sejtfelszíni TASK-3-áram csökkenése is kimutatható volt (14D ábra).

A TASK-3-expresszió mRNS- és fehérjeszinten kimutatható időfüggő csökkenése, a TASK-3-specifikus immunreakció csökkent intenzitása, valamint a TASK-3-csatornát expresszáló HEK sejteken végzett kísérletek eredményei egyértelműen alátámasztották, hogy a munkánk során alkalmazott shRNS szekvencia valóban hatékonyan gátolta a TASK-3-csatornafehérje szintézisét.

4.4. A TASK-3-expresszió gátlásának hatására megváltozik a tenyésztett melanoma sejtek mérete és alakja

Az shRNS-kazetta alkalmazásának hatására a melanoma sejteken jellegzetes morfológiai változásokat figyelhettünk meg. Ennek vizsgálata céljából a kontroll és a TASK-3-specifikus shRNS-sel transzfektált melanoma sejtekről a transzfekciót követő 2. napon differenciál-interferencia kontraszt (DIC) felvételeket készítettünk (15A-D ábra). A sejtek morfológiájában bekövetkező legszembevetőbb változás a kezelt sejtek citoplazmájában megjelenő durva granuláció volt.

Az shRNS-kazettával transzfektált melanoma sejttenyészetben végzett TASK-3-specifikus immunfestésről készült felvételek (15E-H ábra) szintén érdekes információt szolgáltatottak a bekövetkezett morfológiai változásokról. Megállapítottuk, hogy a sikeresen transzfektált sejtek a kontrollhoz képest kisebbek voltak, nyúlványaikat elvesztették, és TASK-3 immunjelölődésük lényegesen kevésbé intenzív volt, mint a szomszédos, ép sejteké. A sejt méretben bekövetkezett változás kvantitatív értékelése céljából meghatároztuk, majd összehasonlítottuk a transzfektálódott és a megkímélt sejtek felszínének méretét. A 15I ábrán látható grafikon mutatja, hogy a transzfektált sejtek mérete a kontrollhoz képest egyértelműen kisebb volt. A DIC felvételekhez hasonlóan az immunreakcióról készült fluoreszcens képen is látható, hogy a citoplazmában erős granuláció jelent meg. Ezek a granulumok az esetek egy részében gyenge, de egyértelmű TASK-3 jelölődést mutattak. Ezen „szemcsék” megoszlása, mérete és alakja alapján valószínűnek tartjuk, hogy azok duzzadt mitokondriumoknak felelhetnek meg. Az shRNS-sel transzfektált sejtek magjának TASK-3 immunpozitivitása jelentős mértékben csökkent, vagy megszűnt; továbbá az shRNS-sel kezelt, majd DAPI-val festett sejt kultúrákban a TASK-3 negatív sejt magok a megkímélt sejteknél jóval kondenzáltabb megjelenést mutattak (15H ábra). A fenti morfológiai



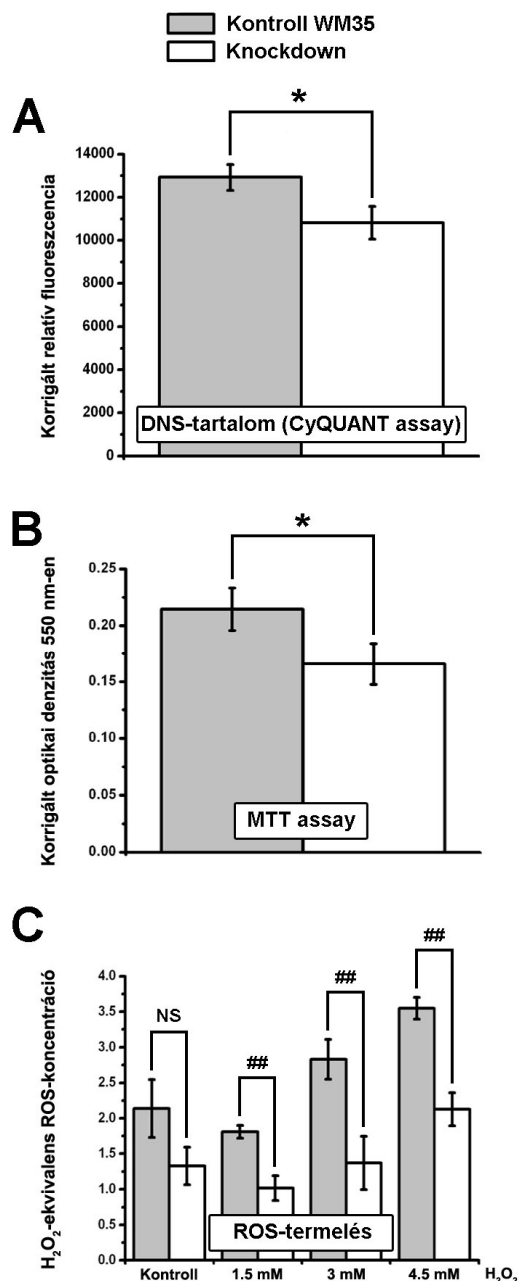
15. ábra: A TASK-3 géncsendesítés hatására bekövetkező számbeli és morfológiai változások melanoma sejtenyészetben

A, B: Kontroll melanoma sejtekről készített differenciál-interferencia kontraszt (DIC) felvétel. **C, D:** A hatékony shRNS kazettával transzfektált melanoma sejtekről készített DIC felvétel. **E:** Gyenge TASK-3 pozitivitást mutató, hólyagos citoplazmájú, TASK-3 géncsendesített melanoma sejt. A kép 20, egyenként 0,8 µm vastag rétegfelvétel egymásra vetítésével készült. A jobb láthatóság érdekében a felvételen a fényerősséget utólag megnöveltük **F, G, H:** A sikeresen transzfektálódott (üres nyíl) és a megkímélt sejtek (egyszerű nyíl) morfológiai összehasonlítása TASK-3 immunreakció után. A **G** és **H** ábrarészen a piros szemcsék az shRNS kazetták jelenlétét jelzik. Kalibráció: 30 µm (**A-D**), 20 µm (**F-H**) és 10 µm (**E**). **I:** A sejt méret változása a transzfekció hatására. A fehér oszlopok a transzfektált, a szürke oszlopok a kontroll sejtek sejt felszínének nagyságát mutatják (átlag ± SEM). A transzfekció utáni 2. napon 11, a 4. napon 18 transzfektált sejt és azonos számú megkímélt sejt sejt felszínét határoztuk meg. A különbség mindkét napon statisztikailag szignifikáns volt; $p < 0,005$ (***) a 2. napon, illetve $p < 0,001$ (***) a 4. napon.

elváltozást mutató sejtek aránya a scrambled RNS-sel kezelt tenyészetben $5,6 \pm 2,2\%$, míg a hatékony, TASK-3-specifikus shRNS-sel kezelt kultúrában $64,3 \pm 21,6\%$ volt. Az eredmények öt független kísérletről származnak, 24 órával a transzfekció után.

4.5. A TASK-3-expresszió gátlása a DNS-tartalom és a mitokondriális funkció csökkenését eredményezte

A TASK-3-csatorna bioszintézisének gátlása nemcsak a sejtek méretére és alakjára volt hatással, hanem egyéb változásokat is okozott, mint például a tenyészet DNS-tartalmának csökkenése (16A ábra), és a csökkent mitokondriális aktivitás (16C ábra). A CyQUANT assay segítségével kimutatott csökkent DNS-tartalom azt mutatja, hogy a transzfektált tenyészetekben a sejtsztódás üteme csökkent a kontroll tenyészetekhez képest. Az MTT-assay eredményének háttérében a transzfektált tenyészetekben bekövetkező sejtszámcsökkenés mellett a sejtek mitokondriális aktivitásának csökkenése is állhat. A TASK-3-csatornák mitokondriális elhelyezkedése, valamint a transzfekció hatására bekövetkező morfológiai változások egyaránt arra utaltak, hogy a TASK-3 géncsendesítés a mitokondriális funkció csökkenését okozhatta, ezért a mitokondriális funkció kvantitatív jellemzésének céljából elvégeztük a nyugalmi és a ROS-indukált ROS-termelés meghatározását egyaránt (16C ábra). Habár a nyugalmi ROS-termelés a kontroll és a transzfektált tenyészetekben nem tért el szignifikáns mértékben, az extracelluláris H_2O_2 adagolásával indukált ROS-termelés a TASK-3 géncsendesített tenyészetekben jelentősen csökkent a kontrollhoz képest. A különbség mindhárom alkalmazott H_2O_2 -koncentráció (1,5, 3 és 4,5 mmol/l) esetén statisztikailag szignifikáns volt. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy a TASK-3-csatornák hiánya gátolja a mitokondriális funkciót, így az érintett sejtek nem képesek a metabolikus hatásokra megfelelő módon reagálni.



16. ábra: Funkcionális változások a TASK-3 géncsendesített melanoma sejtekben

A: A kontroll (szürke oszlop) és a TASK-3 géncsendesített (fehér oszlop) melanoma sejtekben mért, DNS-tartalommal arányos fluoreszcenciaintenzitás 3 nappal a transzfekció után. Az ábra 8 különböző transzfektált tenyészetben, és a párhuzamos kontroll tenyészeteken mért eredményeket mutatja be (átlag ± SEM). A különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$). **B:** A kontroll és géncsendesített melanoma sejtenyészeteken végzett MTT-assay eredménye (550 nm-en mért, háttérre korrigált optikai denzitás). Az ábra hat különböző transzfektált tenyészetben, és a párhuzamos kontroll tenyészeteken végzett mérések eredményét mutatja be (átlag ± SEM). A különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$). **C:** ROS-indukált ROS-termelés kontroll és TASK-3 géncsendesített melanoma tenyészeteken. Az oszlopok a ROS-koncentráció H₂O₂-ekvivalens értékét mutatják nyugalomban („Kontroll”), illetve 1,5-4,5 mmol/l extracelluláris H₂O₂ jelenlétében kontroll, és TASK-3 géncsendesített tenyészetekben. A mért értékek közötti különbség nyugalomban nem volt statisztikailag szignifikáns (kontroll: $2,1 \pm 0,4$; knockdown: $1,3 \pm 0,3$ mmol/l). Az összes többi esetben a géncsendesített tenyészetek ROS-termelése szignifikánsan alacsonyabb mértékű volt, mint a kontroll sejteké (3 mmol/l H₂O₂ jelenlétében például a kontroll tenyészetekben $2,8 \pm 0,3$ mmol/l, a géncsendesített tenyészetekben $1,4 \pm 0,4$ mmol/l volt). Az ábra négy független kísérlet eredményeit mutatja be. Ahol statisztikai szignifikanciát jelöltünk: $p < 0,01$. NS: nem szignifikáns.

5. MEGBESZÉLÉS

A TASK-3-csatornák aktivitásának és jelentőségének egyik legellentmondásosabb pontja, hogy miközben egyes körülmények között kifejezetten serkentik az apoptózist, más esetben jelenlétük és aktivitásuk anti-apoptotikus, és ezáltal tumorképződést serkentő. A TASK-3-csatornák expresszióját leírták egyebek között emlő-, colorectalis és gyomordaganatokban (Kim és munkatársai, 2004; Kovács és munkatársai, 2005), valamint a fehérje fokozott expressziójáról számoltak be egy tüdőcarcinomából származó sejtvonal (Ben-sejtvonal) esetében.

Munkacsoportunk egy korábbi közleményében már ismertettük azon eredményeinket, amelyek igazolják a tenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtek intenzív TASK-3-expresszióját (Pocsai és munkatársai, 2006). Ezen munka keretében szembesültünk első ízben a sejtenyészetben fenntartott melanoma sejtek meglepő TASK-3 expressziós mintázatával: a jelölődés különösen intracellulárisan volt erőteljes, jellegzetes, hálózatos mintázatot adott; ugyanakkor a sejtfelszíni membrán jelölődése nem volt szembetűnő. A jelen vizsgálatsorozat eredményeként kapott kísérletes adatok (többek között) erre az érdekes jelenségre is magyarázattal szolgálnak, amennyiben rámutatnak, hogy az intracelluláris TASK-3 jelölődés az ioncsatornák mitokondriális elhelyezkedésével magyarázható.

Fontos megemlíteni, hogy a TASK-3-csatornák intracelluláris elhelyezkedését egyes munkacsoportok már korábban is jelezték, *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt (Callahan és munkatársai, 2004; Czirják és Enyedi, 2002). A heterológ expressziós rendszerekben végzett kísérletek esetén ez a megfigyelés kevésbé meglepő, hiszen ebben az esetben a jelenség a csatornafehérje intenzív bioszintézisével, és annak sejten belüli felhalmozódásával is összefüggésben állhat. Mivel az alkalmazott ellenanyag az éppen szintézis, tárolás és transzport alatt álló alegységeket is felismeri, az intracelluláris immunjelölődés megjelenése könnyen értelmezhető.

Más a helyzet azonban a melanoma sejtek esetében. Bár itt sem volt kizárható, hogy az intracelluláris jelölődés a fehérje intenzív bioszintézisének következménye, a sejtfelszíni membránban tapasztalható jelölődés csaknem teljes hiánya alternatív magyarázatok alkalmazását is megkövetelte. Ismeretes, hogy a csatornafehérje sejtfelszíni membránba történő szállításában a 14-3-3 adapter fehérje játszik szerepet (Rajan és munkatársai, 2002). Ez az adapter protein a csatornafehérje C-terminális régiójához kötődik, és jelenléte elengedhetetlen a TASK-3-csatorna sejtfelszíni megjelenéséhez; ugyanakkor a 14-3-3 fehérje

TASK-3-csatorna transzportjában betöltött pontos szerepe továbbra sem ismert. Lehetséges, hogy ezen adapter fehérje jelenléte lehetővé teszi egy járulékos protein kötődését, amely elősegíti az elkészült dimer csatornáknak az endoplazmatikus retikulumból a sejtfelszíni membránba való szállítását. Egy másik elképzelés szerint az adapter protein egy retenciós kötőhely lefedése által megakadályozza egy további fehérje kapcsolódását, amely a csatorna visszatartásáért lenne felelős. *Xenopus* oocytákon végzett kísérletek alapján a 14-3-3 protein fokozott expressziója növelte a sejtmembránon folyó TASK-3-áram amplitúdóját; a csatornaféhrje C-terminális régiójának módosítása – tehát a 14-3-3 protein kötődésének megakadályozása – ezzel szemben szignifikáns mértékben csökkentette a sejtfelszíni TASK-3-áramot. Mind a TASK-1-, mind a TASK-3-csatornák esetében elegendő egyetlen aminosav deléciója a C-terminálisról ahhoz, hogy a 14-3-3 protein kötődése ne menjen végbe, és a csatornaféhrje sejtmembránban való megjelenése akadályozott legyen. Ennek ismeretében okkal feltételezhetjük, hogy a citoplazmatikus TASK-3-expresszió háttérében a csatornaféhrje C-terminális régióját érintő mutáció állhatott, ami megakadályozta a csatornaféhrje és az adapter fehérje interakcióját. Az ezen eshetőség megerősítésére vagy kizárására tervezett kísérletünk eredménye fényében ezt a lehetőséget azonban egyértelműen kizárhattuk, mivel a melanoma sejtekből izolált mRNS szekvenciájában mutáció nem volt megfigyelhető. Alternatív magyarázat lehet ugyanakkor, hogy a melanoma sejtekben maga az adapter protein hiányzik, vagy módosult.

A TASK-3-csatorna intracelluláris megjelenését a patkány központi idegrendszerében is kimutatták (Callahan és munkatársai, 2004; Rusznák és munkatársai, 2004). Itt a Golgi-apparátus, az endoplazmatikus retikulum és egyes intracelluláris vezikulumok TASK-3-expressziója volt a legkifejezettebb, viszont a mitokondriumok és a sejtmag jelölődése nem volt jellemző. Ezen eredmények alapján a melanoma sejtekben is felmerült az esetleges endoplazmatikus retikulumban történő expresszió, ám mivel a TASK-3/SERCA-pumpa kettős jelöléssel minimális co-lokalizáció volt kimutatható a melanoma sejtek esetében (nem bemutatott adatok), ezt a lehetőséget is elvetettük.

Mindezek tükrében okkal feltételezhetjük, hogy a TASK-3-csatornák intracelluláris jelenléte valamely más sejtorganellumhoz köthető. Ezzel a megállapítással teljes összhangban a mitokondiális markerrel való kettős jelöléssel egyértelmű, szoros co-lokalizációt mutattunk ki, ami a TASK-3-csatorna mitokondiális jelenlétét jelezte. Figyelembe véve a mitokondriumok igen bonyolult szerkezetét, joggal merül fel a kérdés, hogy vajon a mitokondriumokban megjelenő TASK-3-csatornáknak van-e funkcionális

jelentősége; ha igen, akkor vajon mi lehet az; továbbá, hogy pontosan hova is tehető a TASK-3-csatornák expressziója a mitokondriumokon belül.

Úgy gondoljuk, hogy a jelen munkában bemutatott eredményeink alapján megalapozottan feltételezhetjük, hogy a TASK-3-csatornák jelentős szereppel bírnak a mitokondriális funkció fenntartásában. A csatornafehérje szintézisének gátlása a sejt kultúrákban jellegzetes morfológiai változásokat okozott, valamint hatására csökkent a sejtek mérete, DNS-tartalma és metabolikus aktivitása is – azaz a (működőképes) csatorna létfontosságú lehet az azt expresszáló melanoma sejtek életképességének és proliferációjának biztosításában.

Bár a jelen vizsgálatsorozat eredményei alapján sem a TASK-3-csatornák mitokondriumon belüli lokalizációja, sem azok pontos funkciója nem határozható meg, néhány lehetőség megemlíthető. Mindenekelőtt fölöttébb valószínű, hogy a csatorna vagy a külső, vagy a belső mitokondriális membránban helyezkedik el. Ismeretes, hogy egyéb K^+ -permeábilis csatornák találhatók a belső mitokondriális membránban: az ATP-szenzitív K^+ -permeábilis csatornák (mtKATP; Inoue és munkatársai, 1991; Paucek és munkatársai, 1992), például a mitokondriumok térfogatának szabályozásában játszanak szerepet (Garlid, 1996), de a mitokondriumok oxidatív funkciójához elengedhetetlen protongradiens és transzmembrán elektromos potenciál fenntartásában is jelentőségük van. Amennyiben a belső mitokondriális membránban helyezkednek el, hasonló funkciót tölthetnek be a TASK-3-csatornák is. Nem kizárható azonban az sem, hogy a TASK-3-csatornák a mitokondriumok külső membránjában expresszálódnak; ebben az esetben az ún. Bcl-csatornákkal analóg feladataik lehetnek. A funkcionális Bcl-csatornák kationpermeábilis pórusként működnek, aktivációjuk a mitokondriális membrán hiperpolarizációjához vezet, ami csökkenti a citokróm-c felszabadítását, és elősegíti a mitokondriális ozmotikus homeosztázis fenntartását (Schendel és munkatársai, 1997).

A pontos mitokondriális funkcionálisan túlmenően igen érdekes jelenség a TASK-3-csatornák azon természete, hogy azok bizonyos körülmények között anti-apoptotikus, erősen tumorképződést serkentő funkciót mutatnak; ugyanakkor más esetekben (például a cerebellaris szemcsesejtekben), a jelenlétük kifejezetten pro-apoptotikus, és elengedhetetlen a migráló szemcsesejtek, egyébként fiziológiásan bekövetkező, apoptózisához. A csatornák ezen ellentmondásos viselkedésének pontos oka nem ismert, viszont számos feltételezés született a jelenség magyarázatára (Patel és Lazdunski, 2004). Felmerült annak lehetősége, hogy a daganatos sejtekből esetleg hiányoznak az apoptotikus útvonal bizonyos kulcselemei. A jelen vizsgálatokban alkalmazott melanoma sejt vonalak esetében ez a lehetőség azonban

nem jön szóba, mivel bennük 2-metoxi-ösztadiol hatására apoptózis váltható ki, ami azt jelzi, hogy bár a spontán apoptózis aránya ezen sejttípusban kimondottan alacsony, az apoptotikus útvonal elemei egyértelműen jelen vannak.

Az ellentmondásos viselkedést a sejtfelszíni membránban mérhető TASK-3-áram amplitúdójával is összefüggésbe hozták, amely a cerebelláris sejtekben 1-2 nA nagyságú, míg a malignus Ben sejtvonalban mindössze kb. 100 pA, annak ellenére, hogy a Ben-sejtek fokozott TASK-3-expressziót mutatnak (Pei és munkatársai, 2003). Míg a kisagyi szemcsesejtekben a TASK-3-csatornák aktivációja K^+ -kiáramláshoz, és ennek következtében apoptotikus sejttérfogat-csökkenéshez, majd sejthalálhoz vezethet; addig a Ben-sejtekben elképzelhető, hogy a csatornafehérje intracellulárisan van jelen, és esetleg éppen a mitokondriális funkció támogatása révén járul hozzá a sejtek életben maradásához. Ez a hipotézis magyarázatul szolgálhat arra is, hogy a Ben-sejtekben a TASK-3-csatornák fokozott expressziója miért nem tükröződik a sejtfelszíni TASK-3-áram amplitúdójában.

Ha a fent említett lehetőségek bármelyike igaz, akkor az azt jelzi, hogy végső soron a TASK-3-csatornák lokalizációja határozza meg, hogy azok aktivációja sejthalált, vagy pedig a hypoxiával és szérumdeprivációval szembeni fokozott ellenállást közvetít. A sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TASK-3-csatornák aktivációja K^+ -kiáramlást okoz, ami apoptotikus sejttérfogat-csökkenéshez, majd sejthalálhoz vezet. Amennyiben viszont a TASK-3-csatornák a mitokondriumokban helyezkednek el – mint például a melanoma sejtekben –, aktivitásuk fokozhatja a mitokondriális funkciót, így jó hatással lehet az ATP-termelő folyamatokra. Ezt a feltételezést az a megfigyelés is alátámasztja, ami szerint a melanoma sejtenyészetekben a csatornafehérje szintézisének gátlása nagymértékben csökkentette az élő sejtek számát. Fontos megemlíteni azt is, hogy a mitokondriális funkció fenntartása (vagy fokozása) nem csak közvetlenül, az energiatermelő folyamatok fokozódása révén növelheti a sejtek túlélési esélyeit, hanem az a Na^+/K^+ -pumpa aktivitásának fenntartásához is hozzájárulhat, ami kompenzálhatja a sejtfelszíni membrán K^+ -csatornáin (TASK-, és egyéb K^+ -csatornák, pl. Kv1.5 és Kv2.1; Brevnova és munkatársai, 2004; Pál és munkatársai, 2003; Pál és munkatársai, 2006) keresztül történő K^+ -kiáramlást, védelmet nyújtva az apoptotikus sejttérfogat-csökkenéssel szemben.

Fontos hangsúlyozni, hogy a TASK-3 géncsendesített sejt kultúrákban jellegzetes morfológiai változásokat figyelhettünk meg. A sikeresen transzfektált melanoma sejtek kisebbek lettek, nyúlványaikat elvesztették, citoplazmájukban durva granuláció jelent meg, valamint a magállományuk is kondenzáltabb lett. Habár a jelen kísérletsorozat eredményeként kapott kísérletes adatok nem tárják fel a mitokondriális funkció csökkenése és

a sejtmorfológia megváltozása közötti pontos összefüggést, érdemes megemlíteni, hogy különféle neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór és amyotrophiás lateralis sclerosis) esetén a jellegzetes sejtmorfológiai elváltozásokat ugyancsak a mitokondriális funkció károsodásával hozzák összefüggésbe (Boillée és munkatársai, 2006; Horowitz és Greenamyre, 2010; Rodolfo és munkatársai, 2010).

Tekintettel a TASK-3-csatornák melanoma malignum sejtek túlélésének biztosításában betöltött szerepére, felmerül azok esetleges terápiás célpontként való alkalmazásának lehetősége. Ennek megfontolása során azonban figyelembe kell venni azt is, hogy a csatornafehérjét számos egészséges sejtípus is expresszálja, mint például a kisagyi Purkinje- és szemcsesejtek, a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek endokrin sejtjei, az egészséges melanocyták (Kovács és munkatársai, 2005; Pocsai és munkatársai, 2006; Rusznák és munkatársai, 2004), és a keratinocyták (Kang és munkatársai, 2007). A gastrointestinalis tractusban intenzív intracelluláris TASK-3-expresszió volt megfigyelhető az intestinalis epitheliumban és a neuronális elemekben, míg a kötőszöveti elemek és a simaizomsejtek TASK-3-negatívnak bizonyultak, így célsejt-specifikus alkalmazás nélkül nem tűnik járható útnak a rosszindulatúan elfajult sejtek TASK-3-csatornákon keresztül történő pusztítása.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a melanoma sejtek mitokondriumaiban funkcionális TASK-3-csatornák vannak jelen. Ez a megfigyelés nemcsak az intracelluláris TASK-3-expresszió hátterét tárja fel, hanem a TASK-3 csatornák aktivitása és a daganatos sejtek életképessége közötti összefüggés megértésében is jelentős lehet.

ÖSSZEFOGLALÁS

A TASK-3-csatornák számos sejt típusban jelen vannak, egészséges és daganatos elfajulást mutató sejtekben egyaránt. A csatornafehérje tumorképződést serkentő funkcióját már számos daganattípusban felvetették. Jelen munkánkban immunjelölési módszerekkel vizsgáltuk a TASK-3-csatornafehérje megoszlási mintázatát tenyésztetben fenntartott melanoma malignum sejtekben, valamint a daganatos elváltozást nem mutató HaCaT humán keratinocytá sejt vonalban. Az immuncitokémiai kísérletek elvégzése előtt a melanoma sejtek TASK-3-expresszióját mRNS-szinten is igazoltuk. A csatornafehérje sejten belüli megoszlása elsősorban intracelluláris mintázatot mutatott, míg a sejtfelszíni membrán jelölődése nem volt szembetűnő. Kettős jelölés alkalmazásával megállapítottuk, hogy a TASK-3-csatornák és a mitokondriumok jelölődési mintázata mindkét vizsgált sejt típusban nagymértékű átfedést mutat. Ezen eredményt megerősítették a humán bőrből készített szövettani metszeteken végzett immunhisztokémiai kísérleteink, ahol hasonló festődési mintázatot tapasztaltunk a melanocytákban és keratinocytákban egyaránt.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a TASK-3-csatornák a melanoma sejtek mitokondriális membránjában helyezkednek el, és szerepet játszanak a mitokondriális funkcióban. Egyes felvetések szerint a hypoxia iránti tolerancia fokozása révén hozzájárulnak a sejtek életképességének fenntartásához, támogatva a daganatos sejtek életképességét és a tumornövekedést, ennek pontos mechanizmusa azonban nem ismert.

A mitokondriumok által expresszált TASK-3-csatornának a sejtek életképességében betöltött szerepét munkánk során a csatornafehérje expressziójának csökkentése révén vizsgáltuk. A melanoma sejteken shRNS-kazetták alkalmazásával tranziens transzfekeciót végeztünk, és TASK-3-géncsendesített sejttenyészeteket hoztunk létre. A csökkent TASK-3-expresszió eredményeképpen a sejteken jellegzetes morfológiai változásokat figyelhattunk meg, csökkent a sejtek DNS-tartalma és metabolikus aktivitása, valamint a mitokondriális funkció is károsodást szenvedett. Ezen változások arra engednek következtetni, hogy a mitokondriumokban expresszált TASK-3-csatornák kulcsfontosságú szerepet játszanak a melanoma sejtek életképességének fenntartásában. További vizsgálatokat igényel annak tisztázása, hogy a csatornafunkció és a sejtek életképessége közötti összefüggés valamilyen módon kiaknázható-e a daganatellenes terápiában.

SUMMARY

TASK-3 channels are expressed in several cell types including both healthy and malignantly transformed cells. The role of channel function in tumourigenesis has been proposed in different human cancers. In this work the distribution pattern of TASK-3 channel protein was investigated in cultured melanoma malignum cells and in non-malignant HaCaT keratinocytes using immunochemical methods. Before these experiments, the TASK-3 expression of melanoma cells was confirmed on mRNA level as well. The subcellular localization of the channel protein was found to be mainly intracellular, while the labelling of cell surface membrane was not significant. Double-labelling experiments revealed that the distribution of TASK-3 channels shows strong co-localisation with mitochondria in both investigated cell types. These results were confirmed by immunohistochemical staining of wax-embedded human skin tissue sections, where the same labelling pattern could be observed in melanocytes and keratinocytes as well.

Our findings suggested that TASK-3 channels are present in the mitochondrial membrane of melanoma cells, where they might contribute to mitochondrial function. It has been proposed earlier that they might provide greater hypoxia tolerance for tumour cells, which might contribute to cell survival and tumour growth, but the exact mechanism by which these effects are exerted is still unknown.

We investigated the significance of mitochondrial TASK-3 channels in cell viability by interfering with the function of the channel protein. Melanoma cells were transiently transfected with shRNA cassettes, and TASK-3 knockdown cell cultures were generated. The reduced expression of TASK-3 resulted in characteristic changes of the cell morphology, reduction of DNA content, decreased metabolic activity and impaired mitochondrial function. These changes indicate that TASK-3 channels expressed in the mitochondrial membrane may have crucial roles in maintaining the viability of melanoma cells. However, further experiments are needed to clarify whether the inhibition of TASK-3 channel function could be exploited in anti-cancer therapy.

IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények jegyzéke

- Aller M.I., Veale E.L., Linden A.M., Sandu C., Schwaninger M., Evans L.J., Korpi E.R., Mathie A., Wisden W., Brickley S.G. (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 25:11455–11467.
- Ashmole I., Goodwin P.A., Stanfield P.R. (2001) TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflügers Arch.* 442: 828-833.
- Armstrong C.M. (2003) Voltage-gated K⁺ channels. *Sci. STKE.* 10
- Ball D.J., Luo Y., Kessel D., Griffith J., Brown S.B., Vernon D.I. (1998) The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. *J. Photochem. Photobiol. B.* 42: 415-26.
- Bednarczyk P., Kicinska A., Kominkova V., Ondrias K., Dolowy K., Szewczyk A. (2004) Quinine inhibits mitochondrial ATP-regulated potassium channel from bovine heart. *J. Membr. Biol.* 199: 63-72.
- Berg A.P., Talley E.M., Manger J.P., Bayliss D.A. (2004) Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J. Neurosci.* 24: 6693-6702.
- Boillée S., Vande Velde C., Cleveland D.W. (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 52: 661-667.
- Buckler K.J., Vaughan-Jones R.D. (1998) Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *J. Physiol.* 513: 819-833.
- Buckler K.J., Williams B.A., Honore E. (2000) An oxygen-, acid- and anesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* 525: 135-142.
- Callahan R., Labunsky D.A., Logvinova A., Abdallah M., Liu C., Cotton J.F., Yost C.S. (2004) Immunolocalization of TASK-3 (KCNK9) to a subset of cortical neurons in the rat CNS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 525-530.
- Catterall W.A. (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *TINS.* 16: 500-506.
- Chapman C.G., Meadows H.J., Godden R.J., Campbell D.A., Duckworth M., Kellsell R.E., Murdock P.R., Randall A.D., Rennie G.I., Gloger I.S. (2000) Cloning, localisation and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Mol. Brain. Res.* 82: 74-83.
- Chavez R.A., Gray A.T., Zhao B.B., Kindler C.H., Mazurek M.J., Mehta Y., Forsayeth J.R., Yost C.S. (1999) TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J. Biol. Chem.* 274: 7887-7892.
- Chemin J., Girard C., Duprat F., Lesage F., Romey G., Lazdunski M. (2003) Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* 22: 5403-5411.
- Chen Y., Zheng W., Li Y., Zhong J., Ji J., Shen P. (2008) Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. *Cancer Sci.* 99: 2019-2027.

- Czirják G., Enyedei P. (2003) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63: 646-652.
- Czirják G., Enyedi P. (2002) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 16: 621-629.
- Decher N., Maier M., Dittrich W., Gassenhuber J., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.* 492: 84-89.
- Doupnik C.A., Davidson N., Lester H.A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 268-277.
- Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471.
- Duprat F., Lesage F., Patel A.J., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (2000) The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K⁺ channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57: 906-912.
- Garlid K.D. (1996) Cation transport in mitochondria — the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta* 1275: 123-126.
- Girard C., Duprat F., Terrenoire C., Tinel N., Fosset M., Romey G., Lazdunski M., Lesage F. (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 249-256.
- Goldstein S.A., Bockenhauer D., O'Kelly I., Zilberberg N. (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 175-184.
- Han J., Gnatenco C., Sladek C.D., Kim D. (2003) Background and tandem-pore potassium channels in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 546: 625-639.
- Hartness M.E., Lewis A., Searle G.J., O'Kelly I., Peers C., Kemp P.J. (2001) Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O₂ sensing K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 276: 26499-26508.
- Herbert S.C., Desir G., Giebish G., Wang W. (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol. Rev.* 85: 319-371.
- Hopwood S.E., Trapp S. (2005) TASK-like K⁺ channels mediate effects of 5-HT and extracellular pH in rat dorsal vagal neurones in vitro. *J. Physiol.* 568: 145-154.
- Horowitz M.P., Greenamyre T.J. (2010) Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* 20: S551-S568.
- Inoue I., Hagase H., Kishi K., Higuti T. (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352: 244-247.
- Jan L.Y., Jan Y.N. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol.* 505: 267-282.
- Kang D., Han J., Talley E.M., Bayliss D.A., Kim D. (2003) Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 554: 64-77.

- Kang D., Kim S-H., Hwang E-M., Kwon O-S., Yang H-Y., Kim E-S., Choi T.H., Park J-Y., Hong S-G., Han J. (2007) Expression of thermosensitive two-pore domain K⁺ channels in human keratinocytes cell line HaCaT cells. *Exp. Derm.* 16: 1016-1022.
- Katz B. (1949) Les constans électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 2: 285-299.
- Ketchum K.A., Joiner W.J., Sellers A.J., Kaczmarek L.K., Goldstein S.A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel protein with two pore domains in tandem. *Nature.* 376: 690-695.
- Kim Y., Bang H., Kim D. (1999) TBAK-1 and TASK-1, two-pore K⁺ channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J. Physiol.* 277: H1669-H1678.
- Kim Y., Bang H., Kim D. (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* 275: 9340-9347.
- Kim D., Gnatenco C. (2001) TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 923-930.
- Kim Y., Bang H., Gnatenco C., Kim D. (2001) Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflugers Arch.* 442: 64-72.
- Kim C.J., Cho Y.G., Jeong S.W., Kim Y.S., Kim S.Y., Nam S.W., Lee S.H., Yoo N.J., Lee J.Y., Park W.S. (2004) Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *APMIS* 112: 588-594.
- Kindler C.H., Yost C.S., Gray A.T. (1999) Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiology* 90: 1092-1102.
- Kottke M., Adam V., Riesinger I., Bremm G., Bosch W., Brdiczka D., Sandri G., Panfili E. (1988) Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points of hexokinase and creatinine kinase location, and control Ca²⁺ transport. *Biochem. Biophys. Acta.* 935: 87-102.
- Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Szűcs G., Nemes Z., Rusznák Z. (2005) TASK-3 immunoreactivity is present but shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* 446: 402-410.
- Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N., Jan N.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* 362: 127-133.
- Lauritzen I., Zanzouri M., Honoré E., Duprat F., Ehrenguber M.U., Lazdunski M., Patel A. (2003) K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 32068-32076.
- Leonoudakis D., Gray A.T., Winegar B.D., Kindler C.H., Harada M., Taylor D.M., Chavez R.A., Forsayeth J.R., Yost C.S. (1998) An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J. Neurosci.* 18: 868-877.
- Lesage F., Guillemare E., Fink M., Duprat F., Lazdunski M., Romey G., Barhanin J (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EBO J.* 15: 1004-1011.
- Lesage F., Lazdunski M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279: F793-F801.
- Lesage F., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M. (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 275: 28398-28405

- Li M., Jan Y.N., Jan L.Y. (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*. 257: 1225-1230.
- Liu C., Cotten J.F., Schuyler J.A., Fahlman C.S., Au J.D., Bickler P.E., Yost C.S. (2005), Protective effects of TASK-3 (KCNK9) and related 2P channels during cellular stress. *Brain Res*. 1031: 164-173.
- Meadows H.J., Randall A.D. (2001) Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuro Pharmacol*. 40: 551-559.
- Medhurst A.D., Rennie G., Chapman C.G., Meadows H., Duckworth M.D., Kellsell R.E., Gloger I.I., Pangalos M.N., (2001) Distribution analysis of human two-pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 86: 101-114.
- Meuth S.G., Herrmann A.M., Ip C.W., Kanyshkova T., Bittner S., Weishaupt A., Budde T., Wiendl H. (2008) The two-pore domain potassium channel TASK3 functionally impacts glioma cell death. *J. Neurooncol*. 87: 263-70.
- Meuth S.G., Budde T., Kanyshkova T., Broicher T., Munsch T., Pape H-C. (2003) Contribution of TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons. *J. Neurosci*. 23: 6460-6469.
- Mu D., Chen L., Zhang X., See L., Koch C.M., Yen C., Tong J.J., Spiegel L., Nguyen C.Q., Servoss A., Peng Y., Pei L., Marks J.R., Lowe S., Hoey T., Jan L.Y., McCombie W.R., Wigler M.H., Powers S. (2003) Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*. 3: 297-302.
- Noodt B.B., Rodal G.H., Wainwright M., Peng Q., Horobin R., Nesland J.M., Berg K. (1998) Apoptosis induction by different pathways with methylene blue derivative and light from mitochondrial sites in V79 cells. *Int. J. Cancer*. 75: 941-948.
- Ohlendiek K., Riesinger I., Adam V., Krause J., Bridczka D. (1986) Enrichment and biochemical characterization of boundary membrane contact sites from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys. Acta*. 860: 672-689
- Patel A.J., Lazdunski M. (2004) The 2P-domain K⁺-channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflügers Arch* 448: 261-273
- Patel A.J., Honoré E. (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neurosci*. 24: 339-346
- Patel A.J., Honore E., Lesage F., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (1999) Inhalational anesthetic activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci*. 2: 422-426.
- Paucek P., Mironove G., Mahdi F., Beavis A.D., Woldegiorgis G., Garlid K.D. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem*. 267: 26062-26069.
- Pei L., Wiser O., Slavin A., Mu D., Powers S., Jan L.Y., Hoey T. (2003) Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A*. 100: 7803-7807.
- Pocsai K., Kosztko L., Bakondi G., Gönczi M., Fodor J., Dienes B., Szentesi P., Kovács I., Feniger-Barish R., Kopf E., Zharhary D., Szűcs G., Csernoch L., Rusznák Z. (2006) Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture. *Cell. Mol. Life Sci*. 63: 2364-2376.

- Rajan S., Wischmeyer E., Xin Liu G., Preisig-Müller R., Daut J., Karschin A., Derst C. (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* 275: 1650-1657.
- Rajan S., Preisig-Müller R., Wischmeyer E., Nehring R., Hanley P.J., Renigunta V., Musset B., Schlichthörl G., Derst C., Karschin A., Daut J. (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol.* 545: 13-26.
- Rencrona S., Mela L., Siesjö B.K. (1979) Recovery of brain mitochondrial function in rat after complete and incomplete ischaemia. *Stroke.* 10: 437-445.
- Reyes R., Duprat F., Lesage F., Fink M., Salinas M., Farman N., Lazdunski M. (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.* 273: 30863-30869.
- Robinson J.M., Deutch. (2005) Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron.* 45: 223-232.
- Rodolfo C., Ciccocanti F., Di Giacomo G., Piacentini M., Fimia G.M. (2010) Proteomic analysis of mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Proteomics.* 7: 519-542
- Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Pál B., Szűcs G. (2004) Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1532-1542.
- Sanders K.M., Koh S.D. (2006) Two-pore-domain potassium channels in smooth muscles: new components of myogenic regulation. *J. Physiol.* 570: 37-43.
- Sansom M.S., Shrivastava I.H., Bright J.N., Tate J., Capener C.E., Biggin P.C. (2002) Potassium channels: Structures, models, simulations. *Biochem. Biophys. Acta.* 1565: 294-307.
- Schendel S.L., Xie Z., Oblatt Montal M., Matsuyama S., Montal M., Reed J.C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 5113-5118.
- Talley E.M., Solórzano G., Lei Q., Kim D., Bayliss D.A. (2001) CNS Distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* 21: 7491-505.
- Talley E.M., Bayliss D.A. (2002) Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels. *J. Biol. Chem.* 277: 17733-17742.
- Tímár J., Raso E., Honn K.V., Hagmann W. (1999) 12-lipoxygenase expression in human melanoma cell lines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469: 617-622.
- Tóth I.B., Benkő S., Szöllösi A., Kovács L., Rajnavölgyi É., Bíró T. (2009) Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. *FEBS Lett.* 583: 1619-1624.
- Van Ginkel P.R., Darjatmoko S.R., Sareen D., Subramanian L., Bhattacharia S., Lindstrom M.J. (2008) Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 1299-1306.
- Wang C., Li B., Zhang H., Shi G., Li W., Jonas J.B. (2007) Effect of arsenic trioxide on uveal melanoma cell proliferation in vitro. *Ophthalmic Res.* 39: 302-307.
- Washburn C.P., Sirois J.E., Talley E.M., Guyenet P.G., Bayliss D.A. (2002) Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halotane-sensitive K⁺ conductance. *J. Neurosci.* 22: 1256-1265.

- Washburn C.P., Bayliss D.A., Guyenet P.G. (2003) Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 138: 19-35.
- Williams B.A., Buckler K.J. (2004) Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *Am. J. Physiol.* 286: L221-L230.
- Yamamoto Y., Kummer W., Atoji Y., Suzuki Y. (2002) TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body. *Brain Res.* 950: 304-307.
- Yellen G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419: 35-42.
- Yu W., Xu J., Li M. (1996) NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of Shaker-like potassium channels. *Neuron.* 16: 441-453.

Iktatószám: DEENKÉTK /196/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kosztka Livia

Neptun kód: EWICAZ

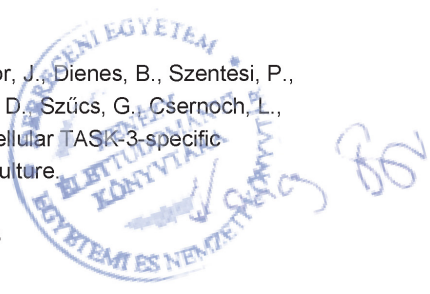
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Rusznák, Z., Bakondi, G., **Kosztka, L.**, Pocsai, K., Dienes, B., Fodor, J., Telek, A., Gönczi, M., Szűcs, G., Csernoch, L.: Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells.
Virchows Arch. 452 (4), 415-426, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-007-0545-x>
IF:2.082
2. **Kosztka, L.**, Rusznák, Z., Nagy, D., Nagy, Z., Fodor, J., Szűcs, G., Telek, A., Gönczi, M., Ruzsnavszky, O., Szentandrassy, N., Csernoch, L.: Inhibition of TASK-3 (KCNK9) channel biosynthesis changes cell morphology and decreases both DNA content and mitochondrial function of melanoma cells maintained in cell culture.
Melanoma Res. 21 (4), 308-322, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283462713>
IF:2.254 (2010)

További Közlemények

3. Pocsai, K., **Kosztka, L.**, Bakondi, G., Gönczi, M., Fodor, J., Dienes, B., Szentési, P., Kovács, I., Feniger-Barish, R., Kopf, E., Zharhary, D., Szűcs, G., Csernoch, L., Rusznák, Z.: Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture.
Cell. Mol. Life Sci. 63 (19-20), 2364-2376, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6166-8>
IF:4.655



4. Pocsai, K., Pál, B., Pap, P., Bakondi, G., **Kosztka, L.**, Rusznák, Z., Szűcs, G.: Rhodamine backfilling and confocal microscopy as a tool for the unambiguous identification of neuronal cell types: A study of the neurones of the rat cochlear nucleus.
Brain Res. Bull. 71 (5), 529-539, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.11.009>
IF:1.943

5. Rusznák, Z., Bakondi, G., Pocsai, K., Pór, Á., **Kosztka, L.**, Pál, B., Nagy, D., Szűcs, G.: Voltage-gated potassium channel (Kv) subunits expressed in the rat cochlear nucleus.
J. Histochem. Cytochem. 56 (5), 443-465, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.2008.950303>
IF:2.823

6. Nagy, D., **Kosztka, L.**, Pap, P., Nagy, Z., Rusznák, Z., Csernoch, L., Szűcs, G.: Cytoplasmic Ca²⁺ concentration changes evoked by muscarinic cholinergic stimulation in primary and metastatic melanoma cell lines.
Melanoma Res. 21 (1), 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283414477>
IF:2.254

Összesített impakt faktor: 16,011

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4,336

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.09.14



TÁRGYSZAVAK

- TASK-3-csatorna / TASK-3 channel
- melanoma sejtvonala / melanoma cell line
- mitokondrium / mitochondrion
- tumorképződés / tumorigenesis
- RNS-interferencia / RNA interference
- immuncitokémia / immunocytochemistry

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Kovács László és Csernoch László Professzor Uraknak, a DE OEC Élettani Intézet volt és jelenlegi igazgatóinak, valamint az Intézet valamennyi munkatársának, amiért támogattak és segítettek munkám elvégzésében.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Rusznák Zoltánnak, valamint Szűcs Géza Professzor Úrnak munkám során nyújtott útmutatásaikért és baráti támogatásukért.

Köszönet illeti Dr. Kovács Ilonát, a Hajdú-Bihar Megyei Kórház Pathológiai Osztályának vezetőjét, és az immunhisztokémiai laboratórium dolgozóit, Pór Ágneszt, Károlyiné Editet és Kósáné Csonka Teréziát, az immunhisztokémiai kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítségükért.

Hálásan köszönöm továbbá Dr. Varga Attiláné (Ibcsike) segítségét, és köszönetet mondok munkatársaimnak: Pál Balázsnak, Pocsai Krisztinának, Bakondi Gábornak, Pap Pálnak, Kőszeghy Áronnak, Nagy Dénesnek és Fodor Jánosnak figyelmes és önzetlen segítségükért.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2P/4TM K^+ -csatorna: alegységenként két pórusformáló régiót és négy transzmembrán szakaszt tartalmazó K^+ -csatorna

4-AP: 4-aminopiridin

AVD: apoptotikus térfogatcsökkenés (apoptotic volume decrease)

BSA: borjú szérum albumin (bovine serum albumin)

CMV: cytomegalovirus

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIC: differenciál-interferencia kontraszt

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

EPSP: excitatorikus posztzinaptikus potenciál

FBS: foetalis borjúsérum (fetal bovine serum)

FITC: fluoeszcein-izotiocianát

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GFP: zöld fluoeszcein fehérje (green fluorescent protein)

GIRK: G protein által regulált, befelé egyenirányító K^+ -csatorna

HEK: humán embrionális vese (human embryonal kidney) sejtvonat

HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav

IgG: immunglobulin G

$I_{K(SO)}$: háttér (standing outward) K^+ -áram

IPSP: inhibitorikus posztzinaptikus potenciál

Kir: befelé egyenirányító (inward rectifier) káliumcsatorna

Kv: feszültségvezérelt (voltage-gated) káliumcsatorna

MLV: murine leukemia virus

mtKATP: mitokondriális ATP-szenzitív káliumcsatorna

MTT: 3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid

PBS: foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)

PBST: 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS

ROI: region of interest

ROS: reaktív oxigéngyök (reactive oxygen species)

RT-PCR: reverz transzkripció polimeráz láncreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)

SDHA: szukcinát-dehidrogenáz, A alegység

SDS-PAGE: Na⁺-dodecilszulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis)

SEM: standard hiba (standard error of the mean)

SERCA: szarko-endoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz

SID: self interacting domain

TALK: TWIK-related, alkaline pH activated K⁺-channel

TASK: TWIK-related acid sensitive K⁺-channel

TEA: tetraetil-ammónium

THIK: TWIK-related halothane-inhibited K⁺-channel

TMS: transzmembrán szegmens

TNF: tumor nekrosis faktor

TRAAK: TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺-channel

TRESK: TWIK-related spinal chord K⁺-channel

TREK: TWIK-related K⁺-channel

TWIK: tandem of pore domain in weak inward rectifier K⁺-channel