

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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**

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kosztka Livia, okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris orvostudomány doktori iskolája (Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán, Ph.D.

**A doktori szigorlati bizottság:**

elnök: Dr. Szöllősi János, az MTA doktora  
tagok: Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora  
Dr. Tóth Attila, Ph.D.

**A doktori szigorlat időpontja:** 2012. március 27. 11:00

**Az értekezés bírálói:**

Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora  
Dr. Széll Márta, az MTA doktora

**A bírálóbizottság:**

elnök: Dr. Szöllősi János, az MTA doktora  
tagok: Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora  
Dr. Széll Márta, az MTA doktora  
Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora  
Dr. Tóth Attila, Ph.D.

**Az értekezés védésének időpontja:** 2012. március 27. 13:00

## Bevezetés

A TASK-3-csatornák a  $K^+$ -csatornák legújabbban felfedezett családjába tartoznak, amelynek tagjai alegységként két pórusformáló hurkot tartalmaznak, és dímereket alkotva hozzák létre a funkcionális  $K^+$ -áteresztő pórust. A TASK-3-csatornák emlős sejtekben számos fiziológias funkcióval rendelkeznek; egyebek között szerepet játszanak az aldosteronszekréció szabályozásában, részt vesznek a neuronok ingerlékenységének beállításában, valamint a perifériás kemoreceptorok hypoxia iránti érzékenységének biztosításában. 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, amikor kevésbé világos, hogy hatásukat milyen módon fejtik ki. Említést érdemel, hogy a TASK-3-csatornák bizonyos sejt típusokban apoptózist kiváltó hatással rendelkeznek, ugyanakkor más körülmények között tumorképződést serkentő funkció is tulajdonítható nekik. Számos különböző daganattípusban is leírták a TASK-3-fehérjét kódoló *kcnk9* gén amplifikációját, valamint a csatornafehérje tumorképződést serkentő funkcióját megerősítő kísérletes adatok is rendelkezésre állnak. Ezen eredmények rámutattak, hogy a hatás kifejlődéséhez nem csupán a fehérje jelenléte, hanem a működőképes,  $K^+$ -permeábilis TASK-3-csatornák kialakulására is szükség van. Habár nem ismert, hogy a TASK-3-csatornák pontosan mely módon járulnak hozzá a daganatos sejtproliferációhoz, bizonyos felvetések szerint növelik a daganatos sejtek hypoxiával 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 állhat fenn, azonban a kapcsolat pontos megértéséhez még további vizsgálatokra van szükség.

A jelen disszertációban bemutatott eredményeink igazolják, hogy a tenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtekben a TASK-3-csatornák 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 megfigyeléseink hozzájárulnak ahhoz, hogy megértsük a TASK-3-csatornák potenciális tumorképződést serkentő hatásának hátterében álló mechanizmust, aminek akár terápiás jelentősége is lehet.

## Irodalmi áttekintés

### A TASK-3-csatorna

A TASK-3-csatornák az alegységenként két pórusformáló régiót tartalmazó (2P)  $K^+$ -csatornák főcsaládjába tartoznak, amelynek tagjai alegységszerkezetüket, működésüket, és farmakológiai jellemzőiket tekintve jelentősen eltérnek a többi  $K^+$ -csatornától. A 2P  $K^+$ -csatornák neuronokban a nyugalmi membránpotenciál szabályozásában, a membrán bemeneti ellenállásának és ingerlékenységének beállításában, valamint az akciós potenciál időtartamának meghatározásában játszanak fontos szerepet. A főcsoporton belül a TASK- (TWIK-related acid-sensitive  $K^+$ -channels) alcsoportba tartozó csatornákra jellemző, hogy érzékenyen reagálnak az extracelluláris pH változásaira; az extracelluláris pH savas irányba való eltolódása a csatornák záródását okozza.

A humán TASK-3-csatornák legjellemzőbb előfordulási helye a központi idegrendszer, azon belül a kisagy, amelynek Purkinje- és szemcsesejtjei, valamint astrocytái egyaránt expresszálják a csatornát. A csatornák ezen kívül azonban számos más szövetben is

előfordulnak, mint például a gastrointestinalis tractus több szakaszában, a hasnyálmirigyben és a nyálmirigyek kivezető csövében.

### **A TASK-3-csatornák szerepe az apoptózisban**

A  $K^+$ -csatornákra általánosságban nem jellemző módon a TASK-3-csatornák a sejtek életképességét alapvetően befolyásoló folyamatokban, például az apoptotikus sejthalál befolyásolásában is szerepet játszanak; ugyanakkor az erre vonatkozó irodalmi adatok rendkívül ellentmondásosak. Egyes tanulmányokban a TASK-3-csatornák apoptózist kiváltó funkciójáról számoltak be, más körülmények között pedig a csatornafehérje működésének anti-apoptoticus hatását demonstrálták.

Az agy fejlődése során a neuronok sejtmembránjának ingerlékenysége meghatározó jelentőségű 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. Ismeretes, hogy a patkány kisagyi szemcsesejtjeiben a TASK-1- és a TASK-3-alegységekből felépülő heterodimer csatornák fontos szerepet játszanak az apoptózis indukálásában. 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 sejtféleség számának szinkronizálásához. A TASK-csatornák pro-apoptotikus funkciójának hátterében feltehetően az a mechanizmus áll, hogy a rajtuk keresztül 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.

A fenti adatokkal ellentétben más tanulmányok azt a felvetést támogatják, hogy a TASK-csatornák működése által okozott hiperpolarizáció védelmet jelent a különféle celluláris stresszhatások által kiváltott sejthalállal szemben. Egy érdekes tanulmány rámutatott, hogy hypoxia és szérumdepriváció esetén a TASK-3-csatornák mind az egér fibroblast eredetű C8 sejtvonalban, mind túlélő hippocampalis agyszeletekben kifejezett védelmet nyújtanak az apoptózis kialakulása ellen.

### **A TASK-3-csatornák szerepe a tumorképződésben**

A TASK-3-csatorna potenciális onkogén szerepe akkor merült fel, amikor kiderült, hogy a *kcnk9* gén a rosszindulatú emlődaganatok 10%-ában 3-10-szeres amplifikációt mutat; ugyanakkor a genomi amplifikáció mellett a géntermék 5-100 szoros overexpressziója is megfigyelhető volt a vizsgált tumorminták 44%-ában, ami semmilyen korrelációt nem mutatott az ismert tumormarkerek (ösztrógenreceptor, HER-2 onkogén) fokozott expressziójával. Az emlőtumorok mellett malignus tüdődaganatokban is 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 képességét, valamint a hypoxia és szérumdepriváció elleni rezisztenciáját is. Egy érdekes megfigyelés szerint a TASK-3-csatornák *in vitro* körülmények között közvetlenül is képesek voltak hozzájárulni a daganatos sejtek túléléséhez. Az *in vitro* kísérletek mellett glioblastoma tumormintákban is

sikerült igazolni a TASK-3-csatornák jelenlétét, és felmerült a a TASK-3-csatornákra ható szerek esetleges terápiás jelentősége 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. 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 eredmények 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. A TASK-3-csatornák fokozott expressziója a membrán hiperpolarizációját okozhatja, aminek hatására megnő a  $Ca^{2+}$  elektrokémiai grádiense. Ennek eredményeként a sejtekbe  $Ca^{2+}$  áramlik, ami 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. kaspázok) 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 vascularisált régióiban lehet jelentős. Bár nem világos, hogy a TASK-3-csatornák milyen módon biztosíthatnak védelmet a hypoxiával szemben, a hatás feltehetően nem közvetlenül a csatornafunkció révén valósul meg, ugyanis a hypoxia gátló hatást fejt ki a TASK-3-csatornákra. Jelen munkánk szempontjából érdekes megfigyelés, hogy a mitokondriális respiráció különféle szerekekkel történő gátlása a hypoxiához hasonló hatást fejt ki a patkány perifériás kemoreceptor sejtjeiben, gátolva azok sejt felszíni TASK-áramát. Elképzelhető tehát, hogy a háttér  $K^+$ -csatornák aktivitása kapcsolatban áll a mitokondriális respirációs folyamatokkal.

### **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.

- A melanoma sejtekben megfigyelt intracelluláris TASK-3-expresszió mely sejtorganellumhoz köthető?
- Megfigyelhető-e a melanoma sejtek esetén tapasztalt mintázathoz hasonló jelölődés más, nem tumorosan elfajult sejt típusban, azaz a szintén TASK-3 pozitív HaCaT keratinocytákban is?
- Hozzájárul-e a TASK-3-csatorna a tenyésztett melanoma sejtek életképességének fenntartásához, és milyen változásokat indukál a csatornafehérje szintézisének gátlása a sejtek megjelenésében és viselkedésében?

## **Anyagok és módszerek**

### **Sejttenyésztés, transzfekció**

Valamennyi alkalmazott sejtvonalat egyrétegű, letapadó tenyészet formájában, 5%-os CO<sub>2</sub> parciális nyomás és 100% relatív páratartalom mellett, 37 °C-on tartottuk fenn. A melanoma sejteket RPMI 1640 tápoldatban, a C2C12, HaCaT, és HEK293 sejtvonalakat Dulbecco's Modified Eagle Medium tápoldatban tenyésztettük. A tápoldatokat 10% foetalis borjúsérummal és antibiotikumokkal egészítettük ki.

A C2C12 sejteket tranziensen transzfektáltuk a humán TASK-3-fehérjét expresszáló pcDNA3 hTASK3/7 plazmiddal.

### **RNS-interferencia**

A TASK-3-specifikus shRNS-kazettákat a GenScript szoftvere segítségével terveztük. Az 5' végükön Rodamin Red jelöléssel ellátott shRNS molekulákat Lipofectamin 2000 transzfekciós reagens segítségével juttattuk a melanoma és HEK293 sejtekbe. Negatív kontrollként a megfelelő kevert szekvenciát (scrambled RNS) alkalmaztuk. A transzfekciót követően a sejteket tovább tenyésztettük, majd 1, 2 vagy 3 nap elteltével immuncitokémiai kísérleteket végeztünk rajtuk. A leghatékonyabbnak bizonyuló shRNS-kazettát, valamint a megfelelő scrambled RNS-t expressziós vektor előállításához is felhasználtuk oly módon, hogy az kazettákat kódoló dupla szálú DNS-t a pRNAT-U6.1/Neo plazmidba ligáltuk. A ligációt követően a plazmiddal kompetens *E. coli* baktériumokat transzformáltunk, majd amplicillin-rezisztencián alapuló szelekció után a baktériumkolóniákból Wizard Plus SV Minipreps kit segítségével preparáltuk a plazmid DNS-t. Az inszert sikeres beépülését restriktív emésztést követő gélelektorforézissel, valamint szekvenálási reakcióval egyaránt ellenőriztük. A vektort szintén Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens alkalmazásával juttattuk be a melanoma sejtekbe.

## **RT-PCR**

A melanoma sejtekből az RNeasy Micro Kit (Qiagen) alkalmazásával teljes RNS-frakciót izoláltunk, és a teljes RNS-ből reverz transzkripció útján cDNS-t állítottunk elő. Az amplifikációhoz alkalmazott specifikus primerpárt a BC075080 kódszámú *Homo sapiens* KCNK9 K<sup>+</sup>-csatorna mRNS szekvenciája alapján terveztük. Az RT-PCR eredmények szemikvantitatív értékelése céljából a TASK-3 mellett gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz- (GAPDH) amplifikációt is végeztünk. A reakciótermékeket etidiumbromiddal festett, 1,5%-os agaróz gélben futtattuk, majd a gélképen denzitometriás analízist végeztünk.

## **Immuncitokémia és immunhisztokémia**

Az immuncitokémiai kísérleteket steril fedőlemezen tenyésztett sejteken végeztük. 4%-os paraformaldehiddel végzett fixálás után a sejteket permeabilizáltuk, majd egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk a TASK-3 specifikus monoklonális primer antitesttel. Másodlagos antitestként fluorescein isothiocyanate- (FITC-) konjugált ellenanyagot használtunk, majd a sejteket DAPI-t tartalmazó beágyazó oldattal fedtük le. A melanoma sejtekből izolált mitokondriumokon a fentiekhez hasonlóan végeztünk immunjelölést.

Az immunhisztokémiai kísérleteket 4 µm vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákon hajtottuk végre, amiket a betegekből posztoperatív hisztopatológiai diagnózis céljából távolítottak el. Az esetek egy részében az immunhisztokémiai reakció előtt antigénfeltárást is végeztünk. Az endogén peroxidáz aktivitását hidrogén-peroxid 3%-os vizes oldatával gátoltuk. Az elsődleges ellenanyag alkalmazását követően vagy EnVision rendszert, vagy biotinnal konjugált másodlagos ellenanyagot, majd streptavidinnel konjugált tormaperoxidáz enzimet alkalmaztunk a reakció megjelenítésére. A negatív kontroll kísérleteket vagy az antitestre specifikus immunizáló fehérjével történő előinkubációval, vagy az elsődleges antitest elhagyásával végeztük.

## **Western-blot**

A teljes sejtlyúzátumból készített minták proteintartalmának meghatározása után SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk, majd a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt a szabad kötőhelyek blokkolását követően nyúlban termeltetett, poliklonális TASK-3-ellenes primer antitesttel, majd nyúl IgG-ellenes, tormaperoxidázzal kapcsolt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. Az eredmények láthatóvá tételéhez egy kemilumineszcenciás Western-blot detektáló rendszert alkalmaztunk. A TASK-3-expresszió mennyiségi értékelése céljából denzitometriás mérést végeztünk, aminek során a mért denzitást  $\beta$ -aktinra normáltuk. A teljes sejtlyúzátumon kívül mitokondriális membránfrakcióból készített mintán is végeztünk Western-blot kísérleteket.

## **A sejtproliferáció és sejt méret vizsgálata**

A sejtproliferáció vizsgálatára két különböző módszert alkalmaztunk: a DNS-tartalom meghatározásán alapuló CyQUANT assay-t, valamint a mitokondriális enzimaktivitás mérésén alapuló, így az élő sejtszámmal arányos jelet adó MTT-assayt. A sejt méret vizsgálata során a sejtfelszín mikroszkóp alatt látható vetületének területét határoztuk meg.

## **A mitokondriális funkció mérése**

A mitokondriális funkciót az extracelluláris reaktív oxigéngyökök (ROS) koncentrációjának meghatározásával mértük, a munkacsoportunk által kifejlesztett permanganát-alapú ROS-meghatározási módszer segítségével. A sejteket módosított, kloridot és szerves anyagot nem tartalmazó HANK oldattal, valamint ezzel párhuzamosan 1,5 mmol/l  $H_2O_2$ -t tartalmazó módosított HANK oldattal inkubáltuk. A ROS koncentrációját a felülűszóban, fotometriás módszer alkalmazásával mértük.

## **Eredmények**

### **A TASK-3-csatornák mitokondriális expressziója melanoma sejtekben**

Korábbi munkáink egyik fontos megállapítása volt, hogy a TASK-3-specifikus immunpozitivitás a különféle daganatos sejtekben elsősorban intracelluláris megjelenést mutat. A jelen vizsgálatsorozatban arra kerestük a választ, hogy a melanoma sejtekre jellemző intenzív TASK-3-expresszió mely intracelluláris struktúrához köthető. A tenyésztett WM35 melanoma sejteken végzett immuncitokémiai kísérleteinkben a mitokondriális jelölés megoszlási mintázata nagymértékű hasonlóságot mutatott a TASK-3-specifikus immunreakcióval. 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. A sejtfelszíni membrán gyenge jelölődése ugyanakkor a jelölődési mintázat további, igen meglepő jellegzetessége volt. A mitokondriális co-lokalizáció bemutatása céljából a TASK-3 és MitoTracker kettős jelölés után konfokális mikroszkóppal 0,5 µm vastag optikai szeleteket készítettünk a sejtréteg teljes vastagságában. Az így készült felvételek alapján megállapítható volt, hogy a szoros co-lokalizáció nem a két jelölődési mintázat egymásra vetülésének következménye, hanem az valóban a TASK-3-csatornák mitokondriális membránban való elhelyezkedését tükrözte.

Ugyancsak vizsgáltuk a TASK-3-csatornák jelenlétét a WM35 melanoma sejtvonalból izolált mitokondriumokon. A preparálási eljárás végén kapott mitokondriális szuszpenzió MitoTracker festékkel és TASK-3-specifikus antitesttel végzett kettős jelölés után szintén nagyfokú átfedést figyelhattunk meg a kétféle jelölődés mintázatában. Ez az eredmény egy eltérő festési eljárással is reprodukálható volt, amelynek során a mitokondriumokat egy monoklonális, citokróm-c-specifikus ellenanyaggal; a TASK-3-csatornákat pedig egy poliklonális TASK-3-ellenes antitesttel jelöltük.

A WM35 melanoma sejtvonalból preparált mitokondriális membránfrakcióban Western-blot módszerrel is vizsgáltuk a TASK-3-fehérje jelenlétét. A Western-blot kísérletek során szukcinát-dehidrogenáz- (SDHA-), TASK-3- és a P<sub>2</sub>X<sub>7</sub>-típusú purinerg receptorokra specifikus primer antitesteket alkalmaztunk. A mitokondriális membránt tartalmazó mintában megjelent a TASK-3-specifikus sáv, ami igazolta, hogy a csatornaféhrje valóban expresszáldott 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<sub>2</sub>X<sub>7</sub>-jelölődés hiánya azt jelezte, hogy a minta a sejtfelszíni membránból származó szennyeződéstől mentes volt. A TASK-3-specifikus primer antitest megfelelő működésének igazolására pozitív kontrollként WM35 sejtvonalból készített, teljes sejtlizátumot tartalmazó mintát, negatív kontrollként pedig naiv (azaz TASK-3-csatornát nem expresszáldó) HEK293 sejtekből készített mintát használtunk.

A melanoma sejtek TASK-3-expressziójának kimutatását mRNS-szinten is elvégeztük. Ennek során három különböző melanoma sejtvonalból izoláltunk mRNS-t, és megállapítottuk, hogy valamennyi mintából származó TASK-3-specifikus mRNS szekvenciája teljes mértékben megegyezett a génbankban meghatározott humán TASK-3-szekvenciával. Ez a kísérletünk nemcsak azt a megfigyelésünket erősítette meg, hogy a melanoma sejtek TASK-3-fehérjét expresszálnak, hanem azt is igazolta, hogy a csatornaféhrje génje nem hordoz mutációt.

További kontroll kísérleteket végeztünk annak bizonyítására, hogy az immuncitokémiai kísérleteinkben alkalmazott ellenanyag nem kötődött aspecifikus módon valamely mitokondriális proteinhez. Ennek érdekében a TASK-3-csatornát nem expresszáldó C2C12 sejtvonalon transziens transzfekciót végeztünk a humán TASK-3-csatornát kódoló pcDNA3 hTASK3/7 expressziós vektorral; majd a transzfektált tenyészetet elvégeztük a

mitokondriumok és a TASK-3-csatornák együttes jelölését. Ezen kísérletekben a transzfekciós határfoknak megfelelően csak a sejtek egy (viszonylag kis) része mutatott TASK-3 immunpozitivitást, míg a mitokondriumok jelölődése valamennyi sejtben egyértelműen megfigyelhető volt. A kísérlet eredménye alapján megállapíthattuk, hogy az alkalmazott antitest nem okozta a mitokondriumok aspecifikus jelölődését.

### **A humán keratinocyták TASK-3 immunpozitivitása**

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. A tenyészetben fenntartott HaCaT keratinocytákra intenzív TASK-3 immunpozitivitás volt jellemző; ugyanakkor 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 keratinocyták TASK-3-expressziójának megoszlását *in situ* körülmények között, egészséges bőrből készült, beágyazott szövettani metszeteken is vizsgáltuk. Az egészséges bőr számos sejttypusa egyértelműen és intenzíven TASK-3 pozitív volt. A laphámsejtes réteg keratinocytái mellett a szekretoros sejtek és a szőrtüszők keratinocytái is TASK-3 pozitívnak bizonyultak, míg a környező kötőszövetben nem jelent meg a TASK-3-specifikus immunreakció. 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 sejttypus esetén is megalapozottnak tűnt a csatornafehérje mitokondriális expressziójának feltételezése.

## **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. Erre a célra RNS-interferenciát alkalmaztunk, és azt figyeltük, hogy a TASK-3 géncsendesítés milyen változásokat idéz elő a tenyészetben fenntartott melanoma sejtek megjelenésében és viselkedésében.

Mivel a kísérleti eredmények értékelése szempontjából kulcsfontosságú volt annak igazolása, hogy az alkalmazott shRNS hatékony és specifikus volt, többféle módszert is alkalmaztunk a csökkent TASK-3-expresszió kimutatására. Megállapítottuk, hogy az shRNS-kazettával végzett transzfecció hatására mind a TASK-3-specifikus mRNS, mind a csatornafehérje expressziós szintje kimutathatóan csökkent. Az expressziós szint csökkenése a transzfecció utáni második napon mRNS- és fehérjeszinten egyaránt szignifikáns volt. A negyedik napon a hatás még mindig látható és szignifikáns volt, azonban innentől kezdve a nem transzfecciózott 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 transzfecció sikerességét és hatékonyságát immuncitokémiai kísérletekkel is vizsgáltuk. A géncsendesített melanoma sejtekben a TASK-3-specifikus immunreakció sokkal kevésbé volt intenzív, mint a scrambled RNS-t expresszáló vektorral transzfecciózott tenyészeteken. 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.



## **Morfológiai változások a TASK-3-expresszió gátlásának hatására**

Az shRNS-kazetta alkalmazásának hatására jellegzetes morfológiai változásokat figyelhettünk meg a melanoma sejteken; a jelenség vizsgálata céljából a transzfekeiót követő 2. napon differenciál-interferencia-kontraszt (DIC) felvételeket készítettünk a kontroll és a TASK-3-specifikus shRNS-sel transzfekeiótált melanoma sejtekről. A sejtek morfológiájában bekövetkező legrövidbetűnőbb változás a kezelt sejtek citoplazmájában megjelenő durva granuláció volt.

Az shRNS-kazettával transzfekeiótált melanoma sejtenyészetben végzett TASK-3-specifikus immunfestésről készült felvételek szintén érdekes információt szolgáltattak a bekövetkezett morfológiiai változásokról. A sikeresen transzfekeiótált sejtek a kontrollhoz képest kisebbek voltak, nyúlványaikat elvesztették, és TASK-3 immunjelölődésük lényegesen kevésbé volt intenzív, mint a szomszédos, ép sejtéké. A sejt méretben bekövetkezett változás kvantitatív értékelése céljából meghatároztuk, majd összehasonlítottuk a transzfekeiótált és a megkímélt sejtek felszínének méretét, és megállapítottuk, hogy a transzfekeiótált sejtek mérete a kontrollhoz képest egyértelműen csökkent. A DIC felvételekhez hasonlóan az immunreakcióról készült fluoreszcens képen is látható volt, 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 transzfekeiótált 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. A fenti morfológiiai 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.

## **A DNS-tartalom és a mitokondriális funkció csökkenése**

A TASK-3-csatorna bioszintézisének gátlása nemcsak a sejtek méretére és alakjára volt hatással, hanem csökkentette a tenyészet DNS-tartalmát és mitokondriális aktivitását is. A DNS-tartalom csökkenése arra utalt, hogy a transzfektált tenyészetekben a sejtszótódás üteme csökkent a kontroll tenyészetekhez képest; ugyanakkor az MTT-assay eredményének háttérében a transzfektált tenyészetekben bekövetkező sejtszámcsökkenés mellett a sejtek mitokondriális aktivitásának csökkenése is állhatott. 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-produkció meghatározását is. Habár a nyugalmi ROS-produkció a kontroll és a transzfektált tenyészetekben nem tért el szignifikáns mértékben, az extracelluláris H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adagolásával indukált ROS-termelés a TASK-3 géncsendesített tenyészetekben jelentősen csökkent a kontrollhoz képest. 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.

## **Megbeszélés**

A TASK-3-csatornák számos fiziológiás funkciójuk mellett egyéb, nem fiziológiás folyamatokban is jelentősek lehetnek. Működésük egyik legellentmondásosabb pontja, hogy miközben egyes körülmények között kifejezetten serkentik az apoptózist, más esetben jelenlétük és aktivitásuk anti-apoptotikus, és ezáltal tumorképződést serkentő hatást biztosít. A TASK-3-csatornák expresszióját leírták egyebek között emlő-, colorectalis- és gyomordaganatokban, 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 tenyésztetben fenntartott melanoma malignum sejtek intenzív TASK-3-expresszióját. Ezen munka keretében szembesültünk első ízben a sejttenyésztetben fenntartott melanoma sejtek meglepő TASK-3-expressziós mintázatával: a jelölődés különösen intracellulárisan volt erőteljes, jellegzetes, hálózatos mintázatot adott; ugyanakkor a sejt felszíni 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.

A TASK-3-csatornák intracelluláris elhelyezkedését egyes munkacsoportok már korábban is jelezték, *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt. Ismeretes, hogy a csatornafehérje sejt felszíni membránba történő szállításában a 14-3-3 adapter fehérje játszik szerepet. Ez az adapter protein a csatornafehérje C-terminális régiójához kötődik, és jelenléte elengedhetetlen a TASK-3-csatorna sejt felszíni megjelenéséhez; ugyanakkor a 14-3-3 fehérje TASK-3-csatorna transzportjában betöltött pontos szerepe továbbra sem ismert. *Xenopus* oocytákon végzett kísérletek alapján a 14-3-3 protein fokozott expressziója növelte a sejtmembránon folyó TASK-3-áram amplitúdóját; a csatornafehérje C-terminális régiójának módosítása pedig – tehát a 14-3-3 protein kötődésének megakadályozása – ezzel szemben szignifikáns mértékben csökkentette a sejt felszíni TASK-3-áramot. Kimutatták, hogy elegendő egyetlen aminosav deléciója a C-terminálisról ahhoz, hogy a 14-3-3 protein kötődése ne menjen végbe, és a csatornafehérje sejtmembránban való megjelenése akadályozott legyen. A csatornafehérje mutációjának lehetőségét azonban a jelen eredmények alapján 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, ahol 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. A korábbi eredmények alapján feltételeztük, hogy a TASK-3-csatornák intracelluláris jelenléte a melanoma sejtek esetében is valamely sejtorganellumhoz köthető. A jelen kísérletekben mitokondriális markerekkel való kettős jelöléssel egyértelmű, szoros co-lokalizációt mutattunk ki, ami a TASK-3-csatorna mitokondriális jelenlétét jelezte. Felmerült viszont 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.

A jelen munkában bemutatott eredményeink alapján megalapozottan kijelenthetjük, 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. Ismeretes, hogy bizonyos  $K^+$ -permeábilis csatornák megtalálhatók a belső mitokondriális membránban: az ATP-szenzitív  $K^+$ -permeábilis csatornák (mtKATP) például a mitokondriumok térfogatának szabályozásában játszanak szerepet, de a mitokondriumok oxidatív funkciójához elengedhetetlen protongradiens és transzmembrán elektromos potenciál fenntartásában is jelentőségük van. Elképzelhető, hogy hasonló funkciót töltenek 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 citokró-m-c felszabadítását, és elősegíti a mitokondriális ozmotikus homeosztázis fenntartását.

Igen érdekes jelenség a TASK-3-csatornák azon természete, hogy azok bizonyos körülmények között anti-apoptotikus, 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 létezik a jelenség magyarázatára; egyebek között felmerült annak lehetősége, hogy a daganatos sejtekből esetleg hiányoznak az apoptotikus útvonal bizonyos kulcselemei. A jelen vizsgálatokban alkalmazott melanoma sejtvonalak esetében ez a lehetőség azonban nem jön szóba, mivel bennük 2-metoxi-ösztadiol hatására apoptózis váltható ki.

Az ellentmondásos viselkedés a sejtfelszíni membránban mérhető TASK-3-áram amplitúdójával is összefüggésbe hozható, ami a cerebelláris sejtekben 1-2 nA nagyságú, míg a malignus Ben sejtvonalban mindössze kb. 100 pA, annak ellenére, hogy a Ben-sejtek egyébként fokozott TASK-3-expressziót mutatnak. Mindezek alapján elképzelhető, hogy a Ben-sejtekben 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 sejt felszíni membránban elhelyezkedő TASK-3-csatornák aktivációja  $K^+$ -kiáramlást okoz, ami apoptotikus sejtterfogát-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.

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 csatornaféhrjét számos egészséges sejt típus is expresszálja, mint például a kisagyi Purkinje- és szemcse sejtek, a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek endokrin sejtjei, az egészséges melanocyták és a keratinocyták. 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. Mindezek alapján kijelenthető, hogy 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 sejttypusban jelen vannak, egészséges és daganatos elfajulást mutató sejtekben egyaránt. A csatornafehérje tumorképződést serkentő funkcióját már számos daganattypusban felvetették. Jelen munkánkban immunjelölési módszerekkel vizsgáltuk a TASK-3-csatornafehérje megoszlási mintázatát tenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtekben, valamint a daganatos elváltozást nem mutató HaCaT humán keratinocytá sejtvonalba. 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 sejt felszíni membrán jelölődése nem volt szembevetendő. Kettős jelölés alkalmazásával megállapítottuk, hogy a TASK-3-csatornák és a mitokondriumok jelölődési mintázata mindkét vizsgált sejttypusban 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 transziens transzfekciót 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 kiaknázzható-e a daganatellenes terápiában.



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

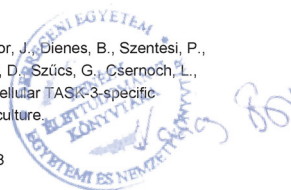
Jelölt: Kosztka Livia  
Neptun kód: EWICAZ  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

#### A PhD értekezés alapiául 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 Ca<sup>2+</sup> 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

