

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

TASK-3-csatornák és muszkarinos kolinerg receptorok szerepe a melanoma sejtek funkciójában

Nagy Dénes

Témavezetők:

Dr. Rusznák Zoltán

Prof. Dr. Szücs Géza



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

ÉLETTAN NEUROBIOLÓGIA PROGRAM

Debrecen, 2015

Tartalom

Tartalom.....	2
1.Bevezetés	4
1.1. A melanoma malignum.....	4
1.2. A sejthalál jelentősége	5
1.3. Az apoptózis.....	6
1.3.1. Az extrinzik apoptotikus kaszkád	6
1.3.2. Az intrinzik apoptotikus kaszkád.....	7
1.3.3. Az effektor kaspázok és a nem-kaspázfüggő apoptózis	8
1.4. A nekrosis (onkózis)	9
1.5. Daganatsejt-migráció és metasztatizálódás	10
1.6. A sejtműködés egyes élettani szabályozó mechanizmusainak szerepe a tumorgenezisben	11
1.6.1. A káliumcsatornák	11
1.6.2. Mitokondriális káliumcsatornák	14
1.6.3. Az intracelluláris kalciumhomeosztázis	16
1.6.4. A kolinerg szignalizáció és a muszkarinos acetilkolin receptorok	19
2.Célkitűzések.....	22
3. Metodika	23
3.1. Sejttenyésztés.....	23
3.2. TASK-3 géncsendesített melanoma sejtvonalak előállítása	23
3.3. RT-PCR	24
3.4. Western-blot	25
3.5. A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata	26
3.6. A mitokondriális membránpotenciál változásainak nyomon követése	29
3.7. MTT életképességi és proliferációs esszé.....	30
3.8. A mitokondriális DNS mennyiségének meghatározása	31
3.9. A melanoma sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának nyomon követése	31
3.10. A CCh dózis-hatás görbe meghatározása	32
3.11. Az apoptózis és nekrosis irányába elkötelezett sejtek arányának meghatározása.....	33
3.12. Mitokondriumban gazdag, valamint citoszól frakciók izolálása és vizsgálata.....	34
3.13. Kaspáz-3 esszé.....	35
3.14. CyQuant®GR sejtproliferációs esszé.....	35

3.15. Fluoreszcens immuncitokémia	35
3.16. Mitokondriumok jelölése.....	36
3.17. A sejtmorfológia vizsgálata és a sejtméret meghatározása.....	36
3.18. Statisztikai analízis	36
4. Eredmények	38
4.1. TASK-3 knockdown sejtvonalak előállítása	38
4.2. A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata	41
4.3. A mitokondriális szétkapcsolás hatása kontroll, scrambled shRNS-sel transzfektált és TASK-3 knockdown WM35 sejtekre	44
4.4. Metabolikus, proliferációs és morfológiai változások a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben	46
4.5. A TASK-3 knockdown tenyészet fokozott mértékű apoptózist, de változatlan mértékű nekrozist mutat.....	49
4.6. Muszkarinos acetilkolin receptorok (MR) kimutatása melanoma sejtekben.....	54
4.7. A karbamilkolinnal (CCh) kiváltott kalciumkoncentráció-változások sajátosságai.....	56
4.8. A CCh-hatás farmakológiai jellemzése	61
5. Diszkusszió.....	65
5.1. A TASK-3 csatorna rosszindulatú tumorokban játszott szerepére vonatkozó adatok ellentmondásai	65
5.2. A TASK-3 expresszió csökkentésének következményei melanoma sejteken	67
5.3. Muszkarinos kolinerg receptorok melanomasejtekben.....	68
5.4. A CCh alkalmazása.....	69
5.5. A citoplazmatikus Ca^{2+} szerepe melanomasejtekben	70
5.6. Az eredmények hasznosításának lehetősége.....	72
5.7. További lehetséges vizsgálatok.....	73
6. Összefoglalás	77
Kulcsszavak:	78
7. Summary.....	79
Keywords:.....	80
8. Irodalomjegyzék	81
9. Rövidítésjegyzék	93
10. Köszönetnyilvánítás.....	96
11. Nyilatkozat önálló munkavégzésről.	97

1.Bevezetés

1.1. A melanoma malignum

A gyakorta csak melanomaként emlegetett melanoma malignum egy olyan rosszindulatú daganat, ami az esetek többségében a bőrben található melanociták malignus elfajulásának következtében alakul ki. Bár előfordulnak nem-bőreredetű melanomák is (pl. colorectalis, ocularis, conjunctivalis vagy vaginalis lokalizációban), ezek gyakorisága eltörpül a bőrből kiinduló melanoma malignum előfordulási aránya mellett: a bőrből kiinduló melanoma malignum incidenciája 40–50/100 000, a nem-bőr eredetű melanomák pedig az összes melanoma malignum esetnek csupán a 4–5%-át képezik [Hussein 2008].

Tekintettel a leggyakoribb megjelenési helyére, a melanomát a statisztikák általában a többi bőreredetű daganattípussal vetik össze. Ezek az elemzések rávilágítanak a betegség súlyos következményeire: bár a melanomás esetek az összes bőreredetű daganat miatt kezelt betegek mindössze 4%-át teszik ki [Porter 2011], a melanoma malignum az összes bőreredetű daganattal kapcsolatos halálesetek mintegy 65%-áért felelős [Alonso és mtsai. 2004; Cummins és mtsai. 2006]. Ezek az adatok világosan jelzik, hogy a melanoma egy különösen rossz prognózissal és súlyos gazdasági/egészségügyi következményekkel jellemezhető betegség. Mindezekből következően a melanoma malignummal és annak lehetséges terápiájával foglalkozó kutatómunka nagy gyakorlati jelentőséggel bír.

A bőreredetű melanoma a bőr stratum basalejában található, melanint termelő melanocitákból alakul ki [Wainstein és Belfort 2004]. Bár a kutatások a melanoma keletkezésének több rizikófaktorát azonosították (pl. nagy számú naevus jelenléte), egyetértés van abban, hogy a legfontosabb kiváltó ok a napfény-expozíció során a bőrt ért ultraibolya sugárzás [Gordon 2013]. Azon megfigyelések ugyanakkor, miszerint a melanoma malignum kialakulásának valószínűsége megnő, ha közeli hozzátartozók esetén már diagnosztizálták a betegséget, arra hívják fel a figyelmet, hogy a betegség pathogenesisében öröklött tényezőknek is szerepe van [Thompson és mtsai. 2005]. Az öröklött tényezők jelentőségét hangsúlyozza az a megállapítás is, miszerint egy már kialakult melanoma esetén a másodlagos melanoma kialakulásának esélye egy egész nagyságrenddel magasabb [Goggins és Tsao 2003].

A melanoma sejtek proliferációs készsége igen nagy, ezért a terápia meghatározó eleme a tumor sebészi úton történő, minél gyorsabb eltávolítása [Harris és mtsai. 1995]. A primer tumor eltávolítása azonban sajnos nem feltétlenül jelent gyógyulást, mivel a melanoma malignitásának fontos eleme a korai áttétképzés. A metasztázisok megjelenése a túlélés

esélyét jelentősen csökkenti [Greenlee és mtsai. 2000]. Mindezekből fakadóan – hasonlóan más rosszindulatú daganatokhoz – a melanoma malignum eredményes terápiájának kulcsa annak korai diagnózisában rejlik. A korai diagnózis egyik eleme a tumor pontos klinikai osztályozása, valamint az általa expresszált diagnosztikai és prognosztikai markerek azonosítása [Breslow 1970; Clark és mtsai. 1969]. Az egyik közismert melanomaspecifikus marker az S-100 fehérjecsoport [Gaynor és mtsai. 1980]. Az S-100 fehérje jelenlétét a mai napig vizsgálják a melanoma diagnosztikája során [Gajjar és mtsai. 2004], jóllehet specificitását újabb vizsgálatok megkérdőjelezték [Ordóñez 1998; Nelson és Ordóñez 2014]. További, említést érdemlő és a diagnosztikai procedúra során alkalmazott melanomaspecifikus marker a HMB-45 (human melanoma black 45 [Gown és mtsai 1986]) és a Melan-A/MART-1 (melanocyte antigen/melanoma antigen recognized by T-cells [Kawakami és mtsai. 1994; Chen és mtsai. 1996]). A melanoma malignum szövettani diagnosztikája során jelenleg a Melan-A/MART-1- és az S-100-specifikus jelölés együttes alkalmazása a leggyakoribb eljárás [pl. Nelson és Ordóñez 2014].

A melanoma malignum nagy terhet ró az egyes országok gazdaságára és egészségügyi ellátórendszerére, ennél fogva nem meglepő, hogy világszerte intenzív kutatómunka folyik a betegség kialakulási mechanizmusának megismerése és lehetséges terápiás eljárások kidolgozása érdekében. A vizsgálatok kiemelten fontos célja a melanoma sejtek magas proliferációs képességének és áttétképző hajlamának hatékony befolyásolása.

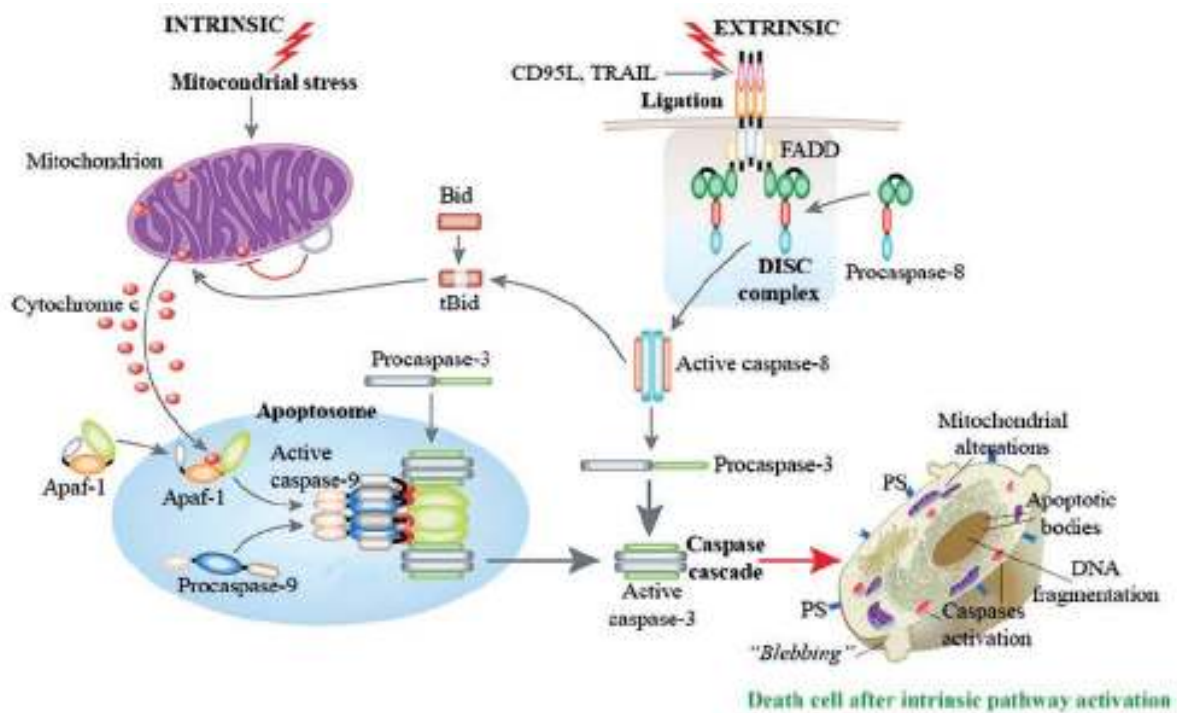
1.2. A sejthalál jelentősége

Fiziológiás körülmények között a sejtosztódás és a sejthalál együttesen biztosítják egy adott sejtpopuláció folyamatos megújulását és a sejtek számának viszonylagos állandóságát. A sejthalál egyik fiziológiás megjelenési formája az apoptózis, ami a mitózis legfontosabb ellenpárja a sejtpopuláció mennyiségi szabályozásában [Edinger és Thompson 2004]. A szabályozás szemléletes példája az a központi idegrendszerben megfigyelt jelenség, ami szerint azok a neuronok, amik nem alakítanak ki szinaptikus kapcsolatokat, apoptotikus sejthalált szenvednek [Opferman és Korsmeyer 2003]. Daganatképződés során a sejtosztódás és a sejtek pusztulása közötti kényes egyensúly felborul, amiért a sejtosztódás fokozódása és a sejthalál mértékének csökkenése általában együttesen felelős [pl. Kerr és mtsai. 1994].

Mivel a sejthalálnak számos formáját azonosították, az ezzel foglalkozó szakirodalomban bevezették a „programozott sejthalál” fogalmát. Az elnevezés olyan intracelluláris folyamatokra utal, melyek során a sejt előre meghatározott program szerint beszünteti tevékenységét és elpusztul.

1.3. Az apoptózis

A programozott sejthalál egyik behatóan tanulmányozott altípusa az apoptózis. Az apoptózis egy olyan ATP-igényes, pontosan szabályozott folyamat, amiben a sejt pusztulását nem kíséri gyulladásos reakció [Fink és Cookson 2005]. Az apoptózis a sejtméret csökkenésével, a sejtmag kondenzációjával és fragmentációjával, majd a citoplazma hólyagosodásával, és a szomszédos sejtekkel fennálló adhézis kapcsolatok elvesztésével jár [Nishida és mtsai. 2008]. Az apoptózis folyamatát elindíthatja egy specifikus külső hatás, ami az ún. extrinzik útvonal aktiválódása révén okoz sejthalált. Az apoptózist ugyanakkor létrehozhatja az intrinzik útvonal aktiválódása is, ami lehet kaspázfüggő és -független folyamat [Ouyang és mtsai. 2012; Galluzzi és mtsai. 2012].



1. ábra: Az apoptotikus útvonalak. A belső, vagy mitokondriális útvonal egyik fő lépése a citokróm c transzlokációja a mitokondriumból a citoszolba, ahol az APAF-1-gyel és a prokaspáz-9-cel kialakítja az apoptoszómát. Ez utóbbi aktiválja a kaspáz-3-at. A külső, extrinzik útvonal a halálreceptorok aktivációjával indul, ami a DISC komplexen keresztül aktiválja a kaspáz-8-at. A kaspáz-8 képes a kaspáz-3 aktivációjára, de a Bid módosításán (tBid) keresztül a mitokondriális útvonalat is beindíthatja. Az aktivizált kaspáz-3 felelős több, az apoptózissal kapcsolatban leírt sejtmorfológiai változásért (pl. hólyagosodás, zsugorodás) [Calvino-Fernández és Parra-Cid 2010].

1.3.1. Az extrinzik apoptotikus kaszkád

Az extrinzik apoptotikus kaszkádot egyes, az ún. halálreceptor-családba tartozó receptorok aktivációja indíthatja el. A folyamatot iniciáló receptorok közül említést érdemel

egyebek között a TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor type I), CD95, DR2 (death receptor 2), DR3, DR5, DR6, TRAIL-R1 és -R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand) [lásd Sayers 2011]. A kaszkád aktiválódásának első lépése, hogy a felsorolt receptorok stimulálása után kialakul egy a receptort, FADD-ot (Fas-associated protein with death domain) és pro-kaspáz-8-at és/vagy pro-kaspáz-10-et tartalmazó komplex (az ún. death-inducing signaling complex [DISC]) [Mannick és mtsai. 1999]. A DISC kialakulását követően aktiválódnak a komplexbe beépült pro-kaspázok [Sun 2011], majd az aktivált kaspáz-8 vagy kaspáz-10 aktiválja az effektor kaspázokat (kaspáz-3, -6 és -7). A kaspáz-8 alkalmas az ún. Bid (BH3-interacting domain death agonist) molekula hasítására, aminek csonkított („trunkált”) formája (a t-Bid) megnöveli a mitokondriumok külső membránjának permeabilitását, elindítva ezzel az intrinzik apoptotikus kaszkádot [Fink és Cookson 2005]. A folyamat sematikus bemutatása az 1. ábrán látható.

1.3.2. Az intrinzik apoptotikus kaszkád

Az intrinzik (vagy mitokondriális) apoptotikus kaszkád aktiválásának indító faktora a DNS károsodása [Ouyang és mtsai. 2012]. A folyamat során bizonyos pro-apoptotikus fehérjék [pl. BAX (Bcl-2-associated X protein), BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) vagy az előzőekben már említett Bid poszttranszlációs módosulásokon mennek keresztül, majd a mitokondriumba transzlokálódnak [Shamas-Din és mtsai. 2011]. A mitokondrium külső membránjában végbemegy a BAX/BAK oligomerizáció, aminek következtében a külső membrán átjárhatóvá válik az apoptotikus folyamatok hírvivő molekulái számára [pl. a citokróm *c* vagy az AIF (apoptosis-inducing factor)] [Li és mtsai. 1997; Zou és mtsai. 1997]. A BAX/BAK oligomerizáció akár közvetlenül is elindíthatja az MPTP (mitochondrial permeability transition pore) összeszerelődését és nyitását [Cory és Adams 2002]. A vezetőképes MPTP megjelenése permeabilizálja a mitokondrium belső membránját, így mitokondriális duzzadást okoz, ami végső soron a sejtek pusztulásához vezet [Vianello és mtsai. 2012].

A mitokondriumokból történő kilépést követően a citokróm *c* az APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) és a pro-kaspáz-9 molekulákkal lép kölcsönhatásba. A kölcsönhatás eredményeként megkezdődik annak az apoptózisra specifikus molekuláris komplexnek az oligomerizációja, amely citokróm *c*-t, APAF-1-et és pro-kaspáz-9-et tartalmaz [Scaffidi és mtsai. 1998]. A folyamat végső eredménye az apoptoszóma kialakulása. A komplex kialakulása során egyúttal bekövetkezik a kaspáz-9 dimerizációja [Kurokawa és Kornbluth 2009] és aktiválódása is [Wen és mtsai. 2012]. A kaspáz-9 aktivációja után az

APAF-1 kölcsönhatásba lép az effektor kaszpázok közé tartozó pro-kaspáz-3-mal és pro-kaspáz-7-tel [Giansanti és mtsai.2011]; a kaszpáz-9 pedig egy specifikus hasítás által aktiválja a két említett pro-kaspázt. Mindezen folyamatok eredményeként megjelenik az aktív kaszpáz-3 és kaszpáz-7 [Ouyang és mtsai. 2012]. Az intrinzik útvonalat kísérő változások lényegesebb lépéseit az 1. ábra mutatja be.

1.3.3. Az effektor kaszpázok és a nem-kaspázfüggő apoptózis

Az apoptózist kísérő sejtmagzsugorodás és sejtméretcsökkenés az effektor kaszpázok aktivitásának eredménye. Az effektor kaszpázok 3-as és 7-es altípusának aktív formái a szerkezeti fehérjék nem-specifikus bontásával indítják el a sejt pusztulását [Allan és Clarke 2009]. A sejtmag méretének csökkenését a laminok proteolitikus bontása [Buendia és mtsai. 1999], a sejt zsugorodását pedig a citoszkeletális fehérjék degradációja okozza [Kothakota és mtsai. 1997]. A folyamat során a kaszpáz-3 és -7 gátolja a DNS-hibák javításáért felelős PARP nevű enzimet (poly ADP ribose polymerase), a kaszpáz-6 pedig a sejtmag dezintegrációján keresztül hozzájárul a sejtmag zsugorodásához [Ouyang és mtsai. 2012].

Az intrinzik apoptózis során a kaszpázfüggő folyamatok mellett kaszpáztól független események is hozzájárulnak a sejt pusztulásához. A folyamat egyik kulcsmolekulája az AIF [Wissing és mtsai. 2004]. A külső mitokondriális membránban lezajló BAX/BAK oligomerizáció következtében nemcsak a citokróm *c* lép ki a citoplazmába [Li és mtsai. 1997], hanem az AIF és több más, sejthalált előidéző molekula is felszabadul a mitokondriumból [Zamzami és Kroemer 2001; Letai és mtsai. 2002]. A folyamat során a mitokondriumban található AIF először proteolízisen esik át, majd a keletkezett csonkolt – és ezáltal vízdékonyabbá tett – AIF (az ún. tAIF) kijut a mitokondriumból és a sejtmagba transzlokálódik [Polster és mtsai.2005]. Az AIF végsősoron a DNS degradálásán keresztül járul hozzá a sejthalál folyamatához [Susin és mtsai. 1999].

Az apoptotikus folyamatok szabályozása bonyolult folyamat, amiben számos molekula vesz részt [pl. Ouyang és mtsai. 2012]. A Bcl (B cell lymphoma) molekulacsalád tagjai között egyaránt vannak pro-apoptotikus és anti-apoptotikus fehérjék. A Bcl-2 molekula például a mitokondriumba transzlokálódott BAX megkötésén keresztül akadályozza a BAX/BAK oligomerizációt. Mivel a BAX/BAK oligomerizáció az apoptotikus kaszkád egyik meghatározó lépése, a Bcl-2 jelenléte anti-apoptotikus hatású [Cory és Adams 2002]. A Bcl-2 antiapoptotikus hatásának tükrében figyelmet érdemel, hogy a fehérje overexpresszióját írták le melanoma sejtekben [Eberle és Hossini 2008]. A fentiek értelmében a Bcl-2 fokozott jelenléte magyarázhatja az apoptózis melanoma malignum sejtekben tapasztalt igen alacsony

mértékét, és egyik oka lehet a melanoma sejtek apoptózisindukcióval szembeni ellenállásának.

Tekintettel az apoptózis jelentőségére, a daganatos sejteket célzó kutatásokban nagy jelentőségű az apoptózis aktiválódásának hathatós detektálása. Az apoptózis aktivációjának egyik lehetséges kimutatása a foszfaditil-szerin sejtfelszíni membrán külső oldalán történő megjelenésének detektálása [Fadok és mtsai. 1992]. A foszfaditil-szerin élő sejtekben a sejtfelszíni membrán belső (citoplazmatikus) oldalán található, mivel a flippáz nevű enzim megakadályozza, hogy a molekula poláris része a külső kompartmentben is előbukkanjon. Az apoptózissal összefüggő folyamatok eredményeként azonban a flippáz többé nem képes a foszfaditil-szerint a citoplazmatikus oldalon rögzíteni, így az a külső oldalról is hozzáférhetővé válik. Az annexin V nevű molekula hatékonyan kötődik a sejtfelszíni membrán külső oldaláról hozzáférhető foszfaditil-szerinhez, így az annexin V sejtfelszíni membránban történő bedúsulása megbízhatóan jelzi az apoptotikus kaszkád aktiválódását [Walisser és Thies 1999]. Az apoptózis detektálásának egy másik lehetséges módja a folyamat gyümölcseként kialakuló DNS fragmentáció láthatóvá tétele, aminek legelterjedtebb módja az ún. TUNEL esszé alkalmazása [Fink és Cookson 2005]. Az apoptózist kísérő mitokondriális diszfunkció ugyanakkor a mitokondriális membránpotenciál mérésével követhető nyomon, arra alkalmas fluoreszcens festékek használatával (pl. DiIC, Rhod-123, Jc-1 vagy DioC6 festékek). Az előzőekben említett eljárások mellett egyes kaspázok aktivitásának mérésén alapuló kolorimetriás vagy flourimetriás esszék is alkalmazhatók az apoptózis detektálására [Otsuki és mtsai. 2003].

1.4. A nekrosis (onkózis)

Bár a sejthalál többi típusának tárgyalása nem tartozik a disszertáció témájához, említés szintjén foglalkoznunk kell a nekrozissal is. Ennek oka, hogy a bemutatandó kísérletes program egyik részében vizsgáltuk, hogy változik-e az általunk tanulmányozott melanoma malignum tenyészetekben a nekrosis következtében elpusztult sejtek száma.

A ma elfogadott nézet értelmében a nekrosis ugyancsak a programozott sejthalál egyik altípusa, annak ellenére, hogy azt sokáig spontán, azaz nem programozott sejthalálnak tartották [Ouyang és mtsai. 2012]. A nekrosis végső következménye a sejtfelszíni membrán irreverzibilis károsodása [Schwartz és Bennet 1995], ezért a nekrotikus típusú programozott sejthalál szabatosabb megnevezése onkózis vagy onkózis-nekrosis lenne [Fink és Cookson 2005]. A folyamatnak az a kiinduló lépése, hogy a sejtbe került toxikus anyagok az ATP-termelést gátolják [Majno és Joris 1995]. Ha a folyamatot DNS-károsodás is kíséri, akkor az

DNS javítását végző, és ennek érdekében aktiválódó PARP nikotinsav-amid- (NAD) depléciót okozhat. Az elhasználódott NAD pótlásához ugyanakkor ATP-re lenne szükség [Walisser és Thies 1999]. Mivel a kiindulási folyamat következményeként az ATP-termelés eleve gátolt, a kialakuló ATP-deplécio végül onkózishoz vezet [Walisser és Thies 1999]. Azok a vizsgálatok, amikben a PARP és a RIP (receptor-interacting protein) családba tartozó kinázok kölcsönhatását tanulmányozták, bizonyították az előzőekben vázolt folyamat programozott jellegét [Golstein és Kroemer 2007]. Mivel a nekrozist a sejtfelszíni membrán károsodása kíséri, a folyamat aktiválódása legegyszerűbben valamilyen membrán-impermeabilis festék alkalmazásával (pl. propídium-jodid) mutatható ki [McCarthy és Evan 1998]. Propídium-jodiddal történő inkubációt követően a festék csak azon sejtek belsejében lesz kimutatható, amik nekrotizálóknak. Ezzel szemben a nem nekrotizáló – ennél fogva ép sejt felszíni membránnal rendelkező – sejtekbe a propídium-jodid nem képes belépni.

1.5. Daganatsejt-migráció és metasztázisképződés

A rosszindulatú daganatok megkülönböztető ismérve, hogy a sejtburjánzás mellett bekövetkezik a környező szövetek infiltrációja és metasztázisok képzése. A sejt vándorlás indító lépése a fokális adhézió. Ez egy összetett folyamat, aminek során a sejt citoskeletális elemei és az extracelluláris mátrix között, különböző jelátviteli folyamatok bevonásával, kapcsolat jön létre [Hanein és Horwitz 2012]. A folyamathoz elengedhetetlen egy intracelluláris „erőgeneráló” rendszer, amit az aktinfilamentumok és a miozin által alkotott aktomiozin-komplex biztosít. Ez a komplex felelős a sejtek hátsó (azaz mozgásiránnyal ellentétes) pólusán tapasztalható összehúzódásért, valamint a haladás irányába eső sejtvégen megjelenő kitüremkedésért [Small és Resch 2005]. A két folyamat együttes hatásaként a sejt elmozdul. Mivel a sejt motilitás itt vázolt formája az aktomiozin-komplex működésétől függ, nem meglepő, hogy a folyamat előfeltétele az intracelluláris kalciumkoncentráció térben és időben megfelelően koordinált változása [Ridley és mtsai. 2003].

Az áttétek kialakulása többlépcsős folyamat eredménye [Valastyan és Weinberg 2011]. A primer tumor kialakulását követően a daganat a lokális környezet infiltrálásával növekszik, majd a daganatsejtek betörnek az erekbe. A vérkeringésbe jutott sejtek elsodródhatnak, és egy távolabbi helyen az érből kilépve mikrometasztázisokat formálnak. Az új környezetben a sejtproliferáció átmenetileg felfüggesztődik, majd az alkalmazkodást követően a tumorsejtek növekedési programja ismét aktiválódik, és klinikailag is kimutatható makrometasztázisok fejlődnek ki [Valastyan és Weinberg 2011]. A vázolt folyamatot metasztatikus kolonizációnak nevezik [Fidler 2003].

Paradox módon, bár a rosszindulatú daganatok kezelésének egyik legfontosabb – ha nem a legfontosabb – nehézségét a metasztázisok jelenléte jelenti, maga a metasztázisképződés nem egy hatékony folyamat: mind a mikrometasztázisok kialakulásának, mind a metasztázis kolonizáció létrejöttének meglepően kicsi az esélye ($< 3\%$ és $< 0,02\%$) [Luzzi és mtsai. 1998].

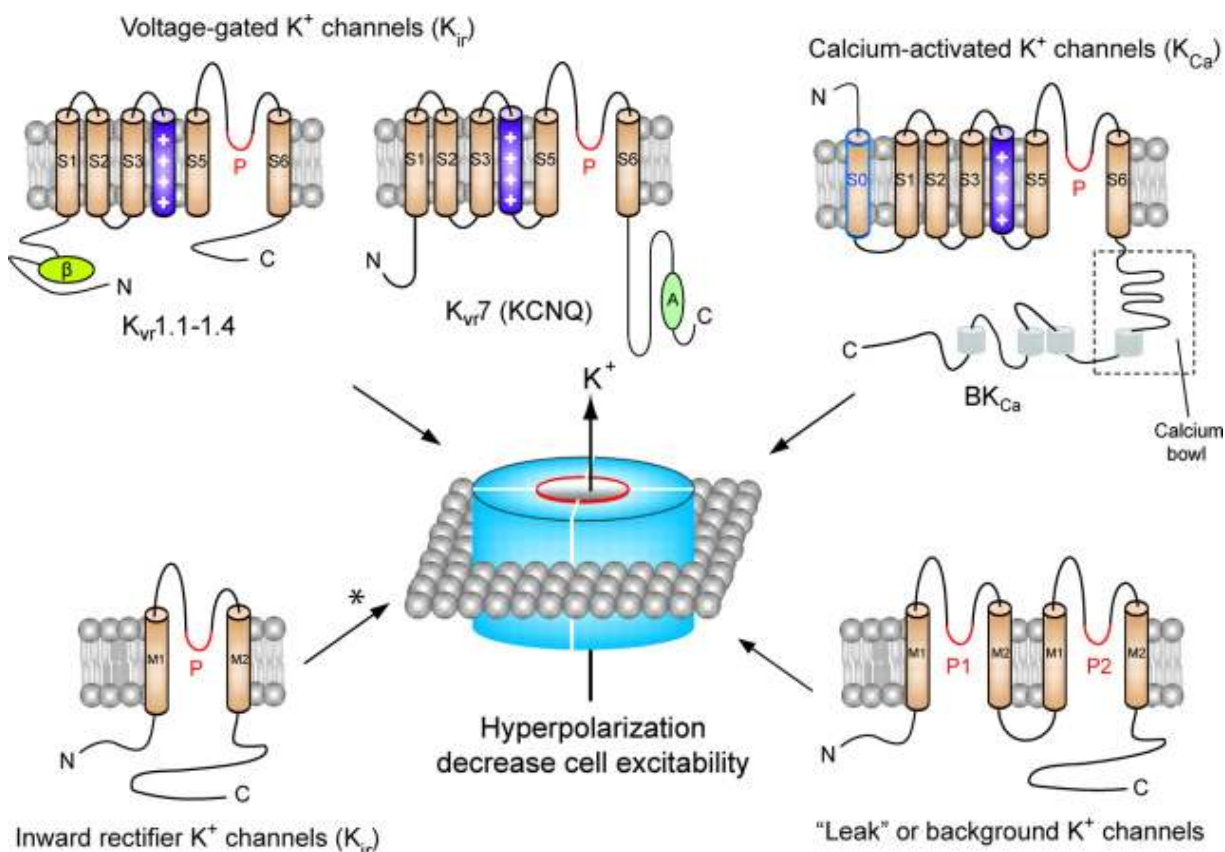
1.6. A sejtműködés egyes élettani szabályozó mechanizmusainak szerepe a tumorgenezisben

Az előző alfejezetekben láttuk, hogy a tumorgenezisben központi szerepet kapnak azok a részben újabban leírt sejt belüli szignalizációs kaszkádok, amelyek speciális fehérje-fehérje kölcsönhatások sorozatán alapulnak. Ezen rendszerek fontos szerepet játszanak az egészséges sejtek életfolyamatainak szabályozásában is, ám ma még nem teljesen feltérképezett körülmények között egyes élettani folyamatok kóros irányba történő torzulásában – és ezáltal a tumorgenezisben – is jelentőséget kapnak. Joggal merül fel a kérdés, hogy az újabban felismert szabályozási láncokhoz hasonlóan, régen ismert, „klasszikus” regulációs mechanizmusok is játszanak-e szerepet a tumorgenezis folyamatában. Az alábbiakban három terület vázlatos áttekintésére teszünk kísérletet.

1.6.1. A káliumcsatornák

A különféle ionok sejtműködést befolyásoló szerepe lehet közvetlen, ám az egyik legáltalánosabb lehetőség a membránpotenciál befolyásolásán keresztül érvényesülő, közvetett hatás. A sejtmembránok elektromos sajátságait az expresszált ioncsatornák heterogenitása szabja meg, melyek közül a legnagyobb változékonyságot a káliumcsatornák mutatják.

A káliumcsatornák osztályozása kezdetben az általuk létrehozott ionáramok sajátságain alapult. Később a *Drosophila* génállományára épülő nevezéktan vált elfogadottá, újabban pedig a humán kromoszómákban kódolt csatornafehérjék elhelyezkedése lett a nomenklatúra alapja. Az elnevezések módosulását annak fokozatos felismerése generálta, hogy a káliumcsatornák lényegesen átfogóbb szerepet játszanak a sejtműködés szabályozásában, mint azt a korai elektrofiziológiai vizsgálatok alapján gondolták. A ma elfogadott kategorizálás a káliumcsatornák négy családját különbözteti meg; ezek (i) a kalciumaktivált káliumcsatornák (BK és SK altípusok), (ii) a befelé egyenirányító káliumcsatornák (K_{ir} altípusok), (iii) a feszültségvezérelt káliumcsatornák (K_v altípusok) és (iv) a két pórusformáló domént tartalmazó káliumcsatornák [Hille, 2001].



2. ábra: Káliumcsatornák szerkezete. A feszültségfüggő káliumcsatorna alegységek 6 transzmembrán domént tartalmaznak, a pórusformáló hurok az ötös és hatos alegység között található. Ennek mentén tetramerizálódik a funkcióképes csatorna. A kalciumaktivált csatornák szerkezete hasonló, csak alegységenként még egy S0 domént is tartalmaznak. Funkcionális csatornát szintén a pórusformáló hurok mentén történő tetramer képződése jelent. Az ikerpórusú, vagy gyakran csak háttér káliumcsatornáként említett molekulák két alegységből épülnek fel. Az alegységek két pórusformáló hurkot és négy transzmembrán domént tartalmaznak. A befelé egyenirányító (Kir) csatornákat felépítő alegység csak két transzmembrán domént és egy pórusformáló hurkot tartalmaznak. A funkcióképes csatorna itt is tetramerizációval jön létre [Benarroch 2009].

Mind a kalciumaktivált, mind a feszültségvezérelt káliumcsatornák négy alegységből épülnek fel. Az előbbieket alegységei hét transzmembrán domént tartalmaznak (S0–S6), míg a Kv csatornaalegységek hat transzmembrán doménnal jellemezhetők (S1–S6). A két káliumcsatorna-család közös vonása, hogy a pórusformáló régió az alegységek S5 és S6 doménje között található, és ezek körül szerelődik össze a működőképes csatorna. A funkcionális Kv csatornák lehetnek homotetramerek vagy heterotetramerek. A heterotetramer összeszerelődés rendezőelve, hogy az alegységeknek ugyanazon főcsoportba kell tartozniuk. A feszültségvezérelt káliumcsatornák feszültségérzékeléséért az alegységek S4 doménje felelős.

A K_{ir} csatornák négy alegységből épülnek fel, az alegységek azonban csak két transzmembrán domént (TM1 és TM2) tartalmaznak. A két domén között található a pórusformáló hurok (az ún. H5 régió), ami körül a funkcióképes csatorna tetramerizálódik. A csatornaalegységek nem rendelkeznek S4 doménnel, így azok nem depolarizáció hatására aktiválódnak, hanem kapuzásukat az alegységösszetételétől függően intracelluláris mediátorok biztosítják [Hibino és mtsai. 2010]. Amint azt a csatornák elnevezése sugallja, a rajtuk átfolyó káliumáram befelé egyenirányító jelleget mutat.

A káliumcsatornák legújabbán azonosított családját a két pórusformáló domént tartalmazó (ún. K_{2P}) csatornák alkotják. A K_{2P} csatornák egy alegysége négy transzmembrán domént és két pórusformáló hurkot tartalmaz; a funkcionális csatorna pedig két alegység dimerizációjával alakul ki [Miller és Long 2012]. A K_{2P} csatornák nevezéktana kissé bonyolult, mivel ezek a csatornák változatos ingerek hatására változtatják nyitvatartási valószínűségüket, az elnevezések pedig ezekre a kapuzási sajátságokra utalnak. A K_{2P} csatornák főbb változatai a TWIK-csatornák (tandem of P-domains in a weakly inward rectifying K^+ channel), a pH-érzékeny TASK (TWIK-related acid-sensitive K^+ channel), valamint a TREK (TWIK-related K^+ channel), a TALK- (TWIK-related alkaline pH-activated K^+ channel) és a TRESK-csatornák (TWIK-related spinal cord K^+ channel). A K_{2P} csatornákon keresztül folyó káliumáram enyhén befelé egyenirányító jelleget mutat. Ezek a csatornák egyebek között részt vesznek a sejtfelszíni membrán nyugalmi, feszültségtől nem függő, azaz „háttér” káliumkonduktanciájának kialakításában, ezért a K_{2P} csatornákat korábban „szivárgó” káliumcsatornaként is említették.

A káliumcsatornák sokféle funkcióval rendelkeznek, amik részletes áttekintése meghaladja jelen értekezés kereteit. Tudománytörténeti jelentősége miatt azonban meg kell említeni azt a felismerést, hogy a K_v csatornáknak döntő szerepük van az akciós potenciál (AP) leszálló szárának kialakításában [Hodgkin és Huxley, 1952]. A folyamat során az AP felszálló szára alatt kialakuló depolarizáció inaktíválja a nátriumcsatornákat, és egyidejűleg megnöveli a K_v csatornák nyitási valószínűségét. A következményesen kialakuló, kifelé irányuló káliumáram repolarizációt idéz elő, létrehozva ezzel az AP leszálló szárát. A repolarizáció sebességét jórészt a jelenlevő káliumcsatornák mennyisége és kinetikai tulajdonságai határozzák meg, így a K_v csatornák meghatározó jelentőségűek az AP hosszának és a refrakter periódusok sajátságainak kialakításában is.

A TASK-csatornák a K_{2P} csatornák családjába tartoznak. A TASK-3 (KCNK9 vagy a legújabb nevezéktan szerint $K_{2P}9.1$) csatorna az extracelluláris pH csökkenésére záródik ($IC_{50} = pH\ 6,8$) [Duprat és mtsai. 1997], nyitott állapotának valószínűsége ugyanakkor

depolarizáció hatására kismértékben nő [Ashmole et. al. 2009]. A TASK-3 csatornának több funkciót tulajdonítanak, ilyen például az aldoszteronszekréció befolyásolása [Czirják és Enyedi 2002], továbbá egyes neuronok ingerlékenységének szabályozása [Meuth és mtsai. 2003]. Mindkét funkció a TASK-3 nyugalmi membránpotenciált befolyásoló hatására vezethető vissza. A TASK-3 emellett feltételezhetően oxigén-szenzorként is funkcionál [O'Kelly és mtsai. 1999].

A jelen értekezésben vizsgált téma szempontjából fontos annak felismerése, hogy a káliumcsatornáknak szerepük lehet mind a sejtprolifерáció, mind a sejthalál szabályozásában. Több megfigyelés támasztja alá azt a feltevést, hogy a sejtmembrán káliumcsatornáinak megnyílása a membrán hiperpolarizációján keresztül elősegíti a kalciumionok belépését a sejtbe, így végső soron fokozza a proliferáció sebességét. Ezt az összefüggést tételezték fel például limfocitákon [DeCoursey és mtsai 1984] és melanoma sejteken [Nilius és mtsai 1993] (a téma áttekintése céljából lásd [Schönherr 2005]).

A sejtmembránban elhelyezkedő káliumcsatornák aktivitása befolyással lehet az apoptotikus sejthalál folyamatára is. Leírták például, hogy a káliumcsatornák megnyílása okozta hiperpolarizáció kloridcsatornákat aktivál, és így következményes kloridkilépést okoz, amit aztán akvaporin csatornákon keresztül vízkilépés is követ [Remillard és Yuan 2004]. A vízkilépés miatti sejtsugorodás ugyanakkor egy apoptózist elindító szignál [Gomez-Angelats és mtsai 2000]. A kálium-, klorid- és vízkilépést követő sejtsugorodás meghatározó szerepét a kisagyi szemcsesejtek vándorlását követő apoptotikus sejtszámcsökkenés esetében is felvetették [Lauritzen és mtsai. 2003], amely folyamatban meghatározó szerepet tulajdonítanak a TASK-3 csatornáknak [Maeno és mtsai. 2000].

1.6.2..Mitokondriális káliumcsatornák

A káliumcsatornák sejtciklus szabályozásban betöltött szerepének megítélését bonyolítja, hogy a csatornák némelyike a mitokondriumokban is megtalálható. Kimutatták például az ATP-függő, a nagy- és közepes konduktanciájú kalciumfüggő, valamint a Kv1.3 típusú feszültségvezérelt káliumcsatornák jelenlétét a mitokondriumok belső membránjában [Szewczyk és mtsai 2009]; valamint feltételezték befelé egyenirányító káliumcsatornák expresszióját a külső mitokondriális membránban [Fieni és mtsai 2010]. Jóllehet ezeknek a csatornáknak a pontos szerepe jórészt ismeretlen, léteznek teóriák, amik arra igyekeznek magyarázatot adni, hogy hogyan befolyásolhatják a mitokondriumok működését, és ezen keresztül a sejtek sorsát. Az említett teóriák közös eleme, hogy a káliumcsatornák a mitokondriális membránpotenciál (MMP) értékének meghatározása révén avatkozhatnak be a

mitokondriumok működésébe. A jelenleg elfogadott álláspont értelmében a csatornák megnyílása a MMP csökkenését idézi elő [Korper és mtsai 2003], amit a mitokondriumok duzzadása és az apoptotikus kaszkád aktiválódása követ [Remillard és Yuan 2004].

A mitokondriális káliumcsatornák ellentmondásos szerepét jelzi, hogy nemcsak aktiválódásuk, hanem gátlásuk is aktiválhatja az apoptotikus útvonalat. Limfocitákban írták le például, hogy a Kv1.3 csatornák kölcsönhatásba léphetnek a mitokondriumokba transzlokálódott BAX molekulákkal. Ennek eredményeként a Kv1.3 csatorna záródik, a MMP nő, ami fokozza a reaktív oxigén intermedierek [reactive oxygen species (ROS)] termelését. Az emelkedett ROS-produkció, vélhetően az MPTP összeszerelődése és aktiválódása által, citokróm *c*-felszabadulást eredményez, ami elindítja az intrinzik apoptózist [Szabó és mtsai. 2008]. A nagykonduktanciájú kalciumfüggő káliumcsatornák esetében is felvetettek hasonló mechanizmust [Cheng és mtsai 2011]. A mitokondriális K_{Ca}3.1-nek szerepe lehet a sejt belüli kalciumszignalizáció és a MMP közötti kapcsolat megteremtésében [De Marchi és mtsai. 2009]; a K_{ATP}-csatornáknak pedig az ischémiás prekondicionálásban tulajdonítanak szerepet [Yongge és mtsai. 1999].

Az utóbbi években számos megfigyelés történt a TASK-3 csatornák tumorigenezisben betöltött szerepére vonatkozóan. A megfigyelések egy része a csatorna tumorképződést elősegítő szerepét valószínűsíti, aminek hátterében az apoptózis gátlása állhat. Ezek a publikációk például a TASK-3-at kódoló gén (KCNK9) amplifikációját és a csatornafehérje overexpresszióját igazolták egyes malignus tumorokban és malignusan transzformált sejtvonalakban [Mu és mtsai 2003; Pei és mtsai 2003]. Figyelemre méltó megállapítás, hogy csak a funkcionális (azaz káliumra permeabilis) TASK-3 csatorna rendelkezik tumorigén hatással [Pei és mtsai 2003], ami azt a látszatot kelti, hogy a tumorképződést elősegítő szerep a csatornán keresztül történő tényleges káliummozgással kell legyen összefüggésben.

A TASK-3 csatornák szerepére vonatkozó elképzeléseket bővítik kutatócsoportunk korábbi adatai, melyek a TASK-3 csatorna intracelluláris elhelyezkedését és mitokondriumokkal való kolokalizációját igazolják [Pocsai és mtsai 2006, Rusznák és mtsai 2008]. Ezen megfigyelések alapján felmerült annak lehetősége, hogy a TASK-3 csatornák hasonló módon befolyásolhatják a mitokondriális működést, mint a korábban leírt egyéb mitokondriális káliumcsatornák. Ezen feltételezést támogatja az az újkeletű megfigyelés, ami keratinocitákban vetette fel a TASK-3 csatornák mitokondriális jelenlétét [Toczyłowska és mtsai. 2014].

Munkacsoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy a melanoma sejtek TASK-3 expressziójának gátlása a mitokondriumok működésének károsodását, és végső soron a sejtek

pusztulását idézi elő [Kosztka és mtsai 2011]. Ezen megfigyelés tükrében indokoltnak láttuk azon lehetséges útvonalak felderítését, amelyek révén a mitokondriális TASK-3 csatornák elősegíthetik a melanoma sejtek túlélését.

1.6.3. Az intracelluláris kalciumhomeosztázis

A citoplazmatikus kalciumionok az egyik legáltalánosabb jelátviteli útvonal központi elemei. Az ion citoplazmatikus koncentrációja a sejt nyugalmi állapotában a 10^{-8} mol/l-es nagyságrendben van; szöges ellentétben az extracelluláris tér és a sejtben található kalciumraktárak nagyságrendekkel magasabb kalciumkoncentrációjával (10^{-3} mol/l). Ebben a helyzetben akár a sejtfelszíni, akár a raktárakat elhatároló membránok kalciumpermeabilitásának minimális növekedése is azt eredményezi, hogy kalciumionok kerülnek a citoplazmába, akár egy teljes nagyságrenddel megnövelve ott mérhető koncentrációjukat. Ez a citoplazmatikus kalciumkoncentráció-emelkedés az a jel, ami megváltoztathatja számos intracelluláris folyamat aktivitását.

A citoplazmában megjelenő kalciumionok forrása lehet az extracelluláris tér, ahonnan a belépés történhet feszültségvezérelt és mechanoszenzitív kalciumcsatornákon vagy kalciumpermeábilis ionotrop receptorokon keresztül. A másik forrást az intracelluláris kalciumraktárak képezik, melyek közül a legnagyobb tároló kapacitással az endoplazmatikus (izomsejtekben: szarkoplazmatikus) retikulum rendelkezik. A raktárakból történő kalciumfelszabadulás rianodin és IP_3 -receptorokon (csatornákon) keresztül megy végbe; előbbiek nyitvatartási valószínűségének legfontosabb szabályozója maga a kalcium, utóbbiaké pedig az inozitol-triszfoszfát (IP_3) molekula.

A citoplazmatikus kalciumszintnek akkor lehet hatékony szabályozó szerepe, ha a koncentráció emelkedését annak gyors normalizálódása követi. Ez átmenetileg bekövetkezik a kalciumionok citoplazmatikus pufferfehérjék (pl. parvalbumin, calbindin, calretinin) általi megkötésével; hosszú távon azonban gondoskodni kell a citoplazmába került kalciumionok tényleges eltávolításáról. Ennek egyik lehetősége az extracelluláris térbe juttatás, aminek céljából minden eukarióta sejt rendelkezik ATP-függő kalciumpumpával. Azok a sejttypusok, amelyek működésében a kalciumszignalizáció különösen jelentős (pl. szívizomsejtek, neuronok), felszínükön nátrium-kalcium kicserélődési mechanizmussal is rendelkeznek. A citoplazmatikus kalcium eltávolításának másik lehetősége az endoplazmatikus retikulumba (ER) történő visszajuttatás; ezt a feladatot a raktárak membránjában található kalciumpumpa biztosítja [SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATP-ase)].

A külső térből történő kalciumbelépés speciális esete az ún. store-operated calcium entry mechanizmus (SOCE), ami kapcsolatot teremt a két kalciumforrás között. A folyamat lényege, hogy az ER kalciumtartalmának csökkenése a STIM-1 (stromal interaction molecule 1) – CRAC (calcium release-activated calcium channel protein) rendszeren keresztül kalciumbelépést hoz létre a felszíni membránon keresztül [Stathopulos és mtsai. 2013].

A sejtek intracelluláris kalciumhomeosztázisának tárgyalása során szükséges megemlékezni a mitokondriumok kettős szerepéről is. Úgy tűnik ugyanis, hogy ez a sejtorganelum a citoplazmatikus kalciumkoncentrációtól függően kalciumionok felszabadítására és visszavételére egyaránt képes [Williams és mtsai. 2013]; azaz egyfajta puffer szerepet tölt be. A mitokondriális kalciumfelvételt a belső membránban található nagy kapacitású–alacsony affinitású kalciumpumpa hozza létre.

A kalciumionok központi jelentősége több sejtfunkció szabályozásában is ismert. Ezek közül a két legalaposabban vizsgált terület a Ca^{2+} jelentősége az izomkontrakció és a neuroneurotranszmitter-felszabadulás szabályozásában. Egyre több adat utal ugyanakkor a kalciumionok jelentőségére a sejtek anyagcseréjében, növekedésében és proliferációjában. Ezek a hatások természetesen egymással összefüggenek. A kalcium emeli például egyes metabolikus enzimek aktivitását [Gunter és Gunter 2001], fokozva ezáltal az ATP termelését, ami biztosítja az energiaszükségletet a sejtek működéséhez és proliferációjához. Ennek a szabályozási útvonalnak mindamellett veszélyei is vannak. A túlzott mértékű kalciumfelvétel ugyanis olyan mértékű ROS-képződést okozhat, ami a sejt pusztulását eredményezheti, mivel a termelődött ROS és a mitokondriumok által felvett kalcium hatására fokozódik a mitokondriális membrán MPTP expressziója. A korábbiakban ismertetett okok miatt a fokozott MPTP expresszió a belső mitokondriális membrán permeabilitásának fokozódását okozza, aminek következtében aktiválódik az apoptózis intrinzik útvonala [Szabó és mtsai. 2008; Bernardi és Rasola 2007]. Ezen információk tükrében nem meglepő, hogy a mitokondriumok rendelkeznek olyan mechanizmusokkal, amik a túlzott kalciumfelvétellel szemben jelentenek védelmet [Giorgi és mtsai. 2009]. Irodalmi adatok alapján ezt a védelmet az ER és a mitokondriumok együttműködése biztosítja, például a mitokondriális Bcl-2 és Bcl-Xl molekulák, valamint az ER IP_3 -receptorainak kölcsönhatása révén [Chen és mtsai 2004].

A kalciumionok több támadásponton is képesek befolyásolni a sejtciklust. Kimutatták például, hogy a Ras molekulacsalád tagjainak aktivitása függ az intracelluláris kalciumkoncentrációtól. A Ras molekulacsalád tagjai képesek aktiválni a MAPK (mitogen-activated protein kinases) és PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) kaskádokat, ezáltal a sejtosztódás folyamatát [Vidwans és mtsai 2011]. A kalciumionok

ugyanakkor a sejtmagban is hathatnak, ahol változásokat indukálhatnak a génexpresszióban és fázisváltásokat hozhatnak létre a sejtciklusban [Resende és mtsai. 2013]. Felmerül ugyanakkor a kérdés, hogy ezeknek a hatásoknak lehet-e szerepük a daganatos sejtekre jellemző megnövekedett proliferációs és migrációs képesség kialakításában.

Az eddigi adatok alapján úgy tűnik, a daganatos sejtek kalciumhomeosztázisának nincs olyan eleme, amelyik specifikusan csak bennük jelenne meg. Más szavakkal, a tumorsejtek ugyanazon mechanizmusokkal szabályozzák kalciumháztartásukat, mint az egészségesek, jóllehet módosult biológiai jelentőséggel. Úgy gondolják például, hogy a tumorgenezis során a Warburg-effektus (ti. a glikolitikus ATP-termelésre való átállás) az oxidatív anyagcsere mérséklése és a mitokondriumoknak a ROS termékekkel és kalciummal való túlterhelésének megelőzése érdekében történik [Roderick és Cook 2008]. A változás mindemellett a hipoxiás környezethez történő alkalmazkodás szempontjából is előnyös.

A daganatsejtekben a kalciumhomeosztázis számos eleme járul hozzá a Ras és a hozzá kapcsolódó szignalizációs rendszerek aktivitásának fokozásához, segítve ezáltal a sejtproliferációt [Ebinu és mtsai. 1998; New és Wong 2007; Yang és mtsai. 2009]. Kimutatták például, hogy az ER megfelelő mértékű kalciumtartalma, és ezzel egyidejűleg a folyamat szempontjából optimális intracelluláris kalciumkoncentráció szükséges a G1/S és G2/M fázisátmenetekhez. Ezzel magyarázható, hogy a SERCA pumpa [Legrand és mtsai. 2001] vagy a kalciumbelépés gátlása [Panner és Würster 2006] megakasztja a sejtciklust, és ezáltal lassítja a tumorsejtek proliferációját.

A fentiekben leírtak értelmében a Ras-aktivitás kalciumionok okozta fokozódása a MAPK kaszkád aktiválása mellett [Campbell és mtsai. 1998] serkenti a PI3K útvonal működését is [Engelmann és mtsai 2006], elősegítve ezzel mind a migrációt, mind az áttétképződést [Dhillon és mtsai 2007]. Ugyanerre a következtetésre jutottak Vidwans és munkatársai is, akik a PI3K kaszkádban is szerepet vállaló protein kináz B (PKB) és mTOR [mechanistic target of rapamycin (szerin/treonin-kináz)] molekulákat összefüggésbe hozták a melanoma sejtek metasztatizisképző képességével [Vidwans és mtsai. 2011]. Az adatok alapján feltételezhető, hogy ezen útvonalak farmakológiai befolyásolása módosíthatná (optimális esetben csökkenthetné vagy megszüntethetné) a melanoma sejtek migrációját, invazivitását és áttétképzését.

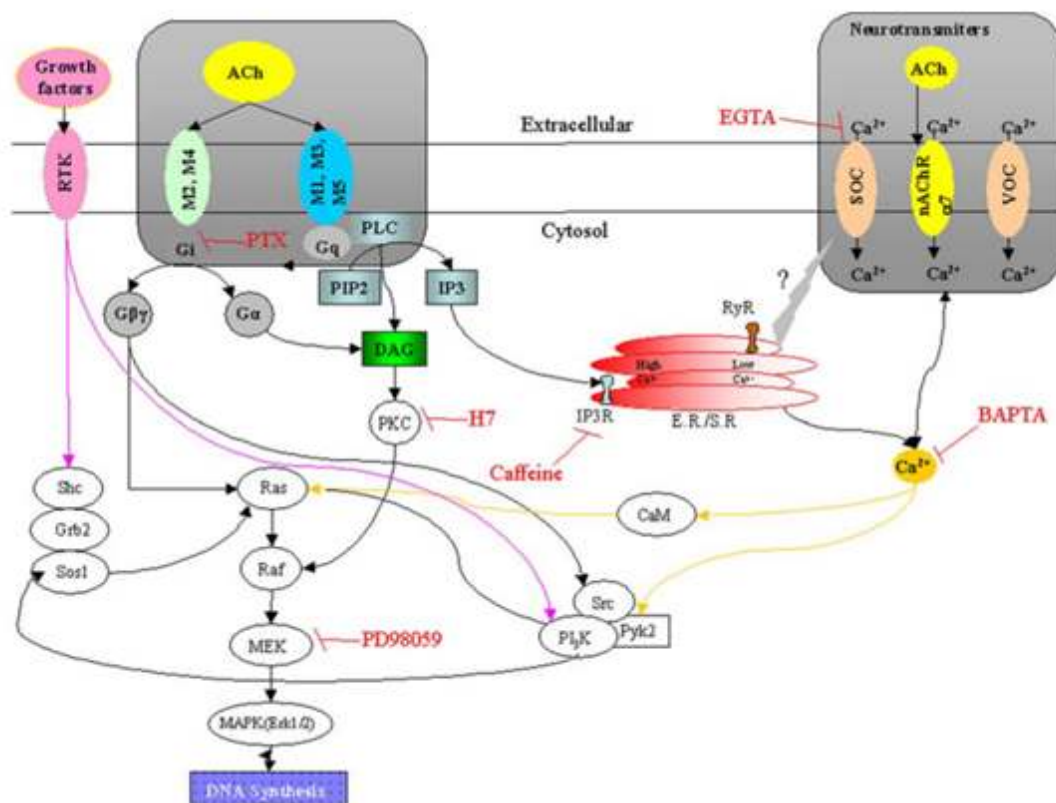
Jóllehet jelenlegi tudásunk nem teszi lehetővé, hogy a releváns kísérleti eredményeket egységes elméletté alakítsuk, széleskörű egyetértés van abban, hogy a kalciumionok döntő mértékben szabályozzák a melanoma sejtek túlélését, proliferációját, migrációját és áttétképzését [Tsuruo és mtsai. 1985; Martinez-Zaquilan és mtsai. 1998]. Közvetlen

bizonyítékot találtak arra vonatkozóan például, hogy az intracelluláris kalciumkoncentráció határozza meg a melanoma sejtek motilitásának mértékét [Cox és mtsai. 2002; Chantome és mtsai. 2009]. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani az a megfigyelés, hogy a muszkarinos kolinerg jelátvitel, és ezáltal az intracelluláris kalciumkoncentráció következményes változása, több tumorfeleség esetében is jelentős mértékben befolyásolja a malignitást [Batra és mtsai. 1993; Williams és mtsai. 1993; Oppitz és mtsai. 2002].

1.6.4. A kolinerg szignalizáció és a muszkarinos acetilkolin receptorok

A kolinerg szignalizáció egy összetett rendszer, ami egyaránt tartalmaz ionotróp (nikotinos) és metabotróp (muszkarinos) receptorokat. A nikotinos receptorok más csoportosítás szerint ligand vezérelt ioncsatornák, amelyek a ligand (pl: acetyl-kolin) kötődésének hatására nyitott állapotba kerülnek. Ez a csatorna egy nem-szelektív kationcsatorna, mely kálium-, nátrium- és kalciumionokra nézve is permeabilis. A nikotinos receptoroknak fontos szerepük van az elektromechanikai kapcsolatban.

A muszkarinos acetilkolin receptorok (MR) legismertebb szerepe egyes vegetatív idegrendszeri hatások megfelelő célsejtekre történő átvitele. A MR-oknak 5 altípusa ismert, ezek közül a páratlan számúak (MR1, MR3 és MR5) a célsejtek IP_3 termelését fokozzák, ami végső soron kalciumfelszabadulást hoz létre az ER-ből. A páratlan számú receptor altípusok jelátviteli folyamatai során a foszfo-lipáz-C (PLC) az IP_3 mellett diacylglicerint (DAG) is termel. A DAG a PKC aktivitás szabályozásán keresztül a sejt működést is befolyásolhatja (lásd 3. ábra). Ezen receptorokkal ellentétben az M2 és M4 receptorok aktiválódása az intracelluláris cAMP-koncentráció csökkentése által befolyásolja a célsejtek működését. Ezek a receptor altípusok más G-fehérjéket aktiválnak, mint a páratlan számúak: míg a 2-es és 4-es altípus jelátviteli útvonalait a G_i fehérje aktivációja indítja el, addig az M1, M3 és M5 receptor aktivációt G_q fehérje aktivitás fokozódása követi.



3. ábra: Kolinerg szignalizáció szerepe a sejtproliferációban. A kolinerg szignalizáció metabotróp muszkarinos és ionotróp nikotinos receptorok összességét jelenti. A kolinerg agonisták (pl: acetyl-kolin) által aktivált nikotinos receptor az aktivációt követően ioncsatornaként működik és rajta kalciumionok is bejutnak a citoszolba. A muszkarinos receptorok altípustól függően más és más G –fehérjéket aktiválnak. Az M1, M3 és M5 által aktivált IP₃ útvonal a sejtek belső raktárából kalciumot szabadít fel. Emellett ezek a receptorok a DAG keletkezésén keresztül a PKC-t aktiválva közvetlen módosítja a MAPK útvonal részét képező Raf aktivitását. Az M2 és M4 receptorok által aktivált útvonalak közvetlenül a RAS aktivitását változtatják meg. Az intracelluláris kalciumkoncentráció emelésén keresztül a kolinerg receptorok közvetve a RAS és PI3K útvonalak aktivitását fokozhatják. A MAPK és PI3K útvonalak a sejtproliferáció és sejtciklus szabályozásában játszanak fontos szerepet [Resende és Adhikari 2009].

A muszkarinos receptorok jelentőségét több tumorfeleségben leírták. Megállapították például, hogy egyes tüdő tumor eredetű sejtvonalakban az MR3 fokozza a MAPK kaszkád aktivitását és következményesen a sejtek proliferációját. Emellett a receptort összefüggésbe hozták olyan génexpresszió-változásokkal is, amik jelentőséggel bírnak a metasztázisok kialakításában. Figyelmet érdemel például, hogy M3 géncsökkentést követően a foszfo-PKB szintjének csökkenését tapasztalták, miközben a teljes PKB fehérjemennyiség változatlan maradt [Lin és mtsai. 2014]. A feltételezett összefüggést valószínűsíti, hogy az PKB – a PI3K kaszkád többi molekulájával együtt – melanoma sejtekben is szerepet játszik az áttétek kialakításában [Vidwans és mtsai 2011]. Egyes végbél tumorok esetében jelentős MR3

overexpressziót figyeltek meg. Leírtak továbbá olyan esetet, amikor fokozott szérumacetilkolin-koncentráció volt detektálható, ami az MR3-on keresztül hatva fokozta a tumor növekedését [Rosevinge és mtsai 2013]. Emlőtumorok esetében a tumor vaszkularizációjának mértékével hozták összefüggésbe a MR-okat [Lombardi és mtsai. 2013].

A melanoma malignum nagymértékű invazivitásának megértése érdekében végzett kutatások felfedték, hogy a melanoma sejtek a muszkarinos kolinerg szabályozási útvonal számos elemét expresszálják [Lammerding-Köppel és mtsai. 1997; Sailer és mtsai. 2000]. Figyelembe véve azt a tényt, hogy az embriogenezis során a muszkarinos jelátvitelnek fontos szerepe van a melanocita prekursor sejtek vándorlásában [Oettling és mtsai. 1988], indokolt feltételezni, hogy a MR-ok és a hozzájuk kapcsolódó szignalizációs útvonalak a melanoma sejtek viselkedésének meghatározásában is fontos szerepet játszhatnak. Ennek az elképzelésnek a megalapozottságát erősíti az a tény, hogy felnőtt melanocitákban mind az öt MR altípus expresszióját kimutatták [Buchli és mtsai. 2001]. E megfigyelések alapján elképzelhető, hogy a melanociták rosszindulatú elfajulása során a sejtek proliferációs és migrációs hajlama azért fokozódik, mert a bennük megtalálható és aktív muszkarinos kolinerg szabályozási rendszer visszanyeri embrionális jellegét [Lammerding-Köppel és mtsai. 1997; Sailer és mtsai. 2000; Oppitz és mtsai. 2008].

A muszkarinos kolinerg szignalizációs útvonal jellemzőinek és szerepének meghatározására tett erőfeszítések eredményei azt sejtetik, hogy a folyamatban különös jelentősége lehet a citoplazmatikus kalciumkoncentráció emelkedésének. Ez az elképzelés olyan kísérleti megközelítéseken alapul, amelyekben kolinerg agonistákat alkalmaztak, és a citoplazmatikus kalciumkoncentráció következményes változásait mérték [Sailer és mtsai 2000; Buchli és mtsai. 2001; Noda és mtsai. 1998; Kohn és mtsai. 1996]. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a ténnyel, hogy egyes MR-ok a foszfolipáz C – IP₃ – kalciumfelszabadulás útvonalra hatnak, ezáltal különféle kalciumfüggő mechanizmusokat aktiválhatnak. Kimutatták azt is, hogy az extracelluláris térből történő kalciumbelépés hozzájárul más kolinerg válaszokhoz, beleértve az arachidonsav-felszabadulást és a cAMP citoplazmatikus akkumulációját [Kohn és mtsai 1996].

Annak ellenére azonban, hogy a muszkarinos receptor–kalcium homeosztázis szabályozási útvonalaknak láthatóan fontos szerepük van a tumorsejtek, ezen belül a melanoma sejtek biológia folyamatainak meghatározásában (lásd pl. [New és Wong 2007]), továbbra sincs egyetértés a kolinerg hatások melanoma malignumra gyakorolt pontos hatásait illetően.

2.Célkitűzések

TASK-3-mal kapcsolatos célkitűzéseink

Stabilan transzfektált TASK-3 géncsendesített WM35 sejtvonal kialakítása.

Tranziens TASK-3 géncsendesítés invazívabb A2058 melanoma sejtvonalon.

A géncsendesítés ellenőrzése a TASK-3 specifikus RNS és a csatornafehérje kimutatásával (PCR, western-blot).

A TASK-3 géncsendesítés mitokondriális membránpotenciálra gyakorolt hatásának vizsgálata.

A sejtek számát, életképességét és morfológiáját jellemző paraméterek meghatározása.

Az apoptózis mértékében bekövetkező változások regisztrálása.

Muszkarinos kolinerg szignalizációval kapcsolatos célkitűzéseink

Muszkarinos receptorok expressziójának vizsgálata primer és metasztatikus eredetű sejtvonalakon.

A sejtvonalak karbamil-kolinnal szembeni érzékenységének vizsgálata.

A karbamil-kolin alkalmazás hatására kialakuló kalcium tranziensek időbeli lezajlásának tanulmányozása.

A kalcium tranziensek kialakulásához szükséges kalciumforrás meghatározása.

3. Metodika

3.1. Sejtenyésztés

A jelen disszertációban bemutatott kísérletekben négy humán melanoma sejtvonalat használtunk. Egy sejtvonal primer tumorból származott [WM35, Fabricant és mtsai. 1977], három pedig metasztatikus eredetű volt [HT168-M1, HT199 és A2058; Ladányi és mtsai, 1995; Lu és mtsai, 1993; Tímár és mtsai, 1999]. A sejteket RPMI-1640 tápoldatban (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Ausztria), 37°C-on, 5% CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett tenyésztettük. A tápoldatot 10% foetalis borjúsérummal, 2 mmol/l L-glutaminnal, 50 U/ml penicilinnel, 50 µg/ml sztreptomicinnel és 1,25 µg/ml fungizonnal (TEVA, Debrecen, Magyarország) egészítettük ki. A vegyszereket, ha az nincs másként említve, a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk (St. Louis, MO, USA).

3.2. TASK-3 géncsendesített melanoma sejtvonalak előállítása

Egyik korábbi munkánk keretében már készítettünk és teszteltünk egy TASK-3-specifikus shRNS plazmidot, melynek specificitását és alkalmazhatóságát részletesen dokumentáltuk [Kosztka és mtsai, 2011]. Jelen kísérleteinkhez ugyanezt a plazmidot használtuk.

A felhasználni kívánt dupla szálú DNS inzerteket és azok komplementer szekvenciáit (sense: 5' GCTCC TTCTACTTTGCGATCA, antisense: 5' TGATC GCAAA GTAGA AGGAGC) a TASK-3-specifikus shRNS kazettából állítottuk elő. Kontrollként egy olyan inzertet készítettünk, ami egyetlen humán expressziós kaszkáddal sem interferáló, kevert (scrambled) szekvenciát tartalmazott (sense: 5' TCTCC GGTAC ACTTC TTGATC, antisense: 5' GATCA AGAAG TGTAC CGGAGA). A fenti inzerteket pRNAT-H1.1/Neo expressziós vektor BamH I és Hind III pontjai közé ligáltuk, majd a plazmidokat *E. coli* sejtekbe jutattuk. Az alkalmazott plazmid az ampicillin elleni rezisztencia génjét is tartalmazta, ami lehetővé tette a sikeresen transzformált baktériumtörzsek szelekcióját.

A sikeresen transzformált, azaz ampicillinrezisztenciát mutató baktériumtörzseket kiválogattuk, és az egyedi kolóniákból plazmid DNS-t preparáltunk. Az inzertek jelenlétét BamH I és Hind III emésztést követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Amennyiben az inzertnek megfelelő sáv jelen volt a gélképen, az inzert jelenlétének egyértelmű bizonyítása végett az adott kolóniából származó mintákon szekvenálási reakciót is végeztünk.

A TASK-3-specifikus és a scrambled shRNS-t tartalmazó vektorkonstrukttal WM35 és A2058 melanoma sejteket transzfektáltunk, amihez Lipofectamine 2000

transzfekciós reagenst használtunk (Invitrogen, Life Technologies, New York, NY, USA). A transzfekció után az A2058-as sejteket 4 napig RPMI tápoldatban tenyésztettük. A WM35 tenyészetek esetében klónszelekciót végeztünk, aminek céljából a transzfekció után két nappal 1 g/l geneticin-szulfátot (Roche, Mannheim, Németország) adtunk az RPMI oldathoz. Ebben a közegben csupán a transzfektált sejtek éltek túl. A szelekciót követően az egyedi klónok közül RT-PCR és Western-blot technika alkalmazásával választottuk ki azokat, amikben a TASK-3 expressziója a legerőteljesebben csökkent. A sikeresen transzfektált WM35 tenyészeteket a továbbiakban geneticin-tartalmú tápoldatban tenyésztettük.

3.3. RT-PCR

A transzfektált és nem-transzfektált sejt kultúrákból teljes RNS-frakciót izoláltunk, amihez Trizol reagenst (Ambion, Life Technologies) és Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitet (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmaztunk. Az Omniscript RT Kit (Qiagen) felhasználásával mintánként 1 µg izolált RNS-ből reverz transzkripciót végeztünk. A TASK-3-specifikus cDNS szekvenciákat 5'GGGAAGTACAACATCAGCAGC (sense) és 5'CCGAACCCAATGGTAGTCAA (antisense) primerek felhasználásával erősítettük fel. A PCR reakcióelegy 50 µl mennyisége a reakciópuffer mellett 2 µl sense és 2 µl antisense primert, 1 µl 200 µmol/l koncentrációjú dNTP-t, valamint 2,5 U GoTaq® DNA-polimerázt (Promega, Madison, WI, USA) tartalmazott. A mintákban jelenlévő TASK-3-specifikus szekvenciák sokszorozása céljából a reakcióelegyet denaturáltuk, majd 35 PCR ciklusnak vetettük alá. A ciklus minden eleme három fázist tartalmazott: denaturálás (94°C, 60 s), primerkötődés (62°C, 60 s) és lánchosszabbítás (72°C, 90 s). Az utolsó ciklust követően a mintát még 10 percen át 72°C-on tartottuk, ami további lánchosszabbításra adott lehetőséget. A PCR reakciót egy Bio-Rad C-1000 típusú készülékben hajtottuk végre (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Minden minta esetében sor került a β -aktin-expresszió meghatározására is, amihez β -aktin-specifikus primereket használtunk (sense: 5'CCAACCGCGAGAAGATGA, antisense: 5'CGTGGATGCCACAGGACT). A primereket a Primer Premier szoftverrel terveztük (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA). A β -aktin-specifikus primert tartalmazó elegyet a következő PCR programnak vetettük alá: denaturálás (95°C, 2 perc), 35 PCR ciklus [denaturálás (94°C, 30 s); primerkötődés (54°C, 30 s) és lánchosszabbítás (72°C; 60 s)], végül egy újabb lánchosszabbítási fázis (72°C, 6 perc). A negatív kontroll kísérletekben a cDNS-t nukleázmentes vízre cseréltük. A PCR termékeket EZVision DNS-jelölő festékkel elegyítettük (Amresco, Solon, OH, USA), majd 1,5%-os agaróz gélben futtattuk. A géképét

Fujifilm Labs-3000 dark box alkalmazásával digitalizáltuk (Fujifilm, Tokyo, Japan), majd azon denzitometriás analízist végeztünk (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA). A TASK-3-specifikus sávokhoz tartozó intenzitásértékeket mindenkor a nekik megfelelő β -aktin-specifikus sávokra normalizáltuk.

3.4. Western-blot

A transzfektált és nem-transzfektált melanoma sejt kultúrákból teljes sejtes lizátumot készítettünk, majd a mintákon Western-blot analízist végeztünk. A sejt lizátum készítéséhez lízispuffert használtunk, aminek összetétele a következő volt: 20 mmol/l TRIS-HCl, 5 mmol/l etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 1 mmol/l 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid és 20 μ mol/l leupeptin ($pH = 7,5$). Elsőként meghatároztuk a minták fehérjetartalmát (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), majd a lizátumhoz 1/5 térfogatú, 5 $\times$ -ös töménységű elektroforézis mintapuffert adtunk. A mintapuffer 310 mmol/l Tris-HCl-t, 10% SDS-t, 50% glicerint, 100 mmol/l 1,4-ditiotreitol és 0,01% brómfenolkéket tartalmazott ($pH = 6,8$). A mintát 5 percen át 80°C-on tartottuk, majd mintánként 20–50 μ g fehérjét vittünk fel az egyes oszlopokra. A mintákat 7,5%–15%-os akrilamid-gélen futtattuk. Az elválasztás után a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át (Bio-Rad). A membránhoz kötődött fehérjéket 5% tejport tartalmazó foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS, $pH = 7,4$) blokkoltuk 30 percig. A primer antitestet (1. táblázat) egy éjszakán át hagytuk a membránon (4°C). Mosás után (3 $\times$ 10 perc) tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel történő inkubáció következett (1 h, szobahő).

Az immunreaktív sávokat Pico vagy Femto detektáló kit alkalmazásával (Thermo Scientific), kemilumineszcens módon tettük láthatóvá, majd a specifikus csíkokat Fujifilm Labs-3000 dark box segítségével digitalizáltuk. A fehérjeexpresszió kvantifikálásához háttérkorrigált denzitometriát végeztünk (ImageJ). A TASK-3-specifikus sávok optikai denzitását mindig ugyanazon minták β -aktin-specifikus sávjaira normalizáltuk.

1. táblázat: Az alkalmazott antitestek tulajdonságai

Elsődleges antitestek

Az antitest specificitása	Az alkalmazott hígítás	A faj, amiben termeltetve lett	Gyártó
S100 fehérje	1:100	egér	Sigma ^a
AIF	1:200	nyúl	Santa Cruz ^b
β-aktin	1:200	nyúl	Santa Cruz
MR1	1:200	nyúl	Sigma
MR3	1:200	nyúl	Sigma
TASK-3	1:200	nyúl	Alomone ^c
SDHA	1:200	nyúl	Abcam ^d
GAPDH	1:200	nyúl	Novus ^e
Citokróm <i>c</i>	1:200	egér	Santa Cruz

Másodlagos antitestek

Az antitest specificitása és a konjugált fluorofór típusa	Az alkalmazott hígítás	A faj, amiben termeltetve lett	Gyártó
Nyúl IgG–FITC	1:500	kecske	Vector ^f
Egér IgG–FITC	1:500	kecske	Sigma
Nyúl IgG–HRP	1:500–1:1000	kecske	Bio-Rad
Egér IgG–HRP	1:500–1:1000	kecske	Bio-Rad
Egér IgG–Texas Red	1:500	ló	Vector
Nyúl IgG–Cy5	1:500	kecske	Life Technologies ^h

^aSigma, Saint Louis, MO, USA

^bSanta Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

^cAlomone Labs, Jerusalem, Israel

^dNovus Biologicals, Cambridge, UK

^eAbcam, Cambridge, UK

^fVector, Burlingame, CA, USA

^gBio-Rad, Philadelphia, PA, USA

^hLife Technologies, Carlsbad, CA, USA

Rövidítések: AIF: apoptózist indukáló faktor; MR1: muszkarinos receptor, 1. altípus; MR3: muszkarinos receptor, 3. altípus; TASK-3: TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel; SDHA: szukcinát-dehidrogenáz, A alegység; GAPDH: glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz; FITC: fluoreszcein-izotiocianát; HRP: torma-peroxidáz; Cy5: cianin5.

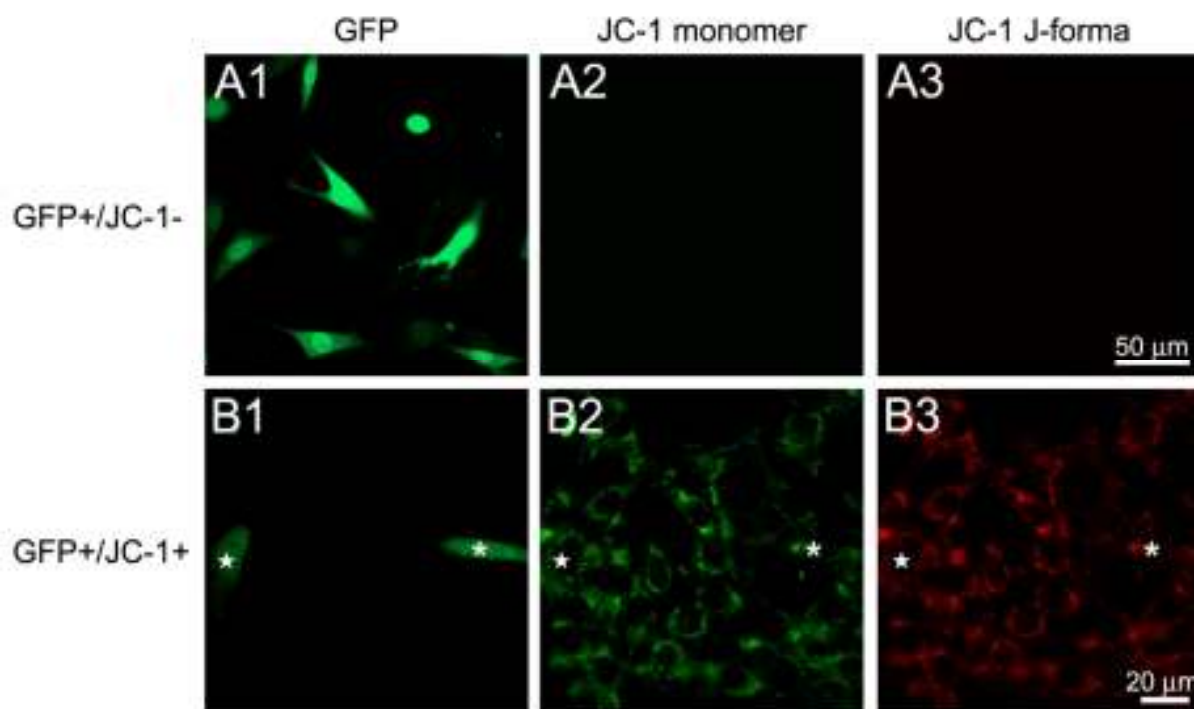
3.5. A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál (MMP) tanulmányozásához a kísérletek egy részében JC-1 fluoreszcens festéket használtunk (1-[(1,3-dietil)-(5,6-diklór)-benzoimidazólium]-3-[(1,3-dietil)-(5,6-diklór)-benzoimidazol]-prop-1-én-jodid, Invitrogen). A JC-1 a nem funkcióképes vagy nem aktív (azaz depolarizált) mitokondriumokban monomer állapotban van jelen; erősen polarizált, azaz funkcióképes és aktív mitokondriumok belsejében pedig ún. J-aggregátumot képez. 485–515 nm hullámhosszúságú fénnnyel gerjesztve a monomer forma emissziós maximuma 530 nm-en, míg a J-aggregátumé 595 nm-

en regisztrálható [Perelman és mtsai, 2012]. Előbbi zöld, utóbbi narancssárga-piros színnek felel meg.

A JC-1 alkalmazásával végzett kísérletek elvégzését megelőzően a festéket dimetilszulfoxidban (DMSO) oldva 2,5 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A kísérletek során a törzsoldatot RPMI-1640 tápoldattal 5 µg/ml végkoncentrációra hígítottuk. A festékoldat 2,5 mmol/l probenecidet és 10% marhaszérumból izolált albumint (BSA) is tartalmazott.

A melanoma sejteket 12 mm vagy 30 mm átmérőjű fedőlemezekben, 60–90%-os konfluenciáig tenyésztettük. A lemezeket 30 percig JC-1-tartalmú, majd újabb 30 percig festékmentes, de probenecidet tartalmazó RPMI-oldatban 37°C-on inkubáltuk. A töltés végeztével a fedőlemezeket festékmentes inkubáló oldatban a mérőkamrába helyeztük. A fluoreszcens felvételeket Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkóppal készítettük (Zeiss, Oberkochen, Németország).



4. ábra: A JC-1- és GFP-specifikus, zöld színnek megfelelő fluoreszcenciaemisszió elkülönítése. [A1–A3] GFP-t expresszáló sejteket tartalmazó, JC-1-mentes sejt kultúra. [A1] A GFP-specifikus beállítás mellett kapott kép (gerjesztés: 488 nm; emisszió: 500–515 nm). [A2] A JC-1 monomerre specifikus beállítás alkalmazásával készült felvétel (gerjesztés: 514 nm; emisszió: 530–545 nm). [A3] A J-aggregátumra specifikus beállítással kapott kép (gerjesztés: 514 nm; emisszió: 580–620 nm). [B1–B3] Rendre ugyanazon beállítások, mint az [A1–A3] képek esetén, azzal a különbséggel, hogy az itt látható sejteket előzőleg JC-1-gyel töltöttük fel. A csillagok két GFP-specifikus emissziót is mutató sejtet jelölnek. Megállapítható, hogy a GFP-

specifikus emisszió nem látható sem a JC-1 monomerre, sem a J-aggregátumra specifikus mérési körülmények között.

A JC-1 alkalmazásával végzett kísérletek során egy olyan problémával kerültünk szembe, amire a konfokális mérések paramétereinek körültekintő megválasztása volt a megoldás. A probléma lényege, hogy a TASK-3 fehérje szintézisének gátlása céljából a sejtekbe juttatott nukleotidszekvencia tartalmazott egy olyan részt, amelyik a zöld-fluoreszcens fehérjét (GFP) kódolta. Ezen elrendezés előnye kézenfekvő: a sikeresen transzfektált sejtekben szintetizálódó GFP jelenléte magától értetődővé teszi a transzfektált (azaz TASK-3 géncsendesített) klónok azonosítását. A nehézséget az okozta, hogy a GFP és a JC-1 spektrális tulajdonságai hasonlóak, így a GFP jelenléte befolyásolhatta volna a JC-1 mérések kivitelezhetőségét. A gondok áthidalása érdekében szükségessé vált a gerjesztési és emissziós hullámhosszak optimális megválasztása. Az általunk használt elrendezés paramétereit és azok alkalmazhatóságát a 4. ábra demonstrálja. A bemutatott felvételek alapján nyilvánvaló, hogy az általunk megválasztott hullámhosszak alkalmazásával elkerülhető volt a GFP- és JC-1-eredetű fluoreszcenciák interferenciája.

A konfokális felvételek elkészítéséhez 40×-es nagyítású és 1,3-as numerikus apertúrájú C-Plan Neofluar olajimmerziós objektívet használtunk. Az egyedi képek optikai szeletvastagsága 2,5 µm, nagysága pedig 512 pixel × 512 pixel volt. Bizonyos esetekben nagyobb nagyítású, 1 µm-es optikai vastagságú képek is készültek, amit 3×-os szoftveres nagyítással állítottunk elő. A fluoreszcenciaintenzitások számszerűsítését az ImageJ programmal végeztük. A MMP jellemzése érdekében az egyedi melanoma sejteket különálló területekként („region of interest”, ROI) jelöltük ki. Egy ROI teljes területén meghatároztuk a háttérkorrigált zöld és piros fluoreszcenciaintenzitásokat, majd a MMP értékét a háttérkorrigált piros/zöld fluoreszcenciaintenzitás arányával jellemeztük. Jóllehet munkánk során nem tettünk kísérletet arra, hogy a fluoreszcenciaintenzitások arányát tényleges feszültségértékre kalibráljuk, a kapott értékek bemutatása és értelmezése során a MMP kifejezést fogjuk alkalmazni.

Mivel a mért fluoreszcenciaintenzitás-értékek függnek a sejtek által felvett festék mennyiségétől, lehetőség nyílt a festékfelvétel (FF) mértékének becslésére, amit az alábbi összefüggés alkalmazásával végeztünk:

$$FF = \frac{Sejt_{piros} - H\acute{a}tt\acute{e}r_{piros}}{H\acute{a}tt\acute{e}r_{piros}} + \frac{Sejt_{z\acute{o}ld} - H\acute{a}tt\acute{e}r_{z\acute{o}ld}}{H\acute{a}tt\acute{e}r_{z\acute{o}ld}} \quad (1)$$

Míg a JC-1 festék bemutatott alkalmazása egyes sejtek esetében tette lehetővé a MMP vizsgálatát, a 1-[(3-hexil)-benzooxazólium]-3-[(3-hexil)-benzooxazol]-prop-1-én-jodid [DiOC6(3), a későbbiekben csak DiOC6] nevű festék használata ugyanezt sejtpopulációkon is megengedte. A DiOC6 egy olyan fluoreszcens festék, aminek mitokondriális mátrixban történő akkumulációja a mitokondriális membránpotenciáltól függ. A kísérletek során a sejteket 40 nmol/l DiOC6-t tartalmazó oldattal inkubáltuk (30 perc, 37°C), amit PBS-sel történő mosás követett. A sejteket tripszinnel felszedtük, majd az így előállított sejtszuspenziót BD FACS Calibur flow-citométerrel vizsgáltuk (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Az élő sejteket fényszórási paramétereik alapján válogattuk ki. A MMP nagyságának jellemzésére 10 000 sejt átlagos DiOC6 fluoreszcenciáját használtuk (FL1-H; [Perry és mtsai 2011]).

3.6. A mitokondriális membránpotenciál változásainak nyomon követése

A MMP időbeli változásait JC-1 festékkel töltött sejteken, Zeiss Axioskop mikroszkópra épített fluoreszcens képalkotó rendszerrel vizsgáltuk (Till Photonics GmbH, Gräfeling, Németország). A rendszer egy xenon-lámpát tartalmazó Polychrome V fényforrásból, egy 1,4 megapixel felbontású kamerából (SensiCam, PCO AG, Kelheim, Németország) és egy vezérlőegységből állt, amit a Till Vision szoftver vezérelt (verziószám: 4.0.1.3). A MMP változását a J-aggregátum emissziójának időbeli módosulása jelezte. A J-aggregátumra jellemző fluoreszcenciaintenzitás változásait 590 nm-en detektáltuk, egy erre alkalmas emissziós szűrő (Omega 590 LP; Drive Brattleboro, VT, USA) és dikroikus tükör (590 DRLP; XF2019, Omega Drive) alkalmazásával. A gerjesztési hullámhosszat 561 nm-re állítottuk. A videók készítése során 4 × 4-es binninget használtunk, a képkockák 260 pixel × 340 pixel felbontásúak voltak. A mintavételezés 2 Hz frekvenciával történt, a képenkénti expozíciós idő 50 ms volt. A fluoreszcens fakulás mértékének csökkentése érdekében a lehető legalacsonyabb gerjesztő fényintenzitást alkalmaztunk, ami általában a fényforrás maximális intenzitásának 10%-a volt.

A mérőkamra űrtartalma 3 ml volt. A kontroll Hanks-oldat folyamatos áramlását egy többcsatornás perfúziós rendszer biztosította, amivel 3 ml/perc áramlási erősséget állítottunk be. A fluoreszcenciaintenzitás változásait szobahőmérsékleten, 40×-es nagyítású Plan Aplanachromat vízimmerziós objektívvel követtük nyomon (Zeiss). A mérés kezdete előtt a kamera látóterében több, egyedi sejtet tartalmazó területet jelöltünk ki (ROI). Ugyancsak definiáltunk egy sejtmentes területet, amire a háttérintenzitásra történő korrekció végett volt szükség. A mérés során a mérőprogram ún. „kinetic view” módját alkalmaztuk, ami lehetővé

tette, hogy a kijelölt ROI-k átlagos fényintenzitás-változásait az idő függvényében kövessük nyomon. A mért fényintenzitást a rendszer önkényes egységekben adta meg (AU). Mitokondriális depolarizációt karbonil-ciano-3-klór-fenilhidrazon (CCCP) felhasználásával váltottunk ki. A CCCP a terminális oxidáció és az ATP-szintézis szétkapcsolásával váltja ki a MMP csökkenését [Ganote és Armstrong, 2003]. A CCCP alkalmazásakor manuálisan váltottuk a perfúziós rendszer kontroll oldatot (Hanks-oldat) és Hanks-oldatban oldott CCCP-t áramoltató csatornái között. A mitokondriális depolarizációt a J-aggregátumra specifikus fluoreszcenciaintenzitás csökkenése jelezte.

A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a gerjesztési fényintenzitás alacsony volta ellenére az emisszió intenzitása folyamatosan csökkent. A fakulással kapcsolatos folyamatok esetén feltételeztük az elsőrendű kinetikát, ezért a fluoreszcenciaintenzitás-csökkenést exponenciális függvénnyel (2. egyenlet) illesztettük. Az exponenciális tagok számát (3 db) a kiértékelés optimalizálása során határoztuk meg.

$$Y = A_1 * e^{\frac{-t}{t_1}} + A_2 * e^{\frac{-t}{t_2}} + A_3 * e^{\frac{-t}{t_3}} + Y_0 \quad (2)$$

Az ezen fakulásra történő korrekció érdekében a regisztrált fluoreszcenciagörbék első 200 s-os szakaszát egy három exponenciális tagot tartalmazó egyenlettel illesztettük. A fakulásra kompenzált görbéket a nyers mérési adatok és az illesztési paraméterek alapján rekonstruált csökkenés segítségével állítottuk elő. A CCCP hatás nagyságának meghatározásakor a CCCP-indukált fluoreszcenciaváltozást az alábbi egyenlet segítségével számoltuk:

$$\Delta F = F_{\text{rest}} - F_{\text{min}} \quad (3),$$

ahol F_{rest} a CCCP adása előtti, F_{min} pedig a CCCP adása utáni érték; mindkét esetben a fakulásra kompenzált görbét vettük figyelembe. A jelölt fényintenzitási értékeket közvetlenül a CCCP adása előtt és után, egy-egy 50 s hosszú szakasz figyelembe vételével határoztuk meg.

3.7. MTT életképességi és proliferációs esszé

Az MTT-esszéhez 96-lyukú tenyésztő edényekbe lyukanként 5 000 sejtet szélesztettünk. A szélesztést követő első és harmadik napon kétszer mostuk a sejteket kalcium- és magnéziummentes PBS-sel (CMF-PBS). Ezt követően a sejteket MTT-reagenst tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk [0,5 mg/ml 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium bromid; Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Németország; 37°C, 2–4 óra]. Az inkubációt követően a felülúszót eltávolítottuk, és a keletkezett formazán kristályokat a

lyukakba töltött MTT szolubilizáló oldattal feloldottuk (30 perc). A formazánkoncentrációt fotometriás úton határoztuk meg (550 nm; Microplate Reader Model 550, Bio-Rad).

3.8. A mitokondriális DNS mennyiségének meghatározása

A transzfektált és nem-transzfektált sejt kultúrákból teljes RNS-frakciót izoláltunk, amihez Trizol reagenst (Ambion, Life Technologies) és Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitet (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmaztunk. Mintánként az Omniscript RT Kit (Qiagen) felhasználásával 1 µg izolált RNS-ből reverz transzkripciót végeztünk. A reakciót egy programozható PCR gépben (Bio-Rad) a kit gyártójának (Qiagen) útmutatásai szerint hajtottuk végre. A mitokondriális és a sejtmag DNS-t qPCR reakció segítségével sokszoroztuk fel a cDNS-ből a Light-Cycler 480 System (Roche, Mannheim, Németország) készülékben Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) felhasználásával. A qPCR reakció elegy 5 µl Master Mixet, 1 µl primer elegyet, 2 µl cDNS-t és 2 µl nukleázmentes vizet tartalmazott. A művelet során Bai és munkatársai [2011] által dokumentált specifikus primereket alkalmaztuk. Ezek a primerek a nukleáris genomban lévő SIRT-1 és a mitokondriális DNS-ben található 16S szakaszon lévő géneket ismerték fel. Ezek a primerek a nukleáris genomban lévő SIRT-1 és a mitokondriális DNS-ben található 16S szakaszon lévő géneket ismerték fel. A mitokondriális DNS-t 5'-CTATGTCGCAGTATCTGTCTTTG-3' (forward) és 5'-GTTATGATGTCTGTGTGGAAAG-3' (reverz) primerek felhasználásával erősítettük fel, a nukleáris DNS-t pedig a 5'-GTTTGTGTGCTATAGATGATATTTTAAATTG-3' (forward), 5'-CATTAACAGTCTACAAAACATAT-3' (reverz) primerek alkalmazásával amplifikáltuk. Egy adott minta genomi és mitokondriális DNS-tartalmának meghatározása párhuzamosan történt, amihez a Lagouge és mtsai [2006] által ismertetett eljárást alkalmaztuk. A mitokondriális és genomi DNS aránya feltételezhetően a sejtenkénti átlagos mitokondrium szám mértékétől függ. A mitokondriumok számának jellemzésére –ebből következően– a mitokondriális- és genomi DNS mennyiségének hányadosát alkalmaztuk. Ezt az ábrán az ún. H2/H1 hányadosként tüntettük fel.

3.9. A melanoma sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának nyomon követése

A melanoma sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának méréséhez a Fluo-4 fluoreszcens indikátor acetoximetilészter (AM) formáját alkalmaztuk (Invitrogen). A festék optimális gerjesztési hullámhossza 494 nm, emissziós maximuma 515 nm. A festéket törzsoldatából (2 mmol/l; DMSO-ban oldva) 2,5 mmol/l probenecid és 1% BSA tartalmú

Hanks-oldatban hígítottuk ki. A festék végkoncentrációja 2 $\mu\text{mol/l}$ volt. A 12 mm-es fedőlemezre szélesztett melanoma sejteket 30 percig festéktartalmú, majd újabb 30 percig festékmentes Hanks-oldatban inkubáltuk (37°C). Az eljárás elegendő időt biztosított a festék észter csoportjainak hidrolíziséhez.

A kalciumkoncentráció méréséhez használt képalkotó rendszer (Zeiss, Till Photonics) megegyezett a 3.6 fejezetben leírtakkal; ugyanakkor néhány komponenst a Fluo-4 festék optikai sajátosságaihoz kellett igazítanunk. Ennek megfelelően LP515 emissziós szűrő (Omega Drive) és $\Omega 505\text{DRLP_XR}$ dikroikus tükör (XF2010, Omega Drive) kombinációját alkalmaztuk, a festék gerjesztésére pedig 494 nm-en került sor. A kalciumtranzienseket a kolinerg agonista karbamil-kolin (karbakol, CCh) alkalmazásával váltottuk ki.

3.10. A CCh dózis-hatás görbe meghatározása

A méréseket konfluens melanoma sejt kultúrákon végeztük, Flex Station II 384 High Throughput Screening System készüléket alkalmazva (Molecular Devices, San Francisco, CA, USA). Egy nappal a kísérlet előtt 96-lyukú, fekete oldalú, Greiner-lemezekbe lyukanként kb. 20 000 sejtet szélesztettünk („teszt lemez”; Greiner Bio-One North America Inc., Monroe, NC, USA). Egy másik 96-lyukú lemezbe („vegyszeres lemez”; Sarsted AG and Co., Nümbrecht, Németország) különböző CCh-koncentrációjú Hanks-oldatot pipettáztunk. A „vegyszeres lemez” esetében a különböző CCh-koncentrációjú oldatok elrendezése megfelelt a „teszt lemezen” alkalmazni kívánt CCh-koncentráció-sémának. A mérés előtt a tenyésztett sejteket Fluo-4 AM festékkel töltöttük, lyukanként 100 μl festékoldatot használva. A Fluo-4 fluoreszcenciaértékeit egy sorban (8 lyuk) egyidejűleg mértük. A kapott fényintenzitás-értékeket a műszer relatív fluoreszcenciaintenzitásként rögzítette (RFU). A dózis-hatás összefüggés tanulmányozása érdekében 7 különböző CCh-koncentrációt alkalmaztunk. Minden koncentrációt külön oszlopban vizsgáltunk oly módon, hogy minden oszlop 7 lyukat tartalmazott. A lemezek minden oszlopának 8. lyukába kontroll, azaz CCh-mentes Hanks-oldatot pipettáztunk, és segítségével az oldatcsere által okozott fluoreszcenciaintenzitás-változást határoztuk meg (adagolási kontroll).

A mérések során a gerjesztő hullámhosszat 495 nm-re, az emissziós hullámhosszat pedig 520 nm-re állítottuk. A kísérlet tartama 5 perc volt, melyből az első 30 s az alapvonal meghatározására szolgált. Az adott CCh-koncentrációhoz tartozó egyedi mérési pontokat a 250 s hosszan tartó CCh-adagoláshoz tartozó maximális fluoreszcenciaintenzitásként kaptuk. A mért fényintenzitás-értékeket először az alapvonalra, majd az adagolási kontroll értékeire

korrigáltuk. Ezt követően egy adott lemezen belül az azonos CCh-koncentrációval kezelt lyukak értékeit átlagoltuk, majd ezeket az átlagokat a 4. egyenlettel illesztettük.

$$RFU = RFU_{\max} - (RFU_{\max} - RFU_{\min}) \frac{1}{1 + \left(\frac{C_{Cch}}{EC_{50}} \right)^p} \quad (4)$$

A 4. egyenletben az RFU az egyes CCh-koncentrációkhoz tartozó fluoreszcenciaintenzitás-érték önkényes egységekben; $RFU_{\max}$ az adott „teszt lemezen” mért intenzitásértékek közül a legnagyobb; $RFU_{\min}$ az adott „teszt lemezen” mért intenzitásértékek közül a legkisebb; C_{Cch} a CCh koncentrációja mol/l-ben; EC_{50} a félhatásos koncentráció; p pedig a receptor aktiválásához szükséges átlagos ligandumszám. Az így meghatározott RFU értékekből egy receptortelítettséget jellemző változót (Y) generáltunk az alábbi módon:

$$Y = \frac{RFU - RFU_{\min}}{RFU_{\max} - RFU_{\min}} \quad (5),$$

majd az Y felhasználásával elvégeztük a Hill-féle illesztést:

$$\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = p \lg(C_{Cch}) - p \lg(EC_{50}) \quad (6)$$

Az egyenleteket két állapot közötti megoszlást leíró modell alapján dolgoztuk ki. A ligand és a receptor között dinamikus egyensúly áll fent. A ligandot egyáltalán nem kötő receptornál a receptor telítettséget $Y = 0$ -nak tekintettük. Ebből következően az adott „teszt lemezen” mért intenzitásértékek közül a legkisebbnél ($RFU_{\min}$) Y ezt az értéket veszi fel. Kis mennyiségű ligand kötődése esetén a receptor jelátviteli útvonalai még nem aktiválódnak, de facilitálódik további ligandok kötődése a receptorhoz. Megfelelő számú ligand kötődése már aktiválja a fluoreszcensen is detektálható jelátviteli útvonalakat és az adott „teszt lemezen” mért legnagyobb fluoreszcencia intenzitás ($RFU_{\max}$) esetén az Y értéke 1-et vesz fel. A maximális ligandkötődés és a ligandmentes receptorok közötti köztes ligandszámú állapotok életidejét elhanyagolhatónak tekintettük.

3.11. Az apoptózis és nekrozis irányába elkötelezett sejtek arányának meghatározása

A melanoma sejteket 12 mm átmérőjű fedőlemezekre szélesztettük és 50–70%-os konfluenciáig tenyésztettük. Az apoptózis és nekrozis mértékének megállapítása érdekében a sejteket PBS-sel mostuk (3×3 perc), majd $2 \mu\text{g/ml}$ fluoreszcein izotiocianáttal (FITC)

konjugált annexin V-tel valamint 3 µg/ml propídium-jodiddal inkubáltuk azokat (10 perc, szobahő). Az inkubálás után a sejteket PBS-sel mostuk, majd fixálás nélkül polivinil-alkohol-polimerbe (Mowiol) ágyasztuk. Az annexin V- és propídium-jodid-specifikus fluoreszcenciát konfokális mikroszkóppal detektáltuk. A gerjesztési és emissziós hullámhosszak 488 nm és 505–550 nm (annexin V), valamint 543 nm és 560–590 nm (propídium-jodid) voltak. A FITC-konjugált annexin V alkalmazása során csak a sejtfelszíni jelölődést tekintettük apoptotikus jelnek.

3.12. Mitokondriumban gazdag, valamint citoszól frakciók izolálása és vizsgálata

A mitokondriumban gazdag és citoszól frakciókat egy korábban kidolgozott protokoll alapján izoláltuk [Frezza és mtsai, 2007]. A művelet során a T150 tenyésztőedényekben tenyésztett melanoma sejteket (cca 5×10^7) 0,08 m/V% tripszint és 0,15 m/V% etiléndiamin-tetraacetátot (EDTA) tartalmazó CMF-PBS oldattal emésztettük, majd a tripszin hatását ötszörös mennyiségű tápoldattal (RPMI-1640) leállítottuk. A sejtszuspenziót 50 ml-es centrifugacsövekben gyűjtöttük össze és 600g-n centrifugáltuk (10 perc; Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Scientific). A felülúszót eltávolítottuk és az üledéket 1 ml izolációs pufferben (IBC) szuszpendáltuk (10 mmol/l Tris-MOPS buffer, 200 mmol/l szaharóz, 1 mol/l EGTA; $pH=7,4$). A szuszpenziót teflon homogenizálóba pipettáztuk (VWR, Radnor, PA, USA) és 40 fel-le mozdulattal homogenizáltuk. A homogenizált oldatot 1,5 ml-es Eppendorf csőbe vittük át (Eppendorf, Hamburg Németország), majd centrifugáltuk (600g, 10 perc). A felülúszót egy új Eppendorf csőbe pipettáztuk, míg a sejtmagokban gazdag üledéket proteáz inhibitort tartalmazó lízispufferbe vittük át (20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l EGTA; $pH=7,5$). Ezen sejtmagokban dús frakciót Western-blot kísérletekhez használtuk.

A felülúszót ultracentrifugáltuk (10 000g, 10 perc), majd az így kapott – citoszólban dús frakciónak megfelelő – felülúszót áthelyeztük egy új Eppendorf csőbe. Az üledéket, azaz a mitokondriumban gazdag frakciót, 0,2 ml IBC oldattal mostuk és 0,5 ml IBC-ben újra szuszpendáltuk. Mind a citoszólban, mind a mitokondriumban gazdag frakciót újra centrifugáltuk (10 000g, 10 perc). A mitokondriumfrakció üledékét proteáz-inhibitort tartalmazó lízispufferbe helyeztük, és Western-blot kísérletekhez készítettük elő. A citoszól frakcióhoz csak proteáz-inhibitort adtunk, mivel ez a szuszpenzió már önmagában is egy Western-blot mérés előkészítésére alkalmas mintát eredményezett. A mitokondrium és a citoszól frakciókban a citokróm *c* detektálását Western-blot kísérletekkel végeztük (15%-os akrilamid gél, oszloponként 20–40 µg fehérje). Az elektroforézis után a mintákat 0,45 µm

pórusméretű nitrocellulóz membránra transzferáltuk, 5% tejpor-tartalmú PBS-sel blokkoltuk, és citokróm *c*-specifikus antitesttel jelöltük (1. táblázat) egy éjszakán át, 4°C-on. Az immunreakciót tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitest alkalmazásával tettük láthatóvá (1 óra, szobahő). Az izolált frakciók tisztaságát gliceraldehid-foszfát dehidrogenázra (GAPDH) és szukcinát-dehidrogenáz A alegységére (SDHA) specifikus antitestekkel ellenőriztük (1. táblázat). A specifikus sávokat ebben az esetben is tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel tettük láthatóvá.

3.13. Kaszpáz-3 esszé

A kaszpáz-3 aktivitását Caspase 3/CPP32 kolorimetriás protein esszével mértük, a gyártó (Invitrogen) instrukcióinak megfelelően. Az egyes minták kaszpáz-3 aktivitását az abszorbancia 370 nm-en történő detektálásával határoztuk meg (FlexStation3®, MolecularDevices, Sunnyvale, CA, USA). A mintákban mért értékeket mindig korrigáltuk negatív kontrollra, ahol a citoszól lizátumot desztillált vízzel helyettesítettük. Pozitív kontrollként olyan tenyészeteket alkalmaztunk, amikben a sejteket 2 órán át 6 mmol/l H₂O₂-oldatban inkubáltuk.

3.14. CyQuant®GR sejtproliferációs esszé

A CyQuant®GR esszéhez fekete falú, 96 lyukú Greiner-tenyésztőedényekbe lyukanként 5 000 sejtet szélesztettünk, majd azokat 3 napig tenyésztettük. A harmadik napon a sejteket kétszer mostuk (CMF-PBS), majd 30 percen át -70°C-on tartottuk őket. A fagyasztás után a mintákat 5 percen keresztül DNS-festő oldattal inkubáltuk [lízis pufferben feloldott CyQuant GR törzsoldat (Invitrogen); lyukanként 100 µl]. Az emittált fluoreszcens jel intenzitását 485 nm-es gerjesztés mellett 530 nm-en detektáltuk (FlexStation3®, Molecular Devices).

3.15. Fluoreszcens immuncitokémia

Az immuncitokémiai jelöléseket egy korábban részletesen leírt protokoll alapján végeztük [Kosztka és mtsai., 2011]. A sejteket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk (10 perc, szobahő), majd 100 mmol/l glicint tartalmazó PBS-sel mostuk őket. A permeabilizálást Triton X-100 tartalmú (0,1%) PBS 10 perces alkalmazásával végeztük, majd ismét mostuk a sejteket. Az ezt követő 30 perces blokkolást 1% BSA tartalmú PBS-sel végeztük. A következő lépésben a melanoma sejteket a primer antitestekkel (1. táblázat) egy éjszakán keresztül, 4°C-on inkubáltuk, majd 3 × 5 perces mosás következett. A másodlagos antitestekkel történő inkubáció szobahőmérsékleten történt, 60 percen át. Az utolsó lépésben a sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)-tartalmú Vectashield médium alkalmazásával tettük láthatóvá

(Vector, Burlingame, CA, USA). A fluoreszcens felvételeket konfokális mikroszkóppal készítettük (LSM 510 Meta, Zeiss). Az elkészült képek esetleges utólagos korrekciója csak azok fényerősségének és kontrasztjának módosítására terjedt ki. Az ábrákat a Photoshop 7.0 program segítségével készítettük (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

3.16. Mitokondriumok jelölése

A mitokondriumok jelölését MitoTracker Red festékkel végeztük (CMXRos probe; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). A Mitotracker Red a mitokondriális membránpotenciál mértékétől függően akkumulálódik a mitokondriális mátrixban. A dúsulást követően a festék a mitokondriumban lévő fehérjék tiol csoportjaival kapcsolódik, emiatt a fixálás (paraformaldehid) után is megőrzi mitokondriális lokalizációját. A festék szubmikromólos koncentrációban kizárólag a mitokondriumban akkumulálódik. Az eljárás során a melanoma sejteket 30 percig 200 nmol/l MitoTracker Redet tartalmazó tápoldatban (RPMI-1640) inkubáltuk, CMF-PBS-ben mostuk, végül 4%-os paraformaldehidben fixáltuk (10 perc, szobahő). A jelölt sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (LSM 510 Meta, Zeiss). A gerjesztési hullámhossz 543 nm volt.

3.17. A sejtmorfológia vizsgálata és a sejtméret meghatározása

A sejtek morfológiai csoportosítása a sejtek alakjának és nyúlványaik számának meghatározásán alapult. A poligonális sejtek több csúcsú sejttel és három vagy több nyúlvánnyal rendelkeztek. Az orsó alakú (fuziform) sejtek 2 nyúlvánnyal bírtak, míg a kerek sejteknek értelemszerűen egyetlen nyúlványa sem volt. A WM35 melanoma sejteket a sejtméret meghatározáshoz 12 mm-es fedőlemezekre szélesztettük, 40–70%-os konfluenciáig tenyésztettük, majd 4%-os paraformaldehidben fixáltuk (10 perc, szobahő). A sejtekről áteső fényben, 10×-es és 20×-os nagyítású vízimmerziós objektívekkel készítettük felvételeket, a 3.6-os fejezetben részletesen ismertetett Till Photonics rendszer alkalmazásával. A kalibráció Bürker-kamra segítségével történt. Az egyes melanoma sejteket tartalmazó ROI-k vetületét az ImageJ programmal határoztuk meg.

3.18. Statisztikai analízis

Az értekezésben szereplő adatok rendre átlag $\pm$ standard hiba (SE) formában kerülnek bemutatásra. A statisztikai különbségek kiértékeléséhez Student-féle *t*-tesztet (két statisztikai sokaság összehasonlítása) vagy többszörös összehasonlítások esetén ANOVA-t alkalmaztunk. ANOVA esetén az egyes csoportok közötti szignifikancia meghatározását Tukey-Kramer-féle *post hoc* teszt segítségével végeztük. Egy különbséget akkor tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, ha a *p* értéke kisebb volt, mint 0,05. A statisztikai analízis az IBM SPSS

Statistics programmal készült (v22; IBM Corporation, Armonk, NY, USA). A számításokhoz és az ábrák készítéséhez az Origin v8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) és a Microsoft Excel programokat (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) használtuk.

4. Eredmények

4.1. TASK-3 knockdown sejtvonalak előállítása

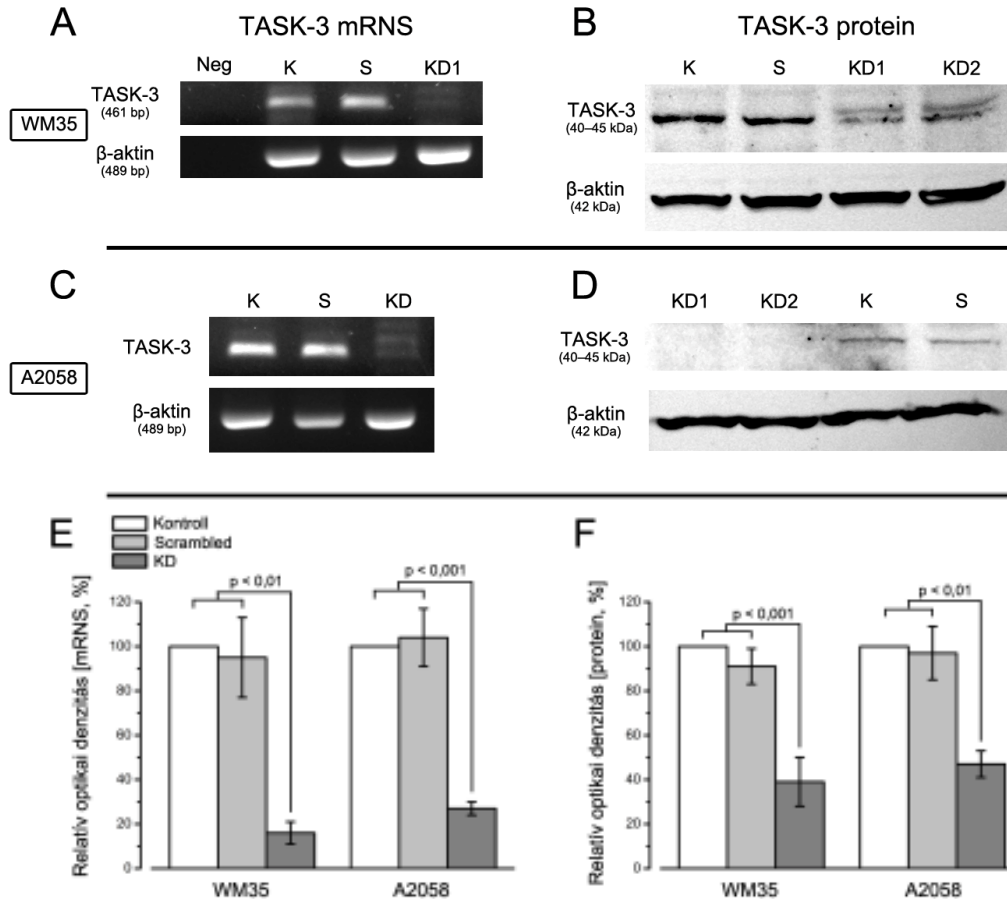
A TASK-3 csatornafehérje melanoma sejtekben játszott szerepének megismeréséhez a csatorna gátlása lenne a legkézenfekvőbb metodikai megközelítés. Mivel azonban a melanoma sejteken történő vizsgálatok kezdetekor nem állt rendelkezésre TASK-3-specifikus gátlószer, WM35 melanoma sejteket transzisensen transzfektáltuk egy specifikus shRNS-szekvenciával, aminek következtében a sikeresen transzfektált sejtekben a TASK-3 fehérje expressziója markánsan csökkent [Kosztka és mtsai, 2011]. A géncsendesített sejtek azonosítása az egyidejűleg bejuttatott GFP-szekvencia által kódolt GFP megjelenése alapján történt. A tranziens transzfekciónak komoly hátránya volt viszont, hogy a transzfektált sejtenyészetek a plazmid bejuttatását követő ötödik naptól már nem voltak alkalmasak az elvégezni kívánt vizsgálatokra, mivel a nem-transzfektált melanoma sejtek túlnőtték a géncsendesített társaikat [Kosztka és mtsai, 2011]. A vázolt kísérleti paradigma tehát csak olyan kísérletek végrehajtását engedte meg, amikben a transzfekciót követő maximum 5 napon belül, aránylag kevés sejt vizsgálatára kerülhetett sor.

A jelen disszertációban részletezett munka kezdetén tehát az volt az első feladat, hogy nagyobb transzfekciós aránnyal jellemezhető és hosszabb időn át felhasználható TASK-3 géncsendesített sejt kultúrákat készítsünk. Ezen cél elérése érdekében stabil transzfekciót alkalmaztunk. A stabilan transzfektált WM35 tenyészetek létrehozásának kulcsfontosságú eleme volt a nem-transzfektált sejtek genetikinnel történő eliminálása, és a genetikinre rezisztens sejtek felszaporítása. A munkafolyamat részleteit a „Metodika” fejezet 3.2. alfejezetében írtuk le.

A stabilan TASK-3 géncsendesített sejt populációk előállítása után az első feladat az expressziócsökkenés tényének igazolása és mértékének ellenőrzése volt. Ezt a tenyészetek TASK-3-specifikus mRNS- és fehérjetartalmának RT-PCR és Western-blot módszerekkel történő vizsgálatával végeztük (5. ábra). Az előállított sejt kolóniák közül kettőben figyeltünk meg különösen markáns expressziócsökkenést, ami mind a TASK-3-specifikus mRNS-t, mind a specifikus fehérjét érintette. Ezen két sejt kolóniát KD1 és KD2 névvel jelöltük. A TASK-3 expressziógátlás következményeinek bemutatására valamennyi további kísérletünkben a KD1 sejt vonalat alkalmaztuk. A 5. ábrán az is látható, hogy a scrambled shRNS-sel transzfektált sejteken (S) nem változott a TASK-3-expresszió mértéke.

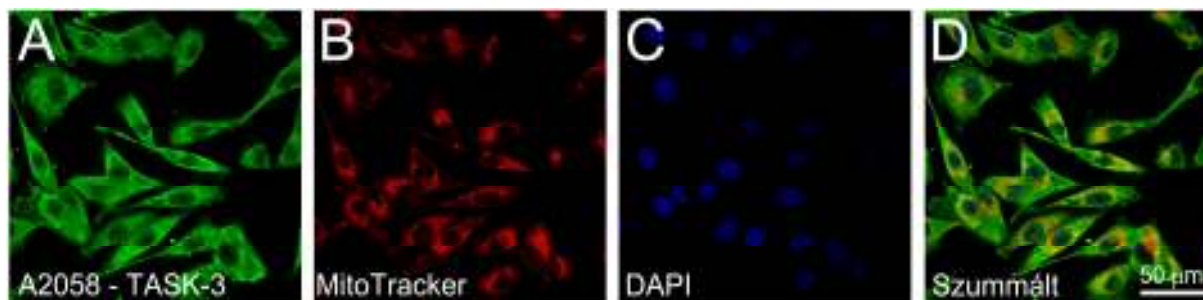
A WM35 sejt vonal egy olyan bőreredetű, felszíni melanoma malignumból készült, ami a radiális vagy korai vertikális növekedés fázisában volt. Időközben megállapítást nyert,

hogy a WM35 sejtek jobban reagálnak a szokásos melanoma-specifikus terápiás eljárásokra, mint a többi, klinikailag relevánsabbnak tartott melanoma sejtvonal [pl. Haas és mtsai, 2008; Smalley és mtsai, 2006]. Ebből következően a WM35 sejtek használata nem optimális olyan vizsgálatokban, amik célja jövőbeni lehetséges terápiák kidolgozása.



5. ábra: A TASK-3-specifikus shRNS szekvencia TASK-3-expressziót csökkentő hatásának vizsgálata. [A] TASK-3-specifikus mRNA (461 bp) meghatározása reprezentatív mintákból kontroll (nem transzfektált, K), scrambled shRNS-sel transzfektált (S) és specifikus shRNS-sel transzfektált (knockdown, KD1) WM35 tenyészetek esetében. A „Neg” névvel jelölt sáv a negatív kontroll. A β -aktin-specifikus mRNA (489 bp) sokszorozása és meghatározása a TASK-3 mRNA meghatározásával párhuzamosan történt. [B] A TASK-3 fehérje (40–45 kDa) expresszióját bemutató reprezentatív minták, WM35 sejtkultúrákból. A β -aktin (42 kDa) kimutatása belső kontrollként szolgált. [C–D] TASK-3-specifikus mRNA [C] és fehérje [D] mennyiségi meghatározása A2058 sejtekben. A panelek szerkezete és a jelölések megegyeznek az [A] és [B] ábrarészek kapcsán leírtakkal. [E] A TASK-3 mRNA meghatározása során kapott relatív optikai denzitás értékei kontroll és transzfektált melanoma sejtek esetében. Első lépésben kiszámítottuk a TASK-3/ β -aktin arányokat, majd az ugyanazon kísérletben kapott scrambled és knockdown minták TASK-3/ β -aktin értékeit a kontrollra normalizáltuk. Az egyes oszlopok a jelölt sejtvonalakon elvégzett 3–4 független mérés átlagát mutatják. [F] A TASK-3 fehérje Western-blot kísérletekben meghatározott relatív optikai denzitása. A kiértékelés módja megegyezik az [E] panelnél ismertetett eljárással. Valamennyi oszlop 3–4 független mérés átlagát mutatja.

Ezen megfontolás alapján a klinikailag agresszívabb viselkedésű A2058 sejtvonalon is elvégeztük a kísérletek egy részét. Az A2058 sejteken végzett munka első lépéseként természetesen igazolni kellett, hogy – a WM35 sejtekhez hasonlóan – ezek a sejtek is expresszálják a TASK-3 csatornát. A TASK-3 fehérje jelenlétének bizonyítása immuncitokémiával történt.



6. ábra: A2058 sejtek TASK-3-specifikus immunjelölése. [A] TASK-3-specifikus jelölődés. [B] Az [A] panelen bemutatott sejtekben található mitokondriumok jelölése MitoTracker Red alkalmazásával. [C] Az előző két ábrarésszel azonos területen látható DAPI-specifikus jelölődés, ami a sejtmagok méretét, alakját és eloszlását mutatja. [D] Az előző három felvétel összegzett képe.

Amint az a 6. ábrán látható, az immuncitokémiai kísérletek azt mutatták, hogy az A2058 melanoma sejtvonal is expresszálja a TASK-3 fehérjét. A 6A ábra TASK-3-pozitivitást jelez, a 6B kép a mitokondriumok elhelyezkedését szemlélteti, míg a 6C felvétel a sejtmagokat mutatja. A három felvétel összegzése a 6D részen látható, ami demonstrálja, hogy a TASK-3-specifikus festődés különösen a sejtmagok körül volt erős, ahol a mitokondriumok is nagyobb sűrűségben fordulnak elő. Az ábrán az is megfigyelhető, hogy a TASK-3-pozitivitás a sejtmagokban nem volt jelen.

A WM35 sejtvonallal ellentétben, az A2058 sejtek esetében a TASK-3 géncsendesítés tranziens transzfekcióval történt. A választást az indokolja, hogy az elvégzendő kísérletekhez így is kaptunk elegendő számú transzfektált sejtet; ugyanakkor a tranziens transzfekció alkalmazásával el tudtuk kerülni azokat az esetleges komplikációkat, amik a hosszabb tenyésztési idejű, klónszelektált, stabilan transzfektált sejtek esetében esetleg felléphetnek (pl. a genetikai állomány nem kívánt módosulása). A kísérleti elrendezésből következően a tranziensen transzfektált A2058 sejtek és a stabilan transzfektált WM35 sejtek egymás kontrolljaként is szolgáltak.

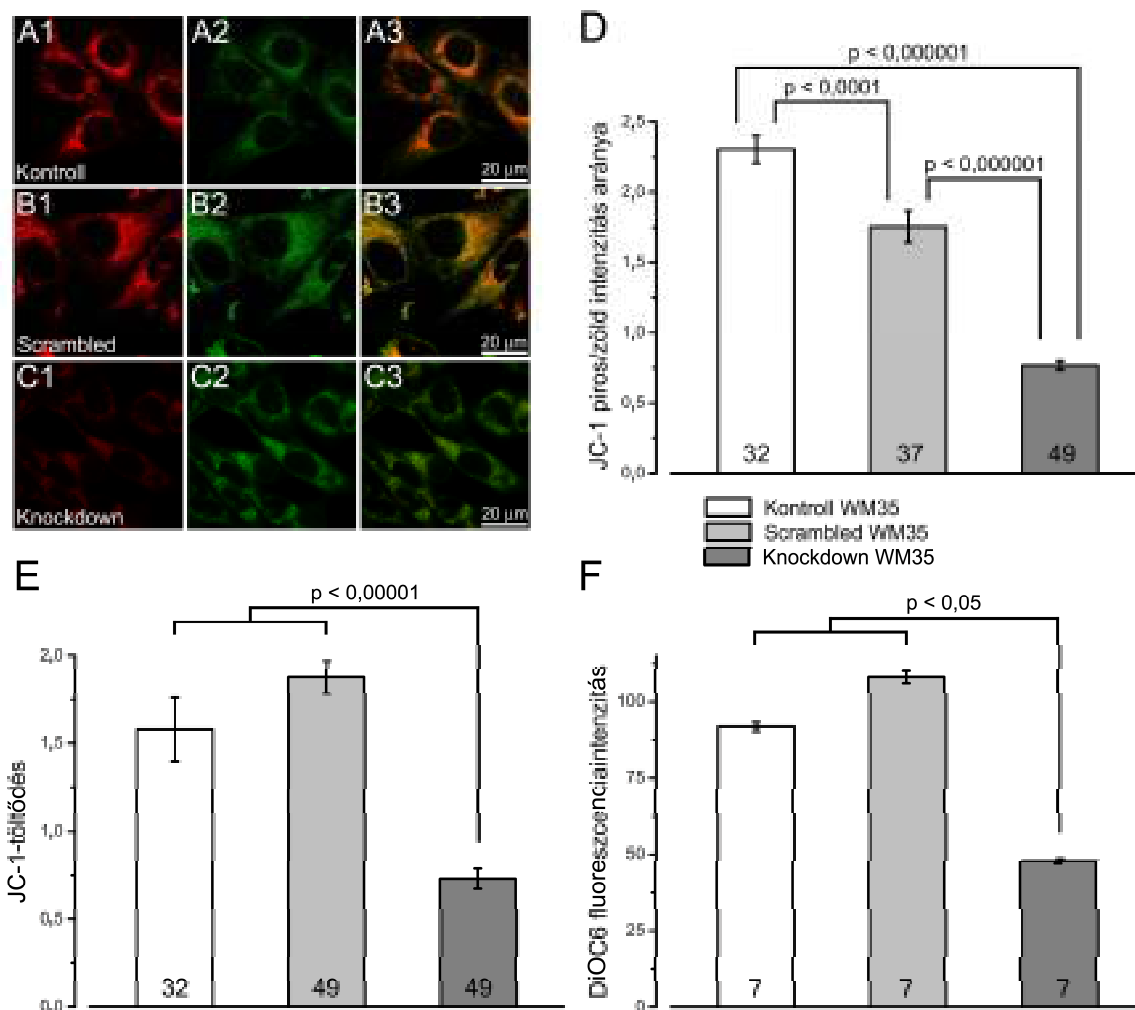
A tranziensen transzfektált A2058 sejttenyészeteken végzett RT-PCR és Western-blot kísérletek igazolták, hogy a specifikus shRNS bejuttatása után 4 nappal jelentősen csökkent mind a TASK-3-specifikus mRNS (5C és 5E ábrák), mind a TASK-3 fehérje expressziója (5D és 5F panelek).

4.2. A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

Az értekezésben bemutatott munka egyik fő célja azon korábbi megfigyelések megerősítése volt, amik a tranziensen transzfektált WM35 sejtek mitokondriumjainak károsodására utaltak. A jelen kísérletek során tehát kiemelt figyelmet szenteltünk a MMP jellemzésére. A MMP tanulmányozását fluoreszcens festékek alkalmazásával, optikai úton végeztük.

Az egyik ebből a célból alkalmazott festék a JC-1 volt. A JC-1 monomér formája zöld, aggregátum formája pedig piros hullámhossznak megfelelő fluoreszcenciás jelet bocsájt ki. Sejtek jelölésekor a festék monomér alakja először a citoplazmába kerül, majd belép a mitokondriumokba. A mitokondriumokba történő belépés mértéke függ a mitokondriumok polarizáltságától: a nagyobb polarizáltság (azaz a nagyobb MMP) fokozza a festék bejutását. Erősen polarizált mitokondriumok olyan nagy mennyiségben akkumulálják a festéket, hogy a JC-1 molekulák aggregátumokat képeznek, amik piros fényt emittálnak [Perelman és mtsai, 2012]. Ebből következően az erősen polarizált, azaz aktív mitokondriumokkal rendelkező sejtek esetében magas piros/zöld JC-1-specifikus fluoreszcenciaintenzitás-arányt rögzíthetünk; a mitokondriumok depolarizációját ugyanakkor csökkent piros/zöld fluoreszcenciaintenzitás-arány jellemzi.

Az 7. ábra A1–C3 paneljei azt mutatják, hogy JC-1 festékkel történt töltést követően a TASK-3 géncsendesített WM35 sejtek fluoreszcenciaemissziója jelentősen különbözik mind a kontroll, mind a kevert shRNS-sel transzfektált sejtek emissziójától. Az eltérés lényege, hogy a KD sejtek (7C1–C3) észrevehetően kisebb intenzitású piros fényt, és valamivel nagyobb intenzitású zöld fényt emittálnak, mint akár a kontroll (7A1–A3), akár a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek (7B1–B3). A piros/zöld intenzitásarányokat számszerűsítettük és összegeztük; ennek eredményét a 7D ábra mutatja be. A kontroll sejtek ($2,31 \pm 0,10$; $n = 32$) és a scrambled-transzfektált sejtek ($1,75 \pm 0,11$; $n = 37$) által produkált értékekkel összevetve a KD sejtek szignifikánsan alacsonyabb piros/zöld fluoreszcenciaemissziós arányt mutattak ($0,77 \pm 0,03$; $n = 49$; $p < 10^{-4}$). Hasonlóan a WM35 sejtekhez, a JC-1-gyel töltött A2058 knockdown sejtek is szignifikánsan alacsonyabb piros/zöld emisszióintenzitás-arányt produkáltak, mint a nem-transzfektát kontrollok ($0,93 \pm 0,07$, $n = 25$ vs. $2,1 \pm 0,2$, $n = 25$; $p < 10^{-7}$). Ezek a megfigyelések alátámasztják azt a feltevést, miszerint a melanoma sejtek TASK-3 expresszióját csökkentve a mitokondriumok működészavara, így végső soron mitokondriális depolarizáció alakul ki.



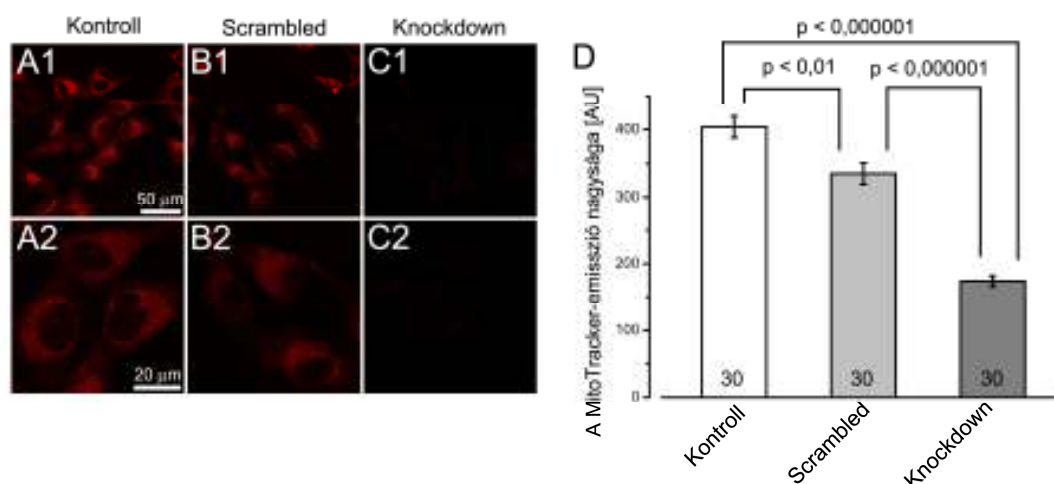
7. ábra: A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata WM35 sejteken. [A1] Kontroll sejtek mitokondriumaiban akkumulálódott J-aggregátum (piros emisszió). [A2] A JC-1 monomer formájának kimutatására használt konfokális beállításokkal készített kép az [A1] panelével azonos látótérrel. [A3] Az [A1] és [A2] panelek összegzett képe. [B1–B3] Az elrendezés ugyanaz, mint az [A1–A3] panelek esetében, csak ezen felvételek scrambled shRNS-sel transzfektált WM35 sejtekről készültek. [C1–C3] Az [A] és [B] részekben látott módon készült felvételek TASK-3 knockdown sejtekről. A három sejtvonalról készített felvételek egymásnak megfelelő tagjai azonos konfokális mikroszkópos és kamerabeállításokkal készültek. [D] A mitokondriális membránpotenciál becslése a JC-1 piros/zöld emissziós fényintenzitási arányok alapján. [E] Az egyes sejtvonalak JC-1-felvételeinek becslése a háttérkorrigált fluoreszcenciaintenzitások alapján. Mindkét esetben (D, E) az érték csökkenése mitokondriális depolarizációra utal. Az oszlopdiagramok esetében az egyes oszlopokban található számok a tanulmányozott sejtek mennyiségét mutatják. [F] Más kísérletekben DiOC6 inkubációt követően kontroll, scrambled RNS-sel transzfektált és TASK-3 knockdown sejteken mért DiOC6 fluoreszcenciaintenzitások. A fluoreszcencia intenzitását alkalmanként 10 000 sejten, sejt-szorterrel mértük, az érték csökkenése mitokondriális depolarizációra utal. Az oszlopdiagramok esetében az egyes oszlopokban található számok a független kísérletek számát jelzik,

A piros/zöld fluoreszcenciaarány meghatározásán túl becsültük a WM35 sejtek által felvett JC-1 festék mennyiségét is. Ezzel az volt a célunk, hogy rávilágítsunk a festékfelvételért és/vagy -eltávolításért felelős mechanizmusok esetleges módosulásaira. Ahogy azt a 7. ábra E panelje is dokumentálja, a kontroll és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek festéktartalma között nem volt szignifikáns eltérés. Ezzel szemben a knockdown sejtek festéktartalma csak mintegy fele volt a másik két sejtvonal festéktartalmának ($p < 10^{-5}$). Joggal tételezhetjük fel tehát, hogy a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben vagy a JC-1 felvétele károsodott, vagy a festék eltávolítása vált hatékonyabbá. Bár ez a megfigyelés további kísérletek kiindulópontja lehet, az értekezésben bemutatott munka keretében nem volt célunk, hogy különbséget tegyünk ezen lehetőségek között, vagy alternatív magyarázatokat keressünk.

A piros/zöld JC-1 fluoreszcenciaarány csökkenése egyértelműen arra utalt, hogy a knockdown WM35 sejtek mitokondriumjainak membránpotenciálja kisebb, mint a kontroll és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejteké. Ennek a megállapításnak további alátámasztására egy másik festéket is alkalmaztunk, amelynek fluoreszcenciasajátságai ugyancsak függenek a MMP-től. A kérdéses festék a DiOC6 volt, amelynek emissziós intenzitása a knockdown sejtekben mintegy fele volt annak, amit a kontroll vagy a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek mutattak (7F ábra).

A MitoTracker ugyancsak egy olyan festék, aminek mitokondriális akkumulációja és fluoreszcenciája függ a MMP-től. Amennyiben a három sejtvonal tenyészetét MitoTracker Reddel jelöltük, a knockdown sejtek festődésének erőssége lényegesen kisebb volt, mint a kontroll vagy a scrambled shRNS-sel transzfektált WM35 sejteké (8. ábra, A1–C2). A különbség jellemzése céljából kiszámítottuk a háttérkorrigált fényintenzitás átlagértékeit (8D ábra). A nyert adatok megerősítették, hogy a jelölődés mértéke valóban a knockdown sejtekben volt a legkisebb, és az szignifikánsan különbözött mindkét másik sejtvonal festődésének erősségétől ($p < 10^{-6}$).

Összefoglalásként elmondható, hogy a fluoreszcens festékek alkalmazásával kapott eredmények összhangban voltak egymással, és abba az irányba mutattak, hogy a TASK-3 fehérje expressziójának csökkentése a melanoma sejtekben csökkenti a mitokondriumok membránpotenciálját és károsítja a mitokondriumok működését.

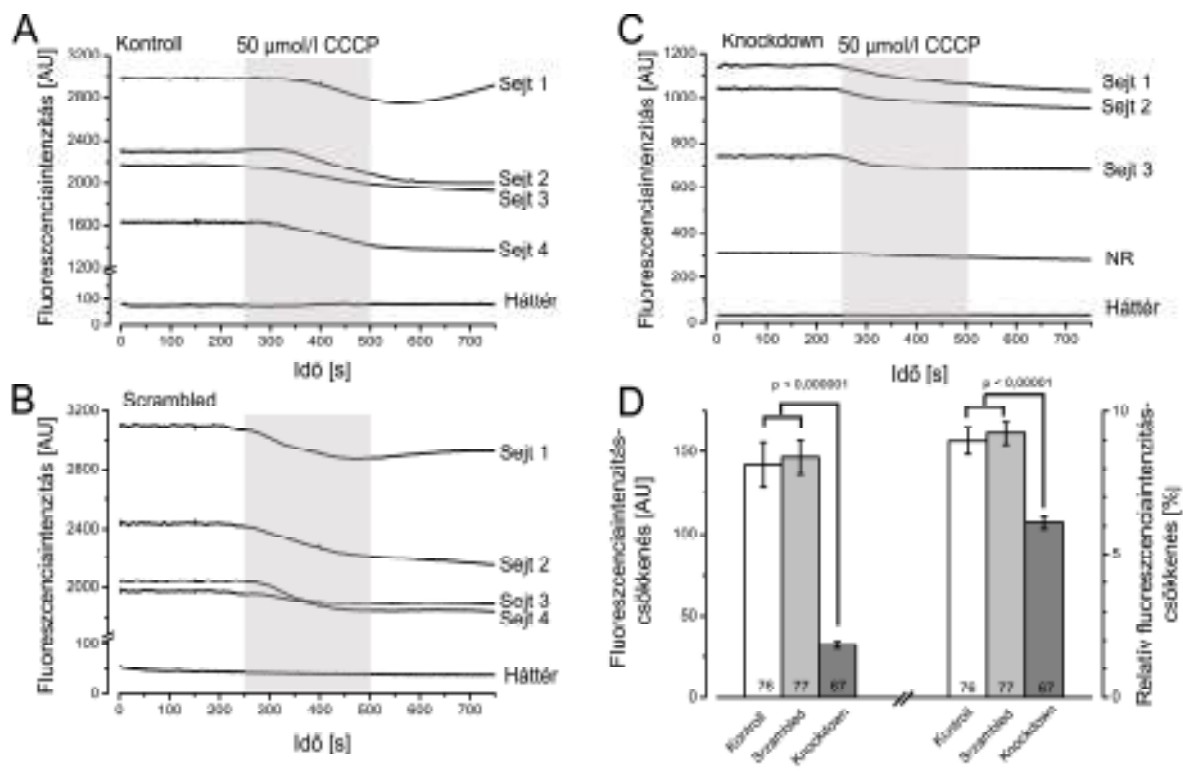


8. ábra: MitoTracker jelölődés stabilan TASK-3 géncsendesített WM35 sejteken. [A1–C2] A melanoma sejteket 200 nmol/l MitoTracker Red festékkal inkubáltuk, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Kontroll [A1, A2], scrambled shRNS-sel transzfektált [B1, B2] és TASK-3 knockdown [C1, C2] sejtekről készült reprezentatív felvételek. A 3–3 kis [A1–C1] és nagy nagyítású [A2–C2] felvételt mindhárom sejtvonal esetében azonos konfokális beállításokkal készítettük. [D] Nem-transzfektált kontroll, scrambled shRNS-sel transzfektált és TASK-3 knockdown sejtek háttérkorrigált, MitoTracker-specifikus fluoreszcenciaintenzitásának átlagértékei. Az oszlopokban feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelölik.

4.3. A mitokondriális szétkapcsolás hatása kontroll, scrambled shRNS-sel transzfektált és TASK-3 knockdown WM35 sejtekre

A mitokondriális működészavar további jellemzésére olyan méréseket végeztünk, amelyben egy mitokondriális szétkapcsoló szer MMP-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérletek során 50 μmol/l CCCP-t alkalmaztunk a tenyésztőoldatban, és mértük a vörös JC-1-fluoreszcencia intenzitásának következményes csökkenését. Ahogy azt a 9. ábra A–C részein bemutatott regisztrátumok igazolják, a CCCP adását követően mindhárom sejtvonalban megfigyelhető volt a vörös emisszió csökkenése. Ez az eredmény azt jelezte, hogy (i) a mitokondriális szétkapcsolás hatására a mitokondriumok membránpotenciálja csökkent; (ii) a mitokondriumok mátrixából festékmolekulák léptek vissza a citoplazmába, és emiatt (iii) a mitokondriumok mátrixában csökkent a festékkoncentráció; (iv) a korábban képződött JC-1 aggregátumok szétestek, aminek következtében (v) az általuk emittált vörös fény intenzitása csökkent. A kontroll (9A panel) és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek CCCP-re adott válaszait (9B panel) összehasonlítva azok nagysága között nem volt érdemi különbség látható. Ezt a megállapítást alátámasztják a kísérletek kiértékelése során nyert összesített adatok is (a 9D ábrarész bal oldali oszlopai). Megfigyelhető ugyanakkor az is, hogy a knockdown sejtek

CCCP-okozta fluoreszcenciaintenzitás-csökkenése (C panel) csak mintegy negyede annak, amit a másik két sejtvonal esetében láttunk (D panel). A tapasztalt különbség alapján kijelenthető, hogy a TASK-3 knockdown WM35 melanoma sejtekben a CCCP lényegesen kisebb MMP csökkenést okozott, mint a kontroll sejtvonalakban.



9. ábra: CCCP hatására kialakuló fluoreszcenciaintenzitás-változások a JC-1 festék J-aggregátumának emissziójában. [A] Kontroll, [B] scrambled shRNS-sel transzfektált és [C] knockdown sejtek mérési eredményei. Szürke háttér jelöli azt az időtartamot, amikor a CCCP alkalmazása történt. A „Sejt” felirattal jelölt számozott görbék egyedi sejtek válaszait tükrözik, míg a „Háttér” nevű görbék sejtmentes területeken regisztrált fluoreszcenciaértékeket mutatnak. A [C] panelen látható „NR” jelzésű görbe egy nem-reagáló sejtről rögzített fényintenzitást mutat. [D] A CCCP hatására kialakuló fluoreszcens fényintenzitás-csökkenés átlagértékei. Az ábrarész az abszolút (bal oldal) és az alapvonalra normalizált (jobb oldal) átlagos fluoreszcenciaváltozásokat tünteti fel. Az oszlopokban található számok a tanulmányozott sejtek számát jelölik. Az átlagos intenzitáscsökkenés számítása során csak a válaszoló sejteket vettük figyelembe.

A vázolt gondolatmenetnek volt azonban egy támadható pontja. Mint azt korábban láttuk, a TASK-3 knockdown sejtek JC-1 akkumulációja csökkent mértékű volt (7E ábra). Ezt a megállapítást tükrözi az a különbség, ami a három sejtvonal CCCP alkalmazás előtti (nyugalmi) fluoreszcenciaintenzitásában is megfigyelhető (lásd a 9A–9C ábrarészek függőleges tengelyeinek beosztását). Ezt az eltérést figyelembe véve helytállónak tűnik az az érv, hogy a knockdown sejteken CCCP jelenlétében kapott kisebb fluoreszcenciacsökkenés

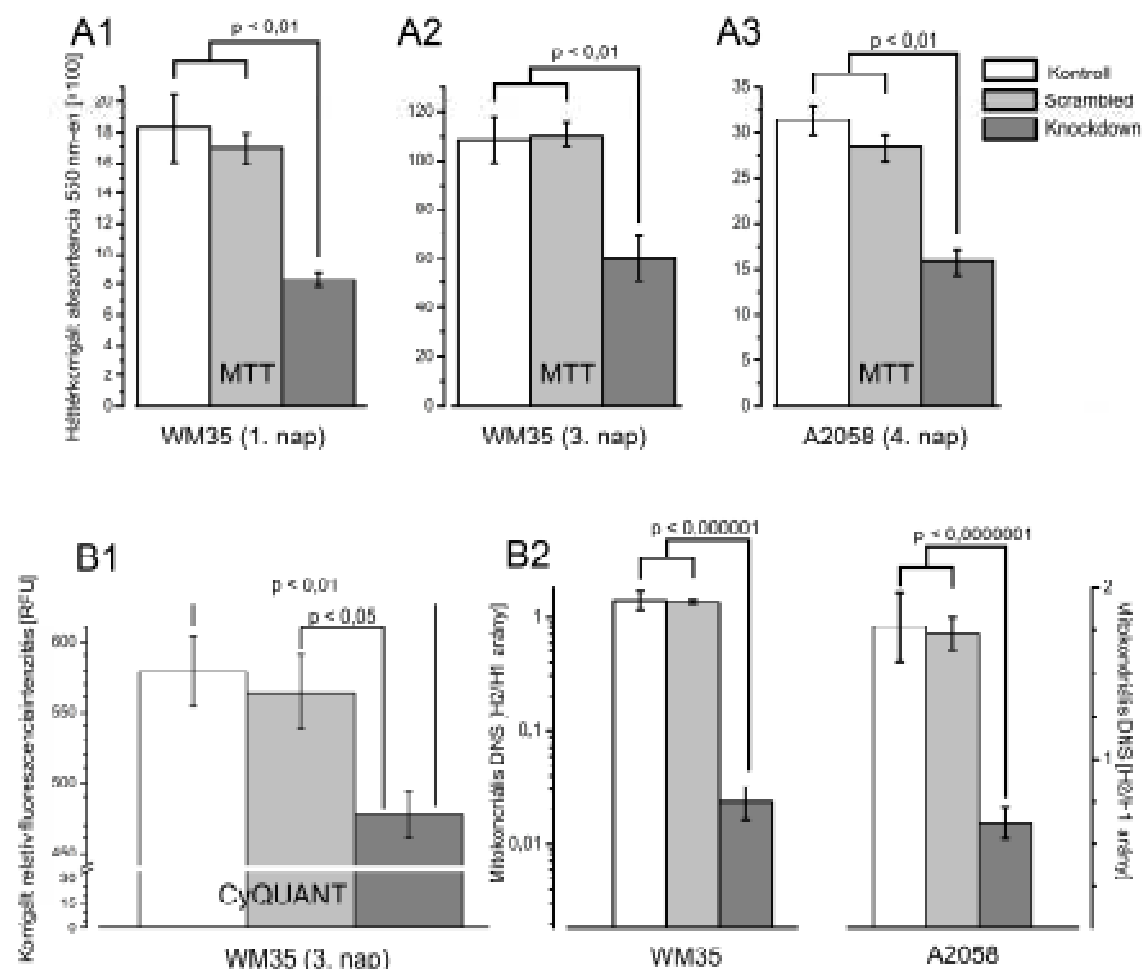
mindössze annak a következménye, hogy a kiindulási fluoreszcenciaintenzitás eleve alacsonyabb.

A CCCP hatás értelmezését úgy kívántuk egyértelművé tenni, hogy a szétkapcsoló szer jelenlétében mért fluoreszcenciaintenzitás-csökkenés nagyságát az alkalmazása előtti nyugalmi értékre normalizáltuk. Az így meghatározott relatív fluoreszcenciaváltozás-értékek összesítése látható a 9. ábra D részének jobb oldali oszlopain. Megállapítható, hogy a kontroll és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek CCCP alkalmazásra adott válaszaik nagyon hasonlóak voltak ($9,0 \pm 0,5\%$, $n = 76$ és $9,2 \pm 0,4\%$, $n = 77$), ugyanakkor a knockdown sejtek mintegy 30%-kal kisebb amplitúdójú választ adtak ($6,12 \pm 0,02\%$, $n = 67$). A különbség mindkét másik sejtvonalhoz hasonlítva statisztikailag szignifikáns ($p < 10^{-5}$). Biztonsággal megállapítható tehát, hogy a TASK-3 expresszió gátlása önmagában is mitokondriális depolarizációt okoz, ezért a CCCP, aminek mitokondriális szétkapcsoló és depolarizáló tulajdonsága közismert, csak kisebb mértékű további depolarizáció kiváltására képes. Ezt a megállapítást a CCCP-re reagáló sejtek százalékos aránya is megerősítette, ugyanis a vizsgált knockdown sejteknek csak 26%-a reagált a szétkapcsoló adására, szemben a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált WM35 sejtek 69%-os és 67%-os válaszkészségével.

4.4. Metabolikus, proliferációs és morfológiai változások a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben

Mivel a mitokondriumok megfelelő működése elengedhetetlen a sejtek túléléséhez és proliferációjához, feltételeztük, hogy a knockdown sejtekben bizonyított károsodott mitokondriális funkció csökkenti a sejtek metabolikus aktivitását és proliferációs képességét is. A feltevés bizonyítása céljából először a metabolikus aktivitást vizsgáltuk, amihez MTT esszét alkalmaztunk. Amint azt a 10. ábra A1–A3 paneljei igazolják, a TASK-3 knockdown sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált sejteké; mind WM35 tenyészetben (A1 és A2 panel), mind az A2058 sejtvonalban (A3 panel).

Három napos WM35 tenyészeteket felhasználva igazoltuk a knockdown sejtek csökkent DNS-tartalmát is (CyQUANT esszé; 10. ábra B1 panelje). A csökkent DNS-tartalom úgy értelmezhető, hogy a géncsendesített tenyészetekben nemcsak a metabolikus aktivitás, hanem a sejtszám is csökkent.

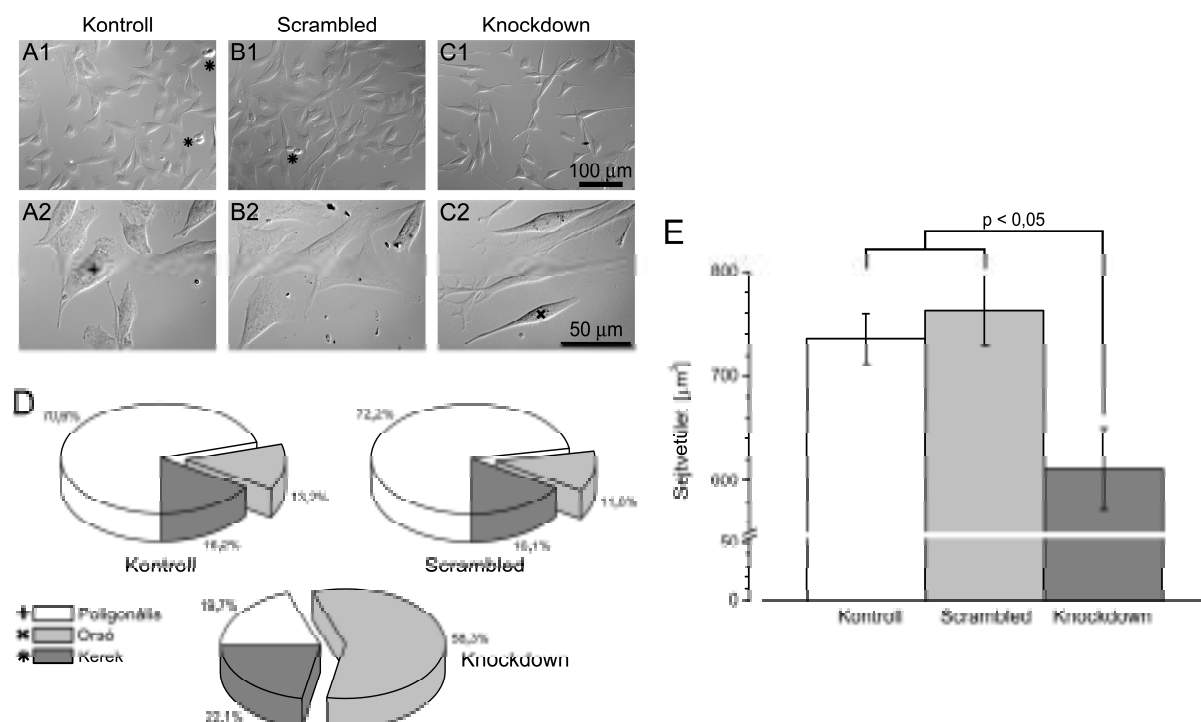


10. ábra: A TASK-3 expresszió gátlásának hatása a melanoma sejtek életképességére, proliferációjára és mitokondriális DNS-tartalmára. [A1–A3] Az MTT-esszé eredménye kontroll, scrambled shRNS-sel transzfektált és knockdown melanoma malignum sejt kultúrákon egy [A1], három [A2] és négy [A3] nappal a sejtek szélesztése után. Az oszlopok az 550 nm-en mért, háttérkorrigált abszorbancia értékeit adják meg. Valamennyi oszlop 4 független mérés eredménye. [B1] A sejtek teljes DNS-tartalmának meghatározása CyQUANT esszével, WM35 sejteken, 3 nappal a passzálást követően. A feltüntetett értékek korrigált relatív fluoreszcenciaintenzitások. [B2] A mitokondriális DNS-mennyiség meghatározása WM35 (bal oldal) és A2058 sejteken (jobb oldal). A magasabb H2/H1 arány nagyobb mennyiségű mitokondriális DNS-t jelez. A WM35 eredményeket bemutató ábrarészen az Y-értékek logaritmikus skálán vannak bemutatva. Az egyes oszlopok 4–5 független mérés eredményének átlagát tükrözik.

Mind a TASK-3 knockdown sejtek csökkent MitoTracker Red jelölődési intenzitása (8. ábra), mind alacsonyabb metabolikus aktivitása (10. ábra A1–A3 paneljei) utalhat arra, hogy ezek a sejtek kevesebb mitokondriummal rendelkeznek. Ezen feltevésnek a megerősítése céljából meghatároztuk a melanoma sejtek mitokondriális DNS-tartalmát (10. ábra B2 panel). Az ezekben a mérésekben a számított H2/H1 arány a sejtenkénti átlagos

mitokondriumszámot jól jellemző paraméter [Bai és mtsai, 2011]). Mint látható, a knockdown sejtekben a H2/H1 arány szignifikánsan alacsonyabb, mint akár a kontroll, akár a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtekben. Megalapozott tehát a következtetés, hogy a TASK-3 expresszió csökkentése nemcsak depolarizálja a mitokondriumokat, hanem a számukat is csökkenti.

Feltűnő változások voltak megfigyelhetők a WM35 TASK-3 knockdown sejtek morfológiai megjelenésében is (11. ábra). A TASK-3 knockdown tenyészet alacsonyabb sejtdenzitást mutatott a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált tenyészetekhez képest (lásd az A1–C2 paneleket), továbbá megváltozott a sejtek alakja is. Amint azt a „Metodika” rész 3.17 alfejezetében részleteztük, az összehasonlítás megkönnyítése végett három sejtalakot különböztettünk meg. A vizsgálatok során azt találtuk, hogy a knockdown kultúrákban a sejtek 58%-a orsószerű volt. Ezzel szemben a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált tenyészetekben az orsó alak fordult elő legritkábban: a sejtek mindössze 12–13%-a mutatta ezt a megjelenési formát.



11. ábra: Stabil TASK-3 géncsökkentés okozta morfológiai változások WM35 melanoma sejteken. [A1–C2] Reprezentatív felvételek kontroll [A1, A2], scrambled shRNS-sel transzfektált [B1, B2] és knockdown [C1, C2] sejtekről kis [A1, B1, C1] és nagy nagyítással [A2, B2, C2]. [D] A három, morfológiailag eltérő sejtcsoport tenyészetenkénti arányát bemutató kördiagramok. A három csoport mindegyikére mutatunk be példát az [A1], [A2], [B1] és [C2] paneleken. [E] A sejtek átlagos vetülete kontroll, scrambled shRNS-sel transzfektált és TASK-3 knockdown tenyészetekben. Mindegyik oszlop 50 sejt átlagértékét reprezentálja.

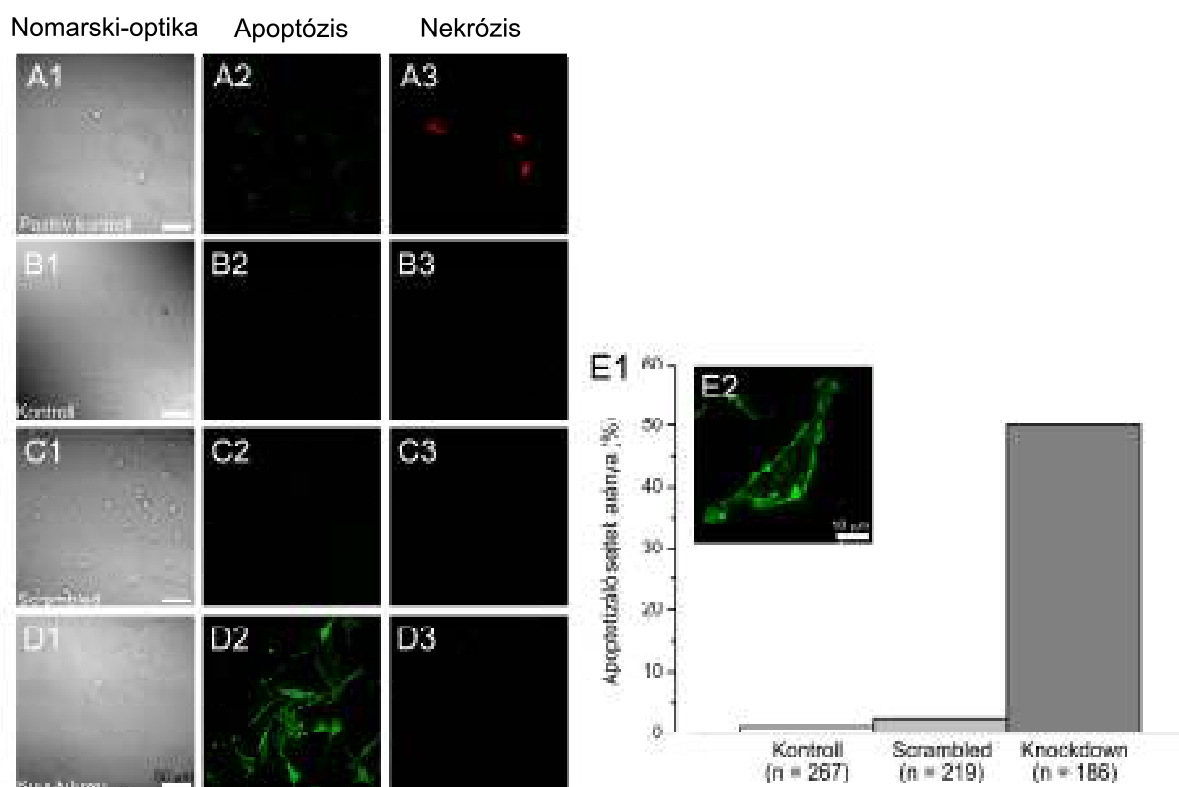
. Utóbbi két sejtvonal esetében a sejtek túlnyomórészt poligonálisak voltak; ennek a formának az előfordulási gyakorisága mindkét kultúrában meghaladta a 70%-ot (11. ábra D panel).

A sejthalak vizsgálata mellett meghatároztuk a sejtek vetületének nagyságát is. Mint a 11. ábra E panelje mutatja, TASK-3 géncsendesítést követően a WM35 sejtek átlagos vetülete ($612 \pm 39 \mu\text{m}^2$) szignifikánsan kisebb volt, mint a másik két tenyészetben mért érték (736 ± 23 és $762 \pm 33 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$, valamennyi esetben $n = 50$).

4.5. A TASK-3 knockdown tenyészet fokozott mértékű apoptózist, de változatlan mértékű nekrozist mutat

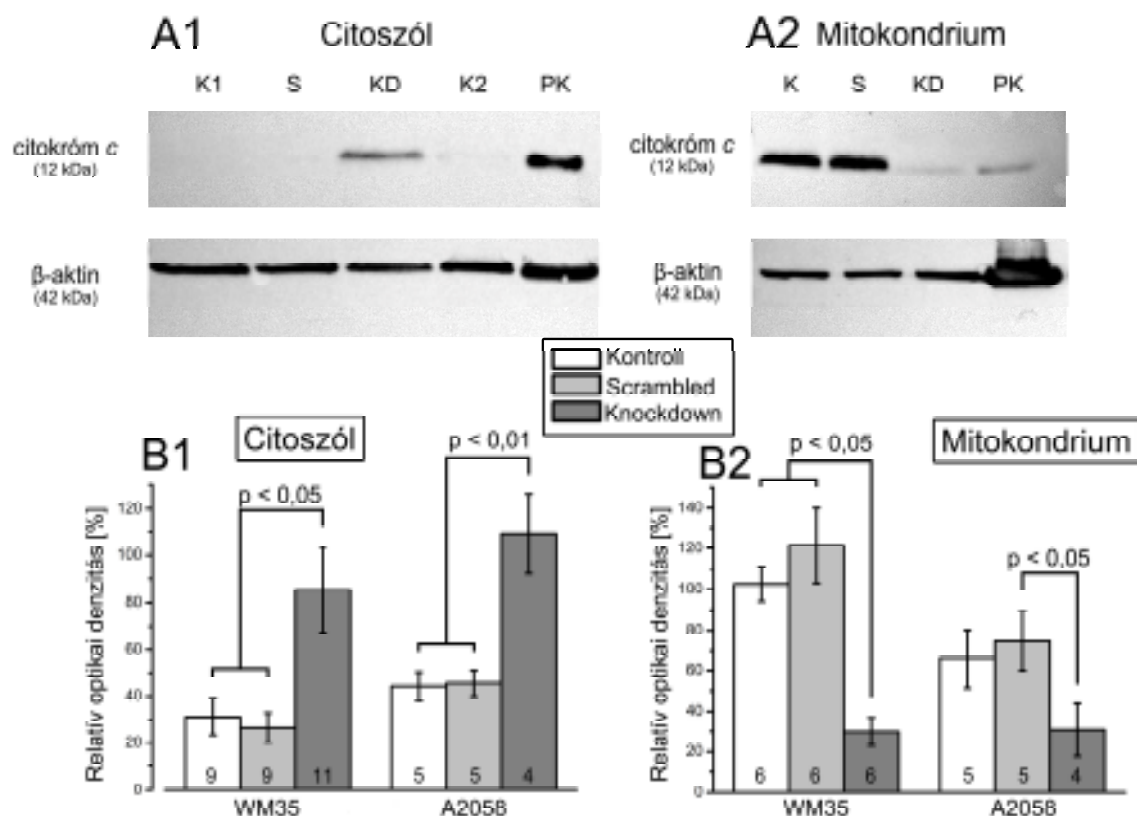
Az eddig bemutatott adatok igazolták, hogy a TASK-3 knockdown tenyészetekben a sejtek száma alacsonyabb volt, mint a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált tenyészetekben. További kísérleteinkben ennek a sejtszámcsökkenésnek az okát vizsgáltuk. Az apoptózis és a TASK-3 csatorna ismert kapcsolatából kiindulva [Lauritzen és mtsai, 2003] elsőként azt vizsgáltuk, hogy a TASK-3 bioszintézis gátlása hatással van-e a melanoma sejtek apoptotikus aktivitására. Miután az is nyilvánvaló, hogy a sejtszámot a nekrotikus folyamatok miatt elpusztuló sejtek mennyisége is befolyásolhatja, az apoptózis mellett a nekrosis intenzitását is tanulmányoztuk. Az eredményeket a 12. ábra foglalja össze.

Az irodalomban található adatokkal összhangban [Kerr és mtsai, 1994], a kontroll WM35 tenyészetben az apoptózis irányában elkötelezett sejtek aránya jelentéktelen volt ($< 5\%$, 12. ábra E1 panel). Ezt az arányt a scrambled shRNS szekvenciával történt transzfekció nem változtatta meg. Ettől eltérően a TASK-3 knockdown sejtvonalakban jelentősen megnőtt az apoptózisra utaló annexin V pozitívást mutató sejtek aránya; az mintegy 50%-ra emelkedett. Megállapítható ugyanakkor az is, hogy a WM35 sejtek esetében a TASK-3-expresszió módosítása nem változtatott a nekrosis mértékén, ugyanis a pozitív kontrollon kívül egyik vizsgált sejtvonalban sem találtunk érdemleges propídium-jodid-jelölődést (12. ábra A3, B3, C3 és D3 panel).



12. ábra: Csökkent TASK-3 expresszió hatása az apoptózis és nekrosis mértékére. [A1–A3] Kontroll melanoma sejteket 5 percen át 3 mmol/l H_2O_2 -dal és 0,1% Triton X-100-zal kezeltünk, majd FITC-konjugált annexin V-specifikus antitesttel és propidium-jodiddal jelöltük őket. Az így kezelt sejtek pozitív kontrollként szolgáltak. **[B1–D3]** Kontroll **[B1–B3]**, scrambled shRNS-sel transzfektált **[C1–C3]** és TASK-3 knockdown **[D1–D3]** sejtekről készült reprezentatív felvételek. **[E1]** Az annexin-V-specifikus (apoptózisra utaló) jelölődést mutató sejtek aránya. A zárójelben lévő számok a kiértékelés során figyelembe vett sejtek számát jelzik. **[E2]** Egy intenzív sejtfelszíni annexin-V-specifikus jelölődést mutató, azaz apoptózis irányába elkötelezett melanoma sejt.

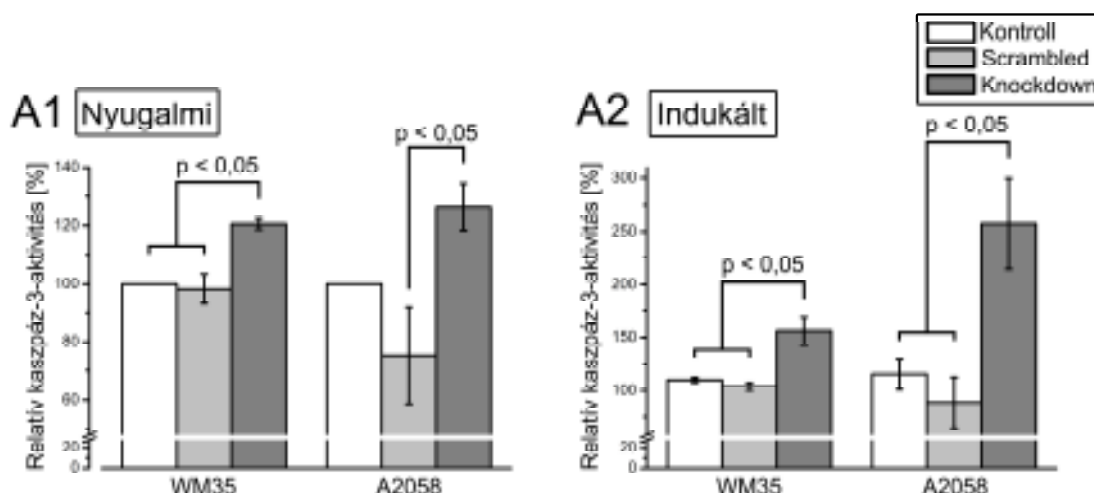
Az apoptotikus útvonalak aktiválódása és a TASK-3 géncsökkentés közötti ok-okozati kapcsolatra további bizonyítékokat szolgáltatottak azok a kísérletek, amikben az egyes sejtvonalak citoszolikus és mitokondriumban gazdag frakcióiban hasonlítottuk össze a citokróm *c* mennyiségét. Amint azt a 13. ábra demonstrálja, a knockdown sejtek citoszoljában magas volt a relatív citokróm *c*-tartalom, míg a kontroll és a scrambled shRNS-transzfektált sejtek esetében, ugyanebben a frakcióban, alig volt kimutatható a citokróm *c* fehérje. Ezzel ellentétes helyzetet figyeltünk meg a mitokondriumban gazdag sejtfrakciók vizsgálata során: itt a knockdown sejtekből származó mintákban alacsony volt a citokróm *c* mennyisége, szemben a TASK-3 fehérjét expresszáló két sejtvonallal, amelyek mitokondriális frakciói magas citokróm *c* tartalommal rendelkeztek.



13. ábra: A citokró m c transzlokációja TASK-3 knockdown sejtekben. [A1] Reprezentatív Western-blot felvételek, melyek a citokró m c fehérje (12 kDa) mennyiségét mutatják kontroll (K1 és K2), scrambled shRNS-sel transzfektált (S) és TASK-3 knockdown (KD) WM35 sejtek citoszóljában. A vázizomból származó teljes sejt lizátum pozitív kontrollként szolgált (PK). Minden egyes sáv intenzitását az ugyanazon mintából nyert β -aktin denzitására normalizáltuk. [A2] Reprezentatív Western-blot felvételek, amelyek a citokró m c fehérje mennyiségét jelzik WM35 sejtekből készített, mitokondriumban gazdag frakciókban. A betűk jelentése ugyanaz, mint az [A1] ábrarész esetében. [B1, B2] WM35 és A2058 sejteken kapott citokró m c -specifikus sávok relatív optikai denzitása. Az oszlopok a citokró m c / β -aktin denzitárányok átlagértékeit mutatják a sejtek citoszólikus [B1] és mitokondriumban gazdag frakciójában [B2]. Az oszlopokban a független kísérletek számát tüntettük fel. Hangsúlyozni kell, hogy az A2058 sejtek mitokondriális frakciója esetében az ANOVA teszt sem a kontroll és knockdown, sem a scrambled és knockdown minták közötti különbséget nem jelölte szignifikánsnak [B2], de a scrambled és knockdown értékek közötti differenciát t -teszttel vizsgálva szignifikáns különbséget kaptunk.

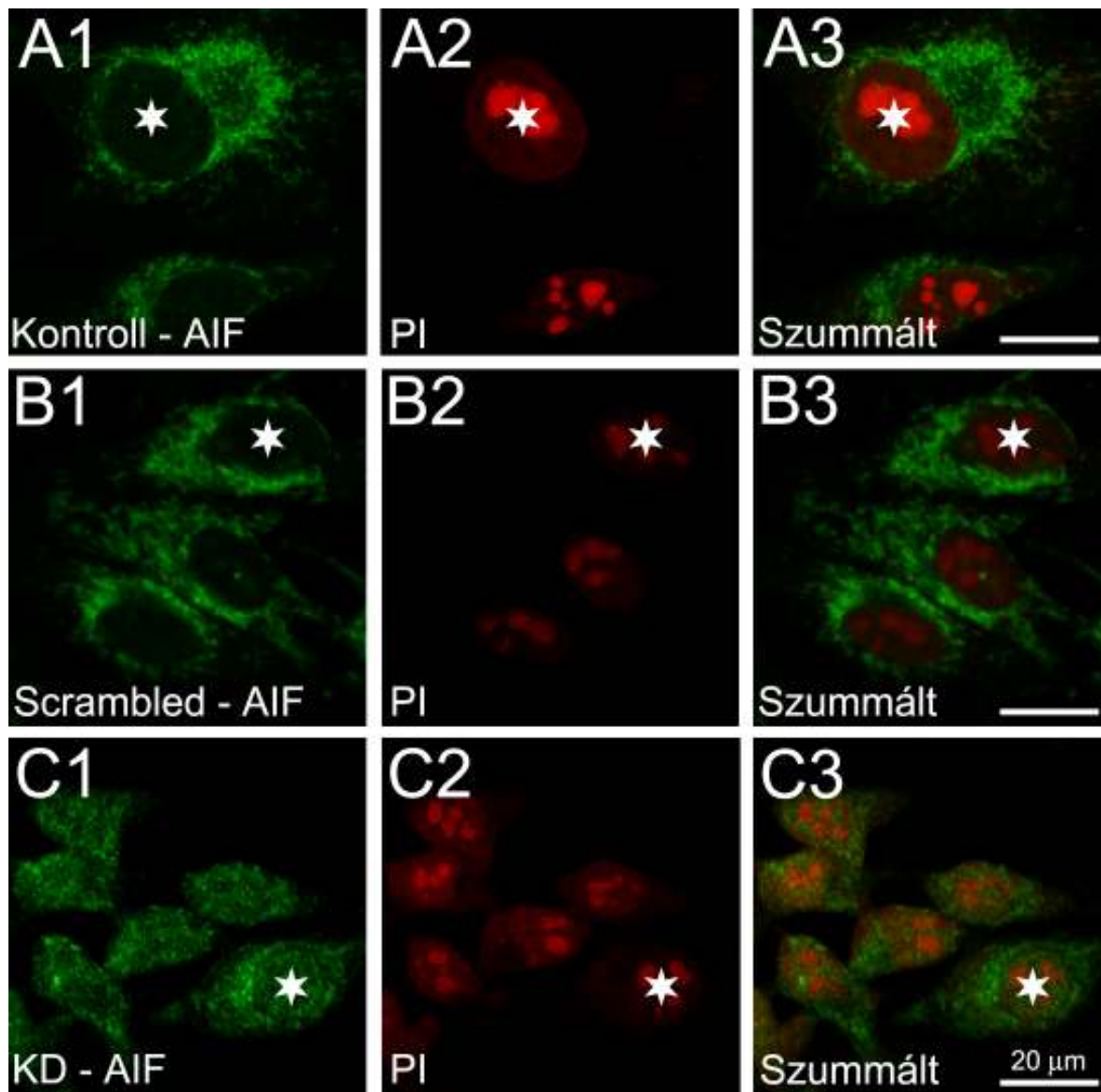
A citokró m c egyike a pro-apoptotikus molekuláknak. A fehérje nyugalmi állapotban a mitokondriumok külső és belső membránja közötti térben helyezkedik el, azonban apoptózis indukálása esetén áthelyeződik a sejt citoplazmájába, és előidézi a kaszpáz-3 enzim aktiválódását. Annak igazolására, hogy esetünkben a citokró m c áthelyeződés valóban része a kaszpáz-3-függő apoptotikus útvonal aktiválódásának, magának a kaszpáz-3-nak is vizsgáltuk az aktivációját, amihez egy kaszpáz-3-specifikus esszt hívtunk segítségül (14. ábra). Az

eredmények azt mutatták, hogy a knockdown sejtek mind nyugalmi helyzetben (A1 panel), mind apoptózisindukciót követően (A2 panel) magasabb kaszpáz-3-aktivitással voltak jellemezhetők. Ez a megfigyelés összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy a TASK-3 expresszió csökkentése károsítja a mitokondriumok működését, és így aktiválja az intrinzik citokróm *c* – kaszpáz-9 – kaszpáz-3 útvonalat [Elmore, 2007].

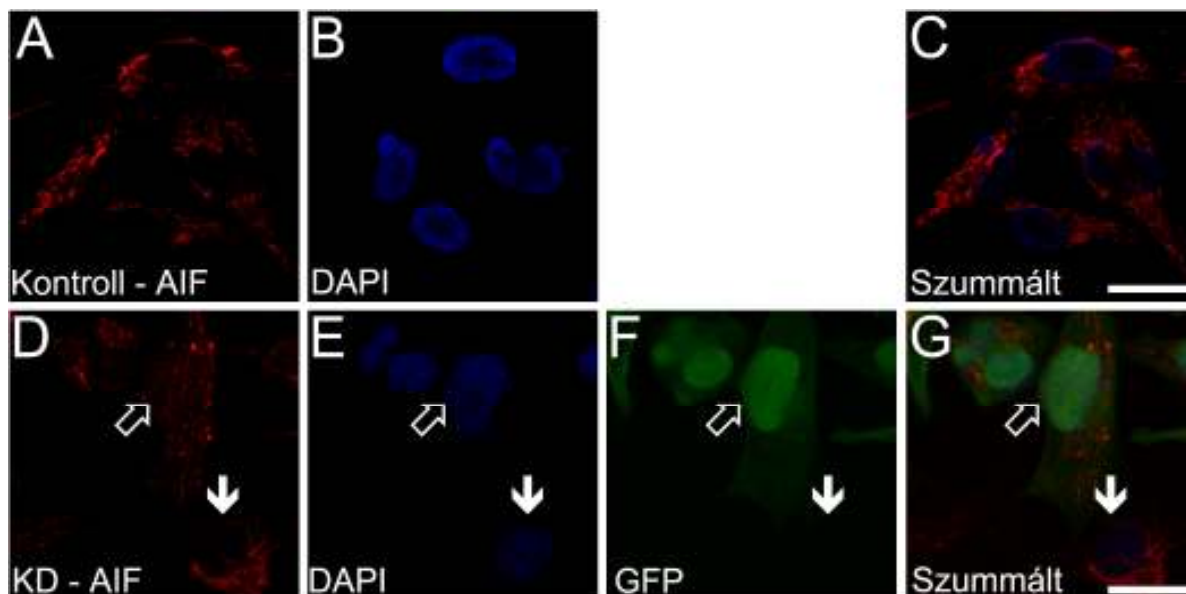


14. ábra: A kaszpáz-3-aktivációja TASK-3 knockdown melanoma sejtekben. A WM35 és az A2058 sejtek relatív kaszpáz-3 aktivitása nyugalomban [A1] és apoptózisindukciót követően [A2]. A mérések során minden adatot a nem-indukált kontroll WM35 és A2058 sejtek kaszpáz aktivitására normalizáltunk. Valamennyi oszlop 3 független kísérlet eredményének átlagát mutatja. Hangsúlyozni kell, hogy bár az ANOVA teszt alapján az A2058 sejtek nyugalmi kaszpáz-3 aktivitása nem különbözött szignifikánsan sem a kontroll és knockdown, sem a scrambled és knockdown minták között [A1], a *t*-teszt szignifikáns differenciát igazolt a scrambled és knockdown értékek között.

A károsodott mitokondriumok kaszpáztól független módon is aktiválhatják az apoptótikus folyamatokat. Ebben az esetben a sérült mitokondriumokból egyebek között AIF szabadulhat fel [Hong és mtsai, 2004]. Annak vizsgálatára, hogy a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben az AIF útvonal hozzájárul-e az apoptótikus folyamat aktiválódásához, AIF-specifikus immuncitokémiai jelöléseket végeztünk WM35 (15. ábra) és A2058 sejteken egyaránt (16. ábra). Az eredmények a két sejtvonal esetében teljes egyezést mutattak. A kontroll és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtekben diffúz, a teljes citoplazmára kiterjedő, de a sejtmagban nem megfigyelhető AIF jelölődést láttunk. Ez az AIF megoszlási mintázat egyezést mutat az irodalomban leírt megfigyelésekkel, amelyek egészséges sejtekben a fehérje mitokondriális lokalizációját írták le [Lorenzo és Susin, 2007].



15. ábra: A TASK-3-expresszió csökkentése WM35 sejtekben az AIF sejtmagba történő transzlokációját okozza. [A1] Az AIF-specifikus immunjelölődés eloszlása kontroll (nem transzfektált) sejtekben. [A2] A propídium-jodid (PI) sejtmagon belüli jelenlétének vizsgálata az [A1]-gyel megegyező látótérben. [A3] Az [A1]-es és [A2]-es felvételek összegzése. A csillag a képen látható egyik sejtmagot jelöli, amelyben AIF jelölődés nem figyelhető meg. [B1–B3] AIF-sepcifikus immunjelölődés megoszlása scrambled shRNS-sel transzfektált WM35 sejteken. A panelek elrendezése és a csillag jelentése ugyanaz, mint az [A1–A3] képek esetében. [C1–C3] AIF-specifikus immunjelölődés TASK-3 knockdown WM35 sejtekben. A csillag egy sejtmagot jelöl. Megfigyelhető a sejtmagok AIF jelölődése.



16. ábra: A TASK-3-expresszió csökkentése tranziensen transzfektált A2058 sejtekben az AIF sejtmagba történő transzlokációját okozza. [A] Az AIF-specifikus immunjelölődés eloszlása kontroll (nem transzfektált) sejtekben. [B] Az [A]-val azonos látótér DAPI jelölődése. [C] Az [A] és[B] felvételek összegzett képe. A sejtmagokban nem figyelhető meg AIF jelölődés. [D–G] A képek elrendezése megegyezik az [A–C] felvételekével, de ezúttal tranziensen transzfektált A2058 sejteket vizsgáltunk. A pár nélküli, [F] panel a GFP-expresszió eloszlását mutatja a látótérben; az erős GFP-pozitivitás a transzfektált sejtek azonosítására szolgált. Egyik ilyen példa az üres nyíllal megjelölt sejt, amelyik sejtmagjában AIF-jelölődés figyelhető meg, ami apoptózisra utal. A telt nyíl egy AIF-mentes sejtmaggal rendelkező sejtet mutat. Mivel ez a sejt nem mutat GFP-expressziót, arra következtethetünk, hogy ez egy nem-transzfektált sejt.

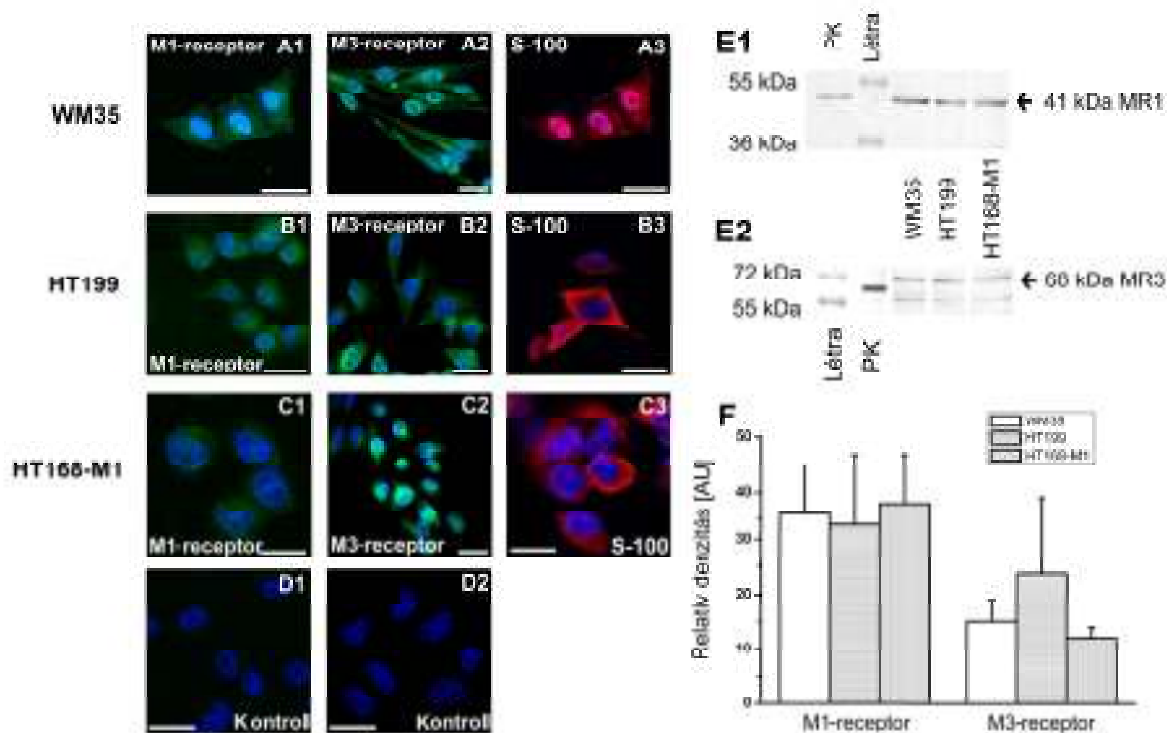
A TASK-3 fehérjét expresszáló sejtekkel ellentétben a knockdown tenyészetekben az AIF-immunjelölődés a sejtmagban is jelen volt. Tekintettel arra, hogy az AIF áthelyeződése a mitokondriumból a sejtmagba a kaspáztól független apoptózis fontos lépése [Hong és mtsai, 2004], a bemutatott eredmények összhangban vannak a TASK-3 knockdown sejtekben tapasztalt megnövekedett apoptótikus aktivitással. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben megfigyelt sejtszámcsökkenés oka az apoptótikus sejtpusztulás, aminek előidézésében kaspázfüggő és -független útvonalak egyaránt részt vesznek.

4.6. Muszkarinos acetilkolin receptorok (MR) kimutatása melanoma sejtekben

A TASK-3 csatornafehérje melanoma sejtekben játszott szerepének vizsgálata során megállapítottuk, hogy számos intracelluláris szabályozó út vonal befolyásolhatja a sejtek életképességét és élettartamát. A jelen értekezésben bemutatott munka egy korábbi fázisában

olyan szabályozási lehetőségeket is tanulmányoztunk, amelyek jelentősége a géncsendesítéses kísérletekben nem lett vizsgálva. Ezen szabályozási útvonalak egyike a citoplazmatikus Ca^{2+} , a másik pedig a sejtek működésének külső idegi/humorális befolyásolása. Ezen lehetőségek elemzése indokolt, hiszen az intracelluláris kalciumhomeosztázis [Roderick és Cook, 2008] és a muszkarinos kolinerg receptorok jelentőségét több tumorféleség esetén is felvetették [Spindel, 2012]. Kísérleteink során a két kérdés tanulmányozását összevontuk, és a muszkarinos ACh-receptorok citoplazmatikus Ca^{2+} -tranzienseket kiváltó szerepét vizsgáltuk három melanoma sejtvonalban.

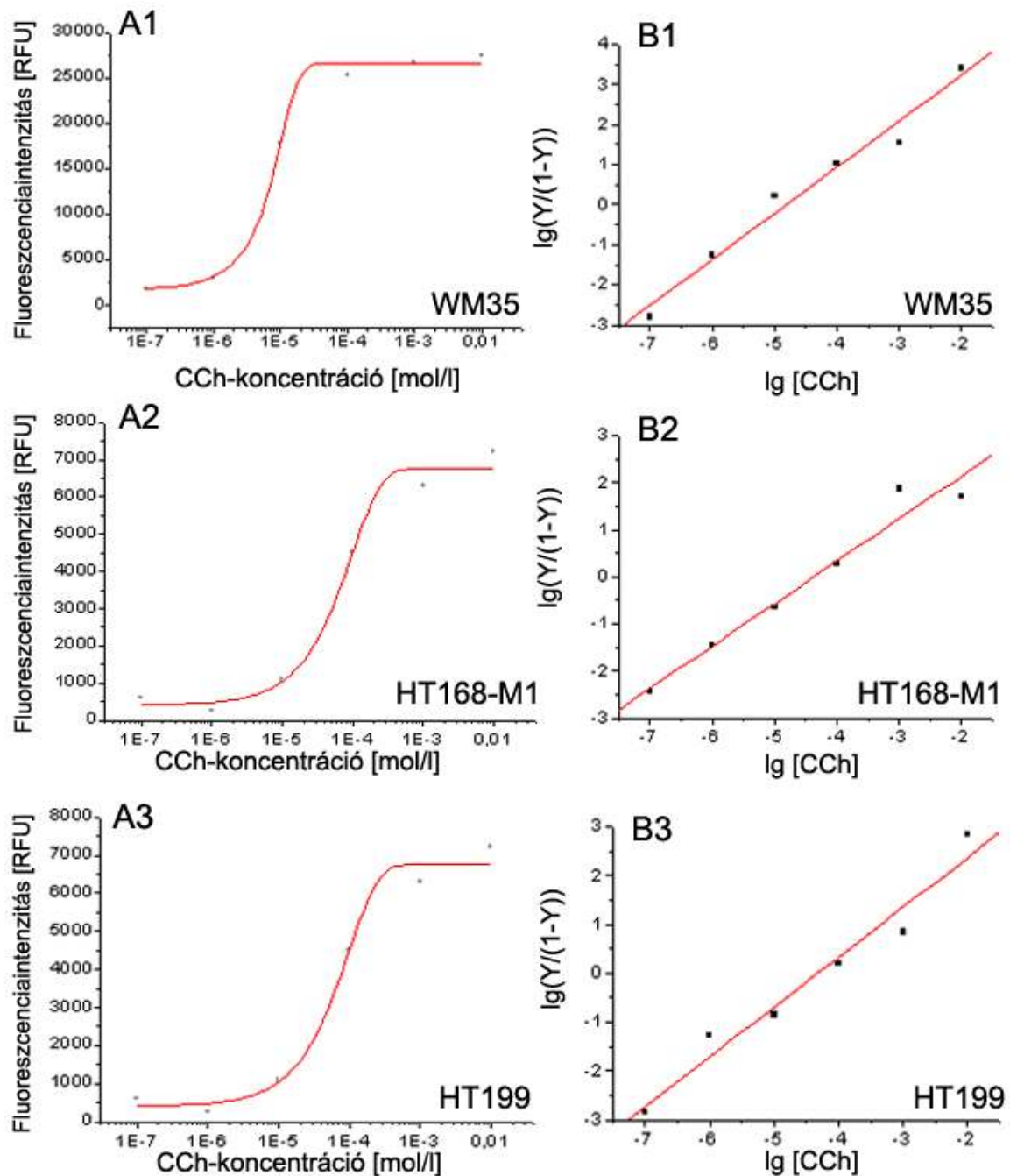
Kísérleteink első lépésében az MR1 és MR3 fehérjék expresszióját mutattuk ki WM35, HT168-M1 és HT199 sejtvonalakon, amihez immuncitokémiai jelölést alkalmaztunk. Amint azt a 17. ábra A1-C2 panelje demonstrálja, mindhárom sejtvonal expresszált mindkét muszkarinos receptort. Az ábrarész jobb oldalán látható képek (A3, B3, C3) S-100-specifikus immunjelölődést ábrázolnak, igazolva a vizsgált sejtvonalak melanoma karakterét. A receptorfehérjék expressziójának kvantitatív jellemzését Western-blot technikával végeztük. A 17. ábra E1, E2 paneljei néhány reprezentatív mintát mutatnak be. A Western-blot kísérletek eredményei megerősítették az immuncitokémiai adatokat; nevesen, hogy mindkét receptor jelen van mindhárom melanoma sejtvonalban. A Western-blot futtatások denzitometriás kiértékelése is megtörtént, aminek során a receptorspecifikus denzitometriai értékeket az azonos futtatásban kapott β -aktin értékekre normalizáltuk. Az egyes sejtvonalak esetében kapott átlagos relatív denzitásértékeket a 17. ábra F része mutatja be. Az eredmények szerint (i) az MR1 protein mennyisége a három sejtvonalban nagyjából azonos mértékű volt; (ii) a tenyészetekben az MR1 fehérje mennyisége nagyobb volt, mint az MR3 fehérje mennyisége; továbbá (iii) az M3 protein mennyisége eltérő volt az egyes sejtvonalak esetében: a HT199 sejtek nagyobb mennyiségben tartalmazták ezt a receptorfehérjét, mint a WM35 vagy a HT168-M1 sejtek. Ez a variabilitás még akkor is figyelmet érdemel, ha a különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.



17. ábra: Muszkarinos acetilkolin receptorok jelenléte a vizsgált melanoma sejtvonalakon. A sejtek MR1- [A1, B1, C1] és MR3-specifikus immunjelölődése [A2, B2, C2]. A két oszlop legalsó felvétele [D1, D2] negatív kontroll, amit úgy készítettünk, hogy az elsődleges antitestet kihagytuk a reakcióelegyből. A kalibráció valamennyi ábrarészen 20 μ m. A jobb oldali oszlop [A3, B3, C3] az S-100 melanoma markerre specifikus jelölődést mutatja. [E1] A panel az MR1-specifikus Western-blot eredményeket mutatja. [E2] A panel az E1 panelhez hasonló elrendezésben mutatja a MR3-specifikus eredményeket. [F] A Western-blot mérések kiértékelése során gyűjtött denzitometriás adatok. Az oszlopokon a megfelelő β -aktin értékekre normalizált MR-receptor értékeket ábrázoltuk. Az egyes oszlopok 3 független kísérletben végzett 3–3 futtatás átlagértékeit adják meg. A sejtvonalak között látható különbségek egyik esetben sem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. PK: pozitív kontroll

4.7. A karbamilkolinnal (CCh) kiváltott kalciumkoncentráció-változások sajátosságai

A muszkarinos acetilkolin receptorok jelentőségének tanulmányozása érdekében a kolinerg agonista hatású CCh-t alkalmaztuk, és elemeztük az adagolás hatására kialakuló citoplazmatikus kalciumkoncentráció-változásokat. Ezen kísérletek megkezdése előtt mindhárom sejtvonal esetében szükségesnek láttuk a CCh-alkalmazás dózis-hatás összefüggésének meghatározását. Ezen mérések célja az volt, hogy a későbbi kísérletekben olyan CCh-koncentrációt alkalmazzunk, ami biztosan maximális választ vált ki. A méréseket a 18. ábra szemlélteti, a kapott eredményeket pedig a 2. táblázat foglalja össze.



18. ábra: CCh alkalmazásával kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció-növekedés dózis-hatás összefüggése. [A1–A3] Különböző CCh-koncentrációk hatására kialakuló kalciumkoncentráció-változások egy-egy reprezentatív kísérletben. **[B1–B3]** A megfelelő A ábrarészen látható meghatározások Hill-féle illesztései. A mérések High Troughput Screening System készülék segítségével történtek, az eljárás és a számítás részleteit a „Metodika” 3.10 alfejezetében ismertettük. Az ábrán pirossal szerepeltetjük az illesztés során kapott görbéket.

2. táblázat: A CCh dózis-hatás görbék kvantitatív jellemzése

Sejtvonal	EC ₅₀ (mol/l)	p	n
WM35	$8,72 \times 10^{-6} \pm 1,17 \times 10^{-6}$	$1,06 \pm 0,12$	8
HT199	$1,70 \times 10^{-4} \pm 1,20 \times 10^{-4}$	$0,74 \pm 0,19$	8
HT168-M1	$3,00 \times 10^{-5} \pm 6,00 \times 10^{-6}$	$0,92 \pm 0,10$	8

A táblázatban a félhatásos dózist (EC₅₀), a receptor aktivációjához szükséges átlagos ligandumszámot (p) és a mérések számát (n) tüntettük fel.

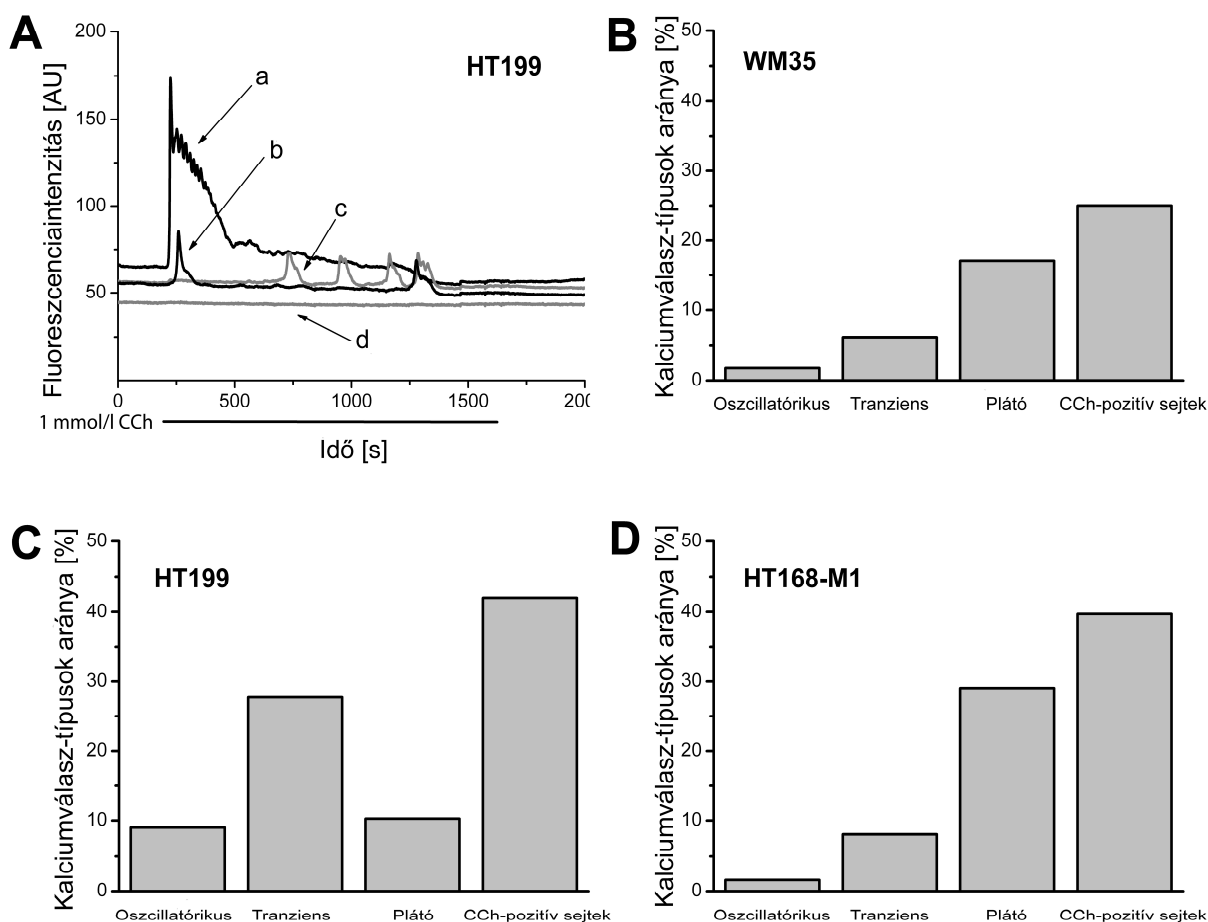
A félhatásos dózisok (EC₅₀) alapján megállapítottuk, hogy a WM35 sejtek mutatták a legnagyobb, míg a HT199 sejtek a legkisebb CCh-érzékenységet. A p paraméter értéke 0,7 és 1,1 között változott, ami arra utal, hogy függetlenül a sejtvonal és a muszkarinos receptor típusától, egyetlen CCh molekula kötődése elegendő a receptoraktivációhoz.

A dózis-hatás összefüggések alapján 1 mmol/l CCh-t, azaz egy biztosan telítő dózist választottuk a Ca²⁺-tranziensek kiváltására. Az elvégzett kísérletek egy jellemző példáját mutatja be a 19. ábra. Az ábra A paneljén egyazon látótérben elhelyezkedő HT199 sejteken kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció-változások láthatók. A kialakuló koncentrációváltozások időbeli lezajlása jelentős sejtek közötti változékonyságot mutatott. A CCh alkalmazását követően egyes sejteken meglehetősen komplex jelalak volt megfigyelhető, ami egy korai tranziens, és egy, a CCh alkalmazása alatt végig fennmaradó plató fázist tartalmazott (lásd a 19. ábra A paneljén a-val jelölt tranziens). Az agonista kimosását követően a Ca²⁺-koncentráció visszaállt a nyugalmi szintre. Ezt a jeltípust az értekezés további részében „plató” vagy „plató-típus” néven említjük.

Más sejtekben a korai tranziens nem követte plató fázis (pl. a b-vel jelölt tranziens a 19. ábra A paneljén). Ezeket a válaszokat a továbbiakban „tranziens” vagy „gyors” néven fogjuk említeni. Ezeken a könnyen azonosítható jeltípusokon túlmenően olykor egyedi időbeli lezajlású kalciumkoncentráció-változásokat is megfigyeltünk. Előfordult például hosszan fenntartott kalciumkoncentráció-emelkedés korai tranziens komponens nélkül, vagy oszcillatórikus jellegű válasz (utóbbira példa a c-vel jelölt tranziens a 19. ábra A paneljén). Ezeket a jelalakokat „atípusos” név alatt foglaltuk össze. Tekintettel az atípusos jelek viszonylag alacsony előfordulási gyakoriságára és nagy variabilitására, további csoportosításukkal nem foglalkoztunk, és az ilyen válaszokat létrehozó sejteket nem vettük figyelembe a kísérletek kiértékelése során.

Az 1 mmol/l CCh-nal kiváltott kalciumkoncentráció-változások statisztikai kiértékelése a 19. ábra B–D paneljein látható. Az adatok elemzése megmutatta, hogy a CCh-

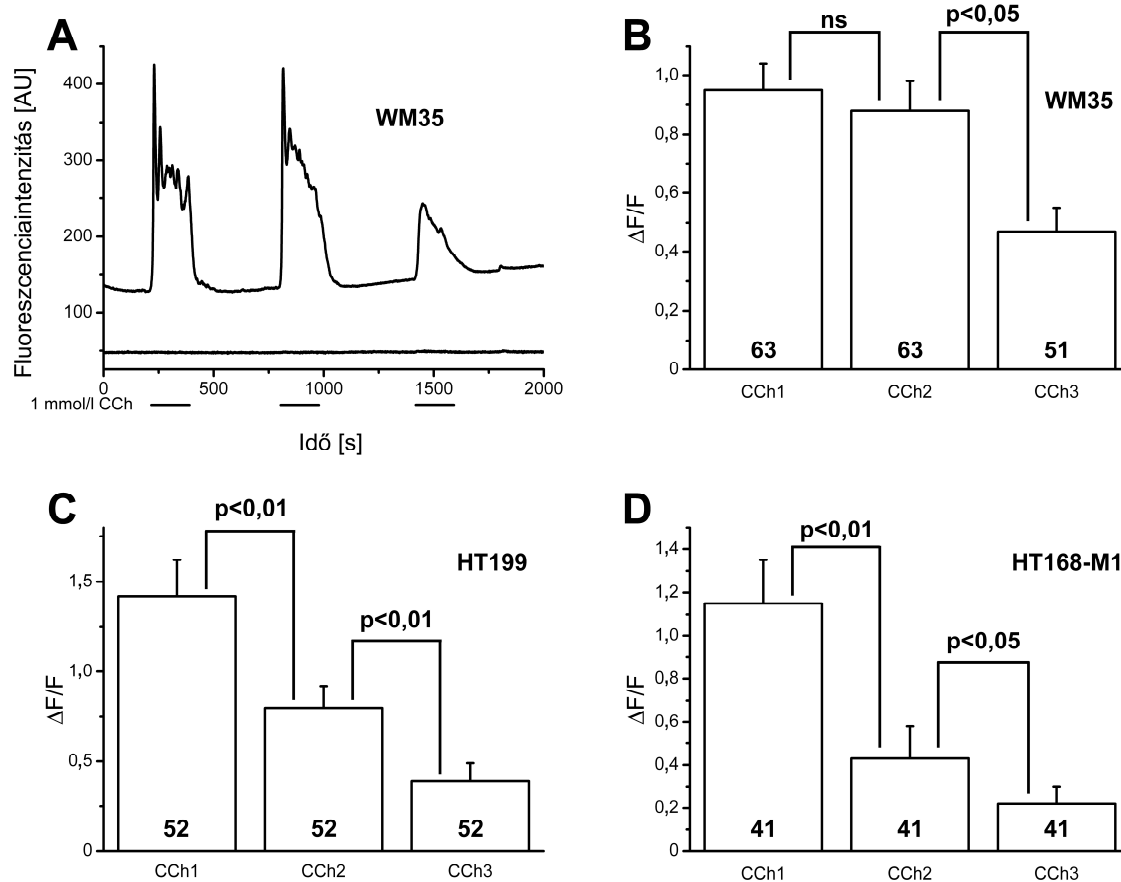
érzékeny sejtek előfordulási gyakorisága a WM35 tenyészetben alacsonyabb volt (25%), mint a HT199 (42%) és a HT168-M1 (40%) sejtekben. A 19. ábra B-D paneljeinek negyedik oszlopa megadja a CCh-ra reagáló sejtek arányát az adott sejtvonalak esetében. Azt is dokumentáltuk, hogy a jelalaktípusok mindegyike jelen volt mindhárom vizsgált sejtvonalban; ugyanakkor az egyes jelalakok előfordulási gyakorisága jelentős eltéréseket mutatott. A legjellemzőbb eltérésnek az tekinthető, hogy a WM35 és a HT168-M1 sejtekben a plató-típusú jelalak előfordulási gyakorisága meghaladta a gyors, tranziens jelalakét, míg a HT199 sejtekben a tranziens jelalak volt a leggyakoribb.



19. ábra: A CCh által kiváltott, eltérő jellegű citoplazmatikus Ca^{2+} -tranziensek megoszlása az egyes melanoma sejtvonalakban. [A] Egyedi sejteken mért fluoreszcenciaintenzitásváltozások egy HT-199 sejteket tartalmazó látótérből. A CCh-alkalmazás időzítését és tartamát az X-tengely alatt látható vízszintes vonal jelöli. A különféle lefutású jelalakokat kisbetűkkel jelöltük (a: platóval rendelkező, b: gyors, tranziens, c: atípusos, oszcillatörikus jeltípus). A legalsó regisztrátum (d) egy sejtmentes területen mért fluoreszcenciaintenzitást mutat be, amit háttérkorrekció céljából rögzítettünk. **[B–D]** Az egyes jelalakok előfordulási gyakorisága WM35 [B], HT199 [C] és HT186-M1 [D] sejtekben. A negyedik oszlop megadja a CCh-ra reagáló sejtek arányát.

Az is látható, hogy az atípusos jelalak a legnagyobb valószínűséggel a HT199 sejteken fordult elő (9%), míg a WM35 és a HT168-M1 sejtekben ez a jelalak csak a válaszok 2%-ában volt jelen. Megállapítottuk továbbá, hogy az atípusos válaszok között az oszcillatórikus megjelenésű volt a leggyakoribb.

A funkcionális és farmakológiai vizsgálatok általában megkívánják az agonista ismételt adagolását. Az eredmények helyes értelmezéséhez ugyanakkor feltétlenül szükséges ellenőrizni, hogy mennyire egyformák az egymást követő CCh-alkalmazásokra adott válaszok. Az ezen célból végzett kísérletek eredményeit a 20. ábra foglalja össze.



20. ábra: CCh ismételt alkalmazásával kiváltott Ca^{2+} -tranziensek. [A] WM35 sejten CCh három egymást követő adásával létrehozott fluoreszcenciaintenzitás-változások (a CCh alkalmazásának időzítését és tartamát az X-tengely alatti vízszintes vonalak jelölik). Az alsó regisztrátum a háttér fényintenzitás állandóságát demonstrálja. [B–D] Az azonos módon elvégzett kísérletek összesített eredménye WM35 [B], HT199 [C] és HT168-M1 [D] sejtek esetében. Mindhárom ábrarészen az oszlopok az első (CCh1), a második (CCh2) és a harmadik (CCh3) CCh-alkalmazás átlageredményeit mutatják. A CCh adása következtében kialakuló Ca^{2+} -tranziensek amplitudóját a nyugalmi kalciumkoncentráció értékére normalizáltuk. Az oszlopokban feltüntettük az adott átlag számításakor figyelembe vett sejtek számát. ns: nem szignifikáns.

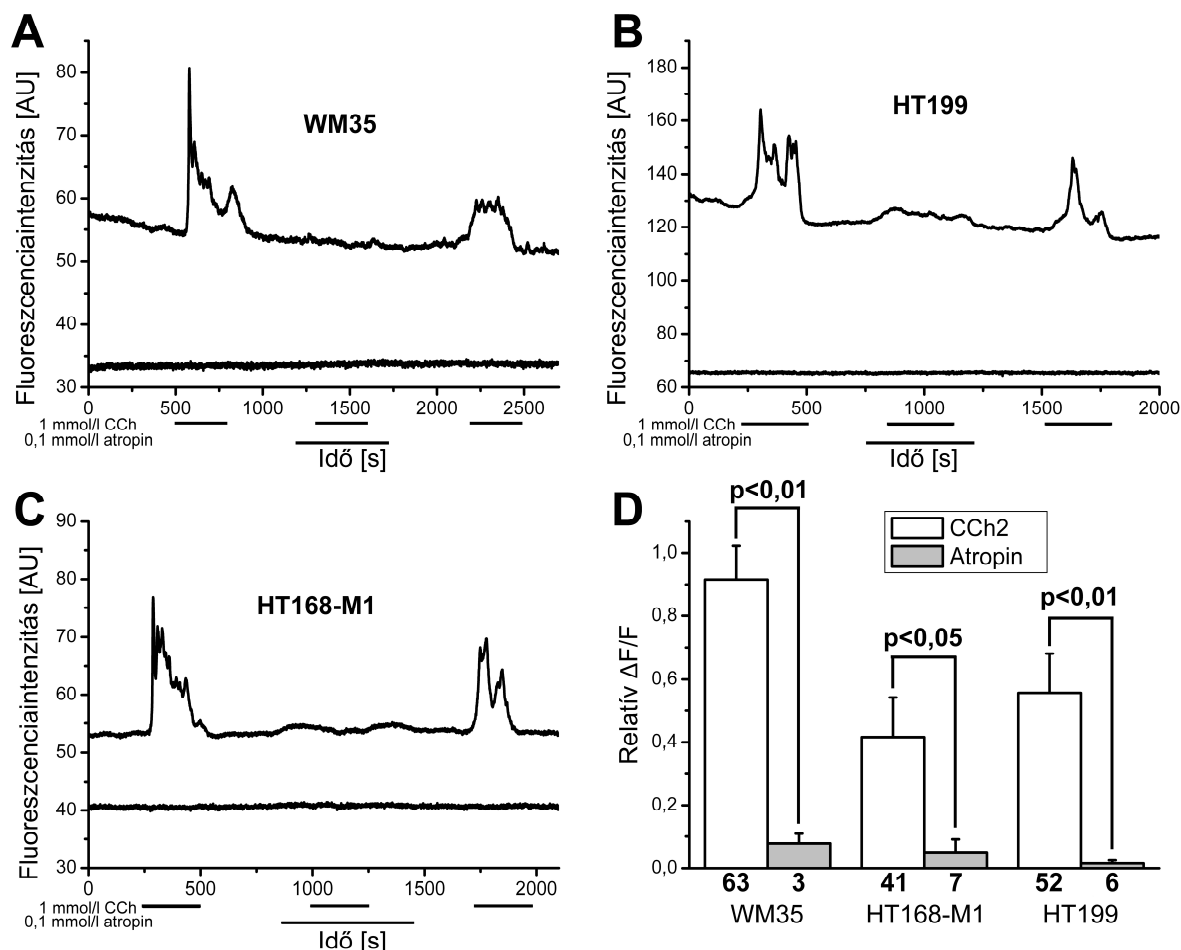
A 20. ábra A panelje egy WM35 sejten végzett kísérlet eredményét mutatja. Jól látható, hogy a CCh-nal kiváltott első és második Ca^{2+} -tranziens nagysága gyakorlatilag azonos, míg a harmadik CCh-adagolás már lényegesen kisebb kalciumkoncentráció-növekedést váltott ki. Az azonos módon elvégzett kísérletek eredményeinek összefoglalását mutatják be a 20. ábra B–D paneljei. Az adatokból látszik, hogy az első kalciumtranziensek amplitúdói a vizsgált sejtvonaltól függetlenül megközelítőleg azonosak voltak ($\Delta F/F = 0,95\text{--}1,42$). A WM35 sejtek esetében (20. ábra B panel) a második kalciumtranziens amplitúdója az első tranziens nagyságának 93%-a volt, azaz a csökkenés minimális. Ezzel szemben a harmadik tranziens már csak az első csúcserkének 49%-át érte el. A HT199 (20. ábra C panel) és a HT168-M1 sejtvonalak esetében (20. ábra D panel) már a második kalciumtranziensek amplitúdója is jelentős csökkenést mutatott az első tranziensekhez képest (56% és 37%), a harmadik CCh-alkalmazást követően pedig még ennél is kisebb jelet figyeltünk meg (az első nagyságának 27% és 19%-a). Az ismételt CCh-alkalmazás esetén megfigyelhető kalciumtranziens-csökkenést az értekezés további részében tachyphylaxis néven említjük. A jelenség hátterében álló lehetséges mechanizmusok azonosítását nem kíséreltük meg.

4.8. A CCh-hatás farmakológiai jellemzése

Annak érdekében, hogy igazoljuk a muszkarinos ACh-receptorok résztvételét a CCh-nal kiváltott citoplazmatikus kalciumkoncentráció-növekedés létrehozásában, atropint – a muszkarinos receptorok jól ismert gátlószerét – alkalmaztunk. A 21. ábra A–C paneljei jelzik, hogy 0,1 mmol/l atropinnal történő előkezelés mindhárom sejttypusban megszüntette, vagy legalábbis igen jelentősen csökkentette, a CCh-nal kiváltott kalciumtranzienseket. Az atropin hatása reverzibilis volt, különösen ha azt is figyelembe vesszük, hogy az atropin kimosását követő CCh-alkalmazás már a harmadik tranzienszt váltotta ki – láttuk ugyanis korábban, hogy a harmadik CCh-adagolás következtében kialakuló Ca^{2+} -tranziensek kontroll körülmények között is jelentősen csökkent nagyságúak voltak.

Az atropinnal végzett kísérletek statisztikai kiértékelését a 21. ábra D panelje szemlélteti. Az adatok feldolgozása során kiszámítottuk, hogy az atropin jelenlétében kapott kalciumtranziensek amplitúdója hány %-a az első CCh-adás során kapott kalciumtranziens nagyságának, és az így kapott értékeket átlagoltuk. A 21D ábra szürke oszlopai jelzik, hogy atropin jelenlétében a kalciumtranziensek nagysága az eredeti érték 9%-ára (WM35), 3%-ára (HT199) és 12%-ára csökkent (HT168-M1). A 21. ábra D paneljének üres oszlopai a tachyphylaxist célzó kísérletek során kiváltott második tranziensek nagyságát jelzik (azaz

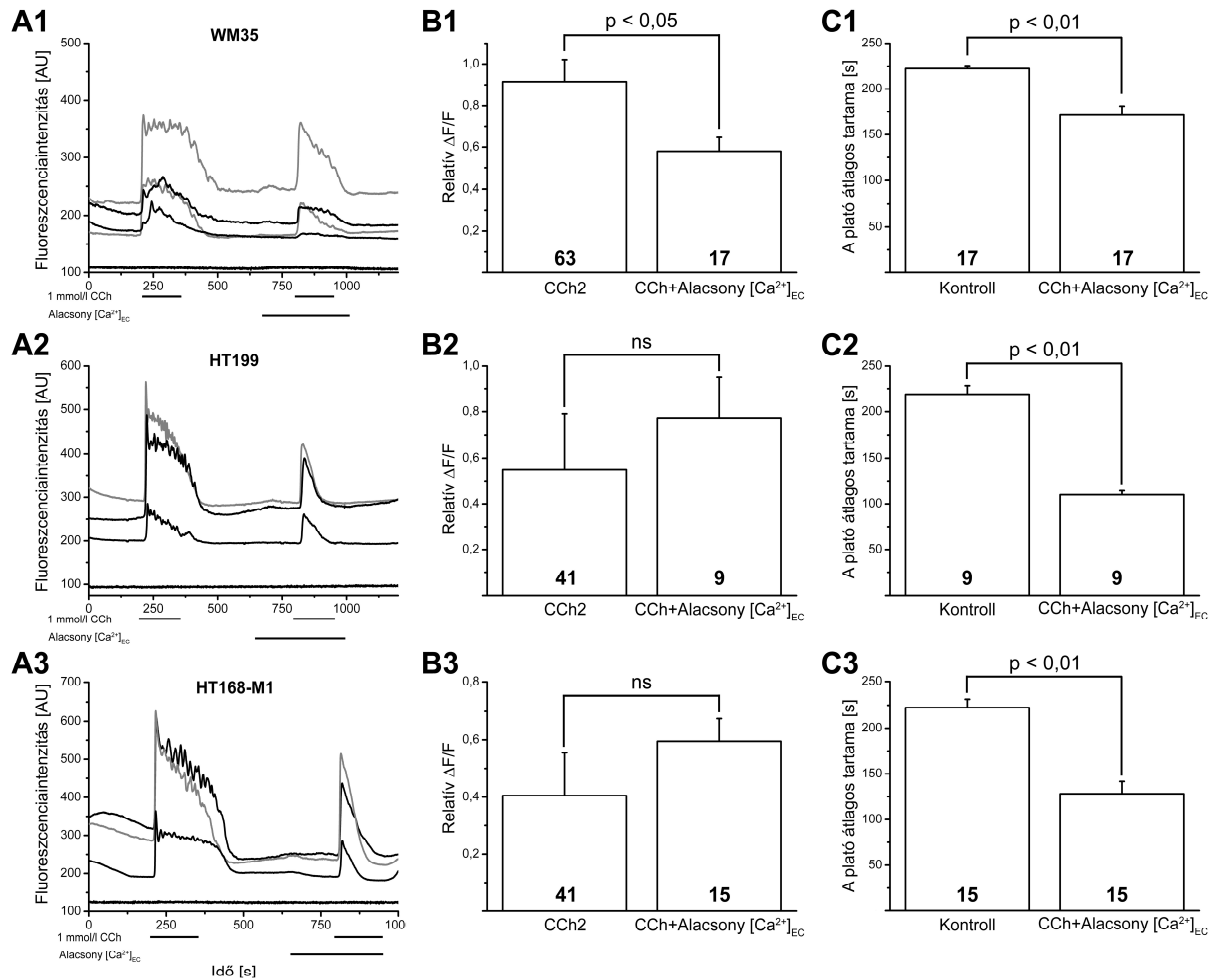
azonosak a 20. ábra B–D paneljein található CCh2 jelzésű oszlopokkal). Az azonos sejtvonalakon nyert átlagértékek összehasonlítása nyilvánvalóvá teszi, hogy atropin jelenlétében a kalciumkoncentráció-változások amplitúdója szignifikánsan nagyobb mértékben csökkent, mint ami a tachyphylaxis alapján várható lett volna.



21. ábra: Atropin hatása a CCh-nal kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre. [A–C] A kísérletek során először kalciumkoncentráció-növekedést váltottunk ki (kontroll Hanks-oldatban alkalmazott 1 mmol/l CCh segítségével) WM35 [A], HT199 [B] és HT168-M1 [C] sejteken (a CCh jelenlétét az időtengely alatti vonalak közül a felsők jelölik). Ezt követően atropint adagoltunk (0,1 mmol/l, 150 s tartamon át; ezt az időtengely alatti vonalak közül az alsók jelölik), majd a blokkolószer jelenlétében megismételtük a CCh alkalmazását. A kísérlet végén az atropin kimosását követően újra CCh-t alkalmaztunk. [D] A leírt módon elvégzett kísérletek összesített eredményei. A panelen az üres oszlopok a 20. ábrán bemutatott CCh2 adatokkal azonosak (azaz a tranziensek tachyphylaxis miatti csökkenését jelzik); ezekhez hasonlítottuk az atropin jelenlétében kapott tranziensek nagyságát (szürke oszlopok). Az oszlopok alatt feltüntettük az adott átlag számításakor figyelembe vett sejtek számát.

A CCh-okozta kalciumkoncentráció-változások egymástól jelentősen különböző időbeli lezajlása arra utalt, hogy a kalciumtranziensek kialakításában részt vevő kalciumionok több forrásból származhattak. Az MR1 és MR3 szignalizációs útvonalról rendelkezésre álló

adatok alapján a tranziensek korai, gyors komponense nagy valószínűséggel a kalciumionok intracelluláris raktárakból történő felszabadulását tükrözi. Indokoltnak látszott ugyanakkor megvizsgálni, hogy az extracelluláris térből történő kalciumbelépés hozzájárul-e a CCh-kiváltotta kalciumkoncentráció-változások kialakulásához.



22. ábra: Az extracelluláris kalciumkoncentráció csökkentésének hatása a CCh-nal kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre. [A1–A3] A kísérletek során először kontroll Hanks-oldatban alkalmaztunk 1 mmol/l CCh-t WM35 [A1], HT199 [A2] és HT168-M1 [A3] sejteken (a CCh jelenlétét az időtengely alatti vonalak közül a felsők jelölik). A következő lépésben az inkubáló oldatot alacsony kalciumkoncentrációjú (0,15 mmol/l) Hanks-oldatra cseréltük (ezt az időtengely alatti vonalak közül az alsók jelölik), majd megismételtük a CCh adagolását. Az A1, A2 és A3 panelek ugyanazon látótérben található több sejt viselkedését mutatják be. [B1–C3] A leírt módon elvégzett kísérletek összesített eredményei. [B1–B3] A bal oldali oszlopok a 17. ábrán bemutatott CCh2 adatokkal azonosak (azaz a tranziensek tachyphylaxis miatti csökkenését jelzik), és ezekhez hasonlítottuk az alacsony extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció jelenlétében kapott tranziensek nagyságát (jobb oldali oszlopok). [C1–C3] A kalciumtranziensek időtartama a maximális amplitudó 10%-ánál mérve, 1,5 mmol/l Ca^{2+} -koncentrációjú Hanks-oldatban (kontroll) és

csökkentett Ca^{2+} -koncentrációjú Hanks-oldatban („alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EC}}$ ”). Az adott átlag számításakor figyelembe vett sejtek számát az oszlopokban tüntettük fel. ns: nem szignifikáns.

A kérdés megválaszolása céljából végzett kísérletekben a CCh-t először a szokásos kalciumtartalmú extracelluláris oldatban alkalmaztuk (1,5 mmol/l). Ezt követően az inkubáló oldat CaCl_2 -tartalmát nagyrészt MgCl_2 -ra cseréltük, és az így előállított, alacsony kalciumkoncentrációjú (0,15 mmol/l) Hanks-oldatban ismételtük meg a CCh adását. A kísérletek eredményeit a 22. ábra foglalja össze. Az ábra A1, A2 és A3 paneljei típusos regisztrátumokat mutatnak be, amiket WM35 (A1), HT199 (A2) és HT168-M1 (A3) sejtekről rögzítettünk. Jól látható, hogy az extracelluláris kalciumkoncentráció mérséklése jelentősen csökkentette a CCh-kiváltott kalciumtranziensek plató komponensét.

Az előzőekben leírt módon elvégzett kísérletek összesített eredményeit a 22. ábra B1–C3 paneljei mutatják. Az adatok alapján megállapítható, hogy a kalciumtranziensek amplitúdója (azaz a korai komponens nagysága) a WM35 sejtekben az extracelluláris kalciumkoncentráció mérséklése esetén kifejezettebben csökkent, mint ami a tachyphylaxis alapján várható lett volna (22. ábra B1 panel). A másik két sejtvonal esetében ugyanakkor nem volt szignifikáns különbség az alacsony külső kalciumkoncentráció esetén mért és a tachyphylaxis alapján várható amplitúdók között (22. ábra B2 és B3 paneljei).

Szemben a korai komponens mérsékelt módosulásával, a külső kalciumkoncentrációt lecsökkentve mindhárom sejtvonalban jelentősen megváltozott a plató fázis időtartama és amplitúdója. A változás mennyiségi jellemzése érdekében a maximális amplitúdó 10%-ánál meghatároztuk a kalciumtranziensek időtartamát. A plató komponens rövidülésének mértéke mindhárom sejtvonal esetében statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (22. ábra C1, C2 és C3 paneljei), de ezen belül a változás jóval kifejezettebb volt a metasztatikus eredetű sejtvonalakban (50% a HT199 és 42% a HT168-M1 sejtekben), mint a primer tumorból származó WM35 sejtekben (23%).

5. Diszkusszió

Az értekezésben bemutatott munka keretében sikerült stabilan TASK-3 géncsendesített WM35, és tranziensen TASK-3 géncsendesített A2085 sejtvonalakat előállítanunk. A géncsendesítés hatásos volt, mivel mind a TASK-3-specifikus mRNS, mind a TASK-3 fehérje expressziója csökkent az érintett tenyészetekben. Kísérleteink során rámutattunk, hogy a TASK-3 géncsendesített melanoma sejtekben károsodik a mitokondriális funkció. Megítélésünk szerint a TASK-3 géncsendesített sejtek mitokondriális diszfunkciójával áll összefüggésben azok csökkent MMP-ja, a mitokondriális szétkapcsolás hatására létrejövő depolarizáció nagyságának mérséklődése, valamint a mitokondriális DNS mennyiségének csökkenése. A géncsendesített sejtek morfológiai sajátságai is karakterisztikus változásokat mutattak. Csökkent továbbá a sejtek életképessége és a sejtproliferáció mértéke, valamint fokozódott az apoptózis irányába elkötelezett sejtek száma; miközben a nekrotikus aktivitás nem változott. A bemutatott munka eredményei bizonyították, hogy a géncsendesített sejtek fokozott apoptózisának hátterében kaszpázfüggő és kaszpáztól független mechanizmusok egyaránt megtalálhatók.

Munkánk második részében immuncitokémiai módszerekkel és Western-blot technikával igazoltuk, hogy az MR1 és MR3 receptorok jelen vannak WM35, HT199 és HT168-M1 melanoma sejteken. A muszkarinos acetilkolin agonista CCh telítő koncentrációjának alkalmazásával mindhárom sejtvonalon intracelluláris kalciumkoncentráció-emelkedést váltottunk ki. Atropinnal történő előkezelés megakadályozta ezen intracelluláris kalciumkoncentráció-változások kialakulását. Megállapítottuk, hogy a CCh-okozta kalciumkoncentráció-változások időbeli lezajlása változó; ugyanakkor jobbára elkülöníthető volt egy viszonylag stabil korai és egy ettől változékonyabb késői komponens. Kimutattuk, hogy a késői komponens jellemzői nagymértékben függenek az extracelluláris kalciumkoncentrációtól. Eredményeink arra utalnak, hogy a primer tumorból és áttétekből származó melanoma sejtek kalciumhomeosztázisa némileg különbözik, ami hozzájárulhat eltérő biológiai és klinikai sajátságaik kialakításához.

5.1. A TASK-3 csatorna rosszindulatú tumorokban játszott szerepére vonatkozó adatok ellentmondásai

Munkacsoportunk korábbi eredményei arra utaltak, hogy a TASK-3 csatorna megtalálható a melanoma sejtek mitokondriumainak külső vagy belső membránjában. Valószínűsítettük továbbá, hogy a mitokondriális lokalizációban található TASK-3-csatornák

hozzájárulnak a mitokondriális funkció fenntartásához [Kosztka és mtsai. 2011]. Jelen kísérletek megerősítették azt a korábbi megfigyelésünket, hogy a TASK-3 géncsendesítése csökkenti a melanoma sejtek számát és proliferációját; továbbá jelentős morfológiai változásokat indukál. Eredményeink arra utalnak, hogy a megfigyelt jelenségek hátterében mitokondriális depolarizáció és apoptózisindukció áll.

A TASK-3 csatorna jelenlétére és tumorsejtekben betöltött szerepére vonatkozó irodalmi adatok és elképzelések nem egységesek. Az első problémát az jelenti, hogy a TASK-3-csatornák jelenléte az őket expresszáló sejt típusától függően indukálhat is apoptózist [Lauritzen és mtsai. 2003, Meuth és mtsai. 2003], meg védhet is ellene [Liu és mtsai. 2005, Taverna és mtsai. 2005]. Másodsorban, jóllehet számos közlemény számolt be a TASK-3 csatorna erőteljes expressziójáról rosszindulatúan elfajult sejtekben [Ernest és mtsai. 2010, Innamaa és mtsai. 2013, Kim és mtsai. 2004, Lee és mtsai. 2012], egy újabb, 20 ráktípus vizsgálatával foglalkozó tanulmányban nem találtak érdemi változást a TASK-3-specifikus mRNS kifejeződésében [Williams és mtsai. 2013]. Harmadszor, egyes megfigyelések szerint a TASK-3 expressziója elősegíti a tumor növekedését, míg más adatok szerint a fehérje jelenléte a daganatos megbetegedés prognózisát javítja. Pei és munkatársai [2003] azt mutatták ki például, hogy a funkcionális (azaz K^+ -ra permeábilis) TASK-3 csatorna erőteljes onkogén hatással bír. Ezzel szöges ellentétben Innamaa és munkatársai [2013] azt tapasztalták, hogy az általuk vizsgált tumorok TASK-3-specifikus immunpozitivitását határozottan jobb prognózis kísérte; továbbá azok a betegek, akik tumora erős TASK-3 jelölődést mutatott, hosszabb túlélési idővel voltak jellemezhetők. Arra is vannak adatok, hogy egyes emlőtumorsejtek fokozott TASK-3 expressziója a tumorsejtek csökkent migrációjával és alacsonyabb invazív hajlamával társul [Lee és mtsai. 2012]. Összhangban a TASK-3 fehérje tumorelles szerepével, Meuth és mtsai [2008] LN319 és U373 glioma sejtvonalakon egy TASK-3-függő sejthalál-útvonalat írtak le. Ellentmondva azonban a fenti, tumorelles aktivitásra utaló adatoknak, Kim és mtsai [2004] nem találtak összefüggést colorectalis daganatok TASK-3 expressziójának mértéke, valamint a daganatok tumorstádiuma és a nyirokcsomó-metasztázisok előfordulása között.

Mindezek alapján az a következtetés vonható le, hogy sem a TASK-3 expresszió jelenléte, sem annak fokozott mértéke nem egy általános, minden rosszindulatúan transzformálódott sejtre jellemző jelenség. Ebből következően a TASK-3 expresszió előfordulását és mértékét eseti alapon szükséges vizsgálni. Jelen tudásunk szerint nincs olyan szabály, aminek alapján meg lehetne jósolni, hogy egy adott tumor expresszál-e TASK-3 fehérjét. Annak eldöntésére sincs még mód, hogy egy tumor TASK-3 expressziója kedvező

vagy kedvezőtlen prognosztikai jel-e; esetleg semmilyen jelentőség nem tulajdonítható neki a rosszindulatú burjánzás várható viselkedése vonatkozásában.

Az említett bizonytalanságnak két fontos következménye van. Egyrészt azt a lehetőséget, hogy a TASK-3 expresszió mértékét prognosztikai faktorként használjuk fel – legalábbis ideiglenesen – el kell vetni. A másik következmény, hogy a TASK-3-csatornák gátlásán alapuló terápia általános klinikai alkalmazhatósága nem garantált; még akkor sem, ha időközben sikerülne kifejleszteni hatékony és szelektív TASK-3 gátlószereket. További erőfeszítések szükségesek tehát a TASK-3 expresszió ténye és annak mértéke, valamint a malignusan transzformálódott sejtek viselkedése és a daganatok prognózisa közötti összefüggések tanulmányozására.

5.2. A TASK-3 expresszió csökkentésének következményei melanoma sejteken

Jóllehet a fentiek értelmében nem lehet egységes módon értelmezni a tumorosan elfajult sejtek TASK-3 expressziójának jelentőségét, saját kísérleti adataink következtetéseik: a WM35 és az A2058 melanoma sejtek expresszálják a TASK-3-csatornát, továbbá a TASK-3 expresszió gátlását követően mitokondriális depolarizáció alakul ki, ami végeredményben a sejtek halálát okozza. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a TASK-3-csatornák jelenléte nélkülözhetetlen a melanoma sejtek túléléséhez. További vizsgálatokat igényel viszont annak eldöntése, hogy a TASK-3 expresszió vajon valamennyi melanoma típus esetében elengedhetetlen feltétele-e a túlélésnek. Még ennek a bizonytalanságnak a tudatában is megalapozottnak tűnik azonban a feltételezés, hogy a TASK-3 csatorna megfelelő célpontja lehet olyan jövőbeni terápiás eljárásoknak, amik a melanoma kezelését célozzák.

Hangsúlyozni érdemes, hogy a TASK-3 fehérje terápiás célpontként való felhasználását jelentősen megnehezíti, hogy expressziója nem korlátozódik kizárólag malignusan transzformálódott sejtekre. Bebizonyosodott, hogy számos sejttípus fiziológiás körülmények között is tartalmazza a TASK-3 fehérjét [Rusznák és mtsai. 2004, Rusznák és mtsai. 2008]. Indokolt tehát az aggodalom, hogy a TASK-3 csatorna esetleges általános gátlása számos fiziológiás folyamatot is befolyásolna. Meglepő módon – és némileg ellentmondva a TASK-3 fehérje nyilvánvaló biológiai jelentőségének – a TASK-3 génkiütött (KO) egértörzs életképes, és csak igen csekély mértékű zavar figyelhető meg az érintett egyedek biológiai funkcióiban. Linden és munkatársai [2007] például arról számoltak be, hogy a TASK-3 KO egerek jórészt fiziológiás viselkedést mutattak. A szerzők arra a megállapításra jutottak, hogy bár a TASK-3 csatorna hozzájárul a cirkadián ritmus

kialakításához, és szerepe van a kognitív funkciókban is, a csatorna kiütésének az eredetileg feltételezetténél jóval enyhébb következményei vannak. Ezen váratlan megfigyelés egyik lehetséges magyarázata, hogy TASK-1 homodimerek vagy más K_{2P} csatornák overexpressziója funkcionálisan kompenzálhatja a TASK-3 kiesését [Linden és mtsai. 2007]. Érdekes módon azonban még a TASK-1/TASK-3 kétszeresen KO állat is túlél, bár primer hyperaldosternaemia alakul ki benne [Davies és mtsai. 2008]. Ennek alapján az a következtetés vonható le, hogy a TASK-3 alegységek TASK-1-gyel történő helyettesítése nem az egyetlen lehetőség arra, hogy a TASK-3 fehérje hiánya kompenzálódjék, és más K_{2P} csatornáknak és/vagy alternatív mechanizmusoknak nagyobb szerepük lehet a funkció helyettesítésében, mint ahogy azt korábban gondolták. A megállapítások egy fontos hozadéka, hogy ha a melanoma sejtekben is léteznek ilyen kompenzáló mechanizmusok, akkor a TASK-3-alapú terápiák a reméltnél kevésbé lesznek hatékonyak. Fontos azonban megjegyezni, hogy az általunk vizsgált melanoma sejtekben nem tapasztaltuk jelét a fentiekben vázolt kompenzáló mechanizmusok aktivációjának; így a TASK-3 KD sejtekben nem változott például a TASK-1 expressziójának mértéke.

5.3. Muszkarinos kolinerg receptorok melanomasejtekben

A páratlan számokkal jelölt MR-ok jelenlétét és funkcionális jelentőségét már több melanoma sejtvonalon is kimutatták. Sebészeti úton nyert, humán tumorminták immunpozitivitásának összehasonlító vizsgálata is megtörtént, amihez a tanulmány szerzői egy minden receptoraltípust felismerő monoklonális ellenanyagot alkalmaztak [Lammerding-Köppel és mtsai. 1997]. Ezen vizsgálatsorozat eredménye szerint a tumorok perifériás részéből származó sejtekben nagyobb a MR proteinek mennyisége, mint a centralisabban elhelyezkedő sejtekben. Ez az adat arra utal, hogy korreláció áll fenn a MR-ok expressziós szintje és a daganatsejtek vándorlási és metasztázisképző hajlama között. A MR-oknak a tumorosan transzformált sejtek malignitásának meghatározásában játszott szerepét alátámasztani látszott az a megállapítás is, ami szerint egészséges melanocitákban nem volt detektálható MR-specifikus immunpozitivitás [Lammerding-Köppel és mtsai. 1997].

Az előzőnél célzottabb kimutatási eljárásokat alkalmazó kísérletekben ugyanakkor a melanomasejtek MR expressziós mintázata a fenténél komplexebb képet mutatott. A2058 sejtekben például csak az MR5 altípus jelenlétét írták le [Kohn és mtsai. 1996]; SK-MEL-28 sejtekben pedig elsősorban az MR3 expresszióját igazolták [Noda és mtsai. 1998], továbbá kisebb mennyiségű MR5 jelenlétét is valószínűsítették [Boss és mtsai. 2005]. Műtéti úton eltávolított mintákban található, HMB-45-pozitív melanoma sejteken pedig az MR3 jelenlétét

azonosították [Oppitz és mtsai. 2008]. A jelen értekezésben bemutatott kísérletekben az általunk vizsgált sejteken részben megerősítettük az MR3 jelenlétét, részben pedig igazoltuk a korábbi tanulmányok által jobbra figyelmen kívül hagyott MR1 expresszióját. Munkánk során azt találtuk, hogy mind az MR1, mind az MR3 jelen van mindhárom vizsgált melanoma sejtvonalban; ugyanakkor nem találtunk különbséget a primer tumor eredetű (WM35) és a metasztatikus eredetű (HT199, HT168-M1) sejtek receptorfehérje tartalma között.

Jóllehet a MR-ok szerepét számos tumor malignitásával összefüggésbe hozták [Batra és mtsai. 1993, Williams és mtsai. 1993, Oppitz és mtsai. 2002, Bowers és mtsai. 2008], ez a felvetés éppen a bőrereditű daganatok esetében vált kétségesse, amikor a 2000-es évek elején egészséges melanocitákon is sikerült kimutatni a MR-ok mind az öt altípusát [Buchli és mtsai. 2001]. Ráadásul az idézett munka az öt MR típus melanocitákban betöltött funkcionális jelentőségét is igazolni tudta. Széles körben elfogadottá vált továbbá az a nézet, hogy a nem-neuronális kolinerg szignalizáció fontos szerepet játszik a bőr élettani és patológiai folyamataiban [Oppitz és mtsai. 2008, Grando és mtsai. 2006, Kurzen és mtsai. 2007]. Tekintettel az újabb adatokra, a jelenleg legszélesebb körben elfogadott álláspont értelmében a MR-ok jelenléte nem korlátozódik a malignus transzformáción átesett melanocitákra, és így az nem lehet egyértelmű jele a rosszindulatú elfajulásnak. Alternatív lehetőségként felmerül, hogy esetleg a receptorok jelátvitel útvonalaiiban lehetnek különbségek a MR-okat tartalmazó tumoros és egészséges sejtek között.

5.4. A CCh alkalmazása

Léteznek olyan adatok, melyek szerint a MR3-ok gátlása megakadályozhatja egyes tumorok növekedését és metasztázisok kialakulását [Spindel 2012]. Tekintettel arra, hogy az MR3 receptoraltípus részben a citoplazmatikus kalciumkoncentráció emelésén keresztül fejti ki hatását, indokoltnak láttuk olyan kísérletek elvégzését, amelyekben a MR-ok aktiválásával váltunk ki kalciumtranzienseket és tanulmányozzuk azok jellemzőit. Erre a célra 1 mmol/l CCh-t alkalmaztunk, ami mindhárom sejtvonal esetében telítő dózisú volt. Az általunk választott koncentráció ugyancsak telítő dózissal bizonyult egyéb, szintén CCh alkalmazásával indukált, melanoma sejteken tapasztalt válaszok esetében [Kohn és mtsai. 1996]. Az általunk meghatározott EC_{50} értékek is hasonlóak voltak a korábban publikált adatokhoz [Noda és mtsai. 1998]. Szükséges azonban hangsúlyozni, hogy az egyes megfigyelések összehasonlításakor óvatosságnak kell lenni; részben az eltérő sejttípusok miatt, részben azért, mert munkánkban nem tértünk ki az egyes szerzők által ugyancsak megfigyelt MR5 jelenlétére.

A fenti megfontolások mellett ki kell térni arra is, hogy találtunk olyan irodalmi adatot, ami szerint 1 mmol/l CCh esetleg már a nikotinos acetilkolin receptorokat is aktiválhatja [Militante és mtsai. 2008]. Ebből fakadóan a jelen disszertációban bemutatott kísérleti eredményeink elemzésekor az a kérdés is felmerült, hogy vajon a nikotinos acetilkolin receptorok nem vehettek-e részt a tapasztalt válaszok létrehozásában. A kérdés már csak azért is releváns, mert a bőrben található bizonyos sejttípusokon nikotinos receptorokat is kimutattak [Grando és mtsai. 2006, Kurzen és mtsai. 2007]. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy egyes adatok szerint az atropin a nikotinos receptorokat is gátolhatja [Zwart és Vijverberg 1997]. Mivel azonban a CCh által kiváltott kalciumtranzienseket atropin alkalmazásával gyakorlatilag teljesen gátolni tudtuk, a fenti ellentmondások és komplikációk ellenére úgy gondoljuk, hogy az általunk részletezett hatások kialakításában döntő módon a MR-ok vettek részt. Mindazonáltal a nikotinos receptorok szerepét csak akkor lehet majd teljesen kizárni, ha expressziós mintázatuk részletei ismertté válnak a melanoma sejtekben.

5.5. A citoplazmatikus Ca^{2+} szerepe melanomasejtekben

Bár a MR-ok több jelátviteli útvonalat is aktiválhatnak a melanoma sejtekben [Kohn és mtsai. 1996], a kalciumionok részvétele ebben a komplex rendszerben egyértelmű. Számos korai tanulmány indult ki abból a feltételezésből, hogy – hasonlóan más sejttípusokhoz – a melanoma sejtek motilitása és proliferációja az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráción keresztül szabályozódik. Az erre vonatkozó munkák rendszerint az extracelluláris térből történő kalciumbelépést változtatták meg a hajtóerő (ti. membránpotenciál) módosításával [Gavrilova-Ruch és mtsai. 2002, Chantome és mtsai. 2009, Nilius és Wohlrab 1992, Lepple-Wienhues és mtsai. 1996], egyes kalciumcsatorna-típusok gátlásával (pl. verapamil [Tsuruo és mtsai 1985, Yohem és mtsai. 1991, Parker és Sherbet 1992], vagy lantanidák alkalmazásával [Cox és mtsai. 2002]). Készült olyan tanulmány is, amelyikben tapszigargin adásával az ER-ba történő kalcium-visszavételért felelős SERCA-pumpát gátolták [Parker és Sherbet 1992]. Ezek a beavatkozások több melanoma sejtvonal esetében is igazolták, hogy a kalciumhomeosztázis befolyásolása megváltoztatja a tumorsejtek metasztázisképző tulajdonságát. Újabban az ún. Wnt jelátviteli útvonal is az érdeklődés középpontjába került mint a melanoma progresszióját meghatározó tényező [Deli és mtsai. 2007, Weeraratna 2005]. Ez a fejlemény azért releváns az általunk leírt adatok szemszögéből nézve, mert ennek a jelátviteli útvonalnak a Ca^{2+} is részét képezi.

A fentiek ismeretében némileg meglepő, hogy a melanoma sejtek kalciumhomeosztázisának részleteit ezidáig csak kevesen vizsgálták. Azokban az esetekben

ráadásul, amelyekben megkísérelték a citoplazmatikus kalciumkoncentráció közvetlen mérését, a meghatározások sejtszuszpenziókon, küvetákban történtek [Martinez-Zaguilán és mtsai. 1998, Isoldi és mtsai. 2004]. Ennek a kísérleti elrendezésnek az előnyei nyilvánvalóak, ugyanakkor ez a megközelítés nem engedi meg az egyedi sejtek vizsgálatát, így elfedi a Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásának sejtszintű variabilitását. Ennek eredményeként azon megállapításunk, hogy a CCh-ra válaszoló sejtek aránya nem éri el az 50%-ot, nehezen vethető össze az irodalmi adatokkal. Ilyen körülmények között különösen figyelemre méltó az a tény, hogy a CCh-ra reagáló és nem reagáló sejtek hasonló arányát írták le SK-MEL-28 tenyészetben, amikor a sejtek kontraktilis válaszát vizsgálták [Sailer és mtsai 2000].

Az egyedi melanoma sejteken végzett kevés számú munka egyikében SKMEL188 sejteken, konfokális rendszerben tanulmányozták a citoplazmatikus kalciumkoncentráció változásait [Wiesner és mtsai 2003]. Jóllehet a mérések feszültségvezérelt kalciumcsatornák jelenlétét és működését is igazolták a sejtfelszíni membránban, nem történt meg a citoplazmatikus kalciumtranziensek részletes leírása. Egy másik tanulmányban ATP-vel kiváltott citoplazmatikus kalciumtranzienseket elemezték azon három melanoma sejtvonalon, amiket mi is tanulmányoztunk [Deli és mtsai 2007]. Ezek a mérések igazolták olyan $\text{P}_{2\text{x}}7$ purinerg receptorok jelenlétét a sejtfelszíni membránban, amik esetleg a kalciumbelépés egyik lehetséges útvonalaként szolgálhatnak. Az idézett munka szerzői emellett azt is megállapították, hogy a sejtek nem-funkcionális rianodin receptorokat, valamint töltött intracelluláris kalciumraktárakat tartalmaznak. Kohn és mtsai [1996] A2058 sejteken vizsgáltak CCh-nal kiváltott kalciumtranzienseket. Jóllehet a szerzők csak az MR5 altípusok jelenlétét tételezték fel, az általuk közölt adatok teljes összhangban állnak saját eredményeinkkel. Ez az egyezés arra utal, hogy a páratlan sorszámú MR-ok ugyanazon (vagy nagyon hasonló) funkciót láthatnak el a különböző melanoma sejttípusokon.

A melanoma sejtek kalciumhomeosztázisával kapcsolatos információkat összegezve megállapíthatjuk, hogy a CCh által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek mindhárom vizsgált sejtvonal esetében látott korai tranziens komponense az intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadulás eredménye lehet, és ez a kalciumfelszabadulás feltehetően nem rianodin receptorokon keresztül történik [Deli és mtsai 2007]. Fel kell tételeznünk, hogy a metabotrop MR-ok vagy közvetlenül nyitnak kalciumcsatornákat a sejtfelszíni membránban, vagy az IP_3 -útvonalon keresztül idéznek elő kalciumfelszabadulást. Az előbbi lehetőség ugyanakkor kizárhatónak tűnik azon az alapon, hogy a kezdeti komponens sajátosságai nem függenek az extracelluláris kalciumkoncentrációtól (lásd saját adatok, továbbá [Kohn és mtsai 1996]). Így marad a második lehetőség, amely összhangban áll az MR1, MR3 és MR5 szignalizációs

kapcsolatairól rendelkezésre álló ismeretekkel. Ami a CCh-nal kiváltott kalciumtranziensek késői komponensét illeti, ennek extracelluláris kalciumionoktól való függése nyilvánvaló mind az általunk bemutatott kísérletekben (MR1 és MR3), mind a Kohn és mtsai [1996] által végzett vizsgálatokban (MR5).

Ha figyelembe vesszük a MR-ok és a kalciumhomeosztázis többek által felvetett jelentőségét a melanomasejtek malignitásában, adataink bizonyos mértékig csalódást keltőek, mivel a primer és a két metasztatikus tumorból származó sejtvonal sejteit összehasonlítva nem találtunk olyan eltérést, ami magyarázná a metasztatikus sejtek nagyobb malignitását. Ez a következtetés ellentmond azon közlésnek, amely szerint a kalcium- és a pH-szabályozás nagyobb mértékben különbözik a kifejezetten metasztatikus C8161 sejtek és a kevésbé metasztatikus jellegű A375P sejtek esetében [Martinez-Zaguilán és mtsai. 1998]. Érdekes módon azonban a purinerg szignalizáció tanulmányozása során sem lehetett igazolni primer és metasztatikus eredetű melanoma sejtek között fennálló markáns különbséget. Deli és munkatársai pusztán egyetlen eltérést találtak az általunk is használt három sejtvonal vizsgálata során: a nem-specifikus rianodinreceptor-gátló ruténium-vörös csökkentette a metasztatikus eredetű HT168-M1 és HT199 sejtek proliferációját, ugyanakkor növelte a primer tumor eredetű WM35 sejtek osztódási sebességét [Deli és mtsai. 2007].

5.6. Az eredmények hasznosításának lehetősége

Néhány, a közelmúltban megjelent tanulmány rámutatott, hogy az utóbbi időben ijesztő mértékben emelkedett a melanomás esetek száma [Goldberg és mtsai. 2007, Marugame és Zhang 2010]. Az is megállapítást nyert, hogy a metasztatikus melanomának különösen rossz a prognózisa, mivel ezek a sejtek rezisztensek a kemoterápiára és a tumorsejtek elleni immunválaszra egyaránt. Jóllehet vannak olyan új és biztató eredmények, amik azzal kecsegtetnek, hogy esetleg javítják majd a melanoma túlélési esélyeit (egy kiváló áttekintés végett lásd [Flaherty és mtsai. 2012]), a metasztatikus melanomák prognózisa még mindig nagyon rossz. A melanoma gyógyításával kapcsolatos nehézségek részben abból adódnak, hogy a melanoma sejtek apoptózist előidéző intracelluláris útvonalai „hibásak” [Fischer és Schulze-Osthoff 2005, Sjöstrom és Bergh 2001]. Ennek tükrében nem lehet viszont meglepő, hogy különösen ígéretes terápiás megközelítésnek tartják a melanoma sejtek csökkent apoptóziskészségének visszafordítását célzó törekvéseket [Eberle és mtsai. 2007].

Az újabb adatok azt látszanak igazolni, hogy az apoptózisindukció valóban eredményes eljárás lehet a melanoma gyógykezelésében [Berger és mtsai 2014; Zimmerman és mtsai 2013]. Különösen fontos és az értekezésben bemutatott kísérletek szempontjából is

releváns az a megfigyelés, miszerint a mitokondriális Kv1.3 káliumcsatornák gátlása tumorsejtek (köztük melanoma sejtek) intrinzik apoptotikus útvonalának aktiválódását eredményezi, és végsősoron a sejtek pusztulását okozza [Leanza és mtsai. 2012]. A jelen disszertációban bemutatott kísérletek során az apoptózis indukcióját és a következményes sejthalált a TASK-3 csatorna expressziójának csökkentésével értük el. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy vannak biztató erőfeszítések szelektív TASK-3-gátlók előállítására is, amik alkalmazásától hasonló eredmény várható. A sperminről például már mintegy nyolc éve ismert, hogy képes a TASK-3 csatornák gátlására [Musset és mtsai. 2006]. Coburn és mtsai [2012] pedig olyan 5,6,7,8-tetrahidropirido-[4,3-D]-pirimidin származék fejlesztéséről számoltak be, ami hatékony és szelektív TASK-3 gátlószernek tűnik. Az előzőekben említett, vagy hasonló, TASK-3 gátlók alkalmazása komolyan megfontolandónak tűnik tehát az új fejlesztésű, TASK-3-csatornákat célzó és így apoptózist indukáló terápiás módszerek kifejlesztése során.

A sikeres melanomaterápia másik lehetősége a sejtproliferáció csökkentése. Ennek szabályozásában a foszfo-inozitol-3-kináz (PI3K) és a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) útvonal jelentősége ismert [Vidwans és mtsai. 2011]. Ezzel összefüggésben melanoma sejtekben leírták a MAPK-útvonal részét képező B-Raf fehérje (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homologue B1) pontmutációit [Flaherty és mtsai. 2010]. Azt is felvetették, hogy a mutáns B-Raf fehérjére specifikus, piridoimidazon-alapú gátlók a melanoma terápiájának új, ígéretes elemei lehetnek [Smalley és Flaherty 2009]. Mivel a fent említett szignalizációs útvonalat metabotrop receptorokhoz kapcsolódó G-fehérjék is aktiválhatják, a MR-oknak a tumorproliferációt serkentő szerepe nem valóságtól elrugaszkodott feltételezés. Ezzel a vélelmezett szereppel állhat összhangban az a megfigyelés is, miszerint melanoma sejtekben az MR3 gátlása csökkentheti a tumor növekedését és metasztatizációk képzését [Spindel 2012]. Joggal állítható tehát, hogy azon terápiás törekvések, amik a melanomák fokozott proliferációs aktivitását és metasztatizáló kapacitását célozzák, a MR-okat is számításba kell venniük.

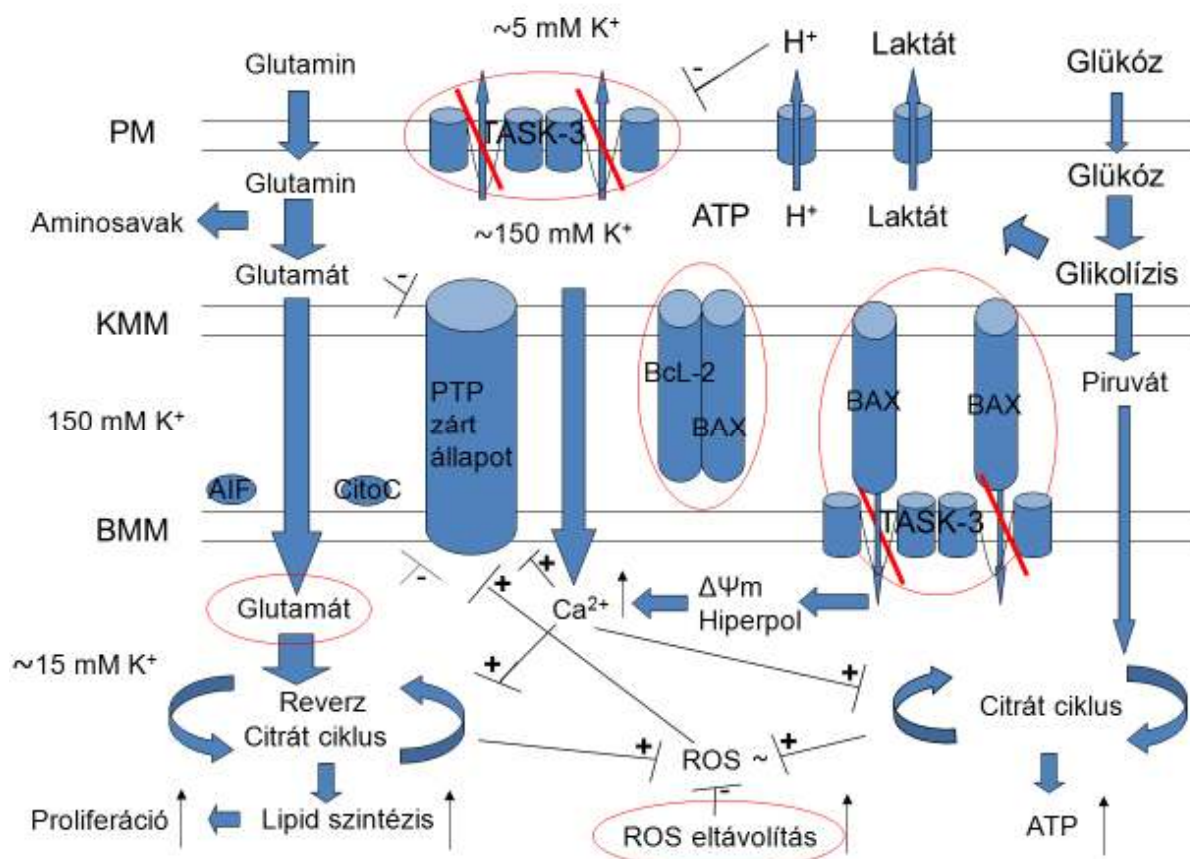
5.7. További lehetséges vizsgálatok

Ahhoz, hogy az eddigi eredmények a gyakorlatban is hasznosíthatóvá váljanak, szükséges modellszintű értelmezésük, valamint további kísérletek megtervezése, amik eredményei lehetőséget adhatnak a modell állításainak ellenőrzésére és a benne foglalt információk esetleges finomítására. A bemutatott eredmények alapján bizonyítottnak tekintjük, hogy az általunk vizsgált melanoma malignum sejtekben a TASK-3 csatornafehérje

expressziója fokozott, és a TASK-3 csatornák döntően a mitokondriumokban helyezkednek el. A géncsendesítés után megfigyelt változások alapján feltételezzük, hogy a mitokondriális TASK-3 csatornák hozzájárulnak a daganatsejtek túléléséhez. Véleményünk szerint a mitokondriális TASK-3 csatornák jelenléte az apoptózis elleni védelem fokozása révén és/vagy a sejtek hipoxia iránti toleranciájának megnövelése által fejt ki hatását.

A hipoxia elleni védelem értelmezésekor érdemes utalni azon megfigyelésekre, amelyek szerint egyes mitokondriális káliumcsatornák aktiválása növeli a szívizomsejtek hipoxiatűrő képességét [Garlid és mtsai. 1996, Liu és mtsai. 1999]. Az általunk javasolt modell alapján a TASK-3 csatorna végső szerepét annak sejten belüli elhelyezkedése határozza meg. Amennyiben a csatorna a sejtfelszíni membránban található, megnyílása apoptózist és sejtpusztulást eredményez, hasonlóan ahhoz a helyzethez, amit neuronok esetében Lauritzen és munkatársai meggyőzően demonstráltak [Lauritzen és mtsai. 2003]. Ezzel szemben a TASK-3 csatorna mitokondriális elhelyezkedése [Kosztka és mtsai. 2011]) a hipoxiás környezetben növekedő tumorsejtek túlélése szempontjából lehet fontos tényező. A vázolt elképzelés helytállóságának megítéléséhez fontos lenne annak részletes feltárása, hogy milyen mechanizmusok befolyásolják a szintetizált TASK-3 fehérje sejten belüli transzportját. Azt tudjuk, hogy a csatornát a 14-3-3 adapter fehérje horgonyozza ki a sejtmembránba [Zuzarte és mtsai. 2009]. Ennek tudatában az általunk vázolt elképzeléssel nagyban összecseng az a megfigyelés, hogy abban az esetben, amikor a melanomasejtekben overexpresszálták a 14-3-3 fehérjét, a sejtek pusztulása következett be [Schultz és mtsai. 2009]. További vizsgálatok szükségesek azonban arra vonatkozóan, hogy milyen tényezők hatására történik meg a csatornafehérjék mitokondriumokhoz vándorlása és a mitokondriális membránba történő beépülése.

Jóllehet a TASK-3 csatornák mitokondriális jelenlétét keratinocitákban funkcionális vizsgálatok is megerősítik [Toczyłowska és mtsai. 2014], nem ismerjük a csatornák orientációját és molekuláris kölcsönhatásaikat. Az apoptózis elleni védelem lehetséges modelljében feltételezzük, hogy a pro-apoptotikus BAX molekula a TASK-3 fehérje káliumpermeabilis pórusával is képes kapcsolatot létesíteni. Ennek jelentősége abban állhat, hogy a melanomasejtekben a Bcl-2 és TASK-3 molekulák csak együttesen lehetnek képesek megkötni az összes BAX/BAK molekulát, így akadályozva meg az apoptózist. Ennek az elképzelésnek a realitását olyan kísérletek dönthetik el, melyek az érintett molekulák jelenlétét és kölcsönhatásait tisztázzák.



23. ábra: A melanomasejtek apoptózis rezisztenciájának hátterében álló lehetséges molekuláris kölcsönhatások. A Kv1.3/BAX kölcsönhatáshoz hasonlóan munkacsoportunk feltételez egy TASK-3/BAX kölcsönhatást, ami a feszültségfüggő csatornához hasonlóan impermeabilissá teszi a TASK-3 csatornát, hiperpolarizálva így a mitokondriumokat. Az upregulálódott BCL-2 mennyiség a TASK-3 csatornával együtt köti meg az összes BAX molekulát, így akadályozva meg az apoptózist. A mitokondriális hiperpolarizáció a sejtalkotó kalcium felvételének mértékét emelve, fokozhatja a citromsavciklus kalciumfüggő enzimjeinek aktivitását. A melléktermékek (reaktív oxigén specieszek) melanoma sejtek számára tolerálható szinten tartását a nagyobb antioxidáns kapacitás teszi lehetővé. A glutaminolízis köztiterméke a glutamát pedig megakadályozza a mitokondriális PTP formációját és nyitását. Feltételezésünk szerint ezen kölcsönhatások együtt járulnak hozzá a melanoma sejtek apoptózis elleni rezisztenciájához. PM: plazmamembrán, KMM: külső mitokondriális membrán, BMM: belső mitokondriális membrán.

A melanoma sejtek esetében már leírták a BCL-2 upregulációját, ennek a fehérjének ismeretes a BAX molekulával történő kölcsönhatása, ami az utóbbi oligomerizációját megakadályozza. A BCL-2 így fejt ki anti-apoptotikus hatását. Felmerül az a lehetőség is, hogy a mitokondriális TASK-3 csatorna és a BAX fehérje feltételezett kölcsönhatása a TASK-3 csatornát impermeábilissá teheti, ami mitokondriális hiperpolarizációt okozhat. Ezt a Kv1.3 esetében leírt kölcsönhatás analógiájaként képzeljük el [Szabó és mtsai. 2008]. A

TASK/3-BAX kölcsönhatásról viszont még nem rendelkezésünkre sem irodalmi, sem kísérleti adat. A mitokondriális hiperpolarizáció más molekulák mellett a kalcium mitokondriális felvételének hajtóerejét is fokozza [Vinogradov és Scarpa 1973], emelve ezzel a citromsavciklus kalciumfüggő enzimjeinek aktivitását [Gunter és Gunter 2001], és fokozva az ATP- és ROS-termelés intenzitását. A reaktív oxigén specieszek (ROS) tolerálható szinten tartását a melanoma sejtek emelkedett antioxidáns kapacitása teszi lehetővé [Hanneke és mtsai. 2007]. Ez a lehetőség felveti annak szükségességét, hogy vizsgálatokat végezzünk a melanoma sejtek mitokondriális anyagcserefolyamatainak és a TASK-3 fehérje ezekben játszott szerepének megismerése érdekében.

A tumoros sejtek, így a melanoma sejtek esetén is leírt glutaminolízis [Scott és mtsai. 2011] köztiterméke, a glutamát megakadályozza a belső mitokondriális membrán permeabilizációját, mivel a glutamát a PTP formációját és nyitását gátolja (ellentétben a kalcium ionok és a ROS hatásával) [Brenner és Moulin 2012]. Feltételezésünk szerint a 23. ábrán bemutatott kölcsönhatások együtt járulnak hozzá a melanoma sejtek apoptózis elleni rezisztenciájához. A TASK-3 esetében azonban a pontos mitokondriumon belüli lokalizáció és orientáció megismerése érdekében további kísérletekre van szükség.

A jelen disszertációban bemutatott eredményeink felvetik továbbá, hogy a MR-ok a kalciumhomeosztázis módosításán és más jelátviteli folyamatok befolyásolásán keresztül hatással lehetnek a melanoma sejtek életképességére, a tumorprogresszióra és a malignus transzformáció áttétképző hajlamára. Fontos hangsúlyozni, hogy más tumorokban már leírták, hogy a MR-ok megváltoztatják a migrációért felelős Rho-kináz aktivitását [Shah és mtsai. 2009]. Vannak továbbá adatok a MR-ok tumornövekedésben [Rosevinge és mtsai 2013], metasztázisképzésben [Lin és mtsai. 2014] és tumorvaszkularizációban [Lombardi és mtsai. 2013] betöltött szerepére vonatkozólag is. A jövőben indokolt ezen vagy hasonló hatások felderítése melanoma sejtek esetében is, mert joggal feltételezhető, hogy a háttérükben álló molekuláris mechanizmusok elemei ezekben a sejtekben is megtalálhatók és működőképesek.

6. Összefoglalás

A közelmúltban megjelent epidemiológiai tanulmányok arra hívják fel a figyelmet, hogy a melanoma malignum incidenciája riasztó mértékben emelkedik. Sajnálatos módon az áttétet adó melanoma malignum különösen rossz prognózisú, mivel a sejtek rezisztensek mind kemoterápiás szerekkel, mind a tumor-specifikus immunválasszal szemben. A jelen munkában a TASK-3 típusú káliumcsatorna és egyes muszkarinos kolinerg receptorok jelentőségét vizsgáltuk sejtenyészetben fenntartott melanoma sejtek túlélésében, valamint intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázisuk szabályozásában.

A jelenleg elfogadott nézet szerint a TASK-3 csatornák képesek a malignusan transzformált sejtek proliferációjának és/vagy túlélésének fokozására. A hatás hátterében a csatornák által közvetített fokozott hipoxiatolerancia állhat. A TASK-3 csatornák mitokondriális expresszióját sugalló korábbi eredményeinkből kiindulva azt tételeztük fel, hogy a TASK-3 csatornáknak szerepe lehet a mitokondriális aktivitás fenntartásában. A jelen munkában azt tanulmányoztuk, hogy a TASK-3 expresszió csökkentésének milyen következményei vannak a WM35 és A2058 típusú melanoma sejtek mitokondriális funkciójára és túlélésére. Megállapítottuk, hogy a TASK-3 géncsökkentett sejtek mitokondriális membránpotenciálja depolarizáltabb, mint a kontroll sejteké. A géncsökkentés csökkentette a mitokondriális DNS mennyiségét, és redukálta az érintett sejtek válaszkészségét egy szokásos mitokondriális szétkapcsoló ágens alkalmazásának hatására. Mindezen megfigyelések a géncsökkentett sejtek károsodott mitokondriális funkcióját jelzik. A TASK-3 expresszió csökkentése a fentiek mellett a sejtek csökkent életképességét, és a sejtekből kivonható DNS mennyiségének megkevesbedését is okozta. A géncsökkentett sejtek morfológiája ugyancsak megváltozott, és csökkent az érintett sejtek felszíne is. Ellentétben a kontroll melanoma sejtenyészetekkel, amikben nem volt érdemi apoptotikus aktivitás megfigyelhető, a TASK-3 géncsökkentett tenyészetekben az apoptózis irányába elkötelezett sejtek aránya közel 50%-ra emelkedett. A géncsökkentett sejtekben megfigyeltük még a citokróm *c*-nek a mitokondriumokból a citoszólba történő transzlokációját, a kaszpáz-3 enzim aktivitásának fokozódását, és az apoptózis-inducing factor mitokondriumokból sejtmagba történő áthelyeződését is. Ezen kísérletes adatokból arra következtetünk, hogy a TASK-3 csatorna expressziójának gátlása melanoma sejtekben kaszpázfüggő és -független apoptotikus folyamatokat aktivál. A TASK-3 expresszió csökkenése és az apoptotikus aktivitás fokozódása közötti kapcsolatot valószínűleg a TASK-3 csatorna mennyiségének csökkenése miatti mitokondriális depolarizáció képezi. Eredményeink alapján indokoltnak

tartjuk azt a feltételezést, hogy a TASK-3 csatornák sikerrel kecsegtető célpontjai lehetnek a jövő melanoma-specifikus terápiás módszereinek.

A munka második részében olyan kísérleteket végeztünk, amikben különbséget kerestünk sejttenyészeti körülmények között fenntartott primer és metasztatikus melanoma malignum sejtvonalak muszkarinos kolinerg receptorokhoz (MR) kapcsolódó intracelluláris Ca^{2+} -jelátvitelében. Elsőként azt erősítettük meg, hogy a vizsgált melanoma sejtek mind az 1-es (MR1), mind a 3-as (MR3) típusú muszkarinos receptorokat expresszálják. Az említett MR-ok funkcióképesek voltak, amit az 1 mmol/l koncentrációban alkalmazott karbamil-kolin (CCh) alkalmazásának hatására megjelenő intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedés jelzett. Megállapítottuk, hogy az MR1- és MR3-specifikus fehérje expressziójának mértéke nem mutatott szignifikáns különbséget a metasztatikus (HT199, HT168-M1) és a primer tumor eredetű (WM35) sejtvonalakban. Bár CCh alkalmazásával mindhárom sejtvonalban lehetséges volt Ca^{2+} -tranziens kiváltása, a reagáló sejtek aránya a WM35 tenyészet esetében alacsonyabb volt, mint a másik két sejtvonalban. A CCh-által indukált Ca^{2+} -tranziensek kialakulását 0,1 mmol/l atropin alkalmazása hatékonyan meggátolta. A CCh jelenlétében megjelenő Ca^{2+} -tranziensek igen változatos időbeli lefutást mutattak, és esetenként egy olyan késői (plató-szerű) komponenst is tartalmaztak, aminek kialakulása az extracelluláris térből belépő Ca^{2+} -tól függött. Az extracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt csökkentve a CCh-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek tartama jelentősen csökkent. Ez a jelenség különösen a metasztatikus eredetű melanoma sejtek esetében volt kifejezett. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy nincsenek alapvető különbségek a primer és metasztatikus eredetű melanoma sejtek muszkarinos receptorokhoz kapcsolódó Ca^{2+} -jelátvitelében. A jelen munkában feltárt kvantitatív különbségek ugyanakkor segíthetnek annak megértésében, hogy a metasztatikus melanoma sejtek miért rosszindulatúbbak és miért mutatnak nagyobb migrációs készséget, mint a primer tumorból származó társaik.

Kulcsszavak:

apoptózis, melanoma, mitokondrium, muszkarinos receptorok, TASK-3, tumorigenezis, citoplazmatikus kalcium

7. Summary

Recent epidemiology studies indicate that the incidence of melanoma increases at an alarmingly high rate. Unfortunately, metastatic melanoma has particularly poor prognosis because it is resistant to both chemotherapy and antitumour immune response. In the present work we have studied the significance of the TASK-3 potassium channels and muscarinic cholinergic receptors in the survival and intracellular Ca^{2+} homeostasis of cultured melanoma cells.

TASK-3 channels are thought to promote proliferation and/or survival of malignantly transformed cells, most likely by increasing their hypoxia tolerance. Based on our previous results that suggested mitochondrial expression of TASK-3 channels, we hypothesized that TASK-3 channels have roles in maintaining mitochondrial activity. In the present work we have studied the effects of reduced TASK-3 expression on the mitochondrial function and survival of WM35 and A2058 melanoma cells. TASK-3 knockdown cells had depolarized mitochondrial membrane potential and contained a reduced amount of mitochondrial DNA. Compared to their scrambled shRNA-transfected counterparts, they demonstrated diminished responsiveness to the application of an established mitochondrial uncoupler. These observations indicate impaired mitochondrial function. Further, TASK-3 knockdown cells presented reduced viability, decreased total DNA content, altered cell morphology, and reduced surface area. As opposed to control melanoma cell lines, which did not present noteworthy apoptotic activity, the rate of apoptosis was about 50% in the TASK-3 knockdown cultures. Sequestration of cytochrome *c* from the mitochondria to the cytosol, increased caspase 3 activity, and translocation of the apoptosis-inducing factor from mitochondria to cell nuclei were also demonstrated in TASK-3 knockdown cells. We conclude that interference with TASK-3 channel expression induces caspase-dependent and caspase-independent apoptosis of melanoma cells, most likely via causing mitochondrial depolarization. Based on our results we submit that TASK-3 channels may be legitimate targets of future melanoma therapies.

In the second part of the work, experiments were carried out to describe differences between cultured primary and metastatic melanoma cell lines in their muscarinic acetylcholine receptor- (MR-) mediated intracellular Ca^{2+} signalization. We confirmed the expression of type 1 and type 3 MRs (MR1, MR3). The functionality of these MRs was tested by applying

1 mM carbamyl-choline (CCh) and recording the associated increases of the cytoplasmic $[Ca^{2+}]$. We found that the expression levels of the receptor proteins were not significantly different in the metastatic (HT199, HT168-M1) and the primary (WM35) cell lines. Although CCh application induced Ca^{2+} transients in all three investigated cell lines, the proportion of responding cells was the smallest in the WM35 cell culture. The CCh-induced Ca^{2+} transients could be effectively blocked by atropine (0.1 mM). The time courses of the Ca^{2+} transients were highly variable, and in some instances they showed a late (plateau-like) component, whose presence crucially depended on the influx of extracellular Ca^{2+} . When the extracellular Ca^{2+} concentration was reduced, the duration of the CCh-evoked transients was considerably decreased. This phenomenon was more pronounced in the metastatic cell lines. We conclude that although there are no fundamental differences in the MR-mediated Ca^{2+} signalization of the primary and metastatic cell lines, the quantitative differences revealed in the present work may help to understand why metastatic cells have increased malignancy and more pronounced migratory potential than those isolated from a primary tumour.

Keywords:

apoptosis, melanoma, mitochondria, muscarinic receptors, TASK-3, tumorigenesis, cytoplasmic calcium

8. Irodalomjegyzék

Allan LA, Clarke PR (2009) Apoptosis and autophagy: regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J*, 276: 6063–6073

Alonso SR, Otiz P, Pollán M, Pérez-Gomez B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto J (2004) Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: A tissue microarray-based study. *Am J Pathol*, 164: 193–203

Ashmole I, Vavoulis DV, Stansfeld PJ, Mehta PR, Feng JF, Sutcliffe MJ, Stanfield PR (2009) The response of the tandem pore potassium channel TASK-3 (K_{2p}9.1) to voltage: gating at the cytoplasmic mouth. *J Physiol*, 587: 4769–4783

Bai P, Cantó C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber V, Sauve AA, Menissier-de Murcia J, Auwerx J (2011) PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab*, 13: 461–468

Batra S, Popper LD, Iosif CS (1993) Characterisation of muscarinic cholinergic receptors in human ovaries, ovarian tumours and tumour cell lines. *Eur J Cancer*, 29: 1302–1306

Benarroch E. E. (2009) Potassium channels *Neurology* 72, (7) 664-669

Berger A, Quast SA, Plotz M, Kuhn NF, Trefzer U, Eberle J (2014) RAF inhibition overcomes resistance to TRAIL-induced apoptosis in melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 134: 430–440

Bernardi P, Rasola A (2007) Calcium and cell death: the mitochondrial connection, *Subcell Biochem*, 45: 481–506

Boss A, Oppitz M, Drews U (2005) Muscarinic cholinergic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel 28: modulation of chemotaxis. *Clin Exp Dermatol*, 30: 557–564

Bowers JW, Schlauder SM, Calder KB, Morgan MB (2008) Acetylcholine receptor expression in Merkel cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*, 30: 340–343

Brenner C., Moulin M., (2012) Physiological Roles of permeability Transition Pore *Circ Res*. ;111(9):1237-47.

Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172: 902–908

Buchli R, Ndoye A, Arredondo J, Webber RJ, Grando SA (2001) Identification and characterization of muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed in human skin melanocytes. *Mol Cell Biochem*, 228: 57–72

Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci*, 112: 1743–1753

Calvino-Fernandez M. and Parra-Cid T. (2010) H. pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress, *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas* 1130 - 0108/2010/102/1/41-50

Campbell S, Khosravi-Far R, Rossman K, Clark GJ, Der CJ (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 17: 1395–1413

- Chantome A, Girault A, Potier M, Collin C, Vaudin P, Pages JC, Vandier C, Joulin V, **(2009)** $K_{Ca2.3}$ channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp Cell Res*, 315: 3620–3630
- Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl KS, Roderick HL, Bootman MD, Berridge MJ, Conway SJ, Holmes AB, Mignery GA, Velez P, Distelhorst CW **(2004)** Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*, 166: 193–203
- Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Tsang S, Coplan KA, Scanlan MJ, Old LJ **(1996)** Serological analysis of Melan-A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5915–5919
- Cheng Y, Gulbins E, Siemen D **(2011)** Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK channel. *Cell Physiol Biochem*, 27: 191–200
- Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC **(1969)** The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29: 705–727
- Coburn CA, Luo Y, Cui M, Wang J, Soll R, Dong J, Hu B, Lyon MA, Santarelli VP, Kraus RL, Gregan Y, Wang Y, Fox SV, Binns J, Doran SM, Reiss DR, Tannenbaum PL, Gotter AL, Meinke PT, Renger JJ **(2012)** Discovery of a pharmacologically active antagonist of the two-pore-domain potassium channel $K_{2p9.1}$ (TASK-3). *Chem Med Chem*, 7: 123–133
- Cory S, Adams JM **(2002)** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2: 647–656
- Cox JL, Lancaster T, Carlson CG **(2002)** Changes in the motility of B16F10 melanoma cells induced by alterations in resting calcium influx. *Melanoma Res*, 12: 211–219
- Cummins DL, Cummins JM, Pantie H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A **(2006)** Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc*, 81: 500–507
- Czirják G, Enyedi P **(2002)** TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol*, 16: 621–629
- Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ **(2008)** TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 2203–2208
- DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD **(1984)** Voltage-gated K^+ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*, 307: 465–468
- Deli T, Varga N, Ádám A, Kenessey I, Rásó E, Puskás LG, Tóvári J, Fodor J, Fehér M, Szigeti GP, Csernoch L, Timár J **(2007)** Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer*, 121: 55–65
- De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabó I, Zoratti M **(2009)** Intermediate conductance Ca^{2+} -activated potassium channel ($K_{Ca3.1}$) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium*, 45: 509–516
- Dhillon A, Hagan S, Rath O, Kolch W **(2007)** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26: 3279–3290
- 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

- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*, 280: 1082–1086
- Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF (2007) Overcoming apoptosis deficiency of melanoma—Hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat*, 10: 218–234
- Eberle J., Hossini A. M. (2008) Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma *Curr Genomics*, 9(6): 409–419.
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 663–669
- Elmore S (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495–516
- Engelman J, Luo J, Cantley L (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 7: 606–619
- Ernest NJ, Logsdon NJ, McFerrin MB, Sontheimer H, Spiller SE (2010) Biophysical properties of human medulloblastoma cells. *J Membr Biol*, 237: 59–69
- Fabricant RN, De Larco JE, Todaro GJ (1977) Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 565–569
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148: 2207–2216
- Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3: 453–458
- Fieni F, Parkar A, Misgeld T, Kerschensteiner M, Lichtman JW, Pasinelli P, Trotti D (2010) Voltage-dependent inwardly rectifying potassium conductance in the outer membrane of neuronal mitochondria. *J Biol Chem*, 285: 27411–27417
- Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73: 1907–1916
- Fischer U, Schulze-Osthoff K (2005) Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ*, 12: 942–961
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman Ja, O’Dwyer PJ, Lee Rj, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010) Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363: 809–819
- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE (2012) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer*, 12: 349–361
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*, 2: 287–295
- Gajjar NA, Cochran AJ, Binder SW (2004) Is *MAGE-1* expression in metastatic malignant melanomas really helpful? *Am J Surg Pathol*, 28: 883–888
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G,

- Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19: 107–120
- Ganote CE, Armstrong SC (2003) Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 35: 749–759
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem*, 271: 8796–8799
- Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR (1980) S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature*, 286: 400–401
- Gavrilova-Ruch O, Schönherr K, Gessner G, Schönherr R, Klapperstück T, Wohlrab W, Heinemann SH (2002) Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membrane Biol*, 188: 137–149
- Giansanti V, Torriglia A, Scovassi AI (2011) Conversation between apoptosis and autophagy: “Is it your turn or mine?” *Apoptosis* 16, 321–333
- Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P (2009) Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol*, 41: 1817–1827
- Goggins WB, Tsao H (2003) A population-based analysis of risk factors for a second primary cutaneous melanoma among melanoma survivors. *Cancer*, 97: 639–643
- Goldberg MS, Doucette JT, Lim HW, Spencer J, Carucci JA, Rigel DS (2007) Risk factors for presumptive melanoma in skin cancer screening: American Academy of Dermatology National Melanoma/Skin Cancer Screening Program experience 2001–2005. *J Am Acad Dermatol*, 57: 60–66
- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32: 37–43
- Gómez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA (2000) Protein kinase C (PKC) inhibits Fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K^+ and cell shrinkage. A role for PKC upstream caspases. *J Biol Chem* 275: 19609–19619
- Gordon R, (2013) Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs*, 29: 160–169
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S (2000) Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*, 50: 7–33
- Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA (1986) Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol*, 123: 195–203
- Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU (2006) Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: Physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*, 126: 1948–1965
- Gunter TE, Gunter KK (2001) Uptake of calcium by mitochondria: Transport and possible function. *IUBMB Life*, 52: 197–204
- Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, Contractor R, Medina CA, Nathanson KL, Herlyn M, Smalley KS (2008) The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res*, 14: 230–239
- Hanein D, Horwitz AR (2012) The structure of cell-matrix adhesions: the new frontier. *Curr Opin Cell Biol*, 24: 134–140

- Hanneke G. M., Wittgen and Léon C.L.T. van Kempen **(2007)** Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications, *melanoma Research*, 17:400-409
- Harris MN, Shapiro RL, Roses DF **(1995)** Malignant melanoma. Primary surgical management (excision and node dissection) based on pathology and staging. *Cancer*, 75: 715–725
- Hibinio H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y **(2010)** Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90: 291–366
- Hille B **(2001)** Potassium channels and chloride channels. In: *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 131–168
- Hodgkin AL, Huxley AF **(1952)** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117: 500–544
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL **(2004)** Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signalling. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 259–264
- Hussein MR **(2008)** Extracutaneous malignant melanomas. *Cancer Invest*, 26: 516–534
- Innamaa A, Jackson L, Asher V, Van Shalkwyk G, Warren A, Hay D, Bali A, Sowter H, Khan R **(2013)** Expression and prognostic significance of the oncogenic K_{2p} potassium channel KCNK9 (TASK-3) in ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 33: 1401–1408
- Isoldi MC, Pereira EA, Visconti MA, Castrucci AML **(2004)** The role of calcium, calcium-activated K⁺ channels, and tyrosine/kinase in psoralen-evoked responses in human melanoma cells. *Brazil J Med Biol Res*, 37: 559–568
- Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yanelli JR, Appella E, Rosenberg SA **(1994)** Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, 180: 347–352
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV **(1994)** Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: 2013–2026
- Kim CJ, Cho YG, Jeong SW, Kim YS, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS **(2004)** Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *APMIS* 112: 588–594
- Kohn EC, Alessandro R, Probst J, Jacobs W, Brilley E, Felder CC **(1996)** Identification and molecular characterization of an m5 muscarinic receptor in A2058 human melanoma cells. Coupling to inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of phospholipase A2. *J Biol Chem*, 271: 17476–17484
- Korper S, Nolte F, Rojewski MT, Thiel E, Schrezenmeier H **(2003)** The K⁺ channel openers diazoxide and NS1619 induce depolarization of mitochondria and have differential effects on cell Ca²⁺ in CD34+ cell line KG-1a. *Exp Hematol*, 31: 815–823
- Kosztka L, Rusznák Z, Nagy D, Nagy Zs, Fodor J, Szücs G, Telek A, Gönczi M, Ruzsnavszky O, Szentandrassy N, Csernoch L **(2011)** 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: 308–322
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT **(1997)** Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278: 294–298
- Kurokawa M, Kornbluth S **(2009)** Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138: 838–854

Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA (2007) The nonneuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res*, 39: 125–135

Ladányi A, Tímár J, Bocsi J, Tóvári J, Lapis K (1995) Sex-dependent liver metastasis of human melanoma lines in SCID mice. *Melanoma Res*, 5: 83–86

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127: 1109–1122

Lammerding-Koppel M, Noda S, Blum A, Schaumburg-Lever G, Rassner G, Drews U (1997) Immunohistochemical localization of muscarinic acetylcholine receptors in primary and metastatic malignant melanomas. *J Cutan Pathol*, 24: 137–144

Lauritzen I, Zanzouri M, Honore E, Duprat F, Ehrengruber MU, Lazdunski M, Patel AJ (2003) K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of TASK leak K⁺ channels. *J Biol Chem*, 278: 32068–32076

Leanza L, Henry B, Sassi N, Zoratti M, Chandy KG, Gulbins E, Szabó I (2012) Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol Med*, 4: 577–593

Lee GW, Park HS, Kim EJ, Cho YW, Kim GT, Mun YJ, Choi EJ, Lee JS, Han J, Kang D (2012) Reduction of breast cancer cell migration via up-regulation of TASK-3 two-pore domain K⁺ channel. *Acta Physiol* 204: 513–524

Legrand G, Humez S, Slomianny C, Dewailly E, Vanden Abeele F, Mariot P, Wuytack F, Prevarskaya N (2001) Ca²⁺ pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca²⁺-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem*, 276: 47608–47614

Lepple-Wienhues A, Berweck S, Böhmig M, Leo CP, Meyling B, Garbe C, Widerholt M (1996) K⁺ channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J Membrane Biol*, 151: 149–157

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2: 183–192

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X, (1997) Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479–489

Lin G, Sun L, Wang R, Guo Y, Xie C. (2014) Overexpression of muscarinic receptor 3 promotes metastasis and predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 9: 170–178

Linden AM, Sandu C, Aller MI, Vekovischeva OY, Rosenberg PH, Wisden W, Korpi ER (2007) TASK-3 knockout mice exhibit exaggerated nocturnal activity, impairments in cognitive functions, and reduced sensitivity to inhalation anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther*, 323: 924–934

Liu C, Cotten JF, Schuyler JA, Fahlman CS, Au JD, Bickler PE, Yost CS (2005) Protective effects of TASK-3 (KCNK9) and related 2P K⁺ channels during cellular stress. *Brain Res*, 1031: 164–173

Liu Y, Sato T, Seharaseyon J, Szewczyk A, O'Rourke B, Marban E (1999) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann NY Acad Sci*, 874: 27–37

Lombardi MG, Negroni MP, Pelegrina LT, Castro ME, Fiszman GL, Azar ME, Morgardo CC, Sales ME (2013) Autoantibodies against muscarinic receptors in breast cancer: their role in tumor angiogenesis. *PLoS One* 8(2): e57572

Lorenzo HK, Susin SA (2007) Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat*, 10: 235–255

Lu C, Rak JW, Kobayashi H, Kerbel RS (1993) Increased resistance to oncostatin M-induced growth inhibition of human melanoma cell lines derived from advanced-stage lesions. *Cancer Res*, 53: 2708–2711

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*, 153: 865–873

Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 9487–9492

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146: 3–15

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 284: 651–654

Martinez-Zaguilán R, Martinez GM, Gomez A, Hendrix MJC, Gillies RJ (1998) Distinct regulation of pH^{in} and $[\text{Ca}^{2+}]^{\text{in}}$ in human melanoma cells with different metastatic potential. *J Cell Physiol*, 176: 196–205

Marugame T, Zhang MJ (2010) Comparison of time trends in melanoma of skin cancer mortality (1990–2006) between countries based on the WHO mortality database. *Jpn J Clin Oncol* 40:710

McCarthy NJ, Evan GI (1998) Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol*, 36: 259–278

Meuth SG, Budde T, Kanyshkova T, Broicher T, Munsch T, Pape HC (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

Meuth SG, Herrmann AM, Ip CW, 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: 263–270

Militante J, Ma BW, Akk G, Steinbach JH (2008) Activation and block of the adult muscle-type nicotinic receptor by physostigmine: single-channel studies. *Mol Pharmacol*, 74: 764–776

Miller AN, Long SB (2012) Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel $\text{K}_{2\text{p}1}$. *Science*, 335: 432–436

Mu D, Chen L, Zhang X, See L, Koch CM, Yen C, Tong JJ, Spiegel L, Nguyen Kc, Servoss A, Peng Y, Pei L, Marks JR, Lowe S, Hoey T, Jan LY, McCombie WR, Wigler MH, Power S (2003) Genomic amplification and oncogenic properties of the *KCNK9* potassium channel gene. *Cancer Cell*, 3: 297–302

Musset B, Meuth SG, Liu GX, Derst C, Wegner S, Pape HC, Budde T, Preisig-Müller R, Daut J (2006) Effects of divalent cations and spermine on the K^+ channel TASK-3 and on the outward current in thalamic neurons. *J Physiol*, 572: 639–657

- New DC, Wong YH (2007) Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal*, 2:2
- Nilius B, Wohlrab W (1992) Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol*, 445: 537–548
- Nilius B, Schwarz G, Droogmans G (1993) Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 265: C1501–C1510
- Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K (2008) Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res*, 103: 343–351
- Noda S, Lammerding-Koppel M, Oettling G, Drews U (1998) Characterization of muscarinic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel-28 via calcium mobilization. *Cancer Lett*, 133: 107–114
- Oettling G, Schmidt H, Show-Klett A, Drews, U (1988) Expression of the Ca^{2+} mobilizing muscarinic system in the chick embryo correlates with morphogenesis. *Cell Differ*, 23: 77–86
- O’Kelly I, Stephens RH, Peers C, Kemp PJ (1999) Potential identification of the O_2 -sensitive K^+ current in a human neuroepithelial body-derived cell line. *Am J Physiol* 276: L96–L104
- Opferman JT, Korsmeyer SJ (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 4: 410–415
- Oppitz M, Möbus V, Brock S, Drews U (2002) Muscarinic receptors in cell lines from ovarian carcinoma: negative correlation with survival of patients. *Gynecol Oncol*, 85: 159–164
- Oppitz M, Busch C, Garbe C, Drews U (2008) Distribution of muscarinic receptor subtype M3 in melanomas and their metastases. *J Cutan Pathol*, 35: 809–815
- Ordóñez NG (1998) Application of immunocytochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas: a review and update. *Adv Anat Pathol*, 5: 67–85
- Ordóñez NG (2014) Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum Pathol*, 45: 191–205
- Otsuki Y, Li Z, Shibata MA (2003) Apoptotic detection methods from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem*, 38: 275–339
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45: 487–498
- Panner A, Würster RD (2006) T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium*, 40: 253–259
- Parker C, Sherbet GV (1992) Modulators of intracellular Ca^{2+} and the calmodulin inhibitor W-7 alter the expression of metastasis-associated genes MTS1 and NM23 in metastatic variants of the B16 murine melanoma. *Melanoma Res*, 2: 337–343
- Pei L, Wiser O, Slavin A, Mu D, Powers S, Jan LY, Hoey T (2003) Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K^+ channel function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 7803–7807
- Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A (2012), JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis*, 3: e430
- Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B., Gelbard H. A. (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 50: 98–115

- Pocsai K., Kosztka L., Bakondi G., Gönczi M., Fodor J., Dienes B., Szentesi P., Kovács I., Feniger-Barish R., Kopf E., Zharhary D., Szücs 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
- Polster B. M., Basanez G., Etxebarria A., Hardwick J. M., Nicholls D.G. (2005). Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 280: 6447–6454
- Porter R. S. (2011) The Merck manual of diagnosis and therapy. 19th ed. Merck Sharpe & Dohme Corp., West Point, PA
- Remillard C. V., Yuan J. X. (2004) Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L49–L67
- Resende R. R., Adhikari A. (2009) Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation *Cell Communication and Signaling*, 7:2
- Resende R. R., Andrade L. M., Oliveira A. G., Guimarães E. S., Guatimosim S., Leite M. F. (2013) Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus. *Cell Commun Signal*, 11: 14
- Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R. (2003) Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science*, 302: 1704–1709
- Roderick H. L., Cook S. J. (2008) Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*, 8: 361–375
- Rosevinge E. C., Cheng K., Drachenberg C. B., Fowler C. B., Evers D. L., Xie G., Raufmann J. P. (2013) Bedside to bench: Role of muscarinic receptor activation in ultrarapid growth of colorectal cancer in a patient with pheochromocytoma. *Mayo Clin Proc*, 88: 1340–1346
- Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór A., Pál B., Bíró T., Szücs 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
- Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, Telek A, Gönczi M, Szücs G, Csernoch L (2008) Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells. *Virchows Arch*, 452: 415–426
- Sailer M, Oppitz M, Drews U (2000) Induction of cellular contractions in the human melanoma cell line SK-mel 28 after muscarinic cholinergic stimulation. *Anat Embryol*, 201: 27–37
- Sayers TJ (2011) Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1173–1180
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17: 1675–1687
- Schönherr R (2005) Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol*, 205: 175–184
- Schultz J, Ibrahim SM, Vera J, Kunz M (2009) 14-3-3 σ gene silencing during melanoma progression and its role in cell cycle control and cellular senescence. *Mol Cancer*, 8: 53
- Schwartz SM, Bennett MR (1995) Death by any other name. *Am J Pathol*, 147: 229–234

Scott D. A., Adam D. Richardson A. D., Filipp F. V., Knutzen C. A., Chiang G. G., Ronai Z. A., Osterman A. L., and Smith W. J. **(2011)** Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines BEYOND THE WARBURG EFFECT, *J Biol Chem.*; 286(49): 42626–42634.

Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP **(2009)** Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C221–C232

Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW **(2011)** BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 508–520

Sjostrom J, Bergh J **(2001)** How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ*, 322: 1538–1539

Small JV, Resch GP **(2005)** The comings and goings of actin: Coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 517–523

Smalley KSM, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M **(2006)** Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther*, 5: 1136–1144

Smalley KSM, Flaherty KT **(2009)** Development of a novel chemical class of BRAF inhibitors offers new hope for melanoma treatment. *Future Oncol*, 5: 775–778

Spindel, ER **(2012)** Muscarinic receptor agonists and antagonists: Effects on cancer. *Handb Exp Pharmacol*, 208: 451–468

Stathopoulos PB, Schindl R, Fahrner M, Zheng L, Gasmi-Seabrook GM, Muik M, Romanin C, Ikura M **(2013)** STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nat Commun*, 4: 2963

Sun SY **(2011)** Understanding the role of the death receptor 5/FADD/caspase-8 death signaling in cancer metastasis. *Mol Cell Pharmacol*, 3: 31–34

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderowski DP, Penninger JM, Kroemer G **(1999)** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441–446

Szabó I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Glubins E **(2008)**; Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 14861–14866

Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS **(2009)** Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life*, 61: 134–143

Taverna S, Tkatch T, Metz AE, Martina M **(2005)** Differential expression of TASK channels between horizontal interneurons and pyramidal cells of rat hippocampus. *J Neurosci*, 25: 9162–9170

Tímár J, Rásó E, Honn KV, Hagmann W **(1999)** 12-lipoxygenase expression in human melanoma cell lines. *Adv Exp Med Biol*, 469: 617–622

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF **(2005)** Cutaneous melanoma. *Lancet*, 365: 687–701

Toczyłowska-Mamińska R, Olszewska A, Laskowski M, Bednarczyk P, Skowronek K, Szewczyk A **(2014)** Potassium channel in the mitochondria of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 134: 764–772

- Tsuruo T, Iida H, Makishima F, Yamori T, Kawabata H, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1985) Inhibition of spontaneous and experimental tumor metastasis by the calcium antagonist verapamil. *Cancer Chemother Pharmacol*, 14: 30–33
- Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147: 275–292
- Vianello A, Casolo V, Petrusa E, Peresson C, Patui S, Bertolini A, Passamonti S, Braidot E, Zancani M (2012) The mitochondrial permeability transition pore (PTP) — An example of multiple molecular exaptation? *Biochim Biophys Acta*, 1817: 2072–2086
- Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J (2011) A melanoma molecular disease model. *PLoS One*, 6: e18257
- Vinogradov A, Scarpa A (1973) The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 248: 5527–5531
- Wainstein AJA, Belfort FA (2004) Conduta para o melanoma cutâneo. *Ver Col Bras Cir*, 31: 204–214
- Walisser JA, Thies RL (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in oxidant-stressed endothelial cells prevents oncosis and permits caspase activation and apoptosis. *Exp Cell Res*, 251: 401–413
- Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ (2012) Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 45: 217–224
- Weeraratna AT (2005) Wnt-er wonderland—The complexity of Wnt signaling in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 24: 237–250
- Wiesner B, Roloff B, Fechner K, Slominski A (2003) Intracellular calcium measurements of single human skin cells after stimulation with corticotrophin-releasing factor and urocortin using confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci*, 116: 1261–1268
- Williams CL, Hayes VY, Hummel AM, Tarara JE, Halsey TJ (1993) Regulation of Ecadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma. *J Cell Biol*, 121: 643–654
- Williams S, Bateman A, O’Kelly I (2013) Altered expression of two-pore domain potassium (K_{2p}) channels in cancer. *PLoS One*, 8: e74589
- Williams GS, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ (2013) Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 10479–10486
- Wissing S, Ludovico P, Herker E, Buttner S, Engelhardt SM, Decker T, Link A, Proksch A, Corte-Real M, Fröchlich KU, Manns J, Candé C, Sigrist SJ, Kromer G, Madeo F (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol*, 166: 969–974
- Yang S, Zhang JJ, Huang XY (2009) Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*, 15: 124–134
- Yohem KH, Clothier JL, Montague SL, Geary RJ, Winters AL 3rd, Hendrix MJ, Welch DR (1991) Inhibition of tumor cell invasion by verapamil. *Pigment Cell Res*, 4: 225–233
- Yongge L, Sato T, Seharaseyon J, Szewczyk A, O’Rourke B, Marbán E (1999) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*, 874: 27–37
- Zamzami, N., Kroemer, G., (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 67–71

- Zimmerman ZF, Kulikauskas RM, Bomsztyk K, Moon RT, Chien AJ (2013) Activation of Wnt/ β -catenin signaling increases apoptosis in melanoma cells treated with trail. PLoS One 8: e69593
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome *c*-dependent activation of caspase-3. Cell, 90: 405–413
- Zuzarte M, Heusser K, Renigunta V, Schlichthörl G, Rinné S, Wischmeyer E, Daut J, Schwappach B, Preisig-Müller R (2009) Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: Role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. J Physiol, 587: 929–952
- Zwart R, Vijverberg HPM (1997) Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: Competitive and noncompetitive effects. Mol Pharmacol, 52: 886–895

9. Rövidítésjegyzék

AIF:	apoptosis inducing factor
AM:	acetoximetilészter
AP:	akciós potenciál
APAF-1:	apoptotic protease-activating factor 1
AU:	arbitrary unit
BAK:	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX:	Bcl-2-associated X protein
Bcl:	B cell lymphoma
Bid:	BH3-interacting domain death agonist
BK, SK:	big and small conductance calcium activated K^+ channels
BSA:	bovine serum albumin
CCh:	karbamilkolin
CCCP:	karbonil-ciano-3-klór-fenilhidrazon
CMF-PBS:	calcium-, magnesium free phosphate-buffered saline
CRAC:	calcium release-activated calcium channel protein
Cy5:	cianin-5
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DiOC6:	1-[(3-hexil)-benzooxazólium]-3-[(3-hexil)-benzooxazol]-prop-1-én-jodid
DilC:	3H-indolium, 2-(5-(1,3-dihidro-1,3,3-trimetil-2H-indol-2-ilidene)-1,3-pentadienil)-1,3,3-trimetil-jodid
DISC:	death-inducing signaling complex
DMSO:	dimetil-szulfoxid
dNTP:	deoxinucleotid-triphosphate
DR:	death receptor
EDTA:	etiléndiamin-tetraacetát
ER:	endoplazmatikus retikulum
EGTA:	etilénglikol-tetraacetát
FADD:	Fas-associated protein with death domain
FF:	festékfelvétel
FITC:	fluoreszcein-izotiocianát
GAPDH:	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GFP:	green fluorescent protein
HMB-45:	human melanoma black 45
HRP:	horseradish peroxidase

IBC:	isolation <u>b</u> uffer for <u>c</u> ells
IP ₃ :	inozitol-triszfoszfát
JC-1:	<u>J</u> -aggregate-forming <u>c</u> ationic dye-1
K _{2P} :	két pórusformáló domént tartalmazó káliumcsatornák
K _{Ca} 3.1:	<u>c</u> alcium-activated <u>K</u> ⁺ channel, subtype 3.1
KCNK9:	<u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel subfamily <u>K</u> member 9
KD:	<u>k</u> nock <u>d</u> own
Kir:	<u>i</u> nward <u>r</u> ectifier <u>K</u> ⁺ channles
KO:	<u>k</u> nockout
Kv:	<u>v</u> oltage-gated <u>K</u> ⁺ channels
MAPK:	<u>m</u> itogén <u>a</u> ktivált protein- <u>k</u> ináz
MART-1:	<u>m</u> elanocyte <u>a</u> ntigen/ <u>m</u> elanoma <u>a</u> ntigen <u>r</u> ecognized by <u>T</u> -cells-1
MMP:	<u>m</u> itokondriális <u>m</u> embrán <u>p</u> otenciál
MPTP:	<u>m</u> itochondrial <u>p</u> ermability <u>t</u> ransition <u>p</u> ore
MR:	<u>m</u> uszkarinos <u>r</u> eceptor
mTOR:	<u>m</u> echanistic <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin (szerin/treonin-kináz)
MTT:	3-(4,5dim <u>e</u> tiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium bromid
PARP:	poly <u>A</u> DP <u>r</u> ibose polymerase
PBS:	phosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PKB:	protein <u>k</u> ináz <u>B</u>
PCD:	<u>p</u> rogrammed <u>c</u> ell <u>d</u> eath
PI3K:	phosphatidy <u>i</u> nositol-4,5-bisphosphate <u>3</u> - <u>k</u> inase
RFU:	<u>r</u> elative <u>f</u> luorescence <u>u</u> nit
Rhod-123:	<u>r</u> hoda <u>m</u> ine-123
RIP:	<u>r</u> eceptor- <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein
ROI:	<u>r</u> egion <u>o</u> f <u>i</u> nterest
ROS:	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygene <u>s</u> pecies
RPMI-1640:	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute-1640 tápoldat
SDHA:	<u>s</u> zukcinát- <u>d</u> e <u>h</u> idrogenáz, <u>A</u> alegység
SDS:	nátrium-dodekaszulfát
SERCA:	<u>s</u> arco/ <u>e</u> ndoplazmatic <u>r</u> eticulum <u>c</u> alcium <u>A</u> TP-ase
SOCE:	<u>s</u> to <u>r</u> e-operated <u>c</u> alcium <u>e</u> ntry
STIM-1:	<u>s</u> tromal <u>i</u> nteraction <u>m</u> olecule <u>1</u>
TALK:	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> lkaline pH-activated <u>K</u> ⁺ channel
TASK:	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> cid- <u>s</u> ensitive <u>K</u> ⁺ channel

TRAIL: TNF- related apoptosis inducing ligand
TREK: TWIK-related K⁺ channel
TRESK: TWIK-related spinal cord K⁺ channel
TM: transzmembrán domén
TNF-R1: tumor necrosis factor receptor 1
TRIS-HCl: trihidrox-i-aminometán-hidroklorid
TRIS-MOPS: trihidrox-i-aminometán-3-(N-morfolino)-propán-szulfát
TWIK: tandem of P-domains in a weakly inward rectifying K⁺ channel

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Rusznák Zoltánnak és Szücs Gézának a munkám során nyújtott segítséget, figyelmet, útmutatást. Köszönettel tartozom Csernoch László Professzor Úrnak, a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának, amiért támogatott, és lehetővé tette az intézetben a PhD munkám elvégzését.

Köszönet Gönczi Mónikának, aki segítségemre volt a munkámban. Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak: Vargáné Kiss Ibolyának, Pál Balázsnak, Szücs Péternek, Pocsai Krisztinának, Bakondi Gábornak, Kosztka Líviának, Pap Pálnak, Kovács Adriennek, Nagy Zsuzsannának, Fodor Jánosnak, Tóth Adriennek, Uzonyi Renátának. Köszönöm mind a Neurobiológia, mind a Kalcium homeosztázis munkacsoport kollégáinak támogatásukat és tanácsaikat. Ezúton szeretném kifejezni hálámat az Intézet összes dolgozójának, akik barátságos és segítőkész légkört teremtettek, ami megkönnyítette a munkámat.

Köszönetet szeretnék mondani kollaborációs partnereinknek Szőőr Árpádnak, Bai Péternek, Fodor Tamásnak, hogy munkájukkal segítették a dolgozatban felhasznált publikációk elkészültét.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak külön kiemelve édesanyámat, hogy stabil érzelmi háttérrel biztosítottak, és minden lehetséges módon támogattak a PhD munkám elvégzése során.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2./B-10/1-2010-0024 sz. és a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 sz. pályázatok támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg a 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 sz. pályázat 'Nemzeti Kiválóság programjának' keretében. A kísérletes munka kivitelezéséhez az OTKA NK-61412; OTKA K108308; ETT 186/2009 és a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. pályázatok nyújtottak anyagi támogatást.



TÁMOP 4.2.4.A

11. Nyilatkozat önálló munkavégzésről.

- A bemutatott kísérletes munka 60-65%-t magam végeztem.
- Kollaborációs partner végezte
 - Mitokondriális DNS meghatározás.
 - DioC6 kapcsolatos kísérletek
- Részben vagy egészben magam vagy magam is végeztem
 - Új protokollok optimalizálása (pl. sejtfrakció szeparálás)
 - Western blot, PCR
 - Mitokondriális membránpotenciál mérések
 - Apoptózis meghatározások
 - Immuncitokémia
 - Intracelluláris kalciumkoncentráció mérések
 - 96 well plate esszék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Jelölt: Nagy Dénes
Neptun kód: LFU9JX
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036794

Iktatószám: DEENKÉTK/415/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, D.,** Gönczi, M., Dienes, B., Szőör, Á., Fodor, J., Nagy, Z., Tóth, A., Fodor, T., Bai, P., Szűcs, G., Rusznák, Z., Csernoch, L.: Silencing the KCNK9 potassium channel (TASK-3) gene disturbs mitochondrial function, causes mitochondrial depolarization, and induces apoptosis of human melanoma cells.
Arch. Dermatol. Res. 306 (10), 885-902, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-014-1511-5>.
IF:2.27 (2013)
2. **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), 12-23, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283414477>
IF:2.187



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. » Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. » Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu » Honlap: lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Szentandrassy, N., **Nagy, D.**, Hegyi, B., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P.P.: Class IV antiarrhythmic agents: New compounds using an old strategy.
Curr. Pharm. Design. Epub ahead of print (2014)
IF:3.288 (2013)
4. Szentandrassy, N., **Nagy, D.**, Ruzsnavszky, F., Harmati, G., Bányász, T., Magyar, J., Szentmiklósi, J.A., Nánási, P.P.: Powerful technique to test selectivity of agents acting on cardiac ion channels: The action potential voltage-clamp.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3737-3756, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642418>
IF:4.859
5. 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:2.187
6. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,614

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,457

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

Debrecen, 2014.12.09.