

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

Debrecen, 2015

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az „Elméleti orvostudományok” tudományágban

Írta: Nagy Dénes okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája

(Élettan és Neurobiológia program) keretében

Témavezetők: Dr. Rusznák Zoltán, PhD, Prof. Dr. Szücs Géza az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Tóvári József, PhD

Dr. Varga Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

2015. április 9. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora

Dr. Zákány Róza, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora

Dr. Tóvári József, PhD

Dr. Varga Zoltán, PhD

Dr. Zákány Róza, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme, 2015. április 9. 13:00

Bevezetés

A melanoma

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 gyakorisága mellett: a bőrből kiinduló melanoma malignum incidenciája 40–50/100 000, a nem-bőr eredetű melanomák pedig az összes melanoma malignum esetnek a 4–5%-át képezik.

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, a melanoma malignum az összes bőreredetű daganattal kapcsolatos haláleset mintegy 65%-áért felelős. 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.

A melanoma sejtek proliferációs készsége igen nagy, ezért a terápia meghatározó eleme a tumor sebészi úton történő, minél gyorsabb eltávolítása. A primer tumor eltávolítása azonban nem feltétlenül jelent gyógyulást, mivel a melanoma malignitásának fontos eleme a korai áttétképzés.

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.

A sejthalál

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. Daganatképződés során a sejtosztódás és a sejtek pusztulása közötti kényes egyensúly felborul, amiért a sejtosztódás fokozódása és a sejthalál mértékének csökkenése általában együttesen felelős.

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.

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. Az apoptózis a sejtméret csökkenésével, a sejtmag kondenzációjával és fragmentációjával, majd a citoplazma hólyagosodásával, és a szomszédos sejtekkel fennálló adhéziós kapcsolatok elvesztésével jár. 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.

Az extrinzik apoptotikus kaszkádot egyes, az ún. halálreceptor-családba tartozó receptorok aktivációja indíthatja el. Az intrinzik (vagy mitokondriális) apoptotikus kaszkád aktiválásának indító faktora a DNS károsodása. Az intrinzik útvonal a kaspáz-9, míg az extrinzik jelátvitel a kaspáz-8-as altípuson keresztül aktiválja az effektor kaspázokat (3, 6, 7). Az apoptózist kísérő sejtmagzsugorodás és sejtméretcsökkenés az effektor kaspázok aktivitásának eredménye. Az intrinzik apoptózis során a kaspázfüggő folyamatok mellett kaspáztól független események is hozzájárulnak a sejt pusztulásához. A folyamat egyik kulcsmolekulája az AIF (apoptosis inducing factor), amelyik végsősoron a DNS degradálásán keresztül járul hozzá a sejthalál folyamatához.

Az apoptotikus folyamatok szabályozása bonyolult folyamat, amiben számos molekula vesz részt. A Bcl (B cell lymphoma) molekulacsalád tagjai között egyaránt vannak pro-apoptotikus és anti-apoptotikus fehérjék.

Tekintettel az apoptózis jelentőségére, a daganatos sejteket célzó kutatásokban nagy jelentőségű az apoptózis aktiválódásának hathatós detektálása. Az annexin V nevű molekula hatékonyan kötődik a sejtfelszíni membrán külső oldaláról hozzáférhető foszfatidil-szerinhez, így az annexin V sejtfelszíni membránban történő bedúsulása megbízhatóan jelzi az apoptotikus kaszkád aktiválódását. Az apoptózis detektálásának egy másik lehetséges módja a folyamat gyümölcseként kialakuló DNS fragmentáció láthatóvá tétele, aminek legelterjedtebb módja az ún. TUNEL esszé alkalmazása. Az apoptózist kísérő mitokondriális diszfunkció ugyanakkor a mitokondriális membránpotenciál mérésével követhető nyomon, arra alkalmas fluoreszcens festékek használatával (pl. DiLC, Rhod-123, Jc-1 vagy DioC6 festékek).

A ma elfogadott nézet értelmében a nekrosis ugyancsak a programozott sejthalál egyik altípusa, annak ellenére, hogy azt sokáig spontán, azaz nem programozott sejthalálnak tartották. A nekrosis végső következménye a sejtfelszíni membrán irreverzibilis károsodása, ezért a nekrotikus típusú programozott sejthalál szabatosabb megnevezése onkózis vagy onkózis-nekrosis lenne. A folyamatnak az a kiinduló lépése, hogy a sejtbe került toxikus anyagok az ATP-termelést gátolják.

Áttétképződés

A rosszindulatú daganatok megkülönböztető ismérve, hogy a sejtburjánzás mellett bekövetkezik a környező szövetek infiltrációja és metasztázisok képzése. A sejtváándorlás 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. A környezet infiltrálásával a daganat növekszik, majd a daganatsejtek betörnek az erekbe. A vérkeringésbe jutott sejtek elsodródnak, 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.

A tumorigenezisben központi szerepet kapnak azok a részben újabban leírt sejten 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 tumorigenezisben – 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 tumorigenezis folyamatában.

A káliumcsatornák

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

A ma elfogadott kategorizálás a káliumcsatornák négy családját különbözteti meg; ezek (i) a kalciumaktivált káliumcsatornák (BK [Big conductance K channel] és SK [Small conductance K channel] altípusok), (ii) a befelé egyenirányító káliumcsatornák (K_{ir} altípusok), (iii) a feszültségvezérelt káliumcsatornák (K_v altípusok) és (iv) a két pórusformáló domént tartalmazó káliumcsatornák.

A káliumcsatornák sokféle funkcióval rendelkeznek. Tudománytörténeti jelentősége miatt meg kell említeni azt a felismerést, hogy a K_v csatornáknak döntő szerepük van az akciós potenciál (AP) leszálló szárának kialakításában. A vizsgált téma szempontjából fontos annak felismerése, hogy a káliumcsatornáknak szerepük lehet mind a sejtproliferáció, 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

végző soron fokozza a proliferáció sebességét. Ezt az összefüggést tételezték fel például limfocitákon és melanoma sejteken is.

A káliumcsatornák sejtciklus szabályozásban betöltött szerepének megítélését bonyolítja, hogy a csatornák némelyike a mitokondriumokban is megtalálható. Az irodalmi adatok közös eleme, hogy a káliumcsatornák a mitokondriális membránpotenciál (MMP) értékének meghatározása révén avatkozhatnak be a mitokondriumok működésébe. A mitokondriális káliumcsatornák ellentmondásos szerepét jelzi ugyanakkor, hogy nemcsak aktiválódásuk, hanem gátlásuk is aktiválhatja az apoptotikus útvonalat.

Az utóbbi években számos megfigyelés történt a két pórusformáló domént tartalmazó TASK-3 csatornák tumorigenezisben betöltött szerepével kapcsolatban. A megfigyelések egy része a csatorna tumorképződést elősegítő szerepét valószínűsíti, aminek hátterében az apoptózis gátlása állhat. Figyelemre méltó megállapítás, hogy csak a funkcionális (azaz káliumra permeabilis) TASK-3 csatorna rendelkezik tumorigén hatással, ami azt a látszatot kelti, hogy a tumorképződést elősegítő szerep a csatornán keresztül történő tényleges káliummozgással áll összefüggésben. Munkacsoportunk korábbi eredményei arra utalnak, hogy a melanoma sejtek TASK-3 expressziójának gátlása a mitokondriumok működésének károsodását, és végző soron a sejtek pusztulását idézi elő.

Muszkarinos receptorok és a kalciumhomeosztázis

A citoplazmatikus kalciumionok az egyik legáltalánosabb jelátviteli útvonal központi elemei. A citoplazmatikus kalciumkoncentráció-emelkedés az a jel, ami megváltoztathatja számos intracelluláris folyamat aktivitását.

A citoplazmatikus kalciumszintnek akkor lehet hatékony szabályozó szerepe, ha a koncentráció emelkedését annak gyors normalizálódása követi. Ez átmenetileg bekövetkezhet 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, a másik pedig a kalciumionok visszavétele a sejten belüli raktárakba. A kalciumionok központi jelentősége több sejtfunkció befolyásolásában is ismert. Ezek közül a két legalaposabban vizsgált terület az izomkontrakció és a neurotransmitter-felszabadulás szabályozása. A kalciumionok ugyanakkor a sejtmagban is hathatnak, ahol változásokat indukálhatnak a génexpresszióban és fázisváltásokat hozhatnak létre a sejtciklusban.

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. A daganatsejtekben a kalciumhomeosztázis számos eleme járul hozzá a Ras és a hozzá kapcsolódó

szignalizációs rendszerek aktivitásának fokozásához, segítve ezáltal a sejtproliferációt.

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.

A muszkarinos receptorok jelentőségét több tumorféleségben leírták. Megállapították például, hogy egyes tüdőtumor eredetű sejtvonalakban az MR3 fokozza a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) kaszkád aktivitását és következményesen a sejtek proliferációját.

A melanoma malignum nagymértékű invazivitásának megértése érdekében végzett kutatások felfedték, hogy a melanoma sejtek a muszkarinos kolinerg szabályozási útvonal számos elemét expresszálják. Figyelembe véve azt a tényt, hogy az embriogenezis során a muszkarinos jelátvitelnek fontos szerepe van a melanocita prekursor sejtek vándorlásában, indokolt feltételezni, hogy a MR-ok és a hozzájuk kapcsolódó szignalizációs útvonalak a melanoma sejtek viselkedésének meghatározásában is fontos szerepet játszhatnak.

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, továbbra sincs egyetértés a kolinerg hatások melanoma malignumra gyakorolt pontos hatásait illetően.

Célkitűzések

Korábbi kísérleti adataink értelmében a TASK-3 csatornának szerepe van a melanoma malignum sejtek mitokondriális funkciójának biztosításában. A problémakör további, és az eddigieknél behatóbb vizsgálata érdekében a primer-tumor eredetű WM35 melanoma sejteken stabil TASK-3 géncsendesítést végeztünk. Mivel a WM35 sejtek terápiás beavatkozásokkal szembeni érzékenysége nagyobb, mint a melanoma-specifikus kísérletekben leggyakrabban alkalmazott más melanoma sejtvonalaké, egy invazívabb karakterű, nyirokcsomó áttétből származó sejtvonalat is felhasználtunk (A2058 sejtek). Az A2058 sejtekben tranziens géncsendesítést végeztünk. Korábbi eredményeinkből kiindulva a jelen munka egyik alapvető célja az volt, hogy a géncsendesített sejtekben vizsgáljuk a mitokondriális membránpotenciál esetleges változásait. Több, a sejtek számát, életképességét és morfológiáját jellemző paraméter meghatározása mellett célunk volt az apoptózis mértékében bekövetkező változások regisztrálása is.

Munkánk másik részében annak a muszkarinos kolinerg hatásnak a tanulmányozását tűztük ki célul, aminek biológiai jelentőségét már több daganatos sejttypus esetében is igazolták. Mivel előkísérleteink megmutatták, hogy a karbamil-kolin nevű kolinerg agonista alkalmazásával intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek válthatók ki sejttenyészetben fenntartott melanoma sejteken, a további specifikus kísérleteket ezen agonista alkalmazásával végeztük. A munka során célunk volt melanoma sejtek karbamil-kolinnal szembeni érzékenységének jellemzése, a kialakuló Ca^{2+} -tranziensek alakjának tanulmányozása, és a tranziensek kialakulásához szükséges kalcium forrásának meghatározása. A kísérletes munka egyik központi eleme az volt, hogy összehasonlítsuk a primer tumor eredetű WM35, valamint metasztázisból származó HT168-M1 és HT199 sejtvonalak által generált válaszokat.

Anyagok módszerek

Sejtenyésztés

A jelen disszertációban bemutatott kísérletekben négy humán melanoma sejtvonalat használtunk. Egy sejtvonal primer tumorból származott (WM35), három pedig metasztatikus (A2058, HT168-M1, HT199) eredetű volt. A sejteket RPMI-1640 tápoldatban, 37°C-on, 5% CO₂ mellett tenyésztettük. A tápoldatot a tenyésztéshez szükséges adalékokkal egészítettük ki.

TASK-3 géncsendesített melanoma sejtvonalak előállítása

Egyik korábbi munkánk keretében már készítettünk és teszteltünk egy TASK-3-specifikus shRNS plazmidot. Kontrollként egy egyetlen humán expressziós kaszkáddal sem interferáló, kevert (scrambled) szekvenciát alkalmaztunk. A fenti inzerteket pRNAT-H1.1/Neo expressziós vektorba ligáltuk. A TASK-3-specifikus és a scrambled shRNS-t tartalmazó vektorkonstruktokkal WM35 és A2058 melanoma sejteket transzfektáltunk, amihez Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenst használtunk.

RT-PCR

A transzfektált és nem-transzfektált sejtkultúrákból teljes RNS-frakciót izoláltunk. Az Omniscript RT Kit felhasználásával az izolált RNS-ből reverz transzkripciót végeztünk. A TASK-3-specifikus és β -aktin (belső kontroll) specifikus szekvenciákat arra tervezett primerek felhasználásával erősítettük fel. A PCR reakciókat egy Bio-Rad C-1000 típusú készülékben hajtottuk végre. A PCR termékeket EZVision DNS-jelölő festékkel elegyítettük, majd agaróz gélben futtattuk. A gélképet Fujifilm Labs-3000 dark box alkalmazásával digitalizáltuk, majd denzitometriás analízist végeztünk.

Western-blot

A transzfektált és nem-transzfektált melanoma sejtkultúrákból teljes sejtes lizátumot készítettünk, amihez lízispuffert használtunk. A minták fehérjetartalmának meghatározása után (BCA protein assay Kit) az elektroforézishez elkészített mintaelegyet akrilamid-gélben futtattuk, majd az elválasztás után azokat nitrocellulóz membránra vittük át. Blokkolást követően a primer antitestet egy éjszakán át a membránon hagytuk, majd a mosást másodlagos antitesttel történő inkubáció követte. Az immunreaktív sávokat Pico vagy Femto detektáló Kit alkalmazásával tettük láthatóvá, majd a specifikus csíkokat Fujifilm Labs-3000 dark box segítségével digitalizáltuk.

A mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál (MMP) tanulmányozásához a kísérletek egy részében JC-1 fluoreszcens festéket használtunk. A JC-1 depolarizált mitokondriumokban monomer állapotban van jelen; erősen polarizált mitokondriumok belsejében pedig ún. J-aggregátumot képez.

514 nm hullámhosszúságú fénnel gerjesztve a monomer forma emissziós maximuma 530 nm-en, míg a J-aggregátumé 595 nm-en regisztrálható. A sejteket tartalmazó lemezeket JC-1-tartalmú, majd festékmentes RPMI-1640 oldatban inkubáltuk. A fluoreszcens felvételeket Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkóppal készítettük. A MMP értékét a háttérkorrigált piros/zöld fluoreszcenciaintenzitás-értékek arányával jellemeztük.

A kísérletek egy része során a sejteket MMP érzékeny DiOC6-t tartalmazó oldattal inkubáltuk, amit PBS-sel történő mosás követett. A sejteket tripszinnel felszedtük, majd az így előállított sejtszuspenziót BD FACS Calibur flow-citométerrel vizsgáltuk.

A MMP időbeli változásait JC-1 festékkel töltött sejteken, Zeiss Axioskop mikroszkópra épített fluoreszcens képalkotó rendszerrel vizsgáltuk. A J-aggregátumra jellemző fluoreszcenciaintenzitás változásait 590 nm-en detektáltuk, egy erre alkalmas emissziós szűrő és dikroikus tükör alkalmazásával, a gerjesztési hullámhosszat 561 nm-re állítottuk. Mitokondriális depolarizációt karbonil-ciano-3-klór-fenilhidrazon (CCCP) felhasználásával váltottunk ki.

MTT életképességi és proliferációs esszé

96-lyukú tenyésztő edényekbe szélesztést követő első és harmadik napon a sejteket mostuk kalcium- és magnéziummentes PBS-sel (CMF-PBS), ezt követően azokat MTT-reagenst tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk. A keletkezett formazán kristályokat MTT szolubilizáló oldatban oldottuk fel. A formazán koncentrációt fotometriás úton határoztuk meg.

A mitokondriális DNS mennyiségének meghatározása

A transzfektált és nem-transzfektált sejt kultúrákból teljes RNS-frakciót izoláltunk. Az Omniscript RT Kit felhasználásával az izolált RNS-ből reverz transzkripciót végeztünk. A mitokondriális és a sejtmag DNS-t qPCR reakció segítségével sokszoroztuk fel a cDNS-ből a Light-Cycler 480 System Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix felhasználásával. A mitokondriumok számának jellemzésére a mitokondriális- és genomi DNS mennyiségének hányadosát alkalmaztuk (az ún. H2/H1 hányados).

A melanoma sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának vizsgálata

A melanoma sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációjának méréséhez a Fluo-4 fluoreszcens indikátor acetoximetilészter (AM) formáját alkalmaztuk. A fedőlemezre szélesztett melanoma sejteket festéktartalmú, majd festékmentes Hanks-oldatban inkubáltuk. A kalciumkoncentráció méréséhez használt képalkotó rendszer megegyezett az előzőekben leírtakkal; ugyanakkor néhány komponenst a Fluo-4 festék optikai sajátosságaihoz igazítottuk. A festék gerjesztésére 494 nm-en került sor, a kalciumtranzienseket a kolinerg agonista karbamil-kolin (karbakol, CCh) alkalmazásával váltottuk ki.

Más kísérleti elrendezésben 96-lyukú, fekete oldalú, Greiner-lemezekbe sejteket szélesztettünk, a tenyésztett sejteket Fluo-4 AM festékkel töltöttük fel. A mérések során a gerjesztő hullámhosszat 495 nm-re, az emissziós hullámhosszat pedig 520 nm-re állítottuk. Az adott CCh-koncentrációhoz tartozó egyedi mérési pontokat a CCh-adagoláshoz tartozó maximális fluoreszcenciaintenzitásként kaptuk. Egy adott lemezen belül az azonos CCh-koncentrációval kezelt lyukak értékeit átlagoltuk, és az általunk összeállított egyenletekkel illesztettük, majd a kiértékelés végén elvégeztük a Hill-féle illesztést.

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányának meghatározása

A melanoma sejteket fedőlemezre szélesztettük és azon tenyésztettük. Az apoptózis és nekrosis mértékének megállapítása érdekében a sejteket PBS-sel mostuk, majd fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált annexin V-tel valamint propidium-jodiddal inkubáltuk. Ezt követő mosás után a sejteket fixálás nélkül polivinil-alkohol-polimerbe (Mowiol) ágyaztuk. Az annexin V- és propidium-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 (propidium-jodid) voltak.

Mitokondriumban gazdag, valamint citoszól frakciók izolálása és vizsgálata

A tenyésztőedényekben tenyésztett melanoma sejteket tripszinnel emésztettük. A kapott sejtszuspenziót összegyűjtöttük és 600g-n centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és az üledéket izolációs pufferben (IBC) szuszpendáltuk. A szuszpenziót teflon potterben homogenizáltuk, majd a kapott oldatot centrifugáltuk (600g). A sejtmagokban gazdag üledéket proteáz inhibitor tartalmazó lízispufferbe vittük át, a felülúszót újra ultracentrifugáltuk (100000g). A felülúszót – citoszólban dús frakciót –, és az üledéket, a mitokondrium frakciót Western-blot kísérletekhez készítettük elő. A mitokondrium és a citoszól frakciókban a citokróm c detektálását Western-blot kísérletekkel végeztük.

Kaspáz-3 esszé

A kaspáz-3 aktivitását Caspase 3/CPP32 kolorimetriás proteáz esszével mértük, a gyártó instrukcióinak megfelelően. Az egyes minták kaspáz-3 aktivitását az abszorbancia 370 nm-en történő detektálásával határoztuk meg. Pozitív kontrollként olyan tenyészeteket alkalmaztunk, amikben a sejteket H₂O₂-oldatban inkubáltuk.

CyQuant®GR sejtproliferációs esszé

A CyQuant®GR esszéhez fekete falú, 96 lyukú fekete oldalú, Greiner-lemezekbe sejteket szélesztettünk. A harmadik napon a sejteket kétszer mostuk (CMF-PBS), majd -70°C-on tartottuk azokat. A fagyasztás

után a mintákat DNS-festő lízis pufferrel inkubáltuk. Az emittált fluoreszcens jel intenzitását 485 nm-es gerjesztés mellett 530 nm-en detektáltuk.

Fluoreszcens immuncitokémia

A sejteket paraformaldehidben fixáltuk, majd glicint tartalmazó PBS-sel mostuk. A permeabilizálást Triton X-100 tartalmú PBS-sel végeztük, majd mosás következett. A blokkoláshoz BSA tartalmú PBS-t alkalmaztunk, majd a sejteket a primer antitestekkel inkubáltuk, amit mosás követett. Ezután a mintákat másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Az utolsó lépésben a sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)-tartalmú Vectashield médium alkalmazásával tettük láthatóvá.

A mitokondriumok jelölését MitoTracker Red festékkel végeztük. Ennek során a melanoma sejteket MitoTracker Redet tartalmazó tápoldatban (RPMI-1640) inkubáltuk, CMF-PBS-ben mostuk, végül paraformaldehidben fixáltuk. A jelölt sejteket minden esetben konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A sejtmorfológia vizsgálata és a sejtméret meghatározása

A sejtek morfológiai csoportosítása a sejtek alakjának és nyúlványaik számának meghatározásán alapult. A WM35 melanoma sejteket fedőlemezre szélesztettük és tenyésztettük, majd paraformaldehidben fixáltuk. A sejtekről áteső fényben készítettük felvételeket az előzőekben ismertetett rendszer alkalmazásával. Az egyes melanoma sejtek vetületét az ImageJ programmal határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Az értekezésben szereplő adatok rendre átlag $\pm$ standard hiba (SE) formában kerülnek bemutatásra. A statisztikai különbségek kiértékeléséhez Student-féle *t*-tesztet és ANOVA-t alkalmaztunk. A számításokhoz és az ábrák készítéséhez Origin v8 és Microsoft Excel programokat használtuk.

Eredmények

A TASK-3 csatornaféherje 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 tranzisensen transzfektáltuk egy specifikus shRNS-szekvenciával, aminek következtében a sikeresen transzfektált sejtekben a TASK-3 fehérje expressziója markánsan csökkent. Az első feladat az volt, 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 genetikával történő eliminálása, és a genetikára rezisztens sejtek felszaporítása.

A WM35 sejtvonal 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. Ebből következően a WM35 sejtek használata nem optimális olyan vizsgálatokban, amik célja jövőbeni lehetséges terápiák kidolgozása. 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. 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 elkerültük azokat az esetleges komplikációkat, amik a hosszabb tenyésztési idejű, klónszelektált, stabilan transzfektált sejtek esetében esetleg felléphetnek (pl. a genetikai állomány nem kívánt módosulása).

A tranziensen transzfektált A2058 sejtenyészeteken végzett RT-PCR és Western-blot kísérletek igazolták, hogy a specifikus shRNS bejuttatása után 4 nappal jelentősen csökkent mind a TASK-3-specifikus mRNS, mind a TASK-3 fehérje expressziója.

Az értekezésben bemutatott munka egyik fő célja azon korábbi megfigyelések megerősítése és bővítése 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, J aggregátuma pedig piros hullámhossznak megfelelő fluoreszcenciás jelet bocsát ki. A 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 akumulálják a festéket, hogy a JC-1 molekulák aggregátumokat képeznek, amik piros fényt emittálnak. 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.

A JC-1 festékkel történt töltést követően a TASK-3 géncsendesített WM35 sejtek fluoreszcenciaemissziója jelentősen különbözött mind a kontroll, mind a kevert shRNS-sel transzfektált sejtek emissziójától. Az eltérés lényege, hogy a KD sejtek észrevehetően kisebb intenzitású piros fényt, és valamivel nagyobb intenzitású zöld fényt emittálnak, mint akár a kontroll, akár a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek. A piros/zöld intenzitásarányokat számszerűsítettük és összegeztük. 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-transzfektált 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. 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. A knockdown sejtek festéktartalma csak mintegy fele volt a másik két sejtvonal festéktartalmának ($p < 10^{-5}$).

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. A MitoTracker ugyancsak egy olyan festék, aminek mitokondriális akumulációja és

fluoreszcenciája függ a MMP-től. Amennyiben a három sejtvonal tenyészeit MitoTracker Reddel jelöltük, a knockdown sejtek festődésének erőssége lényegesen kisebb volt, mint a kontroll vagy a scrambled shRNS-sel transzfektált WM35 sejteké, és az szignifikánsan különbözött mindkét másik sejtvonal festődésének erősségétől ($p < 10^{-6}$). Összességében 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.

A mitokondriális működészavar további jellemzésére olyan méréseket végeztünk, amelyben egy mitokondriális szétkapcsoló szer MMP-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérletek során $50 \mu\text{mol/l}$ CCCP-t alkalmaztunk a tenyésztőoldatban, és mértük a vörös JC-1-fluoreszcencia intenzitásának következményes csökkenését. A csökkenés 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 és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek CCCP-re adott válaszait összehasonlítva azok nagysága között nem volt érdemi különbség. Megfigyelhető ugyanakkor az is, hogy a knockdown sejtek CCCP-okozta fluoreszcenciaintenzitás-csökkenése csak mintegy negyede annak, amit a másik két sejtvonal esetében láttunk. A vázolt gondolatmenetnek volt azonban egy támadható pontja. Mint azt korábban láttuk, a TASK-3 knockdown sejtek JC-1 akkumulációja csökkent mértékű volt. Ezt a megállapítást tükrözi az a különbség, ami a három sejtvonal CCCP alkalmazás előtti, nyugalmi fluoreszcenciaintenzitásában is megfigyelhető. 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 mennyiségi jellemzését úgy kívántuk egyértelművé tenni, hogy a szétkapcsoló szer jelenlétében mért fluoreszcenciaintenzitás-csökkenés nagyságát az alkalmazása előtti nyugalmi értékre normalizáltuk. Megállapítható, hogy a kontroll és a scrambled shRNS-sel transzfektált sejtek CCCP alkalmazásra adott válaszai 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 ($6,12 \pm 0,02\%$, $n = 67$).

Mivel a mitokondriumok megfelelő működése elengedhetetlen a sejtek túléléséhez és proliferációjához, feltételeztük, hogy a knockdown sejtekben bizonyítottan károsodott mitokondriális funkció csökkenti a sejtek

metabolikus aktivitását és proliferációs képességét. A feltevés bizonyítása céljából először a metabolikus aktivitást vizsgáltuk, amihez MTT esszét alkalmaztunk. A TASK-3 knockdown sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált sejteké; mind WM35 tenyészetben, mind az A2058 sejtvonalban. Mind a TASK-3 knockdown sejtek csökkent MitoTracker Red jelölődési intenzitása, mind alacsonyabb metabolikus aktivitása utalhat arra, hogy ezek a sejtek kevesebb mitokondriummal rendelkeznek. Ezen feltevésnek a megerősítése céljából meghatároztuk a melanoma sejtek mitokondriális DNS-tartalmát. 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 TASK-3 knockdown WM35 sejtek morfológiai megjelenésében is. A TASK-3 knockdown tenyészet alacsonyabb sejtdenzitást mutatott a kontroll és scrambled shRNS-sel transzfektált tenyészetekhez képest, továbbá megváltozott a sejtek alakja is. A vizsgálatok során azt találtuk, hogy a knockdown kultúrákban a sejtek 58%-a orsószerű (2 nyúlvánnyal rendelkező) 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. A sejthalak vizsgálata mellett meghatároztuk a sejtek vetületének nagyságát is. A 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 $n = 50$).

Az eddigi 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 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 nekrozis intenzitását is tanulmányoztuk. A kontroll WM35 tenyészetben az apoptózis irányában elkötelezett sejtek aránya jelentéktelen volt ($< 5\%$). 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 nekrozis mértékén, ugyanis a pozitív

kontrollon kívül egyik vizsgált sejtvonalban sem találtunk érdemleges propidium-jodid-jelölődést.

A TASK-3 géncsendesítés és az apoptotikus útvonalak aktiválódása 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. A knockdown sejtek citoszoljában magas volt a 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. A károsodott mitokondriumok kaspáztól független módon is aktiválhatják az apoptotikus folyamatokat. Ebben az esetben a sérült mitokondriumokból egyebek között AIF szabadulhat fel. Annak vizsgálatára, hogy a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben az AIF útvonal hozzájárul-e az apoptotikus folyamat aktiválódásához, AIF-specifikus immuncitokémiai jelöléseket végeztünk WM35 és A2058 sejteken egyaránt. 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, míg 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, a bemutatott eredmények összhangban vannak a TASK-3 knockdown sejtekben tapasztalt megnövekedett apoptotikus aktivitással. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a TASK-3 knockdown melanoma sejtekben megfigyelt sejtszámcsökkenés oka az apoptotikus sejtpusztulás, aminek előidézésében kaspázfüggő és -független útvonalak egyaránt részt vesznek.

A TASK-3 csatornafehérje melanoma sejtekben játszott szerepének vizsgálata során megállapítottuk, hogy számos intracelluláris szabályozó útvonal befolyásolhatja a sejtek életképességét és élettartamát. A jelen értekezésben bemutatott munka egy korábbi fázisában olyan szabályozási lehetőségeket is tanulmányoztunk, amelyek vizsgálatára a géncsendesítéses kísérletekben nem került sor. 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 és a muszkarinos kolinerg receptorok jelentőségét több tumorfeleség esetén is felvetették. Kísérleteink során a két kérdés tanulmányozását összevontuk, és a muszkarinos ACh-receptorok

citoplazmatikus Ca^{2+} -tranzienseket kiváltó szerepét vizsgáltuk három melanoma sejtvonalban.

A receptorfehérjék expressziójának kvantitatív jellemzését Western-blot technikával végeztük. A Western-blot kísérletek eredményei megerősítették az immuncitokémiai adatokat; nevesen, hogy mind a 1-es és mind a 3-as receptor típus jelen van mindhárom melanoma sejtvonalban (WM35, HT199, HT168-M1). 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.

A muszkarinos acetilkolin receptorok jelentőségének tanulmányozása érdekében a kolinerg agonista hatású karbamil-kolint (CCh) 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 dózis-hatás összefüggések alapján 1 mmol/l CCh-t, azaz egy biztosan telítő dózist választottuk a Ca^{2+} -tranziensek kiváltására. 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. Más sejtekben a korai tranziens nem követte plató fázis. Előfordult továbbá hosszan fenntartott kalciumkoncentráció-emelkedés korai tranziens komponens nélkül, vagy oszcillatórikus jellegű válasz, ezeket a jelalakokat „atípusos” név alatt foglaltuk össze.

A funkcionális és farmakológiai vizsgálatok általában megkínájk az agonista ismételt adagolását. A WM35 sejtek esetében a második kalciumtranziens amplitúdója az első tranziens nagyságának 93%-a volt, azaz a csökkenés minimális. Ezzel szemben a harmadik tranziens már csak az első csúcértékének 49%-át érte el. A HT199 és a HT168-M1 sejtvonalak esetében 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%-a és 19%-a). Az ismételt CCh alkalmazás kapcsán megfigyelhető kalciumtranziens csökkenést tachyphylaxis néven említjük a továbbiakban.

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. Atropin jelenlétében a kalciumtranziensek nagysága az eredeti érték 9%-ára (WM35), 3%-ára (HT199) és 12%-ára csökkent (HT168-M1). Az egyes sejtvonalakon nyert átlagértékek elemzése nyilvánvalóvá teszi, hogy atropin jelenlétében a kalciumkoncentráció-változások amplitúdója szignifikánsan nagyobb mértékben csökkent, mint ami a tachyphylaxis alapján várható lett volna.

A CCh-okozta kalciumkoncentráció-változások erősen variábilis időbeli lezajlása arra utalt, hogy a kalciumtranziensek kialakításában részt vevő kalciumionok több forrásból származhattak. Az MR1-hez és MR3-hoz csatlakozó szignalizációs útvonalról rendelkezésre álló adatok alapján a tranziensek korai, gyors komponense nagy valószínűséggel a kalciumionok intracelluláris raktárakból történő felszabadulását tükrözi. Erre utal az a megfigyelés is, hogy a külső tér kalcium koncentrációjának csökkentése a gyors komponens megjelenését nem befolyásolta. Ettől eltérően a plató komponens kialakításában a kívülről belépő kalciumionok lehetnek fontosabbak, mivel az extracelluláris kalciumkoncentráció mérséklése jelentősen csökkentette a CCh-kiváltott kalciumtranziensek ezen komponensének időtartamát.

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 mértékének csökkenése, valamint a mitokondriális DNS mennyiségének csökkenése. A géncsendesített sejtek morfológiai sajátosságai 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 kaspázfüggő és kaspáztól független mechanizmusok egyaránt megtalálhatók.

Atropinnal történő előkezelés megakadályozta a muszkarinos acetilkolin agonista CCh által kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció-változások kialakulását. Megállapítottuk, hogy a CCh-okozta kalciumkoncentráció-változások időbeli lezajlása változó; ugyanakkor jobbra elkülöníthető volt egy viszonylag stabil korai és egy ettől változókéonyabb késői komponens. Kimutattuk, hogy a késői komponens jellemzői nagymértékben függnak az extracelluláris kalciumkoncentrációtól. Eredményeink arra utalnak, hogy a primer tumorból és áttétekből származó melanoma sejtek kalciumhomeosztázisa csak kismértékben különbözik, ez azonban hozzájárulhat eltérő biológiai és klinikai sajátosságaik kialakításához.

A TASK-3 csatorna rosszindulatú tumorokban játszott szerepe

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. 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, meg védhet is ellene.

Másodsorban, jóllehet számos közlemény számolt be a TASK-3-csatorna erőteljes expressziójáról rosszindulatúan elfajult sejtekben, egy újabb, 20 ráktípus vizsgálatával foglalkozó tanulmányban nem találtak érdemi változást a TASK-3-specifikus mRNS kifejeződésében. Harmadszor, egyes megfigyelések szerint a TASK-3 expressziója elősegíti a tumor növekedését, míg más adatok szerint a fehérje jelenléte a daganatos megbetegedés prognózisát javítja.

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 megítélésére sincs még mód, hogy egy tumor TASK-3 expressziója kedvező vagy kedvezőtlen prognosztikai jel-e; esetleg semmilyen jelentőség nem tulajdonítható neki a rosszindulatú sejtburjánzás 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.

Jóllehet a fentiek értelmében nem lehet egységes módon értelmezni a tumorosan elfajult sejtek TASK-3 expressziójának jelentőségét, saját kísérleti adataink következtetések: 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. Mindazonáltal még ennek a bizonytalanságnak a tudatában is megalapozottnak tűnik 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. Gondot jelenthet az is, ha a tumorsejtekben a gátolt TASK-3 alegységeket TASK-1

alegységek helyettesítik. A TASK-3 csatorna szerepére vonatkozó ellentmondásos adatok arra is utalhatnak, hogy 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.

Muszkarinos kolinerg receptorok melanoma sejtekben

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. 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 metasztatizáló hajlama között.

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.

Léteznek olyan adatok, melyek szerint a MR3-ok gátlása megakadályozhatja egyes tumorok növekedését és metasztatizáció kialakulását. 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. Bár a MR-ok több jelátviteli útvonalat is aktiválhatnak a melanoma sejtekben, a kalciumionok részvétele ebben a komplex rendszerben egyértelmű. Számos korai tanulmány indult ki abból a feltételezésből, hogy – hasonlóan más sejt típusokhoz – a melanoma sejtek motilitása és proliferációja az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráción keresztül szabályozódik. 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. Fel kell tételeznünk, hogy a metabotrop MR-ok vagy közvetlenül nyitnak kalciumcsatornákat a sejt felszíni membránban, vagy az IP_3 -útvonalon

keresztül idéznek elő kalciumfelszabadulást. Az előbbi lehetőség kizárhatónak tűnik azon az alapon, hogy a kezdeti komponens sajátosságai nem függenek az extracelluláris kalciumkoncentrációtól. 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 az irodalomban leírt vizsgálatokban (MR5).

Az eredmények hasznosításának lehetősége

Jóllehet vannak olyan új és biztató eredmények, amik azzal kecsegtetnek, hogy esetleg javítják majd a melanoma túlélési esélyeit, 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. Ennek tükrében nem meglepő, hogy különösen ígéretes terápiás megközelítésnek tartják a melanoma sejtek csökkent apoptózis készségének visszafordítását célzó törekvéseket.

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. A jelen disszertációban bemutatott kísérletek során az apoptózis indukcióját és a következményes sejthalált a TASK-3-csatorna expressziójának csökkentésével érték el. Fontos megjegyezni, hogy vannak biztató erőfeszítések szelektív TASK-3-gátlók előállítására is, amik alkalmazásától hasonló eredmény várható. Ismert például, hogy a spermin képes a TASK-3 csatornák gátlására. Az irodalomban olyan 5,6,7,8-tetrahidropirido-[4,3-D]-pirimidin származék fejlesztéséről is beszámoltak, ami hatékony és szelektív TASK-3 gátlószereknek tűnik. Az előzőekben említett, vagy hasonló TASK-3 gátlók alkalmazása komolyan megfontolandónak tűnik új fejlesztésű, TASK-3-csatornákat célzó és így apoptózist indukáló terápiás módszerek kifejlesztése során.

A sikeres melanomaterápia másik lehetősége a sejtprolifерáció csökkentése. Ennek szabályozásában a foszfo-inozitol-3-kináz (PI3K) és a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) útvonal jelentősége ismert. Azon terápiás törekvések, amik a melanomák fokozott proliferációs aktivitását és metasztatizáló kapacitását célozzák, a MR-okat is számításba kell venniük.

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 csatornaféhrje expressziója fokozott, és a TASK-3 csatornák döntően a mitokondriumokban helyezkednek el. A megfigyelt változások alapján azt feltételezzük, hogy a mitokondriális TASK-3 csatornák hozzájárulnak a daganatsejtek túléléséhez.

Felmerül az a lehetőség, hogy a mitokondriális TASK-3 csatorna és a BAX féhrje feltételezett kölcsönhatása a TASK-3 csatornát impermeábilissá teheti, ami mitokondriális hiperpolarizációt okozhat. Ennek az elképzelésnek a realitását olyan kísérletek dönthetik el, melyek az érintett molekulák jelenlétét és kölcsönhatásait tisztázzák.

A mitokondriális hiperpolarizáció más molekulák mellett a kalcium mitokondriális felvételének hajtóerejét is fokozza, emelve ezzel a citromsavciklus kalciumfüggő enzimjeinek aktivitását, és fokozva az ATP- és ROS-termelés intenzitását. Ez a lehetőség felveti annak szükségességét, hogy vizsgálatokat végezzünk a melanoma sejtek mitokondriális anyagcserefolyamatainak és a TASK-3 féhrje ezekben játszott szerepének megismerése érdekében.

A jelen disszertációban bemutatott eredményeink felvetik azt is, hogy a MR-ok a kalciumhomeosztázis módosításán és más jelátviteli folyamatok befolyásolásán keresztül hatással lehetnek a melanoma sejtek életképességére, a tumorprogresszióra és a tumor áttétképző hajlamára. Vannak továbbá adatok a MR-ok tumornövekedésben, metasztázisképzésben és tumorvaszkularizációban betöltött szerepére vonatkozólag is. A jövőben indokolt ezen vagy hasonló hatások felderítése melanoma sejtek esetében, mert joggal feltételezhető, hogy a háttérükben álló molekuláris mechanizmusok elemei ezekben a sejtekben is megtalálhatók és működőképesek.

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 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 géncsendesített sejtek mitokondriális membránpotenciálja depolarizáltabb, mint a kontroll sejteké. A géncsendesítés csökkentette a mitokondriális DNS mennyiségét, és redukálta az érintett sejtek válaszkészségét egy szokásos mitokondriális szétkapcsoló ágens alkalmazásának hatására. Mindezen megfigyelések a géncsendesített 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 géncsendesített 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 géncsendesített tenyészetekben az apoptózis irányába elkötelezett sejtek aránya közel 50%-ra emelkedett. A géncsendesített sejtekben megfigyeltük még a citokróm c-nek a mitokondriumokból a citoszólba történő transzlokációját, a kaszpáz-3 enzim aktivitásának fokozódását, és az apoptosis-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 sejtenyészeti 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, tumorgenezis, citoplazmatikus kalcium



Iktatószám: DEENKÉTK/415/2014.
Tétele szám: PhD Publikációs Lista
Tárgy:

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

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





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), 3737-3758, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796842418>
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 tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.12.09.