

**POTENCIÁLISAN ONKOGÉN FEHÉRJEMOLEKULÁK
(TASK-3 ÉS PKC) MEGOSZLÁSÁNAK ÉS
JELENTŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES ÉS
KÓROS SZÖVETEKBE**



Dr. Kovács Ilona

**POTENCIÁLISAN ONKOGÉN FEHÉRJEMOLEKULÁK
(TASK-3 ÉS PKC) MEGOSZLÁSÁNAK ÉS
JELENTŐSÉGÉNEK VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES ÉS
KÓROS SZÖVETEKBE**



Dr. Kovács Ilona

Témavezető: Dr. Nemes Zoltán

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
PATOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2005.**

1. BEVEZETÉS

1.1. K^+ -csatornák és jelentőségük a sejtek működésben – amiről a mikroelektródák nem beszélnek...

1.1.1. A „klasszikus” K^+ -csatornák molekuláris szerkezete és csoportosítása

A K^+ -csatornák meghatározó jelentőséggel bírnak az ingerlékeny és nem-ingerlékeny sejtek fiziológiás folyamataiban, de jelentőségüket kimutatták egyes patológiás elváltozások genézisében is. A K^+ -csatornák igen heterogén funkcióinak magyarázata az ehhez a csoporthoz tartozó csatornamolekulák rendkívüli diverzitásában rejlik. Ismeretes, hogy a különböző - egymástól gyakran lényegesen eltérő sajátságokkal és funkciókkal jellemezhető - K^+ -csatornák az őket felépítő alegységek száma és struktúrája alapján ún. főcsoportokba (vagy szuperfamíliákba) oszthatók

A leghamarabb felismert, és jelen pillanatban is a legnagyobb számú K^+ -csatornát magába foglaló főcsoportot a feszültségvezérelt (Kv) K^+ -csatornák képezik. Bár az ide tartozó molekulák biofizikai jellegzetességei, elektromos sajátságai és funkciói igen jelentős különbséget mutatnak, molekuláris szerkezetükben megegyező, általában depolarizáció hatására aktiválódó ioncsatornákról van szó. A Kv-csatornákat négy alegység építi fel, melyek mindegyike hat transzmembrán doménal rendelkezik. Az egyes doméneken belül egy olyan hurok található, ami a kész csatorna esetében a K^+ -permeábilis pórus kialakításáért felelős. Az említett szerkezeti, struktúrális sajátosságok miatt a Kv osztályba sorolható K^+ -csatornákat 6TM-P csatornák néven is említi az irodalom.

1949-óta ismert, hogy léteznek olyan membránok, amikben nem pusztán a depolarizáció, hanem a hyperpolarizáció alkalmazása is a membrán K^+ -permeabilitásának fokozódásával jár. A későbbi célzott vizsgálatok rámutattak, hogy a hyperpolarizáció hatására aktiválódó csatornák két nagy csoportba oszthatók, amennyiben megkülönböztethetők a „klasszikus” befelé egyenirányító (inward rectifier) K^+ -csatornák és a hyperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationcsatornák.

Hasonlóan a Kv-család tagjaihoz, a befelé egyenirányító K^+ -csatornák (Kir) is négy alegység összeszerelődése következtében jönnek létre. Ezen alegységek molekuláris szerkezetére jellemző, hogy két transzmembrán szakaszt és a köztük

elhelyezkedő pórusformáló hurkot tartalmaznak; így gyakorta 2TM-P csatornákként említik ezen struktúrákat. A 2TM-P csatornák szerepe igen sokrétű, aktivitásuk hozzájárulhat a nyugalmi membránpotenciál kialakulásához (bár önmagukban nem elégségesek annak létrehozásához), továbbá biztosíthatják a harántesíktal izom aktivitásának következményeként a transversalis tubulusokban felhalmozódott K^+ sejtbé jutását.

1.1.2. Az ikerpórusú K^+ -csatornák – egy dogma halála

1995-ben történt első ízben beszámoló egy minden addig ismert K^+ -csatornától teljesen eltérő molekuláris szerkezetű K^+ -csatorna családról. Ezen molekula nem csupán a szerkezetében és szerveződésében, hanem viselkedésében és funkcióiban is teljesen eltért attól, amit a K^+ -csatornák vonatkozásában már-már dogma szerűen rögzült a tudományos gondolkodásban.

Az egyik leglényegesebb különbség, hogy az egyes csatornaegységek nem egy, hanem két pórusformáló hurkot tartalmaznak, amik egymás után („tandem” elrendezésben) helyezkednek el. Ezen túlmenően, szemben az addig ismert K^+ -csatornákkal, a funkcióképes struktúra kialakulása nem tetramerizációt, hanem dimerizációt igényel. A további vizsgálatok alapján bebizonyosodott, hogy ennek a csatornacsaládnak számos alcsoportja van, amelyek több-kevesebb szekvenciahomológiát mutatnak. A „tandem-pórusú” vagy „ikerpórusú” K^+ -csatornáknak azóta számos alcsoportját írták le (pl. TWIK, TREK, TRAAK, TRESK, THIK, TALK), melyek közül kiemelkedően lényeges csoportnak tűnnek az ún. TASK-csatornák.

Az elmúlt évek kutatásai rávilágítottak, hogy az emlős sejtekben a TASK-csatornák jelenléte és aktivitása meghatározó jelentőségű a nyugalmi membránpotenciál, valamint a sejtek bemenő ellenállásának és ingerlékenységének meghatározásában. Ezen túlmenően, a TASK-csatornák igen érzékenyen reagálnak a pH változásaira; amennyiben az extracelluláris pH savas irányú eltolódása ezen csatornák záródását idézi elő. A TASK-csatornák farmakológiája is tartogatott néhány érdekes meglepetést. Ezek a csatornák a közönséges K^+ -csatornagátló szerekre (Cs^+ , Ba^{2+} , 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium) érzéketlenek; ugyanakkor néhány helyi érzéstelenítésre használt szer (pl. lidokain, bupivikain) gátolja működésüket. Igen lényegesnek tűnik az a felismerés, hogy egyes gáznemű altatószerek (pl. halotán)

aktiválják a TASK csatornák egyes képviselőit (ezidáig a TASK-1 és a TASK-2 csatornákról bizonyosodott be halotán általi aktiválhatóságuk), így logikusnak tűnik az a feltételezés, hogy ez az újonnan felfedezett csatornacsalád jelentheti a gáznemű altatószerek hatásának oly régóta keresett célpontját.

Míg a TASK-csatornák biofizikájának és molekuláris biológiájának megismerése vonatkozásában jelentős előrehaladás történt a közelmúltban, a TASK-csatornák pontos szöveti megoszlását és az ott betöltött szerepét illetően sokkal hézagosabb információval rendelkezünk. A TASK-csatornák egyik lehetséges és igen lényeges biológiai jelentősége a perifériás kemoreceptorok működéséhez köthető, amennyiben bebizonyosodott, hogy az I. típusú receptorsejtek a TASK-csatornákat expresszálják, és az oxigén jelenléte (eddig nem pontosan tisztázott módon) képes a TASK-csatornák, így végsősoron a receptorsejtek működésének befolyásolására. A TASK-3 csatornák ezen túlmenően igen fontos szerepet tölthetnek be az aldoszteron szekréciójának szabályozásában is.

Az előzőekben felsorolt feladatok mellett a TASK-csatornák olyan sejtfolyamatok szabályozásában és/vagy lebonyolításában is részt vállalnak, amiket ezidáig nem volt szokás ioncsatornákkal és azok funkcióival összefüggésbe hozni. Kiderült, hogy a TASK-1 és a TASK-3 csatornák expressziója és funkciója fontos szerepet játszik az apoptózis indukciójában, ugyanakkor (némi ellentmondásosan) a TASK-3 csatornák génszintű amplifikációját mutatták ki egyes rosszindulatú, humán szövetekből (a colorectalis régió és emlő) kiinduló daganatokban.

További, kulcsfontosságú felismerésnek tűnik, hogy egerből származó fibroblasttenyészetben sikerült igazolni a funkcióképes TASK-3 csatorna sejtproliferációt fokozó hatását. A csatorna mesterséges overexpressziója kifejezetten tumorigén hatásnak bizonyult, amit (legalábbis részben) a kérdéses sejtek apoptózisának csökkentése okozott. Egyes szerzők azt is felvetették, hogy a TASK-3 csatornák expressziója valamilyen (eddig nem tisztázott) módon javítaná a sejtek hipoxiát tűró képességét, így javítaná a tumoros sejtek életfeltételeit, elősegítve ezáltal a daganatok növekedését. Fontos megjegyezni, hogy a fenti hatások kizárólag a funkcióképes TASK-3 csatornák megjelenéséhez köthetők. A TASK-3 csatorna egy mutáns változatát juttatva a sejtbe, ahol egy pontmutáció révén megszűnt a molekula K^+ iránti áteresztőképessége, a fenti tumorindukciós hatások nem alakultak ki. A funkcióképesség jelentőségét húzza alá az a felismerés is, hogy a TASK-3 csatornákat gátló anyag (pl. ruténiumvörös) jelenlétében az onkogén hatás megszűnik.

A fenti igen izgalmas (és rendkívül fontosnak tűnő) kísérleti adatok ellenére sajnálatosan kevés adat áll azonban rendelkezésre a TASK-csatornák pontos lokalizációjának és szöveti megoszlásának vonatkozásában. Még az állati szövetek tekintetében is csak hézagos információkkal rendelkezünk a TASK-3 csatornák szöveti disztribúciójára vonatkozólag, a humán szövetekre vonatkozó adatok pedig különösen hiányosnak mondhatók. A TASK-3 ellenes antitestek kereskedelmi forgalomban való megjelenésével ugyan remény van arra, hogy nagyobb mennyiségű kísérleti adat gyűljön össze, azonban továbbra is híján vagyunk azon tanulmányoknak, amik megkísérelnék a TASK-3 megoszlást feltérképezni egészséges és tumorosan elfajult szövetekben, megkísérelnék funkcionális jelentőséget társítani a TASK-3 csatornához az egyes szövetekben, kapcsolatot próbálnának meg leírni a különböző daganatok szövettani és klinikai jellegzetességei és a TASK-3 mintázatuk között, és (végül, de nem utolsó sorban) felvállalnák az antitestek tesztelésének és az optimális reakciókörülmények kidolgozásának fáradságos, ám nem különösebben izgalmas feladatát.

1.1.3. Egyes K^+ -csatornák jelentősége a rosszindulatú daganatok keletkezésében

A TASK-3 csatornák előbbieken már ismertetett, tumorgenezisben betöltött szerepe igen jelentős, ám nem teljesen egyedülálló. Számos olyan adat létezik, ami szerint a különböző (adott esetben feszültségvezérelt) K^+ -csatornák kitüntetett szereppel bírnak a sejtproliferáció és apoptózis szabályozásában és egyes rosszindulatú daganatok genézisében. Ismeretes, hogy bizonyos K^+ -csatornákat gátló szerek alkalmazásával gátlható a humán lymphocyták proliferációja; sőt egyes esetekben a K^+ -csatornák gátlásával sikerült lassítani a malignus daganatok növekedését (a rendelkezésre álló adatok melanoma malignumra, kissejtes tüdőrákra, egyes emlő- és prosztatarákokra vonatkoznak).

Továbbra sem világos azonban a K^+ -csatornák jelenlétének és aktivitásának pontos összefüggése a sejtapoptózis szabályozásával és a rosszindulatú daganatok indukciójával. Léteztek olyan elképzelések, amik szerint a K^+ -csatornák csupán közvetve, részben az aktivitásuk nyomán bekövetkező intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációváltozásokon keresztül, részben a csatornaaktiváció miatt kialakuló térfogatváltozások következtében befolyásolnák a sejtosztódást. Ezen vélemények ellen

szól viszont, hogy bizonyos K^+ -csatornák nyitása apoptózist indukál neocorticalis neuronokban, ami egyes K^+ -csatornákat gátló szerek jelenlétében kivédhető volt; a Ca^{2+} - és a Cl^- -csatornák működését befolyásoló hatóanyagok alkalmazásával ugyanakkor a sejtapoptózis nem volt befolyásolható.

1.2. A protein kináz C enzimek és funkcióik

1.2.1. A protein kináz C izoenzimek általános jellemzése

Míg a TASK-3 csatornák esetében a tumorigén, sejtapoptózist és differenciációt szabályozó, befolyásoló hatás egy viszonylag újkeletű felismerés, addig a protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád esetében ezek a funkciók már régóta ismertek. A PKC család a szerin/treonin kinázok egyik jelentős képviselője. A jelenleg ismert, legkevesebb 11 különböző PKC izoenzim négy nagyobb csoportba sorolható. A “klasszikus” csoport tagjainak (cPKC α , β_I , β_{II} és γ) aktiválásához Ca^{2+} és diacil-glicerol (DAG), esetleg az utóbbi exogén megfelelőjeként működő forbol-észter jelenléte szükséges. A nem Ca^{2+} -dependens, ún. “novel” PKC izoenzimek (nPKC δ , ϵ , η és θ) forbol-észterek vagy DAG hatására, kalcium hiányában is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba tartozó “atípusos” izoenzimek (aPKC; ζ és λ/ι) aktiválódásához sem a Ca^{2+} , sem a forbol-észterek jelenléte nem szükséges; a PKC μ pedig mind aktivációját, mind strukturális jegyeit tekintve rendhagyó izoformának tekinthető, így külön csoportba sorolandó.

A PKC izoformák aktiválódásának molekuláris történései során az aktivátor molekulák a regulátor doménhez kötődnek, majd az aktivált enzim valamilyen intracelluláris struktúrához (sejtmembrán, Golgi-komplex, maghártya, citoszkeletális komponensek) transzlokálódik. A folyamat végén a katalitikus domén foszforilálja az enzimekre specifikus szubsztrátot (pl. citoszkeletális fehérjék, ioncsatornák, receptorok, transzkripciós faktorok, kinázok, foszfatázok). Jelen tudásunk szerint a PKC aktiválását követően azért nem alakul ki tartós PKC aktivitás, mert az intracelluláris proteolitikus enzimek az aktivált PKC enzimet lebontják, ennél fogva inaktiválják azt.

Bár nincs olyan sejtípus a szervezetben, amely ne rendelkezne legalább egy PKC izoformával, általánosságban elmondható, hogy nem mindegyik izoenzim található

meg minden sejttípusban. A PKC izoenzimek a szervezetben az adott fajra, szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot hoznak létre. A PKC α , δ , ϵ és ζ előfordulása ubiquiternek tekinthető, ugyanakkor a PKC γ szinte kizárólag az agyban található meg. A PKC η leginkább keratinocytákban és T-sejtekben fordul elő, míg a PKC θ a harántcsíkolt izom legjellemzőbb izoenzimének tűnik.

A PKC enzimek az élettani folyamatok igen széles skáláját képesek befolyásolni. Ezek között (a teljesség igénye nélkül) kiemelhető a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, az apoptózisban, a mediátortermelésben, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában és a szervezet védekező mechanizmusaiban betöltött funkció.

Hosszú idő óta ismert, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különbözik egymástól. Ezen túlmenően, a különböző izoenzimek egy adott sejtválasz kialakításában nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétes. Mindezek alapján egyáltalán nem meglepő, hogy a különböző PKC izoformák expressziós mintázatának változásait összefüggésbe hozták a bőrsejtek, az emlő, az uterus és a prostata rosszindulatú daganatainak kialakulásával. A PKC izoenzimek lehetséges tumorigén szerepének igen értékes bizonyítéka, hogy egér és humán keratinocytákban a tumor-promóter forbol-észtereket bőrbe adagolva - előzetes iniciáció után - tumor hozható létre. A szerep komplexitását azonban mi sem tükrözi jobban, mint az a megfigyelés, miszerint a PMA előzetes iniciáció nélkül, *in vitro* a sejtproliferációt gátolja, csökkenti a korai, ugyanakkor növeli a késői differenciálódási markerek expresszióját, azaz a terminális differenciálódás felé irányítja a sejteket.

Amint az látható, a PKC izoenzimmintázat megváltozása komoly jelentőségű lehet az egyes rosszindulatú daganatok genesisében, ám a PKC izoenzimmintázat változásának természete és a tumoros elváltozás grádusával való kapcsolata továbbra sem tisztázott.

1.1.2. A PKC izoenzimok sokrétű szerepe proliferáció és differenciálódás szabályozásában

Az utóbbi évek vizsgálatai fényt derítettek arra, hogy a különböző sejtfolyamatokban több PKC izoenzimnek van/lehet szerepe; nem kivétel ez alól a sejtek proliferációs és differenciálódási programjának szabályozására kifejtett hatás sem. Bebizonyosodott, hogy az extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) növelésével az egyes sejtek differenciálódásra kényszeríthetők, és a folyamathoz elengedhetetlen volt a PKC aktiválódása. Jelen tudásunk szerint a folyamat szabályozásában a PKC α játszik meghatározó szerepet. A specifikus kísérletek arra is rámutattak, hogy a PKC δ és η izoformák overexpressziója a sejtek proliferációját gátolja, ugyanakkor differenciálódásukat indukálja; és ezzel összefüggésben (szemben például a PKC ϵ izoformával) egyes kísérletesen előidézett rosszindulatú daganatok növekedését csökkenteni képesek.

A cPKC α központi jelentőségének látszik a kalcium- és a konfluencia-indukálta terminális differenciálódási folyamatokban, ugyanis mind *in vitro*, mind *in vivo* stimulálja az apoptózist és a differenciálódást, ugyanakkor gátolja a sejtproliferációt. A cPKC β szerepe ellentétesnek tűnik (legalábbis keratinocytákban), mivel az ezen izoenzimtípust overexpresszáló sejtek proliferációja fokozódott, eközben gátolta az apoptotikus folyamatokat, azaz kifejezetten tumorigén hatásúnak bizonyult.

A nPKC ϵ számos sejt típus estében bizonyult a sejtproliferáció kulcsfontosságú pozitív regulátorának, és bebizonyosodott, hogy a nPKC ϵ overexpressziója patológias proliferációhoz (hyperproliferatív transzformációhoz) vezet, míg az enzim down-regulációja, illetve domináns negatív mutánsának overexpressziója a proliferáció gátlódását, valamint a differenciálódás indukcióját eredményezi. A nPKC δ a differenciálódás és az apoptózis pozitív regulátoraként működik, és ezzel párhuzamosan gátló hatást fejt ki a sejtproliferációra és a tumornövekedésre. Igen érdekes az a megfigyelés, miszerint a Ha-ras overexpresszió okozta malignus transzformáció során (azaz megnövekedett proliferációs kapacitás és lecsökkent differenciálódási tendencia érvényesülése esetén) a nPKC δ izoenzim eltűnik a sejtekből.

1.3. A munka célkitűzései

A jelen munka alapvető célkitűzése az volt, hogy az eddig tárgyalt két, potenciálisan tumorigén fehérjemolekula jelenlétét, megoszlását és jelentőségét tanulmányozzuk egészséges és tumorosan malformált humán szövetekben. A konkrét célkitűzések az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A kísérletek első lépésében egy újonnan kifejlesztett poliklonális anti-TASK-3 ellenanyag tesztelését kívántuk elvégezni. Különösen nagy figyelmet fordítottunk az antitest specificitásának ellenőrzésére, valamint formalinban fixált, beágyazott metszetek estében az optimális antigénfeltárási technika megtalálására és finomítására.
2. Az antitest optimális reakciókörülményeinek kidolgozása után a humán gastrointestinalis rendszerben kívántuk elvégezni a TASK-3 csatornák megoszlásának vizsgálatát. A gastrointestinalis rendszer azért szerepelt vizsgálataink első tárgyaként, mert a későbbiekben ellenőrizni kívánjuk az itt (sajnálatosan nagy számban és gyakorisággal) előforduló malignus daganatok TASK-3 expresszióját.
3. Meg kívántuk vizsgálni a pancreas TASK-3 expresszióját, ami különösen annak tükrében ígéretes izgalmas kérdésnek, hogy a TASK-3 csatornával viszonylag szoros rokonságban álló TASK-5 csatornákat kódoló mRNS-t nagy mennyiségben mutatták ki ezen struktúrából. Mivel a TASK-3 csatornák az extracellulris acidózis hatására záródnak, jelenlétük esetleg arra utalhatott, hogy szereppel bírnak a pancreas hormontermelő sejtjeinek szabályozásában.
4. Pozitív kísérleti adatok birtokában el kívántuk végezni a Langerhans-szigetek hormontermelő sejtjeinek TASK-3 expresszióját A- és B-sejtekre specifikus markerekkel történő kettős immunjelölés után is.
5. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a malignus daganatok mutatnak-e bármilyen említést érdemlő különbséget a TASK-3 immunjelölődési mintázatukat tekintve az ép szövetekhez képest. Nagy számú emlőtumor feldolgozása után korrelációt szerettünk volna találni a TASK-3 expressziója, valamint azok klinikai és szövettani viselkedése között.
6. Meg kívántuk vizsgálni, hogy van-e különbség a különböző módon eltávolított (core-biopszia, műtéti beavatkozás) szövetminták TASK-3 expressziójában (annak intenzitásában és/vagy megoszlásában).

7. Transitionalis sejtes húgyhólyagtumorok vizsgálatával meg szeretnénk volna vizsgálni a tumoros epithelium PKC izoenzimintázatát, annak változásait és az izoenzimintázat módosulását a tumor grádusának előrehaladásával.
8. Fel szeretnénk volna térképezni, hogy a PKC izoenzimek megoszlása jellemzi-e bármilyen módon a tumor grádusát, azaz szóba jöhet-e a PKC izoenzimek tumormarkerként való alkalmazása.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletek során felhasznált szövetminták (a cerebellum kivételével) műtéti preparátumból származtak, és intra- vagy posztoperatív diagnózis céljából kerültek kimetszésre. Az eltávolítást követően a szövetdarabokat fagyasztottuk vagy 4 %-os, puffereelt formalin alkalmazásával fixáltuk (24 h), majd parafinba ágyasztuk. Az emlőszövet egy részét core-biopsziás beavatkozással távolították el. A core-biopszia formájában nyert szövetminta a mintavételt követően azonnal fixáló oldatba (4 %-os formaldehid) került, szemben a műtéti anyagokkal, amik a fixálást megelőzően mintegy 20-30 percig fiziológiás sóoldatban álltak.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok 4 µm vastag szövettani metszeteken történtek, mind a fagyasztott, mind a beágyazott szövetblokkok alkalmazása esetén. A pozitív kontrollként alkalmazott kisagyi metszetek alkalmazásával határoztuk meg az optimális antigénfeltárás (AF) technikáját, és a többi szövet vizsgálata esetén ezt a technikát alkalmaztuk (amennyiben fagyasztott minta nem állt rendelkezésre). Ha fagyasztott mintán is volt lehetőség az immunreakció kivitelezésére, akkor annak eredményét mindig összehasonlítottuk az ugyanazon szövetblokkból készített, rutin szövettani feldolgozáson átesett (formalinos fixálás, beágyazás) szöveteken kapott eredményekkel, az AF adekvát voltának ellenőrzése végett.

Az ellenanyagok specificitásának ellenőrzésének céljából az immunreakciókat mindig két, a TASK-3 csatorna egymástól távol eső epitópja ellen irányuló elsődleges antitest alkalmazásával vizsgáltuk, és a kapott reakciókat összehasonlítottuk. Az antitestek specificitásának további ellenőrzését jelentette a rendszeresen kivitelezett preadszorpciós kontroll vizsgálatok alkalmazása, amik végén értékelhető immunjelölődést sohasem tapasztaltunk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat Western-blot kísérletekkel is kiegészítettük.

Az immunreakciókat DAB segítségével vizualizált egyszeres, vagy New Fuchsin és DAB kombinált alkalmazásával láthatóvá tett kettős immunjelöléssel végeztük. A vizsgálatokba a gastrointestinalis traktus különböző területeiről (glandula submandibularis, gyomor, colon, colon környéki nyirokcsomók, pancreas) eltávolított szövetmintákat, valamint olyan emlőtumороkat vontunk be, ahol mind a core-biopsziás anyag, mind a műtét során eltávolított szövetminta rendelkezésre állt.

A különböző gádusú húgyhólyagtumороk által expresszált PKC izoenzimintázat tanulmányozását a Western-blot technika segítségével végeztük.

Ezen vizsgálatok során mindösszesen 23 betegből (17 férfi és 6 nő) származó, transitionális sejtes húgyhólyagcarcinomát tartalmazó daganatszövetet alkalmaztunk. (A szövetdarabokat transurethralis resectio, részleges hólyagresectio vagy cystectomy alkalmazásával távolították el; a kontrollként alkalmazott szövetminták prostatectomia céljából végzett sebészi beavatkozásból származtak.) Az eltávolított szövetminák felét hisztopatológiai feldolgozásnak vetettük alá, a tumorok grádusának és a TNM-rendszer szerinti stádiumbeosztásának meghatározása céljából. Az szövetminták másik felét folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd kriomikrotóm segítségével a tumoros régiót a lamina propriaig lemetszettük, hogy a vizsgálatok során kizárólag az epithelialis struktúrák tanulmányozására kerüljön sor. A Western-blot eredményeket denzitometria alkalmazásával számszerűsítettük, ami lehetővé tette az egyes minták PKC izoenzimtartalmának meghatározását és az egyes csoportokban kapott eredmények összehasonlítását.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A TASK-3 csatornák megoszlásának immunhisztokémiai vizsgálata – az optimális reakciókörülmények kidolgozása

A TASK-3 csatornákat célzó kísérletek kezdetén elsőként a reakciókörülmények optimalizálását végeztük el, humán cerebelláris szövetmintát használva pozitív kontrollként. Az elsődleges antitest optimális hígításának meghatározásán kívül megállapítottuk, hogy a formalinban fixált, beágyazott metszeten végzett immunreakció kivitelezéséhez elengedhetetlenül szükséges a megfelelő AF technika alkalmazása. Nem megfelelően megválasztott antigénfeltárási technika vagy annak elmaradása esetén álnegatív reakciót tapasztaltunk. Megállapítottuk, hogy a jelen disszertáció további részében alkalmazott elsődleges antitestek akkor adják a legintenzívebb immunjelölést, ha a szövetmintákat enyhén savas vagy enyhén bázikus környezetben hő hatásának tettük ki.

3.2. A TASK-3 csatornák megoszlásának immunhisztokémiai vizsgálata a gastrointestinalis rendszerben

A humán gastrointestinalis rendszerből izolált szövetmintákban kivitelezett immunjelölődés vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vastagbél nyálkahártyája (és ezen belül az epithelialis sejtek) igen intenzív TASK-3 jelölődést mutattak. Ugyancsak erőteljes immunpozitivitást mutattak a vastagbél simaizomrétegében elhelyezkedő, a plexus myentericus Auerbachhoz tartozó neuronális elemek, miközben az ezen struktúrákat övező simaizomsejtek területén csak meglehetősen gyenge, döntően a sejtmag környezetére lokalizálódó festődést tapasztalhattunk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal egyidejűleg kivitelezett Western-blot kísérletek eredményei a fenti megfigyeléseket tökéletes összhangban álltak – ezek eredményeként intenzíven festődő, vastag immunopozitív csík megjelenését tapasztaltuk a vastagbél nyálkahártyájából nyert szöveti homogenizátum vizsgálatakor, ugyanakkor a simaizmot tartalmazó szövetminta ennél lényegesen gyengébb reakciót mutatott.

Ugyancsak intenzív jelölődést tapasztaltunk a gyomor nyálkahártyájának vizsgálata során, az immunreakció megoszlási mintázata és erőssége nyilvánvaló regionális különbségeket nem mutatott. Hasonlóan a vastagbélhez, a gyomor

simaizomrétege is gyenge TASK-3-specifikus reakciót mutatott, elsősorban a mag környezetére lokalizálódó immunjelöléssel. A gyomor és a vastagbél rosszindulatú daganataiban ugyancsak ki tudtuk mutatni a TASK-3 csatornafehérjék jelenlétét. Az immunjelölődés a daganatosan elfajult sejtek cytoplasmájában és a magban vagy annak környezetében volt a legintenzívebb. A fenti megállapításokat Western-blot kísérletekkel is megerősítettük.

Egyértelműen pozitív TASK-3 specifikus reakciót figyelhettünk még meg a glandula submandibularisban (ahol a ductalis epithelium mutatta a legerőteljesebb jelölődést), a gasztorintestinalis traktus környezetében elhelyezkedő nyirokcsomókban, valamint a pancreasban. Utóbbi struktúrában igen érdekes, klinikai szempontból feltétlenül figyelmet érdemlő megoszlási mintázatot tapasztaltunk. Bár a pancreas exocrin állománya (beleértve a ductalis epitheliumot) egyértelmű TASK-3 pozitivitást mutatott, a Langrehs-szigetekben elhelyezkedő endokrin sejtek immunreaktivitása messze fölülmulta azt. Kettős immunjelölés alkalmazásával azt is bebizonyítottuk, hogy a TASK-3 csatornák jelen vannak a Langerhans-szigetek A- és B-sejtjein egyaránt.

3.3. A TASK-3 csatornák megoszlásának immunhisztokémiai vizsgálata emlődaganatokban

Az ép szövetek vizsgálata mellett sor került a TASK-3 csatornák expressziójának vizsgálatára különböző emlődaganatokban is. A vizsgálatsorozatot olyan szövetmintákon végeztük, ahol mind a core-biopsziás, mind a műtéti beavatkozás során eltávolított vizsgálati anyag rendelkezésünkre állt. A vizsgálatsorozat ezen részét abban a reményben végeztük, hogy talán felfedhetünk valamilyen általános összefüggést az egyes emlődaganatok szövettani és klinikai viselkedése, receptormintázata, prognosztikai faktorai és TASK-3 jelölődése között.

Vizsgálatainkban megállapíthattuk, hogy a TASK-3 expresszió jelen van és kimutatható az emlőtumorokból nyert szöveti mintákban. A metszetekben a tumorsejtek, valamint az ép emlőszövet ductalis- és mirigyállománya egyaránt mutatott TASK-3 expressziót. Bár nem sikerült a remélt összefüggésre bukkanni a tumorgrádus és a TASK-3 expresszió között, igen érdekes különbséget fedeztünk fel a core-biopsziás és a műtéti beavatkozás közben eltávolított szövetminta TASK-3 jelölődésének megoszlásában. A core-biopsziás mintákban a TASK-3-jelölődés a tumorsejtek

cytoplasmájában volt a legkifejezettebb, ugyanakkor a magok túlnyomó többsége egyértelműen negatívnak mutatkozott; az ugyanazon betegből, ugyanazon régióból, de immár műtéti körülmények között eltávolított szövetmintán elvégezve az immunreakciót a cytoplasmaticus reakció továbbra is jól megfigyelhető volt ugyan, ám a sejtmagok is határozott és igen erős immunjelölődést mutattak.

A core-biopszia során és a műtétilag eltávolított szövetminta TASK-3 immunjelölődésében tapasztalt eltérést benignus elváltozások esetében is megfigyeltük. Az emlő ép mirigyállománya (függetlenül a szövetminta eltávolításának körülményeitől) erős TASK-3 pozitivitást mutatott (a festődés a secretoros granulomok belsejében is kimutatható volt), ám a magreakció a műtéti preparátumban mindig lényegesen kifejezettebbnek mutatkozott.

3.4. A PKC-izoemzimmintázat változása rosszindulatú húgyhólyagtumorokban

A húgyhólyagtumorokból izolált szövetminták Western-blot vizsgálata során megállapítottuk, hogy a hólyagepithelium öt PKC izoformát (cPKC α és β , nPKC δ és ϵ , továbbá az aPKC ζ) tartalmaz. A PKC enzimesalád többi tagját (cPKC γ , nPKC η és θ , aPKC λ/ι és μ) a szöveti homogenizátumban nem detektáltuk. Bár nem tapasztaltunk különbséget a PKC izoenzimek megoszlásában a tumoros és az egészséges minták között, azok mennyisége jelentős és statisztikailag is igazolható differenciát mutatott. A jelen munka különösen figyelemre méltó eredménye annak igazolása, hogy a humán húgyhólyag epithelialis rétegéből kiinduló rosszindulatú daganatok által expresszált PKC izoenzimek jelentős, a tumor grádusával összefüggő, mennyiségi változást mutatnak.

Megállapítottuk, hogy a G1 grádusú daganatokban csak a PKC ζ izoforma mennyisége növekedett szignifikáns mértékben, a többi izoenzim mennyisége változatlan maradt az egészséges szövetmintához képest. A G2 és a G3 grádusú tumorokban már valamennyi jelenlévő izoforma esetében tapasztalható volt valamilyen statisztikailag is igazolható mértékű változás. A G2 és a G3 grádusú mintákban cPKC β és a nPKC δ izoformák mennyisége jelentékeny csökkenést mutatott mind a kontroll, mind a G1 stádiumú daganatokhoz viszonyítva ($p < 0,05$). A G2 és a G3 stádium

összehasonlításakor szignifikáns különbség a fenti PKC izoenzimek esetében nem mutatkozott.

A további három PKC izoforma vizsgálata esetében valamennyi fennmaradó változat határozott és statisztikailag is igazolható növekedést mutatott a carcinoma előrehaladottságával. Szemben a cPKCa és az aPKC ζ izoformákkal, amelyek mennyisége fokozatosan növekedett a tumor grádusának előrehaladásával, a nPKC ϵ mennyisége ugyan szignifikánsan nagyobb volt a G2 és a G3 grádusú tumorok esetében, mint a kontroll és a G1 stádiumban lévő daganatokban, ám mennyiségük a G2 és a G3 stádium között már nem változott.

A fent részletezett kísérleti eredmények azt sugallják, hogy az egyes PKC izoformák ellentétes szereppel bírhatnak a tumorok kialakulásában. Érdekesnek tűnik az a megfigyelés, miszerint ez a fajta antagonizmus még az ugyanazon csoportba tartozó formák között is megfigyelhető; a „konvencionális” vagy Ca²⁺-függő csoportba tartozó PKC α és PKC β , valamint a „novel” típusú PKC δ és PKC ϵ mennyisége ellentétes irányú változást mutatott a tumor grádusának előrehaladásával. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a megfigyelt változások nem egyszerűen az egyes csoportok aktiválódási körülményeinek változásaival hozhatók összefüggésbe, hanem olyan eltérésekkel, amelyek képesek az egyes izoformák megjelenését szelektív módon befolyásolni.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. A TASK-3 csatornák megoszlásának immunhisztokémiai vizsgálata – reakciókörülmények és specificitás

A jelen munka keretében elvégeztük a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető humán TASK-3 specifikus ellenanyagok tesztelését, és az optimális reakciókörülmények kidolgozását. Részben fagyasztott, részben beágyazott szöveti preparátumok felhasználásával azt is megmutattuk, hogy a TASK-3 csatornák olyan szövetekben is nagy jelentőséggel bírhatnak, ahol eddig a TASK-3-specifikus mRNS-t csak viszonylag kis koncentrációban detektálták. Vizsgálataink egyértelműen rámutattak, hogy a TASK-3-csatornák jelen vannak a humán gastrointestinalis rendszerben, ahol elsősorban az epithelialis struktúrák és a neuronális elemek TASK-3 expressziója számottevő, bár más struktúrákban is megtalálhatók. Nem utolsó sorban arról is beszámolhattunk, hogy a TASK-3 specifikus immunjelölődés az emlőszövetben is megfigyelhető, és annak megoszlása nagy mértékben függ attól, hogy a preparátumot core-biopszia vagy műtéti beavatkozás keretében távolították el.

Mivel a TASK-3-specifikus ellenanyagok immár hozzáférhetőek a kereskedelmi forgalomban, a jelen disszertációban bemutatott és ehhez hasonló, a reakciókörülmények optimalizálását és az antitestek specificitását célzó vizsgálatok nagy gyakorlati jelentőségűek. A TASK-3 csatornák humán szövetekre kifejtett onkogén hatásának feltérképezéséhez nagy esetszám vizsgálatára van szükség, aminek elérése csak retrospektív tanulmányok végzésével, formalinnal fixált és beágyazott szövettani preparátumok alkalmazásával történhet. A formalinos fixálásnak azonban igen komoly hátrányát jelenti, hogy a fixáló hatóanyaga a fehérjeláncok különböző oldalláncai között metilénhidakat alakít ki. Ezen keresztkötések (amik a tulajdonképpeni fixációért felelősek) azonban nem pusztán stabilizálják és rögzítik a fehérjemolekulákat, hanem olyan jelentős mértékben megváltoztathatják struktúrájukat, hogy azok reakciókészsége a rájuk specifikus ellenanyagokkal számottevő mértékben csökkenhet (akár meg is szűnhet); gyenge vagy álnegatív immunjelölődést eredményezve. Ezen problémák orvoslása végett a mindennapi kórszövettani gyakorlatban rutinszerűen végzik a különböző antigénfeltárási technikákat, aminek során a pH jelentős megváltoztatásával, a hőmérséklet emelésével, valamilyen

proteolitikus enzim alkalmazásával, esetleg ezek kombinációjával történik a fixált fehérjemolekulák elfedett epitópjainak hozzáférhetővé tétele.

Különösen nagy figyelmet fordítottunk az elvégzett reakciók (azaz az alkalmazott elsődleges ellenanyagok) specificitásának megerősítésére. Mivel „knock-out” állat nem áll rendelkezésre a primer antitest minden kétséget kizáró specificitásának bizonyítására, a munkában két elsődleges antitestet használtunk, amik a csatornafehérje két különböző, egymástól igen messze található epitópja ellen irányultak. Az a megfigyelésünk, miszerint a két antitest alkalmazásával kivitelezett reakciók teljesen megegyező festődési mintázatot adtak, azokban csak intenzitásbeli különbség volt tapasztalható, arra utal, hogy ugyanazon fehérjemolekulák jelenlétét detektálták, hiszen annak elhanyagolhatóan csekély a valószínűsége, hogy a két különböző ellenanyag non-specifikus módon teljesen azonos struktúrákat ismerjen fel. További értékes bizonyítékot szolgáltatott az antitest specificitására a preadszorpciós kontroll vizsgálatok negativitása, és a Western-blot kísérletek eredménye.

4.2. A TASK-3 csatornák lehetséges fiziológiai szerepe a gastrointestinalis rendszerben

A jelen vizsgálatsorozat eredményeinek értelmezése és diszkussziója nem nélkülözheti az általunk leírt TASK-3 megoszlási mintázat esetleges funkcionális relevanciájának taglalását. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a vastagbél nyálkahártyájának K^+ -szekréciójában komoly jelentőséggel bírhatnak a TASK-3 csatornák. Hasonlóan a vastagbélhez, a gyomorszekréció és a pancreas exocrin működésének is alapvető eleme lehet a TASK-csatornákon keresztül megvalósuló K^+ mozgás. Különösen kecsegtetőnek tűnik ez a feltételezés, annak tudatában, hogy az ún. Cl^- -ot szekretáló epitheliumokban (amilyen a pancreas is) a K^+ -csatornák jelenléte és aktivitása elengedhetetlen a Cl^- transzportjához, ugyanis a K -ionok mozgása biztosítja az anionok transzportjához szükséges hajtóerőt. A folyamatban egyes Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák jelentőségét már korábban leírták, de a jelen disszertációban részletezett megfigyelések arra utalnak, hogy a TASK-3 csatornák is szereppel bírhatnak a pancreas ductalis rendszerének Cl^- -szekréciójában.

Vizsgálataink egyik legérdekesebbnek tűnő eredménye, hogy az inzuláris sejtek jelentékeny TASK-3 expressziót mutatnak, azaz komoly jelentőségük lehet az iznulin-és/vagy glukagonszekréció szabályozásában. Ezen hipotézist közvetett bizonyítékként

megemlíthető az a hosszú ideje ismert, ám mindmáig megmagyarázatlan megfigyelés, miszerint az extracelluláris pH változásai hatást gyakorolnak a B-sejtek inzuliszekréciónak. Mivel a TASK-csatornák az extracelluláris pH savas irányba történő módosulása következményeként záródnak, hozzájárulhatnak a B-sejtek depolarizációjához, így jelentőségük lehet az acidosis következményeként jelentkező inzuliszekréciónak-fokozódás kialakulásában.

A fentiekben részletezett megfigyelések komoly klinikai jelentőséggel bírhatnak, ugyanis a TASK-3 csatornák onkogén potenciáljából kiindulva felmerült, hogy az ezen csatornákat gátló anyagok – egyebek között a ruténium-vörös – daganatellenes szerként megjelenhetnek majd a rosszindulatú tumorok terápiájában. A disszertációban részletezett megfigyelések alapján azonban úgy tűnik, hogy ezen szerek alkalmazása során igen komoly, ezidáig nem mérlegelt mellékhatások jelentkezhetnek a TASK-3 csatornák működését és/vagy expresszióját gátló anyagok alkalmazásakor, amik számottevő mértékben befolyásolhatják a gastrointestinalis rendszer működését és a pancreas hormontermelésének szabályozását.

4.3. A TASK-3 csatornák jelentősége rosszindulatú daganatokban – nem mindegy hogy core-biopszia vagy műtéti anyag?

A jelen disszertációban részletezett kísérletekben - összhangban más szerzők adataival - azt tapasztaltuk, hogy a TASK-3 csatornák jelen vannak tumoros szövetekben is. Megállapítottuk, hogy a core-biopsziák formájában nyert szövetmintákban a TASK-3 jelölődés döntően cytoplasmaticus, a magot legnagyobb részben megkíméli. Az intracelluláris lokalizáció arra utal, hogy ezek a csatornák nagy mennyiségben vannak jelen az endoplasmaticus reticulum területén. Ez a jelenség igen hasonló ahhoz, amit TASK-1 csatornákat overexpresszáló, transzfektált COS-sejtekben, valamint tenyésztett astrocyták esetében a TASK-1, TASK-2 és TASK-3 csatornák kapcsán korábban leírtak. Igen figyelemre méltónak ítéljük, hogy a TASK-3 jelölődés nagyon gyakran kifejezett perinuclearis rajzolatot mutatott, ami arra utalhat, hogy a csatornák megtalálhatók a perinuclearis cisternákban, esetleg azok részét képezhetik. Továbbra sem világos azonban ezen csatornák funkciója az intracelluláris membránokban. Felmerül, hogy egy könnyen hozzáférhető és gyorsan mobilizálható „tartályt” jelentenek az itt elhelyezkedő TASK-3 csatornák, amiket a sejt szükség esetén igen gyorsan tud rendeltetési helyükre szállítani. Az sem kizárható azonban,

hogy már kifejezett funkcióval bírnak az endoplasmaticus reticulumban is, egyebek között biztosíthatják a Ca^{2+} -kiáramlás kompenzálását szolgáló K^{+} -diffúziót.

Szemben a core-biopsziákkal, a műtéti beavatkozás során eltávolított szövetmintákban a TASK-3 immunjelölődés nem kizárólag a cytoplasmára és intracelluláris membránokra korlátozódott, hanem igen jelentékeny festődést tapasztaltunk a sejtmagok területén is. Nem világos azonban, hogy a megfigyelt jelölődés valóban a magban van, vagy csupán a magot övező sejtmaghártya intenzív jelölődéséről van szó, esetleg az immunreakció a perinuclearisan elhelyezkedő endoplasmaticus reticulum cysternáira korlátozódik. Mivel mind a vizsgált szövet minősége, mind az immunjelölés kivitelezése teljesen azonos a core-biopszia és a műtéti beavatkozás alatt eltávolított szövetmintákban, a jelenség magyarázatára legkézenfekvőbbnek tűnő metodikai problémák/különbségek/hibák kizárhatók. Fontos azonban megjegyezni, hogy jelentős különbség van a szövetminta kezelésében a core-biopsziás és a műtéti anyag között; a core-biopszia során a beteget nem altatják, és az eltávolított szövetminta azonnal a fixáló oldatba kerül. Ezzel szemben a műtét természetesen általános narkózisban történik, és a kivett szövetminta csak némi idő (esetenként 20-30 perc) elteltével kerül formalinba, addig fiziológias sóoldatban áll. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a csatornák esetleg a szöveti hipoxia vagy acidosis (esetleg az ezen tényezők következményeként felszabaduló szöveti faktorok) következményeként kerülnek át a sejtmag környékére a hipoxiára adott sejtválasz részeként. Ez a megfigyelés azért különösen érdekes, mert a TASK-3 csatornák egyik lehetséges funkciójaként felvetették, hogy jelenlétük és aktivitásuk javítaná a sejtek hipoxiatűrő képességét.

4.4. A PKC-izoenzimintázat és a rosszindulatú húgyhólyagtumorok kapcsolata

A jelen munka egyik kiemelkedően fontos eredménye, annak igazolása volt, hogy a humán húgyhólyag epithelialis rétegéből kiinduló rosszindulatú daganatok által expresszált PKC izoenzimek jelentős, a tumor grádusával összefüggő, mennyiségi változást mutatnak. A megfigyelések arra utalnak, hogy (hasonlóan más szövetekhez) a PKC izoenzimek központi szerepet játszhatnak a húgyhólyag epitheliumának daganatos elváltozásaiban is. A kísérleti eredmények azt is sugallják, hogy az egyes PKC izoformák ellentétes szereppel bírhatnak a tumorok kialakulásában. Érdekesnek tűnik

az a megfigyelés, miszerint ez a fajta antagonizmus még az ugyanazon csoportba tartozó formák között is megfigyelhető, ami arra utal, hogy a jelen disszertációban leírt változások nem egyszerűen az egyes csoportok aktiválódási körülményeinek módosulásával hozhatók összefüggésbe, hanem olyan eltérésekkel is, amelyek képesek az egyes izoformák megjelenését szelektív módon befolyásolni.

Kísérleteink nyomán nem elképzelhetetlen, hogy ha az itt bemutatott tendenciákat sikerül megerősíteni, és még a jelenleginél is nagyobb esetszám felhasználásával tovább finomítani, akkor komoly esélye lehet annak, hogy a PKC izoenzimintázat vizsgálatával további adatokat nyerhetünk a daganatok progressziójára (esetlegesen prognózisukra) vonatkozólag. Ezen túlmenően igen lényeges lesz annak tisztázása, hogy ok avagy okozat-e a PKC izoenzimintázat módosulása a rosszindulatú elváltozások kialakulása során.

4.5. Befejezésül...

A jelen tézisekben két olyan molekula megoszlását, és lehetséges kapcsolatát tanulmányoztuk egyes humán rosszindulatú daganatok keletkezésében, amik kifejezetten ubiquiternek tekinthetők, szerteágazó fiziológiás és patológiás funkciókkal rendelkeznek. A vizsgált molekulák egyértelműen jelen vannak az ép szövetekben is, így onkogén potenciáljuk nem pusztán jelenlétükből, hanem megoszlásuk és funkcióik megváltozásából fakad(hat). A jelen disszertáció eredményei rámutattak, hogy egyes PKC izoenzim típusok mennyisége nő, másoké csökken a rosszindulatúan elfajult sejtekben, ami reményt jelenthet arra, hogy egyes pontosan irányított és izoenzim-specifikus PKC agonisták és/vagy antagonisták hatással lehetnek a tumor növekedésére, esetleg hozzásegíthetnek azok regressziójához. A TASK-csatornákkal kapcsolatos vizsgálataink azonban azt is jelzik, hogy (bár a TASK-csatornák onkogén potenciálja manapság széles körben elfogadott) ez a molekula az ép szövetekben is jelen van, és a funkcióját gátló anyagok (amiket sok szerző tekint reménybeli daganatellenes szernek) komoly zavarokat okozhatnak a szervezet fiziológiás működésében. Mindezek alapján eredményeink azt a meglehetősen pesszimistának tűnő, ám sajnos inkább realista megállapítást erősítik meg, hogy igen szívós és kitartó munkára van ahhoz szükség, hogy akár egy parányi lépést is tehessünk a rosszindulatú tumorok megelőzésében hatásos, valamint a kifejlődött daganatokra ható, ugyanakkor az ép szövetek funkcióit csak kevésbé befolyásoló szerek fejlesztése felé.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

In extenso közlemények

Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Szűcs G., Nemes Z., Rusznák Z. (2005) TASK-3 immunoreactivity is present but shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchow's Archive*, In The Press, Manuscript No. VA-04-0344.R1 **(IF:2.357)**

Varga A., Czifra G., Tállai B., Németh T., Kovács I., Kovács L., Bíró T. (2004) Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. *European Urology* 46: 462-465. **(IF: 2.247)**

Előadások és poszterek

Pocsai K., Pór Á., Pál B., Kovács I., Szűcs G., Rusznák Z.: TASK-1 distribution in the auditory system and cerebellum. IBRO 2004 International Workshop on neuronal circuits: from elementary to complex functions, Budapest, 2004.

Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Pál B., Szűcs G.: TASK-csatornák jelenlétének és megoszlásának vizsgálata patkány központi idegrendszerében és humán cerebellumban. MÉT LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004.

Pocsai K., Kovács I., Sarkadi L., Szűcs G., Rusznák Z.: TASK-csatornák megoszlásának vizsgálata humán fiziologiás és pathologiás szövetmintákban. MÉT LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004.

Kovács I., Sarkadi L., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z.: TASK-csatornák expressiojának vizsgálata humán szöveteken. 63. Pathologus Kongresszus, Siófok-Balatonszéplak, 2004.

Rusznák Z., Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Nemes Z., Szűcs G.: Distribution of TASK-3 channels in healthy and pathological human tissue samples. Submitted for the XXXV International Congress of Physiological Sciences (IUPS), San Diego, USA, 2005.

A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke

In extenso közlemények

Pál B., Pór Á., Szűcs G., Kovács I., Rusznák Z. (2003) HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 2189-2199
(IF: 4.995)

Szabó Zs., Harasztosi Cs., Kovács I., Szűcs G., Rusznák Z., Sziklai I. (2003) Tengerimalacból izolált I. típusú ganglion spirale neuron depolarizációja által aktivált K⁺ áramok jellemzése. *Fül-, Orr-, Gégegyógyászat (Otorhinolaryngologia Hungarica)*, 49: 114-123

Bíró T., Griger Z., Kiss E., Papp H., Alexa M., Kovács I., Zeher M., Bodolay E., Csépany T., Szűcs K., Gergely P., Kovács L., Szegedi Gy., Sipka S. (2004) Abnormal cell-specific expression of certain protein kinase C isoenzymes in peripheral mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: effect of corticosteroid application. *Scand. J. Immunol.*, 60: 421-428 **(IF: 1.942)**

Bodó E., Kovács I., Telek A., Varga A., Paus R., Kovács L., Bíró T. (2004) Vanilloid receptor-1 (VR1) is widely expressed on various epithelial and mesenchymal cell types of human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 123: 410-413 **(IF: 4.194)**

Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Bíró T., Szűcs G., (2004) Differential distribution of TASK-1, TASK-2, and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1532-1542 **(IF: 4.995)**

Papp H., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Alexa M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2004) Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1095-1105 **(IF: 4.995)**

Idézhető kivonatok

Molnár I., Kaczur V., Kovács I., Balázs Cs. (1994) IgA antibodies against human eye muscle tissue in Graves' disease. *Period Biol.*, 96: 269.

Kovács I., Kaczur V., Krajczár G., Nemes Z. (1996) Dynamic functional properties of antigen presenting cells in reactive lymph nodes. *Pathology International*, 46: 480.

Előadások és poszterek

Kovács I.: Portobiliaris fistula okozta haemobilia. Pathologus Kongresszus, Pécs, 1992.

Kiszely P., Kovács I.: A Minőségbiztosítás bevezetése során szerzett tapasztalatok a nőgyógyászati cytológiában. Pathologus Kongresszus, Eger, 2000.

Kiszely P., Kovács I., Krajczár G.: A minőségbiztosítás bevezetése során szerzett tapasztalatok a nőgyógyászati cytológiában. A Magyar Nőorvos Társaság Cervixpathologiai Szekciójában XV. Kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2000.

Kiszely P., Kovács I., Sarkadi L.: Az AGUS mint diagnosztikus csapda/nehézség terhesek nőgyógyászati keneteinek értékelésében. Cytologus Kongresszus, Budapest, 2001.

Kovács I., Kiszely P.: A méhnyak glassy cell carcinomájának diagnosztikus nehézségei egy eset kapcsán. Cytologus Kongresszus, Budapest, 2001.

Kovács I., Kaczur V., Darvas Zs., Falus A., Nemes Z.: Histidine decarboxylase expressiója humán szöveteken, immunhisztokémiai tanulmány. Magyar Pathologus Társaság 60. Kongresszusa, Kaposvár, 2001.

Kovács I., Koncz A.: Tallózás érdekes eseteinkből. Magyar Tüdőgyógyász Társaság Tüdőcytologiai Sectiojának Tudományos Ülése. Pécs, 2001.

Sarkadi L., Kovács I., Kiszely P., Nemes Z.: Hodgkin-kór és a pajzsmirigy papilláris carcinomájának egyidejű előfordulása, esetbemutatás. Magyar Pathologus Társaság 60. Kongresszusa, Kaposvár, 2001.

Kiszely P., Kovács I.: Terhesek nőgyógyászati keneteinek diagnosztikus csapdáiról néhány eset kapcsán. Magyar Pathologus Társaság 60. Kongresszusa, Kaposvár, 2001.

Lengyel A., Kovács I., Nemes Z.: Az uterus adenomatoid tumora. Magyar Pathologus Társaság 60. Kongresszusa, Kaposvár, 2001.

Korcsmáros A., Kovács I., Szathmári E.: A módosított Marsh-féle osztályozással nyert tapasztalatok a coeliakia diagnózisában és kezelésében. Magyar Pathologus Társaság 60. Kongresszusa, Kaposvár, 2001.

Molnár I., Szombathy Z., Kovács I., Szentmiklósi J.: Detection of deiodinase in human thyroid and skeletal muscle tissues using sera of guinea pigs immunized against peptide corresponding to human Type 2 5-deiodinase. 73rd Annual Meeting of the American Thyroid Association, Washington DC, USA, 2001.

Kovács I.: Cytologiai diagnosztika a Debreceni Kenézy Gyula Kórházban. MPT Cytodiagnosztikai Szekciójának II. Kongresszusa, Budapest, 2002.

Nemes Z., Kovács I.: Acut leukémiához társuló plasmacytoid sejtes nyirokcsomó-tumor. Magyar Pathologus Társaság 61. Kongresszusa, Győr, 2002.

Kovács I., Nemes Z.: Blastos NK sejtes lymphoma diagnosztikai jellegzetességei. Magyar Pathologus Társaság 61. Kongresszusa, Győr, 2002.

Chalupa I., Horváth T., Károlyi E., Kovács I.: Az oestrogen receptor expressio kimutatásának tapasztalatai keneteken. Pathologus Asszisztensek Magyarországi Egyesületének I. Országos Kongresszusa, Balatonaliga, 2002.

Kovács I.: p16 INK4A expressiójának vizsgálata hagyományos nőgyógyászati keneteken. MPT Cytodiagnosztikai Szekciójának III. Kongresszusa, Pécs, 2003.

Kovács I.: Az aspiratio cytologia nyújtotta lehetőségek a mindennapi diagnosztikában, Országos Boncmesteri és Asszisztensi Továbbképzés, Berettyóújfalu, 2003.

Kovács I.: Jakabné Dobi E.: p16INK4A kimutatásának jelentősége ASCUS esetében. MPT Cytodiagnosztikai Szekciójának IV. Kongresszusa, Miskolc, 2004.

Pozsgai K., Lenkei Zs., Medgyessy É., Zima I., Kovács I.: Az acetontmentes szövétvíztelenítéssel szerzett tapasztalataink. Pathologus Asszisztensek Magyarországi Egyesületének I. Országos Kongresszusa, Balatonaliga, 2002.

Kovács I., Horváth T., Károlyi E., Pásti M., Szegedi H., Chalupa I.: A kvantitatív immuncytokémiai vizsgálatok nehézségei. Cytologus Kongresszus, Budapest, 2002.

Lengyel A., Kovács I., Nemes Z.: Glomangiosarcoma - Atypusos ossificáló fibromyxoid tumor. Magyar Pathologus Társaság 61. Kongresszusa, Győr, 2002.

Török M., Kovács I.: A p63 immunhisztokémiai marker alkalmazhatósága prostata core biopsián és transurethralis resecatumon. 62. Pathologus Kongresszus, Budapest, 2003.

Pocsai K., Pór Á., Pál B., Kovács I., Szűcs G., Rusznák Z.: TASK-1 distribution in the auditory system and cerebellum. IBRO 2004 International Workshop on neuronal circuits: from elementary to complex functions, Budapest, 2004.