

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



Dr. Kovács Ilona

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

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



Dr. Kovács Ilona

Témavezető: Dr. Nemes Zoltán

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

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
1.1. K ⁺ -CSATORNÁK ÉS JELENTŐSÉGÜK A SEJTEK MŰKÖDÉSBE – AMIRŐL A MIKROELEKTRÓDÁK NEM BESZÉLNEK.....	5
1.1.1. A „KLASSZIKUS” K ⁺ -CSATORNÁK MOLEKULÁRIS SZERKEZETE ÉS CSOPORTOSÍTÁSA	5
1.1.2. AZ IKERPÓRUSÚ K ⁺ -CSATORNÁK – EGY DOGMA HALÁLA	7
1.1.3. A TASK-CSALÁD JELLEMZŐI.....	10
1.1.4. EGYES K ⁺ -CSATORNÁK JELENTŐSÉGE A ROSSZINDULATÚ DAGANATOK KELETKEZÉSÉBEN	14
1.2. A PROTEIN KINÁZ C IZOENZIMEK.....	15
1.2.1. A PROTEIN KINÁZ C IZOENZIMEK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	15
1.2.2. A PKC ÉS A KERATINOCYTÁK – AZ IZOENZIMEK SOKRÉTÚ BIOLÓGIAI SZEREPE A PROLIFERÁCIÓ ÉS DIFFERENCIÁLÓDÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN	17
1.2.3. AZ EGYES PKC IZOENZIMEK AKTIVITÁSÁNAK HATÁSA A SEJTEK PROLIFERÁCIÓJÁRA, DIFFERENCIÁLÓDÁSÁRA ÉS A TUMORGENEZISRE	19
1.3 A MUNKA CÉLKITŰZÉSEI.....	20
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
2.1. A SZÖVETMINTÁK ÉS FELDOLGOZÁSUK	22
2.2. IMMUNHISZTOKÉMIA	23
2.3. WESTERN-BLOT TECHNIKA – TASK-CSATORNÁK.....	25
2.4. WESTERN-BLOT TECHNIKA – HÚGYHÓLYAGTUMOROK	26
3. EREDMÉNYEK.....	28
3.1. A TASK-3 CSATORNÁK MEGOSZLÁSÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA – AZ OPTIMÁLIS REAKCIÓKÖRÜLMÉNYEK KIDOLGOZÁSA	28
3.2. A TASK-3 CSATORNÁK MEGOSZLÁSÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA A GASTROINTESTINALIS RENDSZERBEN	30
3.3. A TASK-3 CSATORNÁK MEGOSZLÁSÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA EMLŐDAGANATOKBAN	37
3.4. A PKC-IZOENZIMMINTÁZAT VÁLTOZÁSA ROSSZINDULATÚ HÚGYHÓLYAGTUMOROKBAN	41
4. MEGBESZÉLÉS	43
4.1. A TASK-3 CSATORNÁK MEGOSZLÁSÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA – REAKCIÓKÖRÜLMÉNYEK ÉS SPECIFICITÁS.....	43
4.2. A TASK-3 CSATORNÁK LEHETSÉGES FIZIOLÓGIAI SZEREPE A GASTROINTESTINALIS RENDSZERBEN	47
4.3. A TASK-3 CSATORNÁK JELENTŐSÉGE ROSSZINDULATÚ DAGANATOKBAN – NEM MINDEGY HOGY CORE-BIOPSZIA VAGY MŰTÉTI ANYAG?	49
4.4. A PKC-IZOENZIMMINTÁZAT ÉS A ROSSZINDULATÚ HÚGYHÓLYAGTUMOROK KAPCSOLATA	51
4.5. BEFEJEZÉSÜL.....	53
6. A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	54

ÖSSZEFOGLALÁS	63
SUMMARY.....	64
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	65
A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE.....	66
A TÉZISEKBEN FEL NEM HASZNÁLT TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE	67

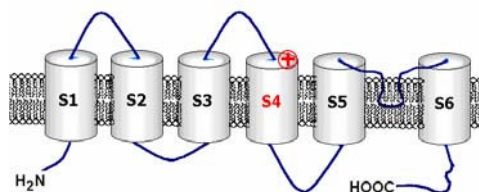
1. BEVEZETÉS

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 fiziológias folyamataiban, de jelentőségüket kimutatták egyes patológias elváltozások genezisében is. A K^+ -csatornák igen heterogén funkcióinak magyarázata az ehhez a csoporthoz tartozó molekulák 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 (*Rudy, 1988; Coetzee és munkatársai, 1999*).

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 (*Catterall és munkatársai, 1993; 1. ábra*).



1. ábra

A feszültségvezérelt K^+ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

Az ábra részleteivel kapcsolatosan lásd a szöveget.

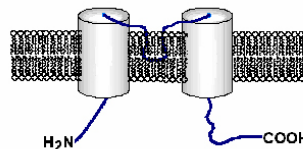
A 4. pozícióban található domén (S4) jelentőségét az adja, hogy itt számos pozitív töltéssel rendelkező aminosav található, így ez a szakasz képezi a csatorna feszültségszenzorát. Említést érdemel még, hogy az S5 és az S6 transzmembrán régiók közötti hurok (H₅- vagy P-régió) mélyen benyúlik a sejtfelszíni membránba. A funkcióképes K⁺-csatornákat felépítő négy alegység ezen hurkot formáló régiói egymás felé tekintenek, így hozva létre a K⁺-permeábilis pórust. A jellegzetes molekuláris struktúrából fakadóan a Kv osztályba sorolható K⁺-csatornákat 6TM-P csatornák néven is említi az irodalom, utalva az egyes alegységek hat transzmembrán szakaszára és a pórusformáló hurokra.

A feszültségvezérelt K⁺-csatornák igen sokrétű funkcióval rendelkeznek, de általánosságban elmondható, hogy többnyire az akciós potenciálokat követő repolarizáció és utóhiperpolarizáció kialakításáért, valamint egyes típusaik az akciós potenciálok késleltetéséért, esetleg azok kialakulásának megakadályozásáért felelősek. A Kv-csatornák heterogenitásának hátterében az áll, hogy az egyes csatornaalegységek több alcsoportba oszthatók, és az alcsoportokon belül számos változat található, amelyek kombinációjával egészen eltérő funkcionális sajátságokkal felruházott K⁺-csatornák jöhetnek létre.

1949-óta ismert (*Katz, 1949*), 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 Katz által elsőként megfigyelt, hyperpolarizáció hatására aktiválódó csatornák két nagy csoportba oszthatók, amennyiben megkülönböztethetők a „klasszikus” befelé egyenirányító (inward rectifier) K⁺-csatornák (ezek aktivitására figyelt fel elsőként Katz) és a hyperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationcsatornák. Utóbbi csatornaféleség tárgyalása nem célja a jelen disszertációnak, ám mindenképpen említésre érdemes, hogy ezek az ioncsatornák felelősek a szív ingerképzéséért (*Brown és munkatársai, 1979; Brown és DiFrancesco, 1980*), de jelenlétük és aktivitásuk különböző neuronok esetében is bizonyított, igen szerteágazó funkciókkal (*Banks és munkatársai, 1993; Cuttle és munkatársai, 2001*).

Hasonlóan a Kv-család tagjaihoz, a befelé egyenirányító K⁺-csatornák (Kir) is négy alegység összeszerelődése következtében jönnek létre (*Douplnik és munkatársai, 1995*). Az alegységek tulajdonképpen egy „lecsupaszított” Kv-alegységnek felelnek meg, ugyanis a Kv-alegységek karboxi-terminálisán található két utolsó (azaz az 5. és 6.) transzmembrán szakaszát és a köztük elhelyezkedő pórusformáló hurkot

tartalmazzák (*Kubo és munkatársai, 1993; 2. ábra*). Az alegységek ezen jellegzetességei miatt az ilyen csatornákat gyakran 2TM-P csatornákként említi az irodalom. Mivel a befelé egyenirányító K^+ -csatornák kifelé irányuló K^+ -áram vezetésére is képesek, aktivitásuk hozzájárulhat a nyugalmi membránpotenciál kialakulásához (bár önmagukban nem elégségesek annak létrehozásához; *Stanfield, 1988*); ugyanakkor (mivel erősebb depolarizáció hatására záródnak) nem szegülnek szembe a depolarizáló hatásokkal, energetikailag kedvezőbb helyzetet teremtve az akciós potenciálok kialakulásához. Az is felmerült, hogy a befelé egyenirányító K^+ -csatornák biztosíthatják a harántcsikolt izom aktivitásának következményeként a transversalis tubulusokban felhalmozódott K^+ sejtbe jutását (lásd *Adrian, 1969; Hille és Schwarz, 1978; Hagiwara és Jaffe, 1979*).



2. ábra

A befelé egyenirányító K^+ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

Az ábra részleteivel kapcsolatosan lásd a szöveget.

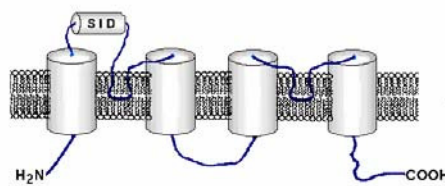
1.1.2. Az ikerpórusú K^+ -csatornák – egy dogma halála

Régóta ismeretes, hogy az élő sejtek intra- és extracelluláris tere között potenciálkülönbség mérhető, aminek értéke a vizsgált sejt típusától függően viszonylag tág határok között változik (ám az intracelluláris tér mindig negatívabb a környezeténél). A membránpotenciál aktuális értékének számítására a Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) egyenlet alkalmazható:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{p_{K^+} [K^+]_E + p_{Na^+} [Na^+]_E + p_{Cl^-} [Cl^-]_I}{p_{K^+} [K^+]_I + p_{Na^+} [Na^+]_I + p_{Cl^-} [Cl^-]_E}, \quad (1)$$

ahol E a számított membránpotenciál, R az univerzális gázállandó, T a hőmérséklet Kelvinben kifejezett értéke, F a Faraday-állandó, p az egyes ionok permeabilitása, $[X]_E$ és $[X]_I$ az adott ion extra- és az intracelluláris koncentrációja. Az egyenlet egyik igen lényeges üzenete, hogy a sejtek nyugalmi membránpotenciálja azért alakul ki, mert a sejt felszíni membrán K^+ -ra vonatkozó permeabilitása igen jelentős. Annak ellenére,

hogy már az 1940-es éve óta ismert volt mind a GHK-egyenlet, mind a nagy K^+ -permeabilitás jelentősége a nyugalmi membránpotenciál kialakulásában, az azért felelős ioncsatornák azonosítására csaknem az ezredfordulóig kellett várni. *Ketchum és munkatársai* 1995-ben számoltak be arról, hogy egy, az addig ismert K^+ -csatornáktól teljesen különböző K^+ -permeabilis molekulát találtak, ami molekuláris szerkezetében, viselkedésében és funkcióiban is teljesen eltért attól, amit a K^+ -csatornák struktúrája vontakozásában már-már dogma szerűen rögzült a tudományos gondolkodásban (3. ábra).



3. ábra
Az ikerpórusú K^+ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

Az ábra részleteivel kapcsolatosan lásd a szöveget.

Ezen új típusú K^+ -csatornák esetében a funkcióképes molekulát felépítő alegységek négy transzmembrán szakaszt tartalmaznak, és az alegységek mindegyikében két olyan hurok azonosítható, ami szerepet játszik a pórus kialakításában. Ezek a pórusformáló hurkok az alegységen belül egymás után („tandem” elrendezésben) helyezkednek el. Szemben az eddig ismert K^+ -csatornákkal, ahol a működőképes struktúra kialakulása négy egyedi alegység összeszerelődését követelte meg, ezen új típusú csatornák esetében az alegységek dimerizációja következik be, amihez az 1. és a 2. transzmembrán szegmens között található, 44 aminosavat tartalmazó, α -helikális struktúrát mutató szakasz, az ún. „self-interacting domain” (SID) épsége szükséges (*Lesage és munkatársai, 1996*). A SID-en belül kiemelkedő jelentőségűnek tűnik a 69-es pozícióban található cisztein, mivel a két szembenálló cisztein között kialakuló diszulfid-kötés stabilizálja a kész csatornát. Tekintve, hogy a dimerizációban részt vállaló két alegység mindegyike két pórusformáló hurkot tartalmaz, a csatornafehérje összeszerelődése után a kész pórusban ugyanúgy négy hurok található, mint a K_v - és a K_{ir} -struktúrák esetében.

A jellegzetes molekuláris szerkezet alapján az itt vázolt főcsoportba tartozó csatornákat 4TM-PP csatornákként jelöli az irodalom, bár az „ikerpórusú K^+ -csatorna”

elnevezés is létjogosultságot nyert. (Meg kell azonban jegyezni, hogy a funkcióképes csatorna valószínűleg nem rendelkezik két független K^+ -permeábilis pórusal, pusztán a pórust formáló aminosavszekvenciából rendelkezik kettővel, amik azonban egyetlen pórus kialakításában vesznek részt.)

A további vizsgálatok rámutattak, hogy ennek a csatornacsaládnak számos reprezentánsa van, melyek több-kevesebb szekvenciahomológiát mutatnak. Az elsőként leírt osztály a TWIK-csatornák (*Lesage és munkatársai, 1996; Chavez és munkatársai, 1999*) csoportja volt (Tandem of pore domains in weak inward rectifier K⁺ channels), és valamennyi később felfedezett csatorna ezen családról kapta a nevét. A jelenleg ismert további ikerpórusú K^+ -csatornaosztályok az alábbiak:

- TREK: TWIK-related K⁺ channel (*Fink és munkatársai, 1996; Patel és munkatársai, 1998; Patel és munkatársai, 2000; Bang és munkatársai, 2000; Lesage és munkatársai, 2000*)
- TRAAK: TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺ channel (*Fink és munkatársai, 1998*)
- TASK: TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel (*Duprat és munkatársai, 1997; Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kim és munkatársai, 1999; Kim és munkatársai, 2000; Rajan és munkatársai, 2000; Kim és Gnatenco, 2001; Ashmole és munkatársai, 2001*)
- TALK: TWIK-related alkaline pH activated K⁺ channel (*Girard és munkatársai, 2001; Decher és munkatársai, 2001*)
- THIK: TWIK-related halothane-inactivated K⁺ channel (*Rajan és munkatársai, 2001*)
- TRESK: TWIK-related spinal cord K⁺ channel (*Sano és munkatársai, 2003*)

Az egyes osztályokon belül a csatornákat a felfedezésük sorrendjében látják el sorszámokkal, így létezik pl. TREK-1 és TREK-2 vagy TASK-1, TASK-2, TASK-3, TASK-4 és TASK-5 csatorna, stb.

1.1.3. A TASK-család jellemzői

A jelenleg általánosan elfogadott álláspont szerint emlős sejtekben a TASK-1 csatorna jelenléte és aktivitása felelős a GHK-egyenletben részletezett nagy nyugalmi K^+ -konduktancia kialakításáért (*Duprat és munkatársai, 1997*), így a TASK-1 csatornák különösen jelentősek a nyugalmi membránpotenciál, valamint a sejtek bemenő ellenállásának és ingerlékenységének meghatározásában. Bár a terminológia szerint a TASK-család jelenleg öt tagot számlál (TASK-1-5), a TASK-1, TASK-3 és TASK-5 csatornák lényegesen nagyobb szekvenciahomológiát (így rokonságot) mutatnak egymással, mint a TASK-2 és a TASK-4 csatornákkal (*Kim és munkatársai, 1999; Rajan és munkatársai, 2000; Czirják és Enyedi, 2002; Talley és munkatársai, 2002*). Az újabban elfogadott álláspont szerint a TASK-2 és a TASK-4 csatornák inkább a TALK-famíliához tartoznak (*Girard és munkatársai, 2001; Decher és munkatársai, 2001*).

A TASK-csatornák biofizikai jellegzetességeivel kapcsolatosan kiemelhető, hogy érzékenyen reagálnak a pH változásaira; az extracelluláris pH savas irányú eltolódása ezen csatornák záródását idézi elő (*Duprat és munkatársai, 1997; Leonoudakis és munkatársai, 1998; Kim és munkatársai, 2000; Reyes és munkatársai, 1998*). A pH-érzékenység kialakulásában alapvető szerepe van a csatornafehérje 98-as pozíciójában, a K^+ permeábilis pórus külső szájadékhöz közel elhelyezkedő hisztidinnek (*Kim és munkatársai, 2000; Rajan és munkatársai, 2000*). Míg a TASK-1 csatornák mintegy 90%-a található nyitott állapotban 7,7-es extracelluláris pH mellett, addig pH = 6,7 esetén ez az arány mindössze 10%. A TASK-2 és a TASK-3 csatornák pH-érzékenysége némileg alacsonyabb, a TASK-3 csatornák kb. 1 pH egységgel durvább változásokat igényelnek az ugyanilyen mértékű gátlás kifejlődéséhez, míg a TASK-2 csatornák 90%-ának nyitott állapotban tartásához 8,8-es pH szükséges, és azt pH = 6,5-re kell csökkenteni ahhoz, hogy csupán a csatornák 10%-a legyen aktivált állapotban.

A TASK-csatornák a közönséges K^+ -csatornagátló-szerekre (Cs^+ , Ba^{2+} , 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium) érzéketlenek; ugyanakkor néhány helyi érzéstelenítésre használatos szer (pl. lidokain, bupivikain) gátolja működésüket (*Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kindler és munkatársai, 1999*). Ezen túlmenően a TASK-1 csatorna az anandamid, a TASK-3 csatorna pedig a ruténiumvörös alkalmazásával specifikusan gátolható (*Czirják és Enyedi, 2003a*). Az is bebizonyosodott, hogy az anandamid TASK-1 csatornát gátló

effektusa nem a kannabinoidreceptorokra kifejtett hatás, hanem közvetlenül a csatornafehérjével történő interakció következménye.

Igen lényegesnek tűnik az a felismerés, hogy egyes gáznemű altatószerek (pl. halotán) aktiválják a TASK-1 és TASK-2 (továbbá a TREK-1 és TREK-2) csatornákat (*Patel és munkatársai, 1999; Lesage és munkatársai, 2000*). Ennek nyomán úgy tűnik, hogy a 4TM-PP csatornák jelenléte nem pusztán a nyugalmi membránpotenciál kialakulásával kapcsolatos kérdésekre ad választ, hanem ezen csatornák képében megjelent a gáznemű altatószerek hatásának oly régóta keresett célpontja. Könnyű belátni ugyanis, hogy az itt tárgyalt K^+ -csatornák halotán jelenlétében bekövetkező aktivációja a neuronok hiperpolarizációját, így azok ingerlékenységének jelentős csökkenését okozza, ami megmagyarázhatja az inhalációs anesztetikumok jól ismert altató, központi idegrendszert gátló hatását.

Míg a TASK-csatornák biofizikájának és molekuláris biológiájának megismerése vonatkozásában jelentős előrehaladás történt a közelmúltban, a TASK-csatornák pontos szöveti megoszlásának és az ott betöltött szerepének vonatkozásában sokkal hézagosabb információval rendelkezünk. A TASK-csatornák egyik lehetséges konkrét biológiai jelentősége a perifériás kemoreceptorok működéséhez köthető (*Buckler és munkatársai, 2000*). Bebizonyosodott, hogy az I. típusú receptorsejtek a TASK-csatornákat expresszálják, és az oxigén jelenléte (eddig nem pontosan tisztázott módon) képes ezen TASK-csatornák, így végső soron a receptorsejtek működésének befolyásolására. Ezen túlmenően a TASK- (és ezen belül a TASK-3) csatornák fontos szerepet tölthetnek be az aldosteron szekréciójának szabályozásában is (*Czirják és munkatársai, 2000; Czirják és Enyedi, 2003b*).

Ugyancsak lényeges megállapításnak tűnik, hogy a patkány cerebellum szemcsesejtjeinek permanens K^+ -áramát ($I_{K_{so}}$, standing outward K^+ current; *Watkins és Mathie, 1996*) ugyancsak a TASK-1 csatornák jelenléte és aktivitása okozza (*Millar és munkatársai, 2000*). Az is bebizonyosodott, hogy a kisgyei szemcsesejtek permanens K^+ -árama a tenyészetben fenntartott neuronok esetében is megfigyelhető. A szerzők nem tapasztaltak ugyan érdemleges TASK-1 immunreaktivitást az egy napos szövettenyészetben elhelyezkedő szemcsesejteken, a 7 napos tenyészeteken azonban intenzív TASK-festődés volt demonstrálható. A munka egyik mellékleteként az irodalomban elsőként számoltak be arról, hogy az astrocytákra specifikus GFAP-t (glial fibrillary acidic protein) expresszáló sejtek a TASK-1-specifikus immunreakcióra is pozitívítást mutattak. A későbbiek során más szerzők is igazolták az astrocyták TASK-

1-specifikus festődését (*Kindler és munkatársai, 2000; Rusznák és munkatársai, 2004*). Az astrocyták TASK-2 pozitivitására vonatkozó adatok némileg ellentmondóak, de az mindenképpen bizonyosnak látszik, hogy az ezen sejtek által mutatott TASK-2 expresszió lényegesen kisebb jelentőségű, mint a TASK-1-csatornák esetében tapasztalható helyzet (*Gabriel és munkatársai, 2002; Rusznák és munkatársai, 2004*).

A TASK-csatornák működésének leírását célzó legfrissebb adatok egészen meghökkentő eredményeket szolgáltattak ezen csatornák lehetséges biológiai funkcióinak vonatkozásában. Az egyik tanulmány azt bizonyította, hogy a TASK-1 és a TASK-3 csatornák expressziója és funkciója fontos szerepet játszik az apoptózis indukciójában (*Lauritzen és munkatársai, 2003*). A szerzők megállapították, hogy a cerebelláris szemcsesejtek perzisztens K^+ -áramait gátolva (akár genetikailag megakadályozva ezen csatornák expresszióját, akár a már megjelent csatornák működésének gátlása által) a sejtek pusztulása jelentősen csökkenthető volt. A TASK-csatornák apoptózis indukciójában betöltött fontos szerepét támasztja az is alá, hogy a TASK-1 és TASK-3 csatornákat hippocampalis neuronokban expresszálva (ahol fiziológiásan nincsenek jelen) azokban sejtapoptózist indukálnak.

Pei és munkatársai (2003) még ennél is figyelemre méltóbb (ugyanakkor a fentieknek némileg ellentmondó) eredményekről számoltak be. Ismeretes volt, hogy a TASK-3 csatornák génszintű amplifikációja mutatható ki egyes tumorfeleségekből, elsősorban emlőtumorok esetén (*Mu és munkatársai, 2003*). A szerzők megállapították, hogy a TASK-3 csatornák overexpressziója egér fibroblasttenyésztésben jelentősen növelte a sejtproliferáció mértékét; a funkcióképtelen (egy pontmutáció révén K^+ -ra impermeábilis) csatornaváltozat ugyanakkor ilyen hatást nem mutatott. Ezen túlmenően, a vad típusú TASK-3 overexpressziója a fibroblastok TNF által kiváltott apoptózist felére csökkentette, ugyanakkor a mutáns (funkcióképtelen) változatnak ilyen hatása nem volt. Ezek a kísérletek arra utaltak, hogy a funkcionális TASK-3 csatornák overexpressziója valóban fokozott sejtproliferációt okoz, mindamelllett csökkenti az apoptózis valószínűségét, ami nyilvánvalóan tumorigén hatást jelent. A szerzők azt is megmutatták, hogy TASK-3 overexpressziót mutató C8 sejteket egerekbe injektálva két héten belül olyan tumorok alakultak ki, melyek mérete lényegesen meghaladta azoknak a daganatoknak a méretét, amiket a kontroll kísérletekben (overexpresszió nélküli C8 sejtek) láttak, vagy a funkcióképtelen TASK-3 csatornákkal overexpresszált C8 sejtek alkalmazásával tapasztaltak.

A fenti kísérleti adatokon végigtekintve, triviálisnak tűnik az a megállapítás, hogy a TASK-csatornák alapvető szerepet játszanak mind a fiziológiás, mind a patológiás sejtműködésben. Sajnálatosan kevés adat áll azonban rendelkezésre a TASK-csatornák pontos lokalizációjának és szöveti megoszlásának vonatkozásában. Míg a TASK-1 és a TASK-2 csatornák esetében történtek erőfeszítések a patkány központi idegrendszerében fellelhető megoszlásuk feltérképezésére, jóval kevesebb eredmény született a TASK-3 csatornák lokalizációjára vonatkozólag. Érdeemes ugyanakkor megjegyezni, hogy *Karschin és munkatársai (2001)* erőteljes TASK-1-, TASK-3- és TASK-5-specifikus mRNS expresszióról számoltak be patkány központi idegrendszerében.

Még ennél is kevesebb adattal rendelkezünk a TASK-specifikus fehérjék emberi szövetekben tapasztalható lokalizációjára vonatkozólag. Az igen csekély számú dolgozat közül kiemelhető a *Medhurst és munkatársai (2001)* által közölt munka, amiben emberi szövetekből készült homogenizátumokban vizsgálták a TASK-1-, TASK-2- és TASK-3-specifikus mRNS expressziójának mértékét. A jelentősebb megállapítások közül kiemelhető, hogy a TASK-2-specifikus mRNS igen kicsiny, míg a TASK-3-specifikus mRNS jelentős mennyiségben volt kimutatható az emberi cerebellumban - a TASK-1-specifikus mRNS mennyisége a kettő között volt. Bár ezen, az mRNS jelenlétére vonatkozó adatok igen érdekesek, önmagukban semmiképpen sem elegendők a TASK-csatornák humán szövetekben történő megoszlásának beható analizésére, hiszen nem adnak tájékoztatást a szöveten belüli, egyes sejtek szintjén megjelenő mintázatról. Ezen túlmenően az mRNS jelenléte (vagy hiánya) semmiképpen sem igazolja a kész fehérjetermék jelenlétét vagy hiányát, így a specifikus, fehérje szintű (és lehetőség szerint funkcionális) vizsgálatok elvégzése elkerülhetetlen. Részben ezen megfontolások által vezetve tettünk már korábban is erőfeszítéseket arra, hogy a TASK-csatornák egyes tagjainak (TASK-1, TASK-2 és TASK-3) szöveti megoszlását az eddigieknél is pontosabban feltérképezzük (*Rusznák és munkatársai, 2004*). Ezen munka keretében számoltunk be a TASK-3 csatornák patkány cerebellumban megfigyelhető megoszlási mintázatáról, továbbá megállapítottuk, hogy a TASK-csatornák mindegyike expresszálódik a patkány agyából izolálható astrocyták sejt felszíni membránjában. Az eredmények azt is megmutatták, hogy jelentős TASK-expresszió lehet az astrocyták endoplasmaticus reticulumának membránjában is. A vizsgálatok eredményeként adatokat közöltünk a TASK-csatornák emberi szövetekben történő megoszlásáról is. Ezen kísérletek keretében

megállapítottuk, hogy a kisagyi Purkinje- és szemcse sejtek igen erőteljes TASK-3, ugyanakkor valamelyest gyengébb TASK-1 expressziót mutatnak, de pozitívnak mutatkozott a molekuláris réteg is. Összhangban a korábbi, mRNS-szintű adatokkal (*Medhurst és munkatársai, 2001*), csupán igen gyenge TASK-2 expressziót tapasztaltunk a humán cerebellumban.

1.1.4. Egyes K⁺-csatornák jelentősége a rosszindulatú daganatok keletkezésében

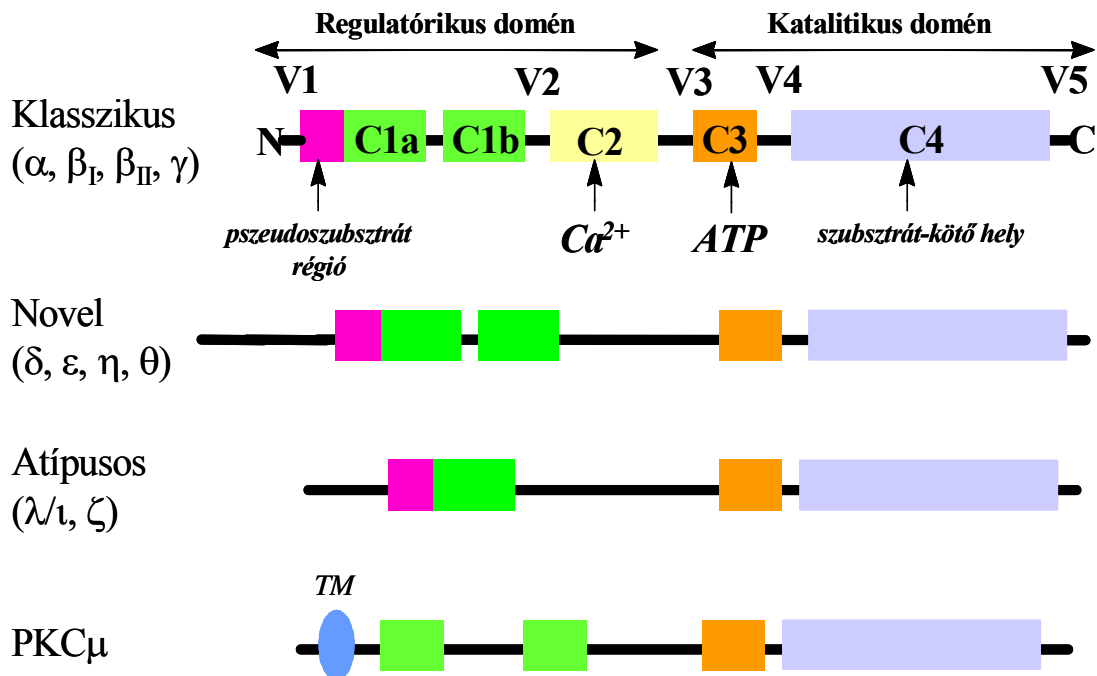
A TASK-3 csatornák előbbiekben már ismertetett, tumorgenezisben betöltött szerepe igen jelentős, ám korántsem egyedülálló. Számos olyan adat létezik, ami szerint a különböző K⁺-csatornák kitüntetett szereppel bírnak a sejtproliferáció és apoptózis szabályozásában és egyes rosszindulatú daganatok genezisében. Ismeretes, hogy bizonyos K⁺-csatornákat gátló szerek alkalmazásával gátolható a humán lymphocyták proliferációja (*Amigorena és munkatársai, 1990; Lin és munkatársai, 1993; Rader és munkatársai, 1996; Jensen és munkatársai, 1999*); sőt egyes esetekben a K⁺-csatornák gátlásával sikerült a malignus daganatok növekedését lassítani (melanoma malignum [*Nilius és Wohlrab, 1992; Lepple-Wienhaues és munkatársai, 1996*], kissejtes tüdőrák [*Pancrazio és munkatársai, 1993*], egyes emlő- [*Woodfork és munkatársai, 1995*] és prostatarákok [*Skryma és munkatársai, 1997*]).

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 Ca²⁺-koncentrációváltozásokon keresztül (*Santella, 1998*), részben a csatornaaktiváció miatt kialakuló térfogatváltozások következtében (*Rouzair-Dubois és Dubois, 1998*) befolyásolnák a sejtosztódást. Ezen vélemények ellen szól viszont, hogy bizonyos K⁺-csatornák nyitása apoptózist indukál neocorticalis neuronokban (*Yu és munkatársai, 1997*), ami egyes K⁺-csatornákat gátló szerek jelenlétében kivédhető volt; a Ca²⁺- és a Cl⁻-csatornák működését befolyásoló hatóanyagok alkalmazásával ugyanakkor a sejtapoptózis nem volt befolyásolható (*Yu és munkatársai, 1999*). A jelenleg elfogadott álláspont szerint a K⁺-csatornák és a rajtuk folyó áram közvetlen onkogén hatást jelent, ami különösen erőteljesnek bizonyult a TASK-3 csatornák esetében (*Pei és munkatársai, 2003*).

1.2. A protein kináz C izoenzimek

1.2.1. A protein kináz C izoenzimek általános jellemzése

A protein kináz C (PKC) izoenzimcsaládba tartozó molekulák a szerin/treonin kinázok jelentős képviselői. Ezidáig 11 különböző PKC izoenzimet azonosítottak (Nishizuka, 1988, 1992; Jaken, 1996), melyek molekuláris szerkezetük (4. ábra) és aktiválhatóságuk alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatók. A „klasszikus” csoportba (cPKC) tartozó izoenzimek (PKC α , β_I , β_{II} és γ) közös jellemzője, hogy aktivitásukhoz Ca^{2+} -ot és diacil-glicerolt (DAG), esetleg az utóbbi exogén megfelelőjeként működő forbol-észtert igényelnek. A klasszikus PKC izoenzimekkel szemben a nem Ca^{2+} -dependens, ún. „novel” PKC izoenzimek (nPKC δ , ϵ , η és θ) aktivitásához Ca^{2+} nem szükséges, azok forbol-észterek vagy DAG alkalmazásával is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba tartozó „atípusos” izoenzimek (aPKC; ζ és λ/ι) aktiválódása sem Ca^{2+} , sem a forbol-észterek jelenlétét nem feltételezi. Végezetül a PKC μ mind aktivációját, mind strukturális jegyeit tekintve rendhagyó izoformának tekinthető, így az a fent említett csoportok egyikébe sem illeszkedik.



4. ábra
A PKC izoenzimcsalád szerkezeti jellemzői
Az ábra részleteit illetően lásd a szöveget

A PKC izoformák aktiválódásának általános sémája egy többlépcsős eseménysorral jellemezhető (*Nishizuka, 1988, 1992; Jaken, 1996*), aminek kezdetén az aktivátor molekulák a regulátor doménhez kötődve olyan konformációváltozást hoznak létre, amelynek hatására a citoszólikus enzim pszeudoszubsztrát régiója leválik a katalitikus domén szubsztrátkötő régiójáról, szabaddá téve azt a foszforilálandó molekula számára. Ezt követően az enzim a C1 doménon keresztül valamilyen intracelluláris struktúrához (sejtmembrán, Golgi-komplex, maghártya, citoszkeletális komponensek) transzlokálódik, majd a katalitikus C3 domén foszforilálja az enzimre 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 inaktíválják azt.

Bár nincs olyan sejttípus 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 (*Nishizuka, 1988 és 1992; Ohno és munkatársai, 1991; Baier és munkatársai, 1993; Goodnight és munkatársai, 1994*). Míg a PKC α , δ , ϵ és ζ előfordulása ubiquiternek tekinthető, a PKC γ , η és θ expressziója túlnyomórészt csak bizonyos szövetekre korlátozódik; így a PKC γ szinte kizárólag az agyban található meg, a PKC η leginkább keratinocytákban és T-sejtekben fordul elő, míg a PKC θ – habár megtalálható a testisben és egyes daganatokban is – a harántcsíkolt izom legjellemzőbb izoenzime (*Boczán és munkatársai, 2000, 2001*).

Részben ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok igen széles skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak egyebek között a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatsorában, meghatározott sejttípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisében, az ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek kialakításában (csatornaaktivitás, akciós potenciálok kódolása, izomkontrakció), a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusában (fagocitózis, immunglobulin-termelés), és a sor hosszan folytatható (lásd *Decker, 2003*).

Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különbözhet egymástól (*Nishizuka, 1992; Decker, 2003*). Az is bebizonyosodott, hogy a különböző izoenzimek egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferációra és differenciálódásra) kialakításában nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétes. Ezen megállapítás egyik kiváló példája, hogy a K-562 erythroleukaemia sejtvonalon a PKC α a forbol-észter által indukált cytostasis kialakulásáért felelős, ugyanakkor a PKC β_{II} ezen sejtek proliferációjában játszik szerepet (*Murray és munkatársai, 1993*). Ezen túlmenően, az RBL-2H3 bazofil leukémia sejtekben a PKC α és ϵ izoenzimek legkifejezettebben a foszfolipáz-C aktivitását gátolták (*Ozawa és munkatársai, 1993*), ugyanakkor a PKC β és ϵ izoenzimek a hízósejtek nagy affinitású IgE receptora által mediált *c-fos* és *c-jun* expressziója kialakításában vettek részt (*Razin és munkatársai, 1994*). További érdekes megfigyelés, hogy míg NIH 3T3 fibroblastok esetén a PKC δ megállította a sejtek proliferációját, addig a PKC ϵ fokozta azt (*Cacace és munkatársai, 1993; Mischak és munkatársai, 1993*). A PKC izoenzimek heterogén funkcióját jelzi az is, hogy a C6 glioma sejtekben az egyes PKC izoenzimek expressziós szintje feltűnően megváltozik a sejtek differenciálódása során (*Brodie és munkatársai, 1998*).

A fentiek ismeretében nem meglepő, hogy a különböző PKC izoformák expressziós mintázatának változásáról számoltak be keratinocyták (*Neill és munkatársai, 2003; Selzer és munkatársai, 2002*), az emlő (*Franz és munkatársai, 1996*), az uterus (*Bamberger és munkatársai, 1996*) és a prostata (*Koren és munkatársai, 2004*) rosszindulatú elfajulása kapcsán. A PKC izoenzimmintázat megváltozásának eshetőségét ugyan felvetette néhány szerző (*Langzam és munkatársai, 2001; Koren és munkatársai, 2000*), ám annak pontos leírása és a tumoros elváltozás grádusával való kapcsolata továbbra sem tisztázott.

1.2.2. A PKC és a keratinocyták – az izoenzimek sokrétű biológiai szerepe a proliferáció és differenciálódás szabályozásában

Viszonylag népszerűnek bizonyult a PKC izoenzimek kutatásával foglalkozó munkacsoportok körében a keratinocytá sejtvonalak alkalmazása, így meglehetősen nagy mennyiségű ismeret halmozódott fel az utóbbi időben ezen molekulák szerepének és a keratinocyták sejtfolymatainak kapcsolatára vonatkozólag (lásd *Mitev és Miteva,*

1999). A vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a különböző sejtfolyamatokban több izoenzimnek van/lehet szerepe (PKC α , δ , ϵ , η , ζ ; *Dlugosz és Yuspa, 1993, 1994*). Igen elegáns kísérletek révén az is bebizonyosodott, hogy a PKC rendszer fontos szerepet játszik a sejtek proliferációs és differenciálódási programjának szabályozásában (*Dlugosz és Yuspa, 1993, 1994; Denning és munkatársai, 1995*). Megállapították, hogy az extracelluláris Ca²⁺-koncentráció ([Ca²⁺]_e) növelésével a sejtek differenciálódásra voltak kényszeríthetők, ám a folyamathoz elengedhetetlen volt a PKC aktiválódása. Az is kiderült, hogy az itt vázolt folyamat szabályozásában a PKC α izoenzim meghatározó jelentőségű (*Denning és munkatársai, 1995, Lee és munkatársai, 1997*).

A normál humán epithelialis keratinocytákban (NHEK) ugyancsak kimutatták az előzőekben említett izoenzimeket (PKC α , δ , ϵ , η , ζ ; (*Lee és munkatársai, 1998*), de más izoenzimek jelenléte sem zárható ki (PKC β és μ ; *Fisher és munkatársai, 1993; Rennecke és munkatársai, 1996*). A kísérletek arra is rámutattak, hogy a PKC izoformák kifejeződése és szubcelluláris lokalizációja jelentősen megváltozott az [Ca²⁺]_e megemlése, valamint a megnövekedett sejtdenzitás (konfluencia) által indukált differenciálódási program beindulásával párhuzamosan (*Denning és munkatársai, 1995; Lee és munkatársai, 1998*).

Ugyancsak a PKC izoenzimek komplex szerepére, és a tumorok keletkezésével kapcsolatos hatásukra utalnak azon kísérletek, aminek során előzetes iniciáció után forbol-észtereket a bőrbe adagolva tumort lehetett létrehozni (*Paramio és Jorcano, 1997; Karen és munkatársai, 1999*). Előzetes iniciáció nélkül, *in vitro* viszont a fenti anyagok gátolták a keratinocyták proliferációját, csökkentették a korai, ugyanakkor növelték a késői differenciálódási markerek expresszióját; azaz végsősoron a terminális differenciálódás felé irányították a sejteket (*Dlugosz és Yuspa, 1993, 1994; Denning és munkatársai, 1995; Lee és munkatársai, 1998*). Kimutatták továbbá, hogy a szelektív PKC gátló GF109203X és Ro-31-7549 – a proliferáció serkentése mellett (*Bollag és munkatársai, 1993; Le Panse és munkatársai, 1994*) – megváltoztatta a differenciálódási markerek megjelenését (*Lee és munkatársai, 1998*) mind egér keratinocytákon, mind NHEK-ban, rámutatva a PKC rendszer központi, endogén szerepére a keratinocyták fenti folyamatainak szabályozásában.

1.2.3. Az egyes PKC izoenzimek aktivitásának hatása a sejtek proliferációjára, differenciálódására és a tumorigenezisre

A specifikus kísérletek megmutatták, hogy a cPKC α központi szereppel bírhat a terminális differenciálódási program beindításában és végrehajtásában (*Murakami és munkatársai, 1996; Lee és munkatársai, 1998; Neill és munkatársai, 2003*). Adenovírus vektorok alkalmazása során az is bebizonyosodott, hogy a PKC δ és η izoformák overexpressziója meggátolja a sejtek proliferációját, és differenciálódást vált ki (*Ohba és munkatársai, 1998; Li és munkatársai, 1999*). Igen jelentősnek tűnik az a felismerés, hogy a fenti izoformák transzgenikus jelenléte (ellentétben a tumorigenezist fokozó PKC ϵ szerepével) jelentősen csökkentette egyes bőrdaganatok növekedési ütemét (*Jansen és munkatársai, 2001*).

A cPKC α központi jelentőségének látszik a kalcium- és a konfluencia-indukálta terminális differenciálódási folyamatokban egér és humán keratinocytákban (*Lee és munkatársai, 1997; Lee és munkatársai, 1998; Bikle és munkatársai, 2001; Jansen és munkatársai, 2001; Neill és munkatársai, 2003; Zang és munkatársai, 2003*). Megállapították, hogy a cPKC α mind *in vitro*, mind *in vivo* stimulálja az apoptózist és a differenciálódást, ugyanakkor gátolja a sejtproliferációt. Ezzel szemben a cPKC β -t overexpresszáló sejtek proliferációja fokozódott, ez az izoenzim kifejezetten tumorigén hatásúnak bizonyult, miközben az apoptotikus folyamatok gátlását okozta.

A nPKC ϵ számos sejtípus estében bizonyult a sejtproliferáció kulcsfontosságú pozitív regulátorának (*Mischak és munkatársai, 1993; Goodnight és munkatársai, 1994; Brodie és munkatársai, 1998; Gutcher és munkatársai, 2003*). Bebizonyosodott, hogy a nPKC ϵ overexpressziója patológiás proliferációhoz (hyperproliferatív transzformációhoz) vezet, míg az enzim down-regulációja (továbbá domináns negatív mutánsának overexpressziója) a proliferáció gátlását, valamint a differenciálódás indukcióját eredményezte (*Mischak és munkatársai, 1993; Goodnight és munkatársai, 1994; Brodie és munkatársai, 1998*). Ezen túlmenően, a nPKC ϵ szerepet játszik transzgenikus egerek bőrtumorainak kialakulásában is (*Jansen és munkatársai, 2001*).

A nPKC δ a differenciálódás és az apoptózis pozitív regulátoraként működik, és ezzel párhuzamosan gátló hatást fejt ki a sejtproliferációra és a tumornövekedésre (*Li és munkatársai, 1999; Denning és munkatársai, 1998; 2002; Fukunaga és munkatársai, 2001*). Érdekes megfigyelés, miszerint a Ha-ras overexpresszió okozta malignus

transzformáció (azaz megnövekedett proliferációs kapacitás és lecsökkent differenciálódási tendencia) esetében a nPKC δ izoenzim eltűnik a sejtekből (*Geiges és munkatársai, 1995*).

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.
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 elemezni 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 sejteinek szabályozásában.
4. Pozitív kísérleti adatok birtokában meg kívántuk vizsgálni a Langerhans-szigetek hormontermelő sejteinek TASK-3 expresszióját A- és B-sejtekre specifikus markerekkel történő kettős immunjelölés után is.
5. Meg szeretnénk nézni, hogy a malignus daganatok mutatnak-e bármilyen említést érdemlő különbséget a TASK-3 immunjelölődési mintázatukat tekintve az ép szövetekhez képest. 42 emlőtumor feldolgozása után korrelációt szeretnénk

volna találni a daganatok TASK-3 expressziója, valamint azok szövettani típusa, grádusa, valamint prognosztikai markerei között.

0. Meg kívántuk vizsgálni, hogy van-e különbség a különböző módon eltávolított (core-biopszia, műtéti beavatkozás) szövetminták TASK-3 expressziójában (annak intenzitásában és/vagy megoszlásában).
0. Meg szeretnénk volna vizsgálni transitionális sejtes húgyhólyagtumorokban a tumoros epithelium PKC izoenzimintázatát, annak változásait és az izoenzimintázat módosulását a tumor grádusának előrehaladásával.
0. Fel szeretnénk volna térképezni, hogy a PKC izoenzimek megoszlása jellemzi-e bármilyen módon a tumor grádusát, azaz szóba jöhet-e a PKC izoenzimek prognosztikai markerként való alkalmazása.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A szövetminták és feldolgozásuk

A TASK-3 expresszió vizsgálatára használt szövetmintákat (a cerebellum kivételével) a Kenézy Gyula Kórház Pathologiai Osztályának szövettani preparátumaiból választottuk ki. A kimetszés a műtöből érkező natív mintából történt, mind a tumoros, mind a kóros elváltozást nem mutató gyomor és vastagbél részletekből. A natív mintákból részben fagyasztott preparátum készült (aminek egy részét a Western-blot vizsgálatok céljaira metszettük ki). Az esetek egy részében a nyálkahártyát elválasztottuk az alatta található izomrétegről. A kimetszéssel szomszédos területből szövetblokk készült, melyet 4 %-os, pufferezt formalinban fixáltunk (18-24 h), majd szokványos módon parafinba ágyasztunk

A pancreasból származó szövetminták vagy trauma során bekövetkező pancreassérülés miatti hasnyálmirigy-eltávolítás mintájából vagy pancreastumort övező ép környezetből származott. Egyik beteg anamnesisében sem szerepeltek diabetes mellitusra utaló tünetek. A nyálmirigyből származó szövetminták jóindulatú tumor környezetéből származtak. Utóbbi két szövetfésülés esetében kizárólag fixált preparátumok álltak a rendelkezésünkre.

Az emlőmintáknál (42 eset) preoperatív core-biopszia és ugyanazon beteg sebészeti beavatkozás során eltávolított szövetmintája is rendelkezésre állt.

A cerebellum sectios anyagból származott.

A húgyhólyag transitiocelluláris carcinomáinak PKC izoenzimintázátát célzó vizsgálatainkhoz mindösszesen 23 betegből (17 férfi és 6 nő) származó, hólyagcarcinomát tartalmazó daganatszövetet alkalmaztunk, melyek a DE OEC Pathologiai intézetének vizsgálati anyagából származtak. A szövetdarabokat transurethralis resectio (17 beteg), részleges hólyagresectio (4 beteg) vagy cystectomy (2 beteg) alkalmazásával távolították el. A kontrollként alkalmazott szövetminták prostatectomia céljából végzett sebészeti beavatkozásból származtak. Minden eltávolított szövetmintát két részre osztottunk. A minták egyik felét rutin hisztopatológiai feldolgozás után hematoxilin-eozinnal festettük a tumorok klasszifikációja, és grádusának (*Mostofi és munkatársai, 1973*), valamint a TNM-rendszer szerinti stádiumbeosztásának (*Silverberg és munkatársai, 1997*) meghatározása céljából. A

hisztopatológiai diagnózis alapján 9 eset G1 grádusú volt (melyből 1 pTa, 8 pedig pT1 stádiumúnak volt minősíthető). A fennmaradó esetekből 8 volt G2 (4 pT1, 3pT2 és 1 pT3b) és 6 G3 grádusú (2 pT2 és 4 pT3b).

Az eltávolított szövetminták mási felét folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd kriomikrotóm segítségével a tumoros régiót a lamina propriaig lemetszettük. Ezen lépés jelentőségét az adta, hogy ilyen módon sikerült olyan szövetmintákat készíteni, amelyek kizárólag epithelialis eredetű szövetet tartalmaztak, így a feltehetően teljesen eltérő PKC izoenzimintázattal rendelkező nem epitheliális elemek (*Nishizuka, 1998; Ohno és munkatársai, 1991*) jelenléte a vizsgálatokat nem befolyásolta. A megfelelő metszési sík elérését az egyes minták hematoxilin-eozinos festésével ellenőriztük.

2.2. Immunhisztokémia

A parafinos blokkokból készült 4 µm-es metszeteken a deparafinálást követő rehidráció után, különböző antigénfeltárási (AF) módokat próbáltunk ki, melyeket az 1. táblázatban foglalunk össze.

<i>Az antigénfeltárási típusa</i>	<i>Protokoll</i>	<i>Időtartam</i>
Proteolízis	Pronáz (0.1 %) 37°C	3 perc
Mikrohullámú besugárzás (750 W)	8 mM Tris-puffer (pH = 8,4)	15 perc
	1 mM EDTA-puffer (pH = 8,0)	15 perc
Magas nyomású hőkezelés (kuktában)	0,1 M Citrát-puffer (pH = 6,0)	2 perc

1. táblázat

Az antigénfeltárási céljára alkalmazott technikák összefoglalása

Az AF után az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása történt 3 %-os H₂O₂-oldat alkalmazásával (10 perc, szobahő), majd a nem-specifikus fehérjekötődés megakadályozása végett a metszeteket Protein Block Serum Free Reagenssel (DAKO, Glostrup, Dánia) inkubáltuk (5 perc, szobahő). Ezen lépés befejeztével a 2. táblázatban bemutatott elsődleges antitestek alkalmazására került sor (egy éjszakán át, nedveskamrában, 4 °C-on). Az inkubáció végeztével (továbbá minden további lépés között) a metszeteket PBS-ben mostuk (3x5 perc), majd a másodlagos antitestek

alkalmazása történt. Amennyiben kecskében termeltetett elsődleges antitestet használtunk, akkor a metszeteket nyúlban termeltetett, biotinilált anti-kecske másodlagos antitestekkel inkubáltuk (30 perc, 1:100 [DAKO]). Az inkubáció végeztével a metszeteket mostuk (PBS), majd torna-peroxidázzal konjugált Streptavidint alkalmaztunk (30 perc, 1:500, szobahő). A létrejött immunreakciót Liquid DAB + Substrate Chromogen System segítségével tettük láthatóvá (DAKO). A nyúlban termeltetett elsődleges antitestek használata során az EnVision+ System-HRP (DAB) (DAKO) detekciós rendszert alkalmaztuk. Az esetek többségében hematoxilines háttérfestést is végeztünk.

A fagyasztott metszetek esetén az antigénfeltárás kivételével a lépések azonosak voltak a beágyazott minták esetében részletezettekkel.

Rendszeresen sor került kontroll kísérletek végzésére is, melynek során az elsődleges antitesteket a rájuk specifikus blokkoló peptiddel előinkubáltuk (a blokkoló peptideket az antitestek gyártója biztosította, azok felhasználása a gyártó által javasolt protokoll alkalmazásával történt). A fentiekén túl elvégeztük a reakciókat primer antitest nélkül, továbbá a primer antitest állatfajából származó nem immunizált savóval.

A kettős immunhisztokémiai jelölést a pancreas szigetsejtjeinek elkülönítésére, és a Langerhans-szigetek A- és B-sejtjei TASK-3 expressziójának igazolására alkalmaztuk. Az immunreakciókat egymás után végeztük, minden esetben a TASK-3-specifikus reakcióval kezdve a procedúrát, az EnVision+ System-HRP (DAB; DAKO) detekciós rendszer alkalmazásával. A DAB-os előhívást követően ismételt blokkolás történt Block Serum Free Reagenssel (5 perc, szobahő). A blokkolósérum lefújása után poliklonális, tengerimalacban termeltetett anti-inzulin („ready-to-use”, 10 perc, szobahő) vagy ugyancsak poliklonális, nyúlban termeltetett anti-glukagon („ready-to-use”, 10 perc, szobahő) antitestek alkalmazása (DAKO) történt. A biotinilált másodlagos antisszel végzett inkubációt követően alkalikus foszfátázzal konjugált streptavidint (DAKO) alkalmaztunk (1:100, 30 perc, szobahő), majd a reakciókat AP-KIT (Vector Laboratories, CA, USA) segítségével vizualizáltuk. A kettős immunjelzés esetén háttérfestést nem végeztünk, a fedés vizes alapú fedőanyaggal történt. A kettős festés előtt megelőző vizsgálatok történtek arra vonatkozólag, hogy a TASK-3 által igényelt antigénfeltárás mellett is megfelelően működik-e az inzulin és a glukagon ellen termeltetett antitest. Ezen vizsgálat során kielégítő eredményt tapasztaltunk.

<i>Gyártó cég</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology Inc.¹</i>	<i>Alomone Labs Ltd.²</i>
Katalógus kód	Sc-11320	APC-044
Specifititás	Anti-TASK-3, humán specifikus	Anti-TASK-3, humán és patkány specifikus
A faj amiben termeltették	Kecske	Nyúl
Az antitest típusa	Poliklonális	Poliklonális
Epitóp	A csatornafehérje C-terminálisának közlében	Extracelluláris, a csatornafehérje P1-hurkának közelében (az 57-73 aminosavak közötti szekvencia)
Inkubációs időtartam	Egész éjen át	Egész éjen át
Hígítás	1:100	1:800
Az antitest végső fehérje koncentrációja	2 µg/ml	1 µg/ml

¹Santa Cruz, CA, USA

²Jerusalem, Israel

2. táblázat

A TASK-3 immunhisztokémiai vizsgálatoknál alkalmazott elsődleges antitestek

Az immunreakciók végeredményét Nikon Eclipse 600W mikroszkóp (Nikon, Tokyo, Japan) és az ahhoz csatolt CCD kamera alkalmazásával vizsgáltuk. A mikrofotókat a Spot RT v3.5 program segítségével készítettük, a disszertációban bemutatott képeket az Adobe Photoshop segítségével állítottuk össze.

2.3. Western-blot technika – TASK-csatornák

A szövetmintákat folyékony nitrogén alkalmazásával mélyfagyasztottuk, majd porcelán dörzsmozsárban apróra őröltük. A szövetdarabokat lízispufferbe helyeztük, (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)benzéneszulfonil-fluorid, 20 µM leupeptin, pH 7,4; valamennyi összetevő a Sigmától került beszerzésre), majd ultrahang

alkalmazásával homogenizáltuk. A minták fehérjetartalmát módosított BCA protein-assay (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg. A sejtlizátumokat SDS-PAGE sample pufferben oldottuk, majd 10 percen át forraltuk. Az így nyert mintákat SDS-PAGE-nek (poliakrilamid-gélelektroforézis) vetettük alá. Az általunk használt gél 7,5 %-os volt, mintánként 80-160 µg proteint alkalmaztunk. Az elektroforézis végeztével a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át (BioRad Laboratories, CA, USA). A membránokat 5% os, PBS-ben oldott tejporral blokkoltuk, majd a TASK-3-specifikus elsődleges antitestetek alkalmazására került sor (Santa Cruz - 1:50; Alomone - 1:800). A másodlagos antitest vagy biotin-konjugált kecske anti-nyúl IgG (BioRad – 1:1000) vagy ugyancsak biotin-konjugált, nyúl anti-kecske IgG volt (Vector Laboratories, CA, USA – 1:1000), függően az elsődleges antitest típusától. A kötődés specificitását az elsődleges antitesteknek a nekik megfelelő blokkoló peptiddel történő előinkubációjával vizsgáltuk; ilyenkor a procedúra végeztével értékelhető immunjelölődést nem tapasztaltunk. Az immunreaktív sávokat kemilumineszcens ECL Western blotting detection kit (Amersham, Little Chalfont, Anglia) segítségével, fényérzékeny filmen (AGFA, Brüsszel, Belgium) vagy Fujifilm Labs 3000 sötétkamrában (Tokió, Japán) tettük láthatóvá.

2.4. Western-blot technika – húgyhólyagtumrok

A 2.1. pontban már részletezett feldolgozás után a húgyhólyag-nyálkahártyából preparált mintákat proteáz-inhibitorokat tartalmazó lízispufferben homogenizáltuk, majd szigorúan azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó (20-30 µg) mintákat alkalmaztunk a Western-blot kísérletekhez, melyek főbb lépései megegyeztek az előzőekben leírtakkal.

A vizsgálatokhoz használt elsődleges antitesteket részben a SIGMA (nyúlban termelt, poliklonális anti-PKC α , β , γ , δ , ϵ η és ζ), részben a Santa Cruz (anti-PKC λ / ι és μ) által fejlesztett és forgalmazott antitestek voltak. Az alkalmazott hígítás 1:500 – 1:1000 volt. Az immunreakció vizualizálása peroxidáz-konjugált, kecskében termeltetett (1:1000; BioRad) másodlagos antitest alkalmazásával, és egy „enhanced chemiluminescence detection kit” (ECL) alkalmazásával történt. A kvantitatív denzitometriát GelDoc rendszer (BioRad) alkalmazásával végeztük (*Papp és*

munkatársai, 2003). A statisztikai vizsgálatok céljára Student t-tesztet használtunk, a különbségeket a $p < 0,05$ feltétel teljesülése esetén tekintettük statisztikailag igazoltnak.

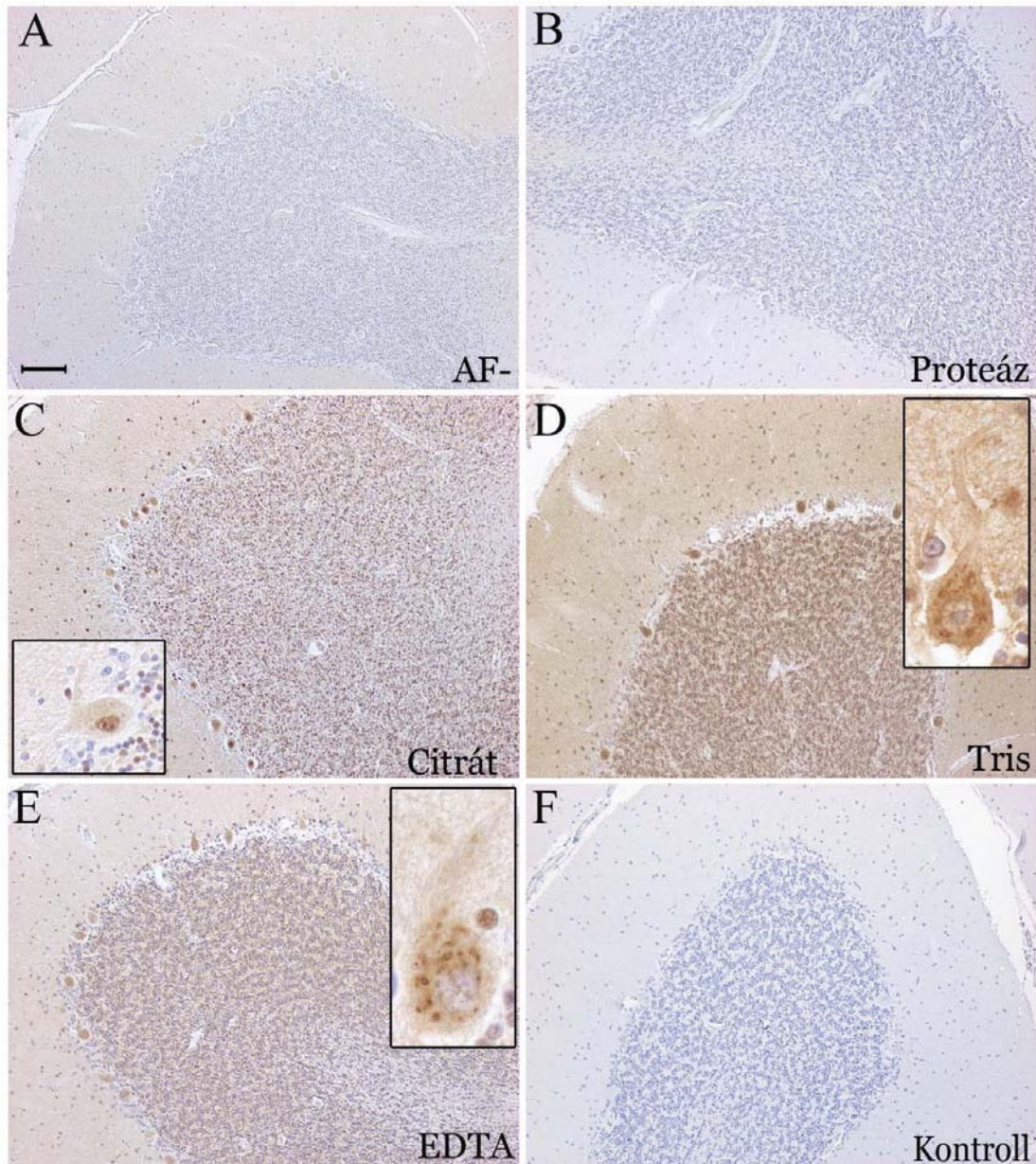
3. EREDMÉNYEK

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

A TASK-3 csatornákat célzó kísérletek kezdetén az Alamone Labs Ltd. által gyártott és forgalmazott antitest „bevizsgálása” történt, aminek során az optimális hígítás és a legmegfelelőbb AF technika meghatározására került sor. A vizsgálatok ezen fázisában humán cerebelláris szövetblokkokat alkalmaztunk pozitív kontrollként, mivel ebben a szövetféleségben a TASK-3 specifikus mRNS-t kiemelkedően nagy mennyiségben detektálták (*Medhurst és munkatársai, 2001*), és korábbi vizsgálataink megmutatták, hogy a Purkinje-sejtek igen erős; a molekuláris és a szemcsesejtes rétegek pedig kifejezett TASK-3 specifikus festődést mutatnak (*Rusznák és munkatársai, 2004*). Az 5. ábra demonstrálja az Alamone által forgalmazott antitesttel történt immunfestés eredményét antigénfeltárás nélkül (5A ábra), valamint különböző antigénfeltárási módszerek alkalmazásával (5B-E ábrák). Fontos megjegyezni, hogy az AF alkalmazása után valamennyi, az 5. ábrán bemutatott immunreakció egyidejűleg készült. Amint az jól megítélhető, az AF nélkül kivitelezett reakció igen gyengének bizonyult (5A ábra), de hasonlóan gyenge eredményt hozott a pronázzal végzett proteolízis is (5B ábra). Citrát- (5C ábra), Tris- (5D ábra) vagy EDTA-pufferes (5E ábra) előkezelést követően azonban erős, a várt cerebelláris struktúrákra lokalizálódó immunreakciót tapasztalhattunk.

Bár mindhárom utóbbi technika értékelhető eredményt hozott, azok jól azonosítható és erős immunreakciókat eredményeztek, a legerőteljesebb festődést a Tris-pufferben történt AF után tapasztalhattuk (ami különösen nyilvánvaló volt a Purkinje-sejtek [lásd a nagy nagyítású felvételek], a molekuláris és a szemcsesejtes rétegek esetében). A disszertáció anyagát képező kísérletekben a formalinban fixált és beágyazott szövettani minták vizsgálatához minden esetben Tris-, citrát- és EDTA-pufferes AF-t alkalmaztunk. Az említett antigénfeltárási technikák alkalmazása nem okozott érdemi különbséget a festődési mintázat vonatkozásában, ám a legintenzívebb és legkontrasztosabb (azaz a leglátványosabb) reakciókat mindig a Tris-inkubáció alkalmazása után figyelhettük meg. Mindezek alapján a disszertáció további részében mindig a Tris-feltárás után kapott reakciókat demonstráljuk, amennyiben az

immunhisztokémiai vizsgálatok formalinnal fixált, beágyazott szövettani metszeteken történtek. Igen fontos kísérlet volt a preadszorpciós kontroll (5F ábra), aminek végén értékelhető immunreakciót nem tapasztaltunk. Tekintettel arra, hogy az itt bemutatott reakció előzetes Tris-inkubáció után történt, az immunfestődés hiányát a reakció specificitásának igen jelentős bizonyítékként értékeltük.



5. ábra

Különböző antigénfeltárási módszerek alkalmazásának hatása a TASK-3-specifikus immunjelölésre formalinban fixált, parafinba ágyazott, humán cerebellum metszetek esetében

Az A kép az antigénfeltárástól elvégzett immunreakció eredményét mutatja. A B, C, D és E fotók a különböző antigénfeltárási módszerek alkalmazása nyomán tapasztalt immunreakciókat dokumentálják. A C, D és E ábrarészekben bemutatott kisebb képek a Purkinje-sejtek jelölődését mutatják. Az F kép az elsődleges antitest blokkoló peptiddel történt előinkubációja után tapasztalt immunfestődést demonstrálja.

Ezen preadszorpciós kontroll előzetes Tris-inkubáció után (azaz a leghatásosabb antigénfeltárást követően) történt. Az elsődleges antitest (Alomone Labs. Ltd.) hígítása valamennyi esetben 1:800 volt. Az A ábrán látható kalibráció (100 μm) valamennyi képre alkalmazható. Minden esetben DAB kromogén alkalmazása történt.

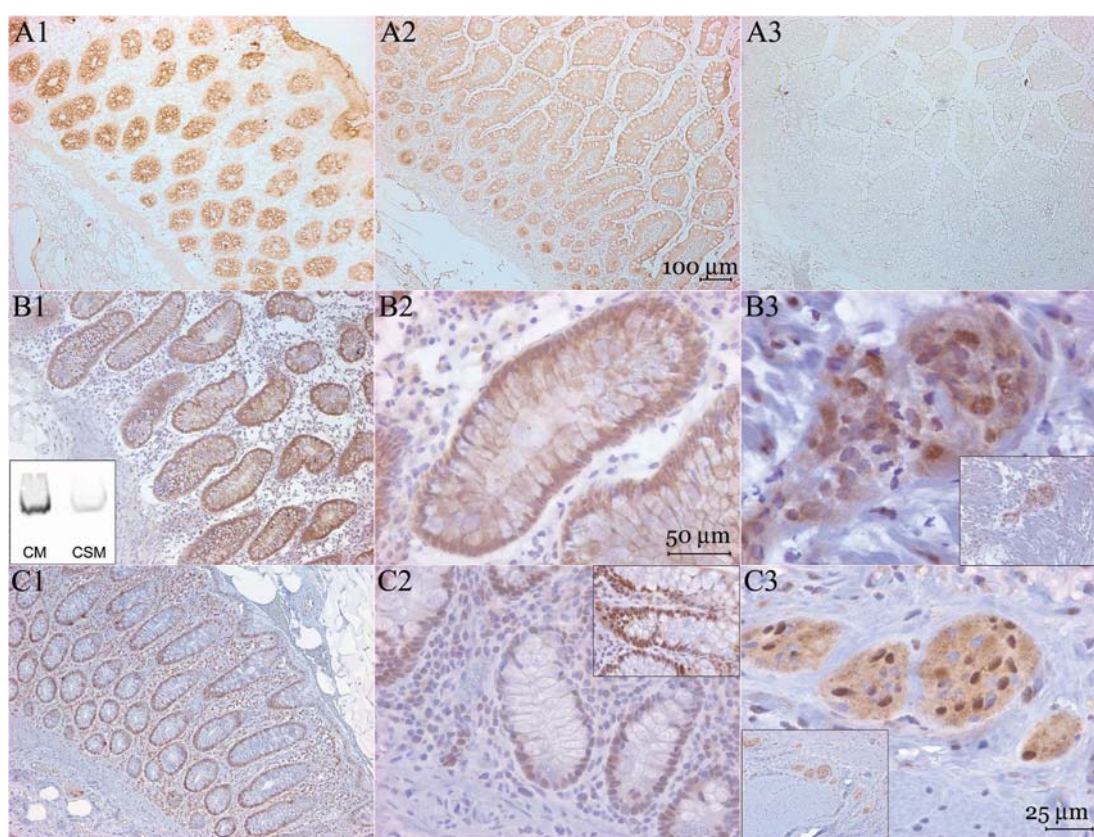
A bevezető kísérletek során az elsődleges antitest különböző hígításait használtuk (1:200 és 1:4000 között) és az 1:800-as titer bizonyult a legcélravezetőbbnek.

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

A kísérletsorozat következő lépésében a humán gastrointestinalis rendszerből származó szövetmintákban (nyálmirigy, gyomor, vékonybél, pancreas és vastagbél) vizsgáltuk meg a TASK-3 expressziójának megoszlását két, eltérő epitópok ellen irányuló elsődleges antitest alkalmazásával. A 6. ábra a colon esetében tapasztalható eredmények összefoglalását adja. A felső sor (6A1-6A3 ábrák) a Santa Cruz által gyártott és forgalmazott antitest alkalmazásával kapott immunreakciót mutatja. A 6A1 ábra fagyasztott metszet alkalmazásával demonstrálja a TASK-3 immunpozitivitás megoszlását, ahol a vastagbél nyálkahártyájának intenzív jelölődése és ezen belül is a felszíni epithelium és a mirigyek hámbélésének igen erőteljes reakciója emelhető ki. A 6A2 ábrán demonstrált reakciót ugyanazon szövetblokkon végeztük, aminek eredményét a 6A1 ábra mutatja, de ezúttal formalinnal történő fixálás, beágyazás (azaz rutin szövettani feldolgozás) és Tris-inkubációval történő AF után. Megállapíthattuk, hogy a fagyasztott metszetben tapasztalható megoszlási mintázat (nevesen a vastagbél nyálkahártyájának festődése) reprodukálható volt, bár annak intenzitása némileg gyengébbnek bizonyult. Ugyanezen reakciót AF nélkül elvégezve érdemi immunjelölődést nem tapasztaltunk. Fontos megjegyezni, hogy amennyiben az elsődleges antitesteket a specifikus blokkoló peptiddel előinkubáltuk, úgy értékelhető immunreakció nem alakult ki még az AF alkalmazása után sem (6A3 ábra).

A 6A ábrán demonstrált eredmények arra utaltak, hogy a humán vastagbél epitheliális sejtjei erőteljes TASK-3-expressziót mutatnak. Ezt a feltevést megerősítették azon vizsgálatok is, amikor a másik típusú elsődleges antitesttel (Alomone Labs Ltd.) végeztük az immunreakciókat. Valamennyi, a 6B és a 6C ábrán bemutatott kép ugyanazon beteg vizsgálati anyagából származik; előbbi esetben

fagyasztott, utóbbi esetben pedig formalinban fixált, beágyazott minták alkalmazására került sor. A fagyasztott minták esetében természetesen nem volt szükség antigénfeltárássra, a bemutatott eredmények a preparátum ilyenfajta előkezelése nélkül születtek. Amint az jól látható, a fagyasztott metszetekben az intestinalis epithelium erőteljes TASK-3-specifikus jelölődést mutatott (6B1 és 6B2 ábra). A 6B3 ábra egy a plexus myentericus Auerbachihoz tartozó, intenzív TASK-3 festődést mutató neuronális struktúra immerziós objektívvel készített képét demonstrálja. A 6B3 ábrán látható kisebb fénykép a plexus környezetének áttekintő képét mutatja, amin a neuronális struktúrát övező simaizomréteg lényegesen gyengébb festődése demonstrálható.



6. ábra

TASK-3 expresszió vastagbélben

Az A1-A3 ábrák a Santa Cruz Biotechnology, Inc-től vásárolt elsődleges antitesttel kapott reakció eredményét ábrázolják, az ábra további részében az Alomone Labs Ltd. által kifejlesztett és forgalmazott antitestet alkalmaztuk. Az A1 kép a fagyasztott, az A2 pedig az ugyanazon szövetblokkon végzett, de formalinos fixálást, beágyazást és Tris-inkubációt követően kivitelezett reakció eredményét mutatja. A preadszorpciós kontroll eredménye az A3 ábrán látható (fixált, Tris-inkubációval végzett antigénfeltárást követően kivitelezett reakció). Háttérfestés nem történt.

A B1-B3 felvételek egy másik betegből kimetszett, fagyasztott szövetminta vizsgálata során kapott eredményt tükrözik. A B1 ábra egy kis nagyítású felvételen, a B2 fotó pedig nagyobb nagyítással demonstrálja a vastagbél epithelialis rétegének TASK-3 specifikus immunreakcióját. A B1 ábrán látható kisebb képen olyan Western-blot kísérlet eredménye látható, amikor a vastagbél nyálkahártyájából (CM) és simaizomrétegéből (CSM) készített szövethomogenizátumok vizsgálatát végeztük. Mindkét sáv esetében azonos mennyiségű proteint vittünk fel. Az immunopozitív csíkok kb. 84 kDal magasságban jelentkeztek. A B3 ábrán egy olyan immerziós objektívvel készített fotó látható, ahol a plexus

myentericushoz tartozó neuronális struktúrák azonosíthatóak. Az ugyanazon területről készített kisebb nagyítású felvételt ugyancsak bemutatjuk, amin jól megfigyelhető a plexust övező környező simaizomszövet meglehetősen gyenge TASK-3 pozitivitása.

A C1-C3 ábrák a B sorozaton már bemutatott szövetmintából készültek, ám ezúttal a rutin szövettani feldolgozás (formalinos fixálás és beágyazás), valamint az optimálisnak ítélt antigénfeltárás (Tris-inkubáció) után. Az egyes képek elrendezése és az általuk demonstrált képletek teljes összhangban állnak a B1-B3 ábrásor esetében már bemutatottal. A C2 ábrán demonstrált kisebb fotó az intestinalis epithelium TASK-3 festődési mintázatát demonstrálja immerziós objektív alkalmazásával. Az A2 ábrán látható kalibráció alkalmazható az A1, A3, B1 és C1 képekre is. A B2 és a C2 ábrák kalibrációja ugyancsak megegyezik. A C3 kép kalibrációja alkalmazható a B3 ábrára is.

Mindkét elsődleges antitest felhasználásával történtek Western-blot kísérleteket is; a 6B1 ábrán a colon mucosájából (CM) és simaizomrétegéből (CSM) készített homogenizátum felhasználásával nyert eredményeket ábrázoltuk. A Western-blot kísérletek egyik lényeges eredménye, hogy aspecifikus kötődésre utaló sávokat nem találtunk. Ezen túlmenően, igen lényegesnek ítéljük azt a megfigyelésünket, miszerint a vastagbél nyálkahártyájából készített szövetminta alkalmazásakor lényegesen erőteljesebb és vastagabb csíkot észleltünk, mint az izomfalat tartalmazó homogenizátum alkalmazása során. Ez a megfigyelés (tökéletes összhangban az immunhisztokémiai vizsgálatok által nyújtott eredményekkel) arra utalt, hogy a mucosa TASK-3 expressziója számottevően intenzívebb, mint az izomfalban tapasztalható helyzet (az összehasonlítás céljából lásd a 6B1 ábrát és a 6B3 kép kis nagyítású részét).

A 6C1-6C3 ábrák a 6B részen már bemutatott szövetblokk TASK-3-specifikus festődését mutatják, a rutin szövettani feldolgozás (formalinos fixálás, majd beágyazás) után, Tris-inkubációval kivitelezett AF-t követően. Amint az a 6C1 ábrán jól látható, a szövetminta megtartotta TASK-3-specifikus jelölődését. Lényeges megjegyezni, hogy bár az AF után tapasztalt reakció némileg gyengébb volt (lásd a 6C2 ábrát), mint a fagyasztott preparátumon kivitelezett festés eredményeként megfigyelhető jelölődés, álpozitív reakció nem alakult ki. Immerziós objektív alkalmazásával egyébként még ezen gyengébb immunjelölődés is könnyedén megítélhetővé vált (lásd a 6C2 ábrán bemutatott kisebb fényképet). A plexus myentericushoz tartozó idegi struktúrák a formalinos fixálást követően is erős és határozottan elkülönülő jelölődést mutattak, amennyiben Tris-inkubációt alkalmaztunk az AF céljára (6C3 ábra, a kisebb kép a bemutatott terület kis nagyítású felvételét demonstrálja). Preadszorpciós kontroll vizsgálatok kivitelezésére is sor került (mind a fagyasztott, mind a beágyazott és antigénfeltáráson átesett szövetminták esetében); értékelhető immunpozitivitást azonban egyik esetben sem kaptunk. Mindösszesen 6 különböző betegből származó

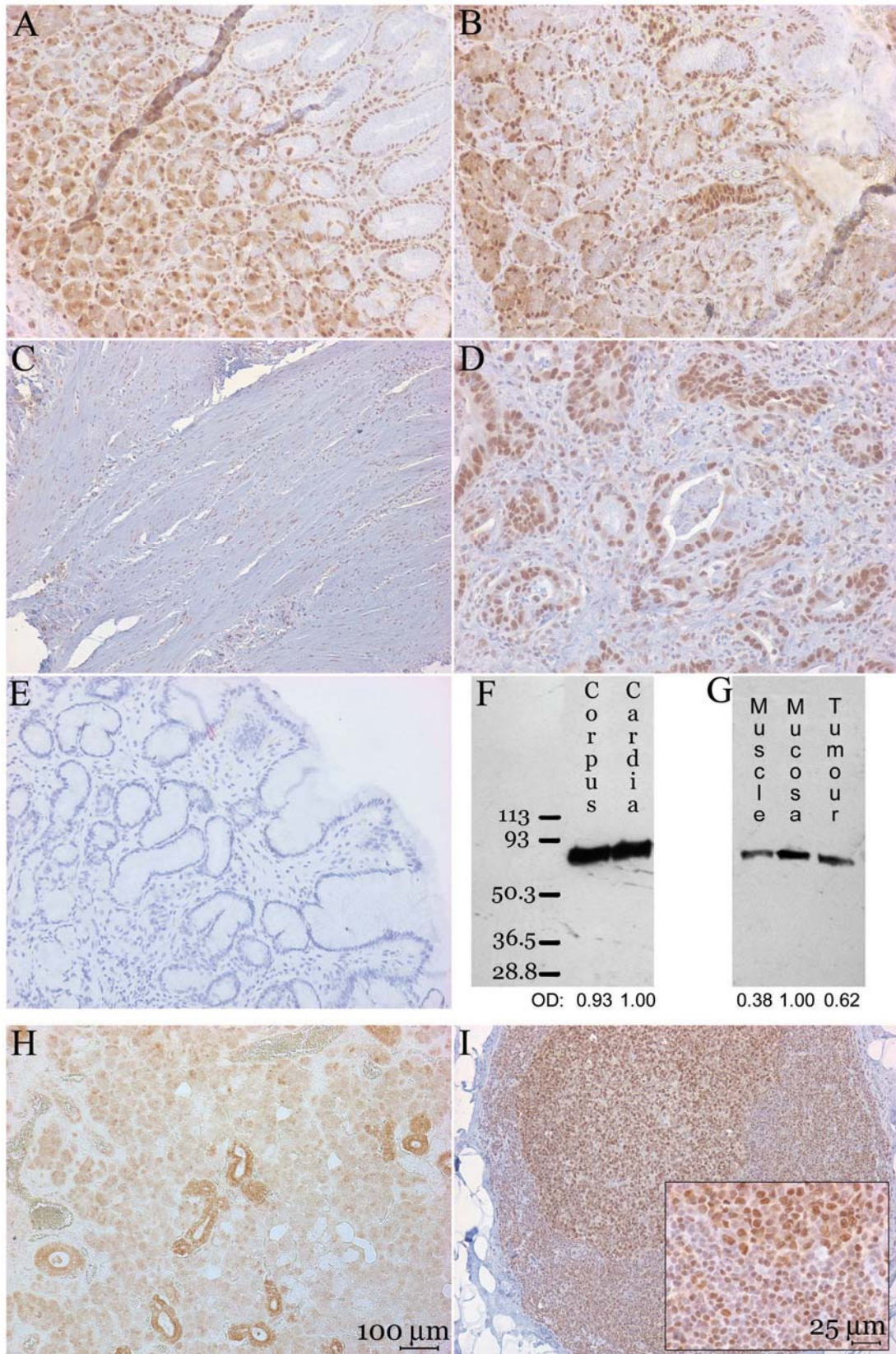
vastagbélmintát vizsgáltunk, és minden esetben az itt bemutatottal megegyező eredményre jutottunk.

A 7. ábra néhány további, a gastrointestinalis rendszer részét képező szerv TASK-3-specifikus jelölődését mutatja. Valamennyi itt demonstrált eredményt formalinban fixált és Tris-inkubációval történt AF-on átesett metszetről nyertük. A 7A és 7B ábrák a gyomor corpus (A) és antrum (B) mucosa rétegének TASK-3-specifikus jelölődését mutatják. Amint az tisztán megítélhető, a gyomor epithelialis sejtei is erőteljes TASK-3-specifikus reakciót mutattak. Az expresszió erőteljesnek bizonyult a cytoplasmában, valamint a magban vagy annak környékén egyaránt. Szöges ellentétben a gyomor nyálkahártyájában tapasztalt helyzettel, a simaizomréteg nem mutatott említésre méltó TASK-3 festődést, csupán az izomsejtek nuclearis-perinuclearis területén tapasztaltunk némi pozitivitást (7C ábra). A specifikus blokkoló (immunizáló) peptid jelenlétében immunreakciót megfigyelni nem tudtunk (7E ábra), ami az immunreakció specificitásának egyik lényeges bizonyítéka.

Igen fontosnak tűnik az a megfigyelésünk, ami szerint a rosszindulatúan elfajult sejtek is mutatnak TASK-3-pozitivitást. A 7D ábra egy közepesen differenciált gyomor adenocarcinoma TASK-3 expresszióját mutatja, ahol erőteljes TASK-3-specifikus jelölődés figyelhető meg a tumorsejtek felszínén és cytoplasmájában. Ezen túlmenően föltétlenül említésre érdemes még a daganatsejtek intenzív nuclearis-perinuclearis immunjelölődése is.

Western-blot kísérletek is történtek a gyomor különböző területeiről izolált szövetminták felhasználásával (7F és 7G ábrák). A 7F ábrán látható esetben a gyomor corpusából és cardiájából kimetszett, a gyomorfallal valamennyi rétegét tartalmazó szövetminta vizsgálata történt. Amint azt az egyes sávok optikai denzitás értékei mutatják, nem tapasztalhattunk érdemi különbséget ezen régiók TASK-3 expressziójának nagyságában.

A 7G ábrán demonstrált eredmények egy másik betegből származó szöveti preparátum felhasználása nyomán születtek. A bemutatott esetben három minta vizsgálatára került sor, amiket rendre az ép terület simaizomrétegéből, az ép terület nyálkahártyájából és a daganatszövetből metszettünk ki. A homogenizálásra szánt vizsgálati anyagokat abból a szövetblokkból készítettük, amelyikkel szomszédos területről a 7A-7E ábrákon bemutatott immunhisztokémiai vizsgálat történt. A Western-blot kísérletek megerősítették azt a korábbi megfigyelésünket, miszerint a rákosan elfajult szövetminták TASK-3 expressziót mutatnak (lásd 7D ábra).



7. ábra

TASK-3 specifikus jelölődés a gyomorban, glandula submandibularisban és egy nyálkahártyában található nyiroktüszőben.

Valamennyi itt bemutatott immunreakció formalinban fixált, beágyazott szövetblokkokból készített metszeten lett kivitelezve, a Tris-inkubációs antigénfeltárást követően. A H ábrán dokumentált esetben az

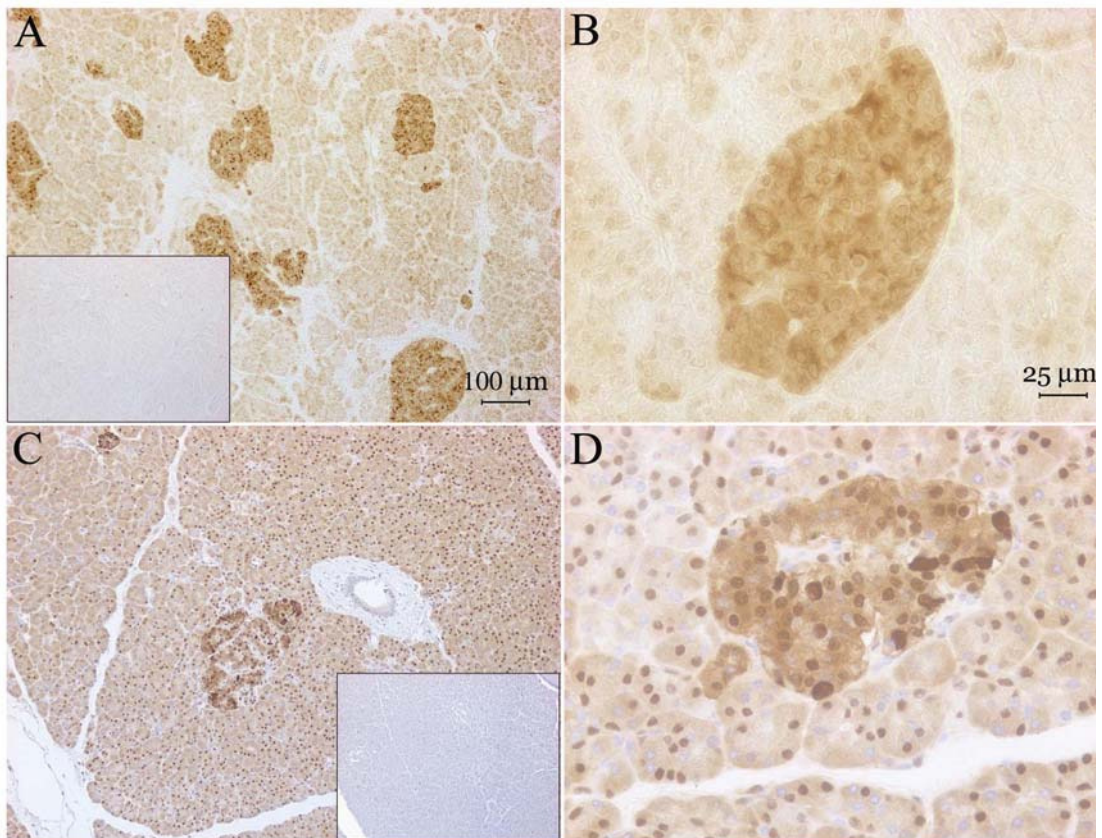
elsődleges antitest a Santa Cruz Biotechnology, Inc.-től származott, valamennyi többi esetben az Alomone Labs. Ltd. volt az ellenanyag forrása. Az A-E ábráson bemutatott metszetek ugyanazon gyomorból származnak (A: corpus nyálkahártya, B: antrum nyálkahártya, C: simaizomréteg, D: közepesen differenciált gyomorrák, E: preadszorpciós kontroll). Az F ábrarészen demonstrált Western-blot kísérlet egy más betegből eltávolított, fagyasztott, homogenizált gyomorszövet felhasználásával történt; a felhasznált szövetdarabokat az alkalmazott preparátum két különböző régiójából metsztük ki. A G kép egy másik Western-blot kísérlet eredményét foglalja össze (a vizsgálat alapjául az a szövetblokk szolgált, aminek immunhisztokémiai vizsgálatát az A-E ábrákon mutattuk be), külön homogenizátumot készítettünk a simaizomrétegből, a nyálkahártyanyúzatból és a daganatszövetből. Minden szimultán elvégzett Western-blot kísérlet során azonos mennyiségű protein felvitele történt; az egyes immunreaktív csíkok optikai denzitásának értékeit ugyancsak feltüntettük a maximális intenzitású csíkra vonatkoztatva. A H ábra a glandula submandibularis TASK-3 immunjelölődését mutatja, míg az I képen egy vastagbélben található lymphoid tüsző vizsgálatának eredménye figyelhető meg. A kisebb képen egy olajimmerziós felvétel látható. A H részen látható kalibráció valamennyi képre érvényes.

Mindösszesen 6 különböző személyből származó gyomorszövet vizsgálatára került sor, és minden esetben az itt bemutatottal megegyező eredményre jutottunk.

A 7H és a 7I ábrák néhány más szerv TASK-3 expresszióját mutatják. A 7H ábrán a glandula submandibularis TASK-3 expressziós mintázata látható, amiből kitűnik, hogy a ductalis epithelium mutatta a legintenzívebb jelölődést. A 7I ábra egy lymphoid tüszőt demonstrál, azon általános megfigyelésünket illusztrálva, miszerint a lymphocytákban egyértelmű TASK-3 pozitivitás volt demonstrálható.

A 8. ábra a pancreas területén tapasztalható TASK-3 jelölődést mutatja. Az A és B, valamint a C és D részeken demonstrált képek alapjául szolgáló szövetmintákat két különböző személyből eltávolított szövetblokkok felhasználásával nyertük. A felső sorban bemutatott reakciót a Santa Cruz, az alsó sorban elhelyezkedőket az Alomone által kifejlesztett anti-TASK-3 ellenanyagok alkalmazásával kaptuk. Mindkét esetben sor került a preadszorpciós kontroll kísérletek kivitelezésére is, amik eredményét a kisebb képeken mutatjuk be. A kontroll kísérletek a tényleges kísérletekkel egyidejűleg történtek, és a fényképezés során az expozíció paraméterei teljes mértékben megegyeztek a kontroll és a tényleges preparátum dokumentálása során.

Az pancreas esetében tapasztalható immunjelölődés eredményét összefoglalva elmondható, hogy bár mind az exocrin, mind az endocrin állomány egyértelmű TASK-3-pozitivitást mutatott, a Langerhans-szigetek festődése jelentősen intenzívebbnek bizonyult, mint az exocrin állomány jelölődése. Igen lényegesnek ítéljük azt a megfigyelést, miszerint a kötőszöveti állomány TASK-3-specifikus jelölődést nem mutatott, még akkor sem, ha a közvetlen környezetében elhelyezkedő mirigyállomány a rá jellegzetes, kifejezetten erőteljes reakciót mutatta.



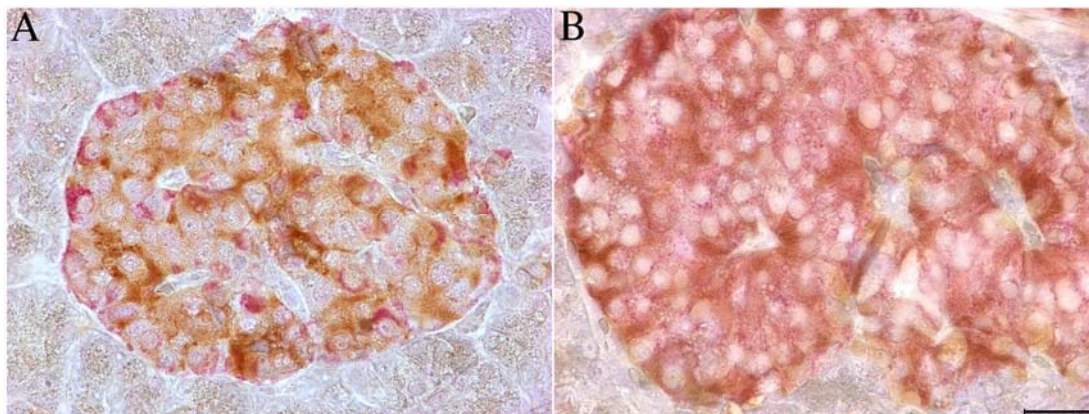
8. ábra

TASK-3 expresszió a pancreasban

Az A és B ábrák a Santa Cruz Biotechnology, Inc.; a C és D képek pedig az Alomone Labs. Ltd. fejlesztésével készített elsődleges ellenanyagok alkalmazásával készültek. Valamennyi esetben formalinban fixált, beágyazott szövetminták vizsgálata történt, a Tris-inkubációval végzett antigénfeltárást követően. A felső és az alsó sorban látható szövetminták két különböző betegből származtak. Az A és C ábrák a pancreas TASK-3 jelölődésének kis nagyítású képét: a B és D ábrák pedig a Langerhans-szigetek nagy nagyítással készült felvételét mutatják. Figyelmet érdemel az immunjelölődés teljes hiánya a kötőszöveti régióban, miközben a szomszédos exocrin és endocrin struktúrák igen intenzív jelölődést mutattak. A kisebb képek a preadszorpciós kontroll vizsgálatok eredményeit tükrözik. Az A és B képeken látható kalibráció az ábra C és D felvételeire is alkalmazható.

Bár az előzőekben demonstrált immunhisztokémiai vizsgálatok egyértelműen jelezték, hogy a pancreas hormontermelő sejtjei erőteljes TASK-3 expressziót mutatnak, kettős immunjelölést is végeztünk annak bizonyítására, hogy a TASK-3-specifikus reakció megfigyelhető az A- és a B-sejteken egyaránt. A 9. ábrán olyan kettős immunjelölés eredményét demonstráljuk, ahol az A-sejteket glukagon- (9A ábra), míg a B sejteket inzulin-ellenes (9B ábra) ellenanyaggal jelöltük (mélyvörös immunreakció); a TASK-3-specifikus jelölést mindkét esetben DAB segítségével hívtuk elő, azaz barna színnel rajzolódik ki. A vörössel festődött (tehát egyértelműen A- vagy B-sejtként azonosítható sejtek) határozottan immunopozitívnak bizonyultak a TASK-3-specifikus jelölés elvégzése után. Figyelmet érdemel még, hogy - teljes összhangban a klasszikus szövettani tankönyvek tanításaival - az A-sejtek száma lényegesen kevesebb volt az

egyes Langerhans-szigetekben, mint a B-sejteké; továbbá előbbieket elsősorban a szigetszövet perifériás részén, utóbbiak pedig döntően a centrális régióban voltak megfigyelhetők.



9. ábra

A Langerhans-szigetek A- és B-sejtjeinek TASK-3 expressziója

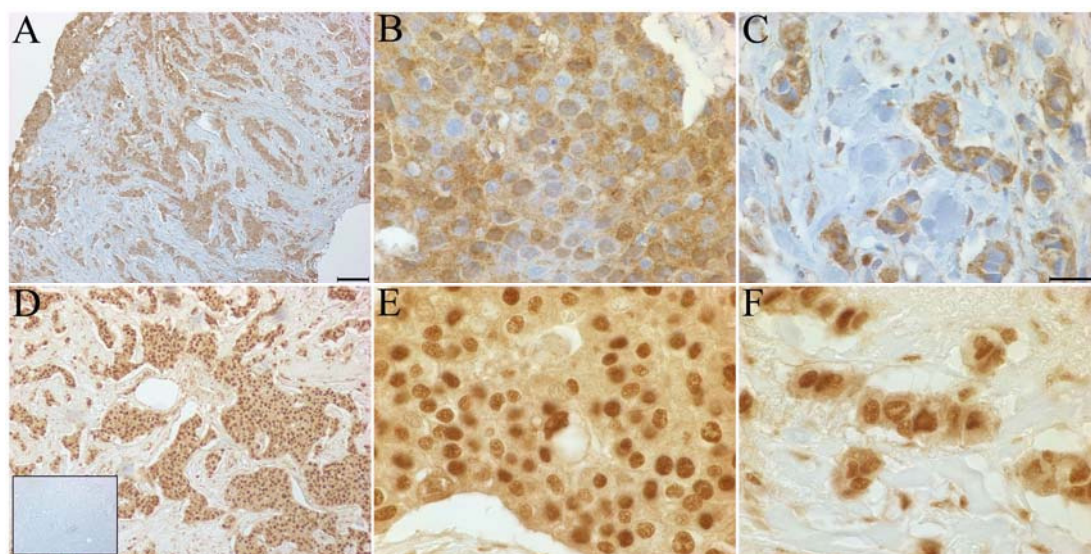
A kísérletek során az A-sejteket glukagon- (A), a B-sejteket inzulinspecifikus (B) elsődleges antitestekkel alkalmazásával jelöltük (mélyvörös szín); a TASK-3 specifikus immunreakció barna színű. Kalibráció 25 μ m.

Mindösszesen 5 különböző betegből származó szövetminta vizsgálatára került sor a jelen munka keretein belül, és valamennyi az itt bemutatottakhoz nagyban hasonló eredményt hozott (megjegyzésre érdemes, hogy egyik szövetminta sem származott olyan betegből, aki diabetes mellitusra utaló tüneteket mutatott volna).

3.3. A TASK-3 csatornák megoszlásának immunhisztokémiai vizsgálata emlődaganatokban

Amint azt a 7. ábrán bemutattuk, egyes gastrointestinalis tumorokban igen határozott TASK-3 jelölődést sikerült demonstrálni. A jelen tézisekben bemutatott eseten kívül egyértelmű TASK-3-specifikus reakciót tapasztaltunk még a vastagbél rosszindulatú daganataiban is. Mivel egyes emlőtumorokban a TASK-3 csatornák kódolásáért felelős gén overexpresszióját írták le (*Mu és munkatársai, 2003*), logikusnak tűnt annak vizsgálata, hogy megfigyelhető-e valamilyen összefüggés az egyes emlődaganatok szövettani típusa, grádusa, stádiuma, receptormintázata, prognosztikai faktorai és azok TASK-3 jelölődése között – feltéve, hogy a TASK-3 expressziót nekünk is sikerül demonstrálni ezen kóros szövetmintákon. A

vizsgálatokhoz olyan szövettani anyagokat használtunk, ahol mind a core-biopszia, mind az annak eltávolítását követő műtéti anyag rendelkezésre állt.

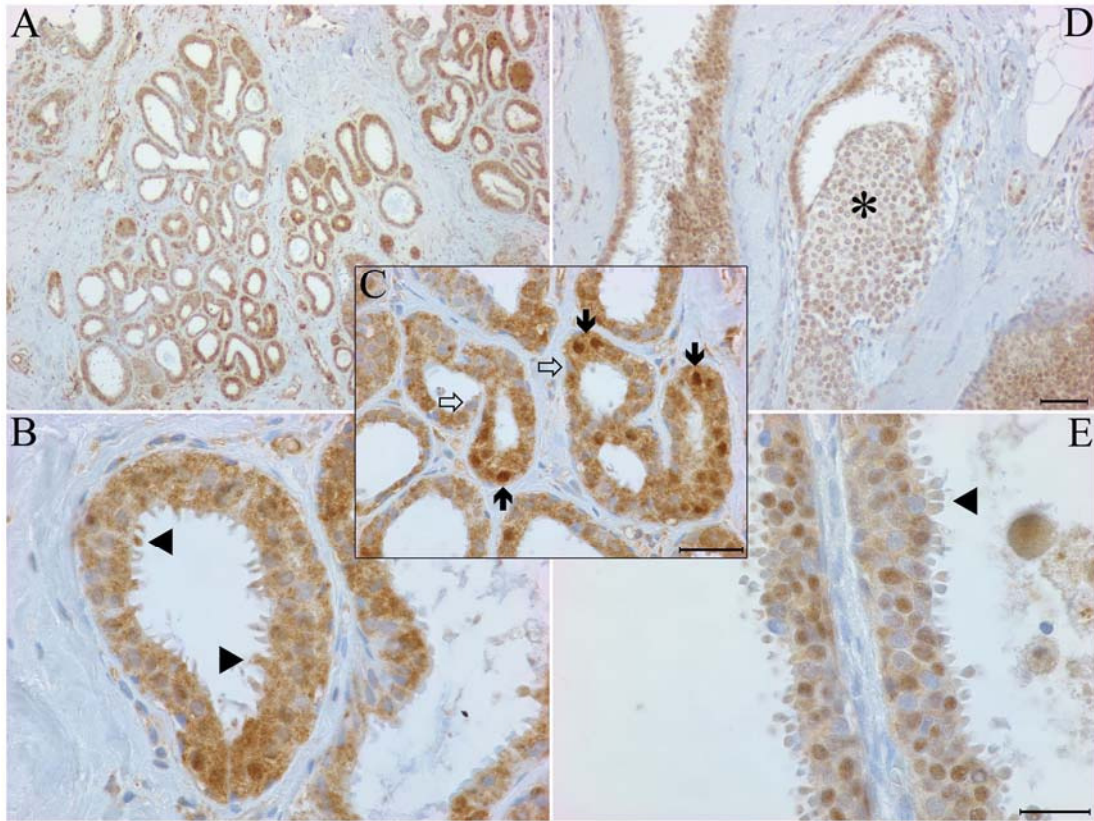


10. ábra

Ductalis emlőcarcinoma TASK-3 immunjelölődése

A felső ábrisor (A-C) a core-biopszia során eltávolított szövetmintát mutatja, az alsó képeken (D-F) ugyanazon beteg ugyanazon tumorszövet műtéti preparátumából származó metszetek láthatók. A D ábra részekén bemutatott bekeretezett kép a preadszorpciós kontroll vizsgálat eredményét demonstrálja. Kalibráció: 100 μ m és 25 μ m.

A 10. ábrán bemutatott szövettani anyagok egy 75 éves nőbetegből származnak. Az 10A-C képek a core-biopsziás anyagot, a 10D-F felvételek pedig a műtéti beavatkozás során nyert mintákat mutatják. Mivel mindkét esetben formalinos fixálás történt, a TASK-specifikus immunfestés kivitelezése előtt antigénfeltárást végeztünk. A kis nagyítású felvételek mindkét szövetmintában a daganatos szövet egyértelmű TASK-3 pozitívitasát mutatták, értékelhető immunreakció a kötőszövetes területeken nem volt megfigyelhető. A nagyobb nagyítású felvételeket összehasonlítva megállapíthattuk, hogy míg a core-biopsziás anyagban a TASK-3-jelölődés a tumorsejtek cytoplasmájában volt a legkifejezettebb, ugyanakkor a magok túlnyomó többsége egyértelműen negatívnak mutatkozott (10B és 10C); 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 immunjelölődést mutattak.

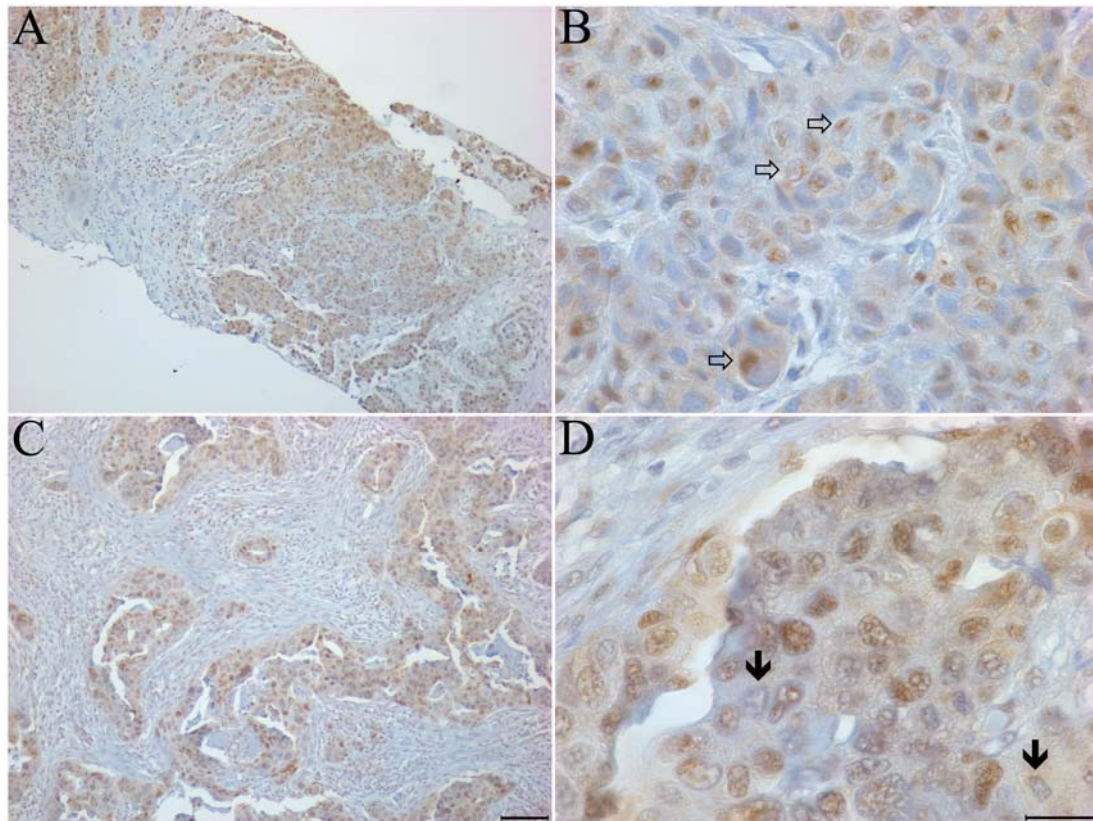


11. ábra
TASK-3 specifikus immunreakció megoszlásának vizsgálata
emlőszövetben.

Az A, B és C képek a core-biopsziás anyagon kivitelezett immunreakció eredményét mutatják, a D és E felvételeken ugyanazon beteg ugyanazon régiójából származó preparátum látható, amit műtéti körülmények között metszettek ki. A core-biopsziás felvételen jól megfigyelhető a mirigyállomány intenzív TASK-3 jelölődése. A B ábrán a nyílhegyek néhány olyan szekréciós hólyagra mutatnak, amikben tisztán kivethető a TASK-3 immunjelölődés. A C ábrán az üres nyilak TASK-3 negatív; a fekete nyilak TASK-3 pozitív sejtmagokat jelölnek. Az E fotón a nyílhegy jelentése megegyezik a B panel esetében demonstrálttal. Kalibráció: 100 μm és 25 μm .

A core-biopszia során és a műtétieltávolított szövetminta TASK-3 immunjelölődésében tapasztalt eltérést benignus elváltozások esetében is megfigyeltük. A 11. ábrán bemutatott emlőszövet egy 46 éves betegből származik; az ábra A és D része a core-biopszia és a műtéti preparátum TASK-3-specifikus immunjelölését mutatja kis nagyítással. Jól megfigyelhető, hogy a mirigyállomány egyértelmű és erős pozitivitást mutat mindkét esetben, és (hasonlóan az előző ábrán demonstrálthoz) a D ábrarészen látható *in situ* carcinoma (*) is határozott TASK-3 pozitivitást mutat. A nagyobb nagyítású felvételek alapján megállapítható, hogy bár mind a core-biopszia (B és C), mind a műtéti preparátum (E) esetében megfigyelhetők pozitívan és negatívan jelölődött sejtmagok egyaránt (a 11. ábra C részén világos nyilak jelölnek néhány egyértelműen negatív, sötét nyilak pedig két erősen pozitív jelölődést mutató magot), a

TASK-3 jelölődéssel bíró magvak aránya a műtéti anyagban lényegesen nagyobb volt. Függetlenül a mag által mutatott TASK-3-reakció intenzitásától, könnyen azonosítható és erőteljes TASK-3 jelölődést tapasztaltunk a cytoplasmában, ami a secretios tevékenységet mutató epithelium esetében az éppen lefűződő secretoros granulumokban is megfigyelhető volt (néhányat ezek közül nyílhegyekkel jelöltünk a 11. ábra B és E részén).



12. ábra

Ductalis invazív emlőcarcinoma TASK-3 expressziója

Az A és B képek core-biopsziás anyagon kivitelezett immunreakció eredményét mutatják, a C és D felvételeken ugyanazon beteg ugyanazon régiójából származó preparátum látható, amit műtéti körülmények között metszettek ki. A kis nagyítású felvételen jól megfigyelhető a mirigyállomány TASK-3 jelölődése, ami némileg kisebb intenzitású, mint a 10. és a 11. ábrán demonstrált. A B ábrán a nyilak olyan sejtekre mutatnak, ahol szembetűnő a TASK-3 pozitívítás kifejezetten perinuclearis jellege. A D ábrán két olyan sejtmagot jelöltünk, ahol nem látható TASK-3 expresszió; ugyanakkor környezetükben számos, egyértelműen pozitívan jelölődött mag figyelhető meg. Kalibráció: 100 μ m és 25 μ m.

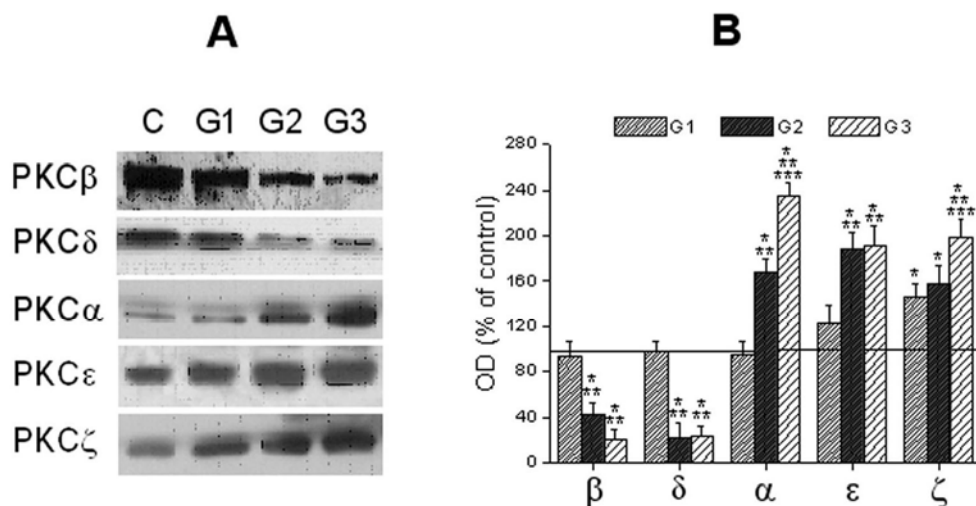
A jelen tanulmányban mindösszesen 42 szövettani mintát vizsgáltunk meg, és a core-biopsziás anyag és a műtéti szövetminta között fennálló, előzőekben részletezett különbség minden esetben megfigyelhető volt. Ugyancsak általánosnak bizonyult a daganatsejtek TASK-3-jelölődése (lokalizációját tekintve a cytoplasma, a sejtmag, a perinuclearis régió és a sejtfelszíni membrán említhető meg), bár a jelölődés

intenzitásában tapasztaltunk némi változatosságot. Ezt szemlélteti a 12. ábra, ahol a TASK-3 specifikus reakció egyértelmű, ám annak intenzitása némileg gyengébb, mint a 10. és a 11. ábrán bemutatott esetekben. A nagyobb nagyítású felvételeken jól megfigyelhető, hogy a sejtmagok kisebb százalékban expresszálják a TASK-3 fehérjét a core-biopsziás anyagban (12B ábra; a nyilak néhány olyan területre hívják fel a figyelmet, ahol a TASK-3-festődés markánsan perinuclearis lokalizációjú, ugyanakkor a mag egyértelműen negatív). A műtéti preparátumból származó szövet vizsgálata során láttunk ugyan TASK-3-jelölődést nem mutató sejtmagokat (12D ábra, nyilak), ám a nucleusok túlnyomó többségében pozitív festődés volt megfigyelhető.

3.4. A PKC-izoenzimintázat változása rosszindulatú húgyhólyagtumorokban

A húgyhólyagtumorokból izolált szövetminták Western-blot vizsgálata során megállapítottuk, hogy a húgyhólyagepithelium 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 PKC 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 (13. ábra).

Az immunreaktív csíkok denzitometriás vizsgálata megmutatta, hogy a G1 grádusú daganatokban csupán a PKC ζ izoforma mennyisége növekedett szignifikáns mértékben, és a többi izoenzim mennyisége változatlan maradt az egészséges szövetmintában tapasztalható mennyiséghez képest. Ezzel szemben a G2 és a G3 grádusú tumorokban már valamennyi jelenlévő izoforma esetében tapasztalható volt valamilyen statisztikailag is igazolható mértékű változás az ép szövethez képest. 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 ugyanakkor nem mutatkozott szignifikáns különbség a fenti PKC izoenzimek esetében.



13. ábra

A PKC izoenzimintázat változásai különböző grádusú húgyhólyagtumorokban

Ép (C) és tumorosan elfajult (G1, G2 vagy G3 grádusú) húgyhólyag epithelialis rétegéből készített szövethomogenizátumok felhasználásával végzett Western-blot vizsgálat (egy reprezentatív vizsgálat eredményét demonstrálja az ábra A része) és annak kvantitatív analízise (B). Az egyes PKC izoformák mennyiségének számszerűsítése céljából meghatároztuk az immunpozitív csíkok optikai denzitásának (OD) értékeit, majd azokat a kontroll szövetminta esetében tapasztalhatóra normalizáltuk (az ép szövetben kapott mennyiséget 100 %-nak tekintettük). Az oszlopok az átlag és a S.E.M értékeit tükrözik, amiket több, egymástól független vizsgálat eredményeként kaptunk. Egy csillag jelöli a kontrolltól statisztikailag szignifikánsan különböző eseteket ($p < 0,05$). Két csillaggal jelöltük a G1 és a G2/G3 stádiumú daganatok közötti szignifikáns különbséget. Három csillag a G2 és a G3 grádusú daganatok között tapasztalható, statisztikailag szignifikánsnak bizonyult differenciát jelöli.

Ettől gyökeresen eltérő eredményt hozott a másik három PKC izoforma vizsgálata, ugyanis valamennyi fennmaradó változat határozott és statisztikailag is igazolható növekedést mutatott a carcinoma előrehaladottságával. Érdekes módon, szemben a cPKCα és az aPKCζ izoformákkal, amelyek mennyisége fokozatosan növekedett a tumor grádusának előrehaladásával, a nPKCε mennyisége ugyan szignifikánsan nagyobb volt a G2 és a G3 grádusú tumorok esetében, mint a kontroll és a G1 stádiumban lévő daganatokban, ám mennyisége a G2 és a G3 stádium között már nem változott.

4. MEGBESZÉLÉS

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

A jelen disszertáció egyik igen lényeges megállapítása, hogy a rendelkezésre álló antitestekkel lehetséges a TASK-3 expresszió kimutatása formalinban fixált és beágyazott metszeteken is, ám a valóságot hűen tükröző jelölődés csak akkor várható, ha az immunhisztokémiai metódus alkalmazását megfelelő antigénfeltárás előzi meg. Az antigénfeltárás nélkül vagy a nem megfelelő technika alkalmazásával kivitelezett reakció csupán igen gyenge festődést (esetleg álnegatív jelölődést) eredményezhet. Ezen megfigyelésünk igen jó összhangban áll azzal az általánosan elfogadott megállapítással, miszerint az immunhisztokémiai vizsgálatok reakciókörülményeinek kidolgozása során a formalinban fixált preparátumok esetében különös figyelmet kell szentelni az optimális antigénfeltárási technika megtalálásának (*Montero, 2003*).

A technikai részleteken túlmenően, a jelen munka keretében azt is sikeresen demonstráltuk, hogy a TASK-3 csatornák olyan szövetekben is nagy jelentőséggel bírhatnak, ahol csak viszonylag kis koncentrációban detektálták a TASK-3-specifikus mRNS-t (*Medhurst és munkatársai, 2001*). Vizsgálataink egyértelműen rámutattak, hogy a TASK-3-csatornák jelen vannak a humán gastrointestinalis rendszerben, ahol elsősorban az epithelialis sejtek 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.

A TASK-család különböző tagjainak szöveti megoszlására és lehetséges funkcióira vonatkozó vizsgálatok kezdenek a tudományos laboratóriumok érdeklődésének homlokterébe kerülni. A csatornák első leírása után a kutatók hajlottak arra, hogy ezen proteinmolekulákat ubiquiter megjelenésűeknek tartsák, hozzájuk a membrán nyugalmi K^+ -permeabilitásának fenntartásán túlmenően más funkciókat nem kötöttek, így a nyugalmi membránpotenciál fenntartásáért felelős „szürke eminenciásokként” kezdték őket emlegetni. A specifikus és egyre kiterjedtebb vizsgálatok azonban felhívták arra a figyelmet, hogy ezt a szemléletmódot minden

bizonytal módosítani kell. Fény derült arra, hogy a TASK-család egyes képviselői igen lényeges és specifikus élettani regulatórikus funkcióval rendelkeznek (példaként említhető az apoptózis-, a légzés- és az aldosteronszekréció szabályozása).

A TASK-csatornák mellett a klinikumban dolgozók sem mehetnek el közömbösen, hiszen a legújabb adatok szerint ezen molekulák jelentenék az inhalációs anesztetikumok oly régen (mindeddig sikertelenül) keresett célpontjait. A TASK-csatornák „unalmas” minősítésére mért legújabb, és kétségtelenül az egyik legjelentősebb csapás a TASK-3 csatornák onkogén potenciáljának felismerése volt. A legújabb vizsgálatok alapján bizonyítást nyert, hogy egyes rosszindulatú daganatokban a TASK-3 kódolásáért felelős génszakasz overexpressziója figyelhető meg; sőt, egy modellrendszerben azt is igazolni lehetett, hogy a működőképes (azaz K^+ -ra permeábilis) TASK-3 csatornának onkogén potenciálja van.

Ezen felismerések után nyilvánvalóvá vált, hogy a TASK-csatornák (és különösen a TASK-3 csatornák) igen komoly jelentőséggel bírhatnak a patológusok számára is, és a világ több laboratóriumában szinte egyidejűleg kezdődtek el azok a kísérletek, amelyek a TASK-3 csatornák jelenlétének, expressziós mintázatának és ezek változásainak vizsgálatát tűzték ki célul különböző rosszindulatú daganatokban.

Mivel a TASK-3-specifikus ellenanyagok immár hozzáférhetőek a kereskedelmi forgalomban, az ilyen és ehhez hasonló vizsgálatok elkezdése viszonylag egyszerű. Nyilvánvaló tény, hogy az immunhisztokémiai vizsgálatok kivitelezése a fagyasztott preparátumokon kecséget a legjobb eredménnyel, ám ilyen metszetekre szert tenni és azokat vizsgálni a patológiai rutinfeladatok mellett gyakorlatilag lehetetlen. Ebben a helyzetben az egyetlen működő alternatívát a formalinnal fixált és beágyazott szövettani preparátumok alkalmazása jelentheti. A formalinos fixálásnak azonban (legyen az bármennyire elterjedt és népszerű) van egy igen komoly hátránya, amit nem szabad szem elől téveszteni az immunhisztológiai vizsgálatok kivitelezése során. Ismeretes, hogy a fixáló hatóanyaga a formaldehid a szokásosan alkalmazott foszfátpufferben feloldva metilén-glikollá alakul, ami a fehérjeláncok különböző oldalláncai között metilénhidakat alakít ki (ez a reakció felelős a tulajdonképpeni fixálásért). Számos oldallánc vehet részt ezen keresztkötések kialakításában; egyebek között az amino-, imino-, amido-, peptid-, guanidil-, karboxil- és SH-csoportok, továbbá az aromás gyűrűk (*Nitschmann és Hadorn, 1944; Fraenkel-Conrat és munkatársai, 1947; Fraenkel-Conrat és Olcott, 1948a, 1948b; Fraenkel-Conrat és Mecham, 1949*). Határozott probléma viszont, hogy ezen keresztkötések nem pusztán stabilizálják és

rögzítik a fehérjemolekulákat (azaz fixálnak), hanem olyan jelentős mértékben megváltoztathatják az eredeti fehérjemolekula struktúráját, hogy azok reakciókészsége a rájuk specifikus ellenanyagokkal számottevő mértékben csökkenhet (akár meg is szűnhet); gyenge vagy álnegatív immunjelölődést eredményezve. Ezen problémák orvoslására egy lehetőség nyílik: valamilyen antigénfeltárási technikát kell alkalmazni. Ezen metódusok általában a pH megváltoztatásával (akár csökkentve, akár növelve azt), a hőmérséklet emelésével, valamilyen proteolitikus enzim alkalmazásával, esetleg ezek kombinációjával próbálják meg a fixált fehérjemolekulák elfedett epitópjait újra hozzáférhetővé tenni a megfelelő ellenanyag számára (*Bell és munkatársai, 1987*).

A jelen munkában kipróbált és alkalmazott antigénfeltárási technikák bevált és gyakorta alkalmazott módszerek a mindennapos hisztopatológiai gyakorlatban (*Shi és munkatársai, 1991; Shi és munkatársai, 1996*). Az eredmények egyértelműen rámutattak, hogy a TASK-3 csatornák immunhisztokémiai detektálása céljára a Tris-pufferben történő inkubáció és a hőkezelés kombinálása jelenti az optimális technikát; konzisztens, megbízható és reprodukálható eredményt adva, ahol a megfigyelt immunfestődés teljesen megfelelt a fagyasztott preparátumban tapasztalható mintázatnak.

A jelen tanulmányban külön figyelmet fordítottunk az antigénfeltárási alkalmazhatóságának ellenőrzésére, hiszen a technika nem megfelelő megválasztása és alkalmazása álpozitív vagy álnegatív reakciókat egyaránt eredményezhet. Az AF ellenőrzése során részben a jól ismert TASK-3 megoszlási mintázattal rendelkező humán cerebelláris szövetet alkalmaztuk pozitív kontrollként, részben összevetettük a TASK-3 jelölődést a fagyasztott preparátumokból készített (azaz megőrzött epitópokat tartalmazó) metszeteken, valamint az ugyanazon blokkból készült, de rutin hisztopatológiai eljáráson átesett mintákon, az AF elvégzése után. Előbbi esetben a várt jelölődési mintázatot tapasztaltuk, utóbbiban pedig mutatkozott ugyan némi különbség az immunreakciók intenzitásában, ám azok megoszlása teljes mértékben megegyezett. Fontos megjegyezni, hogy bár a beágyazott metszeteken kivitelezett reakció intenzitásának csökkenése észrevehető volt, az a vizsgálatok értékelését érdemben nem zavarta. A megfelelő antigénfeltárási technika alkalmazása és az így kapott immunreakció megoszlásának teljes összhangja egyértelműen arra utalt, hogy az a megfigyelésünk, miszerint a TASK-3-specifikus immunreakció egyes szöveti struktúrákból hiányzik (pl. simaizomsejtek), nem a detektálási módszer hiányosságainak vagy az epitópok módosulásának következménye.

Mindezek mellett meg kell azonban emlékezni egy másik igen lényeges (és gyakorta előforduló) hibaforrásról: az álopozitív reakció kialakulásáról. Az álopozitív reakció hátterében egyértelműen az alkalmazott antitestek nem megfelelő specificitása áll. Sajnálatos módon, ez a probléma még manapság is kísérti az immunhisztokémiával foglalkozókat, annak ellenére, hogy az alkalmazott ellenanyagok túlnyomó részét az arra specializálódott cégek állítják elő. A legjobb szándék és a leg gondosabb elővizsgálatok ellenére előfordulhat azonban egy addig fel nem ismert keresztreakció, amikor a primer antitest nem csupán a célproteint ismeri fel, hanem valamilyen más molekulához is kötődik. A fenti okból kifolyólag, és mivel ez az első olyan tanulmány, ahol a TASK-3 csatornák megoszlási mintázatának vizsgálata történt a humán gastrointestinalis rendszerben, különösen nagy figyelmet kellett fordítanunk az immunjelölődés specificitásának ellenőrzésére.

Állatkísérletek esetében a leghitelesebb technika az alkalmazott antitestek specificitásának vizsgálatára a „knock-out” állatok létrehozása, hiszen az ilyen szöveteken kivitelezett immunjelölés negatív eredménye egyértelműsíti az ellenanyag specificitását. Emberi szövetek vizsgálata során (vagy életfontos fehérje tanulmányozása esetén, amikor a knock-out állat életképtelen) ez a módszer természetesen nem használható, ezért megfelelő alternatívákat kell alkalmazni. Mivel a további, specificitást ellenőrző és azt megerősítő kísérletek nem olyan döntő határfokúak, mint a knock-out állatok alkalmazása, a jelen munkában több ilyen technikát is alkalmaztunk, hogy azok együttesen elegendően egyértelműen jelezzék az itt vizsgált immunreakciók specificitását.

Igen komoly megerősítést jelentette az eredményeinknek, hogy a vizsgálatokhoz két elsődleges antitestet használtunk, amik a csatornafehérje két különböző, egymástól igen messze található epitópja ellen irányultak (egyik kötőhely az N-, a másik a C-terminális területén található; egyikük a csatorna extra- a másikuk pedig annak intracelluláris részén). Az a megfigyelésünk, miszerint a két antitest alkalmazásával kivitelezett reakciók teljesen megegyező festődési mintázatot adtak, azokban csak intenzitásbeli különbség volt tapasztalható, feltétlenül arra utal, hogy ugyanazon fehérjemolekulák jelenlétét detektálták, hiszen annak elhanyagolhatóan csekély a valószínűsége, hogy a két különböző ellenanyag aspecifikus módon teljesen azonos struktúrákat ismerjen fel.

Ugyancsak értékes, a primer antitestek specifikus kötődését megerősítő adatként interpretálható azon megfigyelésünk, miszerint a primer antitesteket a nekik megfelelő

immunizáló peptiddel előinkubálva értékelhető immunjelölődés nem jelentkezett. Ezen preadszorpciós kontroll vizsgálatokat minden alkalmazott preparátumon elvégeztük; sőt amennyiben ez lehetséges volt, akkor fagyasztott metszeteken is. Ha a formalinnal fixált minták vizsgálatára került sor, akkor ezek a kontroll vizsgálatok minden esetben a leghatékonyabbnak talált antigénfeltárási technika, azaz a Tris-pufferben történő inkubáció után történtek. Természetesen a preadszorpciós kontroll azt nem zárja ki, hogy az elsődleges antitest valamilyen más proteinhez ne kötődne (aminek van egy olyan epitópja, ami nagyban hasonlít a vizsgált fehérje célepitópjára), ám azt egyértelműen jelzi, hogy az immunhisztokémiai jelölés során az ellenanyag a specifikus, epitópfelismerő régiójával kapcsolódik a célfehérjéhez. Az előző bekezdésben részletezett kísérleti eredménnyel kombinálva azonban ez a vizsgálat is igen meggyőzően igazolja az elvégzett reakció specifikus voltát.

A fenti vizsgálatok mellett Western-blot kísérletekre is sor került. A Western-blot technika alkalmazását részben az indokolta, hogy megvizsgáljuk, vajon a felhasznált antitestek alkalmasak-e „lineáris” epitópok detektálására. A Western-blot vizsgálatok számos igen érdekes (és nagyban megnyugtató) eredményt hoztak. Kiderült, hogy mindkét elsődleges antitest alkalmas ezen vizsgálatok kivitelezésére, azaz nem pusztán „konformációs” epitópok ellen irányulnak. A másik lényeges megállapítás, hogy a Western-blot vizsgálatok után végzett denzitometria eredménye teljes összhangban állt az immunhisztokémiai adatokkal. Némileg meglepő módon, a Western-blot vizsgálatok során a csatornafehérje dimer változatának megfelelő magasságában (kb. 84 kDal) jelentkezett a legintenzívebb csík. A reakciókörülmények (és a fehérjepreparátum készítésének) módosításával sikerült ugyan a monomer fehérjemolekulát detektálni, azonban a dimer változat még ebben az esetben is nagyobb mennyiségben volt jelen. Fontos megjegyezni, hogy mind a monomerként, mind a dimerként azonosítható csík eltűnt a primer antitestek blokkoló peptiddel történő előinkubációja után.

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

A jelen vizsgálat sorozat eredményeinek értelmezése és diszkussziója nem nélkülözheti az általunk leírt TASK-3 megoszlási mintázat esetleges funkcionális relevanciájának taglalását. Ismeretes, hogy a vastagbél nyálkahártyája által termelt

szekrétrum K^+ -koncentrációja magas. A mai napig nem teljesen világos azonban, hogy egészen pontosan milyen K^+ -csatornák felelősek az apicalis és a basolateralis membránon történő K^+ -forgalom biztosításáért (a témáról kiváló áttekintést ad *Kunzelmann és Mall, 2002*). A jelenleg elfogadott nézet szerint a vastagbél K^+ -szekréciójának biztosításában ún. „maxi” és „ROMK”-típusú K^+ -csatornák vehetnek részt, de a folyamatba bevont egyéb K^+ -csatornákra vonatkozó információk igen hézagosnak mondhatók. Az intestinalis epithelium membránjában bizonyos cAMP- és Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák funkciója tűnik a leglényegesebbnek, ám egyéb (így pl. a TASK-3) csatornák szerepe sem zárható ki, különösen a jelen disszertációban részletezett kísérleti adatok tükrében.

A pancreasban számos érdekes funkció tételezhető fel a TASK-csatornák vonatkozásában. Ismert, 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 számára a szükséges hajtóerőt. A folyamatban egyes Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák jelentőségét már leírták (*Kim és Greger, 1999; Köttgen és munkatársai, 1999*), de a jelen disszertációban részletezett megfigyelések arra utalnak, hogy a TASK-3 csatornák is szereppel bírhatnak a pancreas ductalis rendszerének Cl^- -szekréciójában.

A disszertáció egyik legérdekesebbnek tűnő megállapítása az a megfigyelés, miszerint az inzulinális sejtek jelentékeny TASK-3 expressziót mutatnak, azaz komoly jelentőségük lehet az inzulin- és/vagy glukagonszekréció szabályozásában. A jelenleg általánosan elfogadott elmélet szerint az inzulinszekréció szabályozásában az ATP-szenzitív K^+ -csatornák játszanak meghatározó szerepet. A folyamat kulcsfontosságú eleme, hogy az extracelluláris glükózkoncentráció növekedését a B-sejtek ATP-szintézisének fokozódása követi, aminek révén az intracelluláris ATP-koncentráció emelkedése következik be. Ezen folyamat eredményeként a sejtfelszíni membrán ATP-szenzitív K^+ -csatornái záródnak, ami a sejtek depolarizációjához vezet. A membránpotenciál csökkenése a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák megnyílását okozza, lehetővé téve a Ca^{2+} cytoplasmába történő áramlását, ami az inzulinszekréció közvetlen induktora. Önként kínálkozik a feltételezés, hogy a B-sejtek membránjában található TASK-3 csatornák egy jelentős repolarizációs erőt jelenthetnek, azaz az inzulinszekréció egyik „fékjeként” komoly jelentőségűek lehetnek a hormonszekréciót szabályozó mechanizmusok között. Bár az itt felvetett hipotézist közvetlenül támogató kísérletes eredményeknek még híján vagyunk, közvetett bizonyítékként megemlíthető

az a hosszú ideje ismert, ám mindmáig megmagyarázatlan megfigyelés, miszerint az extracelluláris pH változásai hatást gyakorolnak a B-sejtek inzuliszekrécijára (*Hutton és munkatársai, 1980*). 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 inzuliszekrécio-fokozódás kialakulásában.

A fentiekben részletezett megfigyelések komoly klinikai jelentőséggel bírhatnak. A TASK-3 csatornák onkogén potenciáljából kiindulva (*Mu és munkatársai, 2003; Pei és munkatársai, 2003*) felmerült ugyanis, hogy az ezen csatornákat gátló anyagok – egyebek között a ruténium-vörös (*Czirják és Enyedi, 2003b*) – daganatellenes szerként megjelenhetnek majd a rosszindulatú tumorok terápiájában. A disszertációban részletezett megfigyelések alapján azonban úgy tűnik, hogy ezen szerek alkalmazása során ezidáig nem feltételezett 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?

Összhangban más szerzők adataival azt tapasztaltuk, a TASK-3 csatornák jelen vannak tumoros szövetekben is. A vizsgálatok malignus daganatokra vonatkozó részét abban a reményben végeztük, hogy talán sikerül majd összefüggést találni a tumorok hisztológiai típusa, prognosztikai faktorai és azok TASK-3 mintázata (vagy a jelölődés erőssége) között. Nem kis csalódásunkra ilyen összefüggést (eddig legalábbis) nem találtunk, ám sikerült rávilágítani egy nagyon érdekes jelenségre, aminek pontos tisztázása még nyilvánvalóan sok munkát fog igényelni. Megállapítottuk, hogy a core-biopsziák formájában nyert szövetmintákban a TASK-3 jelölődés döntően cytoplasmaticus, az a magot legnagyobb részét 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 (*Girard és munkatársai, 2002; Rusznák és munkatársai, 2004*). Igen figyelemre méltónak ítéljük, hogy a TASK-3 jelölődés nagyon gyakran kifejezett perinuclearis rajzolatot mutatott, ami arra utalhat, hogy a csatornák megtalálhatók a maghártya közelében, esetleg annak részét képezhetik. Továbbra sem világos azonban ezen csatornák funkciója az intracelluláris membránokban. Felmerül, hogy egy könnyen hozzáférhető és gyorsan mobilizálható „tartalékot” jelentenek az itt elhelyezkedő TASK-3 csatornák, amiket a sejt szükség eselén igen gyorsan tud rendeltetési helyükre szállítani. Az sem kizárható azonban, hogy az endoplasmaticus reticulumban már kifejezett funkcióval bírnak. Érdeemes megjegyezni, hogy a témával foglalkozó kutatók továbbra is sikertelenül keresik azon ioncsatornákat, amelyek az endoplasmaticus reticulumból történő Ca^{2+} -felszabadulás során a kifelé elmozduló pozitív töltések által keltett töltésmegoszlás kiegyenlítését hivatottak végezni. Az erre a kérdésre vonatkozó kísérleteknek igen súlyos (jelenleg megoldhatatlan) metodikai nehézségét az jelenti, hogy az intracelluláris membránok nem vizsgálhatók a klasszikus mikroelektroda-technikával, ennél fogva kizárólag hipotézisek léteznek az említett csatornák mibenlétére vonatkozólag. Mindezek alapján nem kizárható, hogy a TASK-csatornák jelentik az endoplasmaticus reticulum „leak”-csatornáit.

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 - válasz a humán szövetmintákon végzett fluoreszcens immunjelölés és a konfokális mikroszkópia alkalmazásától remélhető.

Természetesen nem mellőzhető a core-biopsziás anyagban és a műtéti preparátumban tapasztalt megoszlásbeli különbség lehetséges okának diszkussziója sem. Mivel mind a vizsgált szövet minősége, mind az immunjelölés kivitelezése teljesen azonos a demonstrált két esetben, a 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, ráadásul az így eltávolított anyag mérete miatt a fixáló igen gyorsan átjárja a szövetet. 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 feltételezés azért tűnik kecsegtetőnek, mert az egyik szerzőcsoport vélekedése szerint a TASK-3-csatornák szerepet játszanak a perifériás kemoreceptorok hipoxiára adott válaszreakciójában (*Buckler és munkatársai, 2000*); mások pedig a TASK-3 csatornákat összefüggésbe hozták a sejtek (elősorban a tumorsejtek) fokozott hipoxiatűrő képességével; a pH változásainak TASK-csatornákra kifejtett hatása pedig már hosszabb idő óta ismert.

Egy további lehetőség, ami ugyancsak figyelmet érdemel a gáznemű altatószerek alkalmazásával kapcsolatos. Több szerző beszámolt arról, hogy a halotán és más gáznemű anesztetikumok a TASK-csatornákra közvetlenül hatnak; nevezetesen aktiválják azokat (*Patel és munkatársai, 1999; Lesage és munkatársai, 2000*), ily módon hyperpolarizálva a neuronokat, ami végül a narkózis kialakulásához vezet. A jelen munkában bemutatott eredmények alapján az sem kizárható, hogy a gáznemű anesztetikumok nem csupán hatnak a TASK-csatornákra, de azok transzlokációját is indukálhatják.

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 vizsgálatok arra derítettek fényt, hogy a tumor előrehaladásával a PKC β és δ izoenzimek mennyisége csökkent, míg a PKC α , ϵ és ζ ezzel ellentétes irányú változást mutatott. A megfigyelések arra utalnak, hogy (hasonlóan más szövetekhez, *Mischak és munkatársai, 1993; Goodnight és munkatársai, 1994; Bamberger és munkatársai, 1996; Franz és munkatársai, 1996; Neill és munkatársai, 2003; Selzer és munkatársai, 2003; Koren és munkatársai, 2004*) 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; a „konvencionális” vagy Ca^{2+} -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 leírt és itt tapasztalt módosulások nem egyszerűen az egyes csoportok aktiválódási körülményeinek változásaival hozhatók összefüggésbe, hanem olyan eltérésekkel is, amelyek képesek az egyes izoformák megjelenését szelektív módon befolyásolni.

Fontos megjegyezni, hogy ezidáig rajtunk kívül csupán egyetlen munkacsoport vizsgálta a PKC izoenzimintázat változásait a hólyag rosszindulatú daganataiban (*Koren és munkatársai, 2000; Langzam és munkatársai, 2001*). Bár megfigyeléseink egy része teljes hasonlóságot mutat az idézett szerzőcsoport eredményeivel (a cPKC β és a nPKC δ mennyiségének csökkenése, valamint az aPKC ζ mennyiségének fokozódása a tumor előrehaladásával), néhány adat mutat némi eltérést a két munkacsoport esetében. Ezek sorában megemlítendő, hogy szemben a Koren és munkatársai (*2000*) és a Langzam és munkatársai (*2001*) által leírtakkal, a jelen vizsgálatban jelentős változást tapasztaltunk a cPKC α és a nPKC ϵ mennyiségében (föltétlenül megemlítendő ugyanakkor, hogy a nPKC ϵ vizsgálata nem képezte tárgyát az idézett tanulmányoknak). Ugyancsak lényegesnek tűnő differenciát jelent a két tanulmány között, hogy (szemben az idézett közleményekkel) az általunk vizsgált szövetmintákban a nPKC η jelenlétét nem tudtuk igazolni.

Természetesen számos lehetőség mérlegelendő ezen különbségek értelmezése, azok okainak keresése során, és nem zárhatók ki az eltérő antitestek alkalmazásából, a technikai különbözőségekből és az esetleges geográfiai-populációgenetikai differenciákból származó eltérések. Mérlegelést érdemel azonban két további tényező, ami ugyancsak magyarázhatja az említett különbségeket. Egyrészt az idézett munkákban a G1 és G2 grádusú minták pTa stádiumú, a mi vizsgálatainkban pedig pT1 és pT2 stádiumú daganatokból lettek eltávolítva. Ezen túlmenően, Langzam és munkatársai (*2001*) olyan mintákon végezték a Western-blot analízist, amihez a teljes tumorszövet homogenizálása után jutottak, így eredményeik a tumorszövet mesenchymális eredetű részeinek viselkedését is tükrözik. Ettől jelentősen eltérően, a mi vizsgálatainkban a hólyagfal epithelialis rétegét elválasztottuk az alatta található szöveti régióktól, így a disszertációban szereplő megállapítások kizárólag az epithelialis rétegre vonatkoznak.

Mindent összevetve megállapítható, hogy a PKC izoenzimintázat jelentős eltérést mutat a különböző grádusú hólyagtumorokban. Ha az itt bemutatott tendenciákat sikerül megerősíteni, esetleg még a jelenleginél is nagyobb esetszám felhasználásával tovább finomítani azokat, 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 keletkezésével, amik kifejezetten ubiquiternek tekinthetők, szerteágazó fiziológiás és patológias funkciókkal rendelkeznek. A kérdéses fehérjék (PKC és TASK) 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 izoenzimtípusok 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 arra is rámutatnak, hogy (bár a TASK-3 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 igencsak realista megállapítást erősítik meg, hogy a rendelkezésre álló és folyamatosan növekvő mennyiségű kísérletes adat ellenére fájdalmasan keveset tudunk a daganatok keletkezéséről, és 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.

6. A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- Adrian R.H. (1969) Rectification in muscle membrane. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 19: 340-369.
- Amigorena S., Choquet D., Teillaud J.L., Korn H., Fridman W.H. (1990) Ion channels and B cell mitogenesis. *Mol. Immunol.* 27: 1259-1268.
- Ashmole I., Goodwin P.A., Stanfield P.R. (2001) TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflügers Arch.* 442: 828-833.
- Baier G., Telford D., Giampa L., Coggeshall K.M., Baier-Bitterlich G., Isakov N., Altman A. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 268: 4997-5004.
- Bamberger A.M., Bamberger C.M., Wald M., Kratzmeier M., Schulte H.M. (1996) Protein kinase C (PKC) isoenzyme expression pattern as an indicator of proliferative activity in uterine tumor cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 123: 81-88.
- Bang H., Kim Y., Kim D. (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* 275: 17412-17419.
- Banks M.I., Pearce R.A., Smith P.H. (1993) Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J. Neurophysiol.* 70: 1420-1432.
- Bell P.B. Jr, Rundquist I., Svensson I., Collins V.P. (1987) Formaldehyde sensitivity of a GFAP epitope, removed by extraction of the cytoskeleton with high salt. *J. Histochem. Cytochem.* 35: 1375-1380
- Bikle D.D., Ng D., Tu C.L., Oda Y., Xie Z. (2001) Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177: 161-171.
- Boczán J., Boros S., Mechler F., Kovács L., Bíró T. (2000) Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol.* 99: 96-104.
- Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F., Kovács L. (2001) Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* 102: 55-62.
- Bollag W.B., Ducote J., Harmon C.S. (1993) Effects of the selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-7549, on the proliferation of cultured mouse epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 100: 240-246.
- Brodie C., Kuperstein I., Ács P., Blumberg P.M. (1998) Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. *Mol. Brain Res.* 56: 108-117.
- Brown H.A., DiFrancesco D., Noble S. (1979) Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.* 81: 175-204.

- Brown H.A., DiFrancesco D. (1980) Voltage clamp investigations of currents underlying pacemaker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 308: 331-351.
- Buckler K.J., Williams B.A., Honore E. (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* 525: 135-142.
- Cacace A.M., Guadagno S.N., Krauss R.S., Fabbro D., Weinstein I.B. (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 8: 2095-2104.
- Catterall W.A. (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *TINS* 16: 500-506.
- Chavez R.A., Gray A.T., Zhao B.B., Kindler C.H., Mazurek M.J., Mehta Y., Forsayeth J.R., Yost C.S. (1999) TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J. Biol. Chem.* 274: 7887-7892.
- Coetzee W.A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M.S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 233-285.
- Cuttle M.F., Rusznák Z., Wong A.Y., Owens S., Forsythe I.D. (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J. Physiol.* 534: 733-744.
- Czirják G., Fischer T., Spät A., Lesage F., Enyedi P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 14: 863-874.
- Czirják G., Enyedi P. (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* 277: 5426-5432.
- Czirják G., Enyedi P. (2003a) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63: 646-652.
- Czirják G., Enyedi P. (2003b) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 16: 621-629.
- Decher N., Maier M., Dittrich W., Gassenhuber J., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.* 492: 84-89.
- Decker L.V. (ed) (2003) *Protein Kinase C*, Oxford Press, New York.
- Denning M.F., Dlugosz A.A., Williams E.K., Szallasi Z., Blumberg P.M., Yuspa S.H. (1995) Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell. Growth Differ.* 6: 149-157.
- Denning M.F., Wang Y., Nickoloff B.J., Wrono-Smith T. (1998) Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 29995-30002.
- Denning M.F., Wang Y., Tibudan S., Alkan S., Nickoloff B.J., Qin J.Z. (2002) Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV

radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell. Death Differ.* 9: 40-52.

- Dlugosz A.A., Yuspa S.H. (1993) Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell. Biol.* 120: 217-225.
- Dlugosz A.A., Yuspa S.H. (1994) Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J. Invest. Dermatol.* 102: 409-414.
- Doupnik C.A., Davidson N., Lester H.A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Op. Neurobiol.* 5: 268-277.
- Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471.
- Fink M., Duprat F., Lesage F., Reyes R., Romey G., Heurteaux C., Lazdunski M. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* 15: 6854-6862.
- Fink M., Lesage F., Duprat F., Heurteaux C., Reyes R., Fosset M., Lazdunski M. (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 17: 3297-3308.
- Fisher G.J., Tavakkol A., Leach K., Burns D., Basta P., Loomis C., Griffiths C.E., Cooper K.D., Reynolds N.J., Elder J.T. (1993) Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-betaII in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 101: 553-559.
- Fraenkel-Conrat H., Brandon B.A., Olcott H.S. (1947) The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. Gramicidine. *J. Biol. Chem.* 168: 99-118.
- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. (1948a) The reaction of formaldehyde with proteins. V. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J. Am. Chem. Soc.* 70 :2673-2684.
- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. (1948b) The reaction of formaldehyde with proteins. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole and indole groups. *J. Biol. Chem.* 174: 827-843.
- Fraenkel-Conrat H., Mecham D.K. (1949) The reaction of formaldehyde with proteins. VII. Demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J. Biol. Chem.* 177: 477-486.
- Franz M.G., Norman J.G., Fabri, P.J., Gower W.R. Jr. (1996) Differentiation of pancreatic ductal carcinoma cells associated with selective expression of protein kinase C isoforms. *Ann. Surg. Oncol.* 3: 564-569.
- Fukunaga M., Oka M., Ichihashi M., Yamamoto T., Matsuzaki H., Kikkawa U. (2001) UV-induced tyrosine phosphorylation of PKC delta and promotion of apoptosis in the HaCaT cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 573-579.

- Gabriel A., Abdallah M., Yost C.S., Winegar B.D., Kindler C.H. (2002) Localization of the tandem pore domain K⁺ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 98: 153-163.
- Geiges D., Marks F., Gschwendt M. (1995) Loss of protein kinase C δ from human HaCaT keratinocytes upon ras transfection is mediated by TGF α . *Exp. Cell. Res.* 219: 299-303.
- Girard C., Duprat F., Terrenoire C., Tinel N., Fosset M., Romey G., Lazdunski M., Lesage F. (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 249-256.
- Girard C., Tinel N., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M., Borsotto M. (2002) p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1. *EMBO J.* 21: 4439-4448.
- Goodnight J.A., Mischak H., Mushinski J.F. (1994) Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv. Cancer Res.* 64: 159-209.
- Goodnight J.A., Mischak H., Kolch W., Mushinski J.F. (1995) Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIN 3T3 fibroblasts: isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol.Chem.* 270: 9991-10001.
- Gutcher I., Webb P.R., Anderson N.G. (2003) The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1061-1070.
- Hagiwara S., Jaffe L.A. (1979) Electrical properties of egg cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8: 385-416.
- Hille B., Schwarz W. (1978) Potassium channels as multi-ion single file pores. *J. Gen. Physiol.* 72: 409-442.
- Hutton J.C., Sener A., Herchuelz A., Valverde I., Boschero A.C., Malaisse W.J. (1980) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XLII. Effects of extracellular pH on insulin release: their dependency on nutrient concentration. *Horm. Metab. Res.* 12: 294-299.
- Jaken S. (1996) Protein kinase isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 168-201.
- Jansen A.P., Dreckschmidt N.E., Verwiebe E.D., Wheeler D.L., Oberley T.D., Verma A.K. (2001) Regulation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C alpha, -delta, and -epsilon transgenic mice. *Int. J. Cancer.* 93: 635-643.
- Jensen B.S., Odum N., Jorgensen N.K., Christophersen P., Olesen S.P. (1999) Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 10917-10921.
- Karen J., Wang Y., Javaherian A., Vaccariello M., Fusenig N.E., Garlick J.A. (1999) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces clonal expansion of potentially malignant keratinocytes in a tissue model of early neoplastic progression. *Cancer Res.* 59: 474-481.

- Karschin C., Wischmeyer E., Preisig-Muller R., Rajan S., Derst C., Grzeschik K.H., Daut J., Karschin A. (2001) Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K⁺ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 18: 632-648.
- Katz B. (1949) Les constants électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 2: 285-299.
- Ketchum K.A., Joiner W.J., Sellers A.J., Kaczmarek L.K., Goldstein S.A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* 376: 690-695.
- Kim S.J., Greger R. (1999) Voltage-dependent, slowly activating K⁺ current (IKs) and its augmentation by carbachol in rat pancreatic acini. *Pflügers Arch.* 438: 604-611.
- Kim D., Gnatenco C. (2001) TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 923-930.
- Kim Y., Bang H., Kim D. (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* 275: 9340-9347.
- Kim Y., Bang H., Kim D. (1999) TBAK-1 and TASK-1, two-pore K⁺ channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am. J. Physiol.* 277: H1669-H1678.
- Kindler C.H., Yost C.S., Gray A.T. (1999) Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiology* 90: 1092-1102.
- Kindler C.H., Pietruck C., Yost C.S., Sampson E.R., Gray A.T. (2000) Localization of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1 in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 80: 99-108.
- Koren R., Langzam L., Paz A., Livne P.M., Gal R., Sampson S.R. (2000) Protein kinase C (PKC) isoenzymes immunohistochemistry in lymph node revealing solution-fixed, paraffin embedded bladder tumors. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8: 166-171.
- Koren R., Meir D.B., Langzam L., Dekel Y., Konieczky M., Baniel J., et al. (2004) Expression of protein kinase C isoenzymes in benign hyperplasia and carcinoma of prostate. *Oncol. Rep.* 11: 321-326.
- Köttgen M., Hoefler A., Kim S.J., Beschorner U., Schreiber R., Hug M.J., Greger R. (1999) Carbachol activates a K⁺ channel of very small conductance in the basolateral membrane of rat pancreatic acinar cells. *Pflügers Arch.* 438: 597-603.
- Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N., Jan L.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-133.
- Kunzelmann K., Mall M. (2002) Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol. Rev.* 82: 245-289.
- Langzam L., Koren R., Gal R., Kugel V., Paz A., Farkas A. et al. (2001) Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am. J. Clin. Pathol.* 116: 377-385.
- Lauritzen I., Zanzouri M., Honoré E., Duprat F., Ehrengruber M.U., Lazdunski M., Patel A.J. (2003) K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 32068-32076.

- Le Panse R., Coulomb B., Mitev V., Bouchard B., Lebreton C., Dubertret L. (1994) Differential modulation of human fibroblast and keratinocyte growth by the protein kinase C inhibitor GF 109203X. *Mol. Pharmacol.* 46: 445-451.
- Lee Y.S., Dlugosz A.A., McKay R., Dean N.M., Yuspa S.H. (1997) Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 18: 44-53.
- Lee Y.S., Yuspa S.H., Dlugosz A.A. (1998) Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C pathway. *J. Invest. Dermatol.* 111: 762-766.
- Leonoudakis D., Gray A.T., Winegar B.D., Kindler C.H., Harada M., Taylor D.M., Chavez R.A., Forsayeth J.R., Yost C.S. (1998) An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J. Neurosci.* 18: 868-877.
- Lepple-Wienhues A., Berweck S., Bohmig M., Leo C.P., Meyling B., Garbe C., Wiederholt M. (1996) K⁺ channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J. Membr. Biol.* 151: 149-157.
- Lesage F., Guillemare E., Fink M., Duprat F., Lazdunski M., Romey G., Barhanin J. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* 15: 1004-1011.
- Lesage F., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M. (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 275: 28398-23405.
- Li L., Lorenzo P.S., Bogi K., Blumberg P.M., Yuspa S.H. (1999) Protein kinase C δ targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by and adenoviral vector. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8547-8558.
- Lin C.S., Boltz R.C., Blake J.T., Nguyen M., Talento A., Fischer P.A., Springer M.S., Sigal N.H., Slaughter R.S., Garcia M.L., et al. (1993) Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 177: 637-645.
- Medhurst A.D., Rennie G., Chapman C.G., Meadows H., Duckworth M.D., Kelsell R.E., Glozer I.I., Pangalos M.N. (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 86: 101-114.
- Millar J.A., Barratt L., Southan A.P., Page K.M., Fyffe R.E., Robertson B., Mathie A. (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 3614-3618.
- Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny-Baron G.M., Schaehtle C., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Pierce J.H., Mushinski J.F. (1993) Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 268: 6090-6096.

- Mitev V., Miteva L. (1999) Signal transduction in keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2: 96-108.
- Montero C. (2003) The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 1-4.
- Mostofi F.K., Sobin L.H., Torlani H. (1973) Histological typing of urinary bladder tumors. In *International classification of tumours*. Vol. 10. Geneva: World Health Organisation.
- Mu D., Chen L., Zhang X., See L-H., Koch C.M., Yen C., Tong J.J., Spiegel L., Nguyen K.C.Q., Servoss A., Peng Y., Pei L., Marks J.R., Lowe S., Hoey T., Jan L.Y., McCombie W.R., Wigler M.H., Powers S. (2003) Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* 3: 297-302.
- Murakami A., Chida K., Suzuki Y., Kikuchi H., Imajoh-Ohmi S., Kuroki T. (1996) Absence of down-regulation and translocation of the eta isoform of protein kinase C in normal human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 106: 790-794.
- Murray N.R., Baumgardner G.P., Burns D.J., Fields A.P. (1993) Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J. Biol. Chem.* 268: 15847-15853.
- Neill G.W., Ghali L.R., Green J.L., Ikram M.S., Philpott M.P., Quinn A.G. (2003) Loss of protein kinase C alpha expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 63: 4692-4697.
- Nilius B., Wohlrab W. (1992) Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J. Physiol.* 445: 537-548.
- Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665.
- Nishizuka Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- Nitschmann von H.S., Hadorn H. (1944) Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd. V. Über des Verhalten der ϵ -Aminogruppen des Lysins und der Peptidogruppen. *Helv. Chim. Acta.* 27: 299-312.
- Ohba M., Ishino K., Kashiwagi M., Kawabe S., Chida K., Huh N.H., Kuroki T. (1998) Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the η and δ isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5199-5207.
- Ohno S., Akita Y., Hata A., Osada S., Kubo K., Kohno Y., Akimoto K., Mizuno K., Saido T., Kuroki T., Suzuki K. (1991) Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv. Enzyme Regul.* 31: 287-303.
- Ozawa K., Yamada K., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Beaven M.A. (1993) Different isozymes of protein kinase C mediate feedback inhibition of phospholipase C and stimulatory signals for exocytosis in rat RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 2280-2283.

- Pancrazio J.J., Tabbara I.A., Kim Y.I. (1993) Voltage-activated K⁺ conductance and cell proliferation in small-cell lung cancer. *Anticancer Res.* 13: 1231-1234.
- Papp H., Czifra G., Lázár J., Boczán J., Gönczi M., Csernoch L., et al. (2003) Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCat keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 12: 811-824.
- Paramio J.M., Jorcano J.L. (1997) Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. *Br. J. Dermatol.* 137: 44-50.
- Patel A.J., Honore E., Maingret F., Lesage F., Fink M., Duprat F., Lazdunski M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* 17: 4283-4290.
- Patel A.J., Honore E., Lesage F., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* 2: 422-426.
- Patel A.J., Maingret F., Magnone V., Fosset M., Lazdunski M., Honore E. (2000) TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 275: 28722-28730.
- Pei L., Wisner O., Slavin A., Mu D., Powers S., Jan L.Y., Hoey T. (2003) Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K⁺ channel function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 7803-7807.
- Rader R.K., Kahn L.E., Anderson G.D., Martin C.L., Chinn K.S., Gregory S.A. (1996) T cell activation is regulated by voltage-dependent and calcium-activated potassium channels. *J Immunol.* 156: 1425-1430.
- Rajan S., Wischmeyer E., Karschin C., Preisig-Muller R., Grzeschik K.H., Daut J., Karschin A., Derst C. (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 276: 7302-7311.
- Rajan S., Wischmeyer E., Xin Liu G., Preisig-Muller R., Daut J., Karschin A., Derst C. (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidin as pH sensor. *J. Biol. Chem.* 275: 1650-16657.
- Razin E., Szallasi Z., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Rivera J. (1994) Protein kinases C-beta and C-epsilon link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7722-7726.
- Rennecke J., Johannes F.J., Richter K.H., Kittstein W., Marks F., Gschwendt M. (1996) Immunological demonstration of protein kinase C μ in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells. *Eur. J. Biochem.* 242: 428-432.
- Reyes R., Duprat F., Lesage F., Fink M., Salinas M., Farman N., Lazdunski M. (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.* 273: 30863-30869.
- Rouzaire-Dubois B, Dubois J.M. (1998) K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J. Physiol.* 510: 93-102.
- Rudy B. (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.* 25: 729-749.

- Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Pál B., 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.
- Sano Y., Inamura K., Miyake A., Mochizuki S., Kitada C., Yokoi H., Nozawa K., Okada H., Matsushime H., Furuichi K. (2003) A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem.* 278: 27406-27412.
- Santella L. (1998) The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 317-324.
- Selzer E., Okamoto I., Lucas T., Kodym R., Pehamberger H., Jansen B. (2002) Protein kinase C isoforms in normal and transformed cells of the melanocytic lineage. *Melanoma Res.* 12: 201-209.
- Shi S-R., Key M.E., Kalra K.L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-748.
- Shi S-R., Cote R.J., Young I., Imam S.A., Taylor C.R. (1996) Use of pH 9.5 Tris HCl buffer containing 5 % urea for antigen retrieval immunohistochemistry. *Biotech. Histochem.* 71: 190-196.
- Silverberg S.G., DeLellis R.A., Frable W.J. (1997) *Principles and Practice of Surgical Pathology*, ed. 3, New York: Churchill Livingstone; p. 2191-2195.
- Skryma R.N., Prevarskaya N.B., Dufy-Barbe L., Odessa M.F., Audin J., Dufy B. (1997) Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation. *Prostate.* 33: 112-122.
- Stanfield P.R. (1988) Intracellular Mg²⁺ may act as a cofactor in ion channel function. *TINS* 11: 475-477.
- Talley E.M., Bayliss D.A. (2002) Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.* 277: 17733-17742.
- Watkins C.S., Mathie A. (1996) A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 491: 401-412.
- Woodfork K.A., Wonderlin W.F., Peterson V.A., Strobl J.S. (1995) Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J. Cell. Physiol.* 162: 163-171.
- Yu S.P., Yeh C.H., Sensi S.L., Gwag B.J., Canzoniero L.M., Farhangrazi Z.S., Ying H.S., Tian M., Dugan L.L., Choi D.W. (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science.* 278: 114-117.
- Yu S.P., Yeh C.H., Gottron F., Wang X., Grabb M.C., Choi D.W. (1999) Role of the outward delayed rectifier K⁺ current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 73: 933-941.
- Zang L.C., Ng D.C., Bikle D.D. (2003) Role of protein kinase α in calcium induced keratinocyte differentiation: defective regulation in squamous cell carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 195: 249-259.

ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen tanulmányban két olyan protein (PKC és TASK-3) vizsgálatát végeztük, amelyek hatással vannak a sejtek differenciálódására, proliferációjára és apoptotikus folyamataira, ezáltal jelentőségük lehet a egyes rosszindulatú daganatok kialakulásában és növekedésében.

A TASK-3 csatornák vizsgálata során elvégeztük két, a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető ellenanyag vizsgálatát; igazoltuk specificitásukat, valamint kidolgoztuk az immunreakció optimális feltételeit, beleértve az ideális antigénfeltárási technika megtalálását. Az antigénfeltárást adekvát voltát fagyasztott preparátumokon kivitelezett immunreakciók alkalmazásával erősítettük meg.

Megállapítottuk, hogy a humán gastrointestinalis rendszer epithelialis sejtjei intenzív TASK-3 expressziót mutatnak. Erőteljes reakciót tapasztaltunk a plexus myentericus Auerbach-i idegelemeiben, miközben az azokat övező simaizomrétegben lényegesen gyengébb reakciót figyeltünk meg. Erőteljes és jellegzetes TASK-3 specifikus reakciót láttunk a pancreas területén, az endocrin és az exocrin állományban egyaránt. Kettős immunjelöléssel a Langerhans-szigetek A- és B-sejtjeinek TASK-3 pozitivitását is igazoltuk. Erőteljes TASK-3 jelölődést figyelhettünk meg a gastrointestinalis rendszert és az emlőszövetet érintő malignus daganatokban is, de nem találtunk egyértelmű összefüggést a TASK-3 expresszió erőssége vagy eloszlása, valamint a daganatok szöveti képe, stádiuma és prognosztikai markerei között. Határozott különbséget tapasztaltunk viszont a TASK-3 jelölődés megoszlásában a core-biopszia és a műtéti beavatkozás során eltávolított szövetminták esetén. Előbbi esetben a jelölődés döntően cytoplasmaticus volt és a magok csupán csekély százaléka mutatott TASK-3 pozitivitást, utóbbi esetben a sejtmagok jelentős része erőteljes immunfestődést produkált.

A PKC izoenzimintázat tumorprogresszióval összefüggő változásait húgyhólyagból izolált, transitionális sejtes daganatok Western-blot vizsgálatával végeztük. Megállapítottuk, hogy a humán húgyhólyag epithelialis sejtjei öt PKC izoformát (PKC α , PKC β , PKC δ , PKC ϵ és PKC ζ) expresszálják. A tumorosan elfajult epitheliumból készített szöveti homogenizátumban ezen izoformák mennyisége jellegzetes, a tumor grádusával összefüggő, statisztikailag is szignifikáns változást mutatott. Míg a PKC β és PKC δ mennyisége a tumor előrehaladásával fokozatosan csökkent, addig a PKC α , PKC ϵ és PKC ζ mennyisége fokozódott.

SUMMARY

The two proteins investigated in the present study (PKC and TASK-3) are known to influence cell differentiation, proliferation and apoptotic processes, thus they may have roles in the genesis and growth of certain malignant tumours.

In the frame of the work concerning the TASK-3 channels we evaluated two commercially available antibodies targeting the TASK-3 channels, we confirmed their specificity and we worked out the optimum conditions for the immunoreactions performed with these antibodies. Specific emphasis was laid upon the finding of the ideal antigen retrieval technique. The adequacy of the antigen retrieval was confirmed by performing TASK-3 specific labelling on frozen tissue samples.

We found that the epithelial cells of the human gastrointestinal tract showed intense TASK-3 specific immunolabelling. Strong immunoreaction could be observed in the neural elements of the myenteric plexus, whereas the surrounding smooth muscle layer exhibited markedly weaker immunolabelling. The pancreas also showed strong and rather characteristic TASK-3 immunopositivity pattern in both the endocrine and exocrine portions. Double immunolabelling experiments revealed that both the A and B cells of the islets of Langerhans expressed TASK-3 channels.

Strong TASK-3 labelling could also be observed in the malignant tumours of the gastrointestinal tract and in breast cancers, but no correlation could be found between the intensity/distribution pattern of the TASK-3 immunopositivity and the histological picture, grade and prognostic markers of the tumours. Definite differences could be observed, however, between the TASK-3 distribution of the tissue samples obtained during core-biopsy and surgical intervention, respectively. We found that in the core-biopsies the TASK-3 specific immunoreaction was predominantly cytoplasmic, most of the nuclei were spared after the labelling. In the surgical specimens, however, a large proportion of the nuclei demonstrated strong and distinct TASK-3 specific labelling.

The grade-dependent alterations of the PKC isoenzyme pattern of human bladder carcinomas have been investigated by using Western-blotting. The epithelial cells of the human bladder expressed five PKC isoenzymes (PKC α , PKC β , PKC δ , PKC ϵ és PKC ζ). Moreover, characteristic, grade-dependent, statistically significant changes were found in the amount of the individual types of PKC isoenzymes in the homogenised tissue samples prepared from the tumorous epithelial cells of the urinary bladder. The amounts of PKC β and PKC δ reduced, whereas the quantities of PKC α , PKC ϵ and PKC ζ increased as the tumour progressed.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Nemes Zoltán Professzor Úrnak, témavezetőmnek, a DE OEC Pathologia Intézet igazgatójának, amiért támogatott és segített munkám elvégzésében. Ugyancsak nagy-nagy köszönettel tartozom Kovács László Professzor Úrnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának, segítségéért, valamint azért, hogy lehetővé tette számomra, hogy a jelen tézisekben vázolt kísérletek egy részét Intézetében végezhessem. Köszönöm Dr. Berecz György és Dr. G. Kiss Gyula főigazgató uraknak és Dr. Krajczár Géza főorvos úrnak, hogy lehetővé tették számomra a PhD képzésbe való bekapcsolódást.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak és szerzőtársaimnak: Szűcs Géza Professzor Úrnak, Varga Attilának, Czifra Gabriellának, Pocsai Krisztinának, Pór Ágnesnek, Bíró Tamásnak, Németh Tamásnak, Sarkadi Lászlónak, Tállai Bélának és Rusznák Zoltánnak figyelmes és önzetlen segítségükért.

Külön köszönet illeti Lukács Edit és Horváth Tímea immunhisztokémiai szakasszisztenseket pontos, precíz és lelkes munkájukért.

Hálás vagyok Petinek, Lilinek, valamint szüleimnek a segítségért, támogatásért és a türelemért.

Köszönöm továbbá a Kenézy Kórház Patológia Osztálya munkatársainak segítségét és támogatását, és hálás vagyok mindenki másnak, aki gondolataival, ötleteivel vagy bármilyen más módon segített munkámban.

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 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. típusu 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 resectatumon. 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.