

**Feszültségvezérelt K⁺-csatornaalegységek expressziós mintázata
a ganglion spiraleban és nucleus cochlearisban**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:

Bakondi Gábor

Témavezető:

Dr. Rusznák Zoltán



DEBRECEN

2008

BEVEZETÉS

A hanghullámok rezgéseit a középfül hallócsontocskái továbbítják a foramen ovalen keresztül a belsőfül folyadékterébe, aminek következtében megváltozik a membrana basilaris membrana tectoriához képest elfoglalt helyzete. A folyamat eredményeként a Corti-féle szerv érzékszerveinek (szőrsejtek) apikális végén található csillók elmozdulnak, ami a csillók csúcsán található mechanoszenzitív, nem-specifikus kationcsatornák aktiválódásához, és az endolymphában található K^+ -ionok sejtbe történő mozgásához vezet, ami a szőrsejtek depolarizációját okozza. Az egyedi szőrsejtek depolarizációjának pontos következménye az adott szőrsejt típusától függ.

A Corti-féle szerv szőrsejtjeinek két típusa ismert. A belső szőrsejtek (inner hair cell, IHC) körte alakú, centrális helyzetű sejtmaggal rendelkező sejtek, amelyek egy sorba rendeződve találhatók a ductus cochlearisban. A jelenleg elfogadott nézet szerint a belső szőrsejtek tekinthetők a hallórendszer „valódi” érzékszerveinek. A Corti-féle szerv másik meghatározó sejtfelesége a külső szőrsejtek (outer hair cell, OHC) csoportja. A külső szőrsejtek henger alakú sejtek, sejtmagjuk kerek és a sejt bazális részén található. A külső szőrsejtek általában 3, de néha 4-5 sorba rendeződve helyezkednek el, és főleg efferens beidegzéssel rendelkeznek. A külső szőrsejtek elősegítik a Corti-féle szerv valódi érzékszerveinek (azaz a belső szőrsejteknek) a működését, és közvetve fokozzák azok érzékenységét.

A két sejtfeleség különböző működésének hátterében a sejtmembrán depolarizációját követő történések eltérő jellege áll. A belső szőrsejtek esetében a depolarizáció neurotranszmitter-felszabadulást eredményez a sejt bazális részén, ami az azzal szinaptikus kapcsolatban álló hallóidegrostban akciós potenciálok kialakulását, és így tovaterjedő elektromos aktivitást hoz létre. Mivel az apikális felszínen a csillók mozgásának frekvenciája megegyezik a hanginger frekvenciájával, a szőrsejt – hallóideg szinapszis nagyon aktív. Annak érdekében, hogy a szőrsejtek frekvenciafüggő transzmitterfelszabadulásával a szinapszis lépést tudjon tartani, mind a posztzinaptikus eseményeknek, mind a reaktivációnak igen gyorsan le kell játszódnia. A rendelkezésre álló neurokémiai és immunokémiai bizonyítékok szerint a belső szőrsejt – hallóideg szinapszisban glutamát tölti be a neurotranszmitter szerepét, ami gyors reaktiválhatóságú alegységekből felépülő ionotróp receptorokon fejti ki hatását.

Egyes kutatócsoportok eredményei alapján az is valószínűsíthető, hogy a belső szőrsejtek és a ganglion spirale neuronok közötti szinapszisban nem a glutamát az egyetlen neurotranszmitter. A P2X₂-receptorok jelenléte a hallóidegen arra utal, hogy az ATP is részt vehet a hallóideg működésének szabályozásában, bár az ATP pontos forrása jelenleg még nem ismert.

A belső szőrsejtekkel szinaptikus kapcsolatot létesítő I-es típusú SGC-k az összes ganglion spirale neuron mintegy 90-95 %-át alkotják. Sejttestük ovális alakú és relatíve nagyméretű, bár az utóbbi paraméter fajspecifikus, és nagyban függ az alkalmazott preparátumtól is. Az I-es típusú SGC-k különlegessége, hogy nemcsak a nyúlványaikat, de a sejttestüket is vastag myelinhüvely borítja, és így a soma is részét képezi a vezetési útvonalnak. Egy I-es típusú neuronnak csak egy perifériás nyúlványa van, amely általában egyetlen (néha két) szőrsejttel létesít kapcsolatot. Egy belső szőrsejthez ugyanakkor akár 10-30 SGC is kapcsolódhat, a pontos szám fajfüggő. Az I-es típusú SGC-k spontán aktivitással rendelkeznek, amely részben az IHC-k csurgó transzmitter felszabadításának, részben pedig az idegsejtek intrinzik membrántulajdonságainak köszönhető. A fenti szinapszis működését a szőrsejtek spontán és kiváltott aktivitása mellett modulációs pályák és mechanizmusok is befolyásolják (pl. LOC).

A külső szőrsejtek funkciója jelentősen eltér a belső szőrsejteknél leírtaktól. Ezen struktúrákban a transzdukciós csatornák nyitása által kiváltott transzdukciós áram kétféle választ vált ki. A nagyobb jelentőségű válasz a külső szőrsejtek hosszának és merevségének gyors változása, aminek következtében az adott területen megváltozik a Corti-féle szerv alakja, ami fokozza a belső szőrsejtek válaszkészségét, azaz nő a cochlea érzékenysége az adott frekvencián. A külső szőrsejtek depolarizációját kísérő neurotranszmitter-felszabadulás a bazális régióban jóval kisebb mértékű és jelentőségű, mint a belső szőrsejtek esetében.

A külső szőrsejtek afferens (sensoros) innervációját az ún. II-es típusú SGC-k biztosítják, amelyek az összes ganglion spirale neuron 5-10%-át alkotják, sejttestük gömbölydedebb, méretük pedig kisebb, mint az I-es típusú neuronoké. Egy II-es típusú SGC 3-10 szőrsejtet innervál, és ezen neuronok (az I-es típusú SGC-kel ellentétben) nem rendelkeznek myelinhüvellyel. Bár a külső szőrsejtek és a II-es típusú SGC-k közötti szinapszisok működéséről csak kevés adat áll rendelkezésre, a glutamát meghatározó szerepe ebben a struktúrában is igazoltnak látszik.

Ganglion Spirale

Mivel az I-es és II-es típusú SGC-k igen eltérő funkciókkal rendelkeznek, fontos a két neurontípus megbízható megkülönböztetése. Erre a célra már számos hisztológiai markert kipróbáltak; így az I-es típusú SGC-k jelölésére használtak neuropeptid-Y - (NPY) és parvalbumin-, míg a II-es típusú SGC-k jelölésére GFAP- (glial fibrillar acidic protein,), peripherin- és SAP- (vagy SAP108-) ellenes antitesteket. Az alkalmazott markerek meglepően nagy száma is jelzi, hogy mind a mai napig nincs teljesen elfogadott, és minden kétséget kizáróan specifikus antigén, amely lehetővé tenné az SGC-k két típusának egyértelmű elkülönítését. A problémát tovább bonyolítja, hogy sem az I-es, sem pedig a II-es típusú SGC-k nem alkotnak homogén populációt. A szörsejtekhez hasonlóan a ganglion spirale neuronok is tonotopikusan helyezkednek el, és számos jellemzőjükről leírták, hogy a modiolus tengelye mentén változik (pl. a bázis közelében lévő neuronok nagyobbak, míg az apex közelében elhelyezkedők kisebbek).

A morfológiai eltérések mellett a tüzelési mintázatban is mutatkoznak eltérések az egyes neuronok esetében. Általánosságban elmondható, hogy az SGC-k küszöb feletti ingerlés hatására a stimulus kezdetén egy akciós potenciált (AP) tüzelnek, míg magas frekvenciájú inger során a sejtek adaptálódnak: az akciós potenciálok időtartama nő, az amplitúdójuk és a csúcs eléréshez szükséges idő csökken, és alkalmanként egy-egy AP ki is marad. Az egyes neuronok azonban eltérő látenciával és adaptációs képességekkel rendelkeznek, ami egyrészt függ az adott neuron típusától, és (a morfológiai jellemzőkhöz hasonlóan) a cochleában elfoglalt helyétől is. Így az I-es típusú SGC-k esetében az apikális neuronok (amelyek az alacsonyabb frekvenciájú hangokra reagálnak) hosszabb látenciával és lassabb adaptációval jellemezhetők, míg a bázis neuronjainak (amelyek a magasabb frekvenciájú hangok érzékelését végzik) látenciája rövid, és gyorsan adaptálódnak. Az I-es típusú SGC-k-hez képest a II-es típusú neuronok általában lassabban adaptálódnak, alacsonyabb az ingerküszöbük és elnyújtottabb a válaszuk. Bár a II-es típusú SGC-k esetében is léteznek adatok, amelyek arra utalnak, hogy a tüzelési mintázat a modiolus tengelye mentén változik, ezen eredmények meglehetősen ellentmondásosak. Egyes szerzők szerint a II-es típusú neuronok esetében a változások hasonlóak az I-es típusú neuronoknál leírtakhoz, míg mások ezzel ellentétes eredményeket kaptak, és arról számoltak be, hogy az apikális neuronok adaptációja gyorsabb.

Léteznek olyan adatok, melyek szerint a modiolus tengelye mentén megfigyelhető változások (mind a morfológiai, mind pedig az elektrofiziológiai jellemzők) nem „előreprogramozott” tulajdonságai az idegsejteknek, hanem egy külső, a ganglion spirale

neuronoktól független szabályozási mechanizmus következményei. Ilyen szabályozó vegyület lehet a neurotrophin-3, amelynek a modiolus tengelye mentén változik a koncentrációja, és ez befolyással lehet a neuronok csatorna- és tüzelési mintázatára.

Nucleus Cochlearis

A hanginger feldolgozásának következő állomása a nucleus cochlearis, amely a nervus acusticus-tól kapja az információkat. Fontos megemlíteni, hogy a nucleus cochlearis nemcsak jeltovábbító szereppel rendelkezik, hanem már itt elkezdődik az akusztikus információ feldolgozása. Ezen folyamat során a hangingerek különböző komponensei eltérő útvonalakra kerülnek, amelyek gyakran egymással párhuzamosan futnak, és a hallórendszer magasabb központjaiba szállítanak információkat. Közismert, hogy ezen útvonalak némelyike képes megtartani a hangingerek időbeli kódolását, ugyanakkor más útvonalaknál ez a képesség nincs meg.

A ganglion spirale rostok a magba érve elágaznak, és két köteggként haladnak tovább. A rostralisabb elhelyezkedésű rostok a nucleus cochlearis elülső ventrális (anteroventralis nucleus cochlearis, aVCN) részébe tartanak. Ez a régió főleg bushy-, és stellate-sejteket tartalmaz. A n. acusticus caudalisabb, leszálló nyálábja a mag hátulsó ventrális területén (posteroventralis nucleus cochlearis, pVCN) keresztül a nucleus cochlearis dorsalisba (DCN) jut. A pVCN legjelentősebb sejtjei az octopus-neuronok. A DCN-ben négy, koncentrikusan elhelyezkedő réteget lehet elkülöníteni. A legkülső réteg a molekuláris réteg (1. réteg), amely főleg a szemcsesejtek axonjait tartalmazza, bár néhány szemcsesejt somája is megtalálható itt. Közvetlenül a molekuláris réteg alatt helyezkedik el a fusiform- (vagy piramidális-) réteg (2. réteg), ahol döntően a piramis-, szemcse-, cartwheel- és stellate-neuronok sejttestjei találhatók. A DCN 3. rétegében a piramis-sejtek bazális dendritfája és néhány kisebb jelentőségű neuron (pl. verticalis-sejtek) található. A hallóideg leszálló rostjainak egy része a piramis-sejtek bazális dendritfáján létesít szinaptikus kapcsolatot. A DCN legmélyebb része (4. réteg) főleg az óriás- és a nagy multipoláris-sejtek somáját tartalmazza.

A ganglion spiraleből kétféle rost érkezik a nucleus cochlearisba: az I-es típusú SGC-k myelinizált, vastag nyúlványai; valamint a II-es típusú SGC-k jóval vékonyabb, myelinhüvellyel nem rendelkező rostjai. Míg az előbbiek a nucleus cochlearis nagyobb, döntően projekciós sejtjeivel (pl. piramis- és bushy-neuronok) állnak kapcsolatban, addig az utóbbiak a szemcsesejteken végződnek, amelyek aztán az információt az igen kiterjedt parallel rosthálózaton keresztül továbbítják a nucleus cochlearis különböző területeire. A fentiekből kitűnik, hogy a nucleus cochlearis legfontosabb információforrása maga a

hallóideg, azonban fontos megemlíteni, hogy a mag az SOC -tól is kap acetilkolinerg rostokat, amelyek aktivitása jelentősen módosíthatja a nucleus cochlearis jelfeldolgozó működését.

Általános bevezető a K^+ -csatornákhöz

A káliumcsatornákat elsőként a neuronok membránjában, az akciós potenciál kialakításában betöltött funkciójuk alapján azonosították, mai tudásunk szerint azonban szinte valamennyi sejttypusban megtalálhatók.

Tekintettel arra, hogy az élő sejtek túlnyomó többségében az intracelluláris K^+ -koncentráció magasabb az extracellulárisnál, a K^+ -csatornák nyitása stabilizálja a nyugalmi membránpotenciált, továbbá a membrán hiper- vagy repolarizációját eredményezheti. Általános előfordulásuknak és nagy változatosságuknak köszönhetően a K^+ -csatornák igen szerteágazó élettani (és patológias) folyamatokban jelentősek.

Feszültségfüggő K^+ - (K_v) csatornák

A depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -csatornák az ioncsatornák egyik legnagyobb és legváltozatosabb csoportját képezik; emberben az ismert alegységek száma eléri a negyvenet. Az mRNS poszttranszkripciós módosítása („alternatív splicing”) tovább növeli a lehetséges variációk számát. Bár az egyes csatornák biofizikai tulajdonságai és funkciói között jelentős eltérések lehetnek, általánosságban elmondható, hogy az AP-okat követő repolarizáció és utóhiperpolarizáció kialakításáért, valamint (egyes típusaik) az AP-ok késleltetéséért vagy azok kialakulásának megakadályozásáért felelősek.

A funkcióképes K_v -csatornák négy alegységből állnak. Az egyes alegységek hat transzmembrán domént tartalmaznak (S1-S6), melyek közül az S4 felelős a feszültségérzékelésért, az S5 és S6 között pedig a pórusformáló hurok (P-hurok) található.

A pórus különösen fontos része egy glicin-tirozin-glicin (GYG) aminosav-tripletet tartalmazó, igen konzervatív régió, ami döntő (bár nem kizárólagos) jelentőségű a K^+ -szelektív pórus kialakításában.

A K_v -csatornák heterogenitásának egyik alapja a csatornaalegységek nagy száma, de a változatosságot tovább növeli, hogy mind homomer mind pedig heteromer formában előfordulnak *in vivo*.

A feszültségfüggő K^+ -csatornák a depolarizációra való érzékenységük és inaktivációs tulajdonságaik alapján három nagy funkcionális csoportba oszthatók: (1) dendrotoxinra (DTX) érzékeny, már kis depolarizáció hatására is aktiválódó, lassan inaktiválódó csatornák; (2) erőteljes depolarizáció hatására aktiválódó, inaktivációt nem vagy csak igen lassan mutató,

ún. késői típusú áramot létrehozó csatornák; (3) gyorsan, feszültségfüggő módon inaktiválódó, tranziens csatornák.

Az alacsony feszültségen aktiválódó („low voltage-activated”, LVA) csatornák kis depolarizáció hatására (a nyugalmi membránpotenciáltól kb. -60 mV-ig, ami magában foglalja az AP küszöbpotenciál értékét is) aktiválódnak. Ezen áramért a Kv1.1-, Kv1.2- vagy Kv1.6-alegységekből felépülő csatornák a felelősek.

Lassan inaktiválódó, késői típusú áramot („delayed rectifier”) hoznak létre a Kv1.3, Kv1.5, Kv2.1, Kv2.2, Kv3.1 és Kv3.2 α -alegységekből felépülő csatornák. Ezen csatornák aktiválódásához jelentős mértékű depolarizáció szükséges, azaz tipikusan a „high voltage-activated” (HVA) csatornák csoportjába tartoznak. Ezen áramtípusra jellemző, hogy jelentős késéssel aktiválódik, és nem (vagy csak nagyon lassan) inaktiválódik. Ezen áram az akciós potenciált követő repolarizációs fázist gyorsítja fel (vagyis a rövid AP-ok létrehozásában tölt be alapvető szerepet), lehetővé téve az őket expresszálo struktúrák minél gyorsabb tüzelését.

A harmadik csoportba a tranziens K^+ -áramok (klasszikus terminológiával élve az „A-típusú” áramok) tartoznak. Az ebbe a csoportba tartozó csatornák között mind LVA (Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3), mind pedig HVA (Kv3.4) csatornák előfordulnak. A depolarizációt követő aktivációjuk után 10-100 ms-on belül inaktiválódnak, ami tranziens konduktanciaváltozást eredményez. A nyugalmi membránpotenciál értékén ezen csatornák általában inaktivált vagy részlegesen inaktivált állapotban vannak, de már kis membránpotenciál-változások is jelentősen befolyásolhatják az inaktiváció mértékét. Mindebből következően hiperpolarizáció hatására fokozódik az A-áram aktiválhatósága, ezáltal pedig a szinaptikus aktivitás jelentősen befolyásolhatja a tranziens K^+ -áramot expresszálo neuronok ingerlékenységét. Az A-áramok tranziensen csökkenthetik az első néhány csúcs látenciaidejét, és/vagy módosíthatják a csúcsok közötti időtartamot egy AP-sorozaton belül. A tranziens áramok a szinaptikus integrációban is szerepet játszhatnak oly módon, hogy a kezdeti excitatórikus posztzinaptikus potenciál (EPSP) alatt inaktiválódnak, és így a szummáció során a második EPSP már alacsonyabb küszöbpotenciál-értéken válthat ki AP-t.

Hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornák

A hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornákat (HCN-csatornák) a Kv-csatornák főcsoportjába sorolják. Ezen csatornák hiperpolarizáció hatására lassan aktiválódnak (-50 – -60 mV-nál negatívabb potenciálokon), az általuk létrehozott áramot pedig szívből I_f (funny)-nek, míg neuronokon I_h -nak nevezik. A spontán tüzelés képességével rendelkező idegsejtekben (pl. a thalamocorticalis reléneuronok

vagy a cerebellaris Purkinje-sejtek), valamint a szív ingerképző elemeiben a h-áram igen jelentős szerepet tölt be a ritmikus aktivitásért felelős pacemaker-potenciál kialakításában. A spontán aktivitással nem rendelkező sejtek esetében is nagy jelentősége lehet a h-áramnak: részt vehet a nyugalmi membránpotenciál beállításában (pl. a szem fotoreceptoraiiban), mérsékelheti a hiperpolarizációs és depolarizációs válaszok nagyságát, a dendritikus integrációban is lehet szerepe (pl. hippocampalis CA1 neuronok esetében), és a szinaptikus jelátvitel szabályozásában is részt vehet (pl. a cerebellaris kosársejtekben).

A Kv-csatornákhöz hasonlóan a funkcionális HCN-csatornák is tetramerek. Az egyes HCN-alegységek hat transzmembrán régiót tartalmaznak, melyek közül a pozitív töltéssel rendelkező S4 felelős a feszültségérzékelésért. További hasonlóság, hogy alegységenként egy pórusformáló P-régiót tartalmaznak, melyben megtalálható a K^+ -szelektív pórus kialakításáért felelős GYG aminosav-triplet. Ettől az aminosav-triplettől eltekintve azonban a HCN-csatornák aminosavszekvenciája jelentős eltérést mutat a többi K^+ -csatornáétól, valószínűleg ezzel magyarázható ezen csatornák kevésbé markáns K^+ -szelektivitása.

A cAMP jelentős mértékben befolyásolja a h-áram aktivációját, az aktivációs potenciált pozitív irányba tolja el. Lényeges megemlíteni, hogy a cAMP nem fehérjefoszforiláció révén fejti ki hatását a h-áramra, hanem egy, a citoplazmatikus C-terminálison található, 120 aminosavból felépülő ciklikus nukleotid kötő doménen (CNBD) keresztül.

Ezidáig 4 HCN-csatornaalegység ismert (HCN1-4), a belőlük felépülő homomer csatornáknak eltérő a kinetikája, steady-state feszültségfüggése; és a cAMP kötődése is különböző mértékben befolyásolja működésüket.

CÉLKITŰZÉSEK

A hallópálya kezdeti szakaszának neuronjaiban igen nagy jelentőséggel bírnak a különböző feszültségvezérelt K^+ -áramok.

1. A nucleus cochlearison végzett kísérleteink során vizsgáltuk:

1.a. Egyes Kv-alegységek jelenlétét és megoszlását a nucleus cochlearison belül.

1.b. A nucleus cochlearis legjelentősebb projekciós neuronjainak Kv-csatornaalegység mintázatát.

1.c. A nucleus cochlearis jelentősebb projekciós neuronjainak Kv-csatornaalegység mintázatában mutatkozó eltéréseket.

2. A tengerimalac ganglion spiralen végzett kísérletek során célul tűztük ki:

2.a. Egy olyan metodika kidolgozását, amely lehetővé teszi az SGC-k konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatát, és az I-es és II-es típusú SGC-k pontos, megbízható megkülönböztetését.

2.b. Vizsgáltuk továbbá az SGC-k Kv- és HCN-alegység mintázatát.

2.c. Vizsgáltuk, hogy a morfológiai és funkcionális különbségek mellett a Kv- és HCN-csatorna mintázatban is megfigyelhetők-e eltérések az I-es és II-es típusú SGC-k között.

2.d. Vizsgáltuk, hogy a HCN-csatornaalegységek expressziós szintje mutat-e változást a cochlea tengelye mentén.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A ganglion spiralen végzett kísérletek során hím, felnőtt, 400-700 g súlyú tengerimalacokat használtunk. A Western-blot kísérleteket 20 tengerimalac ganglion spirálján végeztük, míg a paraffinba ágyazott metszetekhez, illetve a „cochlearis úszószelet” preparátumokon végzett kísérletekhez 69 állat cochleáját használtuk fel.

A nucleus cochlearison végzett kísérleteket vegyes nemű, fiatal (11-17 napos) és idősebb (minimum 25 napos, de általában 1-3 hónapos) Wistar patkányokon végeztük. A vizsgálatokhoz összesen 36 állatot használtunk fel (5 fiatal és 31 idősebb patkányt). A fiatal állatokon kizárólag a Kv1.2-alegység expressziójának életkorfüggését vizsgáltuk.

A ganglion spirale preparálása tengerimalacból

A ganglion spirale izolálása során az állatokat pentobarbitállal elaltattuk, majd dekapitáltuk. A sziklacsontokat eltávolítottuk, majd egy fogászati fúróval felnyitottuk őket, láthatóvá téve a cochleát. Az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt izolált modiolusokat 4%-os pufferezt formaldehid oldatban fixáltuk. A cochlearis úszószelet preparátumok esetén a fixálási idő 2 óra, míg a hagyományos beágyazott minták esetében 24 óra volt.

A nucleus cochlearis preparálása patkányból

A preparálás minden lépését jéghideg alacsony Na^+ -tartalmú művi cerebrospinalis folyadékban (aCSF) végeztük. Az állat dekapitálása után az agyat gyorsan eltávolítottuk, leválasztottuk az agytörzset, amit 4%-os formalinban fixáltuk (4 óra, 4 °C), majd a szövetarabokat PB-ben mostuk (3×10 min). A fixálási periódus végétével a nucleus cochlearisból vibráló mikrotóm segítségével 50- 60 μm vastag szeleteket készítettünk

Fluoreszcens immunhisztokémiai kísérletek

A preparátumokat először PB-ben (10 perc), majd TBS-ben (3×10 perc) mostuk, majd permeabilizáltuk és blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket (60 perc), amit az elsődleges antitestekkel történő inkubáció követett (egy éjszakán át, 4 °C). Az elsődleges antitest alkalmazása után a mintákat mostuk (TBS, 3×10 perc), majd a megfelelő, fluorokrómmal konjugált másodlagos antitestek alkalmazására került sor (3 óra, szobahő), amit újabb mosás követett (TBS, 3×10 perc). Végezetül a mintákat fedőlemezre helyeztük és 4',6-Diamidino-2-fenilindolt (DAPI) tartalmazó Vectashield fedő médiummal fedtük.

Immunhisztokémia paraffinba ágyazott mintákon

A formalinban fixált modiolusokat dekalcináltuk (8 óra, Biodec R), paraffinba ágyaztuk, majd hagyományos szövetmetszeteket készítettünk belőlük.

Bár az antitestek zöménél a dekalcinálási folyamat már önmagában is elégséges antigénfeltárásnak bizonyult, egyes antitestek esetében további antigénfeltárást végeztünk az immunreakció erősségének fokozására.

Nyúlban termeltetett elsődleges antitestek esetén (az összes Kv-ellenes antitest, anti-HCN2, anti-HCN3), gátoltuk a minták endogén peroxidáz aktivitását (3%-os hidrogén-peroxid oldat, 10 perc, szobahő), majd a mosást (PBS, 3×5 perc) és blokkolást követően a mintákat az elsődleges antissal inkubáltuk (4 °C, egy éjszakán át). A kísérlet második napján a metszeteket mostuk (PBS, 3×5 perc), majd az EnVision rendszerrel inkubáltuk, végül az immunreakciót VIP SK4600 vagy DAB reagens segítségével tettük láthatóvá. Az immunfestés végén enyhe háttérfestést végeztünk (metilzöld).

Kecskében termeltetett elsődleges antitest esetén (HCN1, HCN4) tormaperoxidáz- és alkalikus-foszfátáz alapú reakciókat is alkalmaztunk. Amikor az alkalikus-foszfátáz alapú technikát alkalmaztuk, az antigénfeltárást követően a metszeteket Tris-pufferben mostuk (3×5 perc), blokkoltuk, majd a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk (4 °C) a primer antissal. A kísérlet második napján a metszeteket mostuk (TB, 3×5 perc), majd a biotinilált másodlagos

antitesttel inkubáltuk őket (1h, szobahő), mostuk (TB, 3×5 perc) és alkalikus-foszfátázzal konjugált streptavidinnel inkubáltuk (30 perc, szobahő). A protokoll végén a metszeteket mostuk (TB, 3×5 perc), az immunreakciót pedig fukszinnal hívtuk elő. Amennyiben A tormaperoxidáz alapú immunfestést a fentebb leírtakhoz hasonlóan végeztük.

Egyes esetekben enyhe háttérfestést is végeztünk (metilzöld).

Western-blot

A minták fehérjekoncentrációját BCA protein assay-vel határoztuk meg. Kísérleteink során a fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd a proteineket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Ezt követően a membránokat blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges és másodlagos antitestek felhasználásával immunfestést végeztünk. Az előhívást kemilumineszcens kit segítségével végeztük, a detektálást pedig fényérzékeny filmmel, vagy LAS 3000-es darkbox-szal végeztük. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint a megfelelő szoftver segítségével hajtottuk végre.

Retrográd jelölés

A kísérletek során a DCN összes, colliculus inferiorba projiciáló neuronját meg kívántuk jelölni, ezért a tetrametilrodamin-dextrán kristályokat az agytörzs ventrális felszínén ejtett sagittalis bemetszésbe töltöttük. A retrográd jelölőanyag fakulását megelőzendő, a teljes kísérletet egy sötétszobában végeztük.

A rodamin alkalmazását követően az agytörzset azonnal normál aCSF-be helyeztük, melybe folyamatosan karbogént vezettünk (8-12 órán keresztül). Az inkubálás végén a preparátumot 4% formaldehid oldatban fixáltuk (12 óra, 4 °C), majd 50- 60 µm vastag szeleteket készítettünk, amelyeken utána immunjelölést végeztünk a fentebb leírt protokoll szerint.

EREDMÉNYEK

Feszültségfüggő K⁺-csatornaaleggység expressziója a nucleus cochlearisban

Kísérleteink során hét feszültségfüggő K⁺-csatornaaleggység expresszióját vizsgáltuk a nucleus cochlearisban, illetve a mag főbb projekciós neuronjaiban.

A-típusú áramot létrehozó Kv-alegységek vizsgálata (Kv4.2, Kv 4.3, Kv 3.4)

A nucleus cochlearisban mind a DCN-ben, mind pedig a VCN-ben erős Kv4.2-specifikus immunpozitivitás volt megfigyelhető. A VCN-ben a Kv4.2-pozitivitás megfigyelhető volt a bushy-neuronok sejtestén és nyúlványain is. Az octopus-sejtek is pozitívak voltak, és ezen idegsejtek esetében a synaptophysinnel végzett kettős festések a Kv4.2-csatornák preszinaptikus lokalizációjának lehetőségét is felvetették. A nervus acusticus ezzel szemben nem mutatott jelentős Kv4.2 expressziót.

A DCN immunjelölődése intenzívebb volt a VCN-hez képest, különösen egyes mélyebb területeken és a szemcsesejtes rétegben, ahol a szemcsesejtek mellett kis, szferikális, synaptophysin-pozitív struktúrákat is megfigyeltünk, melyeket glomeruláris szinapszisokként azonosítottunk. Az óriássejtek közül viszonylag kevés (1/5), míg a piramis-sejtek többsége (3/4) mutatott Kv4.2-pozitivitást.

A Kv4.3-alegységet a DCN-ben és VCN-ben egyaránt sikerült kimutatnunk. Ezen alegység — a Kv4.2-alegységhez hasonlóan — a bushy-neuronok somáján és nyúlványain egyaránt megtalálható volt, mint ahogy az octopus-sejtek is pozitívnak bizonyultak.

A DCN-ben a szemcsesejtek is expresszálták a Kv3.4 fehérjét, a mag felszínét borító ependyma réteg ezzel szemben negatív volt. Valamennyi (8/8) vizsgált óriássejt pozitív volt, azonban csak egy piramis-sejtet sikerült megbízhatóan azonosítanunk, amely ugyancsak Kv4.3-pozitívnak bizonyult.

A Kv3.4-alegység expressziójának vizsgálata azt mutatta, hogy a nucleus cochlearisban ezen fehérje nagyobb mennyiségben van jelen, mint az agytörzs szomszédos területeiben. A VCN bushy- és octopus-neuronjai pozitívnak bizonyultak, míg az itt futó hallóidegrostok negatívak voltak.

A DCN szemcsesejtes régiójában a neuronok mellett a korábban említett glomeruláris szinapszisok is rendelkeztek Kv3.4-immunpozitivitással. Az óriássejtek esetében (n = 3) nem tapasztaltunk szignifikáns immunjelölődést, míg az általunk vizsgált piramis-neuron pozitívnak bizonyult.

Alacsony feszültség hatására aktiválódó, DTX-érzékeny áramot létrehozó Kv-alegységek vizsgálata (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6)

A nucleus cochlearis számos területe mutatott erős Kv1.1-pozitivitást, így például a VCN octopus-sejtes régiója is, de a bushy-neuronok is jelölődtek.

A DCN-ben az óriás- (18/29) és piramis-sejteknek (6/9) csak egy része bizonyult pozitívnak, míg a szemcsesejtek nem mutattak jelentős immunjelölődést.

A Kv1.2-alegység vizsgálata érdekesnek ígérkezett, mivel az irodalomban ellentmondásos adatok találhatók ezen alegység expressziójának változásairól az egyedfejlődés során, ezért különösen nagy hangsúlyt fektettünk ezen kérdés vizsgálatára. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a VCN bushy- és octopus-neuronjai esetében a fiatal állatokban a Kv1.2-specifikus immunpozitivitás intenzitása alacsonyabb volt, mint az idős állatokban, és a fiatal egyedekben a jelölődés inkább intracellulárisan volt megfigyelhető, szemben az idősebb állatokra jellemző membránlokalizációval.

A DCN szemcsesejtjei (akárcsak a glomeruláris szinapszisok) Kv1.2-negatívnak bizonyultak, ezzel szemben a piramis-neuronok többsége (6/7) és számos óriássejt (14/34) expresszálta ezt a csatornaalegységet. A DCN-ben is megfigyelhető volt a Kv1.2-alegység expressziójának életkorfüggése, az idősebb állatok magjának jelölődése intenzívebb volt.

A Kv1.6-specifikus immunfestések során a VCN jelölődése intenzívebb volt, mint a DCN-é. A bushy- és octopus-sejteknek mind a somaja, mind pedig nyúlványaik pozitívak voltak.

Ezzel szemben a szemcsesejtek nem mutattak jelentős Kv1.6 jelölődést. A DCN piramis- és óriássejtjeinek nagy része (6/8 ill. 8/12) ugyanakkor expresszálta a vizsgált alegységet.

Késői típusú áramot létrehozó Kv3.1b-alegység vizsgálata

A nucleus cochlearisban a DCN és a VCN is egyértelműen Kv3.1b-pozitív volt, bár az utóbbi intenzitása erősebb volt. A VCN-ben mind a bushy-, mind pedig az octopus-sejtek erős immunjelölődést mutattak.

Az óriássejtek nagy része (27/33) is pozitív volt, és hasonló megfigyeléseket tettünk a piramis-neuronok (12/15) esetében is. A vizsgált projekciós neuronok közül a cochlearis szemcsesejtek Kv3.1b-jelölődése volt a legkisebb intenzitású.

Megbeszélés

Jelen munka egyik célkitűzése az volt, hogy egy átfogó leírást adjon a nucleus cochlearis megfelelően azonosított neurontípusainak Kv-alegység expressziójáról. Bár egyes Kv-csatorna fehérjék jelenlétét és megoszlását már korábban is leírták, ez az első olyan kísérletsorozat, amely ugyanazon állatfaj azonos korú egyedein vizsgálta 7 különböző Kv-alegység pontos, sejt-specifikus megoszlását. Túl azon, hogy vizsgáltuk az egyes neuronok

csatornaalegység-mintázata, amelynek ismerete lehetővé teszi az adott sejtípusok membrántulajdonságainak megjölését, azt is kimutattuk, hogy a különböző nucleus cochlearis neuronok egyes Kv-alegységeket eltérő mértékben expresszálják.

A nucleus cochlearis neuronok Kv-alegység expressziós mintázata

A VCN bushy-sejtjein sikerült kimutatnunk mindhárom alacsony feszültségen aktiválódó DTX-érzékeny csatornaalegységet, amelyek fontos szerepet játszhatnak ezen neuronok adaptációjában, és összhangban van azon korábbi feltevésekkel, melyek szerint a bushy-neuronokban többféle alegység is részt vesz ezen áram kialakításában. A tranziens áram létrehozásában mind LVA (Kv4.2 és Kv4.3) mind pedig HVA (Kv3.4) csatornaalegységek részt vesznek. A késői típusú áram a hallórendszer kezdeti szakaszának igen sok elemében jelen van, így a bushy-sejteken is. Ennek megfelelően erős Kv3.1-pozitivitással rendelkeztek.

A VCN másik jelentős sejtípusa az octopus-sejtek csoportja. A bushy-neuronokhoz hasonlóan az octopus-sejtek is expresszálták mindhárom LVA DTX-érzékeny csatornaalegységet, sőt a Kv1.1- és Kv1.2-alegységek expressziós szintje olyan magas volt a környező területekhez képest, hogy akár sejtspecifikus markerként is lehetne ezen antitesteket alkalmazni. Az octopus-neuronok mindhárom vizsgált, tranziens áramért felelős csatornaalegységet expresszálták, és a Kv3.1-alegység esetében is erős immunpozitivitás jellemezte őket, vagyis a VCN octopus-neuronjai mindhárom jelentős feszültségfüggő K^+ -áramot expresszálják.

A DCN szemcsesejtjei egyik LVA DTX-érzékeny csatornaalegységet sem expresszálták, mint ahogy a Kv3.1-specifikus immunfestés is negatív eredményt adott. Ezzel szemben mindhárom A-típusú áramot létrehozó csatornaalegység jelen volt ezen sejteken, sőt, a Kv4.2-specifikus immunfestés ezen neuronoknál volt a legintenzívebb. Mindezek mellett jelen tanulmányban igazoltuk a nucleus cochlearisban található glomeruláris szinapszisok Kv4.2- és Kv3.4-pozitivitását is. A glomeruláris szinapszisokat a cerebellumban is erősen Kv4.2-pozitívnak találtuk, ami azt a nézetet támasztja alá, hogy a nucleus cochlearis és a cerebellum eredete azonos, és a két struktúra igen nagyfokú morfológiai hasonlóságot mutat.

Végül, de nem utolsó sorban, eredményeink alapján feltételezhető, hogy sem a piramis-, sem pedig az óriássejtek nem alkotnak homogén sejtpopulációt a Kv-expressziós mintázat terén; azaz elképzelhető, hogy ezek a neurontípusok további funkcionális és/vagy morfológiai alcsoportokra oszthatók. Érdeemes megemlíteni, hogy az óriássejtek többsége igen erős Kv3.1-pozitivitást mutatott, bár a fentebb említett heterogenitás itt is megfigyelhető volt.

A Kv1.2-csatornaalegység esetében a nucleus cochlearison belüli megoszlás mellett a fehérje expressziós mintázatának korfüggését is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy amellet, hogy a csatornaalegység expressziós szintje magasabb idős állatokban, azok lokalizációja is változik az életkorral: fiatal egyedekben inkább intracellulárisan van jelen, míg idősebb állatokban inkább a membránlokalizáció a jellemző.

Eredmények

Tengerimalac ganglion spirale neuronjainak morfológiai vizsgálata

A tengerimalac ganglion spirale neuronok morfológiai jellemzői a „cochlearis úszószelet” preparátumban

Kifejlesztettünk egy technikát, a cochlearis úszószelet preparátumot, amely lehetővé teszi az SGC-fészkek felépítésének háromdimenziós vizsgálatát. Az SGC-k morfológiai jellemzőinek meghatározása során konfokális mikroszkóppal készített Z-stack képsorozatokat használtunk, így az egyes SGC-ket mindig a legmegfelelőbb szögből vizsgálhattuk. A morfológiai analízis során meghatároztuk az egyes neuronok legnagyobb átmérőjét, keresztmetszeti területét, kerületét és az elongációs faktort. Az SGC-ket két populációra lehetett osztani: nagy és kis sejtekre. A nagy sejtek esetében ($n = 100$) az átlagos átmérő $19,9 \pm 2,4 \mu\text{m}$, a keresztmetszeti terület $220,6 \pm 35,6 \mu\text{m}^2$, a kerület $56,5 \pm 5,6 \mu\text{m}$, az elongációs faktor értéke pedig $1,42 \pm 0,23$ volt. Kis sejtek esetében ($n = 11$) ugyanezen paraméterek értéke $14,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $142,3 \pm 28,4 \mu\text{m}^2$, $43,8 \pm 4,8 \mu\text{m}$ és $1,15 \pm 0,28$ volt. Az immunhisztokémiai kísérletek során mind a nagy, mind pedig a kis sejtek NSE-pozitívak voltak, ugyanakkor csak a nagy sejtek mutattak S-100 jelölődést, míg a kis sejtek negatívak voltak, ami arra utal, hogy csak az előbbieket borítja myelinhüvely. A morfológiai és immunhisztokémiai eredmények alapján a nagy sejteket I-es, míg a kis sejteket II-es típusú ganglion spirale neuronokként azonosítottuk.

A tengerimalac ganglion spirale neuronok morfológiai jellemzői beágyazott preparátumban

Összevetve a beágyazott metszeteken végzett morfometriás mérések adatait a cochlearis úszószelet preparátumokban mért adatokkal, nyilvánvalóvá vált, hogy a hosszabb formalinos fixálás és az azt követő hisztológiai eljárások jelentősen csökkentették a neuronok valamennyi jelentős morfometriai paraméterét és azok alakja is megváltozott, valamint jelentősen csökkentek a kis és nagy sejtek közti különbségek is. A beágyazott preparátumok alkalmazása során nemcsak a sejtek megváltozott morfológiája okozott nehézséget, hanem az is, hogy amennyiben a sejtmag nem került bele a metszési síkba, nem lehetett megállapítani, hogy a metszési sík a sejt középső síkján ment-e keresztül, ami pedig alapvető fontosságú lett volna a sejtek átmérőjének (és a többi morfológiai paraméternek) a meghatározása során.

A fenti eredmények alapján kijelenthető, hogy a cochlearis úszószelet preparátum jobban megőrizte az SGC-k geometriáját és méretét, mint a hagyományos technikával készült beágyazott preparátum, és segítségével nagyobb biztonsággal lehetett megkülönböztetni a nagy (I-es típusú) és kis (II-es típusú) sejteket.

Feszültségfüggő K^+ -csatornaalegység expressziója az SGC-kben

Alacsony feszültség hatására aktiválódó, DTX-érzékeny áramot létrehozó Kv-alegységek vizsgálata (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6)

Mind a cochlearis úszószelet preparátumon, mind pedig a hagyományos paraffinba ágyazott mintákon végzett immunhisztokémiai kísérletek azt mutatták, hogy az SGC-k mindhárom DTX-érzékeny áramot létrehozó Kv-alegységet expresszálják mind a sejtestükön mind pedig a nyúlványukon. A Kv1.1- és Kv1.6-alegységeket a neuronok túlnyomó többsége (>95%) expresszálta, és nem tapasztaltunk eltérést az I-es és II-es típusú neuronok között. A Kv1.2-alegység esetében azonban míg szinte valamennyi I-es típusú sejt pozitív volt, addig a II-es típusú neuronoknak csak kb. fele expresszálta ezt az alegységet. Ezen túlmenően az egyes sejtek Kv1.2-expressziós szintje között is jelentős eltérések mutatkoztak.

A-típusú áramot létrehozó Kv-alegységek vizsgálata (Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3, Kv3.4)

A Kv1.4-alegység jelenlétének és megoszlásának vizsgálata a jelen tanulmányban két okból is különösen érdekesnek ígérkezett: egyrészt a Kv1.4-alegységek kapcsolódhatnak DTX-érzékeny Kv-alegységekkel, módosítva az általuk létrehozott áram kinetikáját; másrészt pedig korábban már leírták a Kv1.4-immunpozitivitás hiányát patkány nucleus cochlearisban, így felmerült a kérdés, hogy vajon ez az alegység a hallórendszer teljes kezdeti szakaszából hiányzik-e, beleértve a ganglion spirale-t is. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a ganglion spirale neuronok érdemi Kv1.4-expresszióval jellemezhetők. A jelölődés főleg a neuronok sejtestét érintette, intenzitása pedig változó volt. A nyúlványok csak gyenge pozitivitást mutattak.

A Kv4.2- és Kv4.3-alegységek vizsgálata során megállapítottuk, hogy ezen fehérjéket az SGC-k többsége expresszálja, és a csatornaalegységek elsősorban a neuronok somáján vannak jelen, bár a nyúlványok is jelölődtek.

A HVA K^+ -áramot kialakító Kv3.4-alegység jelenlétét is sürült kimutatni az SGC-k többségén, bár az egyes sejtek esetében az immunjelölődés intenzitása változó volt, és inkább csak a neuronok somáján volt megfigyelhető.

A vizsgált négy Kv-alegység (Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3, Kv3.4) egyikénél sem tapasztaltunk jelentős eltérést az I-es és II-es típusú SGC-k immunfestődésében.

Késői típusú áramot létrehozó alegységek vizsgálata (Kv3.1b, Kv3.2)

A késői típusú K^+ -csatornák felépítésében részt vevő számos Kv-alegység közül jelen munkában a Kv3.1b- és a Kv3.2-alegységek jelenlétét vizsgáltuk. Az SGC-k nagy része Kv3.1b-pozitívnak bizonyult. Az immunpozitivitás mind a sejtesteken, mind pedig a nyúlványokon jelen volt, a membrán pedig intenzívebben jelölődött, mint a citoplazma. Ennél az alegységnél sem tapasztaltunk eltérést az I-es és II-es típusú neuronok között.

A jelen munkában vizsgált másik, ugyancsak késői típusú áramért felelős Kv-alegység (Kv3.2) nem expresszáldott az SGC-kben. Ezen megfigyelésünket mind a cochlearis úszószelet preparátumokon, mind pedig a beágyazott metszeteken végzett kísérletek alátámasztották, ami arra utal, hogy ezen alegység szerepe elhanyagolható az SGC-k késői típusú K^+ -áramának kialakításában.

Hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornaalegységek expressziójának vizsgálata az SGC-kben

HCN-specifikus antitestek validálása

Jelen munkában mind a négy ismert HCN-alegység jelenlétét vizsgáltuk a tengerimalac SGC-ken. Minthogy az alkalmazott antitesteket tengerimalacon ezidáig még nem vizsgálták, az immunhisztokémiai eredményeket teljes ganglion spirale mintákon végzett Western-blot kísérletekkel validáltuk. Valamennyi HCN-specifikus antitest egyetlen immunpozitív sávot adott a várt molekulatömeg értékeknél, vagy azok közelében, amik a blokkoló peptidekkel végzett preadszorpciós kontrollkísérletek során eltűntek.

A ganglion spirale neuronok HCN-alegység expressziós mintázata

Valamennyi vizsgált HCN-alegység expresszióját sikerült kimutatni mind cochlearis úszószelet preparátumokon, mind pedig a paraffinba ágyazott mintákon. Mind a négy HCN-alegység esetében elmondható, hogy az SGC-k túlnyomó többsége pozitívnak bizonyult, és az immunjelölődés a neuronok somaján és nyúlványán egyaránt megfigyelhető volt. Érdekes volt, hogy míg az I-es és II-es típusú neuronok között nem tapasztaltunk eltérést a HCN-csatornaalegység mintázat terén, addig az egyes neuronok immunjelölődési intenzitásátában igen jelentős eltérések mutatkoztak, még a szomszédos sejtek esetében is.

A HCN1- és HCN3-alegységek apiko-bazális grádiense

A teljes modiolusokon végzett immunfestések során nem tapasztaltunk jelentős eltérést a ganglion spirale apexében illetve bázisában található SGC-k immunfestődésének intenzitásában. Mindazonáltal, mivel nem végeztünk denzitometriás méréseket, és más képanalizáló eljárással sem vizsgáltuk a felvételeket, nem jelenthettük ki teljes bizonyossággal, hogy a HCN-alegységek egyenletesen oszlanak meg a modiolus tengelye mentén, különösen annak fényében, hogy alkalmanként még az egymás szomszédságában elhelyezkedő sejtek immunpozitivitásának intenzitása között is igen nagy eltérések adódtak.

A HCN-alegységek esetleges apiko-bazális grádiensének vizsgálatát így Western-blot kísérletekkel vizsgáltuk. A kísérleteket a modiolusok apikális, intermediaer és bazális harmadából készített szövetmintákon végeztük, az eredményeket pedig denzitometriás módszerrel értékeltük ki. A négy vizsgált HCN-alegység közül a HCN1- és HCN3-alegység expressziós szintje egyértelmű apiko-bazális grádienset mutatott: a HCN1-fehérje szintje az apikális régióban $3,5 \pm 0,9$ -szer volt magasabb a bazális területeken mért értékeknél, míg a HCN3 protein esetében a különbség $2,9 \pm 0,5$ -szeres volt.

Megbeszélés

Kísérleteink során kidolgoztunk egy technikát, amely lehetővé tette az SGC-k konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatát, ami számos előnnyel járt a hagyományos paraffinba ágyazott metszetekkel szemben. Egyrészt a rövidebb fixálási idő valamint a dekalcinálás és antigénfeltárás szükségtelenségének köszönhetően jobban megőrződött az egyes SGC-k morfológiája, és így az I-es és II-es típusú neuronok is könnyebben megkülönböztethetőek voltak. Másrészt, míg a paraffinba ágyazott mintákból készített metszeteken csak egy síkban lehet vizsgálni az SGC-ket, és a nyúlványoknak is legfeljebb csak kis szakasza látható, addig a cochlearis úszószelet preparátumban a konfokális mikroszkópos felvételek az SGC-fészkek háromdimenziós felépítését is megmutatták, így segítségükkel az SGC-k morfológiai tulajdonságait mindig a legmegfelelőbb szögből vizsgálhattuk, és a neuronok nyúlványainak lefutását is hosszan nyomon lehetett követni.

Tranziens áramért felelős K^+ -csatornaalegységek jelenléte a tengerimalac ganglion spiraleban

A tranziens K^+ -áram jelenléte vagy hiánya az egyik legvitatottabb kérdés az SGC-k ionáramaival kapcsolatban. A ganglion spirale neuronokat érintő vizsgálatok egy részében nem sikerült ilyen inaktiválódó áramokat kimutatni sem akutan izolált, sem pedig szövettenyészetben fenntartott SGC-ken, ami arra utalt, hogy az ezen komponens kialakításáért felelős csatornák vagy teljes egészében hiányoznak a sejtekből, vagy kizárólag a nyúlványokban expresszálnak, amelyek a preparálás során elvesztek. Ezzel más tanulmányokban kimutattak egy tranziens áramkomponenst, sőt, annak erőteljes korfüggésére is rámutattak. Cochlearis szeletpreparátumban ugyancsak sikerült kimutatni a tranziens K^+ -áram jelenlétét az SGC-ken, sőt ez izolált sejteken is sikerült, ami cáfolta azt a korábbi feltevést, mely szerint ezen csatornák kizárólag az SGC-k nyúlványain helyezkednek el. A cochlearis szeletpreparátumban igazoltan II-es típusú neuronokon is sikerült kimutatni egy tranziens K^+ -áram aktiválódását.

Az SGC-k által expresszált tranziens áram kinetikájának elemzése arra utalt, hogy az áramnak több komponense is van, vagyis valószínűleg többféle Kv-alegység is részt vesz a tranziens K^+ -áramért felelős csatornák felépítésében, ám ezidáig mindössze a Kv4.2-alegység jelenlétét mutatták ki szövettenyészetben fenntartott egér SGC-ken (Adamson és mtsai, 2002). A Kv4.2 expresszióját a jelen tanulmányban is sikerült demonstrálni, emellett azonban kimutattuk a Kv4.3-alegységek jelenlétét is, ami felveti Kv4.2/Kv4.3 heterotetramerek kialakulásának lehetőségét is. A Kv4.2- és Kv4.3- mellett a Kv1.4-alegységek expresszióját is meg kell említeni, ami a Kv1 főcsalád egyéb tagjaival (elsősorban Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.6) asszociálódva részt vehet a DTX-érzékeny áram létrehozásában.

Míg a Kv4.2-, Kv4.3- vagy Kv1.4-alegységekből felépülő csatornák LVA tranziens áramot hoznak létre, addig a Kv3.4-alegységeket tartalmazó csatornák pozitívabb membránpotenciálokon aktiválódó tranziens áramot generálnak. Az SGC-k által expresszált tranziens áram inaktivációs és reaktivációs kinetikája alapján már korábban feltételezték Kv3.4-alegységek jelenlétét is, ám a jelen kísérletek szolgáltatják az első bizonyítékot ezen alegységek előfordulására. Bár a tranziens K^+ -áram pontos szerepe a ganglion spirale sejtekben még vitatott, ezen áramféleség fontos lehet a frekvenciakódolás biztosításában, továbbá különböző, az SGC-k funkcionális tulajdonságait szabályozó mechanizmusok is ezen áram módosításán keresztül fejthetik ki hatásukat, és egyes feltételezések szerint a II-es típusú sejtek működésében is fontos szerepet játszhatnak.

Az alacsony feszültség hatására aktiválódó, DTX-érzékeny K^+ -áramért felelős alegységek expressziója az SGC-kben

Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a DTX-érzékeny K^+ -áram expressziója a hallórendszer kapcsolóneuronjainak fontos jellemzője. Ez az áram a sejtek gyors tüzelésekor játszhat fontos szerepet, gátlása pedig drámai változásokat okoz a gyorsan adaptálódó SGC-k tüzelési mintázatában: a sejtek tartós depolarizáció hatására a gyorsan adaptálódó válasz helyett AP-sorozatot produkálnak. Az LVA K^+ -csatornák működése meggátolhatja a túlzott mértékű depolarizációt és hiperexcitabilitást, ami különösen nagy jelentőségű lehet az SGC-kben a nagy frekvenciájú és a stimuláció időbeliségét pontosan tükröző információfeldolgozás során. Jelen munkában igazoltuk, hogy a tengerimalac SGC-k is expresszálják a Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.6-alegységeket. Korábban felmerült annak lehetősége, hogy a DTX-érzékeny áramért felelős K^+ -csatornák felépítésében Kv1.4-alegységek is részt vehetnek, amely felvetés kísérletes bizonyítását eredményeink jelentik.

A késői típusú K^+ -áramért felelős alegységek expressziója az SGC-kben

Az SGC-k magas frekvenciájú tüzelési mintázata csak részben köszönhető a DTX-érzékeny áramnak, ugyanis ez az aktivitási mintázat igen gyors és erős repolarizációt igényel, amiben a késői típusú K^+ -áramok játszanak fontos szerepet. Számos K^+ -csatornaalegység vehet részt a késői típusú áram létrehozásáért felelős K^+ -csatornák felépítésében, ezek közül mi a Kv3.1- és Kv3.2-alegységeket vizsgáltuk. Jelen munkában elsőként igazoltuk immunhisztokémiai kísérletekkel a Kv3.1b-alegységek jelenlétét a tengerimalac ganglion spiraleban, míg eredményeink szerint a Kv3.2-alegység nem található meg ezen neuronokban.

A hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationcsatornák jelenléte és alegységösszetétele a ganglion spiraleban

Az I_h jelenlétét már több állatfaj SGC-in leírták. Bár ezen áram pontos szerepe még nem ismert, feltételezések szerint számos fiziológiai szerepe lehet. A jelen munkában igazoltuk, hogy a tengerimalac SGC-k mind a négy ismert HCN-alegységet expresszálják. Ezen áramnak szerepe lehet ezen sejtek intrinsic aktivitásában, depolarizálhatja a membránt az akciós potenciált követő hiperpolarizációs fázisban, csökkentheti a membrán időkonstansát, ezáltal növelve az SGC-kben a membránpotenciál-változások sebességét, szerepet játszhat a nyugalmi membránpotenciáljának beállításában is, és elképzelhető, hogy a DTX-érzékeny LVA K^+ -áramoknak és az I_h -nak fontos szerepe van a pillanatnyi membránpotenciálnak, és így a sejt érzékenységének beállításában.

Bár szinte valamennyi SGC-n sikerült kimutatni a HCN-alegységek jelenlétét, az expresszió mértékében igen jelentős eltérések voltak még az egymás közvetlen közelében elhelyezkedő neuronok esetében is. Ezen megfigyelések összhangban állnak a korábbi elektrofiziológiai mérések eredményeivel. Az I_h heterogenitását egy hipotézis szerint a HCN-csatornaalegységek eltérő foszforilációja eredményezi, a jelen munkában bemutatott eredmények alapján azonban feltételezhető, hogy az egyes sejtek eltérő HCN-csatornaalegység mintázata is hozzájárulhat az ismert heterogenitáshoz.

Az egyes neuronok csatornaalegység mintázatának vizsgálatán túl jelen munkában HCN1- és HCN3-alegységekről sikerült kimutatnunk, hogy mennyiségük a cochlea tengelye mentén változik: az apikális területeken expressziós szintjük magasabb, mint a bazális területeken.

Az I-es és II-es típusú sejtek közti eltérések

Ezidáig még nem sikerült minden kétséget kizáróan eldönteni az I-es és II-es típusú SGC-k esetleges funkcionális különbözőségének kérdését, az irodalmi eredmények ellentmondásosak. A jelen munka sem képes ezen kérdés megválaszolására, azonban figyelembe véve, hogy a két neurontípus hasonló Kv- és HCN-alegységmintázattal rendelkezett, valószínűleg nem várhatók nagy eltérések a két neurontípus membrántulajdonságaiban. Mindazonáltal az I-es és II-es típusú sejtek Kv1.2-alegység expressziójában tapasztalt eltérés figyelemreméltó. Bár logikusnak tűnhet a feltételezés, hogy a II-es típusú sejtek egy része által mutatott lassabb adaptáció és alacsonyabb aktivációs küszöb az adott neuron csökkent (vagy nem létező) Kv1.2 expressziójára vezethető vissza, nem szabad elfelejteni, hogy számos egyéb, a jelen munkában nem tárgyalt mechanizmus is jelentősen befolyásolhatja ezen idegsejtek membrántulajdonságait. Mindebből fakadóan a Kv1.2-alegységek funkcionális jelentőségének pontos meghatározásához további vizsgálatokra van szükség.

Összefoglalás

Kísérleteink során egyes feszültségfüggő K^+ -csatornák jelenlétét illetve megoszlását vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerekkel a hallópálya kezdeti szakaszának két elemében: a ganglion spiraleban és a nucleus cochlearisban. Hét feszültségfüggő K^+ -csatornaalegység expressziós mintázatát vizsgáltuk a nucleus cochlearisban, illetve a mag főbb profekciós neuronjaiban. Eredményeink segítséget nyújthatnak az egyes sejtípusok membrántulajdonságainak megjósolásához. Az egyes neuronok csatornaalegység-mintázatának vizsgálatán túl azt is kimutattuk, hogy a különböző nucleus cochlearis neuronok egyes Kv-alegységeket eltérő mértékben expresszálnak, sőt egyes alegységeket a jövőben akár sejt specifikus markerként is fel lehet használni.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a nucleus cochlearis két nagy fontosságú sejtípusa, a piramis- és óriássejtek alkotnak homogén sejtpopulációt a Kv-expressziós mintázat terén; azaz elképzelhető, hogy ezek a neurontípusok további funkcionális és/vagy morfológiai alcsoportokra oszthatók.

Ugyancsak sikerült kimutatnunk a nucleus cochlearisban található glomeruláris szinapszisok Kv4.2- és Kv3.4-pozitivitását. Minthogy a glomeruláris szinapszisokat a cerebellumban is erősen Kv4.2-pozitívnak találtuk, ezen eredmény is azt a hipotézist támasztja alá, mely szerint a nucleus cochlearis és a cerebellum eredete azonos, és a két struktúra igen nagyfokú morfológiai hasonlóságot mutat.

A hallópálya másik, jelen munkában vizsgált eleme a ganglion spirale volt. Munkánk során kidolgoztunk egy új technikát a ganglion spirale neuronok vizsgálatára, mely a korábban alkalmazott módszereknél jobban megőrizte az idegsejtek morfológiáját, és lehetővé tette az SGC-k háromdimenziós vizsgálatát.

Kísérleteink során kilenc Kv- és mind a négy ismert HCN-alegység jelenlétét és megoszlását vizsgáltuk a tengerimalac SGC-ken. Igazoltuk, hogy a ganglion spirale sejtek egyaránt expresszálnak LVA DTX-érzékeny, késői típusú és A-típusú áram kialakításáért felelős feszültségfüggő K^+ -csatornaalegységeket. Kimutattuk továbbá, hogy az SGC-ken megtalálható mind a négy ismert HCN-alegység, és hogy ezen fehérjék expressziós szintje jelentős eltérést mutat az egyes sejtek szintjén. Ezen túlmenően a HCN1- és HCN3-alegységek esetében kimutattuk, hogy expressziós szintjük a modiolus apikális területein magasabb, mint a bazális területeken.

Közlemények

A téziseket megalapozó *in extenso* közlemények:

1. **Rusznák Z, Bakondi G, Pocsai K, Pór A, Kosztka L, Pál B, Nagy D, Szucs G.**
Voltage-gated Potassium Channel (Kv) Subunits Expressed in the Rat Cochlear Nucleus.
J Histochem Cytochem. **56**(5):443-65 **IF: 2,449**
2. **Bakondi G, Pór Á., Kovács I, Szűcs G, Rusznák Z.**
Voltage-gated K⁺ channel (Kv) subunit expression of the guinea pig spiral ganglion cells studied in a newly developed cochlear free-floating preparation
Brain Res. **1210**: 148-162. (elektronikus formában hozzáférhető) **IF: 2,341**
3. **Bakondi G, Pór Á., Kovács I, Szűcs G, Rusznák Z.**
HCN subunit expression pattern of guinea pig spiral ganglion cells
Bírálat alatt

A tézisekben fel nem használt *in extenso* közlemények:

1. **Pocsai K, Pal B, Pap P, Bakondi G, Kosztka L, Rusznak Z, Szucs G.** Rhodamine backfilling and confocal microscopy as a tool for the unambiguous identification of neuronal cell types: a study of the neurones of the rat cochlear nucleus.
Brain Res Bull. **71**(5):529-38. **IF: 1,684**
2. **Pocsai K, Kosztka L, Bakondi G, Gonczi M, Fodor J, Dienes B, Szentesi P, Kovacs I, Feniger-Barish R, Kopf E, Zharhary D, Szucs G, Csernoch L, Rusznak Z.**
Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture.
Cell Mol Life Sci. **63**(19-20):2364-76. **IF: 4,655**
3. **Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, Telek A, Gönczi M, Szucs G, Csernoch L.**
Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells.
Virchows Arch. **452**(4):415-26 **IF: 2,251**

A közlemények összesített impakt faktora: 13,38