

**AZ INTRACELLULÁRIS Ca^{2+} -KONCENTRÁCIÓ
SZABÁLYOZÁSA PATKÁNY NUCLEUS COCHLEARIS
NEURONOKBAN**

Pór Ágnes

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán

Prof. Dr. Szűcs Géza

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

BEVEZETÉS

A nucleus cochlearis jelentősége és felépítése

A szőrsejtektől az elsődleges érzőneuronok, a ganglion spirale bipoláris sejtjei akciós potenciál sorozatok formájában szállítják a hallási információt a hallóközpontok irányába, így elsőként a nucleus cochlearis (CN) területére.

Az utóbbi évek kutatásainak eredményei alapján egyre nyilvánvalóbb, hogy a CN nem egyszerűen a hallópálya átkapcsoló egyik állomása, hanem itt megkezdődik az információ feldolgozása is. A nervus acusticus által a mag területére szállított akciós potenciál sorozatok ugyanis több különböző, párhuzamos útvonalra tevődnek át. Az akusztikus információ ezen „szétosztása” a magban található számos másodlagos érzőneuron eltérő agyterületekre történő projekciója révén valósul meg.

A CN két részre tagolható. A dorsalis terület (DCN) igen jelentős szerepet játszik a hangforrás térbeli lokalizációjában, illetve az akusztikus információ időviszonyainak feldolgozásában. A DCN legtöbbször vizsgált sejtfelesége a piramis-sejt, további projekciós neuronok az óriás-sejt és a Purkinje-szerű sejt. A ventralis magterület (VCN) további két részre, egy elülső (anterior; AVCN) és egy hátulsó (posterior; PVCN) területre osztható. Az elülső résznek elsősorban kapcsoló funkciója van, míg a PVCN szerepe a hallási információ időben hű továbbítása. Az AVCN jelentős projekciós neuronját a szferikális bushy-sejtek képezik. A PVCN-ben a bushy-sejtek másik típusa, a globuláris neuronok valamint az octopus-sejtek találhatóak.

A citoplazmatikus Ca^{2+} szerepe és szabályozása neuronokban

Régóta ismert, hogy számos sejtfunkció aktiválásához elengedhetetlen az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelkedése (izomkontrakció, exokrin és endokrin szekréció, mitózis, stb.). Köztudott, hogy ingerlékeny sejtek esetén a sejt felszíni Ca^{2+} -csatornák hozzájárulhatnak az elektromos sajátságok kialakításához, a rajtuk keresztül belépő Ca^{2+} akár akciós potenciált is kiválthat.

A neuronokban a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) módosíthatja egyes sejt felszíni ioncsatornák kapuzási paramétereit (pl. Ca^{2+} -függő K^+ - és Cl^- -csatornák), befolyásolva ezáltal a sejt membránsajátságait, így ingerlékenységét. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése alapvető jelentőségű a neurotranszmisszió folyamatában, továbbá intracelluláris enzimek aktivitása is függhet a Ca^{2+} jelenlététől (pl.

protein kináz C), az úgynevezett „Long-Term Potentiation” (LTP) jelensége pedig a neuronszintű tanulási folyamatok egyik lehetséges értelmezését kínálja.

A szabályozás szempontjából lényeges, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció gyorsan növekedjen, de ezt követően rövid időn belül újra a nyugalmi szintre térjen vissza (Ca^{2+} -tranziensek kialakulása). A citoplazmában megjelenő Ca-ionok egyik forrása az extracelluláris tér, ahonnan a sejtmembránban található, depolarizáció hatására aktiválódó feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon keresztüli Ca^{2+} belépés valósul meg. Emellett a kémiai szinapszisok posztszinaptikus membránjában található ligandvezérelt ionotróp receptorok közül is számos mutat permeabilitást Ca^{2+} iránt. Legjelentősebbek a glutamát-receptorok, de említést érdemelnek a nikotin típusú acetilkolin receptorok is. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedésében, neurontípusonként változó mértékben, jelentős lehet az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás szerepe is.

A szervezetben végbemenő regulációs folyamatok közös sajátossága, hogy a kívánt hatás kifejlődése után a szabályozó paraméter értéke a nyugalmi szintre tér vissza. Ez különösen fontos szempont a neuronális Ca^{2+} -függő folyamatok esetén, hiszen a rendkívül magas vagy túl hosszú ideig tartó magas intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció az idegsejtekben citotoxikus hatású, degeneratív folyamatokat indíthat el. Nem meglepő, hogy a neuronok az intracelluláris Ca^{2+} szintet igen hatékonyan csökkentő mechanizmusokkal rendelkeznek.

A citoplazmába belépő Ca-ionokat átmenetileg kalciumkötő fehérjék puffereket lehetnek. Ezek jelentőségét mutatja, hogy koncentrációjuk megemelését követően kisebb intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásokat produkál a sejt. A Ca^{2+} visszavétele az intracelluláris raktárakba az endoplazmatikus retikulum membránjában található SERCA (sarcoplasmic reticular Ca^{2+}) pumpa által valósul meg. Jelentős a mitokondriumok Ca^{2+} akkumuláló szerepe is, elsősorban nagy Ca^{2+} -terhelés esetén. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésének legegyszerűbb módja természetesen az extracelluláris térbe történő transzport. Ebben a neuronok membránjában jelenlévő Ca^{2+} -pumpa (PMCA) és a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus vesz részt.

Célkitűzések

A tézisekben bemutatott munka fő célja a nucleus cochlearis neuronok, ezen belül is elsősorban a piramis-sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának további elemzése volt. A feltett kérdések három fő téma köré csoportosíthatók.

1. Extracellulárisan alkalmazott glutamát hatására kialakuló citoplazmatikus Ca^{2+} -tranziensek sajátosságainak vizsgálata a nucleus cochlearis dorsalis részéből enzimatikusan

izolált piramis-neuronokon. Az NMDA és AMPA-típusú glutamát receptorok valamint a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerepe a tranziensek létrejöttében. A K^+ és a glutamát hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziensek sajátosságainak összehasonlítása.

2. A CN projekciós neuronjaiban a Ca^{2+} -puffer fehérjék (kalbindin [CB], kalretinin [CR] és parvalbumin [PA]) jelenlétének és megoszlásának vizsgálata úszószeleteken, immunhisztokémiai módszerekkel. Az egyes fehérjék kolokalizációjának vizsgálata kettős immunjelöléssel. A neuronok egyértelmű azonosítása érdekében a sejtek retrográd töltésének kidolgozása.

3. A citoplazmatikus Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok jelentőségének tanulmányozása izolált piramis-sejteken. Speciális blokkolószer alkalmazásával a sejtmembránban található PMCA és $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus, illetve az ER-ban levő SERCA-pumpa szerepének kimutatása a citoplazmatikus Ca^{2+} -szint csökkentésében.

MÓDSZEREK

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése

A piramis-sejteket 6-11 napos patkányok nucleus cochlearisaiból enzimatikusan (kollagenáz és proteáz) izoláltuk. Az izolált neuronokat tartalmazó sejtszuszpenziót fedőlemezre cseppentettük, majd 10 % lószérumot tartalmazó Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) tápfolyadékban inkubáltuk 3-4 órán keresztül. A sejteket 3 $\mu\text{mol/l}$ Fura-2 Ca^{2+} -indikátor festék észterifikált formájával töltöttük fel.

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérése Deltascan-1 (Photon Technology International, New Brunswick, USA) rendszeren történt. A Fura-2 festéket 340 és 380 nm hullámhosszúságú monokromatikus fényrel felváltva gerjesztettük; a festék által kibocsátott fényt pedig 510 nm-en regisztráltuk. A mérések során a mintavételezés frekvenciája 50 Hz volt. A 340 és 380 nm-es gerjesztő hullámhosszak esetén mért fényintenzitások hányadosát az OSCAR nevű számítógépes program alkalmazásával képeztük (Photon Technology International, New Brunswick, USA).

A mért eredmények analízise során csak azokat a sejteket vettük figyelembe, amelyek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációja 30 nmol/l alatt volt. Kísérleteink során a sejteket folyamatosan perfundáltuk kontroll oldattal, a többi oldatot és a gátlószereket egy gyors cserét biztosító mikroperfúziós rendszer segítségével juttattuk a sejtek környezetébe. Kísérleteinket szobahőmérsékleten végeztük.

Immunhisztokémia

A kísérletekhez 30 napos patkányokat használtunk. Miután az agytörzset 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk, 60 μm vastag szagittális szeleteket készítettünk a nucleus cochleárisból. Az aspecifikus kötőhelyeket 10 % normál lószérummal blokkoltuk, majd a primer antitestekkel inkubáltuk a szeleteket. A pufferfehérjék kolokalizációjának vizsgálata céljából kettős jelöléseket végeztünk. Másodlagos antitestként fluoreszcens festékekkel konjugált antitesteket alkalmaztunk. A szeleteket DAPI tartalmú fedőanyaggal fedtük le, a sejtmagok láthatóvá tétele céljából. Vizsgálataink során kontroll kísérleteket is végeztünk a primer antitestek specifikus reakciójának igazolására (preadszorbció, primer antitest elhagyása).

Retrográd jelölés

A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak retrográd jelöléséhez tetrametilrodamin-konjugált dextránt alkalmaztunk (molekulatömeg = 3000). Tekintettel arra, hogy a nucleus cochlearisból kilépő projekciós neuronok axonjai az agytörzs felszíni rétegeiben haladnak tovább, egy finom tű segítségével ejtett felületes karcolással ezen axonok könnyen átvághatóak. Az ejtett vágásokba a jelölő molekulákat ugyanezen tű segítségével juttattuk be.

A jelölést követően az agytörzset 8 órán keresztül életben tartottuk a retrográd transzport teljesülése érdekében, majd 4 %-os paraformaldehidbe helyeztük azt. Ezután 50 µm vastag szagittális szeleteket készítettünk a jelöléssel azonos oldali nucleus cochlearisból. A szeleteket ebben az esetben is DAPI tartalmú fedőanyaggal fedtük le.

Mikroszkópok

A retrográd jelölések vizsgálata fluoreszcens mikroszkóp (Eclipse 600W; Nikon, Tokyo, Japan), míg az immunreakciók kimutatása fluoreszcens és konfokális (LSM 510; Zeiss, Jena, Germany) mikroszkóp segítségével történtek. A felvételek elkészítéséhez és feldolgozásához a Spot RT v3.5 illetve a Zeiss LSM Image Browser programokat valamint az Adobe Photoshop 7.0 szoftvert alkalmaztuk. Konfokális mikroszkópia esetén a vizsgálni kívánt sejtekről több síkban készítettünk felvételeket, melyeket ezután egymásra illesztettük.

EREDMÉNYEK

1. A glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek jellemzése izolált piramis-sejteken

1.1. AMPA és NMDA-receptorok jelentősége a Ca^{2+} -tranziensek létrejöttében

A glutamát által kiváltott Ca^{2+} -válaszok kvantitatív vizsgálata során először meghatároztuk az extracellulárisan alkalmazott glutamát dózis-hatás görbét. További kísérleteinkben a glutamát biztosan telítő dózist (5 mmol/l) alkalmaztunk legalább 5 s-ig. Ebben a koncentrációban a glutamát 22,7 és 77,6 nmol/l közötti nagyságú Ca^{2+} -tranzienseket hozott létre, melyek átlagos amplitúdója $46,1 \pm 3,0$ nmol/l volt ($n = 66$). Egyes neuronokon magas extracelluláris K^+ -koncentrációt és glutamátot egyaránt alkalmaztunk Ca^{2+} -tranziensek kiváltására, a kétféle válasz összehasonlítása céljából. Ezen sejtekben az 50 mmol/l K^+ által kiváltott tranziensek átlagos amplitúdója $217,7 \pm 20,2$ nmol/l volt, míg 5 mmol/l glutamát $60,8 \pm 6,8$ nmol/l amplitúdójú tranzienseket váltott ki ($n = 9$).

Kísérleteink további részében a különböző ionotróp glutamát-receptorok Ca^{2+} -tranziensek létrehozásában játszott szerepét vizsgáltuk az egyes típusokra specifikus antagonisták használatával. Az AMPA-receptorokat blokkoló CNQX (100 μ mol/l) hatására az 5 mmol/l glutamát által kiváltott tranziensek $33 \pm 4,9$ nmol/l-ről $2,7 \pm 0,9$ nmol/l-re csökkentek ($n = 13$). Az NMDA-receptorok szerepét 100 μ mol/l AP5 alkalmazásával vizsgáltuk. A szer alkalmazása során a Ca^{2+} -tranziens a kontroll $52,4 \pm 4,2$ nmol/l-es amplitúdóról $48 \pm 3,4$ nmol/l-re csökkent, a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($n = 7$).

Mivel az AMPA-receptorok gátlásához használt CNQX az NMDA receptorokat is blokkolhatja, ezért egy jóval specifikusabb AMPA-antagonista, az NBQX hatását is vizsgáltuk (10 μ mol/l). 100 μ mol/l AP5-tel és 200 μ mol/l Cd^{2+} -mal történt előkezelés után a glutamát-indukált tranziens amplitúdója $25 \pm 4,8$ nmol/l volt, ezt NBQX $12,1 \pm 3$ nmol/l-re csökkentette, a hatás szignifikáns volt és kimoshatónak bizonyult ($n = 6$).

1.2. Az NMDA-típusú ionotróp glutamát-receptorok aktivációja

Mivel az AP5 nem befolyásolta a glutamát-indukált Ca^{2+} -tranzienseket, nem lehetett kizárni annak lehetőségét, hogy az izolált idegsejtek nem rendelkeznek funkcióképes NMDA receptorokkal. A kérdés tisztázása érdekében az NMDA-receptorok működését különböző

módszerekkel stimuláltuk, és vizsgáltuk a Ca^{2+} -tranzieisekben létrejövő következményes változásokat.

A kontroll Ca^{2+} -tranzieisek amplitúdójához képest ($44,5 \pm 14,9$ nmol/l) az 50 $\mu\text{mol/l}$ glicin és 20 $\mu\text{mol/l}$ Mg^{2+} -koncentráció jelenlétében kiváltott glutamát tranziensek esetén jelentősen növekedett a Ca^{2+} -tranzieisek amplitúdója ($91,9 \pm 15,3$ nmol/l), a kimosást követően pedig visszatért a kontroll értékre ($41,6 \pm 19,7$ nmol/l).

Kísérleteink egy részében az NMDA-receptorokat az AMPA-receptorok gátlása után stimuláltuk. Kontroll körülmények között 5 mmol/l glutamát alkalmazásakor a Ca^{2+} -tranzieisek amplitúdója $38 \pm 7,8$ nmol/l volt. 100 $\mu\text{mol/l}$ CNQX csaknem teljesen gátolta a tranziens kialakulását (az átlagos amplitúdó $1,8 \pm 0,5$ nmol/l volt). Ezt követően CNQX jelenlétében 50 $\mu\text{mol/l}$ glicint alkalmaztunk, aminek hatására a Ca^{2+} -tranzieisek megnövekedett ($16,8 \pm 3,8$ nmol/l). Végül a fenti szerek folyamatos alkalmazása mellett az inkubáló oldat Mg^{2+} -koncentrációját 20 $\mu\text{mol/l}$ -re csökkentettük. Ennek hatására a tranziensek amplitúdója tovább nőtt ($55,4 \pm 13,1$ nmol/l).

1.3. Az AMPA-receptorok hatása a citoplazmikus Ca^{2+} -koncentráció változásokra

Vizsgálataink során igazolódott a glutamát-indukált Ca^{2+} -tranzieisek létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} extracelluláris eredete. Ennek bizonyítékeként a csökkentett Ca^{2+} -tartalmú extracelluláris oldat jelenlétében a tranziens amplitúdója drasztikusan csökkent a kontroll körülmények között kiváltotthoz képest.

A bemutatott kísérlet kapcsán az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás szerepére vonatkozóan is nyertünk információt. A glutamát alkalmazását követően 50 mmol/l K^{+} -depolarizációval váltottunk ki Ca^{2+} -tranzieist az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak feltöltése céljából, majd megismételtük a glutamát adását. A K^{+} -depolarizációt megelőző és az azt követő glutamát-indukált Ca^{2+} -tranzieisek egyforma nagyságúak voltak, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -raktárak szerepe a tranziensek nagyságának kialakításában minimális.

Az AMPA-receptor-függő Ca^{2+} -tranzieisek létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} -belépés különböző útvonalakon mehet végbe. A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerepét a depolarizáció nagyságának csökkentésével illetve a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlásával vizsgáltuk. A mérés során az NMDA-receptorok esetleges aktivációját 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5 alkalmazásával gátoltuk.

Az extracelluláris Na^{+} -szintet 10 mmol/l-re csökkentve nem tapasztaltunk eltérést az 5 mmol/l glutamát által kiváltott Ca^{2+} -tranzieisek amplitúdójában: kontroll esetben a

tranziensek nagysága $55,6 \pm 10,2$, alacsony Na-tartalmú oldatban pedig $68,8 \pm 14,7$ nmol/l volt ($n = 5$).

A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák Cd^{2+} -mal történő gátlása során a tranziensek amplitúdója $52,8 \pm 5,8$ nmol/l-ről $27,7 \pm 6,7$ nmol/l-re csökkent ($n = 11$). A hatás az esetek nagyobb részében kimosható volt. Az amplitúdó csökkenése mellett a tranziensek kialakulásának sebessége is minden esetben csökkent.

Mivel az NMDA-receptorokon keresztül történő Ca^{2+} -belépés lehetsége a receptorok serkentése nélkül kicsi, a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák pedig csak a kialakuló Ca^{2+} -tranziensek mintegy 50%-áért felelősek, a további Ca^{2+} -belépés útvonalaként már csak magukat az AMPA-receptorokat lehetett feltételezni. A lehetőség igazolására a korábbiakhoz hasonlóan 5 mmol/l glutamáttal váltottunk ki Ca^{2+} -tranzienst (100 $\mu\text{mol/l}$ AP5 és 200 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} jelenlétében). A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlása miatt a tranziensek amplitúdója átlagosan csak $19,4 \pm 2$ nmol/l volt és a felszálló szár sebessége is kisebbnek bizonyult. Amikor a tranziens elérte a maximumot, a glutamát jelenlétében az extracelluláris oldat Ca^{2+} -koncentrációját 10 $\mu\text{mol/l}$ -re csökkentettük. A tranziens a glutamát jelenléte ellenére azonnal csökkenni kezdett és 20-25 s elteltével $5,2 \pm 1,1$ nmol/l-re állt be. Az extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció értékének visszaállítása után megismételt glutamátkezelés a kontrollhoz hasonló nagyságú tranzienseket eredményezett ($24,3 \pm 3,5$ nmol/l).

2. Kalciumkötő fehérjék jelenlétének és megoszlásának vizsgálata a CN projekciós neuronjaiban

2.1. Kalciumkötő fehérjék a DCN-ben

A DCN legtöbbet vizsgált projekciós neuronjai a piramis-sejtek, ezek kalciumkötő fehérje expressziójának vizsgálata során CB/PA és CR/PA kettős jelöléseket alkalmaztunk. A neuronok intenzív és homogén PA valamint CB jelölődést mutattak, ugyanakkor CR jelenlétét nem sikerült kimutatni.

A piramis-neuronok retrográd jelölése során a mag belső rétegében néhány nagy sejt is feltöltődött, melyek projekciójuk, nagyságuk és lokalizációjuk alapján óriás-sejtként azonosíthatóak. Ezen neuronok immunhisztokémiai vizsgálata során bebizonyosodott, hogy csak CB-t expresszálnak, PA és CR pozitivitás nem volt kimutatható esetünkben.

A DCN-ben található Purkinje-szerű sejtek projekciós területe feltételezések szerint számos fajban (így patkányban is) a kisagy. Ez a sejtfeleség a DCN felszínén helyezkedik el

és jelentős CB pozitívítást mutat mind a sejtttestben, mind a kiterjedt dendritfában. A PA jelölés esetén a sejtttest ugyancsak intenzív és homogén jelölődést mutatott, a dendritfa azonban alig volt észrevehető. Eredményeink alapján ugyanakkor úgy tűnik, hogy Purkinje-szerű sejtek nem expresszálnak CR-t.

A piramis- és a Purkinje-szerű sejtek esetén a fluoreszcens mikroszkóppal végzett megfigyeléseinket konfokális mikroszkópiával is kiegészítettük.

2.2. Kalciumkötő fehérjék a VCN-ben

A DCN-hez hasonlóan, a VCN-ben található neuronok azonosítása is lokalizációjuk, méretük és alakjuk alapján történt. A globuláris bushy-sejtek által expresszált kalciumkötő fehérjék vizsgálata során PA/CB és PA/CR kombinációban végeztünk kettős jelöléseket. A sejtttestben és az akusztikus rostokban egyértelmű PA pozitívítást mutatható ki, a neuronok felszínén pedig számos intenzív, foltos jelölődés tapasztalható, melyek az akusztikus rostok axonvégződéseinek felelnek meg. A CB-jelölés esetén sem a sejtttest, sem a hallóidegrostok nem voltak kimutathatóak, ugyanakkor pozitívítást volt megfigyelhető az axonvégzésekben. A CR jelenlétének vizsgálata során a PA-hoz hasonló eloszlási mintázatot tapasztaltunk.

A globuláris bushy-sejtekhez hasonlóan, a szferikális neuronok esetén is PA/CB és PA/CR kombinációban végeztünk jelöléseket. Vizsgálataink során homogén citoplazmatikus immunpozitívítást figyeltünk meg PA-jelölés esetén. A sejtttestet körülvevő rostok PA jelölődése ugyancsak egyértelmű, és sok esetben az axonvégzések erős pozitívítása mintegy kirajzolja a sejtttest kontúráját. A szferikális bushy-sejtek immunhisztokémiai vizsgálata azt is bizonyította, hogy ezek a neuronok nem expresszálnak szómájukban sem CR-t, sem CB-t, míg a sejtttest körül található különféle idegrostok és axonvégzések immunpozitívítást mutattak CB-ra és CR-re egyaránt.

A bushy-sejtekkel kapcsolatos eredményeink alátámasztására konfokális mikroszkóppal is végeztünk vizsgálatokat. Ennek alapján még egyértelműbbé vált az az éles kontraszt, ami az intenzív CR pozitívítást mutató akusztikus idegrostok és végzések, illetve a CR-negatív szferikális bushy-sejt szóma között fennáll. Tekintettel arra, hogy a globuláris bushy-sejtek sejtttestje kifejezett CR-pozitívítást mutatott, a CR jelenléte vagy hiánya megfelelő eszköz lehet a kétféle sejt típus elkülönítésére. A konfokális mikroszkóppal készített rekonstruált felvételek nemcsak megerősítették a kétféle bushy-sejt szómájának PA-pozitívítását, de a sejteket körülvevő akusztikus idegrostok és idegvégzések elrendeződése is egyértelműen láthatóvá vált.

Habár a CB/CR kombinációban végzett kettős jelölés során igazolódott az octopus-sejt szómájának CR expressziója, ennek intenzitása jelentősen kisebb, mint a szomszédos rostokban és axonvégzésekben megfigyelhető immunreakcióé. Említésre méltó, hogy ezek a struktúrák csak igen gyenge CB-jelölődést mutattak, viszont az octopus-sejt szómájában intenzív CB expresszió mutatható ki. PA expresszió csak az axonvégzésekben volt jelen, az octopus-sejt testében ez a fehérje nem expresszálódik.

Annak érdekében, hogy az egyes kalciumkötő fehérjék különböző sejtípusokban tapasztalt expressziós szintjét összehasonlíthassuk, szemikvantitatív értékelési rendszert vezettünk be.

3. A Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok vizsgálata

3.1. A K^+ -depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek megszűnésének kinetikája

A piramis-sejtek citoplazmájából történő Ca^{2+} -eltávolítási folyamatokat a K^+ -depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának illesztésével, az időállandók meghatározásával tanulmányoztuk. Annak érdekében, hogy az eltávolító mechanizmusok intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció függését megvizsgáljuk, különböző extracelluláris K^+ -koncentrációjú oldatokat alkalmaztunk, eltérő inkubációs időekkel.

A Ca^{2+} -tranziensek leszálló szára – a tranziens csúcskoncentrációjától függően – háromféle kinetikát mutatott. A kis amplitúdójú tranziensek leszálló szárát jól lehetett illeszteni egyetlen exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel (1. típus), míg nagyobb Ca^{2+} -tranziensek esetén a leszálló szárát csak két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel kaptunk megfelelő illeszkedést (2. típus). A két típus közötti átmenetet a 45 és 82 nmol/l-es Ca^{2+} -csúcserősségek között lehetett megfigyelni.

A 3. típusú leszálló szár a neuronok mintegy 10%-ánál volt megfigyelhető. Ha 50 mmol/l K^+ -ot 1-5 s-ig alkalmaztunk, a Ca^{2+} -tranziens megszűnésének korai szakasza egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel volt illeszthető. Ezt követően platófázis alakult ki, majd (a K^+ -koncentráció csökkentése után) a megszűnés jóval kisebb sebességgel folytatódott.

A Ca^{2+} -eltávolítás Ca^{2+} -koncentráció függésének vizsgálata során az 1. típusú tranziensek megszűnésének időállandója $6,43 \pm 0,48$ s volt (egy exponenciális tag, τ). A 2. típusú tranziensek illesztésekor a kisebb időállandó (τ_1) a 0 – 100 nmol/l közötti tranzienseknél $3,09 \pm 0,26$ s volt, értéke magasabb Ca^{2+} -tranzienseknél jelentősen csökkent

($1,46 \pm 0,11$ s-ra a 250 – 300 nmol/l-es tartományban). A nagyobb időállandó (τ_2) $18,15 \pm 1,6$ s volt a 0 – 100 nmol/l-es tartományban, értéke nem változott jelentősen magasabb Ca^{2+} -koncentrációk esetén, csak a 250 – 300 nmol/l-es tartományban volt megfigyelhető szignifikáns csökkenés ($7,42 \pm 0,92$ s).

A tranziensek leszálló szárának illesztésekor alkalmazni kellett egy állandó tagot, ami az intracelluláris Ca^{2+} -szint tranziens előtti és utáni értékének különbségével azonos. Ez a különbség a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának növekedésével emelkedett. Kijelenthető ugyanakkor, hogy a tranzienseket megelőzően az intracelluláris Ca^{2+} -szint kielégítően alacsony volt és csak kis mértékben (15 és 25 nmol/l között) változott a kísérletek alatt.

Ismeretes, hogy a nagy affinitású fluoreszcens Ca^{2+} -indikátorok (pl. a Fura-2) maguk is befolyásolják a Ca^{2+} -koncentráció változások időbeliségét. Annak érdekében, hogy a Fura-2 esetleges ilyen hatását kimutassuk, egy alacsony affinitású Ca^{2+} -indikátorral (Fluo-3) is regisztráltunk Ca^{2+} -tranzienseket. Ezen tranziensek kinetikai paraméterei hasonlóak voltak a Fura-2 alkalmazásakor kapott értékekhez (2. típusú tranziensek esetén $\tau_1 = 4,16 \pm 0,52$ s, $\tau_2 = 20,78 \pm 4,5$ s, $n = 4$).

3.2. Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak szerepe a Ca^{2+} -eltávolításban

Az a tény, hogy a 2. és 3. típusú tranziensek leszálló szára több exponenciális tagot tartalmazó függvényvel illeszthető, valószínűsíti több Ca^{2+} -eltávolító mechanizmus egyidejű aktivitását. Az intracelluláris raktárakba történő Ca^{2+} -felvétel jelentőségét az endoplazmatikus retikulum SERCA pumpáját gátló szereknek, a tapszigarginnak (TG) és a ciklopiazonsavnak (CP) az alkalmazásával teszteltük. 50 nmol/l TG hatására a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelkedett, a Ca^{2+} -tranziens csúcsa pedig szignifikáns csökkenést mutatott. Habár TG kezelés alatt a 2. típusú tranziensek megtartották jellegüket, mindkét időállandó értéke szignifikánsan megemelkedett ($\tau_1 = 2,11 \pm 0,13$ s, $\tau_2 = 14,98 \pm 1,95$ s kontroll körülmények között, TG kezelést követően pedig a $\tau_1 = 5,99 \pm 0,96$ s, a $\tau_2 = 27,46 \pm 4,21$ s).

A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának csökkenése felveti azt a lehetőséget, hogy önmagában ez a változás állhat az időállandók növekedésének hátterében. A kérdés vizsgálata érdekében meghatároztuk a Ca^{2+} -tranziens csökkent amplitúdója alapján várható időállandókat, de a TG jelenlétében kapott időállandó növekedés sokkal nagyobb volt, mint ami a Ca^{2+} -tranziens amplitúdójának csökkenése alapján feltételezhető.

A TG-nal kapott eredmények alátámasztása céljából megismételtük a kísérletet 3 $\mu\text{mol/l}$ CPA-val és hasonló eredményt kaptunk. Valószínű tehát, hogy a csökkent amplitúdó és a lassabb leszálló szár a SERCA pumpa gátlásának következménye.

Felmerült annak a lehetősége is, hogy a TG és CPA jelenlétében tapasztalt amplitúdó csökkenés hátterében a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák gátlása áll. Izolált piramis-sejteken a patch clamp technika teljes sejtes elrendezésével végzett mérésekben kimutattuk, hogy a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornákon folyó áram CPA és TG hatására nem csökkent.

A SERCA-pumpa gátlószereinek a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójára gyakorolt hatása felveti azt a kérdést, hogy a tranziensek kialakulásához mennyiben járulhat hozzá az intracelluláris raktárakból származó Ca^{2+} . A kérdés vizsgálatához előbb 20 mmol/l koffeinnel, majd K^+ -depolarizációval váltottunk ki tranzienset. Ezt követően a kísérletet megismételtük TG illetve CPA jelenlétében is. A sejtek egy részében a TG és CPA nem gyakorolt hatást sem a koffein, sem a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek nagyságára, míg egy másik sejtpopuláció esetén a TG és a CPA jelenlétében koffeinnel nem lehetett Ca^{2+} -tranzienseket létrehozni és a K^+ -depolarizáció által kiváltott tranziens amplitúdója is csökkent 50 %-kal.

3.3. A sejtmembrán transzportrendszerének szerepe az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésében

A Ca^{2+} -ot az extracelluláris tér felé szállító $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ antiport gátlása céljából az inkubáló oldat Na^+ -koncentrációját 30 illetve (névlegesen) 0 mmol/l-re csökkentettük. Az alacsony Na^+ -tartalmú oldatot a tranziens kialakulása után alkalmaztuk, a Na^+ helyettesítésére használt Li^+ -mal és szacharózzal azonos eredményeket kaptunk.

A $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus gátlása csökkentette a piramis-sejtek Ca^{2+} -eltávolító képességét. A Ca^{2+} -tranziens megszűnésének időállandói emelkedtek: a τ_1 értéke $2,64 \pm 0,32$ s-ról $3,37 \pm 0,5$ s-ra, a τ_2 értéke $15,32 \pm 1,92$ s-ról $18,14 \pm 1,68$ s-ra ($n = 10$), azonban egyik változás sem bizonyult szignifikánsnak. Mindez a $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ antiport kismértékű szerepét jelzi a Ca^{2+} -eltávolításban.

A PMCA útvonalat 3 mmol/l La^{3+} alkalmazásával gátoltuk. A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák blokkolásának következményeit úgy küszöböltük ki, hogy a La^{3+} -t a K^+ -depolarizáció megszüntetésével egyidejűleg alkalmaztuk. A La^{3+} jelentősen, de reverzibilisen változtatta meg a Ca^{2+} -tranziens leszálló szárának lefutását: az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció rövid csökkenés után megállt és egy platófázis alakult ki, ami a La^{3+} alkalmazásának időtartama alatt változatlanul fennmaradt. A La^{3+} eltávolítása után a Ca^{2+} -

szint ismét csökkent, de lassabban mint a platót megelőzően. La^{3+} jelenlétében mind az alapvonal értéke, mind a tranziens amplitúdója változatlan, a kontroll tranziensek időállandói pedig hasonlóak a korábban kapottakhoz ($\tau_1 = 2,57 \pm 0,65$ s, $\tau_2 = 19,85 \pm 3,45$ s, $n = 7$). La^{3+} alkalmazását követően a leszálló szár mindkét szakasza egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel volt illeszthető. Az első szakasz időállandója ($\tau_{\text{La}} = 5,7 \pm 1,07$ s) valamivel nagyobb volt, mint a kontroll τ_1 , míg a La^{3+} kimosása utáni időállandó ($\tau_{\text{wo}} = 12,56 \pm 2,11$ s) kisebb volt, mint a kontroll τ_2 (a különbségek statisztikailag nem szignifikánsak). A platófázis amplitúdója $81,2 \pm 18,3$ nmol/l-nak adódott, a kimosást követően kialakuló Ca^{2+} -szint ($23,2 \pm 2,2$ nmol/l) pedig nagyobb volt, mint amit kontroll körülmények között tapasztaltunk a Ca^{2+} -tranziensek után.

MEGBESZÉLÉS

A disszertációban bemutatott kísérletek fő célja az volt, hogy további adatokat nyerjünk a nucleus cochlearis neuronok Ca^{2+} -homeosztázisának szabályozására vonatkozóan. A munka szervesen illeszkedik csoportunk azon törekvéséhez, hogy az egyes neuronfélések funkcióját megismerve közelebb jussunk a cochlearis magban kialakuló párhuzamos felszálló útvonalak működési sajátosságainak megértéséhez. Ehhez mindenképpen szükséges a szóban forgó pályák kiinduló neuronjainak tanulmányozása, membránsajátágaik és sejten belüli szabályozó rendszereik megismerése.

Az elvégzett vizsgálatok döntő része a DCN piramis-sejtjeire vonatkozóan szolgáltatott információt. Kijelenthető, hogy ezek a neuronok működésük kapcsán jelentős Ca^{2+} -terhelésnek vannak kitéve, ennek ellenére relatíve kicsi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változások mutathatók ki rajtuk. Ennek oka részben a citoplazmatikus Ca^{2+} -kötőfehérjék pufferelő hatása, részben a citoplazmatikus Ca^{2+} eltávolítását végző transzportfolyamatok hatékony működése.

1. Glutamát-függő Ca^{2+} -tranziensek izolált piramis-sejteken

Kísérleteinkben a piramis-neuronok glutamát érzékenysége alacsonyabb volt, mint amit más izolált sejteken vagy sejt kultúrákon találtak. Azt is megállapítottuk, hogy az általunk kapott glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek kisebbek voltak, mint amit nucleus suprachiasmaticus vagy hippocampus neuronokon leírtak. A különbségek oka nem világos, szóba jön, hogy az enzimatikus izolálás során a neuronok elveszítik a felszíni glutamát-receptorok egy részét. Erre utalhat, hogy a depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek sokkal kevésbé különböztek a mások által kapott értékektől. Megjegyzendő továbbá, hogy eredményeink az AMPA-receptorok fontos szerepét jelzik a tranziensek létrejöttében, márpedig ezen receptorok alacsony glutamát-érzékenysége korábbról ismert.

A különféle gátlószerekkel kapott eredmények szerint a glutamát hatására létrejövő Ca^{2+} -tranziensek eredete kizárólagosan az extracelluláris tér. Az AP5 hatástalansága arra utal, hogy az NMDA-receptorok részvétele a tranziensek kialakításában elhanyagolható. Ennek a következtetésnek azonban ellentmond az a tény, hogy az NMDA receptorokra is ható, AMPA-receptor gátló CNQX jobban csökkentette a tranzienseket, mint az AMPA-receptorokra specifikusabb NBQX. Az ellentmondás lehetséges magyarázata az általunk alkalmazott AP5 koncentráció alacsony értéke lehet. Némileg ellentmondásosak a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerepére vonatkozó megállapításaink is: a Cd^{2+} mintegy

50 %-os csökkenést eredményezett, a depolarizáció mérséklése a külső Na^+ megvonásával viszont gyakorlatilag hatástalan volt. Ebben az esetben magyarázatként az vehető fel, hogy a megmaradó kevés Na^+ is elegendő a Ca^{2+} -csatornák aktiválásához szükséges mértékű depolarizáció kialakításához illetve az a lehetőség is felmerül, hogy a Cd^{2+} gátolja az AMPA-receptorokat is.

A fenti megfigyelések összegzése után adódott a következtetés, hogy a glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek kialakulásához az AMPA receptorokon keresztüli Ca^{2+} -belépésnek is hozzá kell járulni. Számos adat található arra vonatkozóan, hogy a DCN neuronjaiban a GluR1-4 alegységek nagy mennyiségben vannak jelen, jóllehet az egyes sejtek expressziója között különbségek is kimutathatók. Arra is vannak adatok, hogy a hallórendszer neuronjain az AMPA-receptorok Ca^{2+} -permeabilitása általában nagyobb, mint a más agytörzsi struktúrákban található idegsejteké. Más megfigyelések szerint ugyanakkor a DCN piramis-sejtek a GluR2 alegység jelenléte miatt Ca^{2+} -impermeabilis AMPA-receptorokat tartalmaznak. Utóbbi megállapítás ellentmond annak a szerepnek, amit az AMPA-receptoroknak tulajdonítottunk a Ca^{2+} -tranziensek kialakításában.

Az ellentmondás feloldásának több lehetősége van. Szóba jön, hogy kisszámú Ca^{2+} -permeabilis AMPA-receptor is elegendő a tranziensek létrehozásához az adott kísérleti feltételek mellett (izolált sejteken a teljes receptorkészlet egyidejű aktiválása). Lehetséges, hogy a piramis-sejtek citoplazmatikus Ca^{2+} -pufferkapacitása alacsony, ezért kis mennyiségű Ca^{2+} -belépés is eredményezhet mérhető koncentrációváltozást (ennek ellentmondanak a puffer-fehérjék expressziójára vonatkozó újabb adataink, lásd alább). Végezetül említést érdemel, hogy rágcسالókon a glutamát receptorok összetétele a hallópálya neuronjaiban a hallási funkció érése során változik, az általunk használt fiatal patkányokban tehát alacsonyabb lehet a GluR2 alegység mennyisége, mint más a munkacsoport által vizsgált idősebb egerekben.

2. Ca^{2+} -kötőfehérjék előfordulása felnőtt patkány nucleus cochlearisának projekciós neuronjaiban

Tekintettel jelentőségükre, a Ca^{2+} -kötőfehérjék központi idegrendszeri előfordulásával számos korábbi tanulmány foglalkozott, ezek egy részében a nucleus cochlearisra vonatkozó megállapítások is fellelhetők. Kijelenthető ugyanakkor, hogy az adatok heterogének, többféle fajon, különböző életkorú egyedekben történtek a mérések. Mindenképpen helye volt ezért egy olyan kísérletsorozatnak, amelyik adott species felnőtt (tehát kifejlett hallórendszerrel bíró) egyedeiben hasonlítja össze a különféle projekciós neuronok pufferfehérje tartalmát. A

megközelítés átfogó jellege mellett metodikailag is újat nyújtottunk azzal, hogy kettős jelöléseket végeztünk és kritikus esetekben konfokális mikroszkópiával támasztottuk alá megállapításainkat.

A korábbi adatokkal részben megegyezően azt találtuk, hogy a DCN sejtjeiben a CB jelenléte dominál, CR pedig nem mutatható ki. Különösen fontosnak tartottuk a piramis-sejtek citoplazmatikus Ca^{2+} -pufferkapacitásának becslését. Míg korábbi megfigyelések patkányban csak a CB jelenlétére vonatkozóan voltak egyértelműen pozitívak, esetünkben a PA jelenléte is igazolódott. Ez arra utal, hogy a piramis sejtek jelentős pufferkapacitással rendelkezhetnek, tehát az ennek hiányára vonatkozó következtetés értelmezése további munkát igényel.

A patkány Purkinje-szerű sejtek esetében ismert volt a szóma CB és PA pozitivitása, míg a dendritek esetében intenzív CB pozitivitást és alacsony szintű PA előfordulást írtak le. Adataink szerint ez a különbség sokkal élesebb: mind fluoreszcens, mind konfokális mikroszkóppal a dendritek csaknem teljes PA-negativitását állapítottuk meg. A DCN óriás-sejtjei esetében igazoltuk, hogy ezek sem CR-t, sem PA-t nem expresszálnak.

A VCN neuronjaiban a CB jelenléte nem annyira domináns, mint azt a DCN esetében láttuk, ugyanakkor megjelenik a CR. Munkánk során jellegzetes különbséget tudtunk kimutatni a bushy sejtek két altípusának pufferfehérje expressziójában. A globuláris sejtek esetében már ismert volt a CB-negativitás és CR-pozitivitás, ezt kiegészítettük a PA jelenlétére vonatkozó megfigyeléssel, ami azt is jelenti, hogy ez a neuron is két különböző kötőfehérjével rendelkezik.

A patkány szferikális bushy sejtek esetében korábban a CR és CB hiányát írták le. Adataink ebben az esetben is mutatják a PA kismértékű jelenlétét. Ez a megállapítás azért jelentős, mert jelzi, hogy a projekciós neuronok e típusa patkányban is tartalmaz legalább egy Ca^{2+} -pufferfehérjét, más fajokhoz hasonlóan.

Az octopus-sejtek esetében adataink megerősítő jellegűek a CR és CB jelenlétére vonatkozóan, ugyanakkor újak annyiban, hogy egyértelműen igazolták a PA hiányát, azon fehérjéét, amelynek expresszióját más fajok esetében kimutatták ezen sejttypusban.

Az intenzív vizsgálatok ellenére a Ca^{2+} -kötőfehérjék szerepére vonatkozóan kevés biztos információ áll rendelkezésre. Általánosságban kijelenthető, hogy feladatuk a sejtek védelme a túlságosan magas vagy hosszantartó citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció növekedéssel szemben. Erre utal, hogy jelentős expressziójuk mutatható ki olyan neuronokon, amelyek különösen nagy Ca^{2+} -terhelésnek vannak kitéve akár jelentékeny felszíni elektromos aktivitásuk, akár más Ca^{2+} -belépési útvonalak aktiválódása miatt. Előbbi

esetre példa a PA kolokalizációja a Kv3.1b K⁺-csatorna alegységekkel, melyek jelenléte jelentős tüzelési aktivitással rendelkező idegsejtekre jellemző, utóbbira pedig az a megfigyelés, hogy a GluR2 AMPA-receptor alegység jelenléte vagy hiánya (azaz az AMPA-receptor Ca²⁺-permeabilitásának mértéke) összefüggést mutathat a sejt Ca²⁺-kötőfehérje expressziós mintázatával.

3. A citoplazmatikus Ca²⁺ eltávolítására szolgáló mechanizmusok

A neuronok fiziológias működésének fennmaradása szempontjából döntő fontosságú, hogy az aktivitásukat kísérő ionmozgások okozta változások minél kisebbek legyenek illetve minél hamarabb visszaálljon a nyugalmi helyzet. A Ca²⁺ esetében az előbbi feladatot részben a pufferfehérjék látják el, az utóbbit pedig különféle transzportmechanizmusok, amelyek az ionokat visszajuttatják az extracelluláris térbe vagy ideiglenesen az ER-ban tárolják őket. A Ca²⁺-eltávolítás jellemzésére a depolarizációval kiváltott tranziensek leszálló szárát leíró kinetikai paramétereket használtuk fel. Az általunk kapott időállandók jó egyezést mutattak a korábban közölt értékekkel.

A Ca²⁺-tranziensek időbeli lezajlását jelentősen befolyásolja a sejt Ca²⁺-pufferkapacitása. Tekintettel arra, hogy a Fluo-3 és a Fura-2 tranziensek kinetikai paraméterei hasonlóak, a Fura-2 pufferelő hatását kismértékűnek tekinthetjük. Ami a pufferfehérjék szerepét illeti, az aránylag kicsiny Ca²⁺-tranziensek magas pufferkapacitásra utalnak. Ezt valószínűsítik a CB és PA együttes jelenlétére utaló immunhisztokémiai adataink is. Az a tény azonban, hogy a megszűnés időállandói Ca²⁺-függést mutatnak, azt jelezheti, hogy adott kísérleti körülmények között a pufferek közel vannak a szaturációhoz, tehát vagy kapacitásuk kicsi, vagy előterhelésük nagy. Az immunhisztokémiai és kinetikai eredmények összeegyeztetése további munkát, elsősorban pontosabb kvantitatív becsléseket igényel.

Az egyes transzportfolyamatok Ca²⁺-eltávolításban játszott szerepének megítélésére lehetőség szerint szelektív gátlásukat és a kapott módosulások elemzését használtuk. A megközelítésnek több hibaforrása van, első rögtön a gátlószerek vitatható specificitása. A másik fő probléma az útvonalak közötti esetleges kölcsönhatás: egy-egy transzport gátlása csökkentheti más útvonal(ak) aktivitását, de az is elképzelhető, hogy a kiesett transzportot más mechanizmusok aktivitásfokozódása kompenzálja. A lehetőségek tisztázására megkíséreltük több transzportútvonal egyidejű gátlását, ezek a kísérletek azonban nem adtak egyértelmű eredményeket.

Legellentmondásosabbak a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere szerepével kapcsolatos adatok. Egyes megfigyelések ennek fontosságára utalnak, míg mások szerint a cseremechanizmus jelentősége kicsi. Saját adataink az utóbbi álláspontot támasztják alá, egyben megkérdőjelezzik azt a véleményt, mely szerint a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere elsősorban a központi idegrendszer centrális struktúráiban játszik fontos szerepet.

A PMCA szerepét 3 mmol/l La^{3+} alkalmazásával vizsgáltuk. Az ion ebben a koncentrációban feltehetően a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cserét is gátolja, de ha elfogadjuk, hogy ennek a mechanizmusnak a szerepe kicsi, a megfigyelt drámai változást indokolt a PMCA kikapcsolása következményének tulajdonítani. Az a tény, hogy ezen transzportlehetőség megszűnése plató kialakulását eredményezte, megerősíteni látszik feltevésünket, mely szerint a tranziens leszálló szárának kinetikáját a Ca^{2+} -terhelés mértéke és a rendelkezésre álló eltávolító kapacitás közötti arány szabja meg.

A Ca^{2+} ER-ban történő tárolása jelentős szereppel bírhat a piramis sejtek Ca^{2+} -tranzienseinek megszűnésében, erre utal, hogy a SERCA pumpa gátlása egyértelműen csökkenti a tranziens leszálló szárának megszűnési sebességét. Nem lehet azonban teljesen kizárni azt a lehetőséget, hogy a tranziens leszálló szárának lassulása csak látszólagos, a tényleges Ca^{2+} -eltávolítás effektivitását valamely raktár-függő Ca^{2+} -csatorna megnyílása és az azon keresztüli Ca^{2+} -belépés rontja le.

A SERCA pumpa gátlásának váratlan következménye volt a tranziensek nagyságának csökkenése. Miután néhány lehetséges magyarázatot kizártunk, az egyetlen szóba jöhető megoldás annak feltételezése, hogy a tranzienseknek mégiscsak van egy Ca^{2+} -felszabaduláson alapuló komponense. Erre utal, hogy TG és CPA kezelés növeli a nyugalmi Ca^{2+} -szintet, továbbá az a tény, hogy a tranziensek SERCA pumpa gátlással összefüggő csökkenésének feltétele a Ca^{2+} -raktárak előzetes kiürítése. Emellett irodalmi adat is utal rá, hogy a depolarizáció-indukált tranzienseknek lehet egy Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás összetevője.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az izolált piramis-neuronok jól szabályozott Ca^{2+} -homeosztázissal rendelkeznek és alkalmasak ezen szabályozás egyes lépéseinek tanulmányozására. Mindamellettt szükséges, hogy a méréseket fiziológiasabb viszonyok között is megismételjük. Elengedhetetlen továbbá, hogy a cochlearis mag más neuronjainak Ca^{2+} -szabályozásáról is gyűjtsünk adatokat, ami lehetővé teszi majd a neuronális funkciók és a Ca^{2+} -homeosztázis közötti kapcsolatok pontos értelmezését.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Harasztosi, Cs., Pór, Á., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2002) Removal of Ca²⁺ following depolarization-evoked cytoplasmic Ca²⁺ transients in freshly dissociated pyramidal neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *Brain Research* 930: 123-133. **(IF: 2,409)**
2. Pór, Á., Harasztosi, Cs., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2004) Glutamate-induced cytoplasmic Ca²⁺ transients in isolated rat cochlear pyramidal cells. *Gen. Physiol. Biophys.* 23: 3-20. **(IF: 0,794)**
3. Pór, Á., Pocsai, K., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2005) Presence and distribution of three calcium binding proteins in projection neurones of the adult rat cochlear nucleus. *Brain Res.* (közlésre elfogadva, nyomtatás alatt). **(IF: 2,474)**

Idézhető kivonatok

1. Rusznák, Z., Pór, Á., Harasztosi, Cs., Szűcs, G. (2001) Role of ionotropic glutamate receptors in the Ca²⁺ homeostasis of isolated pyramidal cells of the rat cochlear nucleus. *J. Physiol.* 535: 15P.
2. Pór, Á., Pál, B., Pocsai, K., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2004) Distribution of calcium binding proteins in the cochlear nucleus of the rat. *Acta Physiol. Hung.* 91: 352a.

Előadások és poszterek

1. Pór, Á., Harasztosi, Cs., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2001) Ionotróp glutamát-receptorok jelentősége patkány nucleus cochlearis dorsalisból izolált piramis-sejtek Ca²⁺-homeosztázisában, LXVI. MÉT Vándorgyűlés, Szeged.
2. Rusznák, Z., Pór, Á., Harasztosi, Cs., Szűcs, G. (2001) Role of ionotropic glutamate receptors in the Ca²⁺ homeostasis of isolated pyramidal cells of the rat cochlear nucleus, Sheffield University Meeting of the Physiological Society, Sheffield, UK.
3. Pór, Á., Pál, B., Pocsai, K., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2004) Kalciumkötő fehérjék megoszlása patkány nucleus cochlearisban, LXVIII. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.

A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. 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)**
2. 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. **(IF: 4,995)**
3. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2005) Voltage-gated and background K⁺ channel subunits expressed by the bushy cells of the rat ventral cochlear nucleus. *Hearing Res.* 199(1-2): 57-70. **(IF: 1,502)**

Idézhető kivonatok

1. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) HCN₂ subunits contribute to the intrinsic activity of the pyramidal neurones in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Ideggyógyászati Szemle* 56: 65-66a
2. Pór, Á., Tomic, M., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) Immunocytochemical detection of ionic channels expressed by the pyramidal cells of the rat dorsal cochlear nucleus. *Ideggyógyászati Szemle* 56: 72a
3. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2004) Immunohistochemical and electrophysiological investigation of the Kv channel expression of the bushy neurones of rat cochlear nucleus. *Acta Physiol. Hung.* 91: 346a

Előadások és poszterek

1. Pór, Á., Pál, B., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) Immunocytochemical investigation of the ionic channels expressed by neurones of the rat cochlear nucleus, XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg.

2. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) Electrophysiological investigation of the ionic channels expressed by neurones of the rat cochlear nucleus, XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg.
3. Pór, Á., Tomić, M., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) Csatornafehérjék immuncitokémiai vizsgálata patkány nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejtjein, IX. MITT Konferencia, Balatonfüred.
4. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) HCN2 alegységek szerepe patkány nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejtek spontán aktivitásában, IX. MITT Konferencia, Balatonfüred.
5. Pór, Á., Pál, B., Pocsai, K., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) Patkány nucleus cochlearis sejtek membránsajátságait kialakító csatornaféleségek immuncitokémiai vizsgálata, LXVII. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.
6. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) Patkány nucleus cochlearis piramis-neuronok spontán aktivitását kialakító pacemakeráram vizsgálata, LXVII. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.
7. Rusznák, Z., Pál, B., Pór, Á., Forsythe, I., Szűcs, G. (2003) Patkány nucleus cochlearis bushy-neuronok membránsajátságait meghatározó depolarizáció-aktivált K^+ -áramok vizsgálata, LXVII. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.
8. Rusznák, Z., Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G. (2003) Characterisation and function of an h-current presented by the cochlear pyramidal cells of the rat, 3rd FEPS Congress, Nice, France.
9. Pór, Á., Pál, B., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) HCN1, HCN2 and HCN4 subunits in pyramidal neurones of the dorsal cochlear nucleus of the rat, 3rd FEPS Congress, Nice, France.
10. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) Kv4.2 K^+ channel subunits contribute to the transient outward current of the rat cochlear bushy cell, 3rd FEPS Congress, Nice, France.
11. Pocsai, K., Pór, Á., Pál, B., Kovács, I., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2004) TASK-1 distribution in the auditory system and cerebellum, IBRO Konferencia, Budapest.
12. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2004) Patkány nucleus cochlearis bushy-sejtek által expresszált feszültségvezérelt K-csatorna alegységek jelenlétének vizsgálata immunhisztokémiai és elektrofiziológiai módszerekkel, LXVIII. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.

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