

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Patkány nucleus cochlearis dorsalis szemcse- és Purkinje-
szerű sejtjeinek vizsgálata képalkotó és elektrofiziológiai
módszerek kombinált alkalmazásával**

Kőszeghy Áron

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Élettan és Neurobiológia Program

Debrecen, 2013

Patkány nucleus cochlearis dorsalis szemcse- és Purkinje-szerű sejtjeinek vizsgálata képalkotó és elektrofiziológiai módszerek kombinált alkalmazásával

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

Írta: Kőszeghy Áron, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolájában
(Élettan és Neurobiológia Program keretében)

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Acsády László, az MTA doktora
Dr. Nagy Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2013. április 18.

Az értekezés bírálói:

Dr. Krasznai Zoltán, PhD
Dr. Puskár Zita, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Acsády László, az MTA doktora
Dr. Krasznai Zoltán, PhD
Dr. Nagy Péter, PhD
Dr. Puskár Zita, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2013. április 18.

Bevezetés

A nucleus cochlearis (CN) az agytörzs laterodorsalis felszínén, a nyúltvelő-híd határon található és egy ventralis (VCN) és egy dorsalis (DCN) részre osztható fel. Mind a VCN-hez, mind a DCN-hez az azonos oldali ganglion spirale-ból érkeznek hallóidegrostok, azaz a mag monauralis akusztikus bemenettel rendelkezik. Ezen túlmenően a CN kap idegrostokat a colliculus inferiortól, a hallókéregtől, az ellenoldali CN-től, a ganglion vestibularetől, a vestibularis magvaktól, a trigeminus magtól és a nucleus cuneatustól. A CN-t az olivocochlearis kötegből származó kollaterálisok is eléri.

Valamennyi elsődleges akusztikus rost a CN-ben végződik, itt a rajtuk beérkező aktivitási mintázat különféle sejttípusokra tevődik át. A CN-hez érkező információ az ezen neuronokból kiinduló párhuzamos csatornák révén a colliculus inferiorhoz továbbítódik, ahol a csatornák konvergálnak. Az így kialakult információs mintázat a corpus geniculatum medialén keresztül végül a hallókéregbe jut.

A CN összetett cytoarchitektúráját jól jellemzi, hogy Lorente de Nó 1933-as tanulmányában a magban előforduló neurontípusok számát 40–50-re becsülte. Az egyes sejtféleségek részletes vizsgálatára Nissl- és Glees-festés, valamint Golgi-impregnációs technika alkalmazásával került sor. Ezen tanulmányok felfedték, hogy a VCN legfontosabb projekciós neuronjai a szferikális bushy-, globuláris bushy-, octopus- és stellate-sejtek. A projekciós sejteken túlmenően számos interneuron-féleséget is azonosítottak, többek között a Golgi- és a szemcsesejteket. A DCN projekciós neuronjai a piramis- (vagy fusiform) és az óriássejtek. A DCN számos interneuronnak is helyet ad, egyebek között található itt cartwheel-, Golgi-, és szemcsesejtek. Igen jellegzetes, döntően a DCN-ben előforduló sejtpopuláció a Purkinje-szerű sejtek együttese, ezek esetében azonban még arról sincsen egységes vélemény

az irodalomban, hogy axonjaik elhagyják-e a CN területét; azaz projekciós- vagy interneuronok-e.

A DCN piramis- és óriássejtjeinek axonjai a stria acustica dorsalisra keresztül érik el a hallópálya más magjait. A piramis-sejtek döntően az ellenoldali colliculus inferiorhoz és corpus geniculatum medialehez projiciálnak, bár írtak le az azonos oldali colliculus inferiorhoz tartó axonokat is. Az óriássejtek axonjai jellemzően ugyancsak az ellenoldali colliculus inferiorhoz haladnak, bár egyes óriássejtek axonjai az azonosoldali colliculus inferiort és az ellenoldali CN-t is eléri.

A DCN mind coronalis, mind sagittalis metszetekben réteges szerkezetet mutat. A szemcsesejtek axonjai (azaz a parallel rostok), a piramis-sejtek apicalis dendritjei, egyes szemcsesejtek szómája valamint a Purkinje-szerű sejtek a legfelszínebben elhelyezkedő *molekuláris réteg*ben találhatók. A molekuláris réteg alatt a *piramis-sejtes réteg* különíthető el, ebben a piramis-neuronok sejttestei, a legtöbb szemcsesejt szómája, valamint a cartwheel- és a Golgi-sejtek találhatók. A DCN *mély rétege* tartalmazza az óriásneuronok sejttestét és a piramis-sejtek basalis dendritfáit.

A piramis- és az óriássejteket kétféle serkentő bemenet éri el: a basalis dendriteken az acusticus rostok szinaptizálnak, míg az apicalis nyúlványokon a parallel-rostok végződnek. Az acusticus rostok által a basalis dendriteken képzett szinapszisok működésével kapcsolatban nem írtak le számottevő szinaptikus plaszticitást. Ezzel szemben jelentős, kétirányú plaszticitást (hosszú távú potenciációt illetve depressziót) mutattak ki a parallel rostok és az apicalis nyúlványok közötti szinapszisokban. Ismert, hogy a parallel rostok döntően a fülkagylók és a fej-nyak helyzetével kapcsolatos szomatoszenzoros valamint vestibuláris információt közvetítenek.

A szemcsesejtek képesek a különféle forrásokból érkező információ integrálására. Egyik legfontosabb bemenetüket szomatoszenzoros információ formájában a nucleus cuneatusból kapják. A DCN területén különösen nagy amplitúdójú kiváltott potenciálok figyelhetők meg a második nyaki

gerincvelői szegmentumhoz tartozó hátsó gyökér elektromos ingerlése esetén. Az érintett gerincvelői ideg a fülkagyló mozgását végző izmok proprioceptív idege. Míg a fül mozgását végző izmok megnyújtása jelentősen befolyásolja a DCN projekciós neuronjainak AP tüzelési frekvenciáját, a fülkagyló bőrének és szőrének ingerlése nincs hatással ezen sejtek aktivitására. Ezek a kísérleti adatok arra engednek következtetni, hogy az említett neuronok működését nem csak a hallási ingerek befolyásolják, hanem a fülkagyló térben elfoglalt helyzete is. Ez a kapcsolat a hangforrás térbeli helyzetének meghatározásában játszhat szerepet. A szemcsesejtek a hallópálya magasabban elhelyezkedő struktúráitól is kapnak bemenetet, egyebek között a colliculus inferiortól és a hallókéregtől. Ezen túlmenően a DCN projekciós neuronjainak működését gátló bemenetek is befolyásolják. A DCN gátló hatású interneuronjai közül kiemelhetők a cartwheel-sejtek, amelyek viszont a szemcsesejtektől kapnak serkentő bemeneteket. A cartwheel-sejtek axonjai szinaptikus kapcsolatokat létesítenek mind a piramis-, mind az óriássejtekkel.

A DCN projekciós neuronjainak aktivitását hatékonyan befolyásolja az úgynevezett foghíjas spektrumú hangingerek jelenléte. A folyamatos spektrumú hangingerből a fülkagyló alakítja ki ezeket foghíjas hangspektrumokat a pinna árnyékoló hatása révén. A spektrumban kialakuló kiesés jellemzői a hangforrás és a pinna egymáshoz képest elfoglalt helyzetének megfelelően változnak, így ezen spektrális kiesés (ún. „spektrális kulcs”) frekvenciája a hangforrás függőleges és vízszintes síkban elfoglalt pozíciójától függ. Mindezek alapján a DCN egyik lehetséges funkciója a hangforrás térbeli lokalizációja a spektrális kulcsok révén. Ehhez a tevékenységhez a beérkező szomatoszenzoros információ is hozzájárulhat.

A Purkinje-szerű morfológiája a DCN összes többi sejttypusától élesen eltérő. Mint arra elnevezésük is utal, dendritfájuk dús elágazódása a kisagy Purkinje sejtékéhez hasonlít. A PLC-k, hasonlóan a cerebellaris Purkinje-sejtekhez, igen intenzív calbindin-specifikus immunpozitivitást mutatnak.

Legnagyobb számban közvetlenül a DCN felszíne alatt fordulnak elő, de néhány PLC-t a DCN mélyebb rétegeiben és a VCN-ben is megfigyeltek. A PLC-k sejtteste általában gömbölyű vagy enyhén megnyúlt. Valószínűsíthető, hogy a PLC-k axonjai – vagy azok kollaterálisai – elhagyják a DCN-t. A morfológiai tulajdonságok leírásával szemben a PLC-k elektrofiziológiai és membránsajátságait, szinaptikus bemeneteit, lehetséges neurotranszmitterét és cerebellin expresszióját ezidáig nem vizsgálták.

Több adat szól amellett, hogy a CN működését jelentősen befolyásolják egyes kolinerg mechanizmusok. Leírták például muszkarinos kolinerg receptorok és vezikuláris acetilkolin-transzporter jelenlétét a mag területén. Igazolták, hogy különböző agyi területekről, például az oliva superiorból, a nucleus pedunculopontinus tegmentalisból és a nucleus laterodorsalis tegmentalisból származó kolinerg rostok a CN-ban végződnek. *In vitro* és *in vivo* kísérletek tanúsága szerint kolinerg agonista alkalmazását követően a DCN spontán aktivitást mutató neuronjainak kb. 90%-a válaszol aktivitásváltozással.

A fenti, általánosnak mondható megállapítások mellett vannak adatok a kolinerg modulációs mechanizmusok sejtípusfüggő hatásaira vonatkozóan is. Egy korábbi tanulmányban például munkacsoportunk kimutatta a DCN óriássejtek kolinerg modulálhatóságát. Beszámoltunk arról, hogy az óriássejtek dendritjei és a parallel rostok közötti szinapszisokban a neurotranszmisszió preszinaptikusan elhelyezkedő M3-típusú muszkarinos receptorokon keresztül modulálható. Ez a megfigyelés egybecseng azon adatokkal, melyek szerint a CN szemcsesejteket tartalmazó területein nagy számban fordulnak elő kolinerg idegvégződések. Jóllehet korábbi eredményeink felvetették annak lehetőségét, hogy a szemcsesejtek is célpontjai lehetnek kolinerg modulációs mechanizmusoknak, az elképzelés megerősítését vagy elvetését célzó specifikus kísérletekre ezidáig nem került sor.

Célkitűzések

Feltevések szerint a nucleus cochlearis dorsalis (DCN) hallási és szomatoszenzoros információkat integrál. Jóllehet ennek alapján szerepe lehet a hangforrás lokalizációjában, működésének részleteit még nem pontosan ismerjük. Jelen munkában a DCN két sejttípusának, nevezetesen a Purkinje-szerű neuronoknak és a szemcsesejteknek a vizsgálatára került sor. Célunk általánosságban a DCN szerkezetével és működésével kapcsolatos új adatok nyérése volt.

A **Purkinje-szerű sejtekre** vonatkozóan a következő feladatok elvégzését tűztük ki célul:

- Morfológiájuk részletes vizsgálata annak érdekében, hogy biztosítsuk egyértelmű azonosításukat funkcionális kísérletekben;
- Neurotranszmitterük azonosítása, gátló vagy serkentő természetük megállapítása;
- Membránsajátságaik és tüzelési sajátságaik jellemzése;
- Szinaptikus bemeneteik funkcionális vizsgálata annak érdekében, hogy meghatározzuk szerepüket a cochlearis magban található neuronhálózat tevékenységében;
- Cerebellin expressziós mintázatuk elemzése a kisagyi Purkinje neuronok és a Purkinje-szerű sejtek közötti hasonlóság mértékének becslése céljából.

A **szemcsesejtek** a DCN legkisebb méretű, ugyanakkor legnagyobb számban előforduló neuronjai, melyek fontos szerepet töltenek be a

multimodális szenzoros integrációban és a projekciós neuronok tüzelési mintázatának kialakításában. Ismert, hogy kolinerg agonisták alkalmazása a mag egyes sejtjeinek (pl. a piramis- és a cartwheel-neuronoknak) az aktivitását megváltoztatja; továbbá leírták kolinerg terminálisok jelenlétét a nucleus cochlearis szemcsesejteket nagy sűrűségben tartalmazó területein. A szemcsesejtek kolinerg modulálhatóságának közvetlen vizsgálatára ugyanakkor eddig nem került sor. Mivel egyes feltevések szerint a kolinerg moduláció a nucleus cochlearis dorsalisban jelerősítő hatással rendelkezik; valamint léteznek elképzelések, miszerint a kolinerg modulációs mechanizmusok túlműködése fülzúgáshoz vezethet, a szemcsesejtek kolinerg befolyásolhatóságára vonatkozó új ismereteknek fontos gyakorlati jelentősége is lehet. Ezért a munka második részében az alábbi két feladat megoldására összpontosítottunk.

- A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtek kolinerg modulálhatóságának vizsgálata, funkcionális és immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával. Mivel a kalciumkoncentráció változások képalkotó eljárással történő nyomonkövetése módot ad számos sejt aktivitásának egyidejű vizsgálatára, funkcionális kísérleteinket elsősorban ezzel a módszerrel végeztük.
- A kolinerg hatásért felelős receptor(ok) azonosítása receptor altípus-specifikus immunhisztokémia és altípus-szelektív antagonisták alkalmazásával.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok, vegyszerek, oldatok

Valamennyi kísérletet Wistar patkányokon végeztük. A funkcionális mérések mesterséges cerebrospinális oldatban (aCSF) történtek. A neurotranszmisszió gátlása (azaz a DCN neuronok funkcionális szétkapcsolása) céljából a legfontosabb kémiai szanapszisokat egy glutamateg-glicinerg-GABAerg neurotranszmisszió-gátló koktéllal blokkoltuk (a későbbiekben erre az oldatra “3G koktél” néven hivatkozunk). A kalciumkoncentráció változások fluoreszcens nyomkövetésére az Oregon Green 488 BAPTA 1 fluoreszcens kalciumindikátor festék acetoxymetilészter formáját (OGB-AM) alkalmaztuk.

Funkcionális kísérletek

A DCN területéről 200 μm vastagságú szeleteket készítettünk, melyeket aCSF-tal feltöltött inkubáló kádba helyeztünk és folyamatosan buborékoltattunk 95% O_2 és 5% CO_2 tartalmú gázkeverékkel (37°C).

Az agyszeletek vizuális megfigyelésére differencia interferencia kontrasztal (DIC) és 63 $\times$ vízimmerziós objektívvel felszerelt mikroszkóp szolgált. A szeleteket a mérőkádba helyeztük, ahol továbbra is folyamatosan perfundáltuk őket a 95% O_2 -t és 5% CO_2 -ot tartalmazó gázkeverékkel. A neuronok akciós potenciál tüzelését a patch-clamp technika teljessejtes változatának alkalmazásával követtük nyomon. A mérés alatt a sejteket biocytinnel töltöttük fel, a kísérlet befejezése után a szeleteket egy éjszakán keresztül fixáltuk majd permeabilizáltuk, mostuk és a jelölt neuronok megjelenítése céljából streptavidin-konjugált Alexa488 festékkel inkubáltuk.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásait fluoreszcens képalkotó eljárással követtük. A sejteket ebből a célból OGB-AM-mel töltöttük fel. A festék által kibocsájtott fény intenzitásváltozásait fluoreszcens képalkotó rendszer segítségével rögzítettük. Az adatok feldolgozása céljából

a képeket 16-bites TIF-file-okba exportáltuk, majd azokat az ImageJ software (National Institute of Health) segítségével dolgoztuk el. Az adatok elemzése a vizsgálni kívánt területek (region of interest; ROI) manuális kiválasztásával kezdődött. Ezt követően meghatároztuk és ábrázoltuk a ROI-k átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeit az idő függvényében. Egy adott ROI nyugalmi fluoreszcencia intenzitás értékét aktivitásmentes periódus alatti értékek átlagaként kaptuk meg. Annak érdekében, hogy nagymennyiségű adatot dolgozhassunk fel, egy olyan software-t fejlesztettünk ki, amelyik alkalmas a fluoreszcencia jelek zajszűrésére, a kalcium-tranziensek félautomatikus felismerésére és a tranziensek kinetikai sajátosságainak leírására.

Immunhisztokémia

A patkányokat túlaltattuk és a bal kamrán keresztül 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk. Az agyakat utófixáltuk és krioprotekció céljából egy éjszakán át 30%-os szaharóz-puffer oldatban inkubáltuk. Ezt követően 40 µm vastagságú sagittális vagy coronális sorozatmetszeteket készítettünk. A CN-tartalmazó egymást követő metszeteket összegyűjtöttük és M1- és M3-specifikus elsődleges antitestek alkalmazásával jelöltük. A PLC-k esetében hasonló eljárást követtünk, de ilyenkor 80 µm vastagságú sagittális metszeteket készítettünk. A fluoreszcens képeket konfokális mikroszkóp segítségével nyertük.

Statisztika

Az adatok statisztikai analízisére olyan eljárásokat használtunk, amelyek alkalmasak nem-normál eloszlású adathalmazok kezelésére. Független populációk összehasonlítása esetén a Mann-Whitney tesztet alkalmaztuk, az ugyanazon populációból származó átlagok elemzésére pedig a “Wilcoxon signed-rank” teszt szolgált. Az átlagokat minden esetben a standard hiba feltüntetésével adtuk meg (átlag ± S.E.M.).

Eredmények

A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjeinek vizsgálata

A Purkinje-szerű sejtek morfológiai jellemzése

Mivel a PLC-k jelentős mennyiségben expresszálnak calbindint, morfológiájuk vizsgálatához jelentős segítséget nyújtott a calbindin-specifikus immunhisztokémiai jelölés. A PLC-k sejtestének legnagyobb átmérője a sagittális síkban átlagosan $28 \pm 4 \mu\text{m}$ -nek adódott. A sagittális síkra merőleges tengely hossza ehhez az értékhez nagyon hasonló volt ($25 \pm 2 \mu\text{m}$; $n = 33$). A PLC-k átlagos szómatérfogata $7200 \pm 650 \text{ fl}$ -nek bizonyult ($n = 33$).

Dendritfájuk alakja és elhelyezkedése alapján a PLC-ket három csoportba oszthattuk. Három sejt esetében a dendritek sugárszerű lefutást mutattak a tér minden iránya felé, így a dendritfa egésze gömb alakúnak mutatkozott. Ezek a sejtek a DCN mély rétegeiben helyezkedtek el. A két másik csoport tagjai a mag subependymalis részén voltak megtalálhatók. Egy részük esetében a nyúlványok többé-kevésbé párhuzamosan, a mag mély rétegei felé haladtak (kolumnáris vagy centripetális arborizáció), ezek képezték a PLC-k második csoportját. A harmadik altípushoz tartozó sejtek megjelenése legyezőszerű volt, esetükben a proximális nyúlványok a mag felszínével párhuzamosan haladtak, és csak a másodlagos dendritek irányultak a mag mélyebb rétegei felé. Az utóbbi két csoportba tartozó neuronok száma azonos volt (45-45%; $n = 33$).

A PLC-k proximális dendritjeit dendritikus tüskéktől mentesnek találtuk, átmérőjük az esetek többségében $0,7\text{--}1,25 \mu\text{m}$ között változott. Valamennyi proximális nyúlványból dendritikus tüskékben gazdag dendritfa eredt. A proximális dendritek számát meghatározva azt találtuk, hogy az egyes PLC-khez átlagosan 11 ± 1 proximális nyúlvány tartozott. Ez a szám ugyanakkor

neuronról neuronra jelentősen változott, a legnagyobb és legkisebb nyúlványszám 19 illetve 4 volt. A felsorolt morfológiai paraméterek segítségünkre voltak abban, hogy a PLC-ket megbízhatóan azonosítsuk a funkcionális mérések során.

A Purkinje-szerű sejteken I_h mutatható ki

A PLC-k nagy teljessejtes kapacitással bírtak (89 ± 5 pF), nyugalmi membránpotenciáljuk pedig -53 ± 1 mV-nak adódott ($n = 12$). A 12 PLC-ből 11 nem mutatott spontán akciós potenciál tüzelést, depolarizáló áram alkalmazására azonban valamennyi vizsgált sejt nem-adaptálódó akciós potenciál tüzeléssel válaszolt. Voltage-clamp körülmények között alkalmazott hyperpolarizáló lépcsők alatt valamennyi PLC-n egy lassan aktiválódó befelé irányuló áram kialakulását figyeltük meg. Ennek az áramnak a nagysága $13,2 \pm 4,5$ pA/pF volt (-140 mV-os membránpotenciálnál; $n = 4$), kialakulását pedig blokkolni lehetett $10 \mu\text{M}$ ZD7288 adásával. Lassú aktivációs kinetikája és ZD7288 érzékenysége alapján arra következtettünk, hogy ez az áramkomponens megfelel a hyperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationáramnak (I_h).

A Purkinje-szerű sejtekről elvezetett spontán posztzinaptikus áramok

A funkcionális kísérletek következő lépésében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a PLC-k kapcsolódnak-e a DCN többi neuronjához. Ezen mérésekben a patch-clamp technika teljessejtes elrendezését alkalmaztuk, a membránpotenciált -60 mV-ra állítottuk és rögzítettük a PLC-k szómáján kialakuló spontán posztzinaptikus áramokat. A leírt körülmények között 14 ± 2 Hz frekvenciájú spontán gátló posztzinaptikus áramokat (sIPSC) figyeltünk meg. A sIPSC-k frekvenciája jelentősen csökkent, ha a feszültségfüggő Na^+ -csatornákat gátoltuk ($0,4 \pm 0,1$ Hz-re; $n = 4$), jelezve, hogy a sIPSC-k preszinaptikus akciós potenciál aktivitás következményei. Hasonló megfigyelést tettünk azon kísérletekben is, amelyekben a PLC-k és a

mag mély rétegei közötti kapcsolatot mechanikai sértéssel megszüntettük. Ez az utóbbi megfigyelés igazolta a mély rétegekben elhelyezkedő gátló interneuronok oki szerepét a PLC-kről elvezethető gátló posztszinaptikus tevékenység kialakításában. A GABA- és glicinerg szinapszisok hagyományos gátlószereit (bicucullin illetve sztrichnin) alkalmazva megállapítottuk, hogy a sIPSC-k nagyobb részét (76%) glicinerg szinapszisok hozták létre, míg fennmaradó 24%-uk GABA-erg szinapszisok aktiválódásának volt a következménye ($n = 4$). A sIPSC-k csökkent frekvenciája lehetővé tette spontán serkentő posztszinaptikus áramok (sEPSC) észlelését is, ezeket ugyanis korábban a nagyobb amplitúdójú és magasabb frekvenciájú IPSC-k elfedték. Feltételezzük, hogy a sEPSC-k kialakulása a PLC-k szómáján (legalábbis részben) a DCN legfelületesebb részén elhelyezkedő parallel rostok aktivitását tükrözi.

Immunhisztokémia

A PLC-ken nyert funkcionális adatok arra utaltak, hogy ezen sejtek részét képezik a DCN neuronhálózatának. Ezen következtetés további alátámasztását eredményezték a synaptophysin- és calbindin-specifikus kettős immunjelölés alkalmazásával végzett kísérletek. Mivel a synaptophysin a preszinaptikus végződések elfogadott markere, synaptophysin- és calbindin-pozitív struktúrák kolokalizációja különféle axonvégződések és a PLC-k közötti szinaptikus kapcsolatok meglétére utalhat. A jelöléseket követően synaptophysin-pozitív axonvégződések figyeltünk meg a PLC-k szómájának és dendritjeinek szoros közelségében, a végződések sűrűsége a dendriteken olykor igen nagy volt. Jóllehet a szinapszisok meglétének egyértelmű morfológiai bizonyítására elektronmikroszkópos felvételek lennének szükségesek, a konfokális mikroszkóppal és a funkcionális kísérletekben nyert adatok együttesen határozottan arra utalnak, hogy a PLC-k szinaptikusan kapcsolódnak a DCN más neuronjaihoz.

A PLC-k által termelt és felszabadított lehetséges neurotranszmitter a GABA. Annak bizonyítására, hogy a PLC-k valóban GABA-erg neuronok, calbindin- és glutamát dekarboxiláz- (GAD-) specifikus kettős immunjelölést végeztünk. A GAD a GABA bioszintéziséhez szükséges enzim, ezért egyben a GABAerg neuronok elfogadott markere is. Kísérleteinkben valamennyi vizsgált PLC erős GAD-pozitivitást mutatott.

Korábban hagyományos, beágyazott szövettani preparátumok alkalmazásával kimutatták a cerebellin jelenlétét mind kisagyi Purkinje sejtekben, mind a CN PLC-iben. Munkánkban arra voltunk kíváncsiak, hogy cerebellin- és calbindin-specifikus jelöléssel kombinált konfokális mikroszkópia segítségével kimutathatók-e különbségek a cerebellin intracelluláris elhelyezkedésében ezen két sejtípus esetén. Azt találtuk, hogy a PLC-kben a cerebellin-jelölődés a sejttestben volt kifejezett, míg a dendritek ritkán mutattak immunpozitivitást. Ezzel ellentétben a kisagyi Purkinje sejtek esetében a jelölődés mind a sejttestben, mind a dendritekben mindig megfigyelhető volt.

A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjeinek kolinerg modulációja

A DCN szeletekben regisztrált kalciumtranziensek jellemzése

Jóllehet a DCN szeletekben rögzített kalciumkoncentráció változások időbeli lezajlása meglehetősen heterogén volt, a tranzienseket alapvetően két kategóriába lehetett sorolni. Egyes sejtek gyors lezajlású, ismétlődő kalcium jeleket hoztak létre, míg más sejtek meglehetősen lassan lezajló kalciumkoncentráció változásokat produkáltak. Más agyterületeken tett megfigyelések szerint a gyors kalcium tranziensek akciós potenciál-kapcsolt események lehettek. Abból a célból, hogy bizonyítsuk a DCN-ben kapott gyors kalcium tranziensek akciós potenciál-kapcsolt természetét, az egyes

sejtek intracelluláris kalciumkoncentráció változásait és elektromos aktivitását egyidejűleg követtük kalcium képalkotó eljárás és “loose patch” technika szimultán alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a gyors kalciumtranzienseket minden esetben áramtüske előzi meg igazolva ezen tranziensek akciós potenciál-kapcsolt jellegét. Más kísérletekben a sejtek akciós potenciál tüzelését a feszültségfüggő Na^+ -csatornák blokkolásával gátoltuk. Ezekben az esetekben a gyors kalcium tranziensek sem voltak többé megfigyelhetők.

Kolinerg ingerlés növeli a gyors kalcium tranziensek frekvenciáját a DCN szemcsesejtjein

Kolinerg ingerlés céljára az általánosan elfogadott kolinerg agonistát, a karbamilkolint (CCh) alkalmaztuk. A CCh adása előtt a neuronokat szétkapcsoltuk a glutamaterg, glicinerg és GABAerg neurotranszmissziót gátló 3G koktél alkalmazásával. CCh hatására a gyors kalcium tranziensek frekvenciája $0,37 \pm 0,11 \text{ min}^{-1}$ -ről to $6,31 \pm 0,43 \text{ min}^{-1}$ -re nőtt ($p < 0,001$). A CCh hatásért felelős receptorok azonosítása céljából különféle kolinerg antagonistákat alkalmaztunk. Az általános muszkarinerg gátló atropin megszüntette a kalcium tranziensek frekvenciájának CCh hatására bekövetkező fokozódását. Ezzel szemben a nikotinerg receptorokat gátló hexametonium nem volt hatással a CCh adásakor bekövetkező válaszra.

A szemcsesejtek mind M1, mind M3 típusú muszarinerg receptorokkal rendelkeznek

Az irodalomban megtalálható korábbi adatok valamint saját eredményeink alapján indokolt volt feltételezni, hogy a jelen kísérletekben megfigyelt kolinerg hatásokat valószínűleg M3 és/vagy M1 receptorok közvetítik. Ebből a feltevésből kiindulva konfokális mikroszkópiával kombinált M1- és M3 receptor-specifikus immunjelölést végeztünk. Azt találtuk, hogy a szemcsesejtek erős immunpozitivitást mutattak mindkét receptor altípus jelölése esetén. A kétféle receptor funkcionális

jelentőségének meghatározása érdekében képkalkotó rendszerrel vizsgáltuk a szemcsesek sejtek kalciumkoncentráció változásait M1 és/vagy M3 receptor-specifikus gátlók jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a 4-DAMP, egy M3-specifikus gátló meggátolta a kalcium tranziensek frekvenciájának CCh-indukált növekedését. Ezzel szemben a pirenzepin, egy M1-specifikus gátló nem fejtett ki észrevehető hatást. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CCh megfigyelt hatásait M3 receptorok közvetítik.

Megbeszélés

A nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjei

Az irodalomban először sikerült spontán posztszinaptikus áramokat elvezetnünk a PLC-kről, igazolva ezzel, hogy ezek a sejtek a CN neuronhálózatának integráns részét képezik. Megmutattuk továbbá, hogy a PLC-k GAD-ot expresszálnak, ami arra utal, hogy GABAerg neuronok.

A PLC-k morfológiai jellemzésére klasszikus szövettani módszereket alkalmazó korábbi tanulmányokban már sor került. Jelen munkánk újszerűsége abban áll, hogy konfokális mikroszkópiát is felhasználtunk, így el tudtuk végezni a PLCk morfológiájának pontosabb leírását. A PLCk igen kiterjedt dendritikus ágrendszere miatt a hagyományos szövettani metszetekben gyakorlatilag lehetetlen volt a proximális dendritek pontos számának meghatározása, a konfokális mikroszkópia azonban ezt lehetővé tette. Eredményeink szerint a PLC-k proximális dendritjeinek száma átlagosan 11. Ez a szám jelentősen eltér az érett kisagyi Purkinje sejteken meglevőtől, utóbbiak ugyanis közismert módon egyetlen proximális dendrittel rendelkeznek.

A cerebellint először Purkinje sejt-specifikus fehérjeként írták le. Jelenlétét később a DCN cartwheel-sejtjeiben és a subependymalisan elhelyezkedő, akkor még „ectopiás Purkinje-sejtek”-ként (azaz PLC-ként) azonosított struktúrákban is kimutatták. Jelen kísérleteinkben mi is igazoltuk a kisagyi Purkinje-sejtek, a PLC-k és a cartwheel-sejtek erős cerebellin pozitivitását. Megállapítottuk ugyanakkor azt is; hogy a kisagyi Purkinje-sejtek sejtteste és dendritjei egyaránt mutattak cerebellin-specifikus immunjelölődést, míg a PLC-k esetében a jelölődés szinte kizárólag a szómára korlátozódott.

Eredményeink megmutatták, hogy jóllehet egyes funkcionális jellemzőik hasonlóak a Purkinje sejtekéhez, a PLC-k nem rendelkeznek spontán

aktivitással. Mindazonáltal mindkét sejttípus folyamatos akciós potenciál tüzeléssel válaszol küszöbfeletti depolarizációra, mindkét neuronféleségen megtalálható az I_h és mindkét esetben elvezethetők spontán gátló posztszinaptikus áramok. A PLC-kről regisztrálható gátló posztszinaptikus áramok részben glicinerg, részben GABAerg mechanizmussal magyarázhatók. Mivel kísérleti elrendezésünk következtében valamennyi IPSC eredete a DCN-en belül kellett legyen, véleményünk szerint a cartwheel sejtek küldenek gátló bemeneteket a PLC-khez. A synaptophysin-specifikus immunjelöléssel kapott eredmények arra utaltak, hogy nagyszámú axonvégződés alkot szinaptikus kapcsolatot a PLC-k sejttestével és dendritjeivel. Figyelembe véve, hogy több szerző a PLC-ket “eltévedt Purkinje sejteknek” tartja, különösen fontosak az általunk szolgáltatott morfológiai és funkcionális bizonyítékok, melyek alapján a PLC-k a DCN-ben található neuronhálózat aktív résztvevőinek tekinthetők.

A nucleus cochlearis dorsalis szemcsesejtjei

A cochlearis magot tartalmazó vékonyszeleteken változatos időbeli lefutást mutató kalcium tranzienseket lehetett megfigyelni. Kinetikai sajátásaik alapján ezeket a tranzienseket gyors vagy lassú eseményként lehetett megkülönböztetni. Megmutattuk, hogy a gyors kalcium tranziensek akciós potenciál-kapcsoltak. Ennek alapján a gyors kalcium jelek frekvenciájának módosulásai egyértelműen a neuronális aktivitás változásait tükrözik.

Eredményeink azt jelzik, hogy kolinerg ingerlés közvetlenül fokozza a szemcsesejtek aktivitását, hiszen a változás akkor is kialakul, amikor a szinaptikus ingerületátvitel gátolt. Az aktivitásfokozó hatást ugyanakkor ki lehet védeni atropinnal, jelezve a muszkarinerg receptorok részvételét. Ez a megfigyelés összhangban van korábbi tanulmányokkal, amelyek arra utaltak, hogy a DCN-ben kolinerg ingerléssel létrehozott aktivitásváltozást

muszkarinerg receptorok közvetítik valamint arra, hogy a szemcsesejtek szerepet játszanak ebben a folyamatban. Immunhisztokémiai kísérleteink kimutatták, hogy a szemcsesejtek mind M1, mind M3 receptorokat expresszálnak. Bizonyítottuk azt is, hogy a kolinerg moduláció létrehozásában az M3 receptoroknak van elsődleges jelentősége. Tekintettel arra, hogy hexametonium nem gátolta a CCh hatását, a nikotinerg receptorok részvétele valószínűtlen.

Eredményeink szerint az M3 receptorok aktivációja megnöveli a szemcsesejtek kalcium tranzienseinek frekvenciáját. Fontos kérdésként merül fel, hogy mi lehet a kapcsolat a muszkarinerg ingerlés és a fokozott kalcium tranziens frekvencia között. A muszkarinerg aktiváció kalciumot szabadíthat fel intracelluláris raktárakból és/vagy zárhatja az M-típusú K^+ -csatornákat. Utóbbi esetben a felszíni membrán depolarizációja akciós potenciál tüzelést és a feszültségfüggő kalcium csatornákon keresztüli kalcium belépést eredményezhet. Mivel bizonyítottuk a gyors kalcium tranziensek akciós potenciál-kapcsolt jellegét valamint a külső térből történő kalcium belépés meghatározó szerepét, a második lehetőség tűnik valószínűbbnek.

Egyes szerzők szerint a fokozott kolinerg moduláció tinnitust eredményezhet. A tinnitus zajterheléses állatmodelljében fokozott acetilkolin-észteráz aktivitást írtak le, valamint egyes DCN sejtípusok emelkedett CCh-érzékenységét. Sok szerző egyetért abban, hogy a tinnitust neuronális hiperaktivitás kíséri a hallópálya több szintjén, beleértve a nucleus cochlearist. A piramis- és cartwheel sejtek megnövekedett spontán aktivitását is megfigyelték kísérletes tinnitus modellben. A tinnitust ki lehet váltani vagy befolyásolni lehet a fej vagy a nyak területéről származó szomatoszenzoros ingerléssel. Miután a szomatoszenzoros információ a DCN neuronhálózatát a szemcsesejteken keresztül éri el, ezen neuronok kolinerg modulációja jelentőséggel bírhat a tinnitus létrejöttében. Ez az elképzelés összhangban van azzal a ténnyel, hogy a tinnitust a piramis- és cartwheel sejtek fokozott spontán aktivitása kíséri, különösen azért, mert a szemcsesejtek

megváltoztathatják mindkét neuronféleség működését. Ha elfogadjuk, hogy a tinnitus összefügg egyes DCN neuronok kolinerg mediációval létrehozott hiperaktivitásával, a szemcsesejtek esetleges szerepe valószínűsíthető.

Összefoglalás

Ismereteink mind a cochlearis mag egészének, mind a benne található egyes sejttípusoknak a működésére vonatkozóan hiányosak. Igen kevés adat áll rendelkezésre például a szemcse-sejtekről, melyek a nucleus cochlearis legkisebb, ugyanakkor legnagyobb számban előforduló neuronjai. Még kevesebbet tudunk a Purkinje-szerű sejtekről, melyek elsősorban a mag dorsalis részében találhatók és igen jellegzetes morfológiával rendelkeznek. Még az sem világos teljesen, hogy a PLC-k a nucleus cochlearis neuronhálózatának szerves részét képezik-e vagy csupán “eltévedt”, funkció nélküli Purkinje neuronok. Fentiekből kiindulva a jelen munka a patkány nucleus cochlearis dorsalis szemcse- és Purkinje-szerű sejtjeinek vizsgálatát tűzte ki célul. A kísérleteket elektrofiziológiai és képalkotó technikák kombinált alkalmazásával végeztük.

Kettős immunjelölés és konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a PLCk expesszálják a glutamát-dekarboxiláz enzimet, ami nélkülözhetetlen a GABA bioszintéziséhez. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a PLC-k GABAerg gátló neuronok. Agyszelet preparátumban teljes-sejtes patch-clamp technika alkalmazásával leírtuk a PLC-k akciós potenciál mintázatát. Megállapítottuk továbbá, hogy a PLC-k hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationárammal (I_h) rendelkeznek. A PLCk szómájáról elvezetett poszszinaptikus áramok analízise alapján arra következtettünk, hogy ez a sejttípus a nucleus cochlearis dorsalisban található neuronhálózat aktív résztvevője. Kimutattuk, hogy jóllehet a kisagyi Purkinje neuronok és a PLCk hasonlóak erős cerebellin-1 immunpozitivitásuk vonatkozásában, a cerebellin-1 intracelluláris eloszlása a két sejttípusban eltérő.

A cochlearis szemcsejtek azon neuronok közé tartoznak, amelyek aktivitása jelentősen módosíthatja a nucleus cochlearis dorsalis többi sejtfeleségének a működését (beleértve a PLC-ket is). A szemcsejtek

különösen fontos szereplők, hiszen szomatoszenzoros információt is kapnak. Jelen munka második részében ezért a kolinerg ingerlésnek a szemcses sejtek intracelluláris kalcium koncentráció változásaira gyakorolt hatásait tanulmányoztuk. A kísérletekre vékony szelet preparátumban elhelyezkedő, kalcium-érzékeny fluoreszcens festékkel feltöltött szemcses sejteken került sor. Kimutattuk, hogy a kolinerg ingerlés jelentősen növeli a szemcses sejtek aktivitását és gyors kalcium tranzienseik frekvenciáját. Specifikus antagonisták alkalmazásával igazoltuk, hogy ezt a kolinerg hatást muszkarinerg receptorok közvetítik. Azt is kimutattuk, hogy jóllehet a szemcses sejtek mind az M1, mind az M3 muszkarinerg receptorokat expresszálják, a hatások elsősorban az M3 receptorok aktiválódása következtében alakulnak ki.

Eredményeink lehetővé teszik annak jobb megértését, hogyan vesznek részt a szemcses sejtek és a PLC-k a cochlearis mag neuronhálózatának működésében. Az új megfigyelések eredményeként így átfogóbb képet alkothatunk annak az összetett struktúrának a működéséről, amelyik nélkül a hallási információ centrális feldolgozása lehetetlen lenne.

Iktatószám: DEENKÉTK/304/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kőszeghy Áron

Neptun kód: KK87CN

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kőszeghy, Á.**, Vincze, J., Rusznák, Z., Fu, Y., Paxinos, G., Csernoch, L., Szűcs, G.: Activation of muscarinic receptors increases the activity of the granule neurones of the rat dorsal cochlear nucleus: A calcium imaging study.
Pflugers Arch. 463 (6), 829-844, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1103-1>
IF:4.463 (2011)
2. **Kőszeghy, Á.**, Pál, B., Pap, P., Pocsai, K., Nagy, Z., Szűcs, G., Rusznák, Z.: Purkinje-like cells of the rat cochlear nucleus: A combined functional and morphological study.
Brain Res. 1297, 57-69, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.041>
IF:2.463

További Közlemények

3. Kecskés, S., **Kőszeghy, Á.**, Szűcs, G., Rusznák, Z., Matesz, K., Birinyi, A.: Three-dimensional reconstruction and quantitative morphometric analysis of pyramidal and giant neurons of the rat dorsal cochlear nucleus.
Brain Struct. Funct. Epub ahead of Print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-012-0457-7>
IF:5.628 (2011)



4. Lontay, B., Pál, B., Serfőző, Z., **Kőszeghy, Á.**, Szűcs, G., Rusznák, Z., Erdődi, F.: Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system.
J. Neurochem. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x>
IF:4.061 (2011)
5. Pál, B., **Kőszeghy, Á.**, Pap, P., Bakondi, G., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z.: Targets, receptors and effects of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus.
Eur. J. Neurosci. 30 (5), 769-782, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06868.x>
IF:3.418
6. Pap, P., **Kőszeghy, Á.**, Szűcs, G., Rusznák, Z.: Cytoplasmic Ca²⁺ concentration changes evoked by cholinergic stimulation in primary astrocyte cultures prepared from the rat cochlear nucleus.
Hear. Res. 255 (1-2), 73-83, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heares.2009.05.006>
IF:2.177

Összesített impakt faktor: 22.21

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.926

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.17

