

**Immuncitokémiai, immunhisztokémiai és morfológiai vizsgálatok
alkalmazásával kapott eredmények és azok alkalmazhatósága
különböző K⁺-csatorna-alegységek megoszlásának és potenciális
jelentőségének tanulmányozására**



Pocsai Krisztina

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2007.**

**Immuncitokémiai, immunhisztokémiai és morfológiai vizsgálatok
alkalmazásával kapott eredmények és azok alkalmazhatósága
különböző K⁺-csatorna-alegységek megoszlásának és potenciális
jelentőségének tanulmányozására**



Pocsai Krisztina

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2007.**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS.....	5
1.1. A K ⁺ -CSATORNÁK SZERKEZETE ÉS CSOPORTOSÍTÁSA	5
1.1.1. A FESZÜLTSEGFÜGGŐ (DEPOLARIZÁCIÓ HATÁSÁRA AKTIVÁLÓDÓ) K ⁺ -CSATORNÁK	6
1.1.2. AZ INWARD RECTIFIER K ⁺ -CSATORNÁK.....	11
1.1.3. A KÉT PÓRUSFORMÁLÓ HURKOT TARTALMAZÓ K ⁺ -CSATORNÁK	13
1.1.4. A KÜLÖNBÖZŐ K ⁺ -CSATORNÁK EXPRESSZIÓJÁNAK ÉS MŰKÖDÉSÉNEK PATOLÓGIÁS VONATKOZÁSAI.....	17
1.2. A K ⁺ -CSATORNÁK MEGOSZLÁSÁNAK ÉS FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI.	19
1.3. A NUCLEUS COCHLEARIS JELENTŐSÉGE, SZERKEZETE ÉS FŐBB SEJTTÍPUSAI.....	21
1.4. A MUNKA CÉLKITŰZÉSEI	23
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
2.1. AZ ALKALMAZOTT OLDATOK.....	25
2.2 KÍSÉRLETI ÁLLATOK, A PREPARÁLÁS FŐBB LÉPÉSEI.....	26
2.2.1. A KÍSÉRLETI ÁLLATOK	26
2.2.2. A NEURONOK ENZIMATIKUS IZOLÁLÁSA	27
2.2.3. TÚLÉLŐ VÉKONYSZELET-PREPARÁTUM KÉSZÍTÉSE	27
2.2.4. A NUCLEUS COCHLEARIS PROJEKCIÓS NEURONJAINAK RETROGRÁD JELÖLÉSE.....	28
2.2.5 A RETROGRÁD JELÖLÉSEN ÁTESETT NUCLEUS COCHLEARISOKBÓL TÖRTÉNŐ SZELETKÉSZÍTÉS	30
2.2.6. A RETROGRÁD JELÖLÉSEN ÁTESETT SEJTEK KVANTITATÍV ANALÍZISE.....	30
2.3. SEJTTENYÉSZETEK FENNTARTÁSA.....	31
2.4. IMMUNCITOKÉMIA, IMMUNHISZTOKÉMIA.....	31
2.5. MIKROSKÓPIA	35
2.6. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK	36
2.7. ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÉRÉSEK TÚLÉLŐ VÉKONYSZELET-PREPARÁTUMON	38
2.8. EGYÉB TECHNIKÁK.....	39
3. EREDMÉNYEK.....	41
3.1. A NUCLEUS COCHLEARIS BUSHY-NEURONJAI ÁLTAL EXPRESSZÁLT K ⁺ -CSATORNA- ALEGYSÉGEK.....	41
3.1.1. BEVEZETÉS.....	41
3.1.2. EREDMÉNYEK.....	45
3.1.3. DISZKUZZSIÓ.....	56
3.2 A NUCLEUS COCHLEARIS FŐBB PROJEKCIÓS NEURONJAINAK MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSE RODAMINNAL TÖRTÉNŐ RETROGRÁD JELÖLÉS UTÁN	68
3.2.1. BEVEZETÉS.....	68
3.2.2. EREDMÉNYEK.....	73
3.2.3. DISZKUZZSIÓ.....	84

3.3 MELANOMA MALIGNUM SEJTEK TASK-3-EXPRESSZIÓJA	89
3.3.1. BEVEZETÉS	89
3.3.2. EREDMÉNYEK.....	96
3.3.3. DISZKUSSZIÓ.....	109
4. BEFEJEZŐ GONDOLATOK	116
5. A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	120
ÖSSZEFOGLALÁS.....	131
SUMMARY	132
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	133
A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE.....	134
A TÉZISEKBEN FEL NEM HASZNÁLT TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE	136

1. BEVEZETÉS

1.1. A K^+ -csatornák szerkezete és csoportosítása

Alain Hodgkin és Andrew Huxley ma már méltán korszakalkotónak tekinthető dolgozata (*Hodgkin és Huxley, 1952*) óta ismert, hogy az ingerlékeny sejtek membránjában olyan transzmembrán fehérjék találhatók, amik idő- és feszültségfüggő módon képesek megváltoztatni a K -ionokra mutatott permeabilitásukat. Az is bebizonyosodott, hogy a tintahal óriásaxonjának vizsgálata során tanulmányozott fehérje döntő jelentőségű az akciós potenciált (AP) követő repolarizációban. A szerzők megállapították, hogy ez a molekula, amit ma már késői típusú („delayed-rectifier”) K^+ -csatorna néven ismer az irodalom, depolarizáció hatására „konduktív” állapotba kerül, így megengedi a K^+ sejtől történő kifelé áramlását.

Általánosságban elmondható, hogy a K^+ -csatornák döntő szerepet játszanak az AP-kat követő repolarizáció folyamatában, meghatározó jelentőségűek annak időviszonyainak, az egyes AP-k alakjának, továbbá az AP-sorozatok frekvenciájának kialakításában. Tekintettel arra, hogy az információ a neuronok nyúlványain frekvenciakódban terjed, a K^+ -csatornák jelentősége a központi idegrendszeri jelfeldolgozásban és -továbbításában igen jelentős.

Az elsőként leírt és jellemzett K^+ -csatornákon kívül számos más típusú K^+ -permeábilis pórus is ismert, melyek ugyancsak jelentős szerepet töltenek be a neuronok és egyéb ingerlékeny struktúrák membránsajátságainak kialakításában. A K^+ -csatornák részt vesznek a nyugalmi membránpotenciál kialakításában, szabályozzák az egyes idegsejtek (és más excitábilis struktúrák) ingerlékenységét, a szinapszisokban történő neurotransmitter-felszabadulást, továbbá az idegsejtek közötti szinaptikus transzmisszió hatékonyságát.

A központi idegrendszer és a különböző receptorsejtek mellett a szervezet egyéb területein is igen jelentősek a különböző típusú K^+ -csatornák, így pl. a gastrointestinalis rendszerben, ahol a bélcsatorna lassú hullámaint kialakító pacemaker-aktivitás szabályozásában, valamint a tápcsatorna működésének neurotranszmitterek által történő kontrollálásában fontosak (*Hatton és munkatársai, 2001*).

A K^+ -csatornák egyes típusai megtalálhatók epitheliális szövetekben is, ahol szintén alapvető élettani funkciókat látnak el (pl. az epithelsejteken keresztül zajló elektrolittranszport, a sejtek pH-jának szabályozása vagy a K -ionok reabsorbtioja és

secretioja; *O'Grady és munkatársai, 2005*). Nem meglepő módon, a K^+ -csatornák szerepet játszanak a vesében zajló transzport- és homeosztatisz folyamatokban is.

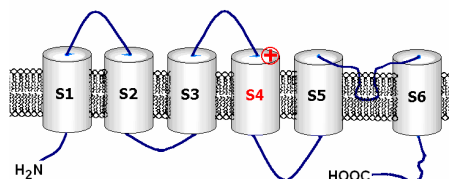
Szemben a K^+ -csatornák régóta ismert „klasszikus” funkcióival (a K^+ -transzportban betöltött szerepük, és a különböző sejtek membránpotenciálját és elektromos tevékenységét befolyásoló ún. elektrogén funkcióik), viszonylag újak mondhatók azon adatok, amik ezen struktúrák általános sejtműködést (így a differenciálódást, proliferációt és apoptosist) befolyásoló hatásairól szólnak. Az is bebizonyosodott, hogy egyes K^+ -csatornák aktivitása elősegítheti az őket expresszáló sejtek túlélését hypoxiás körülmények között. A K^+ -csatornák aktivitásának komoly szerepe lehet egyes patológiás folyamatokban, amit jól példáz, hogy bizonyos K^+ -csatornák túlzott mértékű expresszióját leírták már prostata-, vastagbél-, tüdő-, emlő- és bőrdaganatokban. Meggyőző adatok szólnak amellet, hogy a K^+ -csatornák nem pusztán jelen vannak ezen elváltozásokban, de komoly jelentőségűek az említett folyamatok pathogenesisében is.

Míndezek alapján egyértelműnek tűnik, hogy a K^+ -csatornák aktivitásának, jelenlétének és megoszlásának tanulmányozása közelebb vihet mindazon sejtek fiziológiás és patológiás funkcióinak megértéséhez, amik ezen molekulákat expresszálják. Ahhoz azonban, hogy az egyes K^+ -csatornákkal kapcsolatos kísérleti adatokat értelmezni lehessen, elengedhetetlenül szükséges azok molekuláris szerkezetének és az abból fakadó osztályozás alapjainak áttekintése. Amint az a következő részből kitűnik, a K^+ -csatornák molekuláris szerkezetük szerint korántsem egységesek; az őket felépítő alegységek száma és struktúrája alapján általában három főcsoportba (vagy az angol terminológia szerint szuperfamíliába) oszthatók.

1.1.1. A feszültségfüggő (depolarizáció hatására aktiválódó) K^+ -csatornák

Az emlősök K^+ -csatornatípusai között a legnagyobb számú és legváltozatosabb csoportot a feszültségvezérelt K^+ -csatornák (Kv) főcsoportja alkotja. Bár az ebbe a családba tartozó csatornák biofizikai jellegzetességükben, elektromos sajátságaikban és funkcióikban is jelentős eltéréseket mutathatnak, szerkezetükben megegyező és általában depolarizációra aktiválódó struktúrákról van szó. A Kv-csatornák szerveződéséről általában elmondható, hogy négy alegységből állnak; az egyes alegységek N-és C-terminális régiói a cytoplasmaticus oldalon helyezkednek el (*Jan és Jan, 1997; Samson és munkatársai, 2002; Yellen, 2002; Armstrong, 2003*). Minden alegység N-terminálisa tartalmaz egy ún. T1 szakaszt, amely a funkcióképes molekulakomplex összeszerelődésében, azaz a

tetramerizációban játszik szerepet (Li, és munkatársai, 1992; Yu és munkatársai, 1996; Liu, és munkatársai, 2005; Robinson és Deutsch, 2005).



1. ábra

A feszültségvezérelt K⁺-csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

A Kv-csatornák egy alegységének felépítésében hat transzmembrán domén vesz részt, melyek amino- és karboxi-terminálisa egyaránt intracellulárisan található. Megkülönböztetett jelentőségű az S4 domén, ami több pozitívan töltött aminosavat tartalmazva a csatorna feszültségszenzorát képezi. A pórusformáló hurok az S5 és az S6 szegmensek között helyezkedik el. A funkcióképes csatorna kialakulásához négy ilyen alegység (nem kovalens) összekapcsolódása szükséges.

A Kv-csatornák minden alegységét hat transzmembrán domén építi fel (Catterall és munkatársai 1993; 1. ábra). Ezen szegmensek közül kiemelkedő jelentősége van a 4. pozícióban elhelyezkedőnek (S4), ami számos pozitív töltéssel rendelkező aminosavat tartalmaz, így a Kv-csatornák feszültségszenzorát képezi. A feszültségvezérelt K⁺-csatornák szerkezetében az S5 és az S6 transzmembrán domének között a felszíni membránba mélyen benyúló, de azt át nem érő huroknak (H₅ vagy P-régió) is kiemelkedő szerepet tulajdonítanak, ugyanis az összeszerelődött ioncsatornában az egyes alegységek ezen régiói egymás felé tekintenek, és a csatorna K⁺-permeábilis pórusát alkotják. A pórust kialakító hurok különösen fontos része egy glicin-tirozin-glicin (GYG) aminosav-tripletet tartalmazó, igen konzervatív régió, ami döntő jelentőségűnek tűnik a K⁺-szelektív pórus kialakításában.

A feszültségvezérelt K⁺-csatornák sokrétű funkciókkal rendelkeznek, de általánosságban elmondható, hogy többnyire az AP-ket követő repolarizáció és utóhiperpolarizáció kialakításáért, továbbá (egyes típusaik) az AP-k késleltetéséért, esetleg azok kialakulásának megakadályozásáért felelősek. Ezen funkciókból fakadóan a Kv-csatornák igen fontosak az egyes ingerlékeny struktúrák által tüzelte AP-k alakjának, időtartamának és frekvenciájának kialakításában.

A feszültségvezérelt K⁺-csatornák igen heterogén molekulák, aminek hátterében az áll, hogy az egyes csatornaalegységek több alcsoportba sorolhatók, az alcsoportokon belül pedig számos változat található, amelyek kombinálódásával egészen eltérő funkcionális sajátosságokkal rendelkező struktúrák jöhetnek létre. A disszertáció írásának időpontjában

(2007. január) a Kv-csatornáknak 12 alcsoportja ismert (Kv1-12). Az emlős K⁺-csatornák elsőként és legrészletesebben feltérképezett alcsoportjai a Kv1-, a Kv2-, a Kv3- és a Kv4-kódoló gének által kódolt ioncsatornák, amelyek a *Drosophila melanogaster* Shaker, Shab, Shaw és Shal génjeivel mutatnak homológiát (Swanson és munkatársai, 1990).

A K⁺-csatornák sokféleségét igen jelentősen fokozza, hogy az egyes Kv-gének posztttranszkripciós módosításon („alternatív splicing”) eshetnek át, így a kialakuló fehérjetermék (amit a főcsoport után álló számmal jelölnek, pl. Kv1.1 vagy Kv1.2); és ezáltal az általa meghatározott csatorna biofizikai jellemzői jelentősen különbözhetnek. A funkcióképes K⁺-csatornák tetramer struktúrák, amik az egyes gének által kódolt (és a megfelelő posztttranszkripciós módosuláson átesett) alegységek összeszerelődésével alakulnak ki. A tetramerizáció azonban nem teljesen kötetlen: míg az egyes főcsoportokon belül az alegységek szabadon kapcsolódhatnak egymáshoz (változatos heterotetramerek kialakulását lehetővé téve), ilyen kapcsolódás a különböző főcsoportokba tartozó alegységek között általában nem lehetséges.

Az egyes főcsoportokba tartozó alegységek összeszerelődésével keletkezett csatornák jelentős funkcionális és biofizikai különbségeket mutathatnak. A Kv1-csoportba tartozó alegységek kombinálódásával kialakuló csatornák között található lassan inaktíváló, késői (delayed-rectifier) csatornák (Kv1.3 és Kv1.5); dendrotoxinra érzékeny, már kis depolarizáció hatására is aktiváló, lassan inaktíváló csatornák (Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.6); valamint gyorsan inaktíváló, tranziens (A-típusú) csatornák (Kv1.4; Luján és munkatársai, 2003). Fontos megjegyezni, hogy a felsorolt tulajdonságok az adott alegységekből összeszerelődő homotetramer csatornákra jellemzőek, heterotetramer struktúrák esetében a leírt tulajdonságok keverednek és összemosódnak.

Az egyes K⁺-csatornaalegységek nem pusztán biofizikai sajátosságaikban, de alkalmanként lokalizációjukban is jelentős különbségeket mutatnak. Ennek megfelelően több immunhisztokémiai tanulmány szól arról, hogy a Kv1.4-alegységek az agyban axonális és dendritikus lokalizációban (Sheng és munkatársai, 1992; Veh és munkatársai, 1995; Rhodes és munkatársai, 1997; Cooper és munkatársai, 1998; Song és munkatársai, 1998) egyaránt megfigyelhetők, továbbá patkányagyban a cortex területén a neuropil is igen erőteljes Kv1.4-jelölődést mutatott (Luján és munkatársai, 2003). A Kv1.4-alegység a hippocampus minden részén kimutatható volt, és különösen erős volt a jelölődés a CA1 area stratum oriens, radiatum és lacunosum moleculare területein. A cerebellaris Purkinje-sejtek és a molekuláris réteg ugyanakkor csak nagyon gyenge reakciót adott, a szemcsesejtek rétege pedig közepes festődést mutatott.

A Kv1 alegységek a hallórendszerben is differenciált expressziót mutatnak: egér és humán crista ampullarison végzett kutatások szerint a Kv1.1- és Kv1.2-alegységek jelen vannak, ugyanakkor Kv1.4 és Kv1.5 expresszióját nem sikerült kimutatni (*Hotchkiss és munkatársai, 2005*). Patkány nucleus cochlearis ventralis régiójában történt kísérletek szerint a bushy-neuronok sejttestjén már a születést követően megtalálhatók a Kv1.1- és a Kv1.2-alegységek; axonjukon azonban csak a születést követő harmadik hét végén jelentek meg. Ezzel párhuzamosan a felnőtt állatokban a Kv1.1-alegységek száma lecsökkent, a Kv1.2-alegység pedig teljesen eltűnt (*Caminos és munkatársai, 2005*).

Egy újabb keletű felfedezés szerint a Kv1-csoport tagjai a σ -altípusba tartozó ópioidreceptorokkal is összekapcsolódhatnak, és azok jelentősen módosíthatják a Kv1-alegységeket tartalmazó K^+ -csatornák biofizikai sajátosságait (*O'Grady és munkatársai, 2005*).

A Kv2-csoportba tartozó ioncsatornák (Kv2.1 és 2.2) lassú inaktivációval jellemezhető, 4-aminopiridinre (4-AP) érzékeny, késői típusú K^+ -áramot hoznak létre (*Coetzee és munkatársai, 1999*). Szemben a többi csoport képviselőivel, ezek az alegységek kombinálódhatnak az ún. „kiegészítő alegységek” csoportjába tartozó (Kv5.1-, Kv6.1-, Kv8.1-, Kv9.1- és Kv9.3-) alegységekkel is. A Kv2.1-alegységek közreműködésével kialakított csatornák a „szokványosnak” mondható elektrogén funkciók mellett különösen nagy jelentőségűnek tűnnek a pancreas B-sejtjei által végzett inzulinszekréció szabályozásában. Ismeretes, hogy a plasma glükózkoncentrációjának emelkedése a B-sejtek depolarizációját hozza létre, ami az inzulinszekréció közvetlen előzménye. A B-sejtek repolarizációjának kialakításában, így az inzulinszekréció lezárásában, a késői típusú K^+ -csatornáknak, ezen belül is a Kv2.1-alegységek által kialakított molekuláknak tulajdonítanak kiemelkedő szerepet (*Herrington, 2006*).

Úgy tűnik, hogy a feszültségvezérelt K^+ -csatornák Kv3-családja különösen fontos szerepet játszik az idegsejtek ingerlékenységének szabályozásában. A Kv3.1-alegységek jelenléte bebizonyosodott például a nucleus cochlearis ventralis részében található bushy-sejteken, valamint a dorsalis magrészből elhelyezkedő óriásneuronokon (*Perney és Kaczmarek, 1997*); ugyanakkor az octopus-sejtek csak igen kis mértékben expresszálták ezt az alegységet (*Grigg és munkatársai, 2000*). Egyes immunhisztokémiai adatok szerint a Kv3.3-alegység igen elterjedt a medulla oblongata és a gerincvelő területén (*Brooke és munkatársai, 2005*) egyaránt.

A Kv4 főcsoportba tartozó csatornák A-típusú (azaz gyorsan inaktiválódó) K^+ -áramokat hoznak létre, amik (egyebek között) jelentős szereppel bírnak a nucleus cochlearis

fiziológiájában is. *In situ* hibridizációs és RT-PCR technikákkal kimutatták, hogy a nucleus cochlearis fontosabb projekciós neuronjai (pl. octopus-, bushy- és óriássejtek) már a születést követő második naptól nagy mennyiségben tartalmaznak Kv4.2-specifikus mRNS-t. Ettől eltérő módon, a Kv4.3-specifikus mRNS csak a születést követő harmadik héttől, és csak a ventralis magrészben volt jelen; a Kv4.1-alegység jelenlétét pedig ezidáig egyáltalán nem sikerült kimutatni a nucleus cochlearisban (*Fitzakerley és munkatársai, 1999*).

Viszonylag újkeletű az a megfigyelés, miszerint a feszültségfüggő K^+ -csatornák fontos szerepet tölthetnek be a sejtciklus és az apoptoticus folyamatok szabályozásában is. Igen érdekesnek tűnik az a megállapítás, miszerint kisagyi szemcsesejteken a klasszikus K^+ -csatorna blokkoló 4-AP nemcsak a tranziens K^+ -áram amplitúdóját csökkentette jelentősen, de ezzel egyidejűleg dózisfüggő módon növelte azok túlélését az apoptoticus folyamatok aktiválását követően. Current-clamp technikát alkalmazva az is bebizonyosodott, hogy a 4-AP alkalmazása nem változtatta meg jelentősen a nyugalmi membránpotenciált, ami arra enged következtetni, hogy a neuroprotektív hatás nem a membrán depolarizációján keresztül, hanem valamilyen más folyamat révén valósul meg (*Hu és munkatársai, 2006*).

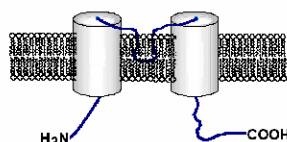
Érdeemes megemlíteni, hogy a Kv-csatornák főcsoportjába sorolják a hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornákat is (HCN-csatornák). Bár a HCN-csatornák vizsgálata nem képezte a jelen disszertáció érdemi részét, röviden áttekintjük az ezen csatornákkal kapcsolatos legfontosabb adatokat is. A HCN-, azaz az ún. h-áram kialakulásáért felelős ioncsatornák szerkezete nagymértékben hasonlít a feszültségfüggő K^+ -csatornák felépítéséhez, vagyis a struktúra kialakításában szerepet játszó négy alegység hat transzmembrán szegmensből épül fel. Az S4 pozícióban elhelyezkedő feszültségérzékeny domén két feszültségérzékeny régióval rendelkezik, amelyek mindegyike 5-5 pozitívan töltött aminosav-oldalláncot tartalmaz. Annak ellenére, hogy ez a domén nem különbözik jelentősen a feszültségfüggő K^+ -csatornák hasonló régiójától, a HCN-alegységek aktiválódását a hiperpolarizáció hozza létre. Az egyes alegységek a cytoplasmaticusan elhelyezkedő C-terminális végükön egy 120 aminosav hosszúságú ciklikus nukleotid kötő doménnal (cyclic nucleotide binding domain, CNBD) rendelkeznek, amelynek jelenléte és aktivitása felelős a cAMP csatornaműködést befolyásoló hatásáért. A h-áram fontos sajátossága, hogy az intracelluláris cAMP-koncentráció emelkedése a csatorna aktivációjának feszültségfüggését pozitívabb membránpotenciál-értékek felé tolja el, így a csatornanyitás valószínűségét és időtartamát megnöveli (*Mayer és Westbrook, 1983; Banks és munkatársai, 1993*). A HCN-csatornák viszonylag negatív membránpotenciálokön aktiválódnak (-50 mV és annál negatívabb értékek), és a hiperpolarizáció növekedésével az aktivált csatornák száma

és az aktiváció sebessége egyaránt növekszik. A h-áram a K^+ -áramok hagyományos blokkoló szereivel (tetraetil-ammónium [TEA^+], 4-AP) nem gátolható, ugyanakkor igen érzékenyen reagál az extracellulárisan alkalmazott Cs^+ jelenlétére (Bader és munkatársai, 1982; Mayer és Westbrook; 1983; Schlichter és munkatársai, 1991; Banks és munkatársai, 1993). A h-áram (viszonylag) specifikus gátlószereinek a ZD7288 és az S-16257 (ivabradin) nevű anyagokat tartják.

A szív ingerképző elemeiben a HCN-csatornákon folyó áram felelős a spontán aktivitás kialakulásáért; a szívvel foglalkozó elektrofiziológusok körében a „funny current” (I_f) elnevezés honosodott meg. A HCN-csatornák jelenlétét a központi idegrendszer több régiójában is igazolták (neocortex, hippocampus, agytörzsi magvak, a kisagy molekuláris rétege, Purkinje-sejtek és a mély kisgyi magvak). A nucleus cochlearison végzett immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei szerint a mag dorsalis részében a neuropil igen erőteljes HCN1-, HCN2- és HCN3-specifikus, ugyanakkor közepesen erős HCN4-specifikus reakciót mutatott; a ventralis régióban pedig mind a neuronok sejtteste, mind nyúlványaik expresszálták valamennyi ismert HCN-alegységet (Monteggia és munkatársai, 2000).

1.1.2. Az inward rectifier K^+ -csatornák

Bár a befelé egyenirányító (inward rectifier) K^+ -csatornák vizsgálata sem képezte a jelen disszertáció tárgyát, didaktikai okok miatt erről a csoportról is említést teszünk. A befelé egyenirányító K^+ -csatornák (Kir) főcsoportján belül az egyes tagok molekuláris és elektrofiziológiai sajátosságai alapján hét alcsoportra különíthető el (Kir1.0-Kir7.0); az ezen alcsoportokba tartozó egyedi molekulák száma húsznál is több (Butt és Kalsi, 2006).



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

A csatorna egy alegysége két transzmembrán domént és egy pórusformáló hurkot tartalmaz; az alegységen belül mind az amino-, mind a karboxi-terminális intracellulárisan helyezkedik el. A funkcióképes struktúra létrejöttéhez négy alegység összeszerelődése szükséges.

Hasonlóan a depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -csatornákhöz, a befelé egyenirányító K^+ -csatornák is négy alegység összeszerelődésével jönnek létre (*Doupnik és munkatársai, 1995*). Az egyes alegységek két transzmembrán domént és a közöttük elhelyezkedő pórusformáló P-hurkot tartalmazzák (2. ábra). Az amino- és a karboxi-terminálisok egyaránt intracellulárisan helyezkednek el, a pórusformáló hurok pedig két membránhoz kapcsolódó szegmenst (M1 és M2) és egy szelektivitásért felelős (S) szekvenciát tartalmaz (*Ho és munkatársai, 1993; Kubo és munkatársai, 1993*). A legújabb adatok szerint a Kir -csatornák két különböző pórust tartalmaznak: egy „transzmembrán pórust”, amelyet a P-hurok és az M2 szegmens alkot; valamint egy „cytoplasmaticus pórust”, amelyet az intracellulárisan elhelyezkedő N-és C-terminálisok hoznak létre. A cytoplasmaticus régióban található továbbá egy olyan kötőhely, ahová különböző ligandok és regulátorok kapcsolódhatnak (*Pegan és munkatársai, 2005; Xie és munkatársai, 2006*).

A befelé egyenirányító K^+ -csatornák hozzájárulnak a nyugalmi membránpotenciál kialakulásához, ugyanakkor nem gátolják a depolarizációt létrehozó hatásokat, így energetikailag kedvező helyzetet teremtenek az akciós potenciálok kialakulásához. A Kir-csatornáknak különösen nagy jelentősége van a harántcsíktolt izom működésében, ahol biztosíthatják a szöveti aktivitás következményeként a transversalis tubulusokban felhalmozódó K^+ sejtbé jutását (*Adrian, 1969; Hille és Schwarz, 1978; Hagiwara és Jaffe, 1979*).

A Kir-csatornák természetesen megtalálhatók a központi idegrendszerben is, ahol egyebek között a gliasejtek magas K^+ -szelektivitását, valamint azok erősen negatív nyugalmi membránpotenciálját biztosítják. Mivel az astrocyták egyik fő feladata a neuronális aktivitás során az extracelluláris térbe jutó K-ionok térbeli pufferelése és azok visszavételezése; az ezen folyamatok biztosításában igen jelentős Kir-csatornák méltán tekinthetők a központi idegrendszeri funkciók egyik fontos elemének. A gliasejtek sejt felszíni membránjukban nagy mennyiségben expresszálnak Kir4.1-csatornákat, amik jelentősen befolyásolják az astrocyták membránjának K^+ -konduktanciáját, így azok nyugalmi membránpotenciálját. A Kir4.1-csatornák megkülönböztetett jelentőségére utal az a megfigyelés, miszerint a Kir4.1-alegységeket kódoló gén átíródásának gátlása csökkentette a mielinizáció mértékét (*Butt és Kalsi, 2006*). Mindent összevetve, a Kir-csatornák kulcsfontosságúak a gliasejtek azon funkcióinak kialakításában, amik révén befolyásolják az idegsejtek ingerlékenységét, és az axonok vezetőképességét

Hasonlóan a Kv-főcsoport tagjaihoz, a Kir-családon belül is számos alcsoport különíthető el. A Kir1 (ROMK), ATP-függő csatornákhöz a vese alacsony konduktanciájú,

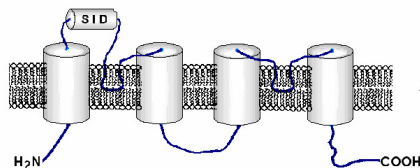
K⁺-szekréciónban különösen jelentős K⁺-csatornái tartoznak (*Ito és munkatársai, 1996; Isomoto és munkatársai, 1997; Lourdel és munkatársai, 2002*), míg a Kir2-alcsaládba (klasszikus befelé egyenirányító K⁺-csatornák) tartozó csatornák a szívizomsejtek nyugalmi membránpotenciálját szabályozzák (*Nichols és munkatársai, 1997; Stanfield és munkatársai, 2002*). A harmadik alcsoportba a G-fehérje által aktivált Kir3.1 és Kir3.4 K⁺-csatornák sorolhatók, amelyek különösen jelentősek a pitvari cardiomyocyták elektrofiziológiai tulajdonságainak szabályozásában (*Krapivinsky és munkatársai, 1995; Isomoto és munkatársai, 1997; Stanfield és munkatársai, 2002*). A heterotetramer, ATP-függő Kir4.1/Kir5.1-csatornák elsősorban az agytörzsben expresszálódnak (*Xie és munkatársai, 2006*); a Kir6.x alcsalád tagjai pedig a szulfanilurea-receptorokkal együtt a natív ATP-érzékeny K⁺-csatornákat (K_{ATP}) alkotják (*Inagaki és munkatársai, 1995*), amelyek a szívizomsejtekben, a hasnyálmirigy B-sejtjeiben, a vázizom és a simaizmok sejtjeiben és az idegsejtekben is megtalálhatók. A Kir7.x csatornák elsősorban az agyban, a vesékben és a vékonybélben fordulnak elő, és ezen struktúrák membránpotenciáljának szabályozásában töltenek be fontos szerepet (*Krapivinsky és munkatársai, 1998*).

1.1.3. A két pórusformáló hurkot tartalmazó K⁺-csatornák

Az K⁺-csatornák ezen legújabbban felfedezett családjának létezéséről elsőként Ketchum és munkatársai számoltak be (*1995*). Az ebbe a csoportba tartozó ioncsatornák molekuláris szerkezetükben, viselkedésükben és funkcióikban is jelentősen különböznek az addig ismert K⁺-csatornáktól. Szerkezetükre jellemző, hogy a funkcionális molekulát felépítő alegységek négy transzmembrán domént és két pórusformáló hurkot tartalmaznak (3. ábra). A pórus kialakításában szerepet játszó hurkok az alegységen belül egymás után helyezkednek el; a működőképes struktúra kialakulása pedig az alegységek dimerizációjával valósul meg, azaz a funkcióképes ioncsatorna pórusa mindösszesen ugyanúgy négy hurokból tevődik össze, mint a Kv- és a Kir-csatornák esetében. A dimerizáció létrejöttéhez az 1. és 2. transzmembrán szegmens között elhelyezkedő, 44 aminosavat tartalmazó, α-helikális struktúrájú, ún. „self-interacting domain” (SID) szükséges (*Lesage és munkatársai, 1996*), ami a család egyes reprezentánsaiban egy ciszteint tartalmaz (69-es pozíció). A két alegységben található ciszteinek az összeszerelődött molekulában egymással szemben helyezkednek el, és a közöttük kialakuló diszulfid-kötés stabilizálja a csatornát.

A két pórusformáló hurkot tartalmazó K⁺-csatornák családjának számos reprezentánsa van (melyek több-kevesebb szekvenciahomológiát mutatnak), ám terjedelmi okok miatt a

jelen disszertációban csak az ún. TASK-csoport tagjairól (TWIK- [twin-pore domain in weak inward rectifier K^+ channels] related, acid-sensitive K^+ channels) esik szó (Lesage és munkatársai, 1996; Chavez és munkatársai, 1999).



3. ábra A két pórusformáló domént tartalmazó K^+ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

Az alegység amino- és karboxi-terminális végei egyaránt intracellulárisan helyezkednek el. Az egyes alegységeket négy transzmembrán domén építi fel, ugyanakkor az alegységen belül két, egymás után elhelyezkedő („tandem” elrendezés) pórusformáló hurok található. A funkcióképes struktúra kialakulásához az alegységek dimerizációjára van szükség, amely folyamatban kiemelkedő szerepe van az 1. és a 2. szegmens között elhelyezkedő SID („self-interacting domain”) régióknak. A dimerizáció a csatornák egyes típusaiban kovalens kötéssel történik (a SID egy-egy ciszteinje közötti diszulfid híd révén), más esetekben (pl. a TASK-csatornák) nem kovalens kapcsolódásról van szó.

Bár a terminológia szerint a TASK-csatornák családjába öt molekula tartozik (Duprat és munkatársai, 1997; Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kim és munkatársai, 1999; Kim és munkatársai, 2000; Rajan és munkatársai, 2000; Kim és Gnatenko, 2001; Ashmole és munkatársai, 2001), a TASK-1, a TASK-3 és a TASK-5 lényegesen nagyobb szekvenciahomológiát, így közelebbi rokonságot mutat egymással, mint a TASK-2- vagy TASK-4-csatornákkal. Az újabb felfogás szerint a TASK-2 és a TASK-4 csatornák nem is a TASK-, hanem a TALK-családba (TWIK-related, alkaline pH activated K^+ channels) tartoznak (Girard és munkatársai, 2001; Decher és munkatársai, 2001).

Amint azt a nevük is mutatja, a TASK-csatornák igen érzékenyen reagálnak az extracelluláris pH változásaira: az extracelluláris pH savas irányba való eltolódása a záródásukat okozza (Duprat és munkatársai, 1997; Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kim és munkatársai, 1999). Ezen pH iránti érzékenységet (legalábbis részben) a csatornafehérje 98-as pozíciójában, a permeábilis pórus külső szájadékaiban elhelyezkedő hisztidin felelős (Kim és munkatársai, 2000; Rajan és munkatársai, 2000). A TASK-3-csatornák pH-érzékenysége kisebb, mint a TASK-1-csatornáké; a TASK-1-csatornák pK-ja 7,5, a TASK-3-csatornáké pedig 6,8.

A TASK-csatornák farmakológiája jelentősen eltér a többi K^+ -csatorna esetében megszokottól: a TASK-csatornák nem érzékenyek a hagyományos K^+ -csatornagátló-szerekre

(Cs⁺, Ba²⁺, 4-AP, TEA⁺), ugyanakkor néhány localanaestheticum (pl. lidokain, bupivakain) gátolja a működésüket (*Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kindler és munkatársai, 1999*). A TASK-1-csatorna gátlószereként gyakran alkalmaznak anandamidot (*Maingret és munkatársai, 1999*). További érdekes megfigyelés, hogy egyes gáznemű altatószerek (pl. halotán) mind a TASK-1-, mind a TASK-3-csatornákat aktiválják (*Patel és munkatársai, 1999; Lesage és munkatársai, 2000*), ami az őket expresszálo neuronok hiperpolarizációját, így azok ingerlékenységének csökkenését okozza. Ez a megfigyelés kiválóan magyarázza a halotán jól ismert altató, központi idegrendszert gátló hatását.

A TASK-3-csatornák egyik hatásos (ám sajnos korántsem specifikus) gátlószere a ruténiumvörös (RR; IC₅₀ = 0,7 μmol/l). A vizsgálatok megállapították, hogy a TASK-3-csatornák vonatkozásában a szer Hill-koefficiense 1, azaz egy dimer gátlásához csak egyetlen RR molekula kötődése szükséges. A jelenség háttérben az áll, hogy a RR keresztkötést alakít ki a két alegység 70-es pozíciójában található glutaminsav molekulákkal, aminek következtében pontosan a K⁺-permeábilis pórus fölött rögzül, és elektrosztatikusan taszítja a K-ionokat. A hatásmechanizmusból és az igen specifikus kölcsönhatásból fakadóan a RR csak a TASK-3-homodimereket gátolja; a megfelelő aminosav(ak) híján nem képes kapcsolódni sem a TASK-1-homo-, sem a TASK-1/TASK-3-heterodimerekhez (*Czirják és Enyedi, 2002; Czirják és Enyedi, 2002c*).

A TASK-csatornák élettani szerepe igen sokrétű; egyebek között jelentőségük lehet a perifériás kemoreceptorok hypoxia iránti érzékenységének biztosításában (*Buckler és munkatársai, 2000*). Ismeretes, hogy a TASK-1- és TASK-3-alegységekből összeszerelődött csatornák hypoxia hatására záródnak, így a kemoreceptorsejtek depolarizációját, végsősoron neurotransmitter-felszabadulást hoznak létre. Különösen jelentősnek tűnnek a TASK-3-csatornák a patkány mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeinek szekretoros funkciójában, ahol meghatározó jelentőségűek a hyperkalaemia és az angiotenzin-II által kiváltott aldosteronszekréció kialakulásában (*Czirják és munkatársai, 2000; Czirják és Enyedi, 2002b*). Bebizonyosodott, hogy a hyperkalaemia a TASK-3-csatornák által biztosított magas K⁺-konduktancia miatt, az angiotenzin-II pedig a megfelelő intracelluláris hírvivő rendszereken keresztül megvalósuló, a TASK-3-csatornákat gátló hatása következtében okoz depolarizációt és aldosteronszekréciót.

A fentiekén túlmenően a TASK-csatornák fontos szerepet töltenek be a központi idegrendszerben zajló neurotranszmisszió folyamatában is. Több adat szól amellett, hogy a neurotranszmisszió során a szinaptikus résben jelentősen változhat a pH (akár 0,3 egységnyi

változás is elképzelhető), ami módosíthatja a prae- és postsynapticus membránban elhelyezkedő TASK-csatornák aktivitását, hozzájárulva ezáltal a neurotranszmitterek prae- és postsynapticus hatásaihoz egyaránt.

Egyes kísérleti adatok alapján úgy tűnik, hogy a TASK-csatornák a glia- és az idegsejtek közötti igen bensőséges kapcsolatban is részt vehetnek: a neuronális aktivitás során jelentős K^+ -kilépés következik be, így az extracelluláris K^+ -koncentráció megemelkedik, ami kiváltja a gliasejtek K^+ -indukált depolarizációját. A gliasejtek depolarizációja stimulálja sejt felszíni membránjuk Na^+/HCO_3^- -symportját, ami az extracelluláris térben HCO_3^- -depléciónhoz vezet, csökkentve annak pH-ját. Az így kialakuló acidosis zárja a TASK-csatornákat, ami jelentősen módosíthatja a neuronok ingerlékenységét és aktivitását.

Igen figyelemre méltó megfigyelésről számoltak be Lauritzen és munkatársai (2003), akik szerint egyes sejtekben a TASK-1- és a TASK-3-csatornák fontos szerepet játszanak az apoptózis indukálásában is. A fenti szerzők eredményei szerint a kisagyú szemcsesejtek TASK-csatornáit, így azok perzisztens K^+ -áramait gátolva a sejtek apoptoticus pusztulása jelentősen csökkenthető volt. A TASK-csatornáknak az apoptózis indukációjában betöltött szerepét az a megfigyelés is alátámasztja, miszerint a TASK-1- és TASK-3-csatornákat hippocampalis neuronokban expresszáva (ahol fiziológiásan nincsenek jelen) azokban apoptózis indukálható. Számos további adat mutat arra, hogy összefüggés van a sejtek apoptoticus aktivitása és a sejt felszíni membránon keresztül megvalósuló K^+ -kiáramlás között: ennek egyik példája, hogy magas extracelluláris K^+ -koncentrációjú oldatban tenyésztve a cerebellaris szemcsesejteket azok apoptoticus aktivitása jelentősen csökkenthető volt (Lauritzen és munkatársai, 2003). Hasonló hatást eredményezett alacsony pH-jú közeg (pH = 6,4) alkalmazása is, ami hatásosan gátolta a folyamatba bevont, döntően TASK-3-csatornák aktivitását (Lauritzen és munkatársai, 2003).

Míg a TASK-csatornák biofizikájára és lehetséges funkcióira vonatkozó adatok egyre gyűlnek, továbbra is viszonylag szegényes mennyiségű információ áll rendelkezésre azok megoszlására és lokalizációjára vonatkozólag, különösen ami a humán eredetű szöveteket illeti. Ezzel kapcsolatosan megemlíthető, hogy Karschin és munkatársai (2001) erőteljes TASK-1-, TASK-3- és TASK-5-specifikus mRNA expressziót mutattak ki patkány hallórendszerének központi idegrendszeri elemeiben. Patkány és humán kisagyon végzett immunhisztokémiai kísérletek eredményei alapján elmondható továbbá, hogy mind a TASK-1-, mind a TASK-3-csatornák megtalálhatók a Purkinje-sejteken, a molekuláris és a szemcsesejtes rétegben, valamint az astrocytákon egyaránt (Rusznák és munkatársai, 2004).

Erőteljes TASK-3-pozitivitás volt demonstrálható továbbá a humán gastrointestinalis rendszer különböző területein is (*Kovács és munkatársai, 2005*).

1.1.4. A különböző K⁺-csatornák expressziójának és működésének patológiás vonatkozásai

Egyre több adat szól amellett, hogy a feszültségvezérelt K⁺-csatornák fiziológiai jelentőségük mellett számos kóros folyamatban is szerepet játszhatnak. Zhanping és munkatársai (*2006*) számoltak be arról, hogy egyes Kv-csatornák részt vesznek bizonyos petefészekdaganat-eredetű sejtek (A2780-sejtvonal) proliferációjának és sejtciklusának szabályozásában egyaránt. Megállapították, hogy ezen csatornák gátlása jelentősen csökkentette a sejtek proliferációját, és hatással volt a sejtciklusra is: 4-AP jelenlétében a G0/G1 fázisban lévő sejtek aránya megnövekedett, ugyanakkor csökkent az S és a G2/M fázisban lévő sejtek száma. Míg a nem szelektív K⁺-csatorna blokkoló tetrapentil-ammónium (TPA⁺) hasonló hatásokat váltott ki, a Ca²⁺-szenzitív K⁺-csatornát gátló iberiotoxin és az ATP-szenzitív K⁺-csatornát blokkoló glibenklamid nem mutatott érzékelhető hatást sem az A2780 sejtek proliferációjára, sem azok sejtciklusára. Mivel a sejtekbe történő Ca²⁺-belépést hatékonyan gátló verapamil alkalmazásával a TPA⁺-hoz hasonló hatásokat tapasztaltak, úgy tűnik, hogy a feszültségfüggő K⁺-csatornák aktivitásának megváltozása döntően Ca²⁺-dependens folyamatok közvetítésével hat a sejtciklusra.

Több adat szól amellett is, hogy a sejt felszíni membránban lévő K⁺-csatornák aktivitása a sejtproliferációhoz is elengedhetetlen (*Kunzelman és munkatársai, 2005*), és ezzel egyidejűleg az is egyre nyilvánvalóbbnak tűnik, hogy a feszültségfüggő K⁺-csatornák aktivitása egyes humán daganatok fejlődésében és növekedésében is lényeges szerepet játszhat (*Kunzelman és munkatársai, 2005*). Spitzner és munkatársai (*2006*) mutattak rá, hogy bár a humán vastagbél-eredetű T₈₄-jelű tumorsejtek számos K⁺-csatornát expresszálnak, csak a feszültségfüggő K⁺-csatornák aktivitása befolyásolta a sejtproliferációt. Ezen csatornák gátlószereit alkalmazva mind a DNS-szintézis intenzitása, mind a sejtszám csökkent; az RNS-interferencia kísérletek szerint pedig a Kv-csatornák transzlációjának csökkentése hatékonyan gátolta az intracelluláris Ca²⁺-szignalizációt.

A Kir-alegységekből felépülő csatornák aktivitásának is lehetnek patológiás vonatkozásai. Dahr és munkatársai (*2006*) demonstrálták, hogy az emlődaganatok mintegy 40%-ában igazolható valamilyen G-proteinhez kapcsolt, befelé egyenirányító K⁺-csatorna (GIRK1, GIRK2 és a GIRK4) jelenléte és aktivitása. Az is bebizonyosodott, hogy

emlőtumorokból származó sejtvonalakban a GIRK-csatornák és a β -adrenerg receptorok szignalizációs útvonala funkcionális kapcsolatban van egymással, továbbá hogy ezen útvonalak szerepet játszanak a tumorsejtek növekedésének szabályozásában. Külön érdekesség, hogy az emlődaganatok kialakulásában jelentékeny rizikófaktorként tartják számon a GIRK-csatornákat nyitott állapotban tartó etil-alkoholt.

Az előzőekben említett Kv- és Kir-családba tartozó K^+ -csatornák mellett a TASK-3-csatornák is igen jelentősnek tűnnek bizonyos rosszindulatú daganatok kialakulásában; ráadásul ez a hatás annyira jelentős, hogy a TASK-3-csatornákat kódoló gént immár hivatalosan is protoonkogénnek tartják. Mu és munkatársai (2003) számoltak be arról, hogy rosszindulatú emlődaganatok egy részében a TASK-3-csatornákat kódoló gén (*kcnk9*) jelentős, 3-10-szeres amplifikációja mutatható ki, amihez az esetek 44%-ában a fehérjetermék mintegy 5-100-szoros overexpressziója társult. Bár a *kcnk9* gén egy ismert onkogén, a *c-myc* közelében kódolódik, és így felmerült, hogy pusztán co-amplifikációról van szó, bebizonyosodott, hogy az esetek egy számottevő részében csak a *kcnk9* gén volt érintett. További értékes adat a TASK-3-csatornák potenciális onkogén hatására vonatkozóan, hogy a fehérjét overexpresszáló C8-sejteket (egy primær, egérből izolált, embrionális fibroblast eredetű sejtvonal) immunhiányos egerekbe fecskendezve két héten belül daganat alakult ki (Pei és munkatársai, 2003). Amennyiben TASK-3-csatornákat nem overexpresszáló vagy funkcióképtelen pontmutáns termelő sejteket alkalmaztak, úgy ritkábban tapasztalták a daganatok kialakulását, ráadásul azok minden esetben kisebbek és jobb indulatúak voltak, mint a funkcióképes fehérjét termelő C8-sejtek injektálása esetén.

További értékes, a TASK-csatornák tumorigenesisben betöltött szerepét megerősítő megfigyelés, miszerint a vad típusú (funkcionális) TASK-3-csatornák overexpressziója a tumor necrosis factor (TNF) által indukált apoptosist fibroblastokban a felére csökkentette, ugyanakkor egy funkcióképtelen mutáns csatorna overexpressziója ilyen hatást nem eredményezett (Pei és munkatársai, 2003).

Az, hogy a TASK-3-csatornák milyen mechanizmus révén rendelkeznek tumorigén hatással, jelenleg nem világos. Az egyik elképzelés szerint a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő K^+ -csatornák aktiválódása hiperpolarizálja a membránt, melynek hatására megnő a Ca-ionok elektrokémiai grádiense, így a háttér Ca^{2+} -csatornákon keresztül nagyobb mennyiségű Ca^{2+} áramlik be a sejtekbe, ami lényeges hatást gyakorol a sejtek proliferációjára és differenciálódására. Egy másik lehetséges magyarázat értelmében a sejtfelszíni membránon keresztül történő K^+ -kilépés csökkentené az intracelluláris K^+ -koncentrációt, ami közvetlenül befolyásolná egyes enzimek (pl. kaspázok) aktivitását. Nem elképzelhetetlen

azonban, hogy a TASK-3-csatornák fokozott jelenléte valamilyen módon növeli az őket overexpresszáló sejtek hypoxiával szembeni ellenállását. Sejttenyésztési körülmények között fenntartott neuroblastoma sejteken végzett kísérletek eredményei szerint a TASK-3-overexpresszió határozottan növelte a sejtek hypoxia- és serumdeprivációval szembeni toleranciáját, ami nyilvánvaló szelekciós előnyt jelenthet a daganatsejtek számára a solid daganatok központi, kevésbé vascularisált régiójában. Továbbra sem világos azonban, hogy a TASK-3-overexpresszió milyen mechanizmus révén biztosítja a sejtek túlélését az említett hypoxiás környezetben.

1.2. A K^+ -csatornák megoszlásának és funkciójának vizsgálati lehetőségei

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a különböző típusú K^+ -csatornák meghatározó jelentőségűek mind az ingerlékeny, mind a nem-ingerlékeny sejtek fiziológiai és patológiai működésében, amiből egyenesen következik, hogy az egyes sejtek által expresszált K^+ -csatornák és csatornaalegységek vizsgálata jelentős segítséget nyújthat a kérdéses struktúrák funkciójának, tüzelési sajátosságainak és viselkedésének megértéséhez. Nem véletlen, hogy napjainkra számos olyan módszer alkalmazása vált mindennapossá a kísérletes munkában, amik a K^+ -csatornák (vagy alegységek) jelenlétének, megoszlásának és funkcionális sajátosságainak megértését célozzák.

Ezen vizsgálati technikák első szintjét azon kísérletek jelentik, ahol az egyes alegységekre specifikus mRNS jelenlétének detektálása a cél, döntően PCR és RT-PCR módszerekkel. Bár ezen vizsgálatok jelentős segítséget nyújthatnak a vizsgálat tárgyát képező ioncsatorna-alegységek jelenlétének ellenőrzéséhez, a módszer komoly hátránya, hogy a specifikus mRNS jelenléte még nem jelenti szükségszerűen a megfelelő fehérjetermék jelenlétét is. Ezen túlmenően, az mRNS-szintű detektálás semmiféle információt nem hordoz a fehérjetermék megoszlására vonatkozóan, ami egy olyan bonyolult struktúra esetében, mint a neuron, nagyon megnehezíti a kísérletes lelet interpretálását. Nem mindegy ugyanis, hogy egy bizonyos alegység a sejttesten, a dendritfán vagy a praesynapticus membránban van jelen; az eltérő lokalizáció lényeges funkcionális következményekkel járhat. Megemlítenő továbbá, hogy a fehérjeszintű vizsgálatokhoz hasonlóan ezen technika alkalmazása esetében is megjelenhet nem-specifikus reakció.

Az egyes géntermékek fehérje szintű jelenlétének detektálására alkalmazható a Western-blot technika, aminek segítségével megállapítható, hogy egy adott szövetminta

tartalmazza-e a kérdéses csatornafehérjét. Mivel a technika információt nyújt a jelölt fehérje molekulatömegéről is, jelentős segítséget jelent az alkalmazott vagy alkalmazandó antitest specificitásának ellenőrzéséhez. A Western-blot technikával kapott immunpozitív csíkokon denzitometriás analízis is végezhető, így a módszer tájékoztatást nyújthat a célfehérje kérdéses mintában található mennyiségére vonatkozóan. Az eljárás komoly hátránya viszont, hogy az semmiféle információt nem szolgáltat a vizsgált fehérje lokalizációjára és megoszlására vonatkozóan; így olyan összetett struktúrákban, ahol az egyes sejtek fehérjeexpressziója jelentősen különbözhet (pl. a központi idegrendszer különböző típusú neuronjai), nagyon korlátozottan alkalmazható.

Az ioncsatornák és alegységek pontos szöveti lokalizációjának és megoszlásának meghatározásához az immunhisztokémiai és immuncitokémiai technikák a legalkalmasabbak. A módszer mind izolált neuronokon, mind szöveti preparátumokon („úszószelet-technika”) alkalmazható, így lehetőséget teremt különböző típusú neuronok expressziós mintázatának vizsgálatára. Amennyiben a technikai feltételek adottak, a vizsgálati módszer alkalmazásakor különleges előnyt jelent a konfokális mikroszkópia, és az ehhez társuló lehetőségek kihasználása (co-lokalizáció vizsgálata, a tanulmányozott neuron térbeli képén az expressziós mintázat regisztrálása, a neuropil és a neuronális festődés elkülönítése, stb.).

Természetesen a kérdéses ioncsatorna (vagy ioncsatorna-alegység) jelenlétének detektálása mRNS vagy fehérje szintjén igen értékes információ, ám a csatornák funkciójának végső tesztje a rajtuk folyó áram detektálása, pl. a patch-clamp technika alkalmazásával. A funkcionális vizsgálatok történhetnek izolált vagy túlélő szeletben elhelyezkedő neuronokon egyaránt. Tekintettel arra, hogy a neuronok a különböző K^+ -csatornákat igen változatos összetételben expresszálják, olyan gátlószerek alkalmazása szükséges, amik képesek az egyes alegységeket tartalmazó K^+ -csatornákon folyó áramok szelektív gátlására. Ideális esetben (a gátlószer 100%-os hatékonysága) az ilyen kísérletek során a kontroll körülmények között és a megfelelő gátlószer jelenlétében rögzített áram különbsége a vizsgált alegységet tartalmazó csatornán folyó áram nagyságával egyezik meg, és módot ad a csatorna kinetikájának és feszültségfüggésének tanulmányozására is. Általánosságban elmondható, hogy az egyes alegységek jelenlétének immunhisztokémiai és funkcionális módszerekkel történő együttes igazolása igen jól kiegészíti egymást, és annak egyértelmű és vitathatatlan bizonyítékát képezi. Ezen túlmenően az elektrofiziológiai mérések képalkotó technikákkal történő kombinációja azért is előnyös, mert lehetővé teszi a vizsgált neuron morfológiájának és típusának egyértelmű megítélését, ami akkor különösen fontos, ha a vizsgált központi

idegrendszeri struktúra sokféle és változatos megjelenésű idegsejtípust tartalmaz (pl. a nucleus cochlearis).

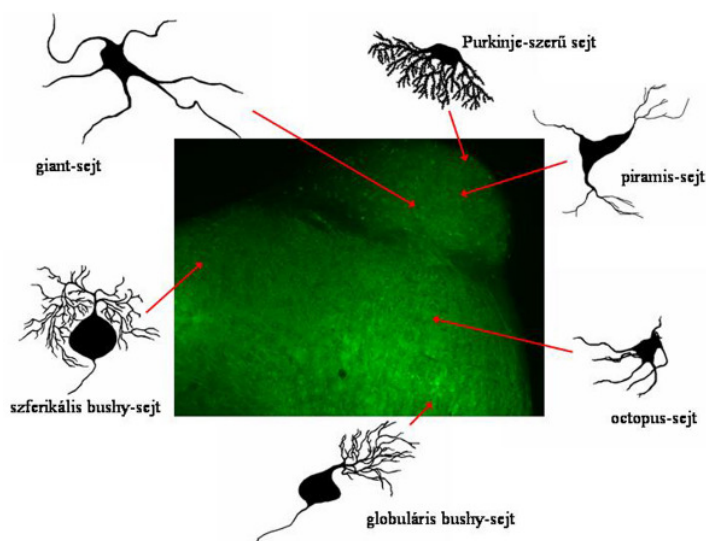
1.3. A nucleus cochlearis jelentősége, szerkezete és főbb sejtípusai

A hang érzékelésének első lépése, hogy a belsőfülben található Corti-féle szerv szőrsejtjei a hanghullámokat lokális elektromos jelekké alakítják. A keletkezett receptorpotenciál a ganglion spirale neuronok szőrsejteket beidegző perifériás nyúlványaiban AP-sorozatok kialakulását eredményezi, melyek ugyanezen neuronok VIII. agyidegben található centrális nyúlványai mentén az agytörzs nucleus cochlearisába jutnak. A hanginger kódolása során a kialakuló elektromos jelmintázat meghatározásában fontos az ingerületbe jövő szőrsejtek és primaer afferens neuronok száma, az ingerelt receptorok lokalizációja a Corti-szervben, a kialakult receptorpotenciál amplitúdója, az AP-sorozatok időtartama és frekvenciája, valamint a kétoldali belsőfül elektromos jelei közötti időkülönbség (késés) mértéke.

A hangérzékelés következő lépéseiben a primaer kisülési mintázat dekódolása történik, aminek fontos és korai lépése a hallóideg rostjain érkező AP-sorozatok „szétosztása” olyan neuronhálózatok között, amelyeket felépítésük alkalmassá tesz arra, hogy ugyanazon jelmintázatot az eredeti hanginger egyes paraméterei szerint (hangerősség, hangmagasság, hangszín, hangforrás lokalizációja) dekódolják. A rendelkezésre álló adatok szerint a nucleus cochlearis szerkezete alkalmassá teszi arra, hogy a benne megtalálható neuronok ilyen eltérő sajátosságú hálózatokként működjenek. A szenzoros rendszerekben természetes átkapcsoló funkción túlmenő jelfeldolgozás lehetőségét valószínűsíti az is, hogy a cochlearis mag (elsősorban annak dorsalis része) kifejezetten rendezett szerkezetet mutat.

Morfológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a hallóidegben érkező ganglion spirale rostok a cochlearis magba lépve elágaznak, és két köteggként haladnak tovább. A rostralisabb elhelyezkedésű rostok a nucleus cochlearis elülső ventralis részébe (aVCN) tartanak, míg a caudalisabb leszálló nyáláb a mag hátulsó ventralis területén (pVCN) keresztül a nucleus cochlearis dorsalisba (DCN) jut (*Moore, 1986*). A belépő afferens rostok a magban számos sejtfeleséggel szinaptizálnak, melyek egy része másodlagos érzőneuron, más része pedig interneuron (*Harrison és Irving, 1966; Osen, 1972; Kane, 1974; Ryugo és munkatársai, 1981; Webster és Trune, 1982; Rhode és munkatársai, 1983; Wouterlood és munkatársai, 1984; Wouterlood és Mugnaini, 1984*). A másodlagos érzősejtek a nucleus cochlearis projekciós

neuronjai, azaz axonjaik elhagyják a nucleus cochlearist, és a hallópálya magasabb rendű központjaihoz tartanak; a nucleus cochlearis interneuronjai pedig a magon belüli hálózatok kialakításában vesznek részt. Ismeretes, hogy a ganglion spirale I. típusú neuronjaiból érkező, mielinhüvelyes rostok elsősorban a nagyobb, projekciós neurontípusokon végződnek (pl. bushy-sejtek, piramis-neuronok), míg a II. típusú ganglionsejtekből érkező vékony, mielinhüvely nélküli axonok elsősorban a szemcsesejtekkel képeznek szinapszisokat (*Perkins és Morest, 1975; Ehret, 1979*). Megemlítendő továbbá, hogy a hallóideg-afferenseken túl a cochlearis mag somatosensoros, valamint leszálló beidegzést is kap (pl. az oliva superior területéről, *Moore, 1986*).



4. ábra

Patkány nucleus cochlearis sagittalis metszete

A struktúra tetején, „kontyszerűen” elhelyezkedő képlet a nucleus cochlearis dorsalis, alatta található a nucleus cochlearis ventralis. Az ábrán feltüntetettük a mag felépítésében különösen jelentős neurontípusok sémás képét, valamint jeleztük típusos lokalizációjukat is. (Az ábra Kv3.1-ellenes elsődleges és FITC-konjugált másodlagos antitestek alkalmazása után készült.)

Mint minden komplex sejtösszetétellel rendelkező központi idegrendszeri struktúránál, úgy a cochlearis mag esetében is számos megválaszolendő kérdés merül fel a szerkezetre vonatkozóan: Hányféle neurontípus különíthető el a magban? Milyen kapcsolatban állnak egymással az egyes neurontípusok? Milyen működési jellegzetességek kapcsolhatók az egyes sejtfeleségekhez? Az elmúlt évtizedekben nagyszámú vizsgálatot végeztek a nucleus cochlearis sejtösszetételének felderítésére, igen változatos technikákat alkalmazva (impregnációs eljárások, anterográd és retrográd töltési módszerek, stb.). Bár az intenzív vizsgálatok a fenti kérdések mindegyikére még nem adtak megnyugtató választ, a cochlearis

mag szerkezetéről kialakult egy olyan elképzelés, amelyik a legkülönbözőbb emlős fajok esetében is helytállóknak tűnik.

Általánosan elfogadott, hogy a nucleus cochlearisban található sejtfeleségek morfológiájukban, funkciójukban, szinaptikus kapcsolataikban és membránsajátságaikban egyaránt különböznek (4. ábra). A mag ventralis részén az ún. multipoláris sejtek régiója elsősorban a bushy, és a csillagsejteket tartalmazza; míg a másik jól elkülöníthető részben az octopus-sejtek helyezkednek el (*Wu és Oertel, 1984*). A dorsalis magrészen négy koncentrikus, egymástól viszonylag jól elkülöníthető réteg található (*Brawer és munkatársai, 1974*). A legfelszínebb területet a molekuláris réteg képezi, melyben főként a szemcsesejtek axonjai, és szórványosan a szemcsesejtek sejttestjei is találhatóak. Ezt követi a fusiform- vagy piramis-sejtek rétege, amely magában foglalja a piramis-, a szemcse-, a cartwheel- és a csillagsejteket. A harmadik rétegben a piramis-sejtek basalis dendritfái és néhány ún. vertikális-neuron található; itt végződnek továbbá a nervus acusticus leszálló rostjai is, kapcsolatot teremtve valamennyi itt található sejtfeleséggel. A cochlearis mag legmélyebb rétegében az óriás- és a multipoláris-sejtek sejttestjei figyelhetők meg. Az egyes sejtípusokra vonatkozó részletesebb adatokat a disszertáció 3.2 fejezetében ismertetjük.

1.4. A munka célkitűzései

Amint az a tudományos munkák során lenni szokott, a kísérletek kivitelezése és a vizsgálati adatok analízise során általában több kérdés merült fel, mint amennyit időközben sikerült megválaszolnunk. Gyakran kellett szembenéznünk olyan problémákkal, amikre a kísérletsorozatok kezdetén nem is gondoltunk, folyamatos igényét teremtve a kísérletes program és az alkalmazott technikák módosításának. Mivel mindenképpen szeretnénk volna azt a szokásos hibát elkerülni, hogy a célkitűzésekben felvetett gondolatokról messziről süssön hogy azok a disszertáció anyagának összeállítása *után* lettek megfogalmazva, a jelen ponton valóban csak a legalapvetőbb kérdéseket igyekeztünk összeszedni, amik folyamatos vezérfonalául szolgáltak a kísérletes munkának:

1. Meghatározható-e egy adott neuronfeleség viselkedése, és megjósolható-e az általa produkált tüzelési mintázat a sejtfelszíni membránjában expresszált Kv-alegységek minősége és összetétele alapján?

1.a. Milyen Kv-alegységek jelenléte igazolható a bushy-neuronokon?

1.b. A fenti kérdés megválaszolásához ki kellett dolgoznunk egy elfogadható sejtazonosítási algoritmust, valamint

1.c. Meg kellett kísérelnünk az immuncitokémiai adatok valamilyen szintű számszerűsítését.

2. Az úszószeletekben végzett, Kv-alegységek megoszlását célzó vizsgálatok során merült fel annak az igénye, hogy keressünk egy olyan technikát, ami alkalmas az agyszeletekben elhelyezkedő neuronok morfológiájának meghatározására. Ennek kapcsán az alábbi feladatokat kellett megoldanunk, és a következő kérdésekre kellett válaszolnunk:

2.a. Jelölhetők-e szelektíven a nucleus cochlearis projekciós neuronjai?

2.b. Valóban a cerebellumba projiciálnak-e a Purkinje-szerű sejtek?

2.c. Kidolgozható-e valamilyen általános érvényű szempontrendszer az egyes nucleus cochlearis neurontípusok könnyebb azonosítására?

2.d. Előfordulhat-e a neuronok téves azonosítása úgy, hogy a vizsgálatot végző esetleg nincs is tudatában a tévedésének?

3. A fenti kísérletek során felkérést kaptunk egy újonnan fejlesztett, TASK-3-ellenes monoklonális antitest tesztelésére („validálására”), amit összekötöttünk szöveti preparátumokban és sejttenyészetekben található melanoma malignum sejtek TASK-3-expressziójának vizsgálatával. A munka kezdetén az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

3.a. Specifikus-e és használható-e az antitest, az általa kapott jelölődési mintázat megfelel-e más, ugyancsak TASK-3-ellenes antitestekkel kapott eredményeknek?

3.b. Beágyazott preparátum esetében mik az optimális reakciókörülmények, milyen antigénfeltárás szükséges?

3.c. Megfelelnek-e egymásnak az immuncitokémiai és az immunhisztokémiai vizsgálatok során kapott eredmények?

3.d. Van-e különbség a melanoma malignum sejtek és a melanocyták TASK-3-expressziójában?

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az alábbiakban kerül sor a disszertáció kísérletes részének kivitelezése során alkalmazott technikák bemutatására. Tekintettel arra, hogy a munka során igen sok és sokféle metodikát használtunk, a könnyebb áttekinthetőség kedvéért nagyobb csoportokba rendezve kíséreljük meg azok ismertetését.

2.1. Az alkalmazott oldatok

Az alábbi táblázat mutatja a kísérletek egy részéhez használt oldatok összetételét. A legtöbb vegyszert a Sigma (St. Louis, MO, USA) biztosította, a kivételeket a megfelelő helyen jelöltük.

1. táblázat

A preparálás és az elektrofiziológiai kísérletek során alkalmazott oldatok

	aCSF-1	aCSF-2	aCSF-3	Pipetta-1	Pipetta-2	EF-1*	EF-2
pH	7,2	7,2	7,2	7,3	7,3		7,4
Ozmolaritás	330	330	330	300			
Összetevő	Koncentráció (mmol/l)						
NaCl	125		135				130
KCl	2,5	2,5	3	120	140		5
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25					
NaHCO ₃	26	26					
CaCl ₂	2	2	2			0,5	2
MgCl ₂	1	1	1	1	4	2,5	1
Mio-inozitol	3	3					
Aszkorbinsav	0,5	0,5					
Na-piruvát	2	2					
Glükóz	10	10	10				30
Szacharóz		250	45				
HEPES			10	40	10		15
EGTA				10	10		
Na ⁺ -GTP				0,5			
K ₂ -ATP				2			

aCSF-1: „normál” művi cerebrospinalis folyadék (artificial cerebrospinal fluid); aCSF-2: alacsony Na⁺-koncentrációjú aCSF, aCSF-3: HEPES-pufferelt aCSF.

Pipetta-1 és EF-1 (extracelluláris oldat): a túlélő agyszeleteken végzett kísérletek során alkalmazott belső (pipetta) és külső (extracelluláris) oldatok; Pipetta-2 és EF-2: a transzfektált HEK-sejteken végzett elektrofiziológiai mérések céljára alkalmazott oldatok.

*az oldat tartalmazott még 1 $\mu\text{mol/l}$ tetrodotoxint (Alomone Labs., Jeruzsálem, Izrael) és 10 $\mu\text{mol/l}$ ZD7288-at (Toocris Cookson, Bristol, UK) a Na^+ - és a h-áramok gátlása céljából.

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz az alábbi oldatok alkalmazására is sor került (a zárójelben feltüntetett számok a koncentrációt jelölik, mmol/l-ben):

Foszfát-puffer (PB): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (100), pH: 7,4.

Foszfát-pufferelt sóoldat (PBS): NaCl (100), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (125), pH: 7,4.

TRIS-puffer: NaCl (150), TRIS-base (8), Trizma-HCl (42), pH: 7,4.

A-puffer: Dithiothreitol (1), fenilmetil-szulfonil-fluorid (0,5), HEPES (10), MgCl_2 (1,5), KCl (10), EDTA (0,1), EGTA (0,1), pH: 7,4.

Lízispuffer: Trizma-HCl (20), EGTA (5), 4-(2-aminoetil)benzoeszulfonil-fluorid (1), leupeptin (0,02), pH: 7,4).

Gélelektroforézis-puffer: TRIS-base (270), glicin (500), Na^+ -dodecil-szulfát (130).

Az alábbiakban részletezzük a kísérletek során alkalmazott szövettenyésztő oldatokat. A médiumok neve után jeleztük, hogy azt mivel egészítettük ki, a zárójelben feltüntetett számok a koncentrációt (általában mmol/l; ha ettől eltér, azt jeleztük) vagy az adott komponens százalékos arányát jelölik (%; ezt külön jelöltük):

RPMI: L-glutamin (2), Foetalis borjúsérum (10%), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$), fungizon* (1,25 $\mu\text{g/ml}$), pH: 7,2.

DMEM-1: Foetalis borjúsérum (10%), Minimum essential medium (MEM; 1%), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$), fungizon* (1,25 $\mu\text{g/ml}$), pH: 7,2.

DMEM-2: Foetalis borjúsérum (10%), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$), pH: 7,2.

*: forrás: TEVA-Biogál, Debrecen.

2.2 Kísérleti állatok, a preparálás főbb lépései

2.2.1. A kísérleti állatok

A kísérletek során egyes nemű, Wistar patkányokat használtunk egy olyan protokoll alkalmazásával, amit a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyott és engedélyezett. A kísérleti állatok az Élettani Intézet állatházában természetes nappal-

sötétség ciklus mellett éltek. Az állatok táplálék- és ivóvízellátása *ad libitum* biztosítva volt. A kísérletek során mindig törekedtünk arra, hogy az állatoknak a lehető legkisebb diszkomfortot és fájdalmat okozzuk.

2.2.2. A neuronok enzimatisz izolálása

Hasonlóan a korábban leírt módszerhez (*Doughty és munkatársai, 1998; Rusznák és munkatársai, 2001*), az enzimatisz módszerrel izolált neuronok készítése céljából 4-11 napos patkányokat használtunk. A patkányok dekapitálása után az agyat fagyasztott, alacsony Na⁺-tartalmú művi cerebrospinalis folyadékba (aCSF) helyeztük. Az agy eltávolítása után a preparálás további lépései sztereomikroszkóp alatt történtek. Elsőként eltávolítottuk az agyhártyákat és az ereket, majd az agyat mediansagittális irányban kettévágtuk. A plexus chorioideust lefejtettük, a kisagyat félrehajtottuk, majd a nucleus cochlearist finom csipesz alkalmazásával eltávolítottuk az agytörzsről. A dorsalis és ventralis magrészt elkülönítése érdekében a cochlearis magot a ventro-dorsalis tengelyre merőlegesen, a felénél kettévágtuk.

A kipreparált magokat 0,03 mg/ml kollagenázt (Sigma, IA) és 0,12 mg/ml proteázt (Sigma, XIV) tartalmazó, 31 °C-os normál aCSF oldatba helyeztük. A magokat kb. 40 percen át inkubáltuk az enzimtartalmú oldatban, amit 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével folyamatosan buborékkoltattunk. Az enzimaktivitást 1 mg/ml koncentrációjú tripszin-inhibítort (Sigma, I-S) tartalmazó aCSF alkalmazásával állítottuk le (5 min). Az enzimatisz szeparálást követően a szövetdarabokat HEPES-pufferelt aCSF-be helyeztük, amelyben fokozatosan csökkenő hegyátmérőjű Pasteur-pipettákkal óvatos mechanikai szeparálásnak (tritálás) vetettük alá őket. Az izolált sejteket fedőlemezre helyeztük, amit 30-60 perc hosszúságú ülepedés követett.

2.2.3. Túlélő vékonyszelet-preparátum készítése

A túlélő neuronokat tartalmazó vékonyszelet-preparátum készítéséhez 7-12 napos patkányokat használtunk. A preparálás menete az agy eltávolításáig megegyezett az előző részben ismertetettel, majd a következő lépésben az agyhártyáktól és az erektől megtisztított agyat a mediansagittális vonalnak megfelelően kettévágtuk. Az így kapott agydarabokat a medialis (azaz a vágott) felszínükön cianoakrilát tartalmú pillanatragasztó segítségével egy teflontökhöz ragasztottuk, majd vibráló mikrotóm alkalmazásával (Campden Instruments, Loughborough, UK vagy Microm International GmbH, Walldorf, Németország) a nucleus

cochlearisból 150-200 μm vastag, sagittalis szeleteket készítettünk. Amennyiben a nucleus cochlearis ventralisban elhelyezkedő bushy-neuronokat tartalmazó szeletek készítése volt a cél, a metszést úgy végeztük, hogy annak mélysége ne haladja meg a 600 μm -t. Ez a feltétel biztosította, hogy ezekben az esetekben a nucleus cochlearis dorsalis nem kerülhetett a metszési síkokba. Az agyszeleteket 37 °C-os, 95% O₂ és 5% CO₂ gázkeverékkel folyamatosan buborékolgatott normál aCSF oldatban inkubáltuk (1 óra). Az inkubációs periódus végén a szeleteket a káddal együtt eltávolítottuk a vízfürdőből, és hagytuk őket szobahőmérsékletűre hűlni.

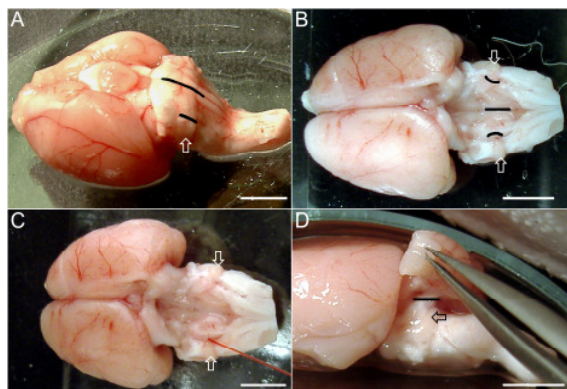
2.2.4. A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak retrográd jelölése

A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak morfológiai vizsgálatát célzó kísérletekben azok sejttestjeit a projekciójuknak megfelelő helyen alkalmazott sértésbe juttatott, dextránnal konjugált tetrametilrodaminnal (molekulatömeg = 3000; Molecular Probes Inc., Oregon, USA) töltöttük fel, kihasználva, hogy a jelölőanyagot a neuronok axonális transzport révén mind antero-, mind retrográd irányba szállítják. A festék gerjesztési hullámhossza (λ_{ex}) 555 nm, az emissziós hullámhossza (λ_{em}) pedig 580 nm volt.

A kísérletekhez 25-30 napos patkányokat használtunk. A kísérletek első lépései (az agy eltávolítása a koponyából, azok megtisztítása és az ezen lépésekhez alkalmazott oldatok összetétele megfelel az előzőekben leírtaknak). A vizsgálatok során mindösszesen 27 állatot használtunk fel a retrográd töltéses vizsgálatok céljára, és ebből 24 alkalommal sikerült értékelhető preparátumot készíteni. A sikertelen esetekben vagy egyáltalán nem tapasztaltunk jelölődést, vagy az erős háttérfluoreszcencia miatt az egyedi sejtek morfológiája megítélhetetlen volt. Úgy véljük, hogy a sikertelen próbálkozások oka legnagyobb valószínűség szerint a sebzések nem megfelelő lokalizációja és/vagy a kérdéses területbe jutó rodamin koncentrációjának nem megfelelő mértéke és/vagy a festék kifakulása volt.

Az agytörzsi metszéseket alacsony Na⁺-koncentrációjú aCSF-et tartalmazó, Sylgarddal bélelt Petri-csészében ejtettük, a beavatkozás során az oldatot folyamatosan buborékolgtattuk. A jelölőanyag alkalmazása előtt a vágott vagy sértett felszín szűrőpapírral leitatottuk, majd elvégeztük a rodamin kivánt helyre juttatását. Ennek során vagy néhány rodamin-kristályt helyeztünk a laesiokba, vagy koncentrált rodaminoldatot (1 mg rodamin/100 μl PB) fecskendeztünk az agytörzs megfelelő területére. A festék kifakulását elkerülendő, valamennyi felsorolt lépést a lehető legnagyobb sötétben végeztük.

Mind a laesio pontos helyét, mind a rodamin alkalmazásának módját az határozta meg, hogy mely projekciós neuron jelölését kívántuk elérni. Az 5. ábra a laesiok alkalmazásának lehetséges helyeit mutatja; 12 állat esetében a beavatkozást szimmetrikusan, bilaterálisan végeztük.



5. ábra

A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak retrográd jelölése során alkalmazott bemetszések pozíciói

A nyilak a nucleus cochlearis, a vonalak pedig a bemetszések helyeit jelölik. **A:** a rövidebb vonal a bushy-sejtek festődését célzó metszés helyét jelöli. A közepén lévő bemetszés alkalmazása esetén az összes átkereszteződő axont jelöltük. **B:** a szélén látható, rövidebb metszések a stria acustica dorsalis helyét mutatják, amelynél ejtett vágással a piramis- és óriássejtek jelölését értük el. A közepén lévő vonal ugyanazt a helyet jelöli, mint amit az **A** ábrán. **C:** a túl a stria acustica intermediába lett vezetve, aminek révén az octopus-sejtek jelölését végezhetjük el (a kisagy eltávolítása után). **D:** a Purkinje-szerű sejtek jelölésére szolgáló metszések. Kalibráció: 1 cm.

A jelen vizsgálatokban nem törekedtünk a bushy-neuronok két típusának, azaz a globuláris és a szferikális sejtek elkülönítésére. A bushy-sejtek jelölése céljából a corpus trapezoideum területén, a nucleus cochlearis ventralis határán ejtettük a metszést, a maghoz olyan közel, amennyire csak lehetséges volt (5A ábra; n = 4). Tapasztalataink szerint a célnak egy kb. 3-5 mm hosszú és 1,5-2,5 mm mély incisio felelt meg a legjobban.

Amennyiben a nucleus cochlearis dorsalis óriás- és piramis-sejtjei voltak a jelölés célpontjai (5B ábra, n = 5), úgy elsőként eltávolítottuk a kisagyat, majd a stria acustica dorsalis területén ejtettük a sebzést. Az incisióra a parasagittalis síkban, a nucleus cochlearis dorsalistól mintegy 2 mm-rel medialisan került sor. Mind a bemetszés hossza, mind annak mélysége 1 mm volt; ha a laesio ennél mélyebbre sikerült vagy közelebb helyezkedett el a nucleus cochlearishoz, akkor a stria acustica intermedia sérülése miatt az abban projiciáló octopus-neuronok is jelölődtek.

Az octopus-sejtek izolált jelölése az axonjaikat tartalmazó stria acustica intermedia izolált sértését követelte meg, aminek kivitelezése az óriás- és a piramis-sejtek axonjainak

sértése nélkül igen nehéz feladatnak bizonyult. A probléma megoldása végett az octopus-sejtek célzott jelölése esetében koncentrált rodaminoldatot injektáltunk a stria acustica intermediába (5C ábra; n = 5). Az injektálás helye a nucleus cochlearis dorsalis medialis szélétől 0,5 mm-rel medialisan volt. Az injektálás során a tűt az agytörzs felszínére pontosan merőlegesen tartottuk, és a festéket 1,6-1,8 mm mélyre juttattuk. A beavatkozás során a lehető legkisebb nyomással próbáltuk meg a rodamin a kérdéses területbe injektálni, mivel nagyobb nyomás alkalmazása a jelölőanyag környező képletekbe való diffúzióját okozta, az óriás- és a piramis-sejtek jelölődését (is) okozva.

A Purkinje-szerű sejtek jelölése során a cerebellum eltávolítása nélkül átmetsztük a pedunculus cerebellaris superiort, mediust és inferiort, majd a rodamin a vágott felszínekre juttattuk (5D ábra; n = 5).

Néhány esetben az összes olyan neuron jelölését szerettük volna elvégezni, ami ellenoldali struktúrákba projiciál. Ennek során az agytörzs ventralis felszínén, a corpus trapezoideum magasságában, pontosan a középvonalban ejtettünk egy 5-8 mm mély metszést (5A és 5B ábra; n = 5).

2.2.5 A retrográd jelölésen átesett nucleus cochlearisokból történő szeletkészítés

A megfelelő laesio elkészítése és a rodamin alkalmazása után az agyat normál aCSF oldatba helyeztük, és azt állandó buborékolatás mellett, 8-12 órán át, teljes sötétségben inkubáltuk. Az inkubációs periódus végeztével az agyat 4%-os formalinba helyeztük, és egy éjszakán át (12 óra), 4 °C-on fixáltuk. A fixálás végén a preparátumot PB-ben mostuk (3×10 min), majd vibratóm segítségével 50-60 µm vastag metszeteket készítettünk a nucleus cochlearisból. A szeleteket először PB-ben (10 min), majd TBS-ben mostuk (3×10 min), végül tárgylemezre helyezésük után DAPI-t (4',6-diamidino-2-phenylindole; $\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) tartalmazó oldat alkalmazásával fedtük azokat.

2.2.6. A retrográd jelölésen átesett sejtek kvantitatív analízise

Egy sejt csak akkor lett a kvantitatív analízis céljára felhasználva, ha eleget tett három feltételnek: egyértelműen és a legkisebb bizonytalanság nélkül meghatározható volt a sejt típusa, a sejttest és a processzusok proximalis régiója sérülésektől mentes volt, és a neuron

rodaminos jelölése kellő intenzitású volt. A PLC-k esetében végzett kvantitatív értékelés egy része azok calbindin-specifikus immunjelölését követően történt. A sejtek nyúlványainak a számát és a sejtestet átmérőjét vagy az elemi konfokális képek összerakásával készített szummált felvételeken, vagy az egyedi optikai metszeteken határoztuk meg. Az olyan sejtek esetében, amik elnyújtott, háromszögletű vagy polygonalis somával rendelkeztek, megkerestük a sejtestet legnagyobb átmérőjét, és ezt mértük meg. A disszertációban közölt adatokat úgy kaptuk, hogy az azonos típusba sorolható neuronokról származó értékeket összesítettük, majd meghatároztuk ezen értékhalmozok átlagát és szórását (S.D.).

2.3. Sejttenyészetek fenntartása

2.3.1. Melanoma malignum, C2C12- és HEK293-sejtek tenyésztése

A disszertáció harmadik részében részletezett kísérletekhez három, korábban már részletesen jellemzett (*Tímár és munkatársai, 1999*) melanoma malignum sejtvonalat használtunk. A WM35 jelű sejtvonal primaer, bőr eredetű, a tumornövekedés radialis fázisát mutató melanoma malignumból származott, a HT199 és a HT168-M1 jelű sejtvonalak pedig metastaticus melanomából lettek izolálva. A HT168-M1 sejtek az A2058 jelű humán melanoma sejtvonalból származnak. A sejtvonal létrehozása során először az A2058 sejteket *in vivo* xenograftként alkalmazták, így létrehozva a HT168 sejtvonalat, majd ezeket a sejteket immunhiányos egerek lépébe ültetve egy igen erős metastatisáló képességet mutató sejtvonalat, a HT168-M1-et különítették el.

A kísérletek során alkalmazott melanoma sejteket RPMI 1640, a C2C12- (egér vázizomból izolált immortalizált sejtek) és a HEK293-sejteket (humán embrionális veséből izolált sejtek) pedig DMEM tápoldatban tartottuk fenn. A sejtvonalak monolayer formájában, T75 jelzésű tenyésztőtartályokban voltak fenntartva, 5%-os CO₂ atmoszférában, 37 °C-on. A tápoldatok cseréjére minden második napon került sor. A sejteket 80-100%-os (a HEK293-sejtek esetében 70-80%-os) konfluencia elérése után, kb. 6-7 naponta passzáltuk.

2.4. Immuncitokémia, immunhisztokémia

2.4.1. A kísérletek során alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek jellemzőinek összefoglalása

A 2. és a 3. táblázat a disszertációban alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek legfontosabb jellemzőit tartalmazza.

2. táblázat

A disszertációban alkalmazott elsődleges antitestek

Antitest	Igazolt specificitás	Hígítás	Milyen fajból	Gyártó	Epitóp
Anti-Kv1.1	Patkány, egér	1:50	Nyúl	Alomone	416-495, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv1.2	Patkány, egér	1:50	Nyúl	Alomone	417-499, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv1.3	Patkány, egér, humán	1:50	Nyúl	Alomone	471-523, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv1.4	Patkány, egér	1:50	Nyúl	Alomone	589-655, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv1.6	Patkány, egér	1:50	Nyúl	Alomone	463-530, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv3.1b	Patkány, egér, majom, kutya	1:50	Nyúl	Alomone	567-585, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv3.2	Patkány	1:50	Nyúl	Alomone	184-204, intracellulárisan, N-terminushoz közel
Anti-Kv3.4	Patkány	1:50	Nyúl	Alomone	177-195, intracellulárisan, N-terminushoz közel
Anti-Kv4.2	Patkány	1:50	Nyúl	Alomone	454-469, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv4.3	Patkány	1:50	Nyúl	Alomone	451-468, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-Kv4.3	Patkány	1:200	Nyúl	Sigma	451-467, N-terminushoz közel
Anti-TASK-1	Patkány	1:50	Nyúl	Alomone	252-269, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-calbindin	Egér, patkány, humán	1:500	Kecske	Santa Cruz	C-terminushoz közel
Anti -TASK-3	Humán	1:100	Kecske	Santa Cruz	Intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-TASK-3	Humán	1:200	Egér	Sigma	360-374, intracellulárisan, C-terminushoz közel
Anti-TASK-3	Patkány, humán	1:800	Nyúl	Alomone	57-73, extracellulárisan
Anti-HMB45	Humán	1:50	Egér	DAKO	A melanosomákat ismeri fel
Anti-S-100	Humán	1:500	Nyúl	Lab Vision	Nem specifikált
Anti-fibroblast	Humán	1:200	Egér	DAKO	A prolil-hidroxiláz enzim α -alegységén

A **vastagon szedett** antitestek monoklonálisak, a többi poliklonális.

Alomone: Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael

Santa Cruz: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornia, USA

DAKO: Glostrup, Dánia

Lab Vision: Lab Vision Corporation, Fremont, Kalifornia; USA

3. táblázat

A disszertációban alkalmazott másodlagos antitestek

Antitest	Hígítás	Milyen fajból	Gyártó
FITC-konjugált IgG (nyúl)	1:200	Kecske	Vector
Texas red-konjugált IgG (nyúl)	1:200	Kecske	Vector
FITC-konjugált IgG (kecske)	1:200	Nyúl	Vector
Texas red-konjugált IgG (kecske)	1:200	Nyúl	Vector
FITC-konjugált IgG (egér)	1:200	Ló	Vector
Texas red-konjugált IgG (egér)	1:200	Ló	Vector
Biotin-konjugált IgG (kecske)	1:500	Nyúl	DAKO

Zárójelben tüntettük fel, hogy az adott antitest mely faj immunglobulinjai ellen lett termeltetve.

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

Vector: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornia, USA

2.4.2. Fluoreszcens immuncitokémia

A frissen izolált sejteken és tenyészetben fenntartott melanoma sejteken végzett immuncitokémiai kísérletek első lépéseként a sejteket PBS-sel mostuk (3×), 4%-os formalinban fixáltuk (szobahőmérséklet, 15 min), majd 100 mmol/l glicint tartalmazó PBS-sel ismét mostuk (3×5 min). A sejtek permeabilizálása céljából 0,1% Triton X-100 tartalmú PBS-t használtunk (10 min), amit újabb mosás követett (PBS, 3×5 min). Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 1% borjú serumalbumint (Bovine serum albumin, BSA) tartalmazó PBS-sel végeztük (30 min), amit az elsődleges antitestekkel történő inkubáció követett (enzimatikusan izolált sejtek esetében 1 órán át, szobahőn; tenyésztett sejtek esetében pedig egy éjszakán át, 4 °C-on). Az elsődleges antitest alkalmazása után a sejteket mostuk (PBS, 3×5 min), majd a FITC-cel ($\lambda_{ex} = 495$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm) vagy Texas vörössel ($\lambda_{ex} = 595$ nm, $\lambda_{em} = 615$ nm) konjugált másodlagos antitestek alkalmazására került sor (1 óra, szobahő), amit újabb mosás követett (PBS, 3×5 min). Az „éles” reakcióval párhuzamosan végzett negatív kontroll kísérletek során vagy a primer antitesteket előinkubáltuk azok specifikus immunizáló peptidjeivel, vagy (ha ez nem állt rendelkezésre) a reakciót az elsődleges antitest kihagyásával végeztük. A kísérletek során az elsődleges antitesteket blokkoló oldatban (10 % kecske- vagy nyúlserum és 0,1% Triton X-100 tartalmú TBS), a másodlagos antitesteket pedig PBS-ben hígítottuk. Az eljárás végén a sejtmagok jelölése és a minták lefedése céljából DAPI-t tartalmazó fedőoldatot használtunk.

Az úszószeleten történő immunhisztokémiai kísérletekhez 28-32 napos patkányokat alkalmaztunk. A jelölés első lépésében az agytörzset 4%-os formalinban fixáltuk (4 óra,

4 °C), majd a szövetarabokat PB-ben mostuk (3×10 min), végül a nucleus cochlearisból 50-60 µm vastag szeleteket készítettünk. A szeleteket először PB-ben (10 perc), majd TBS-ben (3×10 min) mostuk. A szövetminták blokkolása után (1 óra, szobahőmérséklet) az elsődleges antitesteket egy éjszakán át, szobahőn vagy 4 °C-on alkalmaztuk, majd a következő napon mosás (TBS, 3×10 min), majd a másodlagos antitestekkel történő inkubáció következett (3 óra, szobahő), amit újabb mosás (TBS, 3×10 min), majd a szeletek fedőlemezre helyezése és fedése (DAPI-t tartalmazó Vectashield fedő médium) követett. Az elsődleges és a másodlagos antitesteket 1% kecske- vagy nyúlszérum és 0,1% Triton X-100 tartalmú oldatban hígítottuk.

2.4.3. Nem-fluoreszcens immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai kísérletek metodikája jórészt megegyezett azzal, amit korábbi kísérleteinkben már alkalmaztunk (*Kovács és munkatársai, 2005*). A vizsgálatokat a DE OEC Tudományos Bizottságának Regionális és Intézeti Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyásával és engedélyével végeztük.

Az immunhisztokémiai kísérleteket 4 µm vastag, formalinban fixált, paraffinba ágyazott, melanoma malignumot tartalmazó szövetmintákon hajtottuk végre, amiket a betegekből posztoperatív hisztopatológiai diagnózis céljából távolítottak el. Első lépésként antigénfeltárást végeztünk, aminek során a szöveti metszeteket vagy 8 mmol/l Tris-pufferben (pH = 8,4) melegítettük (mikrohullámú sütő, 15 min, 750 W), vagy 0,1 mol/l citrát-pufferben (pH = 6,0), kuktában főztük (2 min). Az endogén peroxidáz aktivitás gátlását 3%-os hidrogén-peroxidot tartalmazó metanolban történő inkubációval végeztük (10 min), majd az aspecifikus kötőhelyek gátlása következett (5 min, szobahő), amihez „Protein Block Serum Free” reagenst alkalmaztunk (DAKO). A mintákat egy éjszakán át inkubáltuk valamelyik TASK-3-specifikus primer antitesttel, majd mosás (PBS, 3×5 min) következett. Nyúlban vagy egérben termeltetett elsődleges antitest alkalmazása esetén a szövetmintákat az EnVision rendszerrel (DAKO) inkubáltuk, aminek végén az immunreakciót VIP SK4600 reagens alkalmazásával tettük láthatóvá. Kecskében termeltetett elsődleges antitesttel történt inkubációt követően a metszeteket nyúlban termeltetett, biotinilált, kecske-IgG-t felismerő másodlagos antitestekkel kezeltük (30 perc), mostuk (PBS, 3×5 min), majd tormaperoxidázzal konjugált streptavidint alkalmaztunk (30 perc). Az immunreakciók vizualizálása az utóbbi esetben is a VIP-rendszer alkalmazásával történt. Az immunfestés végén enyhe háttérfestést végeztünk (metilzöld).

Hasonlóan az immuncitokémiai kísérletekhez, a szöveti metszeteken történő vizsgálatok során is rendszeresen végeztünk kontroll kísérleteket. A poliklonális antitestek alkalmazása esetében ez az adott antitestre specifikus immunizáló fehérjével való előinkubáció formájában, a monoklonális antitest esetében pedig az elsődleges antitest elhagyásával történt. A kontroll vizsgálatokat valamelyik antigénfeltárási technika alkalmazása után végeztük.

2.5. Mikroszkópia

A disszertációban részletezett kísérletek eredményeinek mikroszkópiás vizsgálatához vagy egy Nikon Eclipse 600W típusú konvencionális, fluoreszcens mikroszkópiára is alkalmas, 4×, 10×, 20×, 40× és 60× objektívval felszerelt (az első négy egyszerű „levegős”, az utolsó olajimmerziós) mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán), vagy egy Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal végeztük (Oberkochen, Németország). Konfokális mikroszkópia esetén a disszertációban bemutatott képeket vagy 40× olajimmerziós vagy 60× vízimmerziós objektívvel készítettük.

Egyszerű fluoreszcens vagy fénymikroszkópia esetében a felvételeket a mikroszkóphoz csatolt „RT colour CCD kamera” és a Spot v3.5 program segítségével nyertük. A kalibrálást minden objektíven külön, Bürker-kamra segítségével végeztük. A konfokális mikroszkópia esetén vagy egyetlen (általában 0,5-1,0 μm rétegvastagságú) képet vettünk fel, vagy a vizsgált terület teljes vastagságán végighaladó, egyenként 0,6-1,0 μm vastag rétegfelvétel-sorozatot („Z-stack” képek) készítettünk. Az ún. „szummált” képek (az egyedi rétegfelvételek összerakása révén létrehozott, a bemutatott struktúra térbeli képét bemutató, és szükség szerint elforgatható kép vagy mozgókép) előállításához a Zeiss LSM Image Browser programot alkalmaztuk. Ez a módszer arra is lehetőséget adott, hogy egy adott sejtet tetszőleges irányban és mértékben elforgatva is előállítsuk annak vetületét, ami azt a helyzetet utánozta, mintha a vizsgált neuront különböző síkokban végzett szeletek készítése után vizsgáltuk volna. A disszertációban bemutatott ábrákat az Adobe Photoshop 7.0 program felhasználásával készítettük.

A disszertáció DVD-mellékletén található video file-okat az eredeti konfokális Z-stack képek felhasználásával, ugyancsak a Zeiss Image Browser (v3.5.0.376) segítségével állítottuk elő. Ezen folyamat első lépéseként a program a kijelölt rétegfelvétel-sorozatból meghatározta az ábrázolt terület 64 különböző vetületét („panoráma” kép; az egyes vetületek közötti különbség 6° volt), majd az így nyert képsorozatot „avi” file-ként mentettük el, 12 kép/s

időbeli felbontással. Az így kapott képsorozatot lejátszva, mozgóképként járható körül a vizsgált szelet, sejt vagy képlet. Bár a folyamat során a tér mindhárom irányának megfelelő forgatást meg lehetett valósítani, a bemutatott esetekben csak az X- és Y-tengelyeket alkalmaztuk, a Z-tengely körül történő forgatásra sohasem került sor.

A létrehozott és megtekintésre ajánlott video file-okra való hivatkozást más betűtípussal írtuk(pl. **Video_01**), és azok a disszertáció DVD-mellékleten található PDF változatából a megfelelő hivatkozásokra kattintva közvetlenül is elindíthatók.

2.6. Molekuláris biológiai módszerek

2.6.1. C2C12-sejtek tranziens transzfekciója

Több sejtvonalat is ellenőriztünk annak érdekében, hogy megtaláljuk a humán TASK-3-csatornák tranziens transzfekciójával történő kísérletek ideális alanyát. Úgy tapasztaltuk, hogy a sejtenyészetben fenntartott C2C12-sejtek minimális intenzitású, gyakorlatilag negatív reakciót adtak a birtokunkban lévő TASK-3-specifikus ellenanyagokkal való reakciók után, így a transzfekciós kísérletekhez ezen sejtek bizonyultak a legmegfelelőbbnek. A C2C12 sejteket egy humán TASK-3-csatornát kódoló plazmiddal transzfektáltuk (pcDNA3 hTASK3/7; a plazmidot kollaborációs partnereinktől, Prof. Peter R. Stanfieldtől és Dr. Ian Ashmole-től kaptuk). A TASK-3-specifikus cDNS-t a pcDNA3-vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) EcoRV-helyére kódoltuk, majd a tranziens transzfekciót fedőlemezekre szélesztett sejteken végeztük, azokat Superfect transzfekciós reagenssel (Qiagen, Hilden, Németország) kezelve. Fedőlemezenként 2 µg plazmid DNS-t alkalmaztunk, majd a sejteket 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, 37 °C-on tenyésztettük, 48 órán át, aminek során a sikeresen transzfektált sejtek a bevitt vektor által kódolt fehérjét, azaz a humán TASK-3-csatornát szintetizálták. A folyamat végén a sejteket a korábbiakban leírtakkal egyező módon fixáltuk, majd elvégeztük a szükséges immuncitokémiai vizsgálatokat.

2.6.2. Sejtmagok izolálása melanoma malignum sejtekből

A tenyésztett melanoma malignum sejtek sejtmagjainak szeparálását egy már ismert eljárás (*Diaz-Guerra és munkatársai, 1996; Roberts és munkatársai, 1998*) módosításával végeztük. A sejteket vagy mechanikusan szedtük fel, vagy tripszinkezelésnek vetettük őket alá. Az előző esetben a sejteket jéghideg PBS-ben óvatosan felkapartuk, lecentrifugáltuk

(1000 × g, 10 min, 4 °C), majd az összegyűjtött felülúszót A-pufferben reszuszpendáltuk. A másik eljárás alkalmazása során a sejteket 1,5 mg/ml tripszinnel kezeltük, majd az így felvált sejtekhez 10 % FBS-t tartalmazó RPMI szövettenyésztő médiumot adtunk. A sejteket lecentrifugáltuk (1000 × g, 5 min), jéghideg PBS-ben mostuk (2×), majd A-pufferben reszuszpendáltuk. Mindkét technika alkalmazása teljesen azonos eredményre vezetett.

A sejtek felvételét követően azokat A-pufferben 20 percen át duzzadni hagytuk, majd Nonidet P-40-et adtunk a sejteket tartalmazó A-pufferhez (végső koncentráció = 0,5%). A sejteket Dounce homogenizátorral homogenizáltuk, a lízis előrehaladottságát 10 µl homogenizátum trypankékekkel történő festésével ellenőriztük. A sejtek lízisét akkor tekintettük megfelelőnek, ha azok legalább 90%-a homogenizálódott. A lizátumból centrifugálás révén (770 × g, 10 min, 4 °C) nyertük ki a nyers nuclearis frakciót. Ezt követően a pelletet 2,2 mol/l szacharózt tartalmazó A-pufferben reszuszpendáltuk, majd újra lecentrifugáltuk (40 000 × g, 90 min, 4 °C). A pelletet kétszer mostuk, 0,25 mol/l szacharózt tartalmazó A-pufferben feloldottuk, végül szonikáltuk. A sejtmagfrakció fehérjekoncentrációját BCA-kittel (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. Az így készített mintákat azok felhasználásáig -70 °C-on tároltuk.

2.6.3. Western-blot

A Western-blot kísérletekhez mind az előzőekben vázolt technikával készített nuclearis frakciót, mind teljes sejtlizátumot felhasználtunk. A teljes sejtlizátum készítése során a sejteket mostuk (PBS, 3×), majd 100 µl jéghideg lízispufferben mechanikusan felvettük őket. A szuszpendált sejteket jéghideg környezetben szonikáltuk, majd BCA-kit segítségével meghatároztuk fehérjetartalmukat.

A Western-blot kísérletek egy korábban leírt módszerhez (Kovács és munkatársai, 2005) nagyban hasonlóan történtek. A teljessejt- vagy nuclearis frakciókat Na⁺-dodecilszulfát-poliakrilamid- (SDS-PAGE) gélelektroforézis-pufferrel kevertük és 10 percig főztük. Az így előkészített mintákat 7,5%-os akrilamid-gélen futtattuk; a teljes sejtlizátumból 160 µg-ot, a sejtmagfrakcióból 50 µg-ot vittünk fel az egyes oszlopokra. Az elektroforézis végén a mintákat nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) vittük át, a membránhoz kötődött fehérjéket Ponceau S festékkel tettük láthatóvá, majd 5% tejport és 0,05% Tween20-at tartalmazó PBS alkalmazásával (PBST) blokkoltuk (30 perc). Az anti-TASK-3-antitestet (Alomone, 1:800) egy éjszakán át hagytuk a membránon (4 °C). A következő napon a membránt PBST-vel mostuk, majd tormaperoxidázzal kapcsolt, kecskében termeltetett, nyúl

IgG-ellenes másodlagos antitesttel (Bio-Rad; 1:1000) inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. A negatív kontroll kísérletek során az elsődleges antitestet a rá specifikus blokkoló peptiddel inkubáltuk; az eljárás az immunreaktív csíkok kialakulását teljes mértékben megakadályozta. Az eredmények láthatóvá tételéhez egy kemilumineszcenciás Western-blot detektáló rendszert (Pierce) alkalmaztunk. Az előhívást és az eredmények dokumentálását Fujifilm Labs-3000 sötétkamrával (Tokió, Japán) végeztük.

2.7. Elektrofiziológiai mérések túlélő vékonyszelet-preparátumon

Az izolált agyszeleteken végzett elektrofiziológiai mérések egy Zeiss Axioskop FS típusú, differenciál-interferencia-optikával (Nomarski-optika) és epifluoreszcens feltétellel ellátott mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett, kb. 200 μ l űrtartalmú mérőkádban történtek. A mérések során a szeleteket egy 8-csatornás perisztaltikus pumpa (Gilson, Villiers Le Bel, Franciaország) segítségével folyamatosan perfundáltuk (1 ml/min; oxigenált aCSF-oldat). A mérések során a feszültségvezérelt Na^+ - és h^+ -áramok aktiválódását az extracelluláris oldatban alkalmazott TTX és ZD7288 akadályozta meg. A Ca^{2+} -áramok amplitúdóját (és így a zavaró hatásukat) az extracelluláris oldat Ca^{2+} -koncentrációjának csökkentésével (0,5 mmol/l) és Mg^{2+} -koncentrációjának növelésével (2,5 mmol/l) biztosítottuk.

A mérések során alkalmazott mikroelektrodák vékony falú boroszilikát kapillárisok felhasználásával készültek (Clark Elektromedical Instruments, Reading, UK). A mikroelektrodákat a „Pipetta-1” jelű oldattal feltöltve azok ellenállása 2-3 M Ω volt. A mikroelektrodát vizuális ellenőrzés mellett közelítettük a sejtekhez, a nagy ellenállású kapcsolat (seal) kialakítását a membrán előzetes tisztítása nélkül végeztük. A sejtek azonosítását egy Zeiss Achroplan vízimmerziós objektív (63 \times) segítségével, és a sejtek Lucifer Yellow-val (dipotassium salt, 0,5-2 mg/ml) történő feltöltésével végeztük.

A soros ellenállás értéke általában 2-7 M Ω volt, amit 40-80%-ban kompenzáltunk. Tekintettel a soros ellenállás jelentős hatására a kialakuló áramkomponens nagyságára (*Santos-Sacchi és munkatársai, 1997*), annak nagyságát mindvégig stabilan és a lehető legalacsonyabb értéken igyekeztünk tartani a kísérletek során, aminek érdekében szükség esetén finom szivást alkalmaztunk, esetleg óvatosan megváltoztattuk a mikroelektroda hegyének helyzetét.

A méréseket DigiData 1200 jelátalakítóhoz kapcsolt Axopatch 200A típusú patch-clamp erősítő (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) alkalmazásával végeztük. Az adatgyűjtés és -analízis céljára a pClamp 6.0 program szolgált. A teljes-sejtes kapacitást

elektronikusan kompenzáltuk, a „leak”-áram levonásához pedig -60 mV-os tartópotenciálról alkalmazott, 5 mV amplitúdójú hiperpolarizáló stimulusokat alkalmaztunk. Az ezen stimulus által kiváltott áramokat lineárisan extrapoláltuk, és levontuk a teljes membránáram nagyságából.

Kísérleteink során két, alegység-specifikusnak ismert gátlószert alkalmaztunk. A phrixotoxin-2 (PaTx2; Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) a tarantulák közé tartozó *Phrixotrichus auratus* által termelt, 31 aminosavból álló peptid, ami a Kv4.2- és/vagy a Kv4.3-alegységeket tartalmazó K⁺-csatornák specifikus gátlószere (*Diocot és munkatársai, 1999*). A disszertációban alkalmazott másik specifikus toxin a BDS-I volt (Blood Depressing Substance; Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael). Ez a molekula az *Anemonia sulcata* nevű tengeri csalánozó faj mérgeiből izolálható, 43 aminosavból álló peptid, ami a Kv3.4-alegységeket tartalmazó K⁺-csatornák specifikus gátlására alkalmas (*Diocot és munkatársai, 1998*).

2.8. Egyéb technikák

Az „egyéb” technikák közé azokat a módszereket soroltuk, amiket a disszertációban bemutatott kísérletek során alkalmaztunk ugyan, de azokat a DE OEC Élettani Intézetének más munkacsoportjaihoz tartozó kollegáink végezték, így nem tartottuk volna helyesnek azt az impressziót kelteni, hogy ezek kivitelezése is a mi nevünkhöz fűződik. Ezen technikák mindegyike a TASK-3-csatornák megoszlását, és az anti-TASK-3-antitestek specificitását célzó kísérletek kivitelezéséhez volt szükséges.

2.8.1. HEK293-sejtek stabil transzfekciója

A HEK293-sejtek stabil transzfekciója során a TASK-3-csatornát kódoló, teljes hosszúságú „polymerase chain reaction” (PCR) szekvenciát pIRES expressziós vektorba ligálták (Clontech Laboratories, Cowey, UK), majd a kompetens *E. coli* transzformációját követően a megfelelő kolóniákat kiválogatták és tenyésztették. Az így nyert baktériumok révén megfelelő mennyiségű plazmid DNS-t termeltettek, amihez a Plasmid Maxi Kit (Qiagen Ltd, Crawley, UK) rendszert alkalmaztak. A transzfekciót linearizált plazmid DNS és kalcium-foszfát keverékével végezték (Promega, Southampton, UK), amit 30 órán keresztül hagytak a sejteken, elegendő időt biztosítva az átvitt gén expressziójára. Az eljárás

végén a tenyésztőmédiomot lecserélték, és magas K^+ -koncentrációjú (25 mmol/l) tápoldat alkalmazására került sor, ami a szelekciós ágenszt (neomicin, 800 $\mu\text{g/ml}$) is tartalmazta.

2.8.2. Elektrofiziológiai kísérletek a stabilan transzfectált HEK293-sejteken

A stabilan transzfectált HEK293-sejtek felszíni membránjában lévő TASK-3-csatornákon folyó K^+ -áramok vizsgálatára a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjának alkalmazásával került sor. Hasonlóan a szeleteken történő mérésekhez, a mikroelektrodák boroszilikát tartalmú üvegapillárisokból készültek, ellenállásuk 2-4 $M\Omega$ volt. A mérésekhez használt berendezések (jelátalakító, erősítő, számítógépes program) ugyancsak megegyeztek az előzőekben bemutatottakkal. A kialakuló ionáramok pH-érzékenységének vizsgálata céljából a kontroll extracelluláris oldattal megegyező összetételű (EF-2; 1. táblázat), ám annál lényegesen savasabb ($\text{pH} = 6,0$) oldat alkalmazása történt.

2.8.3. A TASK-3-GFP fúziós proteint kódoló plazmid előállítása

Első lépésként a TASK-3-csatornákat kódoló cDNS sokszorosítása történt a PCR-technika alkalmazásával. A felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciája 5'-GTTAATTGAATTCATGAAGAGGCAGAACGTGCG-3' (szensz) és 5'-GTTATAAAGGATCCAAGTACTTCCGGCGTTTCA-3' (antiszensz) volt. A PCR kísérletek során a következő ciklusok használatára került sor:

- 1 \times 95 $^{\circ}\text{C}$ – 5 min
- 35 \times (95 $^{\circ}\text{C}$ – 1 min; 60 $^{\circ}\text{C}$ – 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ – 3 min)
- 1 \times 74 $^{\circ}\text{C}$ – 3 min

A felsokszorozott termék tisztítása (QIAquick PCR purifikációs oszlop; Qiagen Ltd., Crawley, UK) után *EcoRI* és *BamHI* restriktív enzimekkel történő emésztése, majd *BamHI*-és *EcoRI*-alkalmazásával előkezelt pEGFP-N1 vektorba történő ligálása következett (Clontech Laboratories, Cowley, UK), aminek eredményeként létrejött a TASK-3-pEGFP-vektor. A vektor JM 109 kompetens *E. coli* törzsbe juttatása után 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamicint tartalmazó LB-agaron klónszelekció történt. A plazmid izolálása Wizard[®] Plus SV Miniprep DNS-purifikáló kittel (Promega) történt. Az újonnan előállított fúziós vektor ellenőrzésére DNS-szekvenálással került sor.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A nucleus cochlearis bushy-neuronjai által expresszált K⁺-csatorna-alegységek

3.1.1. Bevezetés

A bushy-neuronok kizárólag az aVCN területén fordulnak elő, sejttestük kerek vagy ovális, legnagyobb átmérője 20-28 μm . A sejttestből két nyúlvány indul, nagyjából egymással szemben. A processzusok egyike az axon, a másik pedig a dendritfa vastag, közös eredése, amiből az a meglehetősen komplex dendrithálózat ered, amiről a sejtek a nevüket is kapták (*Brawer és munkatársai, 1974*). A magon belüli előfordulásuk és projekciójuk célpontja, valamint a dendritfa megjelenése alapján a bushy-neuronok két altípusa különböztethető meg (*Harrison és Irving, 1965; Harrison és Irving, 1966*). A szferikális bushy-sejtek jellegzetes gyöngyfűzér szerű sorokba rendeződve a hallóideg belépő rostjai között helyezkednek el, míg a másik alcsoportot képező globuláris-sejtek az aVCN területén szétszórva vagy kisebb-nagyobb csoportokba rendeződve találhatók. A szferikális bushy-sejtek és a nervus cochlearis axonjai közötti szinaptikus kapcsolat az ún. Held-féle végbunkó (*Lorente de No, 1933*), ami az emlős központi idegrendszer egyik óriásszinapszisa. A globuláris-sejtek esetében az acusticus rostok és a sejttest közötti axo-somaticus szinapszisok valamivel kisebbek, mint a Held-féle végbunkók, de még így is meghaladják a központi idegrendszeri szinapszisok szokásos méretét. A fenti szinapszisok sajátos morfológiájának funkcionális következményei vannak: a cochlearis rostokon érkező akciós potenciálok igen nagy biztonsággal hozzák létre a bushy-sejtek ingerületi állapotát, azaz az ún. elsődleges választ (*Rhode és munkatársai, 1983; Rubio és Wenthold, 1997*).

A szferikális bushy-sejtek esetében az elágazódó dendritfa a sejttest közelében marad, szemben a globuláris bushy-neuronok nyúlványaival, amik ritkább és a sejttesttől távolabb elhelyezkedő dendritfát alkotnak. Jelenleg nem rendelkezünk információval arra vonatkozóan, hogy az eltérő morfológiának milyen funkcionális következményei lehetnek. A helyzet értelmezését különösen megnehezíti az a felismerés, miszerint a cochlearis információ mindkét sejtípus esetén nagyrészt a sejttest membránjára érkezik, a dendriteket szinte teljesen szabadon (azaz szinapsziszmentesen) hagyva.

Mivel a globularis- és a szferikális-sejtek elektrofiziológiai sajátosságai azonosak, eltérő jelentőségük egyik magyarázata az lehetne, hogy más-más irányból érkező bemeneteket integrálnának (amellett, hogy más-más területre küldik az információt). Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy amennyiben a dendritfa ebből a szempontból nem játszik szerepet, vajon mi lehet a magyarázata a két sejttípus létének és (részben) eltérő morfológiájának? Érdekes megemlíteni azt is, hogy míg a bejövő cochlearis rostok a szferikális bushy-sejtekkel képeznek látványos óriásszinapszisokat, addig a kimenő axonok végződéseiben elsősorban a globuláris-sejtek és a nucleus medialis corporis trapezoidei fősejtjei között mutathatók ki hasonló, keheleszerű óriásszinapszisok, amelyek az igen megbízható ingerületáttevődést teszik lehetővé.

A bushy-neuronok tüzelési sajátosságait meghatározó elektrofiziológiai sajátosságokat kezdetben tengerimalacból enzimatikusan izolált sejteken vizsgálták (*Manis és Marx, 1991*). Ezeket a kísérleteket az tette lehetővé, hogy jóllehet a neuronok az izolálás során nyúlványaik nagy részét elvesztik, a VCN területéről származó, megfelelő átmérőjű és a sejttest két átellenes pontján nyúlványmaradvánnyal rendelkező sejtek igen nagy valószínűséggel bushy-neuronok. Az ilyen morfológiájú sejtek egy gyorsan adaptálódó (II. típusú) választ produkáltak, ami alkalmassá tette őket arra, hogy a nervus acusticuson érkező aktivitási mintázatot rendkívüli időbeli hűséggel legyenek képesek reprodukálni („primary-like” tüzelés; *Rhode és munkatársai, 1983; Rubio és Wenthold, 1997*). A „II. típusú tüzelési mintázat” elnevezés eredete az, hogy korábbi *in situ* mérésekben a nucleus cochlearis pontosan nem azonosítható neuronjainak válaszait kizárólag az elektromos jel sajátosságai alapján osztályozták. Ennek során kapta az a választípus a II. típusú nevet, amikor a kérdéses sejt egy hosszan fenntartott depolarizáló impulzus esetén általában egy, de legfeljebb néhány akciós potenciált generált a stimulus kezdetén, majd ezt követően tartósan depolarizált állapotba került. A bushy-sejtek másik igen lényeges funkcionális tulajdonsága, azaz hogy igen nagy frekvenciákig képesek az acusticus rostokon érkező AP-sorozatot hűen reprodukálni, leginkább a hangforrás térbeli lokalizációjának meghatározásában jelentős. Az óriásszinapszisok adta biztonságot és a bushy-sejtek speciális tüzelési sajátosságait összefoglalva megállapítható, hogy a bushy-neuronok funkciója az ingerhatás kezdetéről szóló információ nagy pontossággal és biztonsággal történő továbbítása a harmadlagos érzőneuronokhoz: szferikális-sejtek esetén az azonos oldali oliváris magokhoz, globuláris-sejtek esetében pedig a corpus trapezoideum ellenoldali részéhez.

A bushy-neuronok jellegzetes tüzelési mintázatának hátterében részben egyik igen markáns elektrofiziológiai tulajdonságuk áll: ezen sejtek esetében meglepően kicsi a membrán

időkonstansa, így a beérkező serkentő stimulusokat követően igen gyors válaszok kialakítására képesek. Több szerző felvetette, hogy a bushy-neuronok kicsiny időkonstansa és az ennek megfelelő alacsony bemenő ellenállása háttérben a sejtfelszíni membránjukban elhelyezkedő, alacsony depolarizációra aktiválódó K^+ -csatornák aktivitása is állhat (Oertel, 1983; Manis és Marx, 1991). Ezen K^+ -csatornák közös jellegzetessége, hogy tartalmazzák az ún. dendrotoxin- (DTX) érzékeny Kv-alegységek (Kv1.1, -1.2 vagy -1.6) valamelyikét, és a megjelenő áram az alacsony aktivációs küszöb mellett lassú inaktivációval és számottevő DTX-I iránti érzékenységgel jellemezhető (Dodson és munkatársai, 2003; Rothman és Manis, 2003).

A bushy-neuronok további jellegzetes elektromos sajátosságainak magyarázata is a sejtmembránjukban található ioncsatornák tulajdonságaiban keresendő. A korai vizsgálatok (Manis és Marx, 1991) kimutatták egy kis depolarizáció hatására lassan aktiválódó, 4-AP-érzékeny, kifelé irányuló áramkomponens; valamint egy pozitívabb membránpotenciál-értéknél kialakuló, TEA⁺-érzékeny áram jelenlétét. A fenti tulajdonságok alapján az első komponens az úgynevezett tranziens outward K^+ -áramnak (I_A ; Connor és Stevens, 1971) felelhet meg, aminek megnyílása és az ezt követő inaktivációja megakadályozhatja vagy késleltetheti az egymást követő AP-k kialakulását, befolyásolva ezáltal az AP-sorozat időtartamát és frekvenciáját (Rusznák és munkatársai, 1997). A második komponens jelenléte nagy valószínűséggel a legrégebben ismert, azaz a késői típusú K^+ -csatornákon folyó áram (I_K ; Hodgkin és Huxley, 1952) aktiválódásának tudható be. Ezen áramtípus gyorsan aktiválódik, ugyanakkor általában csekély mértékű idő- és feszültségfüggő inaktivációt mutat, biztosítva a kialakult AP-t követő repolarizációt. A két eltérő aktivációs küszöbvel és kinetikával rendelkező K^+ -áram együttesen olyan hatásos és tartós repolarizációs erőt képvisel, ami biztosítja a II-es típusú, gyorsan adaptálódó tüzelési mintázat létrejöttét. Ezen áramok meglétét a bushy-sejteken később agyszelet-preparátumokban is megerősítették (pl. Dodson és munkatársai, 2003; Pál és munkatársai, 2004), és funkcionális jelentőségüket is sikerült bizonyítani azáltal, hogy gátlással a gyorsan adaptálódó választ folyamatos tüzeléssé lehetett változtatni (Schwartz és Puil, 1997). Kimutatták továbbá, hogy a bushy-sejtek bemenetét adó I. típusú ganglion spirale neuronok, valamint a sejtek célpontjaként szereplő nucleus medialis corporis trapezoidi fősejtek elektromos válasza ugyancsak II. típusú (Brew és Forsythe, 1995; Szabó és munkatársai, 2002). A hallópálya ezen három, egymást követő sejtjének alapvető hasonlósága mellett ugyanakkor érdekes különbségekre is fény derült. A kis depolarizáció hatására aktiválódó, kifelé irányuló áram esetében a kifejezetten tranziens, 4-AP mmol/l-es koncentrációival gátolható (A-típusú) komponensen

belül a mérések felfedték egy tartósabb, 4-AP-re jóval érzékenyebb és DTX-I alkalmazásával is gátolható áram jelenlétét és szerepét. Utóbbi áramot az irodalomban D-típusú áramnak is nevezik, gátlása a nucleus medialis corporis trapezoidei fősejtjein (*Brew és Forsythe, 1995*) valamint a cochlearis bushy-sejteken (*Pál és munkatársai, 2004*) a II-es típusú választ fenntartott tüzeléssé alakította. Ezen áramkomponens gátlása egér ganglion spirale neuronokon hasonló változást okozott (*Mo és munkatársai, 2002*), ugyanakkor tengerimalac ganglion spirale neuronokon ilyen módosulást nem sikerült demonstrálni (*Szabó és munkatársai, 2002*). Jóllehet az eltérő viselkedés magyarázata nem világos, az a következtetés, hogy a bushy-sejtek (valamint a láncban előttük és mögöttük elhelyezkedő neuronok) tüzelési mintázatában döntő szerepet játszanak a különböző aktivációs küszöbű és inaktivációs sebességű K^+ -áramok, bizonyítottan tekinthető.

A globuláris bushy-sejtek morfológiája a neurofiziológiai vizsgálatokban szinte egyedülálló lehetőséget ad arra, hogy tanulmányozni és összehasonlítani lehessen ugyanazon neuron sejttestének és axonvégződésének a membránjában expresszálandó ioncsatornákat. Ilyen összehasonlító vizsgálatok fedték fel, hogy míg a bushy-sejtek somaticus membránjában a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák valamennyi ismert típusa (L-, N-, P/Q-, R- és T-) jelen van, addig a praesynapticus végződéseiken (az ún. Held-féle kelyhekben) csak a P/Q-típus jelentős (*Doughty és munkatársai, 1998*). A h-áram összetétele kevésbé drámai különbségeket eredményezett, az egyedüli említésre érdemes különbség az volt, hogy a sejttest h-árama hatékonyabban volt gátolható Ba^{2+} -mal, mint a praesynapticus membránban található csatornák (*Cuttle és munkatársai, 2001*). Ami a tüzelési mintázat szempontjából különösen fontosnak tűnő D-típusú áramok összehasonlítását illeti, a sejttesten a heteromer csatornaszerkezet dominanciája volt kimutatható, ugyanakkor a praesynapticus végződés membránjában elsősorban homomer csatornák voltak megtalálhatók (*Dodson és munkatársai, 2003*). A fenti adatok meggyőzően világítanak rá arra, hogy egy adott neuron esetében a sejt különböző részein (sejttest, dendritek, axon és praesynapticus terminál) jelentős különbségek létezhetnek az egyes csatornaféleségek expressziójában.

Szemben a teljes-áramok vizsgálatával kapott eredményekkel, viszonylag csekély mennyiségű információ állt rendelkezésre annak vonatkozásában, hogy a bushy-sejteken tapasztalt, funkcionálisan olyan különböző K^+ -áramok kialakításában vajon mely Kv-alegységek vehetnek részt. Az ezzel kapcsolatos irodalmi adatok alapján az tűnt a legbiztosabbnak, hogy a bushy-sejtek jelentős mennyiségben expresszálják a Kv3.1-alegységeket (*Perney és munkatársai, 1992; Perney és Kaczmarek, 1997*), amik nem inaktiválódó K^+ -áramok kialakításáért felelősek. Ennek az áramkomponensnek különösen

fontos jelentősége lehet a hallórendszer területén, mivel aktivitása meghatározó fontosságúnak tűnik a gyors repolarizáció kialakításában, így a magas frekvenciájú bemenő jelekkel szinkron tüzelési mintázat genezisében (*Weiser és munkatársai, 1995; Wang és munkatársai, 1998*). A Kv4-alegységek jelenlétét a nucleus cochlearisban (és benne a bushy-sejtekben) ezidáig csak mRNS-szintű vizsgálatokkal igazolták; az ezzel kapcsolatos eredményeket az általános bevezetőben már összefoglaltuk.

A feszültségvezérelt K^+ -csatornák mellett egyes háttér K^+ -csatornák jelenlétére utaló bizonyítékok is fellelhetők a nucleus cochlearis ventralisban, ahol igen erőteljes TASK-1-, TASK-3- és TASK-5-specifikus mRNS expressziót mutattak ki (*Karschin és munkatársai, 2001*), ugyanakkor fehérjék szintjén még nem igazolták a kérdéses alegységek jelenlétét.

3.1.2. Eredmények

A patkány nucleus cochlearis számos különböző sejtípust tartalmaz, melyek egyértelmű azonosításához nagy segítséget nyújt az axon és a dendritfák lefutásának vizsgálata és azok morfológiájának megítélése. A disszertáció ezen része azonban enzimatikusan izolált neuronokon készült, ahol a sejtek pontos identifikálása nyúlványrendszerük súlyos károsodása miatt igen körülményes volt, így komoly erőfeszítéseket tettünk annak érdekében, hogy egy olyan sejtazonosítási algoritmust dolgozzunk ki, aminek révén nagy biztonsággal elérhető, hogy valóban csak bushy-neuronokat vizsgáljunk. A megfelelő sejtazonosítási protokoll jelentőségét az adta, hogy a bemutatott és felhasznált immunjelölés eredményei csak akkor voltak értelmezhetők, ha azok bizonyosan a bushy-sejtek által mutatott Kv- és TASK-expressziót tükrözték. A sejtazonosítás során az alábbi feltételrendszert alkalmaztuk:

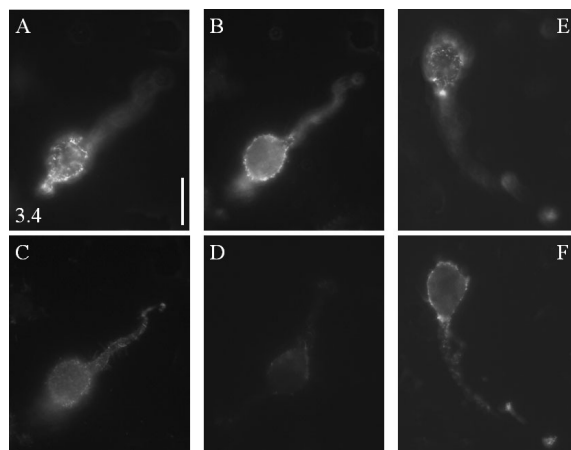
Figyelembe véve a bushy-sejtek morfológiáját (közel gömb alakú sejttest, amiből két nyúlvány ered: a dúsan elágazó dendritfa és az elágazást nem mutató axon) az izolált sejteket csak abban az esetben azonosítottuk bushy-neuronként, amennyiben azok kerek vagy kissé hosszúka, kb. 20 μm (vagy mivel fiatal állatokból izolált neuronról volt szó, ennél némileg kisebb) átmérőjű sejttesttel rendelkeztek. A bushy-sejtként azonosított neuronnak legalább egy, de legfeljebb két nyúlvánnyal kellett rendelkeznie. Amennyiben a sejttestből csak egy processzus indult ki, akkor annak dúsan elágazónak kellett lennie, mert ilyen dendritfával csak a bushy-sejtek rendelkeznek. Amennyiben a sejttestből két nyúlvány eredt, akkor az egyiknek elágazónak (a bushy-sejtek dendritfájának jellegzetessége), a másikkal pedig nem elágazónak (a sejt axonja) kellett lennie. Azok a sejtek, amik ezen kritériumoknak nem

feleltek meg nem lettek bushy-sejtként azonosítva, és a jelen analízisből teljes egészében kihagytuk őket. A kizárás leggyakoribb oka a soma nem megfelelő mérete (kisebb, mint 15 μm vagy nagyobb, mint 25 μm), a soma nem megfelelő alakja (nem gömb vagy enyhén elongált sejttest; pl. háromszög vagy polygonalis alak), vagy a nyúlványok nem megfelelő száma (azok teljes hiánya vagy kettőnél több processzus) volt. Valamennyi, a jelen tanulmányba bevont sejtalak a fenti szigorú kritériumok alapján lett kiválasztva, aminek szigorúságát jól tükrözi, hogy tapasztalataink szerint egy 8 napos patkányból preparált nucleus cochlearis pár enzimatikus izolálása mintegy 800 000 sejtet eredményez, ugyanakkor egy-egy izolálás során sohasem lehetett 15-nél több olyan sejtet találni, amik az előbb említett kritériumoknak megfeleltek. Fontos megjegyezni, hogy az egyes antitestek alkalmazása során csak egy-két sejt képét prezentáljuk, ám minden esetben számos olyan sejt digitális képét rögzítettük és tároltuk, amik a fenti kritériumoknak megfeleltek.

A kísérletek során természetesen rendszeresen végeztünk preadszorpciós kontroll vizsgálatokat, aminek során a reakció kivitelezését megelőzően az elsődleges antitestet a neki megfelelő immunizáló peptiddel előinkubáltuk. A preadszorpciós kontrollokat mindig a nekik megfelelő „valódi” immunreakcióval együtt, azzal párhuzamosan végeztük, majd olyan sejteket kerestünk az így kezelt neuronok között, amik megfeleltek a már említett azonosítási kritériumoknak. Az ilyen módon kiválasztott sejtekről úgy készítettünk digitális felvételeket, hogy mind a kamera expozíciós ideje, mind erősítése ugyanakkora volt, mint a tényleges immunjelölés végeztével készült képeken. Ezt a technikát alkalmazva a preadszorpciós kontroll vizsgálatok nem csupán az immunjelölődés eredményeinek megerősítésére szolgáltak, hanem lehetővé tették az immunreakció intenzitásának szemikvantitatív értékelését is. Az immunjelölődés erősségének megítélése során a preadszorpciós kontroll esetében tapasztalt intenzitást tekintettük alapnak, és ehhez viszonyítottuk a valódi reakció intenzitását. Magától értetődő, hogy specifikus jelölődés híján a preadszorpciós kontroll és a valódi immunreakció eredményeként tapasztalható fluoreszcencia jórészt azonos volt, ugyanakkor egy erőteljes specifikus jelölődés esetében alkalmazva ugyanazon expozíciós paramétereket a preadszorpciós kontroll sejteiben, azokban csupán igen halványan jelölődött (esetenként csaknem észrevehetetlen) sejtek voltak megfigyelhetők (pl. 6. ábra).

A 6. ábra enzimatikusan izolált bushy-sejtek Kv3.4-expresszióját demonstrálja. A 6A-C felvételek ugyanarról a bushy-neuronról készültek, de a sejttest más-más területei vannak a fókuszban. A 6A kép a Kv.3.4-specifikus immunpozitivitás jellegzetesen „foltos” megjelenését demonstrálja a bemutatott sejt sejttestének a felszínén; a 6B felvétel a sejttest egyfajta „optikai keresztmetszetét” mutatja, ahol ugyancsak jól megfigyelhető a reakció

durván granulált jellege. A 6C kép alapján az is nyilvánvaló, hogy a bushy-sejtek nyúlványai is erős Kv3.4-pozitivitást mutattak. A preadszorpciós kontroll vizsgálatok során a bemutatottnál lényegesen gyengébb fluoreszcens jelet tapasztaltunk (6D ábra). A 6E és a 6F felvétel egy másik bushy-sejt példáján mutatja be a Kv3.4-specifikus reakció során tapasztalt eredményeket: ugyancsak jól megfigyelhető a somát és a processzusokat egyaránt érintő, kifejezetten foltos megjelenésű immunpozitivitás. A Kv3.4-specifikus antitest alkalmazása során mindig a bemutatotthoz hasonló immunjelölődést tapasztaltunk.



6. ábra

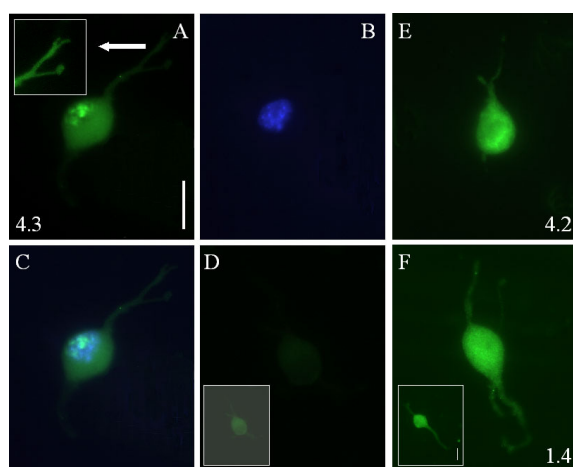
Enzimatikusan izolált bushy-sejtek Kv3.4-expressziója

A-C: Ugyanazon sejtről, de más optikai síkban készült felvételek. Az **A** ábra a sejt felszínét demonstrálja, a **B** panel a sejt optikai keresztmetszetét mutatja, míg a **C** felvételen a sejt nyúlványa látható. A **D** ábrán olyan immunreakció eredménye figyelhető meg, amelynek során az elsődleges antitestet az arra specifikus immunizáló fehérjével előinkubáltuk. A kép készítése során az expozíciós idő megegyezett az **A** ábra készítése során alkalmazottal. Az **E** és **F** felvételeken egy másik bushy-sejten tapasztalt immunjelölés eredményét mutatjuk be. Kalibráció: 20 μm .

A 7. ábrán más, ugyancsak tranziens K^+ -áramot kialakító ioncsatornákat létrehozó Kv-alegységek elleni immunreakció eredményeit mutatjuk be. Amint azt a 7A felvétel mutatja, a Kv4.3-ellenes antitest alkalmazása igen erős immunreakció megjelenését eredményezte, ami közvetlenül is megítélhető a 7D ábrán látható preadszorpciós kontrollal összehasonlítva. (A kis kép esetében ugyanaz a látótér figyelhető meg, itt a kép fényerősségét mesterségesen megnöveltük, hogy a bemutatott sejt morfológiája valamelyest kirajzolódjon.) A 7A ábrán látható kisebb kép a bemutatott bushy-neuronként azonosított struktúra nyúlványait mutatja, némileg kinagyítva. A felvételen a fényerősséget és a kontrasztot kissé megnöveltük, hogy a többszörösen elágazódó nyúlványrendszer egyértelműen megítélhető legyen.

Amint az a 7A képen megfigyelhető, a Kv4.3-specifikus antitest alkalmazásakor kifejezetten szemcsés immunreakció megjelenését tapasztalhattuk. Szemben azonban a

Kv3.4-ellenes antitest alkalmazása során tapasztaltakkal, ahol az immunpozitív szemcsék a sejt felszíni membránhoz kapcsoltnak jelentek meg, a Kv4.3-kapcsolt immunreakció a cytoplasma egyes területeire koncentrálnak, és jelentős átfedést mutatott a neuron sejt magjával. Ez a különös megoszlás jól megfigyelhető a 7A és a 7B felvétel (ahol DAPI alkalmazásával a sejt mag jelölése történt) összehasonlításával, valamint a két kép egymásra vetítésével készült co-lokalizációs felvétel (7C) alapján. A bemutatott és a tanulmány során egyéb alkalmakkal készült reakciók alapján úgy tűnik, hogy a bushy-sejtek sejt felszíni membránja mellett a nuclearis-perinuclearis régiójukban is intenzív Kv4.3-pozitivitás tapasztalható, ami a szokatlan lokalizáció dacára specifikus reakciónak tűnik, hiszen a preadszorpciós kontroll vizsgálatok alkalmával sohasem jelentkezett (lásd pl. a 7D felvételt).



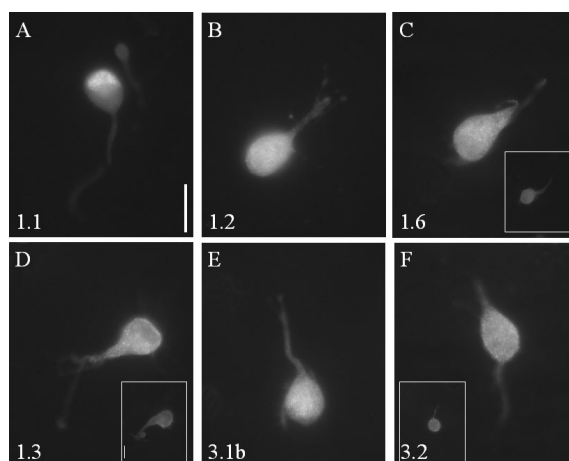
7. ábra

Kv4.3-, 4.2- és 1.4-specifikus immunfestés eredményei enzimatikusan izolált bushy-neuronokon

Az **A** panel a Kv4.3-specifikus immunreakció eredményét mutatja. A kis ábrán a fényerősséget megnöveltük a sejt nyúlványainak jobb láthatósága végett. A **B** képen a DAPI-val történő magfestés látható, a **C** ábra pedig a co-lokalizációs felvételt demonstrálja. A **D** panel a specifikus immunizáló fehérjével végzett kontroll kísérletek eredményét mutatja, a kis ábra ugyanarról a látótérrel készült, de a fényerősséget a könnyebb morfológiai azonosítás érdekében mesterségesen megnöveltük. Az **E** ábra a Kv4.2-specifikus immunreakció eredményét demonstrálja. Az **F** képen a Kv1.4-specifikus festődés látható, a kis felvételen a kontroll kísérlet eredményét figyelhetjük meg. Kalibráció: 20 μm .

A 7E ábrán a Kv4.2-specifikus immunreakció eredménye található, amin jól megfigyelhető a bushy-sejtek által produkált intenzív, ám az előzőekben bemutatottaknál (azaz a Kv3.4- és a Kv4.3-specifikusnál) lényegesen egyenletesebb megoszlást mutató immunpozitivitás. Ismeretes, hogy a Kv3.4-, Kv4.2- és Kv4.3-alegységek mellett a Kv1.4-alegységek jelenléte is okozhatja gyorsan inaktiválódó K^+ -áram megjelenését, így sor került a bushy-neuronok Kv1.4-specifikus jelölésére is. Amint az a 7F képen látható, a „specifikus”

immunreakció (nagyobbik kép) intenzitása gyakorlatilag megegyezett a preadszorpciós kontroll esetében tapasztalt intenzitással (kisebb kép), amiből arra következtettünk, hogy a bushy-neuronok érdemleges Kv1.4-expressziót nem mutatnak. Fontos megemlíteni, hogy a 7F képen bemutatott felvétel során az expozíciós idő mintegy 15-ször hosszabb volt, mint a Kv3.4-, a Kv4.2- vagy a Kv4.3-specifikus immunreakciók eredményeit dokumentáló felvételek eseteiben.



8. ábra

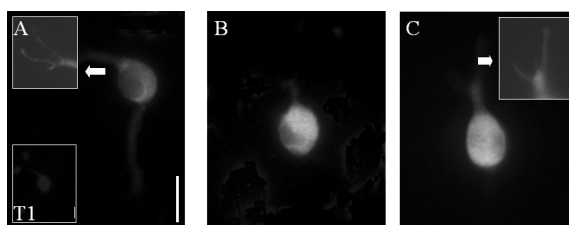
Kv1.1-, 1.2-, 1.3-, 1.6-, 3.1b- és 3.2-specifikus immunjelölések eredményei enzimatikusan izolált bushy-neuronokon

Az **A** felvétel a Kv1.1-specifikus festődés eredményét mutatja, a bushy-sejt mellett látható kisebb sejtet cochlearis szemcsesejtként azonosítottuk. A **B-F** felvételek a Kv1.2-, 1.6-, 1.3-, 3.1b- és 3.2-specifikus immunreakciók eredményeit mutatják. A **C**, **D** és **F** képeken látható kis ábrák a preadszorpciós kontrollokat demonstrálják. Természetesen az **A**, **B** és **E** panelek esetében is végeztünk preadszorpciós kontroll kísérleteket, és ezekben az esetekben a kontrollhoz képest a sejtek csak igen gyenge jelölődés adtak. Kalibráció: 20 μ m.

A bushy-sejtekről ismert, hogy depolarizáció hatására egy dendrotoxinra érzékeny áramkomponenst is produkálnak. Mivel a DTX-re érzékeny áram megjelenése háttérben olyan K^+ -csatornák állnak, amik Kv1.1-, 1.2- és/vagy 1.6-alegységeket tartalmaznak, ezen alegységekre specifikus antitestek alkalmazására is sor került (8. ábra, A-C felvételek). A bushy-sejtek által produkált Kv1.1- és Kv1.2-immunpozitivitás igen erősnek bizonyult (8A és 8B); a preadszorpciós kontroll után, a már rögzített elveknek megfelelően készített felvételeken a kontroll sejtek alig voltak láthatók. A Kv1.6-specifikus immunpozitivitás a bushy-sejteken ugyancsak jelen volt, de annak erőssége gyengébbnek bizonyult, mint a másik két DTX-érzékeny Kv-alegység esetében tapasztalt (8C).

Korábbi elektrofiziológiai vizsgálatok rámutattak, hogy a bushy-neuronok igen erőteljes repolarizációs képességgel rendelkeznek, ami arra utalt, hogy a késői típusú K^+ -

áramok kialakításáért felelős Kv-alegységek jelentős szerepet töltenek be membránsajátságaik kialakításában. A jelen vizsgálatsorozat keretében az izolált bushy-neuronokon három olyan alegység expresszióját ellenőriztük, melyek ilyen késői típusú K^+ -áram kialakításáért felelősek (8D-F képek). Az eredményeket a megfelelő blokkoló peptiddel történő előinkubáció során tapasztalt fluoreszcenciaintenzitásokkal összevetve azt tapasztaltuk, hogy a legerőteljesebb reakció a Kv3.1b-alegységek ellen irányuló antitestek alkalmazása után alakult ki (8E). Ezekből az adatokból úgy tűnik, hogy a bushy-neuronok esetében a Kv3.1-alegységek a leglényegesebbek a késői típusú K^+ -csatornák kialakításában és összeszerelődésében. Ugyancsak értékelhető, ám gyengébb immunreakciót tapasztaltunk a Kv1.3-alegységekre specifikus antitestek alkalmazása után (8D). A harmadik, szintén késői típusú áram kialakításáért felelős csatornaalegység, aminek jelenlétét vizsgáltuk a Kv3.2 volt. Amint az a bemutatott felvételen jól megítélhető (8F), az immunreakció jelen volt ugyan, de a három vizsgált alegység közül ennek intenzitása tűnt a legjelentéktelenebbnek.



9. ábra
TASK-1-specifikus immunreakció eredménye enzimatikusan izolált bushy-sejteken

Az A felvétel 4 napos patkányból izolált bushy-sejten végzett TASK-1-specifikus immunfestődés eredményét mutatja. A felső kis ábra mesterségesen megnövelt fényerősség mellett demonstrálja a sejt nyúlványait, így annak morfológiája könnyebben megítélhető. Az alsó kis ábra a preadszorpciós kontroll eredményét mutatja. A B és C képek ugyancsak TASK-1-specifikus immunreakciókat mutatnak, de azokat 8 és 11 napos patkányokból izolált bushy-sejteken végeztük. A C felvételen lévő kis ábrán a sejt nyúlványa látható, mesterségesen megnövelt fényintenzitás mellett. Kalibráció: 20 μ m.

Karschin és munkatársai (2001) számoltak be arról, hogy a hallórendszer központi idegrendszeri elemeinek területén nagy mennyiségben fordulnak elő a TASK-csoportba tartozó ioncsatornákat kódoló mRNS molekulák, így megvizsgáltuk, hogy a TASK-1-csatorna expresszálódik-e a bushy-sejteken (9. ábra). A bemutatott felvételek egy-egy 4 (9A), 8 (9B) és 11 (9C) napos állat nucleus cochlearisából izolált bushy-sejten tapasztalt immunpozitivitást mutatnak be. A közvetlen összehasonlíthatóság biztosítása végett a preparálás, valamint az immunreakció egyes lépéseit mindhárom esetben teljesen egyidejűleg végeztük, és a felvételeket is azonos paraméterek alkalmazásával készítettük. Amint az tisztán megítélhető, a bushy-sejtek valamennyi vizsgált életkorban egyértelmű TASK-1-pozitivitást mutattak. Az

immunreakciók intenzitását az ugyancsak szimultán végzett preadszorpciós kontrollhoz viszonyítva (kisebb felvétel a 9A kép alján) az is megállapítható volt, hogy a reakció intenzitása az életkor előrehaladtával folyamatosan növekedett. Bár ez a megfigyelés arra utal, hogy a bushy-neuronok TASK-1-expressziója életkorfüggést mutathat, a hipotézis tesztelése, valamint a jelenség funkcionális jelentőségének igazolása az itt bemutatottnál specifikusabb kísérletek kivitelezését igényli. A 9. ábra A és C részén bemutatott kisebb felvételeken a nagyobb ábrán szereplő sejtek dendritikus arborizációját tüntettük fel nagyobb nagyítással és némileg megnövelt fényerősség alkalmazásával.

A 4. táblázat az enzimatikusan izolált bushy-sejteken kivitelezett immunjelölések eredményeinek összefoglalását tartalmazza.

4. táblázat

Az izolált bushy-neuronokon kivitelezett immunjelölés eredményeinek összefoglaló táblázata

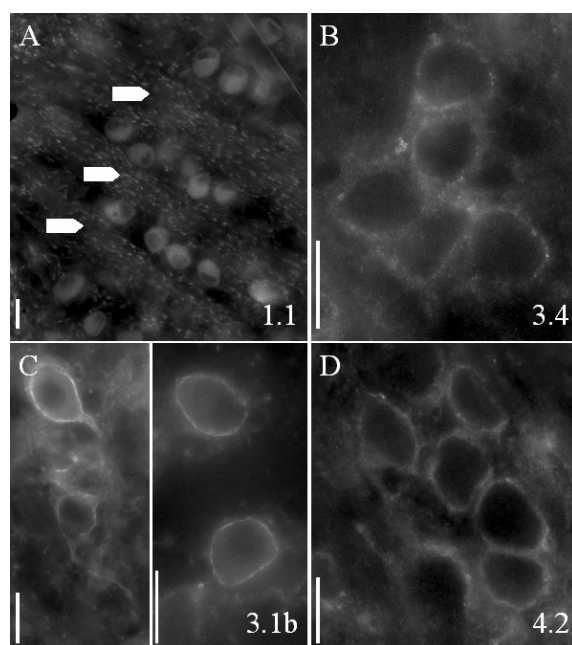
<i>Alegység</i>	<i>Intenzitás*</i>	<i>Lokalizáció és megoszlás</i>
Kv1.1	++	Főleg a sejttest**
Kv1.2	++	A sejttest és a nyúlványok egyaránt
Kv1.3	+	Főleg a sejttest
Kv1.4	-	Nincs jelen
Kv1.6	+	Főleg a sejttest
Kv3.1b	+++	A sejttest és a nyúlványok egyaránt
Kv3.2	+	Főleg a sejttest
Kv3.4	+++	A sejttest és a nyúlványok egyaránt; jellegzetes „foltos” megjelenésű reakció
Kv4.2	+++	A sejttest és a nyúlványok egyaránt
Kv4.3	+++	A sejttest és a nyúlványok egyaránt; intenzív, „foltos” jelölődés, döntően a magban vagy annak közelében
TASK-1	++	Főleg a sejttest; idősebb állatokban a reakció erősebbnek bizonyult

*Az intenzitás az egyidejűleg készített preadszorpciós kontrollok esetében tapasztalt fluoreszcenciaerősséghez viszonyított jelölődési intenzitást tükrözi.

**Az immunjelölődést akkor tekintettük főleg a sejttestre lokalizáltnak, ha a nyúlványok fluoreszcenciaintenzitása lényegesen gyengébb volt, mint a sejttesté.

Az enzimatikusan izolált bushy-sejtek vizsgálata során egy igen szigorú sejttazonosítási szisztémát próbáltunk meg alkalmazni, hogy elkerüljük a sejtek nem megfelelő klasszifikálását. Az igen gondos sejttazonosítási eljárás ellenére felvethető azonban, hogy az enzimtikus disszociáció során olyan súlyosan torzul a sejtek morfológiája, hogy az még a leggondosabban végzett sejttazonosítás eredményét is kétségessé teszi. Ennek következtében

úgy éreztük, fontos annak megerősítése, hogy az eddigiekben prezentált adatok valóban a valóságot; azaz a bushy-neuronok Kv-expressziós mintázatát tükrözik. A cél elérésének érdekében egyes Kv-alegységekre specifikus immunjelöléseket (amik esetében az enzimatikusan izolált sejteken a legerősebb jelölődést tapasztaltuk) úszószeletekben is megismételtük. Bár a vizsgálatokhoz alkalmazott 40-60 μm vastag cochlearis szeletekben a bushy-neuronok dendritfája nem mindig volt egyértelműen jelen, a sejtek pontos azonosítása viszonylag könnyen elvégezhető volt. A bushy-sejtek identifikálása a sejtest nagysága (mintegy 20 μm átmérőjű), annak alakja (kerek vagy kissé elnyújtott), valamint a magon belüli lokalizációja (közel a nervus acusticus belépési pontjához, gyakran sejtoszlopokat vagy -csoportokat alkotva az intranuclearis acusticus rostok közelében vagy között) alapján történt.



10. ábra

Kv1.1-, 3.4-, 3.1b- és 4.2-specifikus immunfestések eredményei cochlearis szeletekben elhelyezkedő bushy-sejteken

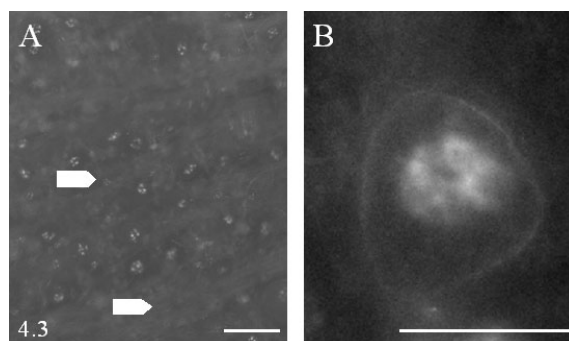
Az A felvételen Kv1.1-specifikus immunreakció kis nagyítású képe látható. A nyilak a hallóideg rostjait mutatják, a bushy-sejtek a rostok között sorokban helyezkednek el. A B-D ábrákon bemutatott felvételek a nucleus cochlearis ugyanazon régiójáról, nagyobb nagyítással készültek. A képek sorban Kv3.4-, 3.1b- és 4.2-specifikus immunfestés eredményeit demonstrálják. Kalibráció: 20 μm .

A 10. ábra a Kv1.1-, Kv3.4-, Kv3.1b- és Kv4.2-specifikus antitestek alkalmazása utáni helyzetet illusztrálja a nucleus cochlearis ventralisból készített szeletekben. A 10A felvétel (ami a Kv1.1-specifikus reakció eredményét tükrözi) az előzőekben említett, a sejtazonosítást megkönnyítő jegyeket demonstrálja. A felvételen nyilak jelzik a nervus acusticus könnyen azonosítható, nucleus cochlearison belül futó axonjait, melyek mentén tisztán megítélhetők az

erős Kv1.1-pozitivitást mutató bushy-neuronok kerek sejttestjei. Valamennyi, a jelen és a következő ábrán bemutatott felvétel, a nucleus cochlearis ezen területén készült.

A 10B felvétel cochlearis úszószeletben elhelyezkedő bushy-neuronok által prezentált Kv3.4-specifikus immunpozitivitást mutat. Figyelmet érdemel, hogy az immunpozitivitás előzőekben már említett „foltos” megjelenése itt is megfigyelhető a bemutatott sejtek kontúrjain. A 10. ábra C részét képező két felvétel a bushy-sejtek intenzív Kv3.1b-specifikus, míg a 10D felvétel azok Kv4.2-specifikus immunpozitivitását hivatottak bemutatni.

Amint azt a 7. ábrán már demonstráltuk, az enzimatikusan izolált bushy-neuronok intenzív Kv4.3-specifikus immunpozitivitást mutattak, egy meglehetősen különös, döntően intra- vagy perinuclearisnak imponáló megoszlásban. Az úszószeletek alkalmazása során ezért arra is választ kerestünk, hogy ez a jelenség vajon megerősíthető-e ezen preparátumban is.

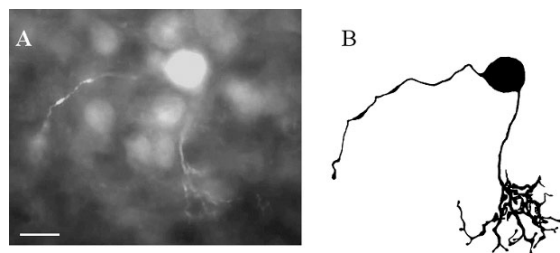


11. ábra
Kv4.3-specifikus immunreakció cochlearis szeletben elhelyezkedő bushy-sejteken

Az **A** képen Kv4.3-specifikus immunfestés eredménye látható kis nagyítással. A nyilak a hallóideg intranuclearis rostjait mutatják, amelyek között helyezkednek el a bushy-neuronok által formált oszlopok. A **B** panel egy nagy nagyítású felvétel, amelyen a sejt intenzíven jelölődő nuclearis régiója, és az ugyancsak pozitívan jelölődött sejt felszíni membrán egyaránt megfigyelhető. Kalibráció: 40 μm (**A**) és 20 μm (**B**).

A 11A felvétel egy cochlearis szeleten kivitelezett Kv4.3-specifikus immunreakció eredményét mutatja. A nyilakkal jelzett acusticus rostok között jól megfigyelhetők az oszlopszerűen rendeződött bushy-sejtek kötegei. Az ábrán demonstrálható, hogy a bushy-sejtek sejttestjei erős Kv4.3-specifikus immunpozitivitást mutatnak. A 11B képen egyetlen bushy-neuron nagy nagyítású képe látható, amin jól megfigyelhető a nucleus és a sejt felszíni membrán immunpozitivitása egyaránt. Érdekes megemlíteni, hogy a nuclearis pozitívitás gyakran elnyomta a sejt felszíni membrán által mutatott reakciót, aminek következtében a jelen ábrához hasonló felvételek készítése meglehetősen nehéz feladatnak bizonyult.

Bár az előzőekben bemutatott kísérletek egyértelműen jelezték, hogy a bushy-neuronok a különböző Kv-csatornák széles választékát expresszálják, különösen érdekes volt azt látni, hogy ezen sejtek felszíni membránjában számos olyan alegység is megtalálható, ami tranziens K^+ -áram kialakításában vesz részt. Egy adott ioncsatorna-alegység jelenlétének immunhisztokémiai módszerekkel történő detektálása azonban még nem szükségszerűen jelenti azt, hogy az alegységek funkcionális ioncsatornák képzésében valóban közreműködnek. Ebből kiindulva a jelen munka keretein belül olyan alegység-specifikus gátlószerek hatásának tesztelésére is sor került, amik képesek voltak a Kv3.4-, valamint a Kv4.2/4.3-alegységeket tartalmazó ioncsatornák hatásos gátlására. Ezen vizsgálatoktól részben azt vártuk, hogy segítségükkel igazolhatjuk, hogy a bushy-neuronok valóban képesek tranziens K^+ -áramok produkálására, részben pedig a korábbi immunhisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók megerősítését reméltük tőlük.



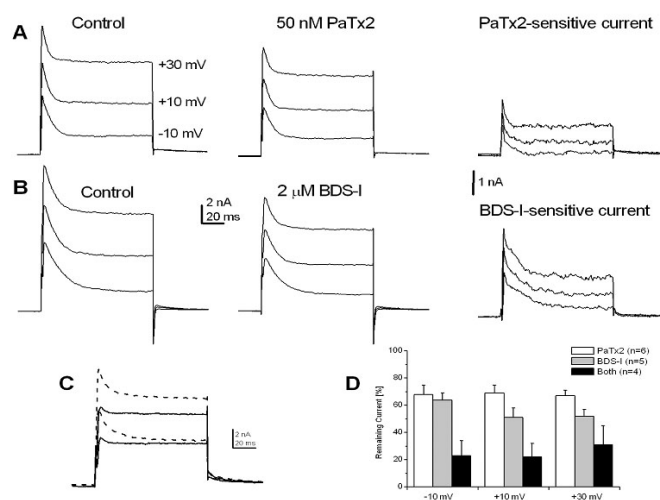
12. ábra

Egy Lucifer Yellow-val feltöltött bushy-sejt a nucleus cochlearis ventralisból készített szelet-preparátumban

Az **A** felvétel a sejtről készített fényképfelvételek egyikét mutatja. A **B** ábrán az ugyanarról a sejtről készült rajz látható, aminek elkészítéséhez valamennyi egyedi fényképfelvételt felhasználtuk. Kalibráció: 20 μ m.

A funkcionális kísérletek során a bushy-neuronokat elsősorban a nucleus cochlearis anterior területén, a nervus acusticus belépési pontjának közelében DIC-optika alkalmazásával kerestük. Az ebben a régióban található bushy-neuronok típusos megjelenési formáját demonstrálja a 12. ábra, ami egy, az elektrofiziológiai mérés során Lucifer Yellow-val feltöltött bushy-sejtet ábrázol. Az adott neuronról több síkban is készítettünk felvételt, és ezek egyikét mutatja a 12A kép. Jól megfigyelhető a közel gömb alakú sejttest, az el nem ágazó axon, valamint az egyébként dúsan arborizálódó dendritfa egy része. A 12B felvétel az ugyanezen neuronról készült rajzot ábrázolja, amihez az adott sejtről készített valamennyi fényképfelvételt felhasználtuk. A kerek sejttestet, a hosszú, el nem ágazódó axont, és a sejttest másik pólusának közeléből induló, dúsan elágazó dendritfát olyan morfológiai

jegyekként értékeltük, amik alapján a bemutatott sejt egyértelműen bushy-neuronként volt azonosítható.



13. ábra

A bushy-sejtek tranziens-áramának kialakításáért felelős K^+ -csatorna-alegységek

A kísérletek során a tartópotenciál -80 mV volt, ahonnan 100 ms hosszú depolarizációs lépcsőket alkalmaztunk -10 , $+10$ és $+30$ mV-ig. Az **A** rész a PaTx2 hatását mutatja. A szer alkalmazására érzékeny komponens úgy állítottuk elő, hogy a kontroll körülmények között felvett görbéből kivontuk a gátlószer jelenlétében regisztrált áramgörbét. A **B** ábrán a BDS-I egy másik bushy-sejt tranziens áramára kifejtett hatását ábrázoltuk, feltüntetve a BDS-I-szenzitív komponens is. A **C** részen a kontroll extracelluláris oldatban készített áramgörbéket (szaggatott vonal), valamint a két gátlószer együttes alkalmazásának hatására kialakuló áramot (kihúzott vonal) ábrázoltuk, -10 és $+10$ mV-os depolarizáció esetén. A **D** részen az eredmények összefoglalása látható, ahol a maradó (gátlószerre rezisztens) tranziens áramokat tüntettük fel PaTx2 és BDS-I izolált, valamint a két szer kombinált alkalmazása esetén.

Az alegység-specifikus szerek hatásának vizsgálata során a tartópotenciál -80 mV volt, és innen alkalmaztuk a 100 ms hosszú depolarizációs lépcsőket -10 , $+10$ és $+30$ mV-os értékekig. A kísérletek során először a kontroll extracelluláris oldatban rögzítettük az alkalmazott stimulus hatására kialakuló áramgörbéket, majd az ugyanazon impulzusprotokoll következtében, de immár a megfelelő gátlószer jelenlétében kiváltható áramokat vettük fel. Annak érdekében, hogy a gátlószerre érzékeny áramkomponens nagysága és kinetikája egyértelműen megítélhető legyen, a kontroll körülmények között felvett áramgörbéből kivontuk a gátlószer jelenlétében megjelenő áramot, és így megkaptuk az adott anyagra specifikusan érzékeny áramkomponens. Amint azt a 13. ábra A része mutatja, a Kv4.2- és/vagy Kv4.3-alegységeket tartalmazó K^+ -csatornák specifikus gátlószerének tartott PaTx2 egyértelműen gátolta a megjelenő tranziens áram részét. Az inaktiválódó áramkomponens egy részének szelektív gátlása különösen a kisebb, -10 és

+10 mV-os depolarizációs lépcsők alkalmazása során volt nyilvánvaló. Amennyiben ennél erőteljesebb depolarizációs lépcsőt alkalmaztunk (+30 mV), a maradó (steady-state) áramkomponens részleges gátlása is kialakult. A 13D ábra a PaTX2 hatásának összefoglalását tartalmazza, mindhárom alkalmazott depolarizációs lépcső esetében (n = 6).

A kísérletek egy másik részében a BDS-I nevű alegység-specifikus gátlószer alkalmazására került sor, ami az olyan K^+ -csatornákon folyó áramok gátlására képes, amik összeszerelődésében Kv3.4-alegységek vesznek részt. A BDS-I hatását mindösszesen öt szeptetben próbáltuk, és az minden neuron esetében igen hatékonyan csökkentette a tranziens áram csúcsának nagyságát (13B). A BDS-I hatásának összefoglalását a 13D ábra demonstrálja.

A kísérletek során vizsgáltuk még a PaTX2 és BDS-I együttes alkalmazásának következményét a bushy-sejtek tranziens K^+ -áramaira. A 13C ábrán egy olyan kísérlet eredménye látható, amikor a két gátlószer egyidejűleg volt jelen az extracelluláris oldatban, és közben -10 és +10 mV értékekre depolarizáltuk a sejtet. Amint az jól megítélhető, ugyan a BDS-I és a PaTX2 kombinált alkalmazása hatékonyan csökkentette a kontroll körülmények között kialakuló tranziens áramot, azt nem tüntette el teljesen. A két szer együttes alkalmazásával még három sejt esetében próbálkoztunk, és a kapott eredmények a 13. ábrán bemutatottak tökéletesen megfeleltek.

3.1.3. Diszkusszió

A bushy-sejtek a nervus acusticus rostjain beérkező AP-sorozat hatására olyan tüzelési mintázatot produkálnak, ami fiziológiás körülmények között igen hűen, általában tévesztés nélkül követi a hallóideg egyes axonjainak aktivitását. A témával foglalkozó szerzőket régen foglalkoztatja a kérdés, hogy a bushy-sejtek igen sajátos viselkedésének hátterében milyen áramok és csatornaalegységek játszanak meghatározó szerepet. A korábban végzett kísérletek alapján számos adat állt rendelkezésre annak vonatkozásában, hogy a bushy-neuronok legalább három különböző típusba sorolható K^+ -áram produkálására képesek (tranziens, lassan inaktiválódó DTX-érzékeny és késői típusú K^+ -áramok), de csupán meglehetősen hézagos ismeretekkel rendelkezünk annak vonatkozásában, hogy ezek kialakításáért vajon milyen alegységek felelősek.

Enzimatikusan izolált bushy-sejteken végzett kísérleteink eredményeit összegezve elmondható, hogy a bushy-neuronok valamennyi olyan Kv-alegységet expresszálják, amik alacsony aktivációs küszöbű, DTX-érzékeny K^+ -áram kialakításában vesznek részt (Kv1.1,

Kv1.2 és Kv1.6); bár azok hozzájárulása a makroszkópos, DTX-érzékeny áram létrehozásához nem azonos. A késői típusú áramot létrehozó alegységek közül a Kv3.1b-, a Kv1.3- és a Kv3.2-alegységek jelenléte tűnt jelentősnek; a tranziens K^+ -áramot kialakító alegységet tekintve pedig a Kv3.4-, Kv4.2- és Kv4.3-típusok jelenléte volt igazolható, miközben a Kv1.4-alegységek kifejeződését nem tapasztaltuk számottevő mértékben. Figyelmet érdemel továbbá, hogy a TASK-1-csatornák nem pusztán mRNS, de fehérje szinten is jelen vannak a bushy-sejtekben.

A kísérletek jellegéből fakadóan a legfontosabb feladat a bushy-sejtek egyértelmű azonosítása volt. Mivel a munka egyes megállapításainak pontos interpretációjához alapvetően fontos volt annak igazolása, hogy a kísérletek valóban bushy-sejteken történtek, ezen állítás alátámasztására több módszert is alkalmaztunk. Az izolált sejteket egy igen szigorú szelekciós procedúra végén azonosítottuk, és csak a feltételek maradéktalan teljesülése esetében tekintettük őket bushy-neuronoknak. Az eredmények ellenőrzésének egy további lényeges módja volt, hogy egyes alegységek expresszióját úszószelet preparátumok alkalmazásával is ellenőriztük, ahol a bushy-sejtek típusos lokalizációja a nucleus cochlearison belül jelentősen segítette egyértelmű azonosításukat. Ezen túlmenően sor került a túlélő agyszeletekben található bushy-sejtek elektrofiziológiai vizsgálatára is, melynek során a tranziens K^+ -áramok kialakulásáért felelős alegységek (Kv3.4, Kv4.2 és Kv4.3) jelenlétét funkcionális módszerekkel, megfelelő alegység-specifikus gátlószerek alkalmazásával is elvégeztük. Ezen kísérletek során a bushy-neuronok azonosítására a pipettaoldatban alkalmazott Lucifer Yellow-val történő feltöltéssel került sor. Az eredményeink valódiságának megerősítésében a végső lépését az jelentette, hogy a munka során tudatosan alkalmaztunk olyan alegységekre specifikus antitesteket is, melyek jelenlétét más szerzők így vagy úgy már dokumentálták (Kv3.1, Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.6; valamint a Kv1.4-expresszió hiánya), így ezek „indikátor”-alegységekként szolgálhattak. Összefoglalásként elmondható, hogy bár az izolált sejtek alkalmazása és a sejtszuspenzióban található neuronok pontos azonosítása sok ponton rejti magában a tévedés lehetőségét, mivel az egyes technikákkal kapott eredmények tökéletesen összecsengtek, a dolgozat ezen részében leírt eredmények minden bizonnyal a valóságot tükrözik.

A bushy-neuronok működésében és a rájuk jellegzetes tüzelési mintázat kialakításában igen jelentősnek tűnik a Kv3.1-alegységek jelenléte és hozzájárulása az általános membránsajátságokhoz. Ez a késői típusú áramot kialakító csatornaalegység különösen jelentős az akciós potenciálokot követő gyors repolarizáció biztosításában, ezáltal felruhazza a sejtet a nagy frekvenciájú akciós potenciálok tüzelésének képességével. Elsőként Perney és

Kaczmarek (1997) számolt be a Kv3.1-alegység jelenlétéről a bushy-sejtekben mind mRNS, mind fehérje szintjén, majd több szerző is megerősítette ezen alegység expresszióját (Wang és munkatársai, 1998; Li és munkatársai, 2001). A jelen munkában a Kv3.1-alegységeket felismerő antitesteket döntően „indikátor”-antitesteknek tekintettük, hiszen (elképzelésünk szerint) a korábban leírt intenzív pozitivitásnak egyértelműen kellett jeleznie a bushy-neuronokat, mind az izolált sejteket tartalmazó preparátumban, mind a túlélő agyszeletekben.

A jelen disszertáció originális eredményének számít annak felismerése, hogy bár a Kv3.1-alegységek a legjelentősebbek a bushy-neuronok késői típusú áramának kialakításában, ezt a funkciót nem egyedül végzik. A bushy-sejtek által mutatott, a Kv3.1-alegységeknél gyengébb, de egyértelműen megfigyelhető Kv1.3- és Kv3.2-pozitivitás arra enged következtetni, hogy ezen alegységek is hozzájárulhatnak a késői típusú K^+ -áramok kialakításához, így a megfelelően gyors repolarizáció biztosításához is. Ismeretes, hogy a Kv1.3-alegységek által létrehozott K^+ -csatornák alacsony aktivációs küszöbű, lassan inaktiválódó áramot hoznak létre, aminek különösen fontos szerepe van az akciós potenciálok alakjának meghatározásában és a gyors repolarizációban. Ezen túlmenően egyes sejtekben a Kv1.3-alegységekből összeszerelődő ioncsatornák hozzájárulnak az őket expresszáló sejtek hosszantartó, tónusos aktivitásának fenntartásához (Kupper és munkatársai, 2002). Szemben a Kv1.3-alegységek által kialakított csatornákkal, a Kv3.2-alegységeket hordozó K^+ -csatornák erőteljes depolarizáció hatására aktiválódnak, és az őket expresszáló sejteknek hasonló sajátságokat kölcsönöznek, mint a Kv3.1-alegységek jelenléte.

Wang és munkatársai (1994), valamint Grigg és munkatársai (2000) mRNS-szintű vizsgálataik alapján valószínűsíthető volt, hogy a bushy-neuronok a Kv3.1-alegységek mellett jelentős mennyiségben expresszálhatják a Kv1.1- és Kv1.2-alegységeket is. Ezzel a felvetéssel összecseng, hogy Dodson és munkatársai (2003) erős Kv1.1- és Kv1.2-, ugyanakkor lényegesen gyengébb Kv1.6-specifikus immunpozitivitást tapasztaltak a nucleus cochlearis ventralisban. Ugyanezen munkában megtörtént a Kv1.4-alegységek jelenlétének vizsgálata is, ám a szerzők nem találtak érdemleges immunpozitivitást a Kv1.4-alegységeket felismerő antitestek alkalmazása során. Egyes alegység-specifikus K^+ -csatorna blokkolókkal (Dendrotoxin-K és tityustoxin- $K\alpha$) végzett funkcionális vizsgálatok eredményei ugyancsak megerősítették, hogy a bushy-sejtek alacsony küszöbű K^+ -áramainak kialakításában Kv1.1-, Kv1.2- és Kv1.6-alegységekből felépülő heterotetramer csatornák vesznek részt (Dodson és munkatársai, 2003). A jelen disszertációban részletezett eredményeink értékes kiegészítést és megerősítést jelentik ezen korábbi adatoknak, hiszen az immuncitokémiai reakciók során

a bushy-neuronok erős Kv1.1- és Kv1.2-, ugyanakkor mérsékelt Kv1.6-pozitivitását tapasztaltuk.

Érdekes kérdés a DTX-érzékeny alegységek jelenlétének szerepe a bushy-sejtekre jellegzetes tüzelési aktivitás kialakításában és fenntartásában. A DTX-érzékeny áramra általánosan jellemző az igen nagymértékű feszültségérzékenység: már a neuronok nyugalmi membránpotenciáljának közelében aktiválódnak. Az így kialakuló áram lassú inaktivációt mutat, és komoly jelentősége lehet a spontán tüzelés megakadályozásában (Anderson és Harvey, 1988) – különösen olyan sejtek esetében, amik bizonyos HCN-alegységeket is expresszálnak. Tekintettel arra, hogy a bushy-neuronok bizonyosan rendelkeznek a h-árammal (Cuttle és munkatársai, 2001) ez a funkció komoly jelentőségű lehet ezen neuronok esetében is. A DTX-érzékeny áramok ezen túlmenően meghatározó jelentőségűnek tűnnek a gyorsan adaptálódó neuronális válasz kialakításában (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz and Trussel, 1998); DTX-jelenlétében a bushy-sejtek aktivitási mintázatához igen hasonló tüzeléssel jellemezhető corpus trapezoideum sejtek gyakran „tévesztettek”, azaz a stimuláció időbeli mintázatát nem követték a szokott hűséggel: elegendően nagy frekvencia alkalmazása esetén a beérkező impulzusok egy része nem váltott ki akciós potenciált. A legújabb adatok szerint a DTX-érzékeny áramoknak komoly szerepük lehet abban, hogy megakadályozzák az axoneredés túlzott ingerlékenységének (hyperexcitabilitás) kialakulását (Dodson és munkatársai, 2003).

Ismeretes, hogy a bushy-sejtek membránjának időkonstansa alacsony, ami nagy sebességű membránpotenciál-változást tesz lehetővé (Oertel, 1983; Manis és Marx, 1991). Részben a korábbi kísérletes adatok, részben a jelen munka alapján megalapozottnak tekinthető az a feltételezés, hogy a membrán alacsony időkonstansának és a gyors válaszkészségnek a kialakításában az alacsony depolarizációra aktiválódó, DTX-érzékeny K^+ -csatornák döntő jelentőségűek lehetnek. Ezen áramféleségek még komoly szerepet tölthetnek be a sejtek nyugalmi membránpotenciáljának viszonylag alacsony értéken (kb. -60 mV) tartásában is, amely hatások együttesen biztosíthatják a gyorsan adaptálódó tüzelési mintázat kialakulását (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998).

Eredményeink szerint a bushy neuronok számos olyan Kv-alegységet is expresszálnak, amik tranziens, gyorsan inaktiválódó (a korábbi terminológia szerint „A”-típusú) áram kialakítását végzik. Részben az immuncitokémiai, immunhisztokémiai adatok, részben a Kv3.4- és Kv4.2/4.3-alegységekre specifikus gátlószerekkel végzett funkcionális kísérletek világítottak rá arra, hogy a bushy-sejteken kialakuló tranziens K^+ -áram kialakulásához mind Kv3.4-, mind Kv4.2/4.3-alegységeket tartalmazó K^+ -csatornák aktivitása hozzájárul;

ugyanakkor a Kv1.4-alegység jelenléte és jelentősége elhanyagolható. A Kv4-családba tartozó alegységek bushy-sejtek membránjában való jelenlétére utaló adatok kiváló összhangban vannak azon korábbi eredményekkel, amik szerint a nucleus cochlearisban megtalálhatók egyes Kv4-családba tartozó alegységekre specifikus mRNS molekulák (*Fitzakerley és munkatársai, 2000*).

Fontos megjegyezni, hogy bár a tranziens áramot kialakító K^+ -csatornák összeszerelődésében döntően a Kv1.4-, Kv3.4-, valamint egyes Kv4-alegységek vehetnek rész (elsősorban a Kv4.2 és a Kv4.3; *Baldwin és munkatársai, 1991; Schroter és munkatársai, 1991; Serodio és munkatársai, 1994, 1996*), az egyébként tartós aktivitást és/vagy igen lassú inaktivációt mutató (azaz gyakorlatilag nem-inaktiválódó) Kv1-családba tartozó alegységek által létrehozott csatornák is inaktiválódhatnak, amennyiben hozzájuk ún. β 1-kiegészítő alegység kapcsolódik (*Retting és munkatársai, 1994; Sewing és munkatársai, 1996*). A jelen tanulmányban bemutatott (részben funkcionális) adatok alapján kijelenthető, hogy a bushy-neuronok tranziens áramának kialakításáért döntően Kv3.4- és Kv4.2/Kv4.3-alegységeket tartalmazó ioncsatornák vesznek részt, a Kv1-család egyes tagjainak lehetséges hozzájárulása a tranziens áramhoz csak kis jelentőségűnek tűnik.

Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy a hallórendszer több sejtípusa is rendelkezik a tranziens K^+ -áram produkálásának képességével; egyebek között a cochlearis szemcsesejtek (*Rusznák és munkatársai, 1997*), és a madarak nucleus magnocellularisának neuronjai (*Rathouz és Trussel, 1998*). Igen érdekes azonban, hogy egy viszonylag újkeletű tanulmányban tengerimalac nucleus cochlearisából enzimatikusan izolált, bushy-neuronként azonosítható sejteken nem tapasztalták inaktiválódó K^+ -áram jelenlétét (*Rothman és Manis, 2003*), ami arra enged következtetni, hogy ezen áramkomponens jelenléte jelentős faji különbségeket mutathat. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés is, hogy laboratóriumunkban számos esetben sikerült a patkány nucleus cochlearisából enzimatikusan izolált, bushy-sejtként azonosított neuronokról tranziens K^+ -áramot elvezetni.

Fontos megemlíteni, hogy az A-típusú K^+ -áram jelenlétének vagy hiányának és megoszlásának esetleges faji különbözőségei a hallórendszer más területén is komoly gondot jelentenek. A nervus acusticus rostjainak sejttestjét képező ganglion spirale neuronok esetében például a mai napig parázs vita zajlik arról, hogy vajon ezen neuronok expresszálják-e (és ha igen, milyen megoszlásban) az A-típusú K^+ -áram kialakulásáért felelős ioncsatornákat. Az irodalmat áttekintve azonban körvonalazódik az a (nem egészen meglepő) szituáció, hogy a tranziens áramkomponens jelenlétét leginkább a vizsgálati módszerek befolyásolják (a preparátum készítésének módszere; esetleges enzimexpozíció jelenléte; a

késői típusú K^+ -áramokat gátló szerek alkalmazása, ami felfedheti az egyébként „rejtett” tranziens áramkomponenst [Szabó és munkatársai, 2002]).

Bár mind a Kv3.4-, mind a Kv4.2/4.3-alegységek által kialakított csatornák tranziens K^+ -áramok kialakulásában vesznek részt, az így megjelenő áramok néhány igen fontos sajátosságukban jelentősen különböznek egymástól. Az egyik legfontosabb differencia, hogy a Kv4-alegységek által generált A-típusú áramot már kicsiny depolarizáció is aktiválja (Low voltage-activated vagy LVA A-áram). Ez az a tranziens áram, aminek létezéséről az elektrofiziológia olyan meghatározó személyiségei számoltak be elsőként mint Connor és Stevens (1971), valamint Neher (1971); és ezen komponens leírására gyakran alkalmazzák a „klasszikus” A-áram terminust. Az LVA A-áram aktiválódásának nagy jelentősége van az AP-sorozatokon belül az egyes csúcsok közötti intervallum (azaz a tüzelési frekvencia) meghatározásában. Mivel ezen csatornák a Na^+ -csatornák aktivációjához szükséges depolarizációnál kisebb membránpotenciál-változások alkalmazásakor már aktiválódnak, hatékonyan csökkenthetik a kialakuló tüzelési frekvenciát, és bizonyos körülmények között nagy jelentőségük lehet az első AP késleltetésének meghatározásában is (Rusznák és munkatársai, 1997; Shibata és munkatársai, 2000). Mindezen funkciók együttesen azt is jelentik, hogy az LVA tranziens K^+ -áram döntő befolyást gyakorol a szinaptikus válasz jellegére; sőt, mivel a csatornák aktivációja kisebb depolarizáció mellett történik, mint a Na^+ -csatornáké, bizonyos esetekben teljesen meg is akadályozhatják az serkentő hatású szinaptikus választ követő AP kialakulását.

A Kv3.4-alegységeket tartalmazó K^+ -csatornák ugyancsak erőteljes inaktivációs tendenciát mutatnak, azonban az ezen alegységek közreműködése által kialakított áram aktivációja lényegesen nagyobb depolarizációt igényel, mint az LVA-áramoké, így megalapozottnak tűnik a high voltage-activated (HVA) A-áram terminológia. A HVA-típusú A-áram legfontosabb funkciója, hogy jelentősen hozzájárul az AP-t követő repolarizáció kialakulásához, valamint (mivel a repolarizációs fázist követően a membránpotenciált erősen negatív tartományba mozdítja) lehetővé teszi a Na^+ -csatornák számára, hogy az inaktivált (és így nem aktiválható) állapotból a zárt állapotba menjenek át, alkalmassá téve őket repetitív aktivitás kialakítására. A HVA A-áram ezen túlmenően tompítja a retrográd irányban terjedő AP-k hatását, valamint hozzájárul a dendritfákon esetlegesen kialakuló Ca^{2+} -tüskék (feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák aktiválódása miatt kialakuló depolarizációk) lezárásához, amik egyébként komolyan befolyásolnák a kérdéses neuron által produkált aktivitási mintázatot (Martina és munkatársai, 2003). Lényeges megemlíteni, hogy mivel a HVA A-áram csak a Na^+ -csatornák megnyílását okozó depolarizációnál nagyobb mértékű

membránpotenciál-változás hatására aktiválódik, az ilyen áramot kialakító csatornák jelenléte és működése sohasem jár az AP kialakulásának megakadályozásával vagy késleltetésével, és az nem befolyásolja a beérkező szinaptikus potenciálok következtében kialakuló depolarizáció nagyságát vagy időviszonyait sem.

A bushy-sejtek Kv-expressziós mintázatának vizsgálata során tanulmányozott Kv-alegységekről eddig rendelkezésre álló információkat (legfontosabb biofizikai és farmakológiai sajátosságok, valamint a hozzájuk rendelt lehetséges funkciók) a könnyebb áttekinthetőség kedvéért az 5. táblázatban foglaltuk össze.

A bushy-sejtek TASK-1 immunpozitivitásának bizonyítását ugyancsak a disszertációban vázolt kísérletsorozat fontos eredményének tartjuk, ugyanis bár mRNS szintjén már igazolták ezen csatornák jelenlétét a hallórendszerben (*Karschin és munkatársai, 2001*), mi mutattuk meg első ízben, hogy a TASK-1-csatornákat valóban expresszálja a nucleus cochlearis egyik jellegzetes sejtípusa. A háttér K^+ -csatornák (így a TASK-1-csatornák) neuronális funkciójáról ismert, hogy alapvető fontosságúak a nyugalmi K^+ -permeabilitás szabályozásában, így döntően befolyásolják a sejtek bemenő ellenállását, így azok ingerlékenységét is. Mindezekből kiindulva feltételezhető, hogy a TASK-1-csatornák komoly szerepet tölthetnek be a bushy-sejtek alacsony bemenő ellenállásának, ezáltal a gyors válaszkészségük fenntartásában.

5. táblázat

A jelen disszertációban vizsgált Kv-alegységekből felépülő ioncsatornák által produkált K⁺-áramok fontosabb jellemzői

<i>Alegység</i>	<i>Aktiváció*</i>	<i>Inaktiváció</i>	<i>Farmakológia**</i>	<i>Klasszikus megnevezés</i>	<i>Lehetséges funkciók****</i>
Kv1.1	LVA	Nagyon lassú	4-AP > TEA ⁺ , DTX	Késői típusú, D-áram	<ul style="list-style-type: none"> • A spontán tüzelés megakadályozása (<i>Anderson és Harvey, 1988</i>) • Lehetővé teszi a gyorsan adaptálódó tüzelés kialakulását (<i>Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel 1998</i>) • Nehezíti vagy megakadályozza a hyperexcitabilitás kialakulását (<i>Dodson és munkatársai, 2003; Forsythe és Dodson, 2004</i>)
Kv1.2	LVA	Nagyon lassú	4-AP > TEA ⁺ , DTX	Késői típusú, D-áram	Ugyanaz, mint a Kv1.1 esetében
Kv1.3	LVA	Lassú	4-AP > TEA ⁺	Lassan inaktiválódó, késői típusú áram	<ul style="list-style-type: none"> • Meghatározza az akciós potenciál alakját • Lehetővé teszi a gyors repolarizációt • Lehetővé teszi tónusos (tartós) tüzelés kialakulását (<i>Kupper és munkatársai, 2002</i>)
Kv1.4	LVA	Gyors	Csak 4-AP***	A-áram	<ul style="list-style-type: none"> • Az A-áram „klasszikus” funkciói (<i>Connor és Stevens, 1971, Neher, 1971</i>): • Meghatározza az egyes akciós potenciálok között eltelt időtartamot, csökkenti a tüzelési frekvenciát • Beállítja a neuronális ingerlékenység mértékét • Meghatározza az akcióspotenciál-sorozat első tagjának késleltetését (<i>Rusznák és munkatársai, 1997; Shibata és munkatársai, 2000</i>) • Hozzájárul a szinaptikus jelek organizációjához
Kv1.6	LVA	Nagyon lassú	4-AP > TEA ⁺ , DTX	Késői típusú, D-áram	Ugyanaz, mint a Kv1.1 esetében
Kv3.1	HVA	Nagyon lassú	TEA ⁺ > 4-AP	Késői típusú áram	Ugyanaz, mint a Kv1.3 esetében (<i>Wang és munkatársai, 1998; Rudy és McBain, 2001</i>)
Kv3.2	HVA	Nagyon lassú	TEA ⁺ > 4-AP	Késői típusú áram	Ugyanaz, mint a Kv3.1 esetében

5. táblázat - folytatás

<i>Alegység</i>	<i>Aktiváció</i>	<i>Inaktiváció</i>	<i>Farmakológia</i>	<i>Klasszikus megnevezés</i>	<i>Lehetséges funkciók</i>
Kv3.4	HVA	Gyors	TEA ⁺ > 4-AP	A-áram	<ul style="list-style-type: none"> • Biztosítja a Na⁺-csatornák visszatérését az inaktívált állapotból (inaktívált→zárt átmenet), így • Lehetővé teszi a repetitív tüzelés kialakulását (<i>Hess és El Manira, 2001</i>) • Csökkenti a retrográd akciós potenciálok amplitúdóját és zavaró hatását • Felgyorsítja a „Ca²⁺-tüskék” megszűnésének ütemét (<i>Martina és munkatársai, 2003</i>)
Kv4.2	LVA	Gyors	Csak 4-AP	A-áram	Ugyanaz, mint a Kv1.4 esetében
Kv4.3	LVA	Gyors	Csak 4-AP	A-áram	Ugyanaz, mint a Kv1.4 esetében

*:LVA: Low voltage-activated; HVA: High voltage-activated

** : 4-AP – 4-aminopiridin; TEA⁺ – Tetraetil-ammónium; DTX – Dendrotoxin

*** : A gátlószerek szokványosan alkalmazott koncentrációtartományában

**** : A megállapítások döntően a homotetramer (és kisebb mértékben az adott alegységet is tartalmazó heterotetramer) csatornákra vonatkoznak

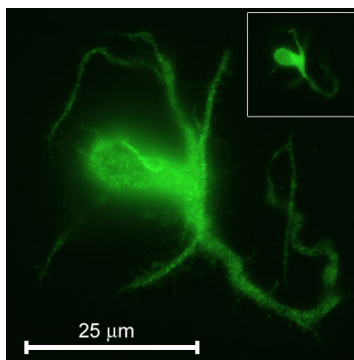
Egyéb megjegyzések:

- A táblázat első öt oszlopa a Coetzee és munkatársai (1999) által publikált áttekintés alapján készült.
- Az egyébként nem inaktiválódó Kv1-csoportba sorolható alegységek szintén közreműködhetnek inaktiválódó K⁺-áram kialakításában, amennyiben egy ún. „β1” kiegészítő alegységgel kapcsolódnak (*Rettig és munkatársai, 1994; Sewing és munkatársai, 1996*).
- Az egyes főcsoportokon belül lehetséges heterotetramer szerkezetet mutató csatornák összeszerelődése is, ami jelentősen módosíthatja a kész, funkcióképes csatorna által produkált ionáram általános jellemzőit.

A nucleus cochlearisban található projekciós neuronok (piramis, óriás-, octopus-, bushy- és Purkinje-szerű sejtek) ugyanazon bemenő információra igen különböző aktivitási mintázattal reagálnak, aminek nagy jelentősége van a hanginger egyes komponenseinek dekódolásában. A nucleus cochlearis működésének pontos megértéséhez igen fontos lenne annak tisztázása, hogy az adott sejtípus vajon miért éppen olyan tüzelési mintázatot produkál, amelyet. Nyilvánvaló, hogy az egyes neuronfélések különböző válaszkészségének hátterében több tényező is állhat: a rajtuk végződő szinapszisok lokalizációja, száma, minősége és nagysága, a sejttest és a nyúlványrendszer geometriája, valamint a belsőleges membránsajátosságok, melyek kialakításában meghatározó jelentőségűek a különböző (de döntően a feszültségvezérelt-) K^+ -csatornák. A jelen fejezetben bemutatott munka azzal a céllal készült, hogy megpróbáljunk összefüggést keresni az egyes sejtípusokra jellegzetes aktivitás és az általuk expresszált Kv-alegységek típusa, mennyisége és eloszlása között; remélve, hogy talán körvonalazódik egy olyan Kv-eloszlási mintázat, ami az egyes tüzelési mintázatok megjelenésével összefüggésbe hozható. Ebből fakadóan nyilvánvaló kell legyen, hogy ez a munka egy nagyobb, a nucleus cochlearis többi sejtípusát is felölelő vizsgálatsorozat első eleme volt. Meggyőződésünk, hogy az ezen részben bemutatott adatok értékes információt adtak a bushy-neuronok viselkedésének és működésének pontosabb megértéséhez, ám a kísérletsorozat továbbfolytatásához egy döntő, a metodikát érintő változást kellett tenni.

A bushy-sejtek vizsgálatához enzimatikusan izolált neuronokat alkalmaztunk, és bár a technika számos előnnyel járt (nem igényel nagy instrumentális háttérrel, a preadszorpciós kontrollal való összehasonlítás után lehetővé teszi az immunpozitivitás erősségének közvetlen megítélését), komoly fogyatékoságai is voltak. Szemben a bushy-sejtekkel, amik esetében sikerült egy olyan azonosítási algoritmust kidolgozni, amivel megbízhatóan lehetett a keresett sejteket identifikálni (hiszen semelyik más sejtípus nem rendelkezett kerek sejttesttel és két nyúlvánnyal), ez a megközelítés a többi neuronfélések vizsgálatához nem bizonyult alkalmazhatónak, így a korábban már definiált kísérleti célok megvalósításához az enzimatikusan izolált sejtek alkalmazása nem volt folytatható. A nehézségeket jól illusztrálja, hogy az octopus-sejtek esetében az összes kísérletet figyelembe véve csak a 14. ábrán bemutatott esetben sikerült olyan izolált neuronra bukkanni, ahol a morfológiai hovatartozáshoz biztosan nem férhetett kétség. A piramis- és az óriássejtek esetében sem volt sokkal jobb a helyzet, mivel a sejttest alakja mindkét esetben jórészt azonos, a soma mérete fiatal állatokban még nem olyan egyértelmű differenciálási szempont, a kérdéses sejtek pontos identifikálásához szükséges nyúlványrendszer pedig általában hiányzott.

A továbbblépés lehetőségét az úszószelet technika rendszeres alkalmazásában láttuk, hiszen itt mind a pontosan megőrzött morfológiai jegyek, mind a neuronok lokalizációja komoly segítséget nyújthatott a pontos és egyértelmű sejtazonosításhoz. A szisztematikusan végzett kísérletek során azonban egy új problémával kellett szembesülnünk: az egyes antitestek alkalmazása során a neuropil gyakran mutatott olyan intenzív jelölődést, hogy az gyakorlatilag teljesen elfedte az egyedi neuronok sejttestét és nyúlványrendszerét egyaránt. Mivel az ilyenkor alkalmazható, szokásos „praktikák” (vékonyabb szelet készítése, hígabban alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek, stb.) nem eredményeztek gyökeres javulást, olyan techniká(ka)t kerestünk, amivel vagy amikkel lehetségesnek tűnt egyedi neuronok vagy egy-egy típusba sorolható neuronpopuláció jelölése. A lehetséges megoldások között bukkantuk egy fluoreszcens jelölőanyag, a rodamin alkalmazásának lehetőségére, ami azért tűnt különösen kecsegtetőnek, mert a festéket az agytörzs megfelelő pontján végzett laesioba juttatva az axon mentén mind antero-, mind retrográd irányba szállítódott, ezáltal feltöltötte a sérült axonokhoz tartozó neuronok sejttestét is. A technika alkalmazásával így lehetségesnek tűnt az egyes csoportba tartozó nucleus cochlearis neuronok szelektív jelölése.



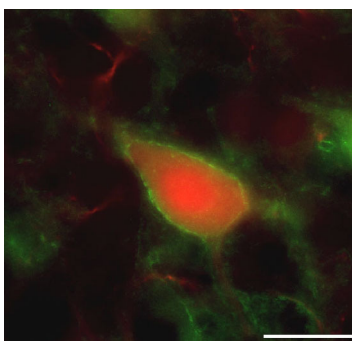
14. ábra

Calretinin-specifikus immunfestés eredménye enzimatikusan izolált nucleus cochlearis octopus-sejten

Az ábrán jól megfigyelhetők az octopus-sejtekre jellegzetes morfológiai jegyek: az elnyújtott sejttest és a jellemző módon a soma egyik oldalából kiinduló nyúlványrendszer. A felső kép ugyanazt a sejtet mutatja, de ebben az esetben a sejttest van a fókuszban.

Amint azt a 15. ábra egy rodaminos töltéssel láthatóvá tett, majd Kv3.1-specifikus immunjelölésen átesett óriássejt példáján mutatja, a megfelelő helyen alkalmazott laesioba juttatott rodammal való retrográd jelölés, valamint az így nyert agyszeleteken végzett immunfestés valóban hasznosan segítette az egyedi sejtek azonosítását, és azok fehérjeexpressziójának vizsgálatát. Hamar be kellett azonban látnunk, hogy konvencionális fluoreszcens mikroszkópot alkalmazva nem leszünk képesek minden sejtípus esetén

elfogadható minőségben dokumentálni egyes Kv-alegységek jelenlétére vagy hiányára utaló immunhisztokémiai eredményeinket. A megoldást csak a konfokális mikroszkópia rutinszerű használata jelenthette, így a továbbiakban a figyelmünket a rodaminnal láthatóvá tett nucleus cochlearis neuronok konfokális analízisének szenteltük. Ezen vizsgálatokat elkezdve azonban azzal kellett szembesülnünk, hogy a nucleus cochlearis egyes sejtalakjainak egyértelmű azonosítása még akkor sem mindig triviális, amikor a morfológiai megjelenés egyértelműnek tűnik. Tekintettel arra, hogy a nucleus cochlearis neuronok elektrofiziológiai vizsgálata során gyakran alkalmazott Lucifer Yellow-val történt feltöltés után is hasonló morfológiai jegyeket mutattak, mint a rodaminnal történő jelölést követően, felmerült annak az igénye, hogy egy jól alkalmazható sémát dolgozzunk ki az egyedi neuronok minél biztosabb azonosítására. A cél elérése érdekében egy meglehetősen részletes konfokális mikroszkópos analízist végeztünk, aminek mikéntjéről és eredményeiről a disszertáció következő fejezete számol be.



15. ábra

Kv3.1-specifikus immunreakció piramis-sejten rodaminnal történő jelölést követően

Az ábra rodaminnal történt retrográd jelölés és Kv3.1b-specifikus immunfestés kombinált alkalmazásának eredményét mutatja. Jól látható egy rodaminnal (piros) sikerrel töltött óriássejt somája, valamint sejt felszíni membránjának intenzív, Kv3.1-specifikus jelölése (zöld). Kalibráció: 25 μ m.

3.2 A nucleus cochlearis főbb projekciós neuronjainak morfológiai jellemzése rodaminnal történt retrográd jelölés után

3.2.1. Bevezetés

A nucleus cochlearis általános szerkezetére és az egyik jellegzetes sejt típusra, azaz a bushy-sejtekre vonatkozó legfontosabb információkat a disszertáció 1.3. és 3.1.1. fejezeteiben már részleteztük, így a jelen részben csak az azokban nem tárgyalt ismeretek tárgyalására szorítkozunk.

A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak morfológiájára és funkcióira vonatkozó kérdések vizsgálata régóta képezi tárgyát a hallás központi idegrendszeri folyamatait tárgyaló értekezéseknek és tanulmányoknak. A projekciós neuronok egyike, az ún. octopus-neuron a pVCN-ben található, nevét onnan kapta, hogy nyúlványai a polip megszokott ábrázolásához hasonlóan egy irányba rendeződnek (14. ábra; *Osen, 1969*). A processzusok ezen elrendeződésének jelentősége akkor válik igazán világossá, ha figyelembe vesszük, hogy a pVCN-en áthaladó nervus acusticus rostköteg igen kis átmérőjűre szűkül, így az octopus-sejtek cochlearis rostok közé benyúló, azokra merőleges dendritjei számos axonnal egyidejűleg tudnak kapcsolatot létesíteni. Ismert, hogy az octopus-sejtek bemenő ellenállása igen alacsony, ezért rajtuk igen gyorsan kialakuló és rövid ideig tartó postsynapticus potenciálok alakulnak ki, így egy octopus-neuron akkor és csak akkor tüzel AP-t, ha a hozzá érkező axonokon az ingerületi folyamat igen szűk időtartamon belül, szinkron zajlik le. Ezen megfontolás alapján az octopus-sejteket „koincidencia-detektoroknak” tekintik. A sejtek az információt a stria acustica intermediában kilépő axonjaik révén a felső oliváris magcsoport sejtjeihez juttatják.

A VCN területén elszórtan található, feltehetően több alcsoportra bontható ún. stellate-sejtek ugyancsak a mag projekciós neuronjai közé tartoznak. Egyes adatok szerint e sejtek spontán aktivitással is rendelkeznek (*Agar és munkatársai, 1997*), a hallópálya felől érkező afferens ingerlésre pedig sajátos válaszmintázattal reagálnak (*Rhode és munkatársai, 1983*). A sejtek egy része mindkét oldali colliculus inferiorba küld információt (T-típus), míg mások axonjai a magon belül a pVCN és DCN területén végződnek (D-típus, *Oertel és munkatársai, 1990*). A stellate-sejtek funkcionális jelentőségéről jelenleg nincs egységes elképzelés.

A DCN területén a neuronok rendezettsége lényegesen nagyobb fokú, mint a VCN-ben, aminek egyik jellegzetes megnyilvánulása a réteges szerkezet (jóllehet ennek mértéke fajonként eltérő, *Moore és Osen, 1979*). Az első sejtrétegben döntően a később tárgyalandó

szemcsesejtek találhatóak. A második sejtréteg legjellegzetesebb neuronjai a piramis-sejtek, melyek háromszögletű sejttestjének két pólusáról egy-egy dendritfa ered, a harmadik szöglet pedig az axon kiindulópontjának felel meg (*Lorente de No, 1933; Lorente de No, 1981; Webster és Trune 1982; Rhode és munkatársai, 1983*). A proximális dendritfa a mag felszíne felé, a külső szemcsesejtes rétegbe nyúlik, ahol az ezen sejtek parallel-rostjai által alkotott hálózattal szinaptizál. A DCN harmadik rétegébe nyúló disztális dendritfa és a sejttest az ezen magrészbe leszálló acusticus rostoktól kap bemenetet (*Kane, 1974; Schweitzer és Cant, 1984*). Ha tekintetbe vesszük, hogy a szemcsesejtekhez cochlearis, somatosensoros és magasabb központokból leszálló információk egyaránt eljutnak, a piramis-sejtek kettős afferenciációja egy jelentős integráció lehetőségét sugallja. Ugyanerre a következtetésre jutunk, ha megfontoljuk, hogy ezen neuronok többféle aktivitásmintázat generálására képesek (*Kanold és Manis, 1999*); sőt, az afferens ingerlés intenzitásától és jellegétől, valamint a nyugalmi membránpotenciál aktuális értékétől függően ugyanaz a neuron is megváltoztathatja aktivitási mintázatát. Arra a kérdésre azonban, hogy a piramis-neuronok ezen integratív működése a hallási információ feldolgozásának mely pontján jelentős, még nincs pontos válasz. A piramis-neuronok axonjai a stria acustica dorsalisban hagyják el a nucleus cochlearist és a colliculus inferiorban végződnek.

A nucleus cochlearis sejtjei közül a legnagyobb (akár 50-60 μm átmérőjű) sejttesttel az óriássejtek rendelkeznek. Jóllehet ezek a neuronok mind a VCN, mind a DCN területén megtalálhatók (*Osen, 1969*), általában a DCN projekciós neuronjaiként tartjuk számon őket, mivel a legnagyobb számban ezen magrész legmélyebb, belső rétegében mutathatók ki; igaz, fajoként változó mennyiségben (*Lorente de No, 1933; Harrison és Irving, 1965; Moore és Osen, 1979; Webster és Trune, 1982*). Egy-egy óriássejt dendritjeit igen nagy távolságra (500-600 μm) lehet követni, és azok szinte az egész nucleus cochlearist behálózzák. Ez az anatómiai elrendezés arra utal, hogy az óriássejtek mind közvetlenül az acusticus rostok jelentős hányadától, mind számos interneurontól kapnak és integrálnak bemeneteket (*Rhode és munkatársai, 1983*). Az óriássejtek az őket ért megfelelő intenzitású stimuláció hatására két utóhiperpolarizációs hullám által kísért AP-t tüzelnek, ami a stria acustica dorsalisban kilépő axonokon az ellenoldali colliculus inferiorba jut. Léteznek arra vonatkozó adatok is, hogy egyes óriássejtek axonjai az ellenoldali nucleus cochlearist is elérik (*Osen, 1972; Ryugo és munkatársai, 1981*). Ezen sejttípus kis száma és „rejtett” pozíciója miatt a működésére vonatkozó adatok száma csekély, így a hangérzékelésben betöltött szerepére vonatkozóan sincsenek megbízható elképzelések.

A DCN területén található az ún. Purkinje-szerű sejtek (PLC), amik nagy valószínűséggel ugyancsak a projekciós neuronok közé tartoznak. Mint arra nevük is utal, ezek a neuronok ontogenetikai rokonságban vannak a kisagy Purkinje-sejtekkel; sőt, egyes szerzők az egyedfejlődés során „eltévedt”, azaz ectopiás Purkinje-sejteknek tekintik őket (*Rossi és Borsello, 1993; Hurd és Feldman, 1994; Spatz, 1997*). A rendelkezésre álló irodalom szerint elsősorban rágcsőknél mutathatók ki, ahol a DCN legfelszínesebb rétegében, és meglehetősen kis számban találhatóak. A sejtek pozíciója olyan, hogy a soma a DCN felszíne felé néz, míg az igen nagy és dúsan elágazó dendritfa a mag belseje felé nyúlik. Rendkívül kevés adat áll rendelkezésre a PLC-k szinaptikus bemeneteire vonatkozóan. Annyi bizonyosnak látszik, hogy patkányban rostokat kapnak az alsó oliváris területről (*Rossi és Borsello, 1993*), de a magon belüli összeköttetések még ebben a fajban is gyakorlatilag ismeretlenek. Vannak ugyanakkor arra utaló adatok, hogy a PLC-k axonjai a kisagy magvakba juthatnak (*Spatz, 1997*). Kellő számú adat híján természetesen a PLC-k hallásban játszott szerepére egyelőre javaslatok sincsenek.

A fent bemutatott projekciós neuronok mellett a cochlearis mag nagy számban tartalmaz igen változatos morfológiájú interneuronokat is. Ezen sejtek esetén még a nomenklátúra sem teljesen egységes, a neuronhálózatokban betöltött szerepükről pedig alig-alig állnak rendelkezésre adatok. Lényegében csupán két olyan interneuron-típus van, ahol érdemi mennyiségű információt sikerült felhalmozni: a szemcse- és az ún. cartwheel-sejtek esetében. Előbbiek a mag egész területén megtalálhatók (*Mugnaini és munkatársai, 1980*), de legjellegzetesebb előfordulásuk a DCN felszíne és a DCN/VCN határterület. A szemcse-sejtek kicsiny, mindössze 6-8 μm átmérőjű neuronok, funkcionális jelentőségükről a piramis-sejtek kapcsán már említést tettünk. Ugyancsak a piramis-sejtek működésének modulálásában van szerepe a cartwheel-sejteknek, amelyeket az irodalom gátló interneuronoknak tart, jóllehet abban eltérőek a vélemények, hogy GABA-erg vagy glicinerg sejtekről van-e szó (*Mugnaini, 1985; Adams és Mugnaini, 1987; Gates és munkatársai, 1996*). A cartwheel-sejtek funkcionális jelentőségét az adja, hogy mind az acusticus, mind a parallel-rostoktól bementet kapnak, és gátló hatást fejtenek ki a piramis-sejtekre valamint (nagy valószínűséggel) az óriássejtekre (*Wouterlood és Mugnaini, 1984*). Immuncitokémiai sajátásaik és összeköttetések jellege alapján sokan úgy tekintik őket, mint a kisagy Purkinje-sejtek funkcionális analógjait (*Oertel és Young, 2004*).

Nyilvánvaló, hogy egy olyan komplex struktúra, mint a nucleus cochlearis esetében a képlet egészének funkciója csak akkor érthető meg, ha elegendő mennyiségű adat áll rendelkezésre az egyes elemek (azaz a különböző sejtípusok) viselkedésére és vélhető

funkciójára vonatkozólag. Annak érdekében azonban, hogy a nucleus cochlearist felépítő sejttípusokhoz egyértelmű funkcionális adatokat rendelhessünk alapvető azok pontos és nagy biztonsággal történő azonosítása; függetlenül attól, hogy funkcionális (patch-clamp) vagy immunhisztokémiai kísérletek történtek. Az egyedi neuronok morfológiai leírása, azok azonosítása és/vagy klasszifikációja a kísérletes neurobiológia régi problémája, aminek megkönnyítésére az utóbbi évtizedekben sokféle vizualizációs technika született, beleértve a különböző impregnációs eljárásokat, és a sejtek feltöltését célzó módszereket. Az általánosan használt technikák hatékonyak lehetnek ugyan, de gyakran van valamilyen hátrányuk: egyes módszerek nagy számú neuron egyidejűleg történő jelölésére alkalmasak, ám nem adnak információt a funkcionális sajátosságaikról; mások alkalmasak a morfológia-funkció kapcsolatának megítélésére, de csak kis számú sejten.

Az egyes sejtfeleségek (köztük a neuronok) funkciójának pontosabb megértését számos esetben hatékonyan segíti a sejtfelszíni membránjukban vagy a cytoplasmájukban található fehérjék (receptorok, ionsatornák, transzporterek, pufferfehérjék, neurotranszmitterek szintézisét végző enzimek) jelenlétének, minőségének és lokalizációjának leírása. Az ezen cél érdekében végzett vizsgálatok gyakran valamilyen immunhisztokémiai jelölés és fluoreszcens mikroszkópia kombinált alkalmazásával történnek, aminek révén valamennyi olyan neuron és egyéb képlet láthatóvá tehető, amik a kérdéses (cél)fehérjét tartalmazzák. Az ilyen eljárások használata során azonban alapvető és megkerülhetetlen követelmény, hogy a kérdéses fehérjére pozitívást mutató struktúrák és sejttípusok a lehető legbiztosabban azonosíthatók, identifikálhatók legyenek. Intracelluláris jelölés alkalmazása gyakran tár fel olyan morfológiai azonosító jegyeket, amik alapján a kérdéses sejttípus többé-kevésbé egyértelműen azonosítható, de a sejtfelszíni antigéneket jelölő antitestek alkalmazása gyakran eredményez olyan szituációt, hogy a jelölt sejt morfológiai hovatartozása nem dönthető el egyértelműen.

A nucleus cochlearist felépítő neuronfeleségek morfológiai azonosítása akkor valósítható meg a legkönnyebben, ha mód van a kérdéses sejt esetében a soma alakjának és nagyságának meghatározására, a nyúlványok számának, lefutásának és lokalizációjának megítélésére, a sejttípus nucleus cochlearison belül elfoglalt helyzetének leírására, valamint (különösen a projekciós neuronok esetében) az axonok célpontjainak meghatározására. Számos esetben azonban ezen információknak csak a töredéke áll rendelkezésre, és így kell a sejttípusra vonatkozó döntést meghozni; ilyenkor azonban a lehető legteljesebb mértékben tisztában kell lennünk azzal, hogy az egyes részinformációk milyen súllyal esnek latba a klasszifikálás folyamata során. Könnyű belátni, hogy egy-egy jól sikerült kísérlet során

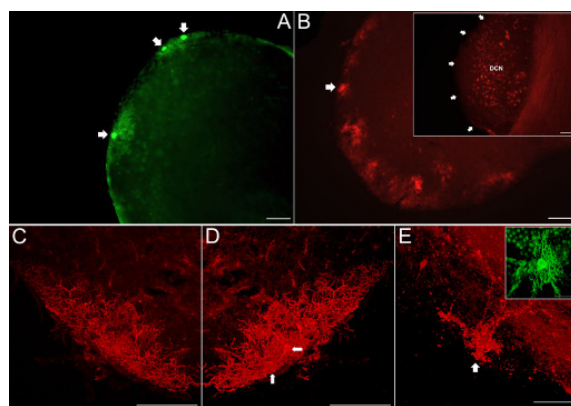
különösen fontos a sejt azonosítása, és igen kellemetlen, ha a rendelkezésre álló adatok alapján ez nem végezhető el kellő bizonyossággal – ilyenkor természetesen igen nagy a téves klasszifikáció esélye.

Az egyértelmű sejtazonosítással összefüggő problémák gyakran jelentkeznek a túlélő vékonyselet-preparátumon történő funkcionális vizsgálatok során is, amikor a vizsgált sejt morfológiai hovatartozásának egyértelmű meghatározása alkalmanként igen nehéz lehet. A szeletben elhelyezkedő neuronok vizualizációja differencia-interferencia kontraszt mikroszkópiával történik, ám ez az eljárás jórészt csak a sejttest láthatóvá tételére alkalmas, ami elegendő ugyan a sejtek mikroelektrodával történő megközelítésére és a megfelelő sejt-mikroelektrod kontaktus kialakítására, de mivel a nyúlványokat csak igen korlátozottan képes megjeleníteni, az egyértelmű és biztos sejtazonosítás ezen technika révén általában nem lehetséges. Gyakran alkalmazott (és a disszertáció előző részében már ismertetett) technika, hogy a kísérlet során valamilyen fluoreszcens festékkel töltjük fel a vizsgálandó sejteket, ami jelentősen növeli a sejtazonosítás esélyeit, de az még így is nagyon nehéz (ha nem lehetetlen) lehet, mert a preparálás során sérülhet a sejtekre jellegzetes nyúlványrendszer; de az is könnyen megeshet, hogy a metszési sík nem teszi lehetővé az egyértelmű sejtazonosítást, mert a sejt nyúlványai döntően a sejttest mögött, azaz „takarásban” vannak.

Annak érdekében, hogy a nucleus cochlearis különböző neurontípusainak egyértelmű azonosításához kellő információra tegyünk szert, a disszertáció jelen részében rodamin segítségével feltöltött nucleus cochlearis neuronok morfológiai analízisét végeztük el, döntően konfokális mikroszkópia alkalmazásával. A sejtek rodaminos jelölése információt nyújtott azok projekciós útvonaláról és lehetővé tette azok izolált feltöltését, aminek révén megítélhető volt a nucleus cochlearison belül elfoglalt helyzetük. A konfokális mikroszkópia az egyedi sejtek vizualizálásán túl lehetőséget teremtett a sejtek térbeli struktúrájának rekonstrukciójára, valamint azok tetszőleges irányból történő vizsgálatára is. A vizsgálat sorozat egyik legfontosabb célja annak megállapítása volt, hogy az egyes projekciós neuronokat nem „ideális” síkban vizsgálva vajon mekkora a tévesztés lehetősége a morfológiai hovatartozás meghatározása során. Szerettünk volna továbbá néhány általánosan használható szempontot kijelölni, aminek révén lehetővé válhatott a könnyebb sejtazonosítás a nucleus cochlearisban, akár részinformációk alapján is. Végül választ szerettünk volna kapni arra a régi kérdésre is, hogy a Purkinje-szerű sejtek projiciálnak-e a cerebellum területére.

3.2.2. Eredmények

A nucleus cochlearis komplex egyik legérdekesebb sejttypusát a Purkinje-szerű sejtek képezik (16. ábra). A PLC-k erőteljes calbindin-pozitivitását (Spatz, 1997) kihasználva azok könnyen láthatóvá tehetőek voltak (16A). Amint azt a nyilak jelzik, a PLC-k többé-kevésbé gömb alakú sejttesttel (átmérő: $32 \pm 4 \mu\text{m}$ [n = 8]) és rendkívül gazdagon elágazó dendritfával rendelkeztek. A sejtek igen aszimmetrikusak voltak, mivel a nyúlványok a nucleus cochlearis középpontja irányába haladtak, ugyanakkor a sejttest a DCN legfelszínesebb rétegében helyezkedett el (Hurd és Feldman, 1994). A PLC-k sejttestéből változó számú (1-8) nyúlvány eredt (az egyes nucleus cochlearis neuronok morfológiai jellemzőit a 6. táblázatban foglaltuk össze).



16. ábra

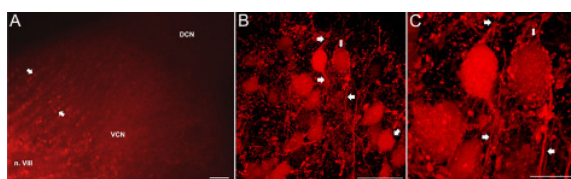
Patkány nucleus cochlearis dorsalis Purkinje-szerű sejtjeinek morfológiája és retrográd jelölése

A: Három, a DCN felszínén elhelyezkedő PLC kis nagyítású képe (nyilak; calbindin-specifikus immunfestés; konvencionális fluoreszcens mikroszkóppal felvett kép). **B:** A pedunculi cerebellaris területén ejtett sebzésekben alkalmazott rodamminal történt jelölés után tapasztalt kép. Nyíl mutatja az egyik jelölődött struktúrát, amiről valószínűsíthető, hogy részét képezi egy PLC dendritfájának. A kisebb kép a középvonalban ejtett laesio után tapasztalt jelölődési mintázatot demonstrálja, nyilak jelzik a DCN határát. Ebben az esetben felszíni jelölődés nem tapasztalható, ugyanakkor tisztán kivehető a DCN egyéb projekciós neuronjai. **C-D:** Calbindin-specifikus immunreakció eredménye a DCN-ben. Jól látható két egymás közelében elhelyezkedő PLC részben átfedő, rendkívül gazdagon elágazó dendritfája. A **D** kép a **C** részen bemutatott terület 180° -kal történő elforgatása után készült, amely esetben a két PLC sejtteste is láthatóvá vált (nyilak). **E:** Egy rodamminal feltöltött, a mag felszínének közelében elhelyezkedő PLC nagy nagyítású, összegzett konfokális képe. Nyíl mutatja a sejttest legvalószínűbb helyzetét, ami a dúsán elágazó, a somát részben elfedő dendritfa miatt csak igen nehezen volt megítélhető. A kis kép egy olyan calbindin-specifikus immunreakció eredményét demonstrálja, amikor csak egyetlen PLC azonosítható a vizsgált területben. Kalibráció: $100 \mu\text{m}$ (A, B, C, D), $50 \mu\text{m}$ (E).

Korábbi tanulmányok felvetették, hogy a PLC-k a cerebellumba projiciálhatnak (Spatz, 1997), így ezen sejtek szelektív jelölését a pedunculi cerebellaris területén ejtett metszésekben alkalmazott rodamin alkalmazásával kíséreltük meg elvégezni. Ezen

beavatkozás eredményeként, kifejezetten foltos megoszlást mutató, a DCN felszínén megjelenő jelölési mintázat kialakulását tapasztaltuk (16B), melynek megjelenése igen hasonlatosnak bizonyult a calbindin-specifikus immunjelölés után tapasztalt képhez. Fontos megjegyezni, hogy amennyiben az agytörzs felszínén a corpus trapezoideum magasságában ejtettünk egy 5-8 mm mély ventro-dorsalis metszést, mind a piramis-, mind az óriássejtek erőteljesen töltődtek, ugyanakkor a DCN felszínének foltos megjelenésű jelölődése soha sem volt látható (16B ábra, kisebb kép). Bár ez a megfigyelés már önmagában is egyértelműen jelezte, hogy a PLC-k valóban a cerebellumba projiciálnak, a jelenség további megerősítését konfokális mikroszkópia alkalmazásával kíséreltük meg.

Amint az a 16C felvételen bemutatott konfokális kép megtekintése alapján egyértelművé válik, a PLC-k különlegesen dús dendritfája gyakran fedheti el a sejttestet: a bemutatott esetben is csak akkor vált a soma láthatóvá és megítélhetővé, amikor a rekonstruált képet a szelet másik felszíne felől vizsgáltuk meg (16D kép, nyilak; lásd még **Video_01**). A 16E felvételen egy olyan terület konfokális mikroszkópia alapján rekonstruált felvételét mutatjuk be, amit a megfelelő pozícióban alkalmazott rodaminnal történt retrográd jelölés után kaptunk; jól látható, hogy az így nyert kép megfelel a PLC-kre jellegzetes, igen dúsan elágazó dendritfának. A hasonlóság különösen nyilvánvalóvá válik, ha a bemutatott képet egy izoláltan elhelyezkedő PLC-n végrehajtott calbindin-specifikus jelölés eredményéhez hasonlítjuk (16E, kis kép). Bár a bemutatott esetben (16E) a sejttest pozíciója nem egyértelműen megítélhető, okkal feltételezhetjük, hogy az a dendritfák által elrejtve, a nyílal jelölt pozícióban lehet.



17. ábra

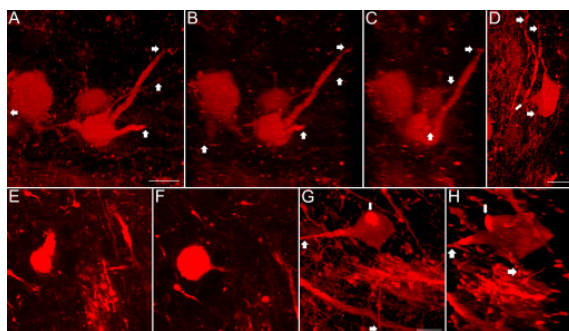
A bushy-sejtek területének retrográd jelölése

A: A bushy-sejtes régió kis nagyítású felvétele, közel a nervus acusticus nucleus cochlearisba történő belépéséhez (n. VIII). Nyilak mutatják a nervus acusticus intranuclearis rostjai között elhelyezkedő bushy-neuronok oszlopait; feltüntettük továbbá a DCN helyzetét is. **B:** Rodaminnal feltöltött bushy-neuronok nagy nagyítású, összegzett képe. A bal oldali sejt esetén vastag nyilak jelzik a soma átellenes pólusairól induló processzusokat. A vékony nyíl intenzív rodaminnal jelölődést mutató képleteket demonstrál, amik megfelelhetnek a nervus acusticus praesynapticus termináljainak. A balra irányuló vastag nyíl egy acusticus rostra mutat, ami eltűnik az egyik bushy-sejt mögött. A ferde nyíl egy másik, ugyancsak típusos megjelenésű bushy-neuront jelez. **C:** Két, a **B** felvételen bemutatott bushy-neuron nagyobb nagyítással készült képe. Kalibráció: 100 µm (**A**), 50 µm (**B**), 20 µm (**C**).

Mivel a bushy-sejtek egy része (a globularis bushy-sejtek) a corpus geniculatum laterale ellenoldali területébe projiciál, a bushy-sejtek jelölése akkor bizonyult a legkönnyebbnek, ha az ezen agyi területre tartó rostokat sértettük és jelöltük meg rodaminnal. A 17A ábra egy ilyen beavatkozás után készült kis nagyítású képet demonstrál. Ezekben az esetekben általában könnyen azonosíthatók voltak a nervus acusticus nucleus cochlearison belül futó, párhuzamosan rendezett kötegei között (nyilak) elhelyezkedő, hosszú sorokat formáló bushy-sejtek. Ezen kísérletekben a DCN jelölődése általában elhanyagolható volt, ugyanakkor az acusticus rostok egyértelmű festődést mutattak, ami különösen a hallóideg nucleus cochlearisba történő belépése környezetében volt erőteljes (n. VIII). Úgy gondoljuk, hogy ezen némileg váratlan jelenség magyarázatának háttérében a patkány agytörzsének kicsiny volta állhat. Bár a kísérletek során igen nagy gondot fordítottunk a rodamin kristályok megfelelő pozicionálására, az agytörzs felszínét borító nedvességben óhatatlanul bekövetkezhetett a festék diffúziója, és az így elérhette a nervus acusticus vágott csomóját is. A hallóideg vágott felszínére kerülő rodamin aztán az acusticus rostok ortográfiát jelölését okozhatta (amint az a 17B és 17C ábrán is jól megfigyelhető; lásd még **Video_02** és **Video_03**). Mivel az acusticus rostok ezen jelölődése nem hátráltatta a bushy-sejtek morfológiai analízisét, nem törekedtünk a jelenség kiküszöbölésére.

A nucleus cochlearisból készült szeleteket konfokális mikroszkóppal vizsgálva rekonstruálhatóvá váltak az egyes sejtek, amik megoszlása, alakja és mérete a bushy-neuronokra jellegzetes jegyeket mutatta. A sejtek gömb vagy kissé elnyújtott sejttesttel rendelkeztek (átmérő: $22 \pm 3 \mu\text{m}$, az egyedi értékek 18 és $25 \mu\text{m}$ között változtak; $n = 22$), amikből két nyúlvány eredt, általában a soma ellentétes pólusairól (17B és 17C, jobbra mutató vízszintes nyilak és a vastag ferde nyíl). A vékony nyállal jelölt szomszédos sejt ugyancsak erősen jelölődött, és jól megfigyelhetők a sejttest felszínét borító, intenzíven festődő, kifejezetten szemcsés megjelenést mutató képletek. Ezen struktúrák lokalizációja, valamint kapcsolatuk az acusticus rostokkal (balra mutató vastag nyilak) azt sugallta, hogy ezen képletek a nervus cochlearis rostok végződéseinek feleltek meg, amik a bushy-sejtekkel axosomaticus szinapszisokat képeztek. A kísérletek során egy kivétellel valamennyi bushy-neuronként azonosított sejt két nyúlvánnyal rendelkezett (6. táblázat). Valószínű, hogy az a bushy-sejt, aminek csak egy nyúlványát láttuk, valamilyen módon károsodott a szelet feldolgozása során, és a másik nyúlvány ezenközben elveszett. Ennek ellenére a sejttest elhelyezkedése, a sejt projekciója és egyéb morfológiai sajátosságai alapján a kérdéses neuron egyértelműen és kétséget kizáróan bushy-neuronként volt azonosítható.

Az octopus-neuronokat meglehetősen változatos morfológiai jegyeket mutató, de általában kissé elnyújtott sejtesttel rendelkező sejtekként azonosítottuk, a soma átlagos átmérője $26 \pm 4 \mu\text{m}$ volt (az egyes sejtek esetében mért értékek 18 és $32 \mu\text{m}$ között változtak; $n = 20$). A jelen tanulmány keretein belül vizsgált octopus-sejtek többsége három nyúlvánnyal rendelkezett, de voltak közöttük olyanok is, amik 2, 4 vagy 5 processzussal bírtak (6. táblázat). A 18A-C képek egy octopus-sejtként azonosítható neuron különböző irányokból megfigyelhető megjelenését ábrázolják, és módot adnak az octopus-neuronokra jellegzetes strukturális jegyek áttekintésére (lásd még **Video_04**). A 18A felvétel a sejt vertikális vetületét ábrázolja, ahol az octopus-neuronokra jellegzetes módon a sejt valamennyi processzusa (nyilak) ugyanazon irányba halad. A 18B képet úgy kaptuk, hogy a 18A felvételen látható sejtet elforgattuk az óramutató járásának megfelelően 30° -kal, így lehetővé vált a sejt vertikális dimenzióinak megítélése is. Jól látható, hogy az a két nyúlvány, ami a 18A képen közvetlenül egymás mellettinek tűnt, valójában egymás mögött helyezkedik el, egymástól egészen messze. Amikor a képet további 30° -kal elforgattuk (így a nyúlvány, ami a 18A képen jobbra haladt, most a papír síkját látszik elhagyni) az is kiderült, hogy a bemutatott octopus-sejt nyúlványainak kezdeti szakaszai meglehetősen vaskosak.



18. ábra

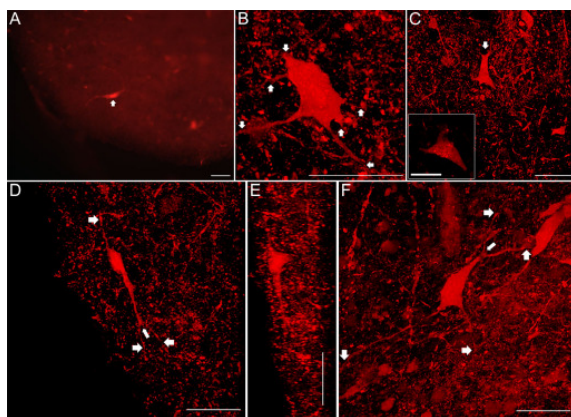
Az octopus-neuronokra jellemző morfológiai jegyek, és azok megtévesztő megjelenési formái

A-C: Ugyanazon octopus-sejtről, különböző irányokból készített összegzett konfokális felvételek. **A B** és **C** képeket az **A** felvételen látható sejt 30° és 60° -kal történő, az óramutató járásának megfelelő irányú elforgatásával kaptuk. **D:** Az octopus-neuronok típusos megjelenési formája. Vastag nyilak jelzik a sejt nyúlványait, a vékony nyíl egy olyan pontra mutat, ahol az egyik processzus egy rendkívül éles fordulatot tesz. **E-F:** Egy másik octopus-sejtről készített egyedi rétegfelvételek, annak tetejétől 6 (**E**) és 18 (**F**) μm -re. **G-H:** Az **E** és **F** felvételeken már bemutatott sejtről készült összegzett képek (**G:** vertikális nézet, **H:** a **G** kép 60° -kal az óramutató járásának megfelelően történt elforgatása után kapott felvétel, a sejtet a **G** felvételhez képest kissé felnagyítottuk). Nyilak jelzik a sejtből eredő nyúlványokat; a lefelé mutató nyíl egy sérült, csonkolt dendritre mutat. Kalibráció: $20 \mu\text{m}$.

A 18D kép egy másik típusos octopus-sejtet ábrázol; jól megfigyelhető az elnyújtott sejtest, valamint az annak egyik oldalából kiinduló számos nyúlvány (nyilak), melyek

mindegyike egy irányba halad (lásd még **Video_05**). Különösen érdekes látni, hogy az egyik processzus egy rendkívül éles, hegyesszöget alkotó kanyart ír le (vékony nyíl).

A 18E-H felvételek egy octopus-sejt igen komplex (és néha határozottan félrevezető) geometriáját hivatottak demonstrálni. A 18E és 18F felvételeken bemutatott optikai metszetek egymástól 12 μm -re készültek, és egy nagyjából kerek sejttestű neuront mutatnak, amiből egyetlen nyúlvány látszik eredni. A soma mérete, valamint az egyetlen, el nem ágazó nyúlvány könnyen keltheti azt a képzetet, hogy a kérdéses neuron egy bushy-sejt. Ezzel szemben ha az összerakott képre tekintünk, ez a vélekedés bizonyosan megváltozik, még akkor is, ha a sejt vertikális vetületét látjuk (18G), ahol két nyúlvány és egy, a sejttesten elhelyezkedő világos folt tűnik elő, mely utóbbit kezdetben meglehetősen nehéz értelmezni. Ha ezt a képet az óramutató járásával megegyezően elforgatjuk 60° -kal (18H), nyilvánvalóvá válik, hogy a sejttest nem kerek, hanem elongált, valamint hogy a neuron számos nyúlvánnyal rendelkezik, amik mindegyike a soma azonos oldaláról ered. Az így nyert képen az is megfigyelhető, hogy az előzőekben leírt világos folt egy csonkolt dendritnek felel meg.



19. ábra

A nucleus cochlearisban található óriássejtek lehetséges megjelenési formái

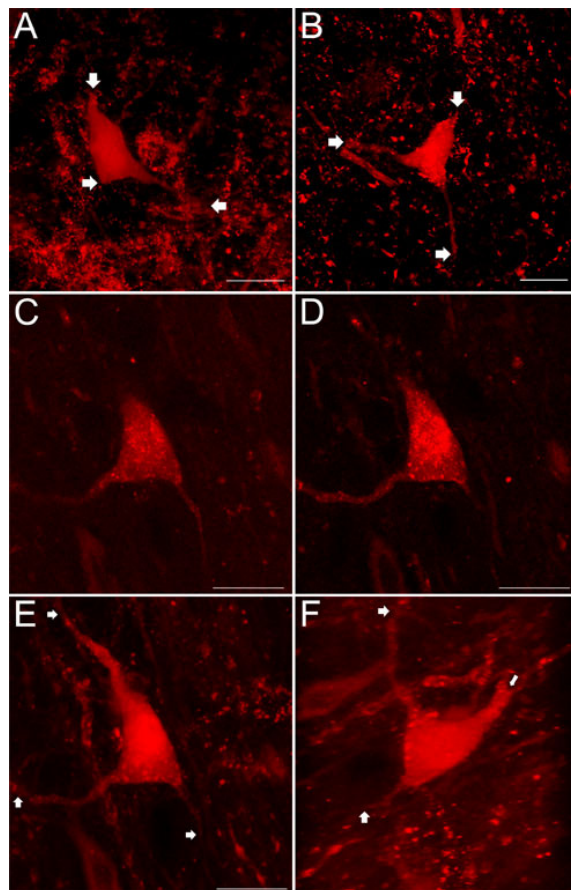
A: A DCN egy rodaminnal jelölt óriássejtjének kis nagyítású képe. **B:** Egy igen sok nyúlvánnyal rendelkező óriássejt összegzett felvételének vertikális nézete. Nyilak jelzik azon legtávolabbi pontokat, ameddig a nyúlványok követhetők. **C:** Egy fej nélküli állatra emlékeztető megjelenésű óriássejt. A nagy kép a sejt összegzett felvételének vertikális nézete. A nyíl a sejttest keskenyebbik részének közelében található bifurkációs pontra mutat. A kisebb kép ugyanezen sejt egyetlen optikai metszetének megjelenését ábrázolja, a bemutatott felvétel a sejt tetejétől 3 μm -re készült. **D:** Az óriássejtek egyik típusos orientációja, ami azok téves azonosítását okozhatja; a bemutatott esetben csak egy elongált sejttest látható. Vastag nyilak jelzik a somából kiinduló nyúlványokat, vékony nyíl mutatja az egyik nyúlvány sejttesthez közel bekövetkező bifurkációját. **E:** A **D** felvételen már bemutatott sejt egy másik nézete; az összegzett képet 54° -kal elforgattuk az óramutató járásának megfelelően. **F:** Egy óriássejt összegzett képének vertikális vetülete; nyilak jelzik azon legtávolabbi pontokat, ameddig a nyúlványok követhetők. A vékony nyíl az egyik nyúlvány sejttest közelében bekövetkező elágazódására mutat. Kalibráció: 20 μm (a **C** panel kisebbik képe); 50 μm (valamennyi egyéb felvétel).

A nucleus cochlearis talán legkönnyebben felismerhető sejt típusa az óriássejt (19A. ábra). Az óriássejtek hatalmas sejttesttel, és legalább három nyúlvánnyal rendelkeztek. A jelen munkában vizsgált óriássejtek legnagyobb átmérője $37 \pm 9 \mu\text{m}$ ($n = 31$) volt, az egyedi értékek $27\text{-}64 \mu\text{m}$ között változtak azaz a $60 \mu\text{m}$ -nél nagyobb átmérőjű óriássejtek nem szokatlanok a nucleus cochlearisban. Az esetek egy részében somájuk viszonylag vékony, polygonális volt (19B), és megfelelő szögéből rájuk tekintve gyakran egy fej nélküli állatra emlékeztettek (19C; lásd még **Video_06**). Bár az óriássejtek könnyen felismerhetőnek tűnnek (és általában valóban azok), a szeletben elfoglalt helyzetük és orientáltságuk alkalmanként megtévesztő morfológiával ruházhatja fel őket. Amint azt a 19C ábra kis képe mutatja, a nagy képen ábrázolt sejt felszínétől $3 \mu\text{m}$ -rel mélyebben készített optikai metszetben a sejt határozottan háromszögletű megjelenést mutat, aminek alakja (de még a nagysága is) kísértetiesen emlékeztet egy piramis-sejtre. Természetesen ilyen tévesztés a teljes preparátumokon, ahol a mikrométer-csavar segítségével áttekinthető a sejt teljes vertikális kiterjedése nem valószínű, egy néhány μm vastag beágyazott metszet esetén azonban az ilyen tévesztés esélye számottevőnek mondható.

Vizsgálataink során számos esetben találtunk olyan nagy sejttesttel rendelkező neuronokat, amelyek nem mutatták a szokásos polygonális alakot, hanem ehelyett határozottan elnyújtott, orsó alakú megjelenésük volt (19D). Ezekben az esetekben a sejt igazi mibenlétét csak az igen nagy longitudinalis méretük és egyik nyúlványuk sejttesthez közeli bifurkációja (19D, vékony nyíl) jelezte. A bemutatott esetben a sejttest valódi alakja csak akkor volt megítélhető, ha azt az óramutató járásának megfelelően elforgattuk 54° -kal (19E; lásd még **Video_07**). A 19F ábra egy másik óriássejtet mutat, amin ezen sejt típus valamennyi fontosabb morfológiai jellegzetessége megfigyelhető (lásd még **Video_08**).

A nucleus cochlearis piramis-neuronjai több szempontból is hasonlatosak az óriássejtekhez, és a két sejt típus elkülönítése gyakran okoz nehézséget. Mivel a piramis-neuronok is a stria acustica dorsalisban projiciálnak, ezen neuronok jelölését is az óriássejtek töltése során alkalmazott technikával értük el. Tekintettel arra, hogy a piramis-neuronok háromszögletű sejttesttel rendelkeznek, amiből három processzus ered, a piramis-neuronok nagyon hasonló megjelenést mutathatnak az óriássejtekhez, különösen, ha azok is három nyúlvánnyal bírnak (mely feltétel a jelen munka keretében tanulmányozott óriássejtek 50%-ára igaznak bizonyult). Ebben az esetben a két sejt típus csak a nucleus cochlearison belül elfoglalt helyzete (a piramis-sejtek a DCN második, a felszínnel párhuzamosan futó rétegében található; az óriássejtek pedig elszórtan, a nucleus cochlearis teljes területén

előfordulhatnak), és a sejttest mérete (a piramis-neuronok kb. 20 μm átmérőjűek, az óriássejtek ennél általában jóval nagyobbak) alapján különíthető el.



20. ábra

A nucleus cochlearis piramis- és óriássejtjei közötti hasonlóságok

A-B: Két piramis-sejt sejttestéről készült összegzett felvételek, vastag nyilak jelzik azon legtávolabbi pontokat, ameddig a nyúlványok jól követhetők. **C-D:** Egy óriássejtről készült egyedi optikai metszetek, amelyek a megtévesztésig emlékeztetnek a piramis-sejtekre (**C:** a kép a sejt tetejétől 7,15 μm -re, **D:** a kép a sejt tetejétől 9,30 μm -re készült). **E:** A **C** és **D** részekben bemutatott sejtről készített összegzett felvétel vertikális irányú nézete, nyilak jelzik a neuron nyúlványait. **F:** Ugyanaz, mint az **E**, de képet 41°-kal elforgattuk az óramutató járásának megfelelően. A felvételen az egyik nyúlvány sejttest közelében bekövetkező bifurkációja is tisztán kivehetővé válik (vékony nyíl). Kalibráció: 20 μm .

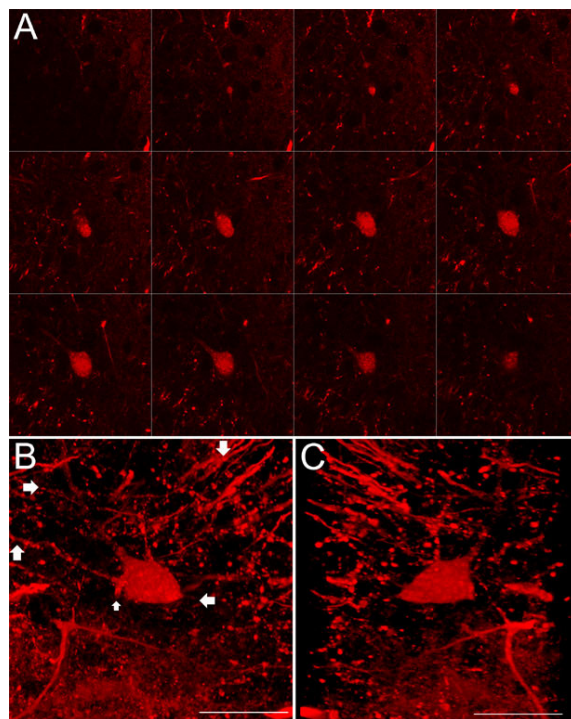
A sejttest átmérője magától értetődő azonosítási lehetőségnek tűnik, ami alapján az óriás- és a piramis-neuronok biztonsággal differenciálhatók. A jelen tanulmányban a piramis-neuronok átmérőjét $23 \pm 3 \mu\text{m}$ -nek találtuk ($n = 16$), ugyanakkor a három nyúlvánnyal jellemezhető (azaz a piramis-sejtektől legnehezebben elkülöníthető) óriássejtek somája ennél nagyobb, $34 \pm 7 \mu\text{m}$ ($n = 15$) volt. Ami még az átlagos értékeknél is fontosabb, a piramis- és a három nyúlvánnyal rendelkező óriássejtek sejttestének átmérője 18-27 μm (piramis-sejt) és 27-53 μm (óriássejt) között mozgott, aminek alapján biztonsággal kijelenthetőnek tűnik, hogy

a 25 μm -nél kisebb átmérőjű háromszögletű sejt legnagyobb valószínűséggel a piramis-sejtek közé, míg az ennél nagyobb neuron az óriássejtek csoportjába sorolandó.

A 20A és 20B ábrák két típusos morfológiát mutató piramis-sejtet demonstrálnak, mutatván a 20 μm átmérőjű, háromszögletű sejttestet és az ebből eredő három nyúlványt (nyilak; lásd még **Video_09**). A 20C-F ábrák egy óriássejtről különböző irányokból készített felvételeket demonstrálnak, amin jól látszanak a piramis-sejtekkel mutatott hasonlóságok. A 20C ábra a sejt felső felszínétől 7,15 μm -rel mélyebben készült. A felvétel kiválóan mutatja, hogy bizonyos esetekben nem pusztán az óriássejtek alakja, de még a mérete is hasonló lehet a piramis-sejtekéhez. A 2,15 μm -rel mélyebben készített optikai szelet (20D) már alkalmasabb a pontos sejtazonosításra, hiszen az ebben a síkban meghatározható átmérő egyértelműen nagyobb, mint a piramis-neuronok esetén várható érték. A 20E kép az összegzett felvétel pontosan vertikális vetületét mutatja, ahol a bemutatott sejt alakja még mindig kísértetiesen emlékeztet egy piramis-neuronéra, és a helyzetet (így a sejtazonosítást) lényegesen megnehezíti, hogy a somából látszólag három nyúlvány ered. A bemutatott neuron morfológiája a maga teljességében csak akkor volt megítélhető, ha az elemi rétegfelvételekből összeállított képet az óramutató járásával megegyező irányban elforgattuk 41°-kal (20F; lásd még **Video_10**), aminek révén jól láthatóvá vált a soma teljes mérete, valamint az egyik nyúlvány sejttesthez igen közel bekövetkező elágazódása (hasonlóan a 19D és 19F ábrákon bemutatott képekhez).

Azt gondolhatnánk, hogy az óriás- és az egyéb sejtek (kivéve az előzőekben demonstrált piramis-neuronokat) közötti tévesztés, azok keverése valószínűtlen, ám a 21. ábra ezen feltételezés egyértelmű cáfolatát mutatja. Az ábra A részén egy sejtről 3,2 μm -enként készített rétegfelvételek láthatók (lásd még **Video_11**). Valamennyi kép egy közel kör alakú átmetszetet mutató neuront demonstrál, és némelyik síkban még a somához tartozó egy-egy nyúlvány is látható. Tekintettel a sejttest közel kerek voltára, valamint a látható processzusok elhelyezkedésére, az a vélekedés alakulhat ki, hogy a bemutatott sejt egy bushy-neuron. A sejt összegzett képének vertikális vetülete azonban (21B) egy kissé elnyújtott sejtet ábrázol, aminek nyúlványai mind egy irányba látszanak haladni (kivéve a balra mutató vastag nyíllal jelzett, egyébként alig észrevehető processzust); így a bemutatott sejt akár octopus-neuronként is azonosítható lehetne. A sejt valódi morfológiája csak akkor vehető szemügyre, ha az összerakott képet 147°-kal az óramutató járásának megfelelően elforgatjuk, hiszen ekkor egyértelműen felismerhető a sejttest polygonális alakja, aminek különböző pontjaiból számos nyúlvány ered (21C; lásd még **Video_12**). Lényeges megemlíteni, hogy a bemutatott neuron esetében a sejttest legnagyobb átmérője 41 μm volt. A 21. ábrán demonstrált példa kiválóan

mutatja, hogy ha egy óriássejt a vizsgálat (metszés) síkjára csaknem merőlegesen helyezkedik el, akkor akár a kifejezetten kerekded sejttestű neuronféleségek (bushy- és octopus-sejtek) megjelenését is utánozhatja.



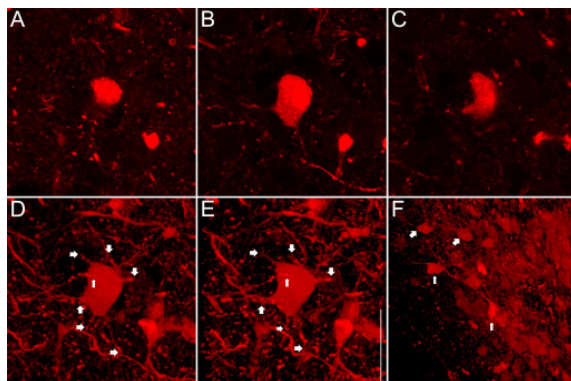
21. ábra

Egy óriássejt téves azonosítást valószínűsítő orientációja

A: Egy óriássejtről készített egyedi optikai metszetek sorozata (nem mutatjuk be valamennyi egyedi metszetet). **B:** Az összegzett felvétel vertikális nézete, nyilak jelzik a neuron sejttestéből kiinduló nyúlványokat. **C:** Ugyanaz, mint a **B**, de az összegzett felvételt 147° -kal elforgattuk az óramutató járásának megfelelően. Kalibráció: $50\ \mu\text{m}$.

Az octopus- és az óriássejtek morfológiáját összehasonlítva azt gondolhatnánk, hogy ezen két neuronféleség összetévesztése lehetetlen; ám amint azt a 22. ábra is mutatja, sajnos nem egészen ez a helyzet. A 22A-C képek ugyanazon sejt különböző optikai síkjaiban készült metszeteit ábrázolják. Valójában a 22A felvétel nem árul el túl sokat a kérdéses neuronról, bár a kerek sejttest alapján azt is gondolhatnánk, hogy az egy bushy-sejt lehet. A $8,4\ \mu\text{m}$ -rel mélyebben készített rétegfelvétel (22B) egy teljesen más megjelenésű sejtet ábrázol, ugyanis ebben a síkban a soma kifejezetten megnyúlnak tűnik, aminek egyik oldalából két, el nem ágazó nyúlvány ered, azaz a neuron akár octopus-sejtként is azonosítható lehetne. A 22C kép (ami újabb $8,4\ \mu\text{m}$ -rel mélyebben készült) az iméntihez hasonló megjelenésű neuront sejtet. Az egyedi képek összerakásával készített felvétel alapján (22D) azonban egy ettől teljesen eltérő kép tárul a szemünk elé: látható, hogy a neuron

sejttestje kifejezetten szabálytalan megjelenésű, és abból számos, a legkülönbözőbb irányokba futó nyúlvány (nyilak) ered, aminek alapján a sejt óriásneuronként volt azonosítható (lásd még **Video_13**). A 20E képen bemutatott felvételen az előző képet kissé (19°-kal) elforgattuk az óramutató járásával ellentétesen, aminek révén a soma legnagyobb átmérője is pontosan megítélhetővé vált.



22. ábra

Az óriássejtek és az octopus-neuronok összetévesztésének egyik lehetséges esete

A-C: Egy óriássejtről készült egyedi optikai metszetek, amikben egy bushy-sejt (A) vagy egy octopus-neuron (B és C) megjelenését utánozza. A metszetek a sejt tetejétől 12,6, 21,0 és 29,4 μm -re készültek. **D:** Az előző felvételeken bemutatott neuron összegzett képének vertikális nézete, a nyilak a sejttestből eredő nyúlványokra mutatnak. A vékony nyíl egy olyan processzust jelez, ami a papír síkjából kifelé, az olvasó irányába halad. **E:** Ugyanaz a sejt, de azt 19°-kal elforgattuk az óramutató járásával ellentétesen, aminek révén megítélhetővé vált annak legnagyobb somaticus átmérője. **F:** Egy olyan nucleus cochlearis szelet összegzett képe, ami jól demonstrálja, hogy az octopus- és az óriássejtek igen közel helyezkedhetnek el egymáshoz. A vastag nyilak octopus-sejtekre, a vékonyak pedig óriássejtekre mutatnak. Kalibráció: 50 μm .

A 20F kép a VCN és a DCN határán készült, viszonylag kis nagyítású felvételt mutat, ahol két octopus- (vastag nyilak) és két óriássejt (vékony nyilak) látható (lásd még **Video_14**). Az ábra kiválóan demonstrálja, hogy az óriás- és az octopus-neuronok összetévesztése reális veszély, hiszen a VCN marginális területein akár igen közel is elhelyezkedhetnek egymáshoz.

6. táblázat

A sejttest átmérője és a látható nyúlványok száma a patkány nucleus cochlearis főbb projekciós neuronjai esetén

Sejttípus	n	A soma legnagyobb átmérője [µm]				A látható nyúlványok száma			
		Átlag ± S.D.	Minimum	Maximum	Referencia	2	3	4	5
PLC	8	22 ± 4	16	28	25 ¹	1-8*			
Bushy	22	22 ± 3	18	25	20-28 ²	21 (95%)**	-	-	-
Octopus	20	26 ± 4	18	32	30-35 ²	4 (20%)	10 (50%)	4 (20%)	2 (10%)
Óriás (mind)	31	37 ± 9	27	64	40-50 ²	-	15 (48%)	11 (35%)	5 (16%)
Óriás (3 nyúlvány)	15	34 ± 7	27	53		-	15 (48%)	-	-
Piramis	16	23 ± 3	18	27	15-25 ³	-	16 (100%)	-	-

A táblázat a jelen disszertáció keretében vizsgált, rodaminnal feltöltött nucleus cochlearis neuronok kvantitatív analízisének összefoglalását tartalmazza. A „Referencia” oszlopban az irodalomban közölt adatok találhatóak, a forrás megjelölésével. Az utolsó négy oszlopban látható számok és százalékos értékek az adott számú látható nyúlvánnyal rendelkező neuronok mennyiségére és arányára vonatkoznak. *A PLC-k a látható nyúlványaik száma tekintetében igen változatosak voltak, ám alacsony előfordulási arányuk miatt további klasszifikációt nem végeztünk. **Az egyik bushy-sejt a szferikális sejttest és a nucleus cochlearison belüli pozíciója alapján azonosítható volt, ám csak egy nyúlvánnyal rendelkezett.

¹L.B.Hurd, M.L.Feldman, *Purkinje-like cells in rat cochlear nucleus. Hear. Res. 72 (1994) 143-158.*

²J.K.Moore, *Cochlear nuclei: Relationship to the auditory nerve, in: R.A.Altschuler, D.W.Hoffman, R.P.Bobbin (Eds.), Neurobiology of hearing: The cochlea, Raven Press, New York, 1986, pp. 283-301.*

³M.G.Fiori, E.Mugnaini, *Subsurface and cytoplasmic cisterns associated with mitochondria in pyramidal neurons of the rat dorsal cochlear nucleus. Neuroscience 6, 461-467 (1981).*

3.2.3. Diszkusszió

A disszertáció kísérletes munkájának előzőekben ismertetett fázisában a nucleus cochlearis projekciós neuronjainak retrográd töltése, és azt követően a jelölődött sejtek konfokális mikroszkópos analízise történt. A konfokális mikroszkóp használata nem pusztán arra adott módot, hogy az egyes sejtek térbeli megjelenését rekonstruáljuk, és ezáltal jobban megérthessük azok sejttestjeinek és nyúlványainak magon belüli elrendeződését és egymáshoz viszonyított helyzetét; de arra is módot adott, hogy az egyes neuronok morfológiai sajátosságait olyan síkban is megvizsgálhassuk, ami a szokásos morfológiai tanulmányok során nem vagy csak ritkán kerül alkalmazásra. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a nucleus cochlearis szeletek metszése során megválasztott sík döntően befolyásolja az egyes neurontípusok morfológiai azonosíthatóságát, és a sejteknek esetenként olyan mértékben „szokatlan” vetületét hozhatja létre, hogy azok téves azonosítása szinte törvényszerűen bekövetkezik. A morfológiai eredmények mellett igazoltuk azt a korábbi hipotézist, miszerint a Purkinje-szerű sejtek a cerebellumba projiciálnak.

A mikroelektróda-technikák felfedezése és elterjedése, valamint a megfelelő jelölő anyagok alkalmazása a pipettaoldatban lehetővé tette a különböző idegsejtek anterográd és retrográd feltöltését és megjelenítését. Ezen vizsgálatok jelentősen járultak hozzá az egyes neuronok funkcionális sajátosságairól és lehetséges szerepéről alkotott elképzeléseinkhez, valamint nagy segítséget jelentettek a vizsgált idegsejtek morfológiájának jellemzésében is. Jelenleg az ilyen vizsgálatokra alkalmas jelölőanyagok egész tárháza áll rendelkezésre; megemlíthető egyebek között a tormaperoxidáz (*Beyerl, 1978; Tolbert és munkatársai, 1982; Wu és Oertel, 1984; Friauf és Osvald, 1988; Oertel és Wu, 1989; Sento és Ryugo, 1989; Oertel és munkatársai, 1990; Ostapoff és munkatársai, 1994; Alibardi, 1998; Alibardi, 1999; Ding és munkatársai, 1999; Alibardi, 2003*), a biocitin (*Zhang és Oertel, 1993; Zhang és Oertel, 1994; Birinyi és munkatársai, 2001*), neurobiotin (*Ding és munkatársai, 1999; Hancock és Voigt, 2002; Smith és munkatársai, 2005*), Lucifer Yellow (*Manis, 1990*) és a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (*Rossi és Bornello, 1993; Matesz és Kulik, 1996*). Magától értetődően az intracelluláris jelölés akkor bizonyult különösen hatékonynak a morfológia-funkció összefüggések megállapításában, ha az valamilyen elektrofiziológiai vizsgálattal párosult.

A rodaminnal végzett retrográd jelölést már több neuronféleség esetében is sikerrel alkalmazták (*Dinh és munkatársai, 2005; Tolosa és munkatársai, 2005; Richardson és*

munkatársai, 2006), és amint azt eredményeink is bizonyítják, a nucleus cochlearis neuronok jelölésére is alkalmas. A rodaminnal történő töltés egyértelmű előnye, hogy a jelölőanyag kristályainak a megfelelő laesioba történő alkalmazása hatásosan akadályozza meg a festéknek a környező struktúrákba történő, „nem specifikus” diffúzióját, így elkerülhető nagy és meglehetősen diverz neuronpopuláció egyidejű jelölése. Ugyancsak előnyös, hogy a rodaminnal feltöltött neuronok immunhisztokémiai jelölése is lehetővé válhat (15. ábra), jelentősen segítve az immunpozitív neuronok morfológiai hovatartozásának megítélését. Az immunhisztokémiai reakciókat követően a jelölődött neuronok azonosítása különösen akkor lehet nehéz, ha olyan antitestek alkalmazása történik, amik a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő proteinekre specifikusak. Ezekben az esetekben a sejtek egyszerű kontúrja nem nyújt elegendő információt az egyértelmű sejtazonosításhoz, így a rodaminos töltés felbecsülhetetlen értékű lehet a morfológiai hovatartozás megítélésében. Mindezekon túlmenően a rodaminos töltést követő konfokális mikroszkópia igen értékes információval szolgálhat a vizsgált sejtek morfológiája és megjelenése tekintetében, ami különösen előnyös az olyan komplex struktúrák esetében, mint a nucleus cochlearis.

Természetesen az említett előnyök mellett a rodaminnal történő retrográd jelölésnek vannak hátrányai is. Ezek közül a legjelentősebb, hogy bár egyes szerzők sikerrel számoltak be a rodaminos retrográd töltés és valamilyen cytoplasmaticus fehérjét felismerő antitest kombinált alkalmazásáról (*Tolosa és munkatársai, 2005; Richardson, 2006*), munkacsoportunk sem egy korábbi munkában (*Pór és munkatársai, 2005*), sem a jelen kísérletsorozat keretében nem tudta a két technikát hatásosan ötvözni. A rodaminos töltés másik komoly hátránya, hogy (több más intracellularis jelölőanyaghoz hasonlóan) a sejtek nyúlványait csak korlátozottan jeleníti meg, aminek háttérében vagy a viszonylag hosszú *in vitro* inkubáció, vagy az alkalmazott fixációs technika fogyatékoságai állhatnak. A disztális nyúlványok és a dendritikus arborizáció nem optimális töltődése különösen problémás lehet azon sejtek morfológiájának megítélése és leírása során, amik esetében a dendritikus tüskék jelenléte vagy hiánya érdekes lehet (pl. a piramis-neuronok apicalis dendritfája esetében azok „tüskés” megjelenését igen jellegzetesnek tartják).

A rodaminos jelölés további, ám könnyen áthidalható komplikációja, hogy a rodamin maga is egy fluoreszcens molekula, így a jelölést immunhisztokémiai vizsgálatokkal kombinálva a másodlagos antitesteket úgy kell megválasztani, hogy azok excitációs és emissziós spektruma minél távolabb legyen a rodaminétól. Ebből egyenesen következik, hogy a Texas vörössel konjugált antitestek és a rodamin kombinált alkalmazása nem

célravezető (Texas vörös: $\lambda_{\text{ex}} = 595 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$; rodamin: $\lambda_{\text{ex}} = 555 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$).

A jelen tanulmány eredményei egyértelműen rámutatnak, hogy a nucleus cochlearis neuronjainak téves azonosítása egy számottevő hibaforrás lehet, még azokban az esetekben is, amikor a vizsgált neuron specifikus és jellegzetes morfológiai ismérvekkel rendelkezik. A nucleus cochlearis sejttípusairól jelenleg rendelkezésre álló információk korábban végzett, gondos morfológiai tanulmányok eredményei. Ezen adatok összevetése után körvonalazódik az a ma igen széleskörben elfogadott elképzelés, miszerint a nucleus cochlearis általános szerkezete és a benne található neuronok alapvető morfológiai sajátosságai jelentős hasonlóságot mutatnak a különböző vizsgált fajokban, így macskában (*Kane, 1974; Kane és munkatársai, 1981; Blackstad és munkatársai, 1984; Sento és Ryugo, 1989; Smith és munkatársai, 2005*), patkányban (*Brawer és munkatársai, 1974; Wouterlood és Mugnaini, 1984; Wouterlood és munkatársai, 1984; Friauf és Ostwald, 1988; Doucet és Ryugo, 1997; Alibardi, 2003; Malmierca, 2003*), tengerimalacban (*Hackney és munkatársai, 1990; Manis, 1990*), egérben (*Webster és Trune, 1982; Wu és Oertel, 1984; Oertel és Wu, 1989; Oertel és munkatársai, 1990; Zhang és Oertel, 1993; Zhang és Oertel, 1994; Golding és munkatársai, 1995*), hörcsögben (*Schweitzer és Cant, 1985; Schweitzer, 1990*), csincsillában (*Ostapoff és munkatársai, 1994*), nyúlban (*Disterhoft és munkatársai, 1980*), és főemlősökben, beleértve az embert is (*Heiman-Patterson és Strominger, 1985*). Dacára a hasonlóságoknak, az egyes neuronok biztos identifikálását gyakran komplikálják az egyes fajok között fennálló különbségek. A DCN morfológiájának törzsfajlását áttekintve például egyértelműen megállapítható, hogy míg a piramis-neuronok gyakorlatilag fajfüggetlen módon a mag külső rétegében található, a mag mélyebb rétegeire lokalizált óriássejtek száma igen változatos lehet az egyes fajokban (*Malmierca, 2003*). Figyelmet érdemel továbbá, hogy a DCN legmélyebb rétege a patkányokban igen gyéren fejlett, ami azt jelzi, hogy az óriássejtek ezen rétegben való elhelyezkedése nem mindig törvényszerű.

A jelen munka eredményei alapján lehetségesnek tűnik, hogy a korábbi tanulmányokban a patkány nucleus cochlearis óriássejtjeit tévesen piramis-neuronokként azonosították; és némi önkritikát gyakorolva azt sem rejthetjük véka alá, hogy ebbe a hibába bizony valószínűleg munkacsoportunk is beleesett. Ez a tévesztési lehetőség azért is fölöttébb valószínű, mert a két sejttípus membránsajátosságai és tüzelési sajátosságai igen hasonlatosak (*Smith és munkatársai, 2005*), így még a párhuzamosan végzett funkcionális mérések eredményei alapján sem lehet a téves azonosítás lehetőségét egyértelműen kizárni.

Bár a nucleus cochlearisban található octopus-sejtek száma igen korlátozott (egerekben kb. 200 octopus-sejt lehet; *Golding és munkatársai, 1995*), a kizárólag a pVCN-re korlátozódó elhelyezkedésük, és az igen jellegzetes nyúlványrendszerük (*Oertel és munkatársai, 1990*) könnyű azonosítást sugall. Ennek ellenére, az octopus-neuronok és a globuláris bushy-sejtek között fennálló morfológiai és fiziológiás hasonlóságokra már más szerzők is rámutattak (*Smith és munkatársai, 2005*), aláhúзва a bushy-octopus tévesztés lehetőségét a morfológiai klasszifikáció során.

Az esetleges morfológiai-lokalizációs hasonlóság mellett különböző fejlődési sajátosságok is nehezíthetik a nucleus cochlearis neuronjainak egyértelmű azonosítását. Újszülött hörcsögökben már egyértelműen demonstrálták a piramis- és az óriássejtek közötti hasonlóságot (*Schweitzer és Cant, 1985*), és a téves morfológiai azonosítás lehetőségét tovább növeli, hogy ebben a fajban a piramis-sejtek gyakran növesztenek egy harmadik dendritfát (*Schweitzer, 1990*). Egerek esetében az octopus-neuronok dendritfájának jelentős, az egyedfejlődéssel összefüggő módosulását írták le (*Willott és Bross, 1990*), és még a főemlősökben is vannak adatok a nucleus cochlearis egyes neuronjainak életkor- és egyedfejlődés-függő módosulásairól (*Heiman-Patterson és Strominger, 1985*). Bár a jelen munka alapjául szolgáló faj, azaz a patkányok esetében híján vagyunk a hasonló kísérletes adatoknak, nem kizárható, hogy a nucleus cochlearis neuronok igen jelentős mértékű morfológiai heterogenitásához ilyen tényezők is hozzájárulnak.

Tekintettel a jelen disszertációban részletezett sejtazonosítási problémákra, nyilvánvalónak látszik, hogy a konfokális mikroszkópia alkalmazása a nucleus cochlearis különböző sejtípusainak vizsgálata során felbecsülhetetlen segítséget nyújthat a megbízható klasszifikációhoz. A konfokális mikroszkópia térnyerését megelőzően alkalmazott technikák általában csak egy, a szeletelés által meghatározott síkban engedték meg a neuronok tanulmányozását. Bár a nucleus cochlearis igen magasan szervezett strukturáltságot mutat, a leggyakrabban alkalmazott szeletelési síkokban végzett preparátumkészítés általában jól reprodukálható sejtalkokat eredményezett, ám (amint arra a jelen munka is rávilágított) a nucleus cochlearis neuronok egyértelmű azonosítása gyakran teszi szükségessé azok morfológiájának több irányból történő vizsgálatát. Az újabban kifejlesztett számítógépes algoritmusok alkalmazása ugyan módot ad a nem fluoreszcens jelölőanyaggal feltöltött neuronok térbeli struktúrájának megszerkesztésére (*Hancock és Voigt, 2002*), azonban a konfokális mikroszkópiával és az ennek során kapott rétegfelvételek analízisével ez a cél könnyebben elérhetőnek látszik. A jelen eredmények nem csupán arra mutatnak rá, hogy ez a megközelítés a nucleus cochlearis neuronjainak morfológiai azonosítása céljára is alkalmas,

hanem azt is felvetik, hogy néhány korábbi adat átértelmezése is szükségessé válhat az egyes sejtek valószínűleg látszó téves azonosítása miatt.

Ahogy azt a nevük is sugallja, a Purkinje-szerű sejteket ectopiás Purkinje-neuronoknak tartja az irodalom, melyek az egyedfejlődés során vándorolnak a nucleus cochlearisba (*Rossi és munkatársai, 1993; Hurd és munkatársai, 1994; Spatz, 1997*). A klasszikus morfológiai tanulmányok általában nem szenteltek nekik különösebb figyelmet, de később már rendre leírták jelenlétüket egérben, patkányban és tengerimalacban egyaránt. Bár a PLC-k funkcionális szerepe és jelentősége a nucleus cochlearis jelfeldolgozó működésében még a mai napig is vitatott, egyetértés van azok cerebellaris Purkinje-sejtekkel való hasonlóságában, aminek egyik igen lényeges eleme a patkányokban igazolt erőteljes calbindin- és kevésbé jelentős parvalbumin-specifikus jelölődésük (*Friauf és Ostwald, 1988; Spatz, 1997*). A két sejtípus között fennálló kapcsolatot hangsúlyozza továbbá az a tény is, hogy patkányban a Purkinje-szerű sejtek is kapnak bemeneteket a kúszórostok által az oliva inferior területéről (*Rossi és munkatársai, 1993*). Léteznek továbbá arra utaló kísérletes adatok is, melyek szerint a PLC-k axonjai elérhetnek egyes kisagyi magvakat (*Spatz, 1997*). A jelen disszertációban ismertetett eredmények, miszerint a rodamint a pedunculi cerebellaris területén ejtett metszésekbe juttatva a PLC-k jelölhetők, ezen feltételezés további bizonyítékának tekinthetők.

3.3 Melanoma malignum sejtek TASK-3-expressziója

3.3.1. Bevezetés

A jelen disszertáció első és második fejezetében olyan eredményekről számoltunk be, melyeket a nucleus cochlearis felépítésében és működésében jelentős szerepet betöltő idegsejtek vizsgálata során kaptunk. Ezen kísérletek során részben arra törekedtünk, hogy valamilyen összefüggést találjunk a bushy-neuronok jellegzetes aktivitási mintázata és az általuk expresszált Kv-alegységek között; részben pedig a magunk szerény lehetőségeihez mérten megpróbáltunk hozzájárulni a nucleus cochlearis projekciós neuronjainak egyértelmű azonosítását övező problémakör egyszerűsítéséhez és tisztázásához. Ezen kísérletek gyakorlati kivitelezése során keresett meg bennünket a Sigma-Aldrich egyik izraeli kutatólaboratóriumának vezetője, aki egyik korábbi munkánkra hivatkozva (*Rusznák és munkatársai, 2004*) együttműködést ajánlott fel, aminek keretében módunk nyílt egy általuk újonnan kifejlesztett, TASK-3-specifikusnak vélt monoklonális antitest kipróbálására, az ellenanyag „bevizsgálására” és validálására. Tekintettel arra, hogy az ilyen jellegű vizsgálatok teljes mértékben illeszkedtek a laboratórium profiljába, hiszen egyéb munkáinkban már vizsgáltuk a TASK-3-csatornák expresszióját egyes egészséges és tumorosan elfajult humán szövetekben (*Rusznák és munkatársai, 2004; Kovács és munkatársai, 2005*), az igen megtisztelő felkérésre igent mondtunk, és elkezdtük a kísérletek tervezését és kivitelezését.

A kísérletsorozat egyes lépéseinek ismertetése, valamint az eredmények rendszerezése és megbeszélése előtt két fontos problémáról kell megemlíteni: milyen információk álltak és állnak rendelkezésre a TASK-3-csatornákról, valamint hogy miért éppen melanoma sejteken történt a vizsgálatosorozat döntő többségének kivitelezése.

A humán TASK-3-csatornát kódoló gén a 8. kromoszóma hosszú karján, meglehetősen telomerikus pozícióban kódolódik (8q24.3), a specifikus mRNS szintézise pedig két exonról történik. A TASK-3-csatornák ezen kromoszómális lokalizációja két ok miatt is jelentős: egyrészt az említett génszakaszhoz viszonylag közel, attól mintegy 10 Mbázissal a centromerhez közelebb kódolódik a *c-myc* jelű, jól ismert onkogén, felvetve annak lehetőségét, hogy a TASK-3-csatornák általános bevezetőben már

említett tumorigén hatásáért ennek a génnek az amplifikációja felelős, így a TASK-3-csatornákat kódoló gén amplifikációja, valamint a fehérjetermék overexpressziója csak egyszerű co-expresszió eredménye. Ez a lehetőség azonban bizonyosan elvethető, mivel számos tumorszövetből származó mintában megfigyelték a TASK-3-csatornákat kódoló *kcnk9* gén önálló amplifikációját (*Mu és munkatársai, 2003*). Az említett kromoszómális lokalizáció másik érdekessége, hogy az ezen régió területén található, eddig pontosan nem azonosított gének módosulásai három különböző eredetű epilepszia kialakulásában (benignus neonatalis familiaris convulsio, 2. típusú generalizált idiopathias epilepszia és 1. típusú gyermekkori absence epilepszia) is oki szerepet játszanak, így logikus felvetésnek tűnt, hogy a *kcnk9* gént érintő esetleges mutáció oki szerepet játszhat ezen epilepsziák valamelyikének kialakulásában. Egy 65 német betegen végzett vizsgálatsorozat eredményei viszont ezt a feltételezést cáfolták, és a szerzők nem találtak ok-okozati összefüggést a *kcnk9* gén genetikai polimorfizmusa és a fenti epilepsziatípusok kialakulása között. A tanulmányban arra is fény derült, hogy bár a gén polimorf, a vizsgált epilepsziás betegekben ez a polimorfizmus az exonokat sohasem érintette, így nem okozott eltérést a csatornaalegységek aminosav-szekvenciájában (*Kananura és munkatársai, 2002*).

A humán TASK-3-csatorna (hTASK-3) 374 aminosavat tartalmaz, és így némileg rövidebb, mint a patkány TASK-3-fehérjéje. A protein meglehetősen konzervatív: a hTASK-3- és a hTASK-1-, valamint a hTASK-3- és a hTASK-5-csatornák közötti homológia mértéke 62 és 56%-os (*Chapman és munkatársai, 2000; Karschin és munkatársai, 2001*) szemben a többi két pórusformáló domént tartalmazó csatornával (köztük a korábban ugyancsak TASK-családba sorolt TASK-2- és TASK-4-csatornákkal), ahol a szekvenciaazonosság csupán 31-35%-os (*Chapman és munkatársai, 2000*). A TASK-3-csatorna konzervativitása az egyes fajok között is meglepően nagy: a patkány és a humán TASK-3-csatorna 74%-ban identikus, ám ennek mértéke az első 250 aminosavat tekintve még robosztusabb, hiszen ezen régióban az azonosság mértéke 94% - ugyanakkor vannak olyan részek is (döntően a C-terminális közelében), ahol csupán 47%-os homológia áll fenn (*Chapman és munkatársai, 2000*). Hasonlóan jelentős szekvenciaazonosság tapasztalható a humán és a tengerimalac TASK-3-csatorna szintjén: az egész molekulát tekintve a homológia mértéke 88,3%; ugyanakkor a pórusformáló régiók környékén ez az érték megdöbbentően magas (96,8%), a hosszú, intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális közelében pedig mindössze 69,8%-os (*Chapman és munkatársai, 2000*). A fenti adatok azért különösen

érdekesek, mert ezekből nyilvánvaló, hogy az olyan TASK-3-specifikus antitestek, amik a csatorna N-terminálisának közelében elhelyezkedő epitópokat ismernek fel nagy valószínűséggel többféle faj esetében is alkalmazhatók, ugyanakkor a hosszú, intracellulárisan elhelyezkedő C-terminus közelében található epitópok ellen termeltetett antitestek esetében lényegesen valószínűbb a fajspecifititás.

A TASK-3-csatornák aminosavszekvenciájára jellemző, hogy az első pórusformáló domén területén megtalálható a K^+ -csatornákra jellegzetesnek tartott „ujjlenyomat”, a GYG triplet. A második pórus területén ez kissé változott, és itt egy GFG szekvencia (glicin-fenilalanin-glicin) vesz részt a K^+ -permeabilitás biztosításában (Lesage és Lazdunski, 2000). A funkcióképes TASK-3-csatorna konduktanciája (heterológ expressziós rendszerben meghatározva) 28 pS; és bár a „háttér” K^+ -csatornák közé tartoznak, így aktivációjukat sokáig idő- és feszültségfüggetlennek gondolták, az újabb adatok szerint aktivációjuk egyértelmű, időfüggő növekedést mutat (legalábbis a *Xenopus* oocytákban és HEK-sejtekben expresszált humán TASK-3-csatornák; Meadows és Randall, 2001).

A TASK-3-csatornák aktivitása különböző másodlagos hírvivők által modulálható, aminek kialakításában alapvető jelentőségűnek tűnik egy 6 aminosavat tartalmazó szekvencia a csatornák hosszú, intracellulárisan elhelyezkedő karboxi-terminusának elején. Bár a modulációs hatások támadáspontjában egyetértés van a szerzők között, annak hatását tekintve a vélemények igen különbözőek: az egyik tanulmányban a *Xenopus* oocytákban expresszált TASK-3-csatornákon folyó áram nagyságát a protein kináz C (PKC) útvonal nem, ugyanakkor a PKA útvonal stimulációja hatékonyan csökkentette (Meadows és Randall, 2001). Az újabb vizsgálatok eredményei szerint azonban a G_{q11} -fehérje aktiválása a TASK-3-áram egyértelmű csökkenését okozza; részben az említett G-fehérje aktivációját követően kialakuló foszfatidil-inozitol-biszfoszfát (PIP_2) depléciója, részben az inozitol-triszfoszfát (IP_3) koncentrációjának emelkedése miatt (Chemin és munkatársai, 2003; Cooper és munkatársai, 2004; Chen és munkatársai, 2006). Fontos megemlíteni, hogy egyes metabotróp glutamát-receptorok (Group I mGluR), amik komoly jelentőségűek a tanulás, az emlékezés, az epilepszia, a fájdalomérzés és az idegsejtek pusztulásának egyes formáiban, éppen a fent említett útvonal révén képesek hatni a TASK-3-csatornákra, azok záródását és a neuronok következményes depolarizációját okozva (Chemin és munkatársai, 2003). A jelenség azért tűnik különösen lényegesnek, mert ez a hatásmechanizmus értékes kiegészítést jelent azon folyamatoknak, amik az I.

csoportha sorolható glutamát-receptorok túlfokozott aktivitása következtében a neuronok kórosan megnövekedett ingerlékenységét és végsősoron pusztulását okozhatják.

Az általános bevezetőben már megemlékeztünk róla, hogy a TASK-3-csatornák fölöttébb különleges farmakológiai jellemzőket mutatnak, hiszen gyakorlatilag érzéketlenek a szokásos K^+ -csatorna-gátlószerekre, miközben hatékonyan blokkolhatók RR alkalmazásával (Czirják és Enyedi, 2003). Időközben egyéb fémionokról is bebizonyosodott, hogy képesek a TASK-csatornák gátlására, bár az erről szóló kísérletes adatok némileg ellentmondásosak. Egyes szerzők szerint a Zn^{2+} erőteljesebben gátolja a TASK-1-, mint a TASK-3-csatornát (Hartness és munkatársai, 2001), ugyanakkor egy másik munka arról számol be, hogy a Zn^{2+} igen hatékonyan gátolta a TASK-3-csatornát ($IC_{50} = 19,8 \mu\text{mol/l}$), miközben jóval kevésbé hatott a TASK-1- és a TASK-2-csatornák működésére (TASK-1 esetén az $EC_{50} = 175 \mu\text{mol/l}$; Clark és munkatársai, 2004). Úgy tűnik, hogy a TASK-3-csatornák cink iránti érzékenységeért a 98-as pozícióban található hisztidin (ami a pH-érzékelésben is fontos szerepet játszik) jelenléte is felelős; a H98A mutáns csatorna jelentősen kisebb érzékenységet mutatott ezen kationra (Clarke és munkatársai, 2004). A helyzetet bonyolítja azonban, hogy a TASK-1-csatorna is rendelkezik ezzel az aminosavval, ráadásul ugyanebben a pozícióban, és ennek ellenére csekély érzékenységet mutatott a cinkre. A TASK-1/TASK-3 heterodimer csatorna Zn^{2+} iránti érzékenysége úgyszintén csekély mértékűnek bizonyult (Clarke és munkatársai, 2004).

Fontos leszögezni, hogy a TASK-3-csatornák cink általi gátlása nem valamiféle ezoterikus, „l'art pour l'art” jellegű kísérletes eredmény. Bebizonyosodott, hogy az inhibitoros szinapszisok aktiválódása során tetemes mennyiségű cink kerülhet a szinaptikus részbe (több tíz $\mu\text{mol/l}$ koncentrációt elérve, de egyes vélekedések szerint a szinaptikus rész egyes mikrodoménjeiben ez az érték akár $300 \mu\text{mol/l}$ is lehet), ami az itt elhelyezkedő TASK-3-csatornák gátlását okozza, nagyban befolyásolva a postsynapticus sejt membránjának bemenő ellenállását, ezáltal annak ingerlékenységét (Clarke és munkatársai, 2004). További érdekes felvetés, miszerint ugyancsak jelentős mennyiségű cink kerülhet az extracelluláris térbe ischaemia és epilepsziás rohamok során, aminek a TASK-3-csatornák gátlása révén közvetlen oki szerepe lehet a membránpolarizáció, a Ca^{2+} -belépés és a bekövetkező neuronpusztulás kialakulásában.

Az extracellulárisan alkalmazott réz a cinkhez hasonló hatást gyakorol a TASK-3-csatornák működésére ($IC_{50} = 2,7 \text{ nmol/l}$). Mivel a rézionok negatív

membránpotenciálon erőteljesebb gátló hatást gyakorolnak a TASK-3-csatornákra, kötőhelyük legnagyobb valószínűséggel a csatorna pórusa közelében található (*Gruss és munkatársai, 2004*). Tekintettel arra, hogy egyes központi idegrendszeri betegségekben, a központi idegrendszert érő sérülések esetén, valamint egyes anyagcsere-betegségekben a cinkhez hasonlóan a rézionok koncentrációja is megnövekedhet az extracelluláris térben, ezen kísérletes adatoknak komoly klinikai jelentőségük is lehet.

Fölöttébb érdekes, hogy nemcsak a TASK-3-csatornák aktivitásának (és így a TASK-3-áram nagyságának) a csökkenése okozhat az előzőekben vázolt mechanizmus révén sejt- (neuron-) pusztulást, de egyes esetekben az aktivitásuk is apoptosist indukálhat. Az általános bevezetőben már számot adtunk arról, hogy kisagyi szemcsesejtekben a TASK-3-alegységeket (is) tartalmazó csatornák aktivitása azok programozott halálát okozza (*Lauritzen és munkatársai, 2003*). A jelenségnek komoly fiziológiai jelentősége van, hiszen gondoskodik arról, hogy miközben az egyedfejlődés során a szemcsesejtek a külső szemcsesejtes rétegből (external granule layer – EGL) végső helyükre, a szemcsesejtes rétegbe vándorolnak, számuk jelentősen csökkenjen. Ezen számcsökkenés azért különösen fontos, mert az EGL területén fejlődő szemcsesejtek száma sokszorososan meghaladja azt a kívánt mennyiséget, amit a Purkinje-sejtekkel való szinaptikus kapcsolatok kialakítása indokol, így a TASK-áram által kiváltott sejtpusztulás tevékenyen hozzájárul a két sejtfeleség számának szinkronizálásához.

Az, hogy a sejtfelszíni membránban található TASK-csatornák aktivitása hogyan okozza a szemcsesejtek pusztulását, továbbra is vita tárgya, ám az tűnik a legvalószínűbbnek, hogy a rajtuk keresztül megvalósuló K^+ -kiáramlás a következményes Cl^- és vízkiáramlás miatt kialakuló sejttérfogat-csökkenés (apoptotic volume decrease – AVD); vagy az intracelluláris K^+ -koncentráció csökkenése miatt bekövetkező, kaszpázokat és nukleázokat érintő aktivitásnövekedés révén valósul meg. Mindezek alapján nem meglepő, hogy akár a TASK-csatornák gátlása, akár az extracelluláris K^+ -koncentráció növelése hatásosan képes csökkenteni a kialakuló apoptosist mértékét, hiszen mindkét behatás csökkenti a K -ionok sejtből történő kiáramlásának mértékét.

A fenti kísérletes adatok és következtetések igen határozottan utalnak arra, hogy a TASK-3-csatornák aktivitása a sejtfelszíni membránban kifejezetten pro-apoptotikus hatású. Szükséges azonban megemlíteni, hogy (mint oly sok más esetben) a valóság

finoman szólva is bonyolultabb, mint azt első pillanatban hinnénk. Meggyőző kísérletes adatok szólnak amellet, hogy a TASK-csatornához sok szempontból hasonlatos, ugyancsak a két pórusformáló domént tartalmazó K^+ -csatornák közé tartozó ún. TREK-1-csatornák aktiválása riluzol (egy neuroprotektív hatóanyag) által, határozott anti-apoptoticus hatást fejt ki (*Duprat és munkatársai, 2000*). A lehetséges hatásmechanizmus az lehet, hogy a TREK-csatornák aktivitása a membránt hiperpolarizálja, ezáltal csökkenti a neuronok ingerlékenységét, és így a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák megnyílása miatt bekövetkező Ca^{2+} -belépést is, amitől már egyenes út vezetne a sejthalálhoz. Nyilvánvalóan nehéz azonban megmagyarázni, hogy a TASK-csatornákon kialakuló K^+ -kiáramlás miért közvetít pro-; ugyanakkor ugyanezen ionok, ugyanilyen irányba, csak más csatornán (TREK-1) keresztül történő mozgása miatt okoz anti-apoptoticus hatást. A kérdést tovább bonyolítja, hogy miközben a TASK-1-, TASK-2- és TASK-3-csatornák C8-sejtekben történő overexpressziója kifejezett védelmet nyújtott az apoptózis kialakulása ellen, túlélő agyszövetekben kizárólag a TASK-3-csatornák jelenléte biztosította ezt a protektív hatást (*Liu és munkatársai, 2005*). A jelenség magyarázata jelenleg sem világos, ám nem elképzelhetetlen, hogy mindez azért lehetséges, mert a három csatornaféleség közül a TASK-3-csatornák a legkevésbé pH-érzékenyek, így savas extracelluláris környezetben ők okozzák legtovább a membrán ingerlékenységének csökkenését.

Miközben az irodalomban tovább gyűlnek az adatok a TASK-3-csatornák aktivitásának pro- vagy anti-apoptoticus hatását támogatva, tumoros szövetmintákat vizsgálva egyre egyértelműbbnek tűnik, hogy ezen K^+ -csatornák komoly jelentőségűek egyes rosszindulatú daganatok kialakulásában is. Az ezzel kapcsolatos adatok egy részének taglalására már az általános bevezetőben sor került, a jelen fejezetben csak arra kívánjuk ismét ráirányítani a figyelmet, hogy egyes malignus elváltozásokban kimutatták a TASK-3-csatornák kódoló gén amplifikációját. Az amplikon mintegy 550 kbázis nagyságú, és bár két gén részleteit is tartalmazta, csak a *kcnk9* gént hordozta teljes egészében, a másik (pontosan nem azonosított génnek) csak egy része képezte az amplikon részét (*Mu és munkatársai, 2003*).

Bár már történtek előzetes vizsgálatok annak eldöntésére, hogy vajon van-e összefüggés a TASK-3-fehérje expressziójának mértéke és/vagy mintázata, valamint az egyes tumorok klinikai és hisztológiai jellegzetességei, továbbá bizonyos prognosztikai faktorok jelenléte között, úgy véljük, hogy egy ilyen, kellően nagy esetszámot

felvonultató tanulmány lebonyolítására feltétlenül szükség lenne. Egy ilyen vizsgálatsorozat kivitelezéséhez minimálisan három dolog szükséges: egy kellő alaposággal bevizsgált, megbízhatóan alkalmazható és specifikus (lehetőleg monoklonális) elsődleges antitest; egy kellően nagy számú és patohisztológiai-klinikai szempontból megfelelően heterogén szövetminta-gyűjtemény, valamint egy olyan technika, ami kontrollált körülmények között teszi lehetővé a minták tömeges vizsgálatát. Tekintettel arra, hogy hosszú évek óta ápolunk egy igen gyümölcsöző kollaborációs kapcsolatot a Hajdú-Bihar Megyei Kenézy Gyula Kórház-Rendelőintézet Patológia Osztályával, a megfelelő számú tumoros minta előkészítése a vizsgálatokra reálisnak mondható, ugyanakkor időközben szert tettünk egy tissue microarray (TMA) készülékre is, aminek alkalmazása a nagyszámú szövetminta egyidejű vizsgálatának jelenleg legelfogadottabb technikáját jelenti. A nagyszabású vizsgálatsorozat elindításának már csak egy feltétele volt: a megfelelő minőségű elsődleges antitest, amit viszont a Sigma-val való együttműködésünk biztosíthatott – amennyiben sikerül meggyőződnünk az általuk fejlesztett antitest alkalmazhatóságáról.

Természetesen számos rosszindulatú daganatféleséget választhattunk volna az előzetes vizsgálatok kivitelezése céljából, de végül a melanoma malignum mellett döntöttünk, aminek alapvetően két oka volt. Az Élettani Intézetben, Prof. Dr. Csernoch László munkacsoportjában sejttenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtek vizsgálata zajlott, amik egyik - számunkra különösen érdekes - eredménye az volt, hogy ruténiumvöröst alkalmazva a tenyésztőoldatban, a melanoma sejtek koncentrációfüggő pusztulása következett be. Tekintettel arra, hogy a ruténiumvörös hatékonyan gátolja a TASK-3-csatornákon folyó áramot, ugyanakkor a TASK-3-fehérje jelenléte kifejezetten pro-oncogen hatású, a jelenség egyik magyarázata az lehetett, hogy a gátlószer éppen a TASK-3-csatornákra hatva okozza a melanoma sejtek pusztulását, azaz valószínűsíthető volt, hogy a melanoma sejtek expresszálják a TASK-3-fehérjét, így ideális alanyául szolgálhatnak a tervezett kísérletekhez. Kétségtől igaz, hogy a ruténiumvörös a TASK-3-csatornák mellett számos egyéb struktúra és folyamat gátlását is okozza (Ca^{2+} -aktivált K^+ -áram, vanilloidreceptor, TRAAK-csatorna, mitokondriális Ca^{2+} -uniporter, rianodinreceptor, SERCA- és egyéb Ca^{2+} -pumpák, feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák, epithelialis Ca^{2+} -transzporter), így a melanoma sejtekre gyakorolt hatása még a legjobb indulattal sem volt specifikusnak mondható, úgy véltük, hogy egy próbát feltétlenül megérdemel a jelenség. Az esetleges pozitív eredmény ráadásul azzal a jelentős előnnyel is kecsegtetett, hogy amennyiben sikerül a melanoma sejtek TASK-3-

expresszióját igazolni, akkor lehetőségünk lesz mind immuncitokémiai, mind immunhisztokémiai körülmények között tesztelni az antitestet, ami jelentős mértékben javíthatja a vizsgálat sorozat eredményeinek általános hasznosíthatóságát.

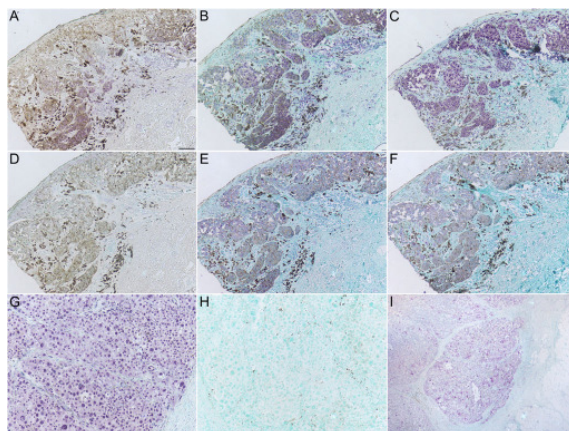
Amint az „Eredmények” fejezetből kiderül, nem kis szerencsére a melanoma sejtek valóban expresszálják a TASK-3-fehérjét, és a munkában nem pusztán az elsődleges antitestek bevizsgálását végeztük el, de sikerült néhány érdekes, némileg váratlan és talán általánosan is jelentős jelenségre rámutatnunk a melanoma sejtek TASK-3-expressziójának vonatkozásában.

3.3.2. Eredmények

A kísérletek első lépésében formalinban fixált, hisztopatológiailag igazolt melanoma malignumot tartalmazó szövetminták alkalmazására került sor, annak kiderítése végett, hogy azok vajon mutatnak-e értékelhető immunpozitivitást a TASK-3-specifikus ellenanyagok alkalmazása során. Annak érdekében, hogy a kialakuló immunpozitivitás valódiságához ne férjen kétség, a szövetmintákon három különböző cég által, három különböző fajban termeltetett, a TASK-3-fehérje különböző epitópjait felismerő antitestek alkalmazására került sor (a részleteket illetően lásd az „Anyagok és módszerek” fejezet 2. táblázatát). Mivel az immunreakciókat formalinban fixált mintákon végeztük, nagy gondot fordítottunk a megfelelő antigénfeltárási technika (antigen retrieval – AR) kiválasztására, különösen azon korábbi megfigyelésünk tükrében, hogy beágyazott metszeteken alkalmazva a TASK-3-specifikus ellenanyagokat könnyen álnegatív vagy igen gyenge intenzitású jelölődést tapasztalhatunk (*Kovács és munkatársai, 2005*).

Amint azt a 23. ábra felső sorában látható felvételek mutatják (A-C), az egyik poliklonális antitest AR nélküli alkalmazása gyenge, de egyértelműen pozitív reakciót adott ugyan, ám annak erőssége jelentősen fokozható volt, függetlenül attól, hogy melyik AR alkalmazására került sor. Tekintettel arra, hogy a melanoma sejtek jelentős része tartalmaz barna pigmentációt, a reakcióban úgy választottuk meg a kromogént, hogy az lila terméket eredményezzen, így a melanintól való elkülönítés nem okozhatott gondot. A felvételeken az is megfigyelhető, hogy a kötőszövetben értékelhető immunpozitivitás nem volt megfigyelhető, így az a reakció kényelmesen alkalmazható belső negatív kontrollját biztosította. Az is látható (23D-H), hogy a tesztelni kívánt monoklonális antitest ugyanolyan jelölődési mintázatot adott, mint a poliklonális

ellenanyag, bár az előbbivel végzett immunreakció intenzitása (nem meglepő módon) némileg elmaradt a poliklonális antitest alkalmazása során tapasztalttól. Figyelmet érdemel, hogy amennyiben a monoklonális antitest alkalmazását AR nélkül kíséreltük meg (23D), úgy érdemi jelölődést alig tapasztaltunk, azaz álnegatív reakció jelentkezett.



23. ábra

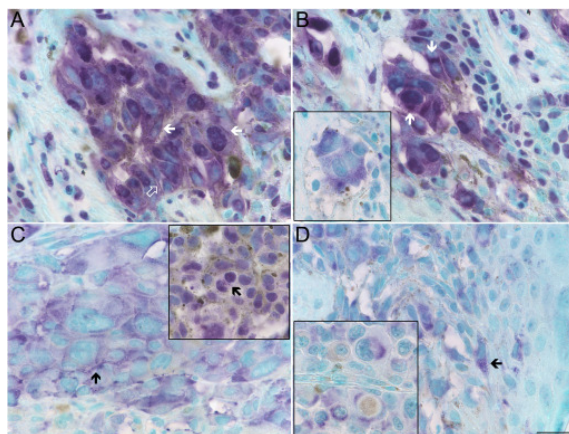
TASK-3-specifikus festés primaer és metastaticus melanoma malignumot tartalmazó, beágyazott mintákon

A-C: poliklonális antitest (Alomone Labs Ltd) alkalmazása antigén feltárás nélkül (**A**) és két különböző antigén feltárási technikát követően [TRIS- (**B**) és citrát-puffer (**C**)]. **A D-F** felvételeken ugyanaz látható, mint az **A-C** képeken, de az immunfestés a monoklonális antitest alkalmazásával történt. **G:** TASK-3-specifikus immunjelölődés vékonybélből származó metastaticus melanomából származó metszeten (poliklonális antitest – Alomone; az antigénfeltárás TRIS-pufferben történt). **H:** A preadszorpciós kontroll kísérlet eredménye. Ebben az esetben ugyanazt az elsődleges antitestet és antigénfeltárási technikát alkalmaztuk, mint a **G** esetben; a két immunreakciót párhuzamosan végeztük. **I:** TASK-3-specifikus immunfestés vékonybélben kialakult metastaticus melanoma esetén, a monoklonális antitest alkalmazásával. Jól megfigyelhető a kötőszövet negativitása. Kalibráció: 100 μm (**A-H**) és 250 μm (**I**).

A melanoma malignum sejtek TASK-3-pozitivitása metastaticus daganatokban is kimutatható volt, és a kialakuló reakció jellege érdemben nem függött az alkalmazott elsődleges antitest típusától (a 23G kép az egyik poliklonális, a 23I felvétel pedig a monoklonális antitesttel kapott eredményeket demonstrálja). A kísérletek során rendszeresen végeztünk preadszorpciós kontroll vizsgálatokat. Tekintettel arra, hogy AR nélkül még az elsődleges antitest jelenlétében is jelentősen csökkent a reakció intenzitása (alkalmanként álnegatív eredményt tapasztaltunk), a kontroll vizsgálatokat mindig egy hatásosnak bizonyult AR, a TRIS-pufferben történő inkubáció után végeztük el. A 23H ábrán bemutatott esetben az alkalmazott szövetmintát a 23G képen látható metszettel mindenben megegyező módon, azzal párhuzamosan kezeltük. Amint

látható, sem a 23H képen bemutatott preadszorpciós kontroll, sem a kísérletsorozat során készített egyéb kontroll metszetek nem mutattak érzékelhető immunpozitivitást.

A 24. ábra nagyobb nagyítás alkalmazásával foglalja össze a melanoma malignumot tartalmazó metszeteken tapasztalt TASK-3-specifikus immunpozitivitás jellemzőit. Az ábra alapján nyilvánvaló, hogy mindhárom elsődleges antitest alkalmazása egyértelmű és hasonló megoszlást mutató immunpozitivitást produkált. Bár az immunpozitivitás az esetek egy részében a sejtfelszíni membránt is érintette (pl. a fehér nyilak által mutatott sejtek a 24A képen), a legerőteljesebb reakciót legtöbb esetben intracellulárisan tapasztaltuk, ami gyakran határozottan szemcsés megjelenést mutatott (24D). A jelölődés gyakran mutatott határozott perinuclearis lokalizációt (24C és 24D), és a tumoros óriássejtek vagy osztódó alakok esetében a magok közötti térben is erőteljes reakciót tapasztaltunk (24C, kis kép). Számos esetben a sejtmag egyik pólusán tapasztalhattuk a legerőteljesebb immunreakciót (24B és 24C - kis kép). Amennyiben a melanoma sejtek nyúlványai a metszési síkba kerültek, úgy azokban is intenzív reakciót tapasztaltunk (ferde nyíl a 24A képen, fekete nyíl a 24C felvételen).



24. ábra

Melanoma sejtek TASK-3-specifikus festése szövettani mintákon

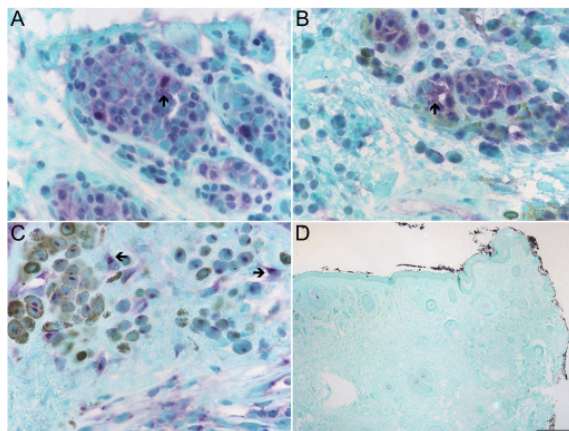
A: Az egyik poliklonális antitesttel (Alomone + TRIS-puffer) végzett immunreakció. A fekete nyilak azokat a sejteket mutatják, amelyek sejtfelszíni membránja is jelölődött, a világos nyilak az erősen TASK-3 pozitív nyúlványokat jelölik. B: A fő ábrán ugyanazt az antitestet és feltárási technikát alkalmaztuk, mint az A képen; a kis képen látható esetben a monoclonális antitestet használtunk (TRIS-puffer). Mindkét esetben megfigyelhető az erőteljes perinuclearis jelölődés. C: Poliklonális antitestekkel végzett TASK-3-specifikus immunreakció (nagy kép: Santa Cruz + citrát-puffer; kis kép: Alomone + TRIS). A nagy képen látható nyilak azon sejteket jelölik, melyeknél intenzív perinuclearis festődés és szemcsés intracelluláris immunpozitivitás figyelhető meg. A kis felvételen a nyilak a sejtmagok között látható retikuláris megjelenésű jelölődést mutatják. D: A monoclonális antitesttel végzett immunreakciók eredménye. A nyilak a szemcsés jellegű immunpozitivitást jelölik. Kalibráció: 25 µm.

Bár a jelölődési mintázat jórészt függetlennek bizonyult az alkalmazott elsődleges antitest típusától, a nuclearis jelölődés tekintetében némi különbség volt megfigyelhető: az egyik poliklonális antitest által adott nuclearis reakció volt a legintenzívebb (bár egyértelműen negatív magok ugyancsak megfigyelhetők voltak, lásd a 24A és 24B képeket, valamint a 24C felvételen demonstrált kis képet), ugyanakkor a nuclearis pozitivitás kevésbé határozottan jelentkezett a másik két antitest alkalmazása során (24C és 24D). Függetlenül azonban az elsődleges antitest típusától, a kötőszövet sohasem mutatott érdemi pozitivitást.

Kísérleteink során 14 melanoma malignumot tartalmazó szövetmintát alkalmaztunk, melyek közül 8 bőr eredetű, elsődleges; 6 pedig metastaticus melanoma malignumból származott. 10 mintán igen erős, 3 mintán pedig valamelyest gyengébb, de határozott reakciót tapasztaltunk, egy minta esetében pedig alig észrevehető immunpozitivitás jelentkezett. Bár sem a feldolgozott és megvizsgált minták száma, sem azok változatossága (valamennyi elsődleges tumorminta Clark IV vagy Clark V stádiumnak, azaz előrehaladott melanoma malignumnak felelt meg) nem tette lehetővé a TASK-3-expressziós mintázat hisztológiai és klinikai jegyekkel való precíz, nagy statisztikai sokaságon végzett összevetését, fontos megjegyezni, hogy nem találtunk érdemi és nyilvánvaló összefüggést az immunreakció jellemzésére meghatározott paraméterek (pl. a festődött magok aránya, a reakció erőssége) és az elsődleges tumorok jellemzői között.

A kísérletek ezen fázisában tettünk egy fontos kitérőt: mivel a TASK-3-csatornák különösen jelentősek lehetnek egyes rosszindulatú daganatok kialakulásában, érdekesnek tűnt annak vizsgálata, hogy vajon a melanoma malignum sejtek benignus „rokonai”, azaz a melanocyta ugyancsak mutatnak-e TASK-3-expressziót, vagy ez a malignusan transzformált sejtfeleségre jellegzetes, azt esetleg a benignus változattól megkülönböztető marker. Amint az a 25. ábrán egyértelműen megfigyelhető, a melanoma malignum sejtekhez hasonlóan a legtöbb melanocyta is erős TASK-3-pozitivitást mutatott, és az gyakran kifejezetten szemcsés megjelenésű volt (nyíllal jelölt sejtek a 25A-C képeken). Hasonlóan a melanoma malignumból származó metszetekhez, AR nélkül csupán igen gyenge reakciót tapasztaltunk, ugyanakkor a megfelelő AR alkalmazása jelentősen fokozta a jelölődés erősségét. Az immunpozitivitás megoszlása alapvetően ugyanaz volt, mint a melanoma malignumot tartalmazó mintákban (intenzív perinuclearis jelölődés, lásd a 25C ábra nyíllal jelölt sejtjét), és a benignus naevusból készített metszeteken is nyilvánvaló volt a nuclearis

polymorphismus (azaz intenzíven, gyengén vagy egyáltalán nem jelölődött sejtmagok egyidejű jelenléte). A preadszorpciós kontroll vizsgálatok a melanocyták esetében sem eredményeztek érdemi jelölődést (25D). Vizsgálatainkat négy különböző minta bevonásával végeztük el, és minden esetben a 25. ábrán bemutatotthoz hasonló eredményt tapasztaltunk.



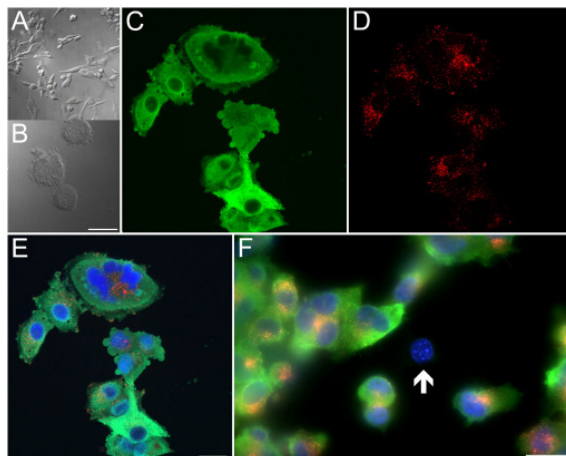
25. ábra

Melanocyták TASK-3-specifikus immunreakciója

A: Az egyik poliklonális antitesttel (Alomone + citrát-puffer) végzett immunfestés eredménye. A nyíl a jellegzetes szemcsés immunjelölődést mutatja. **B:** Az **A** képen bemutatottal megegyező immunreakció eredménye. A nyilak azon naevus sejteket jelölik, amelyek nyúlványai intenzív TASK-3 festődést mutattak. **C:** A másik poliklonális antitesttel (Santa Cruz + TRIS-puffer) történt immunreakciók eredménye. A nyilak az elsősorban a sejtmag területére lokalizálódó, intenzív, szemcsés megjelenést mutató sejteket jelölik. **D:** A preadszorpciós kontroll kísérlet eredménye (Alomone + TRIS-puffer). A kísérletet az **A** és **B** felvételeken bemutatottakkal párhuzamosan végeztük. Kalibráció: 25 μ m (**A-C**), 375 μ m (**D**).

A melanoma malignumot tartalmazó szövetminták vizsgálata során kapott eredmények egyértelműen megmutatták, hogy a melanoma sejtek expresszálják a TASK-3-fehérjét. Természetesen jó volt látni, hogy a kiindulási hipotézisünk igaznak bizonyult, ám az is nyilvánvaló volt, hogy a formalinban fixált preparátumok alkalmazása csak a fehérje jelenlétének és megoszlásának tanulmányozását engedi meg, ugyanakkor (halott szövetek révén) nem engedi meg az olyan funkcionális(abb) vizsgálatok kivitelezését, amik alapvetően fontosak lennének a TASK-3-csatornák sejtfunciókban betöltött jelentőségének pontosabb megismeréséhez, vagy a csatornafehérjét érintő manipulációk következményeinek leírásához. Mivel ezen kísérletek kivitelezéséhez a sejtenyészetben fenntartott melanoma sejtek jól alkalmazhatók, a vizsgálatok következő fázisában immuncitokémiai körülmények

között is meg kívántunk győződni az antitestek alkalmazhatóságáról, valamint a melanoma sejtek TASK-3-expressziójáról.



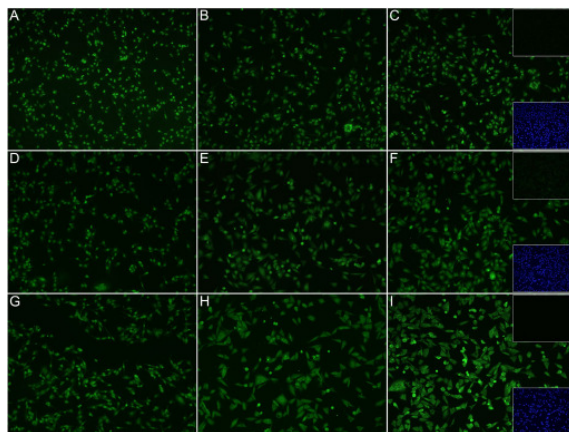
26. ábra

Sejtenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtek

A-B: Az egyik melanoma malignum sejtvonalról (WM) DIC-mikroszkópiával készült kis (A) és nagy (B) nagyítású felvételek. **C-E:** S-100- (C) és HMB-45- (D) pozitív sejtek konfokális mikroszkóppal készített képei, **E:** a C és D felvételek magfestéssel kiegészített co-lokalizációs képe. **F:** a HT199 melanoma malignum sejtvonalon végzett S-100- (zöld) és HMB45- (piros) specifikus, valamint a sejtmagokat megjelenítő (kék) immunfluoreszcens képe. A nyíl egy olyan sejtre mutat, amelyen sem S-100-, sem HMB-45-pozitivitás nem volt észrevehető. Kalibráció: 25 μ m.

A vizsgálatok ezen szakaszában három különböző típusú, melanoma malignumból származó sejtvonal alkalmazására került sor. Ezek egyike primaer, bőr eredetű melanomából származott, a másik kettő pedig metastaticus melanomákból izolált sejteket tartalmazott. Az egyes sejtvonalak megjelenésükben és morfológiájukban nem mutattak érdemi különbséget, így azok egyenkénti bemutatásától eltekintünk. A 26. ábra A és B része a vizsgált melanoma malignum sejtek differenciál-interferencia-kontraszt optikával készült képeit mutatja. A 26A felvételen mind a kifejezetten lapos, gyakran polygonalis megjelenésű; mind a sejtosztódás irányában elkötelezett, gömb alakú sejtek megfigyelhetők. A 26B kép nagyobb nagyítással demonstrál néhány szferikálisabb sejtalakot. A sejtenyészeti körülmények között fenntartott melanoma malignum sejtek pontos identifikálását két, a hisztopatológiai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott szöveti marker, az S-100-fehérje jelenléte és a HMB-45-pozitivitás demonstrálásával végeztük el (26C-F). Az S-100-fehérje egy olyan Ca^{2+} -kötő protein, amit (más sejtek mellett) a melanoma malignum sejtek is nagy mennyiségben tartalmaznak, a HMB-45-specifikus antitest pedig a melanosomák jelenlétét igazolja, így melanoma malignum sejtek esetében jellemző a pozitivitás.

Amint az jól megfigyelhető, a sejtenyészetben található sejtek túlnyomó többsége mindkét szöveti markerre pozitívnak bizonyult, bár ritkán olyan sejteket is találtunk, amik S-100- és HMB-45-negatívnak mutatkoztak (26F kép, nyíllal jelölt sejt).



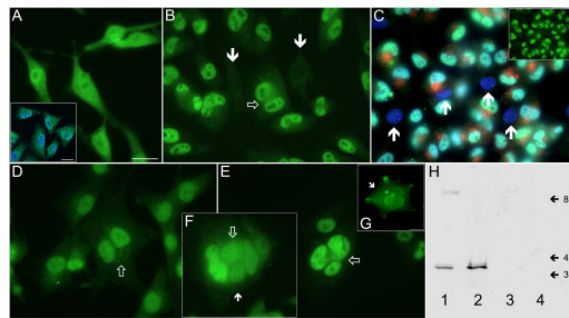
27. ábra

Sejtenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtek TASK-3 expressziójának immuncitokémiai vizsgálata

Az egyes sorok a különböző antitestekkel készült kísérletek eredményeit demonstrálják (**A-C**: Alomone; **D-F**: Santa Cruz; **G-I**: monoklonális); az oszlopok pedig a különböző sejtvonalakat mutatják (**A,D,G**: WM35; **B,E,H**: HT-168-M1; **C,F,I**: HT199). A **C**, **F** és **I** képek jobb felső sarkában lévő felvételek a specifikus immunizáló peptiddel végzett (**C** és **F**) vagy az elsődleges antitest kihagyásával (**I**) végrehajtott kísérleteket mutatják. Ezen képek készítésének körülményei (expozíciós idő és a kamera érzékenysége) ugyanazok voltak, mint a **C**, **F** és **I** képek készítése során. A jobb alsó sarokban látható képek ugyanarról a látótérrel készültek, mint a kontroll kísérletek felvételei, de a DAPI-val történt magfestés eredményeit mutatják. Kalibráció: 25 μ m.

Az alkalmazott tenyészetek homogenitásának jellemzése végett mindhárom sejtvonal esetében meghatároztuk a HMB-45-pozitív sejtek arányát. Eredményeink szerint a primaer sejtvonal esetében a tenyészetben található sejtek $97 \pm 2\%$ -a volt HMB-45-pozitív ($n = 630$; átlag \pm S.D.), a két metastaticus sejtvonal esetében ugyanezen érték $93 \pm 3\%$ ($n = 1345$) és $95 \pm 4\%$ ($n = 1137$) volt, azaz a melanoma-specifikus markereket nem hordozó sejtek aránya minden esetben olyan alacsony volt, hogy azok jelenléte a további vizsgálatokat érdemben nem befolyásolta. A kísérletek egy fázisában megpróbáltuk azonosítani ezeket a sejtenyészetben található, de melanoma-specifikus markereket nem mutató sejteket. Mivel úgy véltük, hogy legnagyobb valószínűséggel fibroblastokról volt szó, humán fibroblastokra specifikusnak mondott antitest alkalmazásával immuncitokémiai reakciót végeztünk, aminek eredményeként a tenyészetben található valamennyi sejt határozott és erőteljes immunreakciót produkált. Mivel fölöttébb valószínűtlennek tűnt, hogy az alkalmazott sejtvonalak kizárólag fibroblastokat tartalmaztak, alternatív magyarázatot kerestünk,

aminek során megállapítottuk, hogy az antitest a fibroblastok kollagénszintézisében jelentős prolil-4-hidroxiláz enzimfehérjét ismerte fel, amiről viszont már korábban bebizonyosodott, hogy a melanoma malignum sejtek is expresszálják azt (*Langness és Udenfriend, 1974; Sundberg és munkatársai, 1996; Ivarsson és munkatársai, 1996*). Ebből következően az alkalmazott antitest nem volt alkalmas a melanoma sejtek és a fibroblastok differenciálására. Mivel más olyan markert nem találtunk, amit a fibroblastokra specifikusnak tartanak, a HMB-45-negatív sejtek pontos azonosítására tett erőfeszítéseinket feladtuk.



28. ábra

Melanoma malignum sejteken végzett TASK-3-specifikus immunjelölés eredményeinek nagy nagyítással készült képei

A: A monoklonális antitesttel készült immunocitokémiai kísérlet (WM35-sejtvonal). Különösen a sejtmag környezetében szembevetű az immunpozitivitás jellegzetes, hálózatos megoszlása. A jelölődés ezen mintázata még nyilvánvalóbb a konfokális mikroszkópos képen (kisebb felvétel; a sejtmag jelölése DAPI-val történt). **B:** Az egyik poliklonális antitest (Alomone) alkalmazása a HT199-sejtvonalon. Az üres nyíl a sejtmagok között megfigyelhető immunpozitivitást demonstrálja; a fehér nyilak két olyan sejtre mutatnak, amelyek esetében érdemi TASK-3-pozitivitás nem volt megfigyelhető. **C:** TASK-3- (Alomone; zöld) és HMB-45-specifikus (piros) immunfestés, valamint DAPI-val történt magfestés co-lokalizációs képe. A nyilak olyan sejtekre mutatnak, amelyeken sem TASK-3-, sem HMB-45-festődést nem lehetett detektálni. A kisebb ábrán ugyanazon látótér TASK3-specifikus jelölődése látható. **D:** Az egyik poliklonális antitesttel (Santa Cruz) végzett immunreakció a WM35-sejtvonalon. A nyíl egy olyan sejtre mutat, amelyben a sejtmagok közötti régióban erős, retikuláris festődési mintázat figyelhető meg. **E:** Poliklonális antitesttel (Alomone) történt kísérlet eredménye a WM35 sejtvonalon. A nyíl a sejtmagok közötti erőteljes immunreakciót mutatja. **F:** a monoklonális antitesttel végzett reakció a HT199 sejtvonalon. Az üres nyíl a sejtmagok között megfigyelhető, intenzív, hálózatos mintázatot mutató immunpozitivitásra mutat. A fehér nyíl a sejtfelszíni membrán TASK-3-pozitivitását jelzi. **G:** Az E résznek megfelelő jelölés (ugyanaz az antitest és sejtvonal), konfokális mikroszkóppal vizsgálva. Jól látható a cytoplasma erőteljes, retikuláris mintázata, és a nyúlványok intenzív TASK-3-pozitivitása. A nyíl a sejtfelszíni membrán érintettségét jelzi. Kalibráció: 25 µm. **H:** Az egyik poliklonális antitesttel (Alomone) végzett Western-blot kísérlet eredménye. Az 1. oszlop a teljes sejtlizátumból (160 µg fehérje), a 2. oszlop a sejtmagfrakcióból (50 µg fehérje) készült mintákon végzett kísérletek eredményeit mutatja. A 3. és 4. oszlopon a specifikus immunizáló peptiddel készült kontroll kísérletek eredményei láthatók. A feltüntetett számok az adott pozíciónak megfelelő molekulatömegeket jelzik (kDa).

Amint azt a 27. ábra mutatja, mindhárom TASK-3-specifikus antitest erős és reprodukálható reakciót adott a primaer és a metastaticus sejtvonalakon egyaránt. Az immunjelölődést nagyobb nagyítással vizsgálva (28. ábra) megerősíthettük ezt a megállapítást, ugyanakkor az is nyilvánvalóvá vált, hogy az egyes antitestek által nyújtott intracelluláris jelölődés jellege és megoszlása némileg különbözött egymástól. A fehérje N-terminálisának közelében található epitópot felismerő antitest (Alomone) által adott jelölődés esetében a nuclearis-perinuclearis festődés erősebb volt (28B, 28C és 28E képek), mint a másik két ellenanyag alkalmazása során (28A, 28D és 28F felvételek), amik ugyanakkor lényegesen komplexebb mintázatú intracelluláris jelölést produkáltak (lásd a 28A kép részeként bemutatott konfokális felvételt). Bár első pillantásra úgy tűnhet, hogy az N-terminális közelében található epitópot felismerő antitest alkalmazása során ez a fajta intracelluláris jelölődés hiányzik, a 28G képen bemutatott konfokális mikroszkópos felvétel alapján nyilvánvaló, hogy az intracelluláris jelölődés itt is jelen van, és annak mintázata igen hasonló a másik két antitest alkalmazása során kapotthoz. Függetlenül azonban az alkalmazott antitest típusától, a cytoplasmaticus immunpozitivitás általában a sejtmag egyik pólusa és (polynuclearis sejtek esetében) a nucleusok között látszott koncentrálni, egyfajta szövetszerű hálózatot alkotva (üres nyilak a 28B, 28D, 28E és 28F képeken). Az immunpozitivitás néhány esetben a sejtfelszíni membránt is érintette (tömör nyilak a 28F és a 28G felvételeken).

Fontos megjegyezni, hogy a sejttenyészetekben található sejtek némelyike nem mutatott érdemi TASK-3-pozitivitást (nyilak a 28C ábrán). Amint az a bemutatott felvételek alapján egyértelműen megítélhető, a TASK-3-negatív sejtek azon sejtek voltak, amik a melanoma-specifikus markereket sem expresszálták (a bemutatott esetben nem volt HMB-45-pozitivitás demonstrálható).

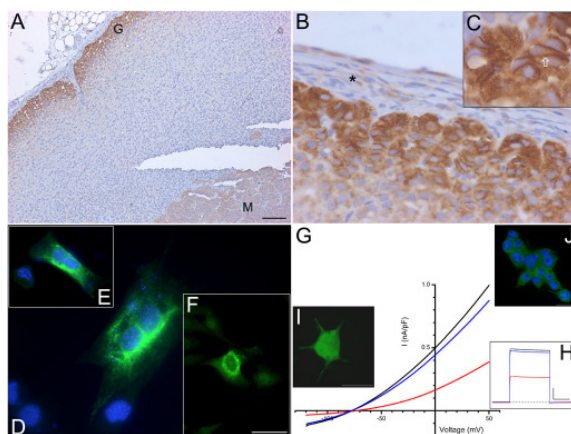
Az eddigiekben bemutatott immunhisztokémiai és immuncitokémiai kísérletek eredményei rámutattak, hogy mindhárom alkalmazott antitest ugyanazon struktúrákat és ugyanazon sejteket jelölte, ugyanakkor némi különbség mutatkozott az egyes subcellularis struktúrák egymáshoz viszonyított jelölődési intenzitásában (cytoplasmaticus vs. nuclearis-perinuclearis reakció). Bár fölöttebb valószínűtlennek tűnt, hogy mindhárom antitest egy nem-specifikus kötődés eredményeként produkálja ugyanazt a festődési mintázatot, az immunreakciók valódiságának újabb igazolásaként a sejttenyészetben fenntartott sejtvonalakból izolált fehérjeminták alkalmazásával Western-blot vizsgálatokat is végeztünk, amely kísérletek eredményének egy

reprezentatív példáját mutatja a 28H ábra. Mivel a fehérjeminták preparálása során lehetséges volt egy olyan frakció készítése, ami döntően a melanoma sejtek magjából izolált fehérjét tartalmazta, reményeink szerint ennek a vizsgálatnak arra a kérdésre is választ kellett adnia, hogy vajon az eddigiek során gyakran megfigyelt nuclearis pozitivitás valós reakció-e vagy pusztán egy konzisztensen jelentkező műtermékről van szó.

Amint az jól megfigyelhető, a teljes sejtlizátumból származó fehérje alkalmazása (28H, 1. oszlop) két jól elkülönülő sávot eredményezett, melyek közül az alsó a csatornafehérje monomer, a felső pedig a dimer formájának felelhetett meg. Igen lényeges, hogy egyik csík sem volt megfigyelhető, amennyiben az elsődleges antitestet a neki megfelelő immunizáló peptiddel előinkubáltuk (28H, 3. oszlop). Amennyiben a sejtmagokat tartalmazó frakcióból izolált fehérjemintát alkalmaztuk, úgy a Western-blot vizsgálatok során egy erős és specifikus sáv jelent meg a humán TASK-3-fehérje monomerjének megfelelő pozícióban (28H, 2. oszlop). A preadszorpciós kontroll vizsgálat során immunreaktív sáv ebben az esetben sem jelentkezett (28H, 4. oszlop), ami az immunreakció (és az antitestek) specificitásának további bizonyítékát szolgáltatta. Fontos megjegyezni, hogy az immuncitokémiai és immunhisztokémiai reakciók eredményével teljes összhangban, a melanoma sejtek magfrakciójából készített mintán végzett vizsgálat a teljes sejtlizátum esetében tapasztalhoz képest lényegesen erősebb reakciót eredményezett. Ez a megfigyelés azt bizonyította, hogy a melanoma malignum sejtek nuclearis TASK-3-pozitivitása valóban a fehérje szokatlan lokalizációjának és nem valamiféle műterméknek az eredménye.

Az eddigiekben részletezett eredmények szerint a melanoma malignum sejtek erőteljes TASK-3-immunpozitivitást mutatnak, ám az igen dús intracellularis jelölődés és a sejtfelszíni membrán igen szegényes festődése váratlan és meglepő kísérleti lelet volt, így további vizsgálatokat terveztünk annak igazolása végett, hogy az antitestek valóban azt és ott ismerik fel, amit és ahol kell. Első lépésben egy olyan szövetmintán végeztünk pozitív kontroll vizsgálatokat, ahol a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TASK-3-csatornák jelenlétét már funkcionális vizsgálatokkal igazolták. Erre a célra a patkány mellékvese tűnt a legalkalmasabbnak, hiszen meggyőző bizonyítékok szóltak a zona glomerulosa sejtek felszíni membránjában található TASK-3-csatornák jelentőségéről az aldosteronszekréció szabályozásában (*Czirják és Enyedi, 2002b*). Ezen vizsgálatokat a TASK-3-csatornafehérje N-terminálisának közelében található epitópot felismerő poliklonális antitest alkalmazásával végeztük, mivel ez az antitest

patkányspecificitással is rendelkezett. Amint azt az 29A felvétel mutatja, igen intenzív immunpozitivitást figyelhettünk meg a zona glomerulosa rétegben, továbbá ugyancsak egyértelműen pozitív, de valamivel gyengébb intenzitású reakciót tapasztalhattunk a mellékvese velőállományában is. A mellékvesét övező kötőszövet (29B), továbbá a mellékvese-kéreg másik két sejtrétege ugyanakkor nem mutatott érdemi TASK-3-pozitivitást (29A).



29. ábra

A primer antitestek alkalmazhatóságát alátámasztó kísérletek

A: Az egyik poliklonális antitest (Alomone) alkalmazásával, patkány mellékveséből származó, beágyazott mintán végzett immunreakció kis nagyítású képe. Erőteljes pozitívítás jelentkezett a cortex zona glomerulosájában (G), valamint gyengébb, de tisztán kivehető reakciót láthattunk a velőállomány területén (M). **B-C:** Patkány zona glomerulosa TASK-3 jelölődésének nagy nagyítású képei. A zona glomerulosa sejtei erőteljes, szemcsés jellegű festődést mutattak, ami a sejt felszíni membránt is érintette (C). A mellékvesét borító kötőszövetes réteg (*) ugyanakkor nem jelölődött. Kalibráció: 100 μm (A), 25 μm (B) és 12,5 μm (C). **D-F:** Transziensen transzfektált C2C12-sejtek TASK-3 festődése. A D és E panelek esetében monoklonális antitestet alkalmaztunk (a colokalizációs felvételek a DAPI-val végzett magfestés eredményét is mutatják); az F kép az egyik poliklonális antitesttel (Alomone) végzett kísérlet eredményét mutatja. A nem transzfektálódott sejtek gyenge vagy egyáltalán nem érzékelhető pozitívítást mutattak. Kalibráció: 25 μm (D, F) és 37,5 μm (E). **G-H:** stabilan transzfektált HEK-sejteken végzett funkcionális vizsgálatok eredményei. A G kép esetében a sejteket -80 mV-on tartottuk és egy 800 ms hosszú ramp protokollt alkalmaztunk +120 mV és +50 mV között. A protokollt 3 másodpercenként megismételtük, és 5 jel átlagát mutatjuk be. A kontroll áramjel fekete (pH = 7,4), a piros esetében az extracelluláris folyadék pH-ját 6,0-ra csökkentettük. A kék áramgörbe a kimosás utáni állapotot jelzi. A H ábra esetében a sejteket -80 mV-on tartottuk, majd egy előimpulzus (-90 mV, 200 ms) után +30 mV-ra depolarizáltuk a sejteket (600 ms). Kontroll: fekete áramjel, acidosis: piros, kimosás: kék; kalibráció: 3 nA és 200 ms. **I-J:** Stabilan transzfektált HEK-sejtek TASK-3-specifikus immunjelölődése az egyik poliklonális (Alomone; I) és a monoklonális antitesttel (J); konfokális felvételek. Kalibráció: 25 μm .

A nagyobb nagyítású felvételeken (29B és 29C) az is megfigyelhető, hogy az egyébként intenzíven festődő zona glomerulosa sejtekben a sejtmagok egyáltalán nem voltak TASK-3-pozitívak, miközben a sejt felszíni membrán erőteljes jelölődését tapasztalhattuk. Mindezek mellett erős, kifejezetten szemcsés megjelenésű TASK-3-

pozitivitást láttunk még a jelölődött sejtek cytoplasmájában is. A fenti eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a jelen kísérletekben alkalmazott antitest képes volt a sejt felszíni membránban (és a cytoplasmában) elhelyezkedő TASK-3-csatornák felismerésére, így a melanoma malignum sejtek esetében tapasztalt meglehetősen gyenge sejt felszíni jelölődés nem az elsődleges antitestek nem megfelelő voltának lehetett az eredménye, hanem azt jelezte, hogy a csatornafehérje valóban kicsiny mennyiségben volt jelen a melanoma sejtek felszínén.

Következő lépésben természetes körülmények között TASK-3-csatornát nem expresszáló sejt vonalakat transzfektáltunk TASK-3-fehérjét kódoló vektorokkal (mind tranziens, mind stabil transzfekciós rendszer alkalmazására sor került), majd ellenőriztük, hogy mindhárom vizsgált antitest valóban felismeri-e a TASK-3-csatornafehérjét. Amint azt a 29D-F ábrák jelzik, a sikeresen transzfektált C2C12-sejteken intenzív immunjelölődést figyelhettünk meg; ezekben az esetekben a nem transzfektálódott sejtek a reakció kényelmesen alkalmazható negatív kontrollját jelentették. A bemutatott C2C12-sejteken jól látható az erőteljes, cytoplasmaticus lokalizációjú, kifejezetten retikuláris megjelenésű festődés; a sejtmagok jelölődését ugyanakkor nem tapasztaltuk. Érdemes kiemelni, hogy az itt bemutatotthoz igen hasonló jelölődési mintázatról számoltak be Callahan és munkatársai (2004) egy másik, ugyancsak TASK-3-specifikus antitest alkalmazása után.

A vizsgálat sorozatban stabilan transzfektált HEK-sejtek alkalmazására is sor került, néhány reprezentatív felvételt mutatunk be a 29I és 29J felvételen, ahol jól megfigyelhető, hogy mind a cytoplasma, mind a sejt felszíni membrán intenzív TASK-3-specifikus immunreakciót mutatott. A stabilan transzfektált HEK-sejteken kivitelezett preadszorpciós kontroll vizsgálatok érdemi immunreakciót nem eredményeztek.

A stabilan transzfektált HEK-sejteken tapasztalt sejt felszíni jelölődés módot adott az itt található TASK-3-csatornák jelenlétének funkcionális ellenőrzésére, a vizsgálatok eredménye a 29G és 29H képeken látható. Jól megfigyelhető, hogy a HEK-sejtek depolarizációja egy robosztus, kifelé irányuló áram megjelenését okozta, ami hatásosan gátolható volt az extracelluláris pH csökkentésével. Az acidosis csatornát gátló hatása teljesen reverzibilisnek bizonyult: az extracelluláris pH 6,0-ról 7,4-re történő változtatása az eredeti amplitúdó visszatérését eredményezte. Megfelelő depolarizációs „rámpa” alkalmazásának hatására egy olyan kifelé irányuló áram jelent meg, aminek megfordulási potenciálja a belső és a külső oldatok K^+ -koncentrációja alapján számított, a K^+ -ra vonatkoztatott Nernst-potenciál közelében volt (29G).

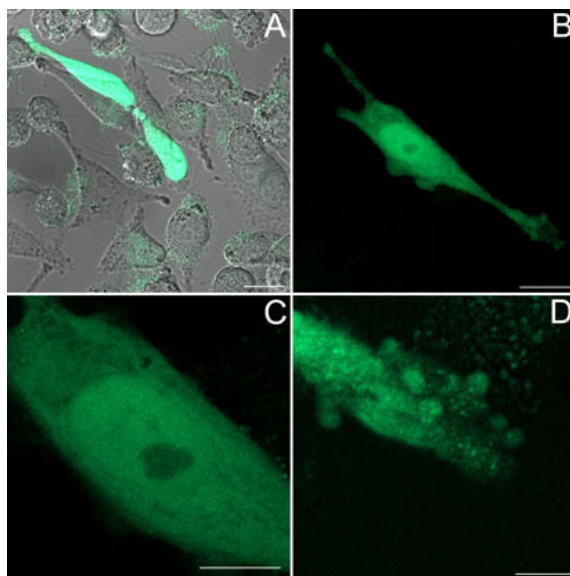
Amennyiben ugyanezen depolarizáló stimulust egy savasabb extracelluláris oldat jelenlétében ismételtük meg (pH = 6,0), a megjelenő áram amplitúdója jelentősen csökkent, de megfordulási potenciálja nem változott. Az extracelluláris acidosisnak a kialakuló K^+ -áram amplitúdójára kifejtett hatása ugyancsak tökéletesen reverzibilisnek bizonyult.

Az elektrofiziológiai vizsgálatok eredményeit összefoglalva a vizsgált sejtek egy extracelluláris acidosisra érzékeny, kifelé irányuló K^+ -áramot produkáltak, ami ezen jellemzők alapján megfelelhetett a TASK-3-csatornákon folyó áramnak, igazolván a transzfekció hatásosságát. A sejt felszíni membránjukban TASK-3-csatornákat expresszáló HEK-sejteken végzett immuncitokémiai vizsgálatok pozitivitása és a preadszorpciós kontroll vizsgálatok negativitása ugyanakkor ezen az expressziós rendszeren is egyértelműen jelezte, hogy a vizsgált antitestek a nekik megfelelő proteint specifikusan, a keresztreakció kialakulásának veszélye nélkül felismerték. Bár az eddigi vizsgálatok során meggyőzően sikerült igazolnunk a TASK-3-specifikus antitestek (köztük az újonnan fejlesztett monoklonális antitest) használhatóságát, a melanoma malignum sejtekben tapasztalt, meglehetősen szokatlan jelölődési mintázat (és ezen belül is leginkább a csatornafehérje intranuclearis jelenlétének) értelmezése továbbra is jelentős problémát jelentett. Annak érdekében, hogy egyértelműen és kétséget kizáróan bizonyítsuk, hogy a TASK-3-protein valóban bejuthat a sejt magba, egy olyan vizsgálatot terveztünk és hajtottunk végre, ami esetében az antitestek specificitásának kérdése nem merülhetett fel, ugyanakkor alkalmas volt a TASK-3-fehérje sejtben belüli lokalizációjának jelzésére.

Ezen vizsgálatok céljára egy ún. fúziós fehérjét kódoló vektort konstruáltunk, ami a TASK-3-csatornát, valamint az ahhoz a C-terminális végén kovalensen kötött fluoreszcens fehérjét (Green Fluorescent Protein, GFP) kódolta, majd ezzel a DNS-szekvenciával transzfektáltuk a sejtenyészetben fenntartott melanoma malignum sejteket. 2-3 nap elteltével a sikeresen transzfektált sejtek a fúziós proteint kellő mennyiségben szintetizálták ahhoz, hogy megfelelő hullámhosszúságú (488 nm) fényel megvilágítva az emittált fluoreszcencia, és így a fehérje lokalizációja megítélhető legyen; az eredményeket a 30. ábra foglalja össze.

Amint az a 30A felvételen megfigyelhető, a sikeresen transzfektált melanoma malignum sejtek intenzív fluoreszcens jelet produkáltak, így azok egyértelműen elkülöníthetők voltak a környező, nem transzfektálódott sejtektől. A képekre tekintve az is egyértelműen látható (30B), hogy a zöld fluoreszcencia megoszlása megegyezett

azzal, amit az immuncitokémiai eredmények alapján vártunk (lásd pl. 28A. ábra): a fúziós protein egyértelműen jelen volt a cytoplasmában és a sejtmagban (miközben a nucleolus területét megkímélte - 30C). Ezen túlmenően a fluoreszcens protein a melanoma sejtek nyúlványainak terminalis részén bedúsult, és ott kisebb vacuolumok formájában leválni látszott a sejtmembránról (30D). Hasonló jelenséget a melanoma sejteken végzett immuncitokémiai vizsgálatok során is gyakran megfigyeltünk.



30. ábra

TASK-3-GFP fúziós fehérje megoszlása sejttenyészetben fenntartott melanoma malignum sejteken

A: Sejttenyészetben fenntartott melanoma malignum sejtek DIC-optikával készített képének, és az ugyanazon látótérben elhelyezkedő, a TASK-3-GFP fúziós proteinnel sikeresen transzfectált sejtek fluoreszcens képének co-lokalizációs felvétele. **B:** A TASK-3-GFP fúziós fehérje sejtben belüli megoszlása egy melanoma malignum sejtben. A szummált kép 7 egyedi felvétel ($z = 1 \mu\text{m}$) alapján készült. **C:** Ugyanazon sejt nuclearis régiójáról készült nagy nagyítású kép. **D:** A **B** részen látható sejt lefelé mutató nyúlványának végéről készített, nagy nagyítású felvétel. Kalibráció: $20 \mu\text{m}$ (**A** és **B**), $10 \mu\text{m}$ (**C**) és $5 \mu\text{m}$ (**D**).

3.3.3. Diszkusszió

A TASK-3-csatornák ubikviter előfordulású, „háttér” K^+ -csatornák, melyek molekuláris szerkezetét, biofizikáját és farmakológiáját sok laboratórium próbálta meg tisztázni az elmúlt években, döntően heterológ expressziós rendszerek és állati szövetek alkalmazásával. Ezen vizsgálatok eredményeként ismert, hogy a TASK-3-csatornák számos fiziológias funkcióban vesznek részt; egyebek között biztosítják a perifériás és centrális kemoreceptorok acidosis és hypoxia iránti érzékenységét (*Hartness és*

munkatársai, 2001; Yamamoto és munkatársai, 2002; Washburn és munkatársai, 2002; Washburn és munkatársai, 2003; Williams és Buckler, 2004), meghatározó jelentőségűek a zona glomerulosa sejtek aldosteronszekréciójának szabályozásában (*Czirják és Enyedi, 2002b*), fontos szerepet játszanak a neuronális ingerlékenység rövid és hosszú távú szabályozásában (*Han és munkatársai, 2002; Chemin és munkatársai, 2003; Kang és munkatársai, 2003; Meuth és munkatársai, 2003; Berg és munkatársai, 2004; Hopwood és Trapp, 2005*), jelentősek lehetnek a neuron-glia kölcsönhatásokban (*Han és munkatársai, 2003*), továbbá az apoptózis szabályozásában.

A TASK-3-csatornák patológiás jelentősége is igen lényegesnek tűnik: mivel a halotán és izofluorán alkalmazása aktiválja őket, ezen gáznemű altatószerek a sejtek K^+ -konduktanciájának növekedését, a membrán hiperpolarizációját és csökkent ingerlékenységét okozhatják (*Meadows és Randall, 2001*). Különösen lényegesnek tűnik az a felismerés, hogy a TASK-3- és a TASK-1-csatornák generális anaesthesia során bekövetkező aktivációja a kemoreceptorokat is hiperpolarizálja, csökkentve azok érzékenységét a szokásos stimulusokkal szemben. A perifériás kemoreceptorok válaszkészségének ezen redukciója következtében a respirációt fenntartó fiziológias stimulusok erőssége jelentősen csökken, ami súlyos komplikációt jelenthet az általános anaesthesia alkalmazása során vagy azt követően (*Buckler és munkatársai, 2000; Talley és Bayliss, 2002*). Érdekes módon, az izofluorán egyben neuroprotektív hatása is, amit ugyancsak a neuronális TASK-3-csatornák aktivációjával, a következményes hiperpolarizációval és az ingerlékenység csökkenésével hoznak összefüggésbe.

A TASK-3-csatornák aktivitásának és jelentőségének egyik legellentmondásosabb pontja, hogy miközben egyes körülmények között kifejezetten serkentik az apoptosist, más esetben jelenlétük és aktivitásuk anti-apoptotikus és ezáltal tumorigén hatást hordoz. A TASK-3-csatornák expresszióját leírták egyebek között emlő-, colorectalis- és gyomordaganatokban (*Kim és munkatársai, 2004; Kovács és munkatársai, 2005*), valamint a fehérje overexpressziójáról számoltak be egy tüdőcarcinomából származó sejtvonal (Ben-sejtvonal) esetében. Tekintettel a TASK-3-csatornák jelenlétének és aktivitásának a tumorok kialakulásában betöltött potenciális jelentőségére, helytállónak tűnik az a feltételezés, hogy összefüggés állhat fenn a TASK-3-csatornák jelenléte, mennyisége és megoszlása, valamint a tumorok egyes klinikai, hisztológiai és biológiai jellemzője között. Az ilyen összefüggések felismerése nagy jelentőségű lehet a klinikai gyakorlatban, hiszen esetlegesen információt szolgáltat a rosszindulatú daganat növekedéséről, metastatisáló képességéről és

prognózisáról. Annak érdekében azonban, hogy ezeket a következtetéseket levonhassuk, egy kellően nagy esetszámot felölelő immunhisztokémiai vizsgálatra van szükség, aminek viszont előfeltétele egy megbízhatóan alkalmazható, hatásos, kellően specifikus és lehetőleg monoklonális anti-TASK-3-antitest alkalmazása. Eredményeinkből úgy tűnik, hogy a jelen munka keretében vizsgált monoklonális antitest megfelelő erre a célra, és az optimális antigénfeltárási technikával kombinálva lehetővé teszi a kívánt hisztopatológiai tanulmány kivitelezését.

Meg kell azonban jegyezni, hogy a melanoma malignum sejtek által mutatott TASK-3-expresszió igen váratlan mintázatot adott. A jelölődés különösen intracellulárisan bizonyult jelentősnek, ahol erőteljes, hálózatos megoszlást mutatott. A jelölődés gyakran koncentrált a sejtmagok területére, és összefüggést mutatott a sejtmaggal (és/vagy a sejtmaghártyával) is. Ezzel egyidejűleg, a kezdetben leginkább várt struktúra területén, azaz a sejtfelszíni membránban, a jelölődés meglehetősen szegényesnek bizonyult; ami akár azt is jelezhetette, hogy az alkalmazott antitestek nem képesek a TASK-3-fehérje megbízható detektálására. Bár ennek a lehetősége kétségtelenül fennállt, számos olyan bizonyíték áll a rendelkezésünkre, ami ezen interpretációnak egyértelműen ellentmond. Mindenképpen megnyugtató például hogy a sejtfelszíni membrán markáns jelölődése a három közül egyik alkalmazott antitest esetében sem volt megfigyelhető, mivel az meglehetősen valószínűtlen, hogy egyik antitest sem képes azt a molekulát felismerni, ami ellen termeltetve lett. További lényeges bizonyíték az antitestek alkalmazhatósága mellett, hogy az expressziós rendszereket a TASK-3-fehérjét kódoló vektorral transzfektálva valamennyi esetben intenzív immunpozitivitást tapasztaltunk a sikerrel transzfektált sejtekben. Olyan pozitív kontroll szövetet alkalmazva pedig, ahol a sejtfelszíni membrán TASK-3-expressziója funkcionális vizsgálatokkal korábban már bebizonyosodott (patkány mellékvese zona glomerulosa; *Czirják és Enyedi, 2002b*) vagy a stabilan transzfektált HEK-sejtek esetében, ahol a TASK-3-csatornák aktivitását elektrofiziológiai módszerekkel magunk is igazolhattuk, az antitestek alkalmazása a sejtfelszíni membrán markáns és erőteljes jelölődését eredményezte. A fentieket kiegészítve a TASK-3-GFP fúziós protein megoszlásával kapott adatokkal, kijelenthető, hogy az antitestek valóban felismerik a TASK-3-fehérjét, függetlenül annak lokalizációjától.

Alapvetően fontos azonban annak tisztázása is, hogy a megfigyelt reakció vajon specifikus kötődés eredményét tükrözi-e. Az antitestek specificitásának ellenőrzésére a legjobb módszer azok „knock-out” rendszereken való tesztelése, azonban egy humán

TASK-3 knock-out rendszer kifejlesztése nem tűnik triviális feladatnak. Ebből következően olyan megoldásokat kellett választanunk a specificitás tesztelésére, amik önmagukban kevésbé hatékonyak ugyan, mint a knock-out rendszer alkalmazása, de kombinált alkalmazásuk elfogadottnak tekinthető az antitestek specificitásának igazolására. Ezek első eleme, hogy általában tanácsos két, a célfehérje eltérő epitópjait felismerő elsődleges antitest alkalmazását elvégezni, hiszen annak valószínűsége, hogy a két különböző antitest nem-specifikus módon mutatja ugyanazt a festődési mintázatot, gyakorlatilag nulla. A jelen munkában nem két, hanem három különböző antitest alkalmazása történt, és bár a reakció intenzitása némileg különbözött az egyes esetekben, nem volt döntő különbség a jelölt sejtek és struktúrák minőségében. Tekintettel arra, hogy az egyes antitestek különböző fajokban lettek termeltetve (nyúl, kecske és egér), és a preadszorpciós kontroll vizsgálatok konzisztens, negatív eredményt hoztak, a másodlagos antitestek által esetleg okozott nem-specifikus jelölődés is kizárható volt. A transzfekciós kísérletek, a pozitív kontroll vizsgálatok és a fúziós proteinnel végzett kísérletek eredményei további megerősítést jelentettek a bemutatott immunreakciók valóságának.

Igen figyelemre méltó, hogy a szövettani metszeteken a kötőszövet rendre negatívnak bizonyult, ami nem pusztán azért volt megnyugtató, mert ez a tény igen kényelmes belső negatív kontrollt biztosított, hanem azért is, mert a kötőszövet immunhisztokémiai szempontból meglehetősen „promiszkus”, azaz itt gyakran tapasztalható álpozitív reakció. További érv a specificitás mellett az intracelluláris jelölődési mintázat bonyolult (ugyanakkor konzekvensen reprodukálható) volta; nem-specifikus reakció esetében sokkal homogénebb reakció megjelenésére lehet számítani. Végül, de nem utolsó sorban, a Western-blot kísérletek eredményei is specifikus reakció mellett szóltak, ami azért is különösen jelentős, mert módunkban állt olyan fehérjeminta vizsgálatát is elvégezni, ami abból a struktúrából készült, ahol a TASK-3-jelölődés megjelenése a legmeglepőbb volt: azaz a sejtmagok területén. A nuclearis homogenizátumból készített fehérjeminta esetében a várt pozícióban megjelenő, a preadszorpciós kontroll során pedig eltűnő immunreaktív csík igen meggyőzően igazolta, hogy a nuclearis TASK-3-jelenlét nem műtermék.

A fentieket összefoglalva úgy gondoljuk, hogy minden rendelkezésünkre álló eszközt és módszert megragadtunk annak igazolására, hogy az antitestek specifikusak és használhatók; továbbá hogy a melanoma malignum sejtek esetében tapasztalt különös jelölődési mintázat nem a technikák inadekvát alkalmazásának vagy a felhasználók

inkompetenciájának a következménye. Ha viszont elfogadjuk, hogy a melanoma malignum sejtek nem elsősorban a sejt felszíni membránjukban, hanem intracellulárisan expresszálják a TASK-3-fehérjét, akkor meg kell próbálni választ keresni arra a kérdésre, hogy ennek vajon mi lehet az oka.

Mindenekelőtt le kell szögezni, hogy a transzfektált sejtek esetében tapasztalt igen erőteljes intracelluláris pozitivitás nem szokatlan (Czirják és Enyedi, 2002b; Callahan és munkatársai, 2004), és ebben az esetben a kérdéses fehérje igen jelentős szintézise, és a termék sejten belüli felhalmozódása áll a jelenség hátterében. Ezt a magyarázatot követve felmerül, hogy a melanoma sejtek esetében is a TASK-3-fehérje igen intenzív produkciója magyarázza a jelentős mértékű intracelluláris pozitivitást; ám az továbbra is nehezen értelmezhető, hogy a kész fehérje vajon miért nem jelenik meg a sejt felszíni membránban. A jelenség lehetséges magyarázata az lehet, hogy a TASK-3-fehérje intracelluláris szállítása megköveteli a csatornafehérje és egy 14-3-3 jelű, ún. adapter-fehérje közötti szoros kölcsönhatást (Rajan és munkatársai, 2002). Bár az még most sem teljesen világos, hogy az említett adapter fehérje hogyan képes a TASK-3-csatorna sejt felszíni membránba történő kihelyeződését biztosítani, számos lehetőség felmerült. Előfordulhat, hogy a 14-3-3 fehérje kötődése lehetővé teszi valamilyen kiegészítő protein („motor”-fehérje, β -alegység vagy chaperon) kapcsolódását, ami a funkcióképes dimerek endoplasmaticus reticulumból a sejt felszíni membránba juttatásában működik közre. Egy másik, ugyancsak említésre méltó lehetőség, hogy a 14-3-3 fehérje kötődése egy olyan ún. retenciós domént fed el, aminek szabadon maradása után egy specifikus (ám ezidáig még nem azonosított) protein kapcsolódik a csatornához, ami elősegíti annak sejt felszíni membránból történő visszavonását. A harmadik lehetséges mechanizmus pedig, hogy a 14-3-3 fehérje a TASK-3-csatorna egyéb olyan szekvenciáihoz is képes kapcsolódni, amik valamilyen eddig nem tisztázott szerepet töltenek be a TASK-3-fehérje transzlokációjában.

A TASK-1-csatornák esetében a csatornafehérje és az adapter protein közötti kapcsolat egy pentapeptid szekvencia épségét feltételezi a csatorna C-terminális végének közelében. A TASK-csatornák és az adapter fehérje közötti erős kapcsolódás egy mintegy 40 aminosavból álló szekvencia meglétét igényli, ám egy kísérletsorozat során elég volt egyetlen (!) aminosav delécióját okozni a karboxi-terminális régió területéről ahhoz, hogy a TASK-csatornák sejt felszíni membránba történő transzlokációja súlyosan károsodjon. A beavatkozás következtében a makroszkopikus TASK-3-áram nagysága is szignifikánsan csökkent. Ezzel összhangban, ugyancsak

heterológ expressziós rendszert vizsgálva azt is megállapították, hogy a 14-3-3 adapter fehérje overexpressziója a megjelenő TASK-3-áram nagyságát jelentősen növelte. Mindezek alapján igen kecsegtetőnek tűnik az a feltételezés, hogy miközben a melanoma malignum sejtek nagy mennyiségben állítják elő a TASK-3-fehérjét, azok sejt felszíni membránba történő kihelyeződése zavart szenved, aminek háttérében vagy a 14-3-3 adapter-fehérjével való kölcsönhatás változása (pl. az adapter fehérje hiánya vagy a TASK-3-csatorna C-terminusának mutációja miatt), vagy valamilyen egyéb, jelenleg nem ismert mechanizmus állhat.

Az említett magyarázatok közül különösen érdekesnek tűnik az a lehetőség, hogy a csatornafehérje megfelelő transzlokációjához szükséges apparátus egyes elemei (így az adapter fehérje) hiányozhatnak, és ezért marad el a TASK-3-csatornák sejt felszíni membránba történő kihelyeződése. Ez a mechanizmus (legalábbis részben) választ adhatna arra a kérdésre is, hogy vajon a malignusan transzformált Ben-sejtek esetében (amik egyébként overexpresszálják a fehérjét) miért sokkal kisebb a TASK-3-áram nagysága, mint egyes egészséges sejtek (pl. zona glomerulosa sejtek vagy kisagyi szemcsesejtek) esetében. Mivel könnyen elképzelhető, hogy a TASK-3-áram nagysága lehet a kulcs annak eldöntésében, hogy a csatornák pro- vagy anti-apoptoticus funkciót töltenek be, a fehérje transzlokációjáért felelős intracelluláris gépezet működése meghatározó jelentőségű lehet a sejt életének ezen „sorskérdése” szempontjából.

Szükséges még rámutatni, hogy bár a TASK-3-csatornák döntően intracelluláris jelenléte a melanoma malignum sejtekben meglepő volt ugyan, a fehérje (legalábbis részleges) intracelluláris lokalizációja azonban nem teljesen szokatlan. Intracelluláris megjelenést tapasztaltunk korábban patkány cerebellumból és nucleus cochlearisból származó astrocyták (*Rusznák és munkatársai, 2004*), humán vastagbél-nyálkahártya sejtjei és a pancreas szigetsejtjei (*Kovács és munkatársai, 2005*) esetében. Hasonló adatokról számoltak be Callahan és munkatársai (*2004*) patkány központi idegrendszerét alkotó egyes neuronok tanulmányozása során is. Ezen utóbbi vizsgálatokban az immunogold technika alkalmazására került sor, és az elektronmikroszkópos felvételek alapján igazolható volt a TASK-3-immunpozitivitás a Golgi-apparátus, az endoplasmaticus reticulum és néhány más intracelluláris organelum esetében. Könnyen előfordulhat, hogy a melanoma sejtek esetében is ezen struktúrák TASK-3-expressziója felelős a jellegzetesen erős, intracellulárisan jelentkező immunpozitivitásért. A fenti struktúrák mellett felmerül még a melanoma malignum sejtek nuclearis és mitokondriális membránt érintő TASK-3-expressziója is. Kicsit

általánosítva ezeket a megfigyeléseket és gondolatokat nem elképzelhetetlen, hogy a TASK-3-csatornák különböző intracelluláris struktúrákban és membránokban történő expressziója a sejtek egy általános jellemzője, ahol a TASK-3-csatornák fontos, ám ezidáig pontosan nem tisztázott funkcióval bírnak.

4. BEFEJEZŐ GONDOLATOK

Témavezetőmmel és laboratóriumunkkal nagy utat tettünk meg a disszertáció keretében végzett kísérletek során. Két fontos szempont irányított bennünket a kísérletes munka tervezése és kivitelezése, valamint az egyes projektek kimunkálása során: egyrészt folyamatosan szembesülnünk kellett azzal a kihívással, hogy a mai tudományos munkában csak akkor képzelhető el a megfelelő színvonalú tudományos folyóiratokban történő közlés, ha többféle technika egyidejű alkalmazására kerül sor; másrészt (ahogy az a tudományos munka során lenni szokott) egy-egy kérdés megválaszolása során mindig újabb problémák megoldása vált szükségessé. Az előbbi okán folyamatosan bővítettük technikai, metodikai arzenálunkat, és azt mindig a lehető legmagasabb színvonalon próbáltuk meg elérni. Laboratóriumunk működésének kezdeti időszakában csak „tisztá” elektrofiziológia alkalmazására került sor, először enzimatikusan izolált neuronokon, később túlélő agyszeletek alkalmazásával. A kísérletek során hamar be kellett azonban látnunk, hogy csak elektrofiziológiával manapság már nem lehet boldogulni, ezért azt megpróbáltuk a képalkotó technikák és az immuncitokémiai, immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával kombinálni. A kezdeti lépések fölöttébb bizonytalanok voltak, és talán mindenkinek jobb, ha az első, izolált neuronokon kapott immuncitokémiai eredményeket és a róluk készült képeket örök homály fedi, és csak magunk számára állnak rendelkezésre azt dokumentálva, hogy hogyan is kezdődött „kirándulásunk” a képalkotó technikák birodalmába.

Később, a technika finomításával, már arra is vállalkozhattunk, hogy fontosnak tűnő, általános érdeklődésre is számot tartó kérdésekre keressünk választ. A mai napig érdekes és izgalmas kérdés, hogy a neuronok tüzelési sajátosságainak eltérőségét vajon az általuk expresszált K^+ -csatornaelegységek típusa és megoszlása önmagában is kellő mértékben garantálja-e, vagy ezen fehérvék jelenléte az eltérő viselkedés biztosításában csak másodlagos tényező. Ebből a szempontból kifejezetten szerencsés a nucleus cochlearis tanulmányozása, hiszen az itt található neuronok sokfélesége és funkcionális heterogenitása kiváló alanyát jelenti az efféle vizsgálatoknak. A bushy-sejtek immuncitokémiai vizsgálata még megvalósíthatónak tűnt az enzimatikusan izolált sejtek alkalmazásával, azonban a nucleus cochlearis többi sejtípusának tanulmányozása (a sejtazonosítás nehézségei miatt) gyökeresen más megközelítést: az úszószeletek rendszeres alkalmazását követelte meg. Az úszószeletekben történő sejtidentifikálás

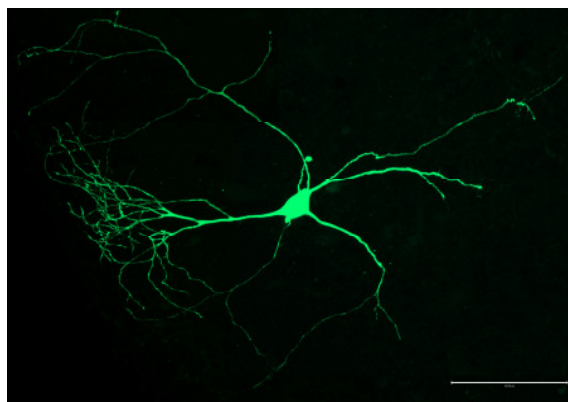
azonban keményebb diónak bizonyult, mint azt feltételeztük; keresnünk kellett tehát egy „kisegítő” technikát, amivel ez a feladat egyszerűsíthetőnek tűnt. A nucleus cochlearis neuronok rodaminos töltésével és a konfokális mikroszkópia alkalmazásával azonban nem pusztán több és pontosabb információ állt rendelkezésünkre a nucleus cochlearis szerkezetét és sejtípusainak morfológiáját illetően, de az összeállított, térhatású felvételeknek köszönhetően elkezdtünk „látni” a nucleus cochlearisban, és pontosabban kezdett körvonalazódni az a hihetetlenül bonyolult cytoarchitektúra, ami ezen magfésülésre jellemző. A szisztematikus konfokális mikroszkópos vizsgálatok eredményeként egyébként egyre szilárdabb meggyőződésünk, hogy a nucleus cochlearis neuronok jelenleg alkalmazott klasszifikációja nem minden ponton állja meg a helyét, és határozott célunk, hogy ennek vonatkozásában is új adatokat szolgáltatassunk.

A K^+ -csatornák neuronokban betöltött funkciójának vizsgálata mellett a TASK-3-csatornák is figyelmünk középpontjába kerültek, amik a jellemző élettani funkciók mellett jelentősek lehetnek különböző rosszindulatú daganatok pathogenesisében is. Ezen vizsgálatok keretében végeztük el egy újonnan kifejlesztett antitest tesztelését, és szeretnénk hinni, hogy az antitest validálását valóban a lehető legalaposabban, valamennyi alkalmazható technika bevonásával végeztük el. Összevetve a disszertáció kezdeti és végpontját, azaz az enzimatikusan izolált neuronokon kivitelezett immuncitokémia konvencionális mikroszkópos dokumentálását, és egy professzionális fejlesztőlaboratórium által kifejlesztett monoklonális antitest validálásnak keretében végzett kísérletes munkát, aminek egyik eleme egy fúziós proteint kódoló vektor szintézise, a vele való transzfecció és a termék intracelluláris megoszlásának vizsgálata konfokális mikroszkópiával; azt gondoljuk, hogy a két pont között nem az egyenes volt a legrövidebb út, és közben valóban nagyon sokat tanultunk.

Természetesen továbbfejlődésre és egyre újabb technikák alkalmazására továbbra is szükség van. Bár a továbbiakban részletezett eredmények és tervek nem képezik a jelen disszertáció tárgyát, szükségesnek érezzük néhány további, a disszertációval kapcsolatos kísérletes munka lezárását követő kísérletes eredmény megemléztését.

Bár a nucleus cochlearis neuronok rodaminos töltése, és az így kapott szeletek konfokális mikroszkópos analízise egy fantasztikus világot nyitott meg számunkra, mostanra szembesülnünk kellett a technika egyik komoly fogyatékoságával: alkalmazásával a neuronok nyúlványrendszere csak igen korlátozottan vizsgálható és reprodukálható, márpedig enélkül nem lehet a neuronok morfológiáját a maga

teljességében megítélni. A probléma áthidalására egy új jelölőanyag, a biocitin alkalmazását kezdtük meg, és az ennek segítségével nyert felvételek konfokális analízise zajlik (31. ábra). Mivel a biocitin sejtbe juttatása elektrofiziológiai mérések során, a mikroelektródon keresztül zajlik, a technika kiválóan alkalmas a morfológia-funkció kapcsolatainak vizsgálatára is.



31. ábra
Egy biocitinnel jelölt nucleus cochlearis óriássejt konfokális mikroszkópos képe

A bemutatott felvételen jól megfigyelhető az óriássejt szinte az egész nucleus cochlearist behálózó nyúlványrendszere. Kalibráció: 100 μm .

A szeletekben történő elektrofiziológiai méréseket jelenleg sikeresen ötvözzük a szinaptikus aktivitás jellemzésére szolgáló módszerekkel, és ezáltal nem csak a neuronok belsőleges membránsajátosságainak vizsgálatára van módunk, de a nucleus cochlearisban található neuronális hálózatok vizsgálatára is. Ezen túlmenően lehetőségünk van az elektrofiziológiai méréseket az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásainak tanulmányozásával is kiegészíteni az általunk vizsgált sejtek (döntően neuronok és astrocyták) esetében.

A melanoma sejtek további vizsgálata is folyik. Ennek során megtörtént a humán TASK-3-csatornára specifikus mRNS jelenlétének igazolása mindhárom melanoma sejtvonal esetében, értékes megerősítést adva az immunhisztokémiai és immuncitokémiai eredményeinknek. Az mRNS-t megszekvenálva az is bebizonyosodott, hogy az teljesen identikus a GénBankban közölt humán TASK-3-csatorna szekvenciájával, azaz nem mutáns fehérjéről van szó. Sikerrel igazoltuk továbbá, hogy a jelen disszertációban is bemutatott intracelluláris festődés hátterében a TASK-3-csatornák mitokondriális expressziója áll, valamint bizonyítottuk, hogy a TASK-3-csatornák translációját gátolva a melanoma sejtek pusztulása következik be.

Utóbbi megfigyelés arra utal, hogy a TASK-3-csatornák a mitokondriális funkció biztosítása révén szükségesek a melanoma sejtek túléléséhez, és felvetik azt a reményteljes gondolatot, hogy talán egyszer majd specifikus tumorterápia célpontjaiként szolgálhatnak.

Végül, de nem utolsó sorban, gőzerővel folynak azon „tissue microarray” technikával végzett kísérletek, melyekhez az általunk validált anti-TASK-3-antitestet és több száz, különböző hisztopatológiai és klinikai jegyeket viselő emlőtumorból izolált szövetmintát alkalmazunk, a tumorminták hisztológiai viselkedése és TASK-3-expressziója között esetlegesen fennálló kapcsolatok létezésének igazolására.

5. A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- Adams J.C., Mugnaini E. (1987) Patterns of glutamate decarboxylase immunostaining in the feline cochlear nuclear complex studied with silver enhancement and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 262: 375-401.
- Adrian R.H. (1969) Rectification in muscle membrane. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 19: 340-369.
- Agar E., Green G.G., Sanders D.J. (1997) Membrane properties of mouse dorsal cochlear nucleus neurons in vitro. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 8: 157-179.
- Ahmole I., Goodwin P.A., Stanfield P.R. (2001) TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflügers Arch.* 442: 828-833.
- Alibardi L. (1998) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of neurons in the rat ventral cochlear nucleus projecting to the inferior colliculus. *Ann. Anat.* 180: 415-426.
- Alibardi L. (1999) Fine structure, synaptology and immunocytochemistry of large neurons in the rat dorsal cochlear nucleus connected to the inferior colliculus. *J. Hirnforsch.* 39: 429-439.
- Alibardi L. (2003) Ultrastructure and immunocytochemical characteristics of cells in the octopus cell area of the rat cochlear nucleus: comparison with multipolar cells. *Ann. Anat.* 185: 21-33.
- Alibardi L. (2006) Review: Cytological characteristics of commissural and tuberculo-ventral neurons in the rat dorsal cochlear nucleus. *Hearing Res.* 216-217: 73-80.
- Anderson A.J., Harvey A.L. (1988) Effects of the potassium channel blocking dendrotoxins on acetylcholine release and motor nerve terminal activity. *Br. J. Pharmacol.* 93: 215-221.
- Armstrong C.M. (2003) Voltage-gated K⁺ channels. *Sci. STKE.* 10.
- Bader C.R., Bertrand D., Schwartz E.A. (1982) Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J. Physiol.* 331: 253-284.
- Baldwin T.J., Tsaur M.L., Lopez G.A., Jan Y.N., Jan L.Y. (1991) Characterization of a mammalian cDNA for an inactivating voltage-sensitive K⁺ channel. *Neuron* 7: 471-483.
- Banks M.I., Pearce R.A., Smith P.,H. (1993) Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brainstem. *J. Neurophysiol.* 70: 1420-1432.
- Berg A.P., Talley E.M., Manger J.P., Bayliss D.A. (2004) Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J. Neurosci.* 24: 6693-6702.
- Beyerl B.D. (1978) Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. *Brain Res.* 145: 209-223.
- Birinyi A., Straka H., Matesz C., Dieringer N. (2001) Location of dye-coupled second order and efferent vestibular neurons labeled from individual semicircular canal or otolith organs in the frog. *Brain Res.* 921: 44-59.
- Blackstad T.W., Osen K.K., Mugnaini E. (1984) Pyramidal neurones of the dorsal cochlear nucleus: a Golgi and computer reconstruction study in cat. *Neuroscience* 13: 827-854.
- Brawer J.R., Morest D.K., Kane E.C. (1974) The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 155: 251-300.
- Brew H.M., Forsythe I.D. (1995) Two voltage-dependent K⁺ conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *J. Neurosci.* 15: 8011-8022.
- Brooke R.E., Atkinson L., Edward I., Parson S.H., Deuchars J. (2005) Immunohistochemical localisation of the voltage gated potassium ion channel subunit Kv3.3 in the rat medulla oblongata and thoracic spinal cord. *Brain Res.* 1070: 101-115.

- Buckler K.J., Williams B.A., Honore E. (2000) An oxygen-, acid- and anesthetic- sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* 525: 135-142.
- Butt M.A., Kalsi A. (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 is glial functions. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 33-44.
- Callahan R., Labunsky D.A., Logvinova A., Abdallah M., Liu C., Cotton J.F., Yost C.S. (2004) Immunolocalization of TASK-3 (KCNK9) to a subset of cortical neurons in the rat CNS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 525-530.
- Caminos E., Vale C., Lujan R., Martinez-Galan J.,R., Juiz J.,M. (2005) Developmental regulation and adult maintenance of potassium channel proteins (Kv1.1 and Kv1.2) in the cochlear nucleus of the rat. *Brain Res.* 1056: 118-131.
- Catterall W.A. (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *TINS.* 16: 500-506.
- Chapman C.G., Meadows H.J., Godden R.J., Campbell D.A., Duckworth M., Kelsell R.E., Murdock P.R., Randall A.D., Rennie G.I., Gloger I.S. (2000) Cloning, localisation and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Mol. Brain. Res.* 82: 74-83.
- Chavez R.A., Gray A.T., Zhao B.B., Kindler C.H., Mazurek M.J., Mehta Y., Forsayeth J.R., Yost C.S. (1999) TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J. Biol. Chem.* 274: 7887-7892.
- Chemin J., Girard C., Duprat F., Lesage F., Romey G., Lazdunski M. (2003) Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* 22: 5403-5411.
- Chen X., Talley E.M., Patel N., Gomis A., McIntire W.E., Dong B., Viana F., Garrison J.C., Bayliss D.A. (2006) Inhibition of a background potassium channel by G_q protein α -subunits. *Neuroscience* 103: 3422-3427.
- Clarke C.E., Veale E.L., Green P.J., Meadows H.J., Mathie A. (2004) Selective block of the human 2-P domain potassium channel, TASK-3, and the native leak potassium current, I_{KSO}, by zinc. *J. Physiol.* 560.1 51-62.
- Coetzee W.A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M.S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 233-285.
- Connor J.A., Stevens C.F. (1971) Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* 213: 21-30.
- Cooper B.Y., Johnson R.D., Rau K.K. (2004) Characterisation and function of TWIK-related acid sensing K⁺ channels in a rat nociceptive cell. *Neuroscience* 129: 209-224.
- Cooper E.C., Milroy A., Jan Y.N., Jan L.Y., Lowenstein D.H. (1998) Presynaptic localization of Kv1.4-containing A-type potassium channels near excitatory synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18: 965-974.
- Cuttle M.F., Rusznák Z., Wong A.Y.C., Owens S., Forsythe I.D. (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J Physiol.* 534: 733-744.
- Czirják G., Enyedi P. (2003) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63: 646-652.
- Czirják G., Enyedi P. (2002) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63: 646-652.
- Czirják G., Enyedi P. (2002b) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 16: 621-629.
- Czirják G., Enyedi P. (2002c) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* 277: 5426-5432.

- Czirják G., Fischer T., Spät A., Lesage F., Enyedi P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 14: 863-874.
- Dahr M.S., Plummer H.K. (2006) Protein expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRK) in breast cancer cells. *BMC Physiology* 6:8.
- Decher N., Maier M., Dittrich W., Gassenhuber J., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.* 492: 84-89.
- Diaz-Guerra M.J., Velasco M., Martin-Sanz P., Bosca L. (1996) Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes. Requirement of NF-kappaB activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 271: 30114-30120.
- Ding J., Benson T.E., Voigt H.F. (1999) Acoustic and current-pulse responses of identified neurons in the dorsal cochlear nucleus of unanesthetized, decerebrate gerbils. *J. Neurophysiol.* 82: 3434-3457.
- Dinh Q.T., Cryer A., Dinh S., Trevisani M., Georgiewa P., Chung F., Geppetti P., Heppt W., Klapp B.F., Fisher A. (2005) Protease-activated receptor 2 expression in trigeminal neurons innervating the rat nasal mucosa. *Neuropeptides* 39: 461-466.
- Diochot S., Drici M-D., Moinier D., Fink M., Lazdunski M. (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of I_{to1} in cardiac electrogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 126: 251-263.
- Diochot S., Schweitz H., Béress L., Lazdunski M. (1998) Sea *Anemone* peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* 273: 6744-6749.
- Disterhoft J.F., Perkins R.E., Evans S. (1980) Neuronal morphology of the rabbit cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 192: 687-702.
- Dodson P.D., Billups B., Rusznák Z., Szűcs G., Barker M.C., Forsythe I.D. (2003) Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J. Physiol.* 550: 27-33.
- Dodson P.D., Forsythe I.D. (2004) Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability. *Trends Neurosci.* 27: 210-217.
- Doucet J.R., Ryugo D.K. (1997) Projections from the ventral cochlear nucleus to the dorsal cochlear nucleus in rats. *J. Comp. Neurol.* 385: 245-264.
- Doughty J.M., Barnes-Davies M., Rusznák Z., Harasztosi Cs., Forsythe I.D. (1998) Contrasting Ca²⁺ channel subtypes at cell bodies and synaptic terminals of rat anteroventral cochlear bushy neurones. *J. Physiol.* 512: 365-376.
- Doupnik C.A., Davidson N., Lester H.A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Op. Neurobiol.* 5: 268-277.
- Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471.
- Duprat F., Lesage F., Patel A.J., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (2000) The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K⁺ channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57: 906-912.
- Ehret G. (1979) Quantitative analysis of nerve fibre densities in the cochlea of the house mouse (*Mus musculus*). *J. Comp. Neurol.* 183: 73-88.
- Fitzakerley J.L., Star K.V., Rinn J.L., Elmquist B.J. (2000) Expression of Shal potassium channel subunit in the adult and developing cochlear nucleus of the mouse. *Hearing Res.* 147: 31-45.
- Friauf E., Ostwald J. (1988) Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 73: 263-284.
- Gates T.S., Weedman D.L., Pongstaporn T., Ryugo D.K. (1996) Immunocytochemical localization of glycine in a subset of cartwheel cells of the dorsal cochlear nucleus in rats. *Hear. Res.* 96: 157-166.

- Girard C., Duprat F., Terrenoire C., Tinel N., Fosset M., Romey G., Lazdunski M., Lesage F. (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 249-256.
- Golding N.L., Robertson D., Oertel D. (1995) Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J. Neurosci.* 15: 3138-3153
- Grigg J.J., Brew H.M., Tempel B.L. (2000) Differential expression of voltage-gated potassium channel genes in auditory nuclei of the mouse brainstem. *Hear. Res.* 140: 77-90.
- Gruss M., Bushell T.J., Bright D.P., Lieb W.R., Mathie A., Franks N.P. (2004) Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol. Pharmacol.* 65: 443-452.
- Hackney C.M., Osen K.K., Kolston J. (1990) Anatomy of the cochlear nuclear complex of guinea pig. *Anat. Embryol. (Berl)* 182: 123-149.
- Hagiwara S., Jaffe L.A. (1979) Electrical properties of egg cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8: 385-416.
- Han J., Gnatenco C., Sladek C.D., Kim D. (2003) Background and tandem-pore potassium channels in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 546: 625-639.
- Han J., Truell J., Gnatenco C., Kim D. (2002) Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 542: 431-444.
- Hancock K.E., Voigt H.F. (2002) Intracellularly labeled fusiform cells in dorsal cochlear nucleus of the gerbil. II. Comparison of physiology and anatomy. *J. Neurophysiol.* 87: 2520-2530.
- Harrison J.M., Irving R. (1965) The anterior ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 124: 15-42.
- Harrison J.M., Irving R. (1966) The organization of the posterior ventral cochlear nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 126: 391-401.
- Hartness M.E., Lewis A., Searle G.J., O'Kelly I., Peers C., Kemp P.J. (2001) Combined antisense and pharmacological approaches implicate hTASK as an airway O₂ sensing K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 276: 26499-26508.
- Hatton W.J., Mason H.S., Carl A., Doherty P., Latten M.J., Kenyon J.L., Sanders K.M., Horowitz B. (2001) Functional and molecular expression of a voltage-dependent K⁺ channel (Kv1.1) in intestinal cells of Cajal. *J. Physiol.* 533.2: 315-327.
- Heiman-Patterson T.D., Strominger N.L. (1985) Morphological changes in the cochlear nuclear complex in primate phylogeny and development. *J. Morphol.* 186: 289-306.
- Herrington J. (2007) Gating modifier peptides as probes of pancreatic β -cell physiology. *Toxicol.* 49: 231-238.
- Hess D., El Manira A. (2001) Characterization of a high-voltage-activated I_A current with a role in spike timing and locomotor pattern generation. *PNAS* 98: 5276-5281.
- Hille B., Schwartz W. (1978) Potassium channels as multi-ion single file pores. *J. Gen. Physiol.* 72: 409-442.
- Ho K., Nichols C.G., Lederer W.J., Lytton J., Vassilev P.M., Kanazirska M.V., Hebert S.C. (1993) Cloning and expression of an inward rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature.* 362: 31-38.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 449-472.
- Hopwood S.E., Trapp S. (2005) TASK-like K⁺ channels mediate effects of 5-HT and extracellular pH in rat dorsal vagal neurones in vitro. *J. Physiol.* 568: 145-154.
- Hotchkiss K., Harvey M., Pacheco M., Sokolowski (2005) Ion channel proteins in mouse and human vestibular tissue. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 132: 916-923.

- Hu C.-L., Liu Z., Zeng X.-M., Liu Z.-Q., Chen X.-H., Zhang Z.-H., Mei Y.-A. (2006) 4-aminopyridine, a Kv channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *Neuropharmacol.* 51: 737-746.
- Hurd L.B., Feldman M.L. (1994) Purkinje-like cells in rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 72: 143-158.
- Inagaki N., Gono T., Clement J.P., Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J. (1995) Reconstruction of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* 270: 1166-1170.
- Isomoto S., Kondo C., Kurachi Y. (1997) Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn. J. Physiol.* 47: 11-39.
- Ito M., Inanobe A., Horio Y., Hibio H., Isomoto S., Ito H., Mori K., Tonosaki A., Tomoike H., Kurachi Y. (1996) Immunolocalisation of an inwardly rectifying K^+ channel, K_{AB-2} (Kir4.1), in the basolateral membrane of the renal distal tubular epithelia. *FEBS Letts.* 388: 11-15.
- Ivarsson M., Sundberg C., Farrokhi N., Pertoft H., Rubin K., Gerdin B. (1996) Recruitment of type I collagen producing cells from the microvasculature in vitro. *Exp. Cell. Res.* 15: 336-349.
- Jan L.Y., Jan Y.N. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol.* 505: 267-282.
- Kananura C., Sander T., Rajan S., Preising-Müller R., Grzeschik K.-H., Daut J., Derst C., Steinlein O. K. (2002) Tandem pore domain K^+ channel TASK-3 (KCNK9) and idiopathic absence epilepsies. *Am. J. Hum. Genet.* 114: 227-229.
- Kane E.C. (1974) Synaptic organisation in the dorsal cochlear nucleus of the cat: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 155: 301-330.
- Kane E.S., Puglisi S.G., Gordon B.S. (1981) Neuronal types in the deep dorsal cochlear nucleus of the cat. I. Giant neurons. *J. Comp. Neurol.* 198: 483-513.
- Kang D., Han J., Talley E.M., Bayliss D.A., Kim D. (2003) Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 554: 64-77.
- Kanold P.O., Manis P.B. (1999) Transient potassium currents regulate the discharge patterns of dorsal cochlear pyramidal cells. *J. Neurosci.* 19: 2195-2208.
- Karschin C., Wischmeyer E., Preising-Muller R., Rajan S., Derst C., Grzeschik K.H., Daut J., Karschin A. (2001) Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and tandem pore domain K^+ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 18: 632-648.
- Ketchum K.A., Joiner W.J., Sellers A.J., Kaczmarek L.K., Goldstein S.A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel protein with two pore domains in tandem. *Nature.* 376: 690-695.
- Kim C.J., Cho Y.G., Jeong S.W., Kim Y.S., Kim S.Y., Nam S.W., Lee S.H., Yoo N.J., Lee J.Y., Park W.S. (2004) Altered expression of KCNK9 in colorectal cancers. *APMIS* 112: 588-594.
- Kim D., Gnatenco C. (2001) TASK-5, a new member of the tandem-pore K^+ channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 923-930.
- Kim Y., Bang H., Kim D. (1999) TBAK-1 and TASK-1, two-pore K^+ channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J. Physiol.* 277: H1669-H1678.
- Kim Y., Bang H., Kim D. (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore K^+ channel family. *J. Biol. Chem.* 275: 9340-9347.
- Kindler C.H., Yost C.S., Gray A.T. (1999) Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiology* 90: 1092-1102.
- Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Szűcs G., Nemes Z., Rusznák Z. (2005) TASK-3 immunoreactivity is present but shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* 446: 402-410.
- Krapivinsky G., Gordon E.A., Wickman K., Velimirovic B., Krapivinsky L., Clapham D.E. (1995) The G-protein-gated atrial K^+ channel $I_{K_{ACh}}$ is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ channel proteins. *Nature.* 374: 135-141.

- Krapivinsky G., Medina I., Eng L., Krapivinsky L., Yang Y., Clapham D.E. (1998) A novel inward rectifier K⁺ channel with unique pore properties. *Neuron*. 20: 995-1005.
- Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N., Jan N.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 362: 127-133.
- Kunzelmann K. (2005) Ion channels and cancer. *J. Membrane Biol.* 205: 159-173.
- Kupper J., Prinz A.A., Fromherz P. (2002) Recombinant Kv1.3 potassium channels stabilize tonic firing of cultured hippocampal neurons. *Pflügers Arch.* 443: 541-547.
- Langness U., Udenfriend S. (1974) Collagen biosynthesis in nonfibroblastic cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 50-51.
- Lauritzen I., Zanzouri M., Honoré E., Duprat F., Ehrenguber M.U., Lazdunski M., Patel A. (2003) K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 32068-32076.
- Leonoudakis D., Gray A.T., Winegar B.D., Kindler C.H., Harada M., Taylor D.M., Chavez R.A., Forsayeth J.R., Yost C.S. (1998) An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J. Neurosci.* 18: 868-877.
- Lesage F., Guillemare E., Fink M., Duprat F., Lazdunski M., Romey G., Barhanin J (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EBO J.* 15: 1004-1011.
- Lesage F., Lazdunski M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279: F793-F801.
- Li M., Jan Y.N., Jan L.Y. (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science*. 257: 1225-1230.
- Li W., Kaczmarek L.K., Perney T.M. (2001) Localization of two high-threshold potassium channel subunits in the rat central auditory system. *J. Comp. Neurol.* 437: 196-218.
- Lin W., Burks C.A., Hansen D.R., Kinnamon S.C., Gilbertson T.A. (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J. Neurophysiol.* 92: 2909-2919.
- Liu C., Cotten J.F., Schuyler J.A., Fahlman C.S., Au J.D., Bickler P.E., Yost C.S. (2005), Protective effects of TASK-3 (KCNK9) and related 2P channels during cellular stress. *Brain Res.* 1031: 164-173.
- Liu H.L., Chen C.W., Lin J.C., (2005) Homology models of the tetramerization domain of six eukaryotic voltage-gated potassium channels Kv1.1-Kv1.6. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 22: 387-398.
- Lorente de No R. (1933) Anatomy of the eighth nerve. III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope* 43: 327-350.
- Lorente de No R. (1981) The primary acoustic nuclei. Raven Press, New York.
- Lourdel S., Paulais M., Cluzeaud F., Bens M., Tanemoto M., Kurachi Y., Vandewalle A., Teulon J. (2002) An inward rectifier K⁺ channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir 4-Kir5.1 heteromeric channels. *J. Physiol.* 538: 391-404.
- Luján R., de la Vega C.C., del Toro E.D., Ballesta J.J., Criado M., Juiz J.M. (2003) Immunohistochemical localization of the voltage-gated potassium channel subunit Kv1.4 in the central nervous system of the adult rat. *J. Chem. Neuroanat.* 26: 209-224.
- Maingret F., Patel A.J., Lesage F., Lazdunski M., Honoré E. (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.* 274: 26691-26696.
- Malmierca M.S. (2003) The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. *Int. Rev. Neurobiol.* 56: 147-211.
- Manis P.B. (1990) Membrane properties and discharge characteristics of guinea pig dorsal cochlear nucleus neurons studied in vitro. *J. Neurosci.* 10: 2338-2351.
- Manis P.B., Marx S.O. (1991) Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J. Neurosci.* 11: 2865-2880.

- Martina M., Yao G.L., Bean B.P. (2003) Properties and functional role of voltage-dependent potassium channels in dendrites of rat cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 23: 5698-5707.
- Matesz C., Kulik Á. (1996) Connections of the torus semicircularis and oliva superior in the frog, *Rana esculenta*: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin labelling study. *Acta Biol. Hung.* 47: 287-301.
- Mayer M.L., Westbrook G.L. (1983) A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J. Physiol.* 364: 217-239.
- Meadows H.J., Randall A.D. (2001) Functional characterisation of human TASK-3, an acid-sensitive two-pore domain potassium channel. *Neuro Pharmacol.* 40: 551-559.
- Meuth S.G., Budde T., Kanyshkova T., Broicher T., Munsch T., Pape H-C. (2003) Contribution of TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons. *J. Neurosci.* 23: 6460-6469.
- Mo Z.L., Adamson C.L., Davis R.L. (2002) Dendrotoxin-sensitive K⁺ currents contribute to accommodation in murine spiral ganglion neurons. *J. Physiol.* 542: 763-778.
- Monteggia L.M., Eisch A.J., Tang M.D., Kaczmarek L.K., Nestler E.J. (2000) Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Mol. Brain Res.* 81: 129-139.
- Moore J.K. (1986) Cochlear nuclei: Relationship to the auditory nerve. In: R.A. Altschuler, D.W. Hoffmann, P.R. Bobbin (Eds.), *Neurobiology of hearing: The cochlea*, Raven Press, New York, 1986, pp. 283-301.
- Moore J.K., Osen K.K. (1979) The cochlear nuclei in man. *Am. J. Anat.* 154: 393-418.
- Mu D., Chen L., Zhang X., See L., Koch C.M., Yen C., Tong J.J., Spiegel L., Nguyen C.Q., Servoss A., Peng Y., Pei L., Marks J.R., Lowe S., Hoey T., Jan L.Y., McCombie W.R., Wigler M.H., Powers S. (2003) Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell.* 3: 297-302.
- Mugnaini E. (1985) GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* 235: 61-81.
- Mugnaini E., Warr W.B., Osen K.K. (1980) Distribution and light microscopic features of granule cells in the cochlear nuclei of cat, rat, and mouse. *J. Comp. Neurol.* 191: 581-606.
- Neher E. (1971) Two fast transient current components during voltage clamp on snail neurons. *J. Gen. Physiol.* 58: 36-53.
- Nichols C.G., Lopatin A.N. (1997) Inward rectifier potassium channels. *Ann. Rev. Physiol.* 59: 171-191.
- O'Grady S.M., Lee S.Y. (2005) Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1578-1594.
- Oertel D. (1983) Synaptic responses and electrical properties of cells in brain slices of the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 3: 2043-2053.
- Oertel D., Wu S.H. (1989) Morphology and physiology of cells in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.* 283: 228-247.
- Oertel D., Wu S.H., Garb M.W., Dizack C. (1990) Morphology and physiology of cells in slice preparations of the posteroventral cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.* 295: 136-154.
- Oertel, D., Young, E. D.: What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci.* 27, 104-110 (2004).
- Osen K.K. (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.* 136: 453-484.
- Osen K.K. (1972) Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 144: 355-372.
- Ostapoff E.M., Feng J.J., Morest D.K. (1994) A physiological and structural study of neuron types in the cochlear nucleus. II. Neuron types and their structural correlation with response properties. *J. Comp. Neurol.* 346: 19-42.

- Pál B., Rusznák Z., Harasztosi C., Szűcs G. (2004) Depolarization-activated K^+ currents of the bushy neurones of the rat cochlear nucleus in a thin brain slice preparation. *Acta Physiol. Hung.* 91: 83-98.
- Patel A.J., Honore E., Lesage F., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (1999) Inhalational anesthetic activate two-pore-domain background K^+ channels. *Nat. Neurosci.* 2: 422-426.
- Pegan S., Arrabit C., Zhou W., Kwiatkowski W., Collins A., Slesinger P.A., Choe S. (2005) Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat. Neurosci.* 8: 279-287.
- Pei L., Wisner O., Slavin A., Mu D., Powers S., Jan L.Y., Hoey T. (2003) Oncogenic potential of TASK3 (Kcnk9) depends on K^+ channel function. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7803-7807.
- Perkins R.E., Morest D.K. (1975) A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *J. Comp. Neurol.* 163: 129-158.
- Perney T.M., Kaczmarek L.K. (1997) Localization of a high threshold potassium channel in the rat cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 386: 178-202.
- Perney T.M., Marshall J., Martin K.A., Hockfield S., Kaczmarek L.K. (1992) Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *J. Neurophysiol.* 68: 756-766.
- Pór Á., Pocsai K., Rusznák Z., Szűcs G. (2005) Presence and distribution of three calcium binding proteins in projection neurons of the adult rat cochlear nucleus. *Brain Res.* 1039: 63-74.
- Rajan S., preisig-Müller R., Wischmeyer E., Nehring R., Hanley P.J., Renigunta V., Musset B., Schlichthörl G., Derst C., Karschin A., Daut J. (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol.* 545: 13-26.
- Rajan S., Wischmeyer E., Xin Liu G., Preisig-Muller R., Daut J., Karschin A., Derst C. (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K^+ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* 275: 1650-1657.
- Rathouz M., Trussel L. (1998) Characterization of outward currents in neurones of the avian nucleus magnocellularis. *J. Neurophysiol.* 80: 2824-2835.
- Retting J., Heinemann S.H., Wunder F., Lorra C., Parcej D.N., Dolly J.O., Pongs O. (1994) Inactivation properties of voltage-gated K^+ channels altered by presence of β -subunit. *Nature* 369: 289-294.
- Reyes R., Duprat F., Lesage F., Fink M., Salinas M., Farman N., Lazdunski M. (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K^+ channel from human kidney. *J. Biol. Chem.* 273: 30863-30869.
- Rhode W.S., Smith P.H., Oertel D. (1983) Physiological response properties of cells labelled intracellularly with horseradish peroxidase in cat dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 213: 426-447.
- Rhodes K.J., Strassle B.W., Monaghan M.M., Bekele-Arcuri Z., Matos M.F., Trimmer J.S. (1997) Association and colocalization of the Kv β 1 and Kv β 2 β -subunit with α -subunits in mammalian brain K^+ channel complexes. *J. Neurosci.* 17: 8246-8258.
- Richardson R.J., Grkovic I., Allen A.M., Anderson C.R. (2006) Separate neurochemical classes of sympathetic postganglionic neurons project to the left ventricle of the rat heart. *Cell Tissue Res.* 324: 9-16.
- Roberts T.G., Sturm N.R., Yee B.K., Yu M.C., Hartshorne T., Agabian N., Campbell D.A. (1998) Three small nucleolar RNAs identified from the spliced leader-associated RNA locus in kinetoplastid protozoans. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4409-4417.
- Robinson J.M., Deutch. (2005) Coupled tertiary folding and oligomerization of the T1 domain of Kv channels. *Neuron.* 45: 223-232.
- Rossi F., Borsello T. (1993) Ectopic Purkinje cells in the adult rat: olivary innervation and different capabilities of migration and development after grafting. *J. Comp. Neurol.* 337: 70-82.
- Rothman J.S., Manis P.B. (2003) Differential expression of three distinct potassium currents in the ventral cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 89: 3070-3082.

- Rubio M.E., Wenthold R.J. (1997) Glutamate receptors are selectively targeted to postsynaptic sites in neurons. *Neuron* 18, 939-950.
- Rudy B., McBain C.J. (2001) Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci.* 24: 517-526.
- Rusznák Z., Forsythe I.D., Brew H.M., Stanfield P.R. (1997) Membrane currents influencing action potential latency in granule neurons of the rat cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2348-2358.
- Rusznák Z., Harasztosi C., Stanfield P.R., Szűcs G. (2001) An improved cell isolation technique for studying intracellular Ca²⁺ homeostasis in neurones of the cochlear nucleus. *Brain Res. Prot.* 7: 68-75.
- Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Pál B., 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.
- Ryugo D.K., Willard F.H., Fekete D.M. (1981) Differential afferent projections to the inferior colliculus from the cochlear nucleus in the albino mouse. *Brain Res.* 210: 342-349.
- Sansom M.S., Shrivastava I.H., Bright J.N., Tate J., Capener C.E., Biggin P.C. (2002) Potassium channels: Structures, models, simulations. *Biochem. Biophys. Acta.* 1565: 294-307.
- Santos-Sacchi J., Huang G.-J., Wu M. (1997) Mapping the distribution of outer hair cell voltage-dependent conductances by electrical amputation. *Biophys. J.* 73: 1424-1429.
- Schlichter R., Bader C.R., Bernheim L. (1991) Development of anomalous rectification (I_h) and a tetrodotoxin-resistant sodium current in embryonic quail neurones. *J. Physiol.* 442: 127-145.
- Schroter K.H., Ruppertsberg J.P., Wunder F., Rettig J., Stocker M., Pongs O. (1991) Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. *FEBS Lett.* 278: 211-216.
- Schwarz D.W., Puil E. (1997) Firing properties of spherical bushy cells in the anteroventral cochlear nucleus of the gerbil. *Hear. Res.* 114: 127-138.
- Schweitzer L. (1990) Differentiation of apical, basal and mixed dendrites of fusiform cells in the cochlear nucleus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 56: 19-27.
- Schweitzer L., Cant N.B. (1985) Differentiation of the giant and fusiform cells in the dorsal cochlear nucleus of the hamster. *Brain Res.* 352: 69-82.
- Sento S., Ryugo D.K. (1989) Endbulbs of held and spherical bushy cells in cats: morphological correlates with physiological properties. *J. Comp. Neurol.* 280: 553-562.
- Serodio P., Kentros C., Rudy B. (1994) Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J. Neurophysiol.* 72: 1516-1529.
- Serodio P., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. (1996) Cloning of a novel component of A-type K⁺ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.* 75: 2174-2179.
- Sewing S., Roeper J., Pongs O. (1996) Kv β1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron* 16: 455-463.
- Sheng M., Tsaur M.-L., Jan Y.N., Jan L.Y. (1992) Subcellular segregation of two A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons. *Neuron* 9: 271-284.
- Shibata R., Nakahira K., Shibasaki K., Wakazono Y., Imoto K., Ikenaka K. (2000) A-type K⁺ current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 14: 4588-4599.
- Smith P.H., Massie A., Joris P.X. (2005) Acoustic stria: anatomy of physiologically characterized cells and their axonal projection patterns. *J. Comp. Neurol.* 482: 349-371.
- Song W.-J., Tkatch T., Baranauskas G., Ichinohe N., Kitai S.T., Surmeier D.J. (1998) Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A-type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J. Neurosci.* 18: 3124-3137.

- Spatz W.B. (1997) Differences between guinea pig and rat in the dorsal cochlear nucleus: expression of calcium-binding proteins by cartwheel and Purkinje-like cells. *Hear. Res.* 107: 136-146.
- Spitzner M., Ousingsawat J., Scheidt K., Kunzelmann K., Schreiber R. (2007) Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J.* 21: 35-44.
- Stanfield P.R., Nakajima S., Nakajima Y. (2002) Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 145: 47-79.
- Sundberg C., Ivarsson M., Gerdin B., Rubin K. (1996) Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab. Invest.* 74: 452-466.
- Swanson R., Marshall J., Smith J.S., Williams J.B., Boyle M.B., Folander K., Luneau C.J., Antanavage J., Oliva C., Buhrow S.A., Bennett C., Stein R.B., Kaczmarek L.K. (1990) Cloning and expression of cDNAs and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron.* 4: 929-939.
- Szabó Zs., Harasztosi C., Sziklai I., Szűcs G., Rusznák Z. (2002) Ionic currents determining the membrane characteristics of type I spiral ganglion neurones of the guinea pig. *Eur. J. Neurosci.* 16: 1887-1895.
- Talley E.M., Bayliss D.A. (2002) Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels. *J. Biol. Chem.* 277: 17733-17742.
- Tímár J., Raso E., Honn K.V., Hagmann W. (1999) 12-lipoxygenase expression in human melanoma cell lines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469: 617-622.
- Tolbert L.P., Morest D.K., Yurgelum-Todd D.A. (1982) The neuronal architecture of the anteroventral cochlear nucleus of the cat in the region of the cochlear nerve root: horseradish peroxidase labelling of identified cell types. *Neuroscience* 7: 3031-3052.
- Tolosa J.N., Cooper R., Myers A.C., McLemore G.L., Northington F., Gauda E.B. (2005) Ontogeny of retrograde labeled chemoafferent neurons in the newborn rat nodose-petrosal ganglion complex: an ex vivo preparation. *Neurosci. Lett.* 384: 48-53.
- Veh R.W., Lichtinghagen R., Sewing S., Wunder F., Grumbach I.M., Pongs O. (1995) Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular location and neuron-specific colocalizations in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2189-2205.
- Wang H., Kunkel D.D., Schwartzkroin P.A., Tempel B.L. (1994) Localization of Kv1.1 and Kv1.2 two K⁺ channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J. Neurosci.* 14: 4588-4599.
- Wang L.Y., Gan L., Forsythe I.D., Kaczmarek L.K. (1998) Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high frequency firing in mouse auditory neurones. *J. Physiol.* 509: 183-194.
- Washburn C.P., Bayliss D.A., Guyenet P.G. (2003) Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 138: 19-35.
- Washburn C.P., Sirois J.E., Talley E.M., Guyenet P.G., Bayliss D.A. (2002) Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halotane-sensitive K⁺ conductance. *J. Neurosci.* 22: 1256-1265.
- Webster D.B., Trune D.R. (1982) Cochlear nuclear complex of mice. *Am. J. Anat.* 163: 103-130.
- Weiser M., Bueno E., Sekirnjak C., Martone M.E., Baker H., Hillman D., Chen S., Thornhill W., Ellisman M., Rudy B. (1995) The potassium channel subunit Kv3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific population of CNS neurons. *J. Neurosci.* 15: 4298-4314.
- Williams B.A., Buckler K.J. (2004) Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *Am. J. Physiol.* 286: L221-L230.
- Willott J.F., Bross L.S. (1990) Morphology of the octopus cell area of the cochlear nucleus in young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *J. Comp. Neurol.* 300: 61-81.
- Wouterlood F.G., Mugnaini E. (1984) Cartwheel neurons of the dorsal cochlear nucleus: a Golgi-electron microscopic study in rat. *J. Comp. Neurol.* 227: 136-157.

- Wouterlood F.G., Mugnaini E., Osen K.K. Dahl A.-L. (1984) Stellate neurons in rat dorsal cochlear nucleus studied with combined Golgi impregnation and electron microscopy: synaptic connections and mutual coupling by gap junctions. *J. Neurocytol.* 131: 639-664.
- Wu S.H., Oertel D. (1984) Intracellular injection with horseradish peroxidase of physiologically characterized stellate and bushy cells in slices of mouse anteroventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 4: 1577-1588.
- Xie L., John S.A, Ribalet B., Weiss J.N. (2006) Activation of inwardly rectifying potassium (Kir) channels by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate (PIP₂): Interaction with other regulatory ligands. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*
- Yamamoto Y., Kummer W., Atoji Y., Suzuki Y. (2002) TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body. *Brain Res.* 950: 304-307.
- Yellen G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419: 35-42.
- Yu W., Xu J., Li M. (1996) NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of Shaker-like potassium channels. *Neuron.* 16: 441-453.
- Zhang S., Oertel D. (1993) Giant cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *J Neurophysiol.* 69: 1398-1408.
- Zhang S., Oertel D. (1994) Neuronal circuits associated with the output of the dorsal cochlear nucleus through fusiform cells. *J. Neurophysiol.* 71: 914-930.
- Zhanping W., Xiaoyu P., Na C., Shenglan W., Bo W. (2006) Voltage-gated K⁺ channels are associated with cell proliferation and cell cycle of ovarian cancer cell. *Gynecol. Oncol.* 104: 455-460.

ÖSSZEFOGLALÁS

A K^+ -permeábilis transzmembrán fehérjék (K^+ -csatornák) fontos szerepet játszanak az ingerlékeny és a nem-ingerlékeny sejtek fiziológiás és patológias működésében egyaránt. Elektrogén funkcióik révén meghatározó jelentőségük van a sejt felszíni membrán ingerlékenységének és az általa produkált akciós potenciálok időbeliségének szabályozásában, de a legújabb adatok szerint jelentősek lehetnek a sejtek pro- és antiapoptotikus folyamatainak regulációjában is. Ebből következően, a különböző típusú és K^+ -csatornák jelenlétének és megoszlásának vizsgálata nagy segítséget jelenthet az őket expresszáló struktúrák működésének pontosabb megértéséhez, és az esetlegesen kialakuló patológias folyamatok értelmezéséhez.

A jelen vizsgálatsorozat első részében a hallási információ feldolgozásának első agytörzsi állomásának (nucleus cochlearis) területén elhelyezkedő bushy-neuronok által expresszált feszültségvezérelt (Kv-) K^+ -csatorna-alegységek típusait és megoszlását vizsgáltuk. A kísérletekre enzimatikusan izolált és „úszószeletekben” elhelyezkedő neuronokon, részben immunokémiai, részben funkcionális vizsgálatok alkalmazásával került sor. A munka keretében megállapítottuk, hogy a bushy-neuronok igen sokféle alegységet (így dendrotoxin érzékeny, késői típusú, inaktiválódó Kv-alegységeket, valamint a TASK-1-csatornát) expresszálnak membránjukban, ami részben magyarázhatja a rájuk jellegzetes, igen komplex tüzelési mintázatot. A tranziens áram kialakításában jelentős alegységek jelenlétét specifikus gátlószerek alkalmazásával is megerősítettük. Elvégeztük továbbá a nucleus cochlearis neuronok specifikus jelölését, és olyan morfológiai jegyeket határoztunk meg, amik segítségével egyértelműbben elvégezhető lehet a nucleus cochlearis neuronok pontos azonosítása. Bizonyítottuk továbbá, hogy a Purkinje-szerű sejtek a cerebellumba projiciálnak.

Munkánk másik részében egy új fejlesztésű, humán TASK-3-specifikus monoklonális ellenanyag tesztelését és validálását végeztük, immuncito- és hisztokémiai körülmények között egyaránt. Az antitest specificitásán és az optimális reakciókörülmények dokumentálásán túl megállapítottuk, hogy a humán melanoma malignum sejtek intenzív, döntően intracellularis megoszlású TASK-3-immunpozitivitást mutatnak. Melanocytacon végzett kísérletek során azt is igazoltuk, hogy a TASK-3-expresszió nem kizárólag a malignusan transzformált sejtekre jellemző sajátosság, így nem alkalmas a melanocytaer eredetű benignus és malignus folyamatok elkülönítésére.

SUMMARY

K⁺-permeable transmembrane proteins (K⁺-channels) play important roles in physiological and pathological processes of both excitable and non-excitable cells. As the consequence of their electrogenic functions, they are essential in regulating the excitability of the cell surface membrane and thus they regulate the timing of action potentials. Moreover, based upon the most recent experimental data, they are important in regulating pro- and anti-apoptotic processes, too. It is not surprising, therefore, that the examination of the presence and distribution of the various K⁺-channel types might significantly contribute to our precise understanding of the functions of structures they are expressed in and to the proper interpretation of certain pathological mechanisms.

The very first station of the auditory information processing occurring in the brain stem is the cochlear nucleus. In the first part of the present study, the presence and distribution of various types of voltage-gated K⁺-channel (Kv) subunits have been studied in the bushy neurones situated in this structure. The experiments were carried out on either enzymatically isolated neurones or free-floating slices by applying immunochemistry and functional investigations. According to our experimental data, bushy neurones express several types of K⁺ channel subunits (such as dendrotoxin sensitive, delayed rectifier and rapidly inactivating Kv-subunits as well as TASK-1 channels), which can partly account for the extremely complex firing behaviour characteristics of these cells. The presence of transient current producing subunits was confirmed by applying highly specific channel blockers. In addition, we also performed the specific labelling of cochlear nucleus neurones, and we established morphological clues allowing their more reliable identification. Moreover, we demonstrated that Purkinje-like cells of the cochlear nucleus project into the cerebellum.

In the second part of this work we tested and validated a novel, human TASK-3 specific monoclonal antibody by employing immunocytochemical and immunohistochemical methods. Besides the documentation of the specificity of the antibody and determining the optimal conditions for the immunochemistry we also showed that human melanoma malignum cells display a strong, mainly intracellularly distributed TASK-3 immunopositivity. The experiments carried out on melanocytes indicated that TASK-3 expression is not only confined to malignantly transformed cells, thus it is not suitable to distinguish between benign and malignant processes of melanocytic origin.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Kovács László és Csernoch László Professzor Uraknak segítőkészségükért, valamint a folyamatos támogatásért, amit munkám során nyújtottak. Köszönettel tartozom továbbá a DE OEC Élettani Intézet valamennyi munkatársának a kísérletes munka és az oktatási tevékenység során fellépett problémákhoz nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Rusznák Zoltánnak, valamint Szűcs Géza Professzor Úrnak munkám során nyújtott útmutatásaikért és baráti támogatásukért.

Köszönet illeti Dr. Kovács Ilonát, a Hajdú-Bihar Megyei Kórház Pathológiai Osztályának vezetőjét, és az immunhisztokémiai laboratórium dolgozóit, Pór Ágnes, Károlyiné Editet és Horváth Tímeát az immunhisztokémiai kísérletek kivitelezéséhez nyújtott önzetlen segítségükért.

Hálásan köszönöm továbbá Dr. Varga Attiláné (Ibcsike) segítségét, és köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak: Pál Balázsnak, Kosztka Líviának, Bakondi Gábornak és Pap Pálnak figyelmes és önzetlen segítségükért.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

In extenso közlemények

1. 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: 57-70. (*IF: 1,578*)

2. Pocsai K., Kosztka L., Bakondi G., Gönczi M., Fodor J., Dienes B., Szentesi P., Kovács I., Feniger-Barish R., Kopf E., Zharhary D., Szűcs G., Csernoch L., Rusznák Z. (2006) Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2364-2376 (*IF: 4,582*)

3. Pocsai K., Pál B., Pap P., Bakondi G., Kosztka L., Rusznák Z., Szűcs G. (2007) 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. Bulletin* 71: 529-538 (*IF: 2,481*)

Idézhető előadáskivonatok

1. Pál B., Pór Á., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z., (2004) Immunohistochemical and electrophysiological investigation of Kv channel expression of the bushy neurones of rat cochlear nucleus. *Acta Physiol. Hung.* 91: 364a

Előadások és poszterek

1. Pór Á., Pál B., Pocsai K., Rusznák Z., Szűcs G. (2003) Patkány nucleus cochlearis sejtek membránsajátságait kialakító csatornaféleségek immuncitokémiai vizsgálata. 67. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.

2. Pocsai K., Pór Á., Pál B., Kovács I., Szűcs G., Rusznák Z. (2004) TASK-1 distribution in the auditory system and cerebellum. *IBRO WORKSHOP*, Budapest.

3. 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. 68. MÉT Konferencia, Debrecen.

4. Rusznák Z., Pocsai K., Pál B., Pap P., Csernoch L., Szűcs G. (2005) Időfüggő változások a TASK-3 fehérje expressziós mintázatában human melanoma sejtvonalban: összefüggés van-e a sejtosztódás és a TASK-3 csatornafehérje expressziója között? 69. MÉT Vándorgyűlés, Budapest.

5. Pap P., Pál B., Pocsai K., Rusznák Z., Szűcs G. (2005) A nucleus cochlearis projekciós neuronjai által expresszált Kv-alegységek: összefüggésbe hozható az alegységek megoszlása a jellegzetes aktivitási mintázattal? 69. MÉT Vándorgyűlés, Budapest.

6. Rusznák Z., Pál B., Pór Á., Pocsai K., Pap P., Szűcs G. (2005) A nucleus cochlearis projekciós neuronjai által expresszált Kv-alegységek. Összefüggésbe hozható az alegységek megoszlása az ezen sejtekre jellegzetes aktivitási mintázattal? XI. MITT Konferencia, Pécs.

7. Rusznák Z., Pocsai K., Pál B., Pap P., Csernoch L., Szűcs G. (2005) Time-dependent changes of the TASK-3 channel expression pattern of melanoma cells maintained in tissue culture: is there a connection between cell-division and TASK-3 expression? Joint International Meeting of The Physiological Society and FEPS, Bristol, UK.

8. Pocsai K., Pál B., Pap P., Szűcs G., Rusznák Z. (2006) Retrograde labelling and confocal analysis of the projection neurones of the rat cochlear nucleus. 41st Meeting of the Brazilian Physiological Society and Joint Meeting with The Physiological Society, Ribeirao Preto, Brazília.

9. Rusznák Z., Pocsai K., Bakondi G., Kosztka L., Szűcs G., Csernoch L. (2006) Presence and distribution of TASK-3 channels in cultured melanoma cells: evidence for their mitochondrial localisation. 41st Meeting of the Brazilian Physiological Society and Joint Meeting with The Physiological Society, Ribeirao Preto, Brazília.

10. Pocsai K., Kőszeghy Á., Szűcs G., Rusznák Z. (2006) Patkány nucleus cochlearis projekciós neuronok konfokális mikroszkópos vizsgálata. 70. MÉT Vándorgyűlés, Szeged.

11. Bakondi G., Kosztka L., Pap P., Pocsai K., Rusznák Z. (2006) Egy új fejlesztésű anti-hTASK-3 ellenes monoklonális ellenanyag alkalmazásával kapott, melanoma malignum sejteken elért eredményeink. 70. MÉT Vándorgyűlés, Szeged.

A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

In extenso közlemények

1. 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: 4,812**)

2. Pór Á., Pocsai K., Rusznák Z., Szűcs G., (2005) : Presence and distribution of three calcium binding proteins in projection neurones of adult rat cochlear nucleus. *Brain Res.* 1039: 63-74 (**IF: 2,296**)

3. Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Szűcs G., Nemes Z., Rusznák Z., (2005) TASK-3 immunoreactivity shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchow's Arch.* 446: 402-410 (**IF: 2,224**)

Idézhető előadáskivonatok

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. *Clin. Neurosci.* 56: special edition 2, 65.

Előadások és posztterek

1. 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. Meeting of the Federation of European Physiological Societies, Nice, France.

2. 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.

3. Pór Á., Pál B., Pocsai K., Rusznák Z., Szűcs G. (2004): Kalciumkötő fehérjék megoszlása patkány nucleus cochlearisban. 68. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.

4. Kovács I., Sarkadi L., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z. (2004) TASK-csatornák expressziójának vizsgálata humán szövetekben. 63. Pathologus Kongresszus, Siófok-Balatonszéplak.

5. Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Pál B., Szűcs G. (2004) TASK-csatornák jelenlétének vizsgálata patkány központi idegrendszerében és humán cerebellumban. 68. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.

6. Pocsai K., Kovács I., Sarkadi L., Szűcs G., Rusznák Z. (2004) TASK-csatornák megoszlásának vizsgálata humán fiziológiás és patológias szövetmintákban. 68. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.

7. Pocsai K., Kovács I., Rusznák Z., Pál B., Pór Á., Kosztka L., Szűcs G. (2005) TASK-3 expresszió vizsgálata egészséges és tumorosan elfajult human szöveteken. 69. MÉT Vándorgyűlés, Budapest.