

**HCN- ÉS TASK-CSATORNÁK MOLEKULÁRIS
SZERKEZETÉNEK, MEGOSZLÁSÁNAK ÉS
FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA A KÖZPONTI
IDEGRENDSZERBEN**

Dr. Pál Balázs

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2004.**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS.....	4
1.1. A NUCLEUS COCHLEARIS FELÉPÍTÉSE	4
1.2. A NUCLEUS COCHLEARIS DORSALIS PIRAMIS-NEURONJAINAK FŐ SAJÁTSÁGAI.....	5
1.3. A CEREHELLUM ÉS A NUCLEUS COCHLEARIS DORSALIS KÖZÖTTI ROKONSÁG	7
1.4. A K ⁺ -CSATORNÁK MOLEKULÁRIS SZERKEZETE ÉS CSOPORTOSÍTÁSA	8
1.5. A H-ÁRAM ÉS A HCN-CSATORNÁK SAJÁTSÁGAI	10
1.6. AZ IKERPÓRUSÚ K ⁺ -CSATORNÁK.....	13
1.7. A TASK-CSALÁD JELLEMZŐI	15
1.8. CÉLKITŰZÉSEK.....	19
2. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK	21
2.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK, A PREPARÁLÁS FŐBB LÉPÉSEI.....	21
2.1.1. <i>Vékony szelet-preparátumok készítése.....</i>	<i>21</i>
2.1.2. <i>Neuronok enzimatisz izolálása</i>	<i>22</i>
2.1.3. <i>Astrocytatenyészet készítése</i>	<i>22</i>
2.2. AZ ALKALMAZOTT OLDATOK	23
2.3. ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÉRÉSEK	24
2.4. IMMUNCITOKÉMIA, IMMUNHISZTOKÉMIA	25
2.4.1 <i>Fluoreszcens immuncitokémia.....</i>	<i>25</i>
2.4.2. <i>Nem fluoreszcens immunhisztokémia</i>	<i>25</i>
2.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK	28
2.5.1. <i>Az astrocytatenyészet transzfekciója</i>	<i>28</i>
2.5.2. <i>Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR).....</i>	<i>29</i>
2.5.3. <i>Western-blot</i>	<i>30</i>
3. EREDMÉNYEK	31
3.1. A NUCLEUS COCHLEARIS DORSALIS PIRAMIS-SEJTEK HCN- ÁRAMÁNAK JELENTŐSÉGE A JELLEGZETES AKTIVITÁSI MINTÁZAT KIALAKÍTÁSÁBAN.....	31
3.1.1. <i>A HCN-áram általános jellemzése</i>	<i>31</i>
3.1.2. <i>A HCN-áram farmakológiai vizsgálata és összefüggése a piramis-sejtek spontán aktivitásával.....</i>	<i>34</i>
3.1.3. <i>A piramis-neuronok HCN-csatornáinak alegység-összetétele</i>	<i>37</i>
3.2. TASK-CSATORNÁK JELENLÉTÉNEK ÉS MEGOSZTLÁSÁNAK VIZSGÁLATA EMBER ÉS PATKÁNY KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN.....	40

3.2.1. A TASK-immunreaktivitás megoszlása patkány cerebellumban	40
3.2.2. TASK-immunreaktivitás jelenléte szövettenyészetben fenntartott astrocytákon	41
3.2.3. A TASK-csatornák expressziója az astrocyták endoplasmaticus reticulumában.....	44
3.2.4. TASK-expresszió a humán cerebellumban	45
4. MEGBESZÉLÉS	47
4.1 A NUCLEUS COCHLEARIS DORSALIS PIRAMIS-SEJTEK HCN-ÁRAMÁNAK JELENTŐSÉGE A JELLEGZETES AKTIVITÁSI MINTÁZAT KIALAKÍTÁSÁBAN.....	47
4.2. TASK-CSATORNÁK JELENLÉTÉNEK ÉS MEGOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA EMBER ÉS PATKÁNY KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN.....	49
A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE.....	55
ÖSSZEFOGLALÁS	64
SUMMARY	65
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67
A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE.....	68
A TÉZISEKBEN FEL NEM HASZNÁLT EGYÉB TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE	70

1. BEVEZETÉS

1.1. *A nucleus cochlearis felépítése*

A környezetből származó akusztikus információ feldolgozása tulajdonképpen a cochlea szőrsejtjeiben kezdődik, részben a receptorsejtek szigorú tonotopikus elrendeződése; részben pedig a kialakuló receptorpotenciál nagyságának és az aktivált sejtek számának alapján. A receptorsejtek aktivitása a tovaterjedő akciós potenciál kialakulásának helyére, azaz a ganglion spirale I. típusú sejtjeire kerül. A ganglion spirale neuronok tonotópiás szerveződésüknek, valamint az aktivált idegsejtek számának megfelelően ugyancsak hozzájárulnak a hallási információ dekódolásához. Mindezekon túlmenően ezen a szinten kapcsolódik be a kétoldali akusztikus ingerület időbeli eltolódása, aminek alapján lehetővé válik a hangforrás térbeli lokalizációja (Perkins és Morest, 1975).

A fenti módon kialakuló ingerületet a nervus acusticus képező primer szenzoros rostok szállítják a nucleus cochlearisban található másodrendű neuronokhoz. Morfológiai tanulmányok alapján ismert, hogy a nucleus cochlearis egy ventralis és egy dorsalis részre oszlik, és mindkét terület kap bemenetet a nervus acusticus felől. A struktúra projekciós neuronjainak nyúlványai alkotják a nucleus cochlearis efferens pályáit, amelyek a központi idegrendszeri hallópályák felsőbb központjai felé (oliva superior komplex, nucleus medialis corporis trapezoidei, colliculus inferior) továbbítják a hallási információt. A nucleus cochlearisból származó másodrendű axonok zömmel azonos oldalon maradnak, kisebb részük azonban az ellenoldali területek felé halad, lehetővé téve a két fülből származó aktivitási mintázat összehasonlítását a harmadrendű neuronok szintjén. Lényeges megemlíteni, hogy a mag működésében nemcsak a nervus acusticus felől érkező bemenet, hanem bizonyos leszálló pályák módosító hatása is szerepet játszik (Brawer és munkatársai, 1974; Cant és Gaston, 1982; Moore, 1986).

A nucleus cochlearis ventralis anteroventralis és posteroventralis részre különül. A nervus acusticus a magba való belépés után kettéágazik, egy része anterior, más része posterior irányba halad tovább, majd az utóbbi axonok nagy része a ventralis magot elhagyva a nucleus cochlearis dorsalisban végződik. Az emlős nucleus cochlearis dorsalis négy, koncentrikusan szerveződött réteget tartalmaz. A legfelületesebb, közvetlenül az ependyma alatt található réteg a molekuláris réteg, ami zömmel a

szemcsesejtek axonjait tartalmazza, bár néhány szemcsesejt sejtteste is megtalálható ebben a régióban. Közvetlenül a molekuláris réteg alatt található a fusiform- vagy piramis-sejtek rétege, amely a piramis-, a szemcse-, a cartwheel- és stellate-sejtek sejttesteit tartalmazza. A harmadik rétegben a piramis-sejtek basalis dendritfája teremt szinaptikus kapcsolatot a nervus acusticus leszálló rostjaival, míg a mag legmélyebben elhelyezkedő, negyedik rétege tartalmazza az óriás- és a multipoláris-sejtek sejttesteit (Moore, 1986; Oertel és Wu, 1989).

A nervus acusticusnak az I. típusú ganglion spirale sejtekből származó rostjai a dorsalis magba való belépés után a piramis-sejtek basalis dendritfájával és a szemcsesejtekkel; a II. típusú ganglion spirale sejtek axonjai pedig egyes gátló interneuronokkal (cartwheel- és stellate-sejtek) képeznek glutamáterg szinapszisokat. A kis, kerek (mintegy 6-8 μm átmérőjű) szómájú szemcsesejtek axonjai alkotják a paralel-rostokat, amelyek a piramis-neuronok apicalis dendritfájával, valamint a gátló hatású stellate- és cartwheel-sejtekkel alkotnak (ugyancsak serkentő hatású, glutamáterg) szinapszisokat (Zhang és Oertel, 1993). A gátló interneuronok axonjai részben a piramis-sejteken (elsősorban a sejttesten) végződnek, ahol GABA-erg és glicinerg gátló szinapszisokat hoznak létre (Oertel és Wu, 1989). A mag működését egyes leszálló pályák is módosítják: macskában az oliva superiorból, patkányban a nucleus medialis corporis trapezoideiból érkeznek leszálló, kolinerg rostok (Chen és munkatársai, 1995), amelyek a gátló interneuronokon és a piramis-sejteken végződnek, zömmel M₄-típusú muszkarinos receptorokon fejtve ki hatásukat (Chen és munkatársai, 1998).

1.2. A nucleus cochlearis dorsalis piramis-neuronjainak fő sajátosságai

A piramis-sejtek képezik a nucleus cochlearis dorsalis egyik legfontosabb neurontípusát. Jellegzetességük a háromszög alakú, mintegy 25 μm nagyságú sejttest, amely csúcsaiból a basalis és apicalis dendritfa, valamint az axon ered (Osen, 1969). Az apicalis dendritfa a mag molekuláris rétegébe jut, ahol a cochlearis szemcsesejtek paralel-rostjaival képez szinapszist; a basalis dendritfa pedig a nervus cochlearis befutó rostjaival alkot szinapszisokat. Mindkét szinaptikus kapcsolat serkentő, glutamáterg (Lorente de No, 1981; Webster és Trune, 1982; Rhode és munkatársai, 1983). A nervus cochlearis a basalis dendritfa mellett a piramis-sejtek sejttesteivel is képez szinapszisokat. A piramis-sejtek axonjai a stria acustica dorsalisba belépve az

ellenoldali colliculus inferior felé projiciálnak (Osen, 1972; Ryugo és munkatársai, 1981).

A piramis-sejtek funkcionális jellegzetességei közül kiemelhető, hogy nyugalmi membránpotenciáljuk -50 és -60 mV között mozog, bemenő ellenállásuk viszonylag alacsony, 85 M Ω körüli (Zhang és Oertel, 1994). Általánosan elfogadott álláspont, hogy a piramis-sejtek nem egyszerű kapcsoló neuronok, hanem igen komplex jelanalízis végzésére képesek, amennyiben a pillanatnyi membránpotenciáljuktól (így végsősoron az éppen aktiválható ioncsatornák minőségétől) függően gyökeresen eltérő akcióspotenciál-mintázatok kialakítását végezhetik (lásd Cant, 2003). A piramis-neuronok a beérkező stimulusok hatására úgynevezett „pauser”, „chopper” és „buildup” tüzelési mintázatot alakíthatnak ki. A „pauser” mintázat során a neuron tüzelési frekvenciája csökken, majd megszűnik; a „chopper” aktivitás esetén tüzelési periódusok és akciós potenciáloktól mentes szakaszok váltják egymást; a „buildup” tüzelés esetén pedig az akcióspotenciál-tüzelés frekvenciája fokozatosan nő, és végül igen gyors sorozattüzeléssé alakul (Pfeiffer, 1966; Rhode és munkatársai, 1983).

A piramis-sejt ezen jellegzetes aktivitási mintázatainak kialakulásáért felelős ionáramok egy része (részben saját laboratóriumunk tevékenységének nyomán) korábban leírásra került. A piramis-neuronok esetében beszámoltak a tranziens K⁺-áram (régebbi nevén A-áram) jelenlétéről, amely aktiválhatósága fontos eleme a stimulációt követő tüzelési mintázatok kialakításának (Kanold és Manis, 1999). A tranziens káliumáram mellett a piramis-sejtek lassan inaktiválódó, tetraetil-ammónium (TEA⁺) és 4-aminopiridin (4-AP) alkalmazására érzékeny káliumárammal is rendelkeznek (Kanold és Manis, 1999). Érdekes megfigyelés, hogy a piramis-sejtek esetében a „klasszikus”, tranziens Na⁺-áram mellett leírtak egy perzisztens, a nyugalmi membránpotenciál környékén aktiválódó Na⁺-áramot is (Hirsch és Oertel, 1988).

A fenti konduktanciákon túlmenően a piramis-sejtek többféle depolarizáció-aktivált Ca²⁺-csatornát is expresszálnak sejtfelszíni membránjukban, így megfigyelhető a T-, P/Q-, L-, N- és R-típusú Ca²⁺-áramok aktiválódása egyaránt (Harasztosi és munkatársai, 1999). Az is megállapítást nyert, hogy a GABA_B-receptorok aktivációja az N-típusú Ca²⁺-áram amplitúdóját csökkenti, így a GABA-erg szinapszisok is szerepet játszhatnak a piramis-sejtekre jellegzetes membránsajátságainak kialakításában (Harasztosi és munkatársai, 1999).

Régi megfigyelés, hogy a magba szúrt mikroelektrodák segítségével még a nucleus cochlearis dorsalis teljes deafferentációja után is elvezethetők akciós

potenciálok, ami felvetette annak gyanúját, hogy a magot felépítő egyes struktúrák spontán aktivitással rendelkeznek. Ezt a felvetést megerősítette az a megfigyelés, aminek során a piramis-sejtek intrinsic aktivitását regisztrálták. Ezen aktivitás forrására vonatkozólag megoszlanak a vélemények, egyes szerzők szerint a piramis-neuronok saját ingerképző sajátsággal rendelkeznek; mások úgy vélik, hogy a piramis-neuronok spontán aktivitása csak a velük szinaptikus kapcsolatban álló struktúrák aktivitásának következménye (Hirsch és Oertel, 1988; Charpak és munkatársai, 1989; Waller és Godfrey, 1994; Kanold és Manis, 1999).

1.3. A cerebellum és a nucleus cochlearis dorsalis közötti rokonság

A cerebellum szerkezete és funkciója nem egyedülálló a központi idegrendszerben, több olyan struktúra is létezik, amelyek morfológiai, fejlődéstani és funkcionális sajátságaikban nagyban hasonlatosak a kisagyhoz. Ilyen képlet egyebek között a halakban és kétélűekben előforduló nucleus octavolateralis dorsalis és ventralis, az oldalvonalis lebeny, valamint az emlősökben megtalálható nucleus cochlearis dorsalis (Mugnaini és munkatársai, 1980a, 1980b; Juiz és munkatársai, 1994; Devor, 2000).

A nucleus cochlearis dorsalis a kisagyhoz hasonló felépítésű: a cerebellum fő sejtje típusa a gátló Purkinje-sejt, amelynek axonja a felszínnel ellentétes irányba halad, míg dendritfája egy síkban, a cerebellum felszínével párhuzamosan terül el. A külső, molekuláris rétegben a szemcsesejtek paralel-rostjai haladnak, amelyek a Purkinje-sejtek dendritfájával képeznek szinapszisokat, és a Purkinje-sejteken egy paralel-rost mindig küszöb alatti depolarizációt hoz létre. A szemcsesejtek a bemenetüket számos különböző fel- és leszálló pályából, egyebek között a gerincvelő, agytörzsi magvak és az agykéreg területéről kapják. A Purkinje-sejt másik fő bemenete az oliva inferiorból származó kúszórost.

Mivel a nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejtjei serkentő jellegűek, azok inkább a kisagyi fehérállomány magjainak neuronjaival mutatnak hasonlóságot. A Purkinje-sejteknek megfelelő, nucleus cochlearis dorsalisban található sejtje típusa a gátló hatású cartwheel-neuron. Ezt a megállapítást igazolja, hogy a Purkinje-sejtekre specifikus markerek a cartwheel-sejteket is jelölik. Ezen túlmenően az egérben létrehozott, a postnatalis életben a Purkinje-sejtek degenerációját létrehozó mutációk (a „Lurcher”, a „Purkinje cell degeneration” és a „Straggerer”) a nucleus cochlearis dorsalis cartwheel-

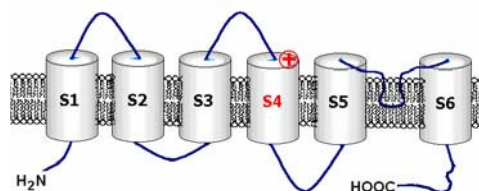
sejtjeinek pusztulását is előidézték. Igen érdekes megfigyelés, hogy a nucleus cochlearis dorsalisba transzplantált Purkinje-sejt túlél, és a kisagyban láthatóhoz hasonló, egysíkú dendritfát fejleszt. Mindezek mellett a nucleus cochlearis dorsalis és a cerebellum fejlődéstani eredete is megegyezik, ugyanis mindkét képlet a velőcső szomatoszenzoros lemezéből fejlődik (Martin és Rickets, 1981).

A morfológiai és strukturális hasonlóságok mellett a cerebellum és a nucleus cochlearis dorsalis funkcionális hasonlóságot is mutat: amennyiben a piramis-sejteket a paralel-rostokon és a nervus acusticus rostokon egyszerre éri ingerület, hosszabb ideig (mintegy 10 s) nem mutatnak aktivitást, azaz egy elnyújtott gátlás alakul ki. Ehhez hasonló jelenséget a cerebelláris Purkinje-sejtek két bemenetén történő egyidejű ingerléskor is megfigyeltek (Bell, 2002).

1.4. A K^+ -csatornák molekuláris szerkezete és csoportosítása

A K^+ -csatornák molekuláris szerkezetének és összetételének vizsgálata felfedte, hogy azok korántsem alkotnak egységes csoportot. A különböző - egymástól gyakran lényegesen eltérő sajátságokkal és funkciókkal jellemezhető - K^+ -csatornák az őket felépítő alegységek száma és struktúrája alapján ún. főcsoportokba (vagy superfamiliákba) oszthatók (Rudy, 1988; Coetzee és munkatársai, 1999).

A leghamarabb felismert, és jelen pillanatban is a legnagyobb számú K^+ -csatornát magába foglaló főcsoportot a feszültségvezérelt (Kv) K^+ -csatornák képezik. Bár az ide tartozó molekulák biofizikai jellegzetességei, elektromos sajátságai és funkciói is igen jelentős különbséget mutatnak, molekuláris szerkezetükben megegyező, általában depolarizáció hatására aktiválódó ioncsatornákról van szó. A Kv-csatornákat négy alegység építi fel, melyek mindegyike hat transzmembrán doménnal rendelkezik (Catterall és munkatársai, 1993; 1. ábra).



1. ábra

A feszültségvezérelt K^+ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

Az ábra részleteivel kapcsolatosan lásd a szöveget.

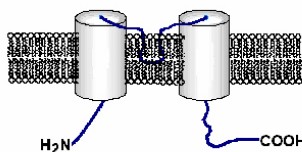
A transzmembrán szegmensek közül kitüntetett jelentőségű a 4. pozícióban található domén (S4). Ez a régió számos pozitív töltéssel rendelkező aminosavat tartalmaz, így ez a szakasz képezi a depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -csatornák feszültségszenzorát. Ugyancsak lényeges megemlíteni az S5 és az S6 transzmembrán régiók közötti hurkot (H_5 - vagy P-régió), ami mélyen benyúlik a sejt felszíni membránba, ám azt át nem éri. Jelen tudásunk szerint az egyes alegységek ezen hurkot formáló régiói az összeszerelődött ioncsatornában egymás felé tekintenek, és létrehozzák a csatorna K^+ -permeábilis pórusát. A pórust kialakító hurok egy különösen fontos szakasza egy glicin-tirozin-gicin (vagy az aminosavak egybetűs rövidítését alkalmazva GYG) aminosav-tripletet tartalmazó egység. A kérdéssel foglalkozó szakemberek sokáig úgy vélték, hogy ez a GYG-szekvencia a K^+ -permeábilis ioncsatornák egyfajta „ujjlenyomata”, és ennek megléte a K^+ -szelektív pórus kialakításához nélkülözhetetlen. Ezen hipotézis azonban a legújabb kutatási adatok birtokában megdőlni látszik (lásd az „ikerpórus” K^+ -csatornákat bemutató részt). A jellegzetes molekuláris struktúrából fakadóan a Kv osztályba sorolható K^+ -csatornákat 6TM-P csatornák néven is említi az irodalom, utalva az egyes alegységek hat transzmembrán szakaszára és a pórusformáló hurokra.

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

Katz, ma már méltán korszakalkotónak tartott, kísérletei óta (Katz, 1949) tudjuk, hogy léteznek olyan membránok, amikben nem pusztán a depolarizáció, hanem a hiperpolarizáció alkalmazása is a membrán K^+ -permeabilitásának fokozódásával jár. A későbbi célzott vizsgálatok rámutattak, hogy a Katz által elsőként megfigyelt hiperpolarizáció hatására aktiválódó csatornák két nagy csoportba oszthatók, amennyiben megkülönböztethetők a „klasszikus” befelé egyenirányító (inward rectifier) K^+ -csatornák (ezek aktivitására figyelt fel elsőként Katz) és a hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationcsatornák. Az utóbbi csatornaféleség pontos

szerkezetét és lehetséges funkcióit a disszertáció egy későbbi szakasza taglalja, jelen fejezetben csak a befelé egyenirányító K^+ -csatornák rövid áttekintésére kerül sor.

Hasonlóan a Kv-család tagjaihoz, a befelé egyenirányító K^+ -csatornák (K_{ir}) is négy alegység összeszerelődése következtében jönnek létre (Doupnik és munkatársai, 1995). Az alegységek tulajdonképpen egy „lecsupaszított” Kv-alegységnek felelnek meg, ugyanis a Kv-alegységek karboxi-terminálisán található két utolsó (azaz az 5. és 6.) transzmembrán szakaszát és a köztük elhelyezkedő pórusformáló hurkot tartalmazzák (Kubo és munkatársai, 1993; 2. ábra). Az alegységek ezen jellegzetességei miatt az ilyen csatornákat gyakran 2TM-P csatornákként említi az irodalom. Mivel a befelé egyenirányító K^+ -csatornák kifelé irányuló K^+ -áram vezetésére is képesek, aktivitásuk hozzájárulhat a nyugalmi membránpotenciál kialakulásához (bár önmagukban nem elégségesek annak létrehozásához; Stanfield, 1988); ugyanakkor (mivel erősebb depolarizáció hatására záródnak) nem szegülnek szembe a depolarizáló hatásokkal, energetikailag kedvezőbb helyzetet teremtve az akciós potenciálok kialakulásához. Az is felmerült, hogy a befelé egyenirányító K^+ -csatornák biztosíthatják a harántcsíkolt izom aktivitásának következményeként a transversális tubulusokban felhalmozódott K^+ sejtbe jutását (lásd Adrian, 1969; Hille és Schwarz, 1978; Hagiwara és Jaffe, 1979).



2. ábra

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

Az ábra részleteivel kapcsolatosan lásd a szöveget.

1.5. A h -áram és a HCN-csatornák sajátosságai

A hiperpolarizáció-aktivált nem specifikus kationáramot a szívben (Brown és munkatársai, 1979; Brown és DiFrancesco, 1980; Yanagihara és Irisawa, 1980), a retina fotoreceptorain (Attwell és Wilson, 1980; Bader és munkatársai, 1982) és érzőneuronokon (Spain és munkatársai, 1987) írták le először, és az ekkor már ismert, „klasszikus” befelé egyenirányító csatornákon folyó áramtól az „anómális” befelé egyenirányító elnevezéssel különítették el. Az áramot a szívvel foglalkozó

elektrofiziológusok általában „funny current” (I_f) néven említik, míg a neuroelektrofiziológiában inkább a h-áram (I_h) terminus honosodott meg. A h-áram egy kevert kationáram, amelynek reverzálpotenciálja szövettől függően -50 és -20 mV között változik, lassú aktiváció jellemzi (az aktivációs időkonstans általában 100 ms-nál nagyobb), és inaktivációt nem mutat. További szokatlan sajátossága, hogy jellegzetes feszültségfüggéssel rendelkezik, hiszen viszonylag negatív membránpotenciálokön aktiválódik (-50 mV és annál negatívabb értékek), és a hiperpolarizáció növekedésével növekszik az aktivált csatornák száma és az aktiváció sebessége egyaránt. Az áram rendhagyó sajátosságai miatt kapta a „funny” és a „queer” (lásd Accili, 2002) nevet (I_f , I_q).

Régóta ismert, hogy a szív sinuatrialis csomóját felépítő sejteken ezen áram felelős a spontán (pacemaker) aktivitás létrejöttéért, és így a sinuatrialis csomó tüzelési frekvenciájának beállításáért. Neuronokon a spontán akcióspotenciál-tüzelés kialakításán túl a sejtek elhúzódo vagy nagymértékű hiperpolarizációjának megakadályozása („escape phenomenon”), valamint a nyugalmi membránpotenciál és a bemenő ellenállás beállítása és stabilizálása a feladata (BoSmith és munkatársai, 1993; Pape, 1996; Lüthi és McCormick, 1998; Moosmang és munkatársai, 1999).

A h-áram a káliumáramok hagyományos blokkolószereinek tekintett TEA⁺ és 4-AP alkalmazásával nem gátolható, ugyanakkor igen érzékeny az extracellulárisan alkalmazott Cs⁺ jelenlétére; 1 mM CsCl már csaknem tökéletes gátlást okoz (Banks és munkatársai, 1993; Schlichter és munkatársai, 1991; Bader és munkatársai, 1982; Mayer és Westbrook, 1983). 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 csatornafehérjék szerkezetének leírására az áram felfedezése után mintegy három évtizeddel került sor. A h-áram kialakulásáért felelős csatornák molekuláris szerkezete nagyban hasonlít a feszültségvezérelt K⁺-csatornák felépítéséhez (1. ábra). Az S4 pozícióban elhelyezkedő feszültségérzékeny domén két feszültségérzékeny régióval rendelkezik, amelyek mindegyike 5-5 pozitívan töltött aminosav-oldalláncot tartalmaz. A domén a csatorna hiperpolarizáció által történő aktivációja ellenére nem mutat jelentős különbséget a depolarizáció-aktivált feszültségvezérelt K⁺-csatornák analóg feszültségérzékeny struktúrájával. A pórusformáló hurok rendelkezik a GYG szekvenciával, de ennek ellenére a csatorna Na⁺-ra is permeábilis. A Na⁺- és a K⁺-permeabilitás aránya (P_{Na}/P_K arány) a csatornát kialakító alegységek

összeszerelődésének függvénye, általában 0,25 és 0,41 között változik. A fehérje C-terminális végéhez közel, intracellulárisan található a ciklikus nukleotid kötő domén (cyclic nucleotide-binding domain, CNBD), aminek jelenléte és aktivitása felelős a cAMP csatornaműködést moduláló hatásáért (lásd Accili, 2002; Zagotta és munkatársai, 2003).

Ezidáig négy különböző alegységtípust sikerült leírni. Az egyes alegységek a HCN1-4 (hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid-kapuzott) jelölést kapták, és a belőlük összeszerelődött funkcióképes csatornák jelentős különbségeket mutathatnak biofizikai sajátosságaikban. A HCN1 alegységből felépülő homotetramerikus csatornák gyorsan aktiválódnak, aktivációs időkonstansuk (τ_{akt}) 100-200 ms körüli, ugyanez a paraméter a HCN2 alegységeket tartalmazó struktúra esetében 250-500 ms. A HCN3 és HCN4 homotetramerek aktiválódása ehhez képest igen lassú, a τ_{akt} értéke 2000 ms körül változik (Santoro és munkatársai, 1998; Ludwig, és munkatársai, 1999; Santoro és munkatársai, 2000).

Az egyes alegységek cAMP-érzékenységükben is különböznek egymástól: a HCN1 kisebb mértékű, a HCN3 kifejezett, a HCN4 pedig igen jelentős cAMP-szenzitivitással rendelkezik. A funkcióképes csatornák jellemzését tovább bonyolítja, hogy az egyes alegységekből heterotetramer molekulák is kialakulhatnak, és ilyenkor még az abban résztvevő alegységek önálló tulajdonságainak és a csatorna pontos alegység-összetételének ismeretében sem lehet megjósolni annak kinetikai sajátosságait és ciklikus nukleotid iránti érzékenységét. Általánosságban elmondható, hogy a csatorna tulajdonságai nem az alegységek sajátosságainak átlagolásával jönnek létre; egy HCN1- és HCN2-alegységekből összeszerelődő csatornánál például a félaktivációs feszültség a HCN2-alegységek értékéhez, a csatornanyitás sebessége a HCN1-nél, míg a cAMP-érzékenység a HCN2-nél megfigyelthez áll közelebb (Proenza és munkatársai, 2002).

A HCN-csatornák szerepének neuronokban is megfigyelhető fontosságát húzzák alá a legújabb, HCN2 knock-out egéren tett megfigyelések, miszerint a kísérleti állatokban nem pusztán a sinuatrialis csomó működése vált arrhythmiássá, de zavart szenvedett a thalamocorticalis kapcsolóneuronok működése is: a nyugalmi membránpotenciál negatívabb értékek felé tolódott, a neuronok pedig - hasonlóan a Cs^+ alkalmazása során megfigyelthez - periódikusan visszatérő aktivitássorozatokat („burst”) produkáltak. A jelenség hátterében valószínűleg a hiperpolarizáció hatására inaktivációból visszatérő T-típusú Ca^{2+} -csatornák megnyílása állhat, aminek

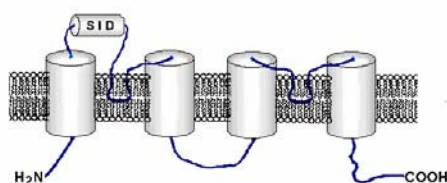
következményeként „absence”-típusú epilepszia alakult ki. (Ludwig és munkatársai, 2003)

1.6. Az ikerpórusú K^+ -csatornák

Régóta ismeretes, hogy az élő sejtek intra- és extracelluláris tere között potenciálkülönbség mérhető, aminek értéke a vizsgált sejt típusától függően viszonylag tág határok között változik, ám leggyakrabban -40 és -90 mV közötti értéket mutat (az intracelluláris tér negatívabb). A pillanatnyi membránpotenciál számítására a Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) egyenlet alkalmazható:

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

ahol E a számított membránpotenciál, R az univerzális gázállandó, T a hőmérséklet Kelvinben kifejezett értéke, F a Faraday-állandó, p az egyes ionok permeabilitása, $[X]_E$ és $[X]_I$ az adott ion extra- és az intracelluláris koncentrációja. Elemi megfontolásokból következik, hogy az egyes sejtek nyugalmi membránpotenciálja azért alakul ki, mert a sejt felszíni membrán K^+ -ra vonatkozó permeabilitása igen jelentős. Annak ellenére, hogy már az 1940-es éve óta ismert volt mind a GHK-egyenlet, mind a nagy K^+ -permeabilitás jelentősége a nyugalmi membránpotenciál kialakulásában, az azért felelős ioncsatornák azonosítására csaknem az ezredfordulóig kellett várni. Ketchum és munkatársai 1995-ben számoltak be arról, hogy egy, az addig ismert K^+ -csatornáktól teljesen különböző K^+ -permeabilis molekulát találtak, ami molekuláris szerkezetében, viselkedésében és funkcióiban is teljesen eltért az addig leírtaktól (3. ábra).



3. ábra
Az ikerpórusú K^+ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete
 Az ábra részleteivel kapcsolatosan lásd a szöveget.

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

A jellegzetes molekuláris szerkezet alapján az itt vázolt főcsoportba tartozó csatornákat 4TM-PP csatornákként jelöli az irodalom, bár az „ikerpórusú K^+ -csatorna” elnevezés is létjogosultságot nyert. Szükséges azonban megjegyezni, hogy a funkcióképes csatorna valószínűleg nem rendelkezik két független K^+ -permeábilis pórussal, pusztán a pórust formáló aminosavszekvenciából rendelkezik kettővel, amik azonban egyetlen pórus kialakításában vesznek részt.

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

- | | |
|--------|---|
| TREK: | <u>T</u> WIK- <u>r</u> elated <u>K</u> $^+$ channel (Fink és munkatársai, 1996; Patel és munkatársai, 1998; Patel és munkatársai, 2000; Bang és munkatársai, 2000; Lesage és munkatársai, 2000) |
| TRAAK: | <u>T</u> WIK- <u>r</u> elated <u>a</u> rachidonic <u>a</u> cid-stimulated <u>K</u> $^+$ channel (Fink és munkatársai, 1998) |

TASK:	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> cid- <u>s</u> ensitive <u>K</u> ⁺ channel (Duprat és munkatársai, 1997; Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kim és munkatársai, 1999; Kim és munkatársai, 2000; Rajan és munkatársai, 2000; Kim és Gnatenco, 2001; Ashmole és munkatársai, 2001)
TALK:	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> lkaline pH activated <u>K</u> ⁺ channel (Girard és munkatársai, 2001; Decher és munkatársai, 2001)
THIK:	<u>T</u> WIK-related <u>h</u> alothane- <u>i</u> nactivated <u>K</u> ⁺ channel (Rajan és munkatársai, 2001)
TRESK:	<u>T</u> WIK- <u>r</u> elated <u>s</u> pinal cord <u>K</u> ⁺ channel (Sano és munkatársai, 2003)

Az egyes osztályokon belül a csatornákat a felfedezésük sorrendjében látják el sorszámokkal, így létezik TREK-1 és TREK-2 csatorna, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TASK-4 és TASK-5 csatorna, stb. Az ikerpórusú K⁺-csatornák esetében sérül a korábban rendíthetetlennek tartott dogma a K⁺-permeábilis pórusban található GYG triplet vonatkozásában, ugyanis a GYG szekvencia bizonyos csatornák esetében GFG-re vagy GLG-re módosul (azaz a középső tirozin fenilalaninra vagy leucinra cserélődik; Lesage és Lazdunski, 2000).

1.7. A TASK-család jellemzői

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

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

A TASK-csatornák ezen pH-érzékenysége jelentős élettani szereppel bírhat, ugyanis léteznek olyan adatok, amik szerint a neurotranszmisszió során a pH jelentősen megváltozhat a szinaptikus résben a neurotranszmisszió alatt bekövetkező H^+ - és OH^- -szekréció következtében. Tekintettel arra, hogy ezen folyamatok során akár 0,3 pH egységnyi változás is bekövetkezhet, a TASK-csatornák gátlása vagy aktiválódása igen számottevő lehet, és hozzájárulhat a neurotranszmitter poszt- és preszinaptikus hatásaihoz. Ezen hipotézis mellett szól, hogy a TASK-1 csatorna rendelkezik a PDZ-doménnal, ami lehetővé teszi számára a szinaptikus struktúrákkal való interakciót (lásd Lesage és Lazdunski, 2000).

A TASK-csatornák a közönséges K^+ -csatornagátló-szerekre (Cs^+ , Ba^{2+} , 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium) érzéketlenek; ugyanakkor néhány localanaestheticum (pl. lidokain, bupivikain) gátolja működésüket (Leonoudakis és munkatársai, 1998; Reyes és munkatársai, 1998; Kindler és munkatársai, 1999). Ezen túlmenően a TASK-1 csatorna az anandamid (Maingret és munkatársai, 2001), a TASK-3 csatorna pedig a ruténiumvörös alkalmazásával specifikusan gátolható (Czirják és Enyedi, 2003a). Az is bebizonyosodott, hogy az anandamid TASK-1 csatornát gátló effektusa nem a kannabinoidreceptorokra kifejtett hatás, hanem közvetlenül a csatornafehérjével történt interakció következménye.

Igen lényegesnek tűnik az a felismerés, hogy egyes gáznemű altatószerek (pl. halotán) aktiválják a TASK-1 és TASK-2 (továbbá a TREK-1, TREK-2) csatornákat (Patel és munkatársai, 1999; Lesage és munkatársai, 2000). Ennek nyomán úgy tűnik,

hogy a 4TM-PP csatornák jelenléte nem pusztán a nyugalmi membránpotenciál kialakulásával kapcsolatos kérdésekre ad választ, hanem ezen csatornák képében megjelent a gáznemű altatószerek hatásának oly régóta keresett célpontja. Könnyű belátni ugyanis, hogy ezen K^+ -csatornák halotán jelenlétében bekövetkező aktivációja a neuronok hiperpolarizációját, így azok ingerlékenységének jelentős csökkenését okozza, ami megmagyarázhatja a halotán jól ismert altató, központi idegrendszeri gátló hatását.

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

Ugyancsak lényeges megállapításnak tűnik, hogy a patkány cerebellum szemcsesejtjeinek permanens K^+ -áramát ($I_{K_{so}}$, standing outward K^+ current; Watkins és Mathie, 1996) ugyancsak a TASK-1 csatornák jelenléte és aktivitása okozza (Millar és munkatársai, 2000). Az is bebizonyosodott, hogy a kisagyi szemcsesejtek permanens K^+ -árama a tenyészetben fenntartott sejtek esetében is megfigyelhet; bár a szerzők nem tapasztaltak érdemleges TASK-1 immunreaktivitást az egy napos szövetenyészetben elhelyezkedő szemcsesejteken, intenzív TASK-festődés volt demonstrálható a 7 napos tenyészeteken. A munka egyik mellékleteként az irodalomban elsőként számoltak be arról, hogy az astrocytákra specifikus GFAP-t (glial fibrillary acidic protein) expresszáló sejtek a TASK-1-specifikus immunreakcióra is pozitivitást mutattak. A későbbiek során más szerzők is igazolták az astrocyták TASK-1-specifikus festődését (Kindler és munkatársai, 2000), ugyanakkor az astrocyták a TASK-2 jelölés alkalmazása során számottevő festődést nem mutattak (Gabriel és munkatársai, 2002).

A TASK-csatornák működésének leírását célzó legfrissebb adatok egészen meglepő eredményeket is szolgáltatottak ezen csatornák lehetséges biológiai funkcióinak vonatkozásában. Az egyik tanulmány azt bizonyította, hogy a TASK-1 és a TASK-3 csatornák expressziója és funkciója fontos szerepet játszik az apoptózis

indukciójában (Lauritzen és munkatársai, 2003). A szerzők megállapították, hogy a cerebelláris szemcsesejtek perzisztens K^+ -áramait gátolva (akár genetikailag megakadályozva ezen csatornák expresszióját, akár a már megjelent csatornák működésének gátlása által) a sejtek pusztulása jelentősen csökkenthető volt. A TASK-csatornák apoptózis indukciójában betöltött fontos szerepét támasztja az is alá, hogy a TASK-1 és TASK-3 csatornákat hippocampalis neuronokban expresszálva (ahol fiziológiásan nincsenek jelen) azokban sejtapoptosist indukálnak.

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

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

Semmiféle adattal sem rendelkezünk ugyanakkor a TASK-specifikus fehérjék emberi szövetekben tapasztalható lokalizációjára vonatkozólag. Az egyetlen érdemi információ a Medhurst és munkatársai (2001) által közölt dolgozat, amiben emberi szövetekből készült homogenizátumban vizsgálták a TASK-1-, TASK-2- és TASK-3-specifikus mRNS expressziójának mértékét. A munka jelentősebb megállapításai közül kiemelhető, hogy a TASK-2-specifikus mRNS igen kicsiny, míg a TASK-3-specifikus mRNS jelentős mennyiségben volt kimutatható az emberi agyban. A TASK-1-specifikus mRNS mennyisége a kettő között volt. Bár ezen, az mRNS jelenléte vonatkozó adatok igen érdekesek, önmagukban semmiképpen sem elegendők a TASK-csatornák humán szövetekben történő megoszlásának beható analizisére, hiszen nem adnak tájékoztatást a szöveten belüli, egyes sejtek szintjén megjelenő mintázatról. Ezen túlmenően az mRNS jelenléte (vagy hiánya) semmiképpen sem igazolja a kész fehérjetermék jelenlétét vagy hiányát, így a specifikus, fehérje szintű (és lehetőség szerint funkcionális) vizsgálatok elvégzése elkerülhetetlen.

1.8. Célkitűzések

A tézisekben végzett munka során az alábbi konkrét kérdésekre próbáltunk választ keresni:

1. Kimutatható-e patkány nucleus cochlearisából izolált, túlélő agyszeleteken a piramis-neuronok spontán aktivitása?
2. Expresszálják-e a piramis-neuronok a spontán aktivitás háttérében gyakran meghúzódozó HCN-csatornákat? Ha igen, milyen elektrofiziológiai és farmakológiai tulajdonságok jellemzik a kérdéses csatornákat és az általuk létrehozott ionáramot?
3. Van-e összefüggés a HCN-csatornák jelenléte és működése, valamint a piramis-neuronok spontán aktivitása között?
4. Tudunk-e információval szolgálni a nucleus cochlearis piramis-sejtjeinek HCN-csatornáit felépítő alegységek típusára vonatkozólag?
5. Kimutatható-e a nucleus cochlearis astrocytákból készített tenyészeteken a TASK-1, TASK-2 és TASK-3 csatornák jelenléte? Megerősíthetők-e az immuncitokémiai adatok funkcionális (a TASK-csatornákon át folyó ionáramokat célzó) vizsgálatokkal?

6. Mutat-e a TASK-csatornák astrocytákon történő expressziója összefüggést azzal, hogy honnan történt az astrocyták izolálása (nucleus cochlearis, hippocampus, cerebellum)?
7. Mutatnak-e a GluR- és a GluT-típusba sorolható astrocyták bármilyen különbséget a vizsgált TASK-csatornák expressziójának vonatkozásában?
8. Jelen vannak-e, és ha igen, milyen megoszlásban a különböző TASK-csatornák az emberi cerebellumban?
9. Kimutatható-e bármilyen különbség a TASK-csatornák megoszlásában az emberi és a patkányból izolált cerebellum között?

2. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Kísérleti állatok, a preparálás főbb lépései

2.1.1. Vékonyszelet-preparátumok készítése

A kísérletekhez 8–14 napos Wistar patkányokat használtunk, a preparálás fő lépései megegyeztek a korábban leírtakkal (Rusznák és munkatársai, 1997). Az állat dekapitációja után sagittalis metszést ejtettünk a fejbőrön, valamint a nyaki csonton maradt izomzaton. Ezen képletek felpreparálását a cranialis nyakcsigolyák csigolyaívének átmetszése, majd a koponyán ejtett sagittalis, valamint a két orbitát összekötő coronalis irányú metszés követte. Az így bemetszett, még nem teljesen elcsontosodott koponyacsontok kettépattinthatóak voltak, és az agy hozzáférhetővé vált. A bulbus olfactoriusok, valamint az erek és agyidegek (közte a legmarkánsabb nervus trigeminus) átmetszése után az agy kibuktathatóvá vált. Az agy kipreparálása után azt mediansagittalis irányban megfeleztük, majd a középagy szintjében leválasztottuk az agytörzset.

Az így elkészített agytörzs-preparátumot cianoakrilát tartalmú ragasztóval teflontökhöz rögzítettük. A nucleus cochlearis dorsalis szeletek készítése esetén a cerebellum, plexus chorioideus ventriculi quarti, tela chorioidea ventriculi quarti és a pia mater eltávolítását követően a mag 600 μm vastag lateralis, a nucleus cochlearis ventralisnak megfelelő részét eltávolítottuk. A mag megmaradó, immár csak a nucleus cochlearis dorsalist tartalmazó részéből vibratóm (Campden Instruments, Loughborough, UK) segítségével 100-200 μm vastagságú szeleteket készítettünk. A szelet a dorsalis magrészek mellett a híd és a nyúltvelő egyes elemeit is tartalmazta, így a mag azonosítása részben annak jellegzetes, az agytörzs síkjából kidomborodó alakja; részben a preparálás során készített vázlatos rajz segítségével volt lehetséges. A preparálás során az agyszövetet jéghideg (-2°C), alacsony Na^{+} -tartalmú arteficiális cerebrospinalis folyadékban (továbbiakban aCSF) tartottuk (az alkalmazott oldatok pontos összetételét lásd később). A fenti módon nyert preparátumot 37°C -os normál aCSF-ben inkubáltuk 60 percen át. A preparálás és az inkubálás alatt az oldatokat 95% O_2 /5% CO_2 keverékével folyamatosan buborékolattuk.

2.1.2. Neuronok enzimatisz izolálása

Izolált neuronok preparálásához 3-8 nap közötti Wistar patkányokat használtunk (Rusznák és munkatársai, 2001). Az állat dekapitációja, majd az agy kipreparálása után a nucleus cochlearis csipesz segítségével eltávolítható volt. Az izolált nucleus cochlearist a ventralis és a dorsalis rész határán átmetszettük, így lehetővé vált a ventralis, illetve dorsalis magrészetben található neuronok szeparált izolálása. A preparálás során az agyszövetet jéghideg (-2°C) alacsony Na⁺-tartalmú aCSF-ben tartottuk. A kipreparált magrészetet 0,03 mg/ml kollagenázt (Sigma, type IA) és 0,12 mg/ml pronázt (Sigma, type XIV) tartalmazó normál aCSF-ben inkubáltuk 40 percen át (31°C). Az enzimatisz kezelés alatt az inkubáló oldatot 95% O₂/5% CO₂ keverékével buborékolattuk. A sejtizolálás végeztével az emésztést tripszin-inhibitor (Sigma, type I-S, 1 mg/ml) segítségével állítottuk le, majd a sejteket polírozott végű Pasteur-pipettával végzett óvatos mechanikai trituráció segítségével diszpergáltuk HEPES-pufferelt aCSF-ben.

2.1.3. Astrocytatenyészet készítése

Az astrocytatenyészet készítéséhez 3-8 napos Wistar patkányokat használtunk. Az állat dekapitálása és az agy eltávolítása után annak megfelelő területét (a nucleus cochlearist, a cerebellumot vagy a hippocampust) D1 izoláló oldatba helyeztük. A sejtek enzimatisz izolálása a D1 oldatban alkalmazott 0,025 g/ml koncentrációjú tripszinnel történt. A 37 °C-on történő, 30 perces inkubációt követően az immár elkocsonyásodott agyszövetdarabkákat 10% foetalis borjúsérummal (FCS) kiegészített MEM-be (minimal essential medium) helyeztük, ahol 5 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd óvatos trituráció segítségével mechanikusan disszociáltuk. Az így nyert sejtuszpenziót 100000 sejt/ml sűrűségűre hígítottuk, majd a szuszpenzió 0,5–0,5 ml-ét a 24 lyukú tenyésztőedény alján elhelyezkedő fedőlemezekre rétegeztük. Az így elkészített tenyészetet 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó légkörben tartottuk. A tápoldat 10% FCS-mal kiegészített MEM-et tartalmazott, amit először a tenyészet elkészítésének másnapján, majd ezt követően másodnaponként cseréltünk. Az itt vázolt tenyésztési körülmények között a neuronok nagy része elpusztult, míg az astrocyták folyamatosan osztódtak és növekedtek.

2.2. Az alkalmazott oldatok

	Normál aCSF	Alacsony Na ⁺ -tartalmú aCSF	HEPES pufferelt aCSF	Pipettaoldat*	D1 oldat**
PH	7,2	7,2	7,2	7,3	7,2
Ozmolaritás (mOsm/l)	330	330	330	300	300
Vegyszer	koncentráció mM-ban				
NaCl	125	Ø	135	Ø	136
KCl	2,5	2,5	3	120	5,2
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25	Ø	Ø	0,64
KH ₂ PO ₄	Ø	Ø	Ø	Ø	0,22
NaHCO ₃	26	26	Ø	Ø	Ø
CaCl ₂	2	2	2	Ø	Ø
MgCl ₂	1	1	1	1	Ø
Mioinozitol	3	3	Ø	Ø	Ø
Aszkorbinsav	0,5	0,5	Ø	Ø	Ø
Na-piruvát	2	2	Ø	Ø	Ø
Glükóz	10	10	10	Ø	16,6
Szacharóz	Ø	250	45	Ø	22
HEPES	Ø	Ø	10	40	10
EGTA	Ø	Ø	Ø	10	Ø
Na-GTP	Ø	Ø	Ø	0,5	Ø
K ₂ -ATP	Ø	Ø	Ø	2	Ø

* A vizsgált neuronok morfológiai azonosítása céljából a pipettaoldatban 1 mg/ml Lucifer Yellow fluoreszcens festéket is alkalmaztunk.

** Az oldatot 0,06 U/ml penicillinnel és 0,06 µg/ml streptomycinnel egészítettük ki.

Az oldatok ozmolaritását szükség esetén szacharóz hozzáadásával tartottuk a kívánt értéken. A legtöbb alkalmazott vegyszert a Sigma (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltuk, a kivételeket a megfelelő helyen jelöljük.

2.3. Elektrofiziológiai mérések

A vékonyszeleten történő mérések során a szeleteket a kísérletekhez használt mikroszkóp tárgyasztalába épített mérőkádba helyeztük, amelynek térfogata mintegy 200 μ l volt. A vizsgálatok során a szeletet, valamint a (mérőkádba helyezett) tárgylemezen található astrocytatenyészetet kb. 1 ml/min sebességgel perfundáltuk folyamatosan buborékoltatott (95% O_2 /5% CO_2) normál aCSF oldattal, egy 8 csatornás Minipulse 3 perisztaltikus pumpa (Gilson, Villiers Le Bel, Franciaország) segítségével. Izolált neuronok esetén a sejteken 30 perces ülepítés után (a mérőkád aljára kitapadásukat követően) végeztünk méréseket, miközben a neuronok HEPES aCSF-ben voltak. Az oldatcsere ebben az esetben egy gravitációs perfúziós rendszer segítségével történt. Szükség esetén a neuronok akcióspotenciál-tüzelésének gátlásához 1 μ M tetrodotoxint (TTX, Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) alkalmaztunk mérőoldatban. Egyes mérések alkalmával K^+ -csatorna-blokkolókat (1 mM TEA⁺, 2 mM 4-AP), 1 mM CsCl-ot, illetve 10 μ M ZD7288-at (Tocris, Cookson, UK) használtunk.

A méréseket a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében végeztük, mind a feszültség-, mind az áram-clamp módozatok alkalmazásával (Hamill és munkatársai, 1981). Az áram-clamp mérések során külső ingerlés nélkül regisztráltuk a neuronok spontán akcióspotenciál-tüzelését. A felhasznált mikroelektrodák vékonyfalú boroszilikát üvegkapillárisból készültek (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK), ellenállásuk a belső oldattal való feltöltés után 2 és 2,5 M Ω között volt. Piramis-sejtek vizsgálata során a nucleus cochlearis dorsalis szeletekben található nagy, háromszög alakú sejtesteken végeztük a méréseket. Ezen sejteken szemellenőrzés mellett, előzetes tisztítás nélkül képeztünk „giga-seal”-t. A soros ellenállás értéke 2 és 8 M Ω között volt, és azt 60-80%-ban, elektronikusan kompenzáltuk. A soros ellenállás mértékét a mérés során állandó értéken próbáltuk tartani, alkalmankénti óvatos szívással vagy a pipetta helyzetének kismértékű változtatásával. A mintavételezés Axopatch 200A patch-clamp erősítő és DigiData 1200 AD/DA-konverter (Axon Instruments, Foster City, Kalifornia, USA) segítségével történt. A méréshez és az adatok feldolgozásához a pClamp 6.0 szoftvert használtuk. A teljes-sejtes kapacitást elektronikusan kompenzáltuk. Az eredmények átlag $\pm$ SEM formájában vannak feltüntetve.

A mérőkád egy Nomarski optikával (differenciál-interferenciakontraszt) és epifluoreszcens feltétellel felszerelt Axioskop mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen,

Németország) tárgyasztalába volt beépítve. A sejtek morfológiai azonosítása Zeiss Achroplan vízimmerziós objektív (63X) segítségével történt. A sejtek pontosabb azonosítása érdekében a belső oldatban 1 mg/ml Lucifer Yellow fluoreszcens festéket alkalmaztunk. A mérés végeztével epifluoreszcens megvilágítást alkalmazva a sejtbe diffundált festék a sejtestet, valamint az axon és a dendritfa egy részét is láthatóvá tette.

2.4. Immuncitokémia, immunhisztokémia

2.4.1 Fluoreszcens immuncitokémia

Fluoreszcens immuncitokémiát astrocytatenyészetben és izolált neuronokon végeztünk. Az astrocytatenyészet a vizsgálatok végzésekor általában 4-5 napos volt és 70 – 80%-os konfluenciát mutatott. Az izolált neuronokon 20 perces ülepítést követően végeztük el az immunfestést, amikor a sejtek a tárgylemezre már kitapadtak. A festési eljárás a kezdeti lépésektől megegyezik a két preparátum esetén. A festést megelőzően a sejteket 4 % paraformaldehidben fixáltuk (15 perc, szobahőmérsékleten), majd ezt követően 100 mM glicint tartalmazó PBS-sel (phosphate buffered saline) mostuk. A permeabilizációt a mosást követően Triton-X 100 (0,1%) tartalmú PBS-ben történő 10 perces inkubálással végeztük. Az aspecifikus kötődés megelőzése érdekében 1%-os borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-ben tartottuk a sejteket 30 percen át. Ezt követően a primer antitestekkel (I. I. táblázat) inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten 60 percen át, vagy 4°C-on egy éjszakán át. 3 x 5 perces PBS-ben történő mosást követően a preparátumot a megfelelő másodlagos antitestekkel (II. táblázat) inkubáltuk 60 percen át (szobahőmérséklet), majd 3x5 perces PBS-ben történő mosás történt. A festés utolsó lépéseként DAPI sejtmagfestést alkalmaztunk, majd fedőlemezzel fedtük a mintát.

2.4.2. Nem fluoreszcens immunhisztokémia

Patkány és humán cerebellumból származó szövettani minták vizsgálatakor nem fluoreszcens immunfestést alkalmaztunk. A humán szövetből formaldehid-fixált, parafinba ágyazott metszeteket készítettünk, míg a patkány cerebellumból formaldehid-fixált (24 h) és fagyasztott (folyékony nitrogén) metszeteket is alkalmaztunk (a metszetek vastagsága minden esetben 4 µm volt). A humán cerebellum minta egy akut szívelégtelenségben elhunyt 78 éves nőbetegből származott. A vizsgálatot a

hozzátartozók írásos beleegyezésével és a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük.

Az immunfestés főbb lépései megegyeztek mind a fagyasztott, mind a formalinnal fixált metszetek esetében. A formaldehid-fixált minták esetén az antigénfeltárás pronázos kezelés (0,1 %, 3 perc) vagy 0,01 M TRIS pufferben (pH = 8,8), mikrohullámú sütőben történő inkubálás segítségével történt (3x5 perc).

Az antigénfeltárást követően az endogén peroxidáz aktivitást 3% H₂O₂-vel blokkoltuk (10 perc, szobahőn). Az aspecifikus kötődést PBS-sel történő mosást követően Protein Block Serum Free Reagent (DAKO, 10 perc, szobahő) segítségével blokkoltuk. A szövettani mintákat ezután a primer antitestekkel reagáltattuk 60 percen át (I. táblázat), PBS-sel mostuk (3x5 perc), majd ezt követően alkalmaztuk a biotinnal jelölt másodlagos antitesteket (30 perc, II. táblázat), végül ismét PBS-ben mostuk. A mintákat tormaperoxidázzal konjugált Streptavidinnel (Streptavidin/HRP, 1:500, szobahő) inkubáltuk 30 percig, PBS-sel mostuk, majd alkalikus foszfátazzal-konjugált Streptavidinnel (1:50) inkubáltuk újabb 30 percen át. Az immunreakciót VIP- (SK4600, Vector) vagy diaminobenzidin-kit (DAB, Vector) segítségével tettük láthatóvá. Ezt követően hematoxilin festést, esetenként glia- vagy neuronspecifikus immunfestést alkalmaztunk. Az utóbbi esetben újabb 10 perces blokkolóoldatos kezelés után került sor a második primer antitest alkalmazására (30 perc). A másodlagos antitestekkel végzett kezelést (30 perc, szobahőn) megelőzően (és azt követően) a metszeteket TBS-sel (TRIS-buffered saline) mostuk. A minták alkalikus foszfátáz-konjugált Streptavidinnel (1:50, 30 perc) történő inkubációját követően az immunreakciót New Fuchsin alkalmazásával tettük láthatóvá.

Az immunreakciók vizsgálatához vagy RT Color CCD kamerával felszerelt Nikon Eclipse 600W mikroszkópot (Nikon, Tokio, Japán), vagy Zeiss LSM 510 konfokális lézermikroszkópot használtunk (Oberkochen, Németország). A számítógépes képfeldolgozás Spot RT v3.5 szoftver segítségével, a pixel analízis az Image-Pro Plus szoftverrel történt.

I. táblázat
A munkában használt primer antitestek

<i>Antitest</i>	<i>Specifitás</i>	<i>Hígítás</i>	<i>Milyen fajból</i>	<i>Gyártó</i>
Anti-HCN1	patkány	1:200	nyúl	Alomone
Anti-HCN2	patkány	1:200	nyúl	Alomone
Anti-HCN4	patkány	1:200	nyúl	Alomone
Anti-NSE*	patkány	1:100	egér	Alomone
Anti-TASK-1	patkány	1:50; 1:500; 1:1000	nyúl	Alomone
Anti-TASK-2	patkány	1:50	humán	Alomone
Anti-TASK-1	humán	1:10	kecske	Santa Cruz
Anti-TASK-2	patkány, humán	1:10	kecske	Santa Cruz
Anti-TASK-3	patkány, humán	1:10	kecske	Santa Cruz
Anti-GFAP**	humán	1:400	humán	DAKO
Anti-GFAP	patkány, humán	1:100	kecske	Santa Cruz
Anti-NFP***	humán	1:50	egér	DAKO

*: neuronspecifikus enoláz

** : glial fibrillary acidic protein

***: neurofilament protein

II. táblázat
A munkában használt másodlagos antitestek

<i>Antitest</i>	<i>Hígítás</i>	<i>Gyártó</i>
Anti-nyúl Texas Red-konjugált IgG	1:400	Vector
Anti-egér FITC-konjugált IgG	1:400	Vector
Anti-egér Texas Red-konjugált IgG	1:400	Vector
Anti-nyúl FITC-konjugált IgG	1:200, 1:400	Vector
Anti-kecske FITC-konjugált IgG	1:200	Vector
Anti-kecske Texas Red-konjugált IgG	1:200	Vector
Anti-kecske Biotin-konjugált IgG	1:500	DAKO
Anti-nyúl Biotin-konjugált IgG	1:300	DAKO
Anti-egér Biotin-konjugált IgG	1:300	DAKO

Alomone: Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael

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

DAKO: Glostrup, Dánia

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

2.5. Molekuláris biológiai módszerek

2.5.1. Az astrocytatenyészet transzfekciója

A tenyészet 50%-os konfluenciájának elérésekor került sor a sejtek pDsRed2-ER vektorral (BD Biosciences, CA, USA) történő transzfekciójára. Ezen 4,7 kbázis méretű vektort az élő sejtek endoplasmaticus reticulumának fluoreszcens jelölésére fejlesztették ki (Roderick és munkatársai, 1997, Kendall és munkatársai, 1994). A DNS szekvencia egy vörösen fluoreszkáló proteint, egy endoplasmaticus reticulumot célzó szekvenciát, valamint a fluoreszkáló fehérje endoplasmaticus reticulumban történő lehorgonyzását szolgáló szekvenciát kódol. A transzfekció után 24 órával a tenyészetet formalinnal

fixáltuk, majd a fent leírt módon került sor az immunfestésre. Sikeres transzfekció esetén az endoplasmaticus reticulum vörösen fluoreszkáló jelölést kapott.

2.5.2. Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR)

A TASK-1, -2 és -3 mRNS expressziójának vizsgálata patkányból származó astrocytatenyészetben, RT-PCR segítségével történt. A sejtekből TRIzol (Invitrogen, Paisley, UK) felhasználásával vontuk ki a teljes RNS-t, a gyártó utasításait követve. A sejteket TRIzol tartalmú oldatban mobilizáltuk a tárgylemezről, majd 5 perc szobahőn történő inkubálás után 200 µl kloroformot mértünk a mintára. 15 perces, 12000 g-vel, 4°C-on történő centrifugálás után az átlátszó felülúszót 0,5 ml izopropanolba mértük, majd így inkubáltuk szobahőn 10 percig. 10 perces, 4°C-on történő centrifugálás után a felülúszót 1 ml 75%-os etanolba tettük, majd mintegy 30 percen át levegőn száradni hagytuk. Az így nyert mintából 0,5 µl-t 99,5 µl 1 mM Na₂HPO₄ pufferhez (pH = 7,5) mértünk. Fotométer segítségével, 260 és 280 nm-es hullámhosszon határoztuk meg a minta fehérjetartalmát.

A reverz transzkripciót 3 µg RNS felhasználásával végeztük 5 mM MgCl₂, reverz transzkripció puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, pH = 9, 25 °C), 1 mM dNTP mix, 1 U/µl rekombináns RNasin RNase inhibitor, 15 U/µl AMV reverz transzkriptáz, és 0,5 µg Oligo(dT)₁₅ primerek (Promega, Mannheim, Germany) jelenlétében. Az ezt követő PCR amplifikációt (95 °C, 5 percig; utána 35 ciklus 95 °C-on 1 percig, 58 °C TASK-1-nél, 65 °C TASK-2 esetén és TASK-3-nál, 1 percig; 72 °C-on 1 percig; majd mindezt követően 4 °C-on 5 percig) GeneAmp PCR System 2400 segítségével (Perkin Elmer Wellesley, MA, USA), az alábbi primerekkel végeztük (Invitrogen): TASK-1, 5'-CAC CGT CAT CAC CAC AAT CG-3' és 5'-TGC TCT GCA TCA CGC TTC TC-3' (515 bp nagyságú); TASK-2, 5'-TGG GCG CCT CTT CTG TGT CTT CTA-3' és 5'-TCC CCT CCC CCA CTT GTT TTC ATT-3' (629 bp nagyságú); TASK-3, 5'-ATG AGA TGC GCG AGG AGG AGA AAC-3' és 5'-ACG AGG CCC ATG CAA GAA AAG AAG-3' (414 bp nagyságú; Meuth és munkatársai, 2003). A PCR termékek 2%-os agaróz gélen, etidium-bromiddal váltak láthatóvá, az adatfeldolgozás Image-Pro Plus szoftver (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) segítségével történt.

2.5.3. Western-blot

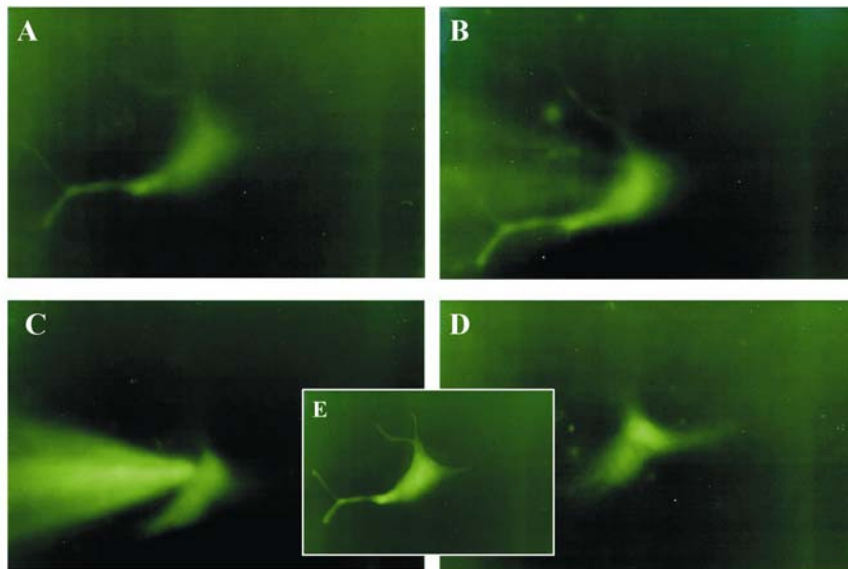
Az astrocytatenyészetet jéghideg PBS-ben mostuk, majd lízispufferben került sor a sejtek felszedésére (20 mM TRIS-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)benzénszulfonil-fluorid, 20 μ M leupeptin, pH 7.4). A minta feltárását jégen történő szonikálás segítségével fejeztük be (Lázár és munkatársai, 2003). A minták fehérjetartalmát módosított BCA protein-assay (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével mértük meg. A teljes sejtlizátumok SDS-PAGE sample pufferbe kerültek, majd 10 percen át főztük azokat 100 °C-on. A mintákat SDS-PAGE-nak (poliakrilamid-gélelektroforézis) vetettük alá (Laemmli, 1970). Az általunk használt gél 8%-os volt, mintánként pontosan ugyanakkora mennyiségű (20 μ g) proteint alkalmaztunk. Az elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át (BioRad, Wien, Austria). A membránokat 5%-os, PBS-ben oldott tejporral blokkoltuk, majd ezt követően TASK-1, -2, és -3 ellen termeltetett poliklonális kecske antitestekkel inkubáltuk (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA). Másodlagos antitestként peroxidáz-konjugált kecske elleni, nyúlban termeltetett IgG antitestet (BioRad), a jel erősítésére nyúl elleni Vectastain ABC-kitet (Vector) használtunk. A kontroll kísérletek során a festés specifikus voltát megfelelő szintetikus blokkoló peptidek (Santa Cruz) antitestekkel történő preadszorpciója után történő inkubációval ellenőriztük. A fenti művelet teljesen megakadályozta pozitív immunreakció kialakulását. Az immunreaktív sávokat kemilumineszcens ECL Western-blotting detection kit (Amersham, Little Chalfont, Anglia) segítségével, fényérzékeny filmen (AGFA, Brüsszel, Belgium) tettük láthatóvá.

3. EREDMÉNYEK

3.1. *A nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejtek HCN-áramának jelentősége a jellegzetes aktivitási mintázat kialakításában*

3.1.1. A HCN-áram általános jellemzése

A nucleus cochlearis dorsalis szeletben elhelyezkedő piramis-sejtek gyakran nem azonosíthatóak kétséget kizáróan pusztán a Nomarski-optika alkalmazásával, mivel a sejtest alakja nem mindig ítéltető meg teljes bizonyossággal, akár a szelet metszési síkja, akár a sejtet részben vagy egészében takaró struktúrák miatt. A pontos identifikálást tovább bonyolítja, hogy a Nomarski-optika a nyúlványrendszert nem, vagy csak igen kis részben teszi láthatóvá.



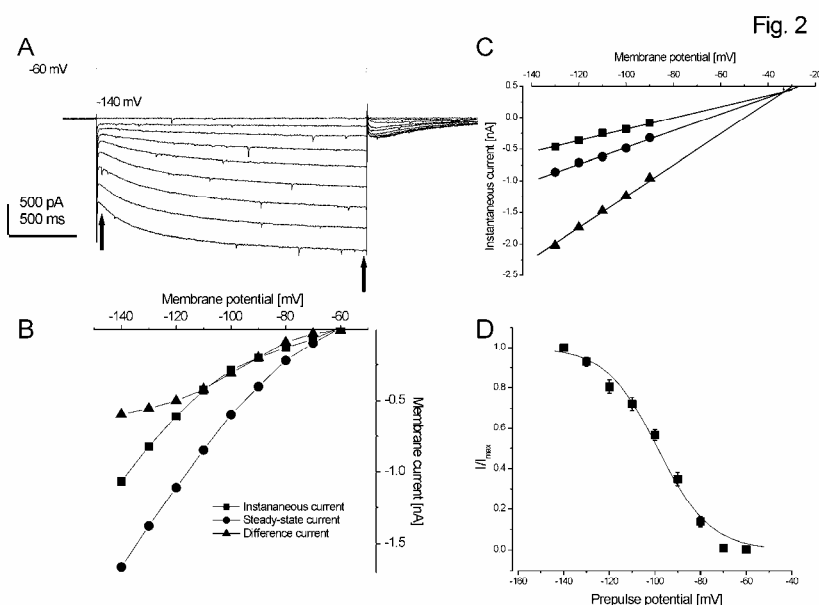
4. ábra

Fluoreszcens festékkel feltöltött piramis-sejt a nucleus cochlearis dorsalisban

A képeket epifluoreszcens feltétellel felszerelt Zeiss Axioskop FS mikroszkóppal, 63x vízimmerziós objektív segítségével készítettük. (A-D) Ugyanazon sejtről különböző optikai mélységben felvett képek. (A-legmélyebb, D-legfelületesebb réteg) A B és C panelen a mikroelektroda is látható. (E) Az A-D képek egymásra vetítésével származtatott kép.

A piramis-neuronok pontos azonosítása érdekében ezért szükség volt a sejtek morfológiai sajátosságainak láthatóvá tételére, aminek céljából az elektrofiziológiai

vizsgálat során az alkalmazott mikroelektrodákat egy fluoreszcens festéket (Lucifer Yellow) is tartalmazó oldattal töltöttük fel. A festék a mérés alatt a sejtbe diffundált, így a kísérletek végeztével láthatóvá vált az éppen vizsgált neuron sejtestének alakja, valamint nyúlványrendszerének egy tekintélyes része (4. ábra). A piramis-neuronokat a relatíve nagy (mintegy 20-25 μm átmérőjű), kifejezetten háromszög alakú sejtest, és az annak csúcsaiból kiinduló apicalis és basalis dendritfa, valamint az axon megléte alapján azonosítottuk.



5. ábra

A cochlearis piramis-sejtek I_h -áramának főbb jellemzői

(A) -60 mV-os tartópotenciálról 2 s hosszúságú hiperpolarizáló impulzusok hatására kialakuló áram. A nyilak az azonnali és steady-state áramkomponensek mérésének időpontját jelzik. (B) Az azonnali (négyzet) és a steady-state (kör) áramok feszültségfüggése. Az azonnali áramkomponens steady-state áramból történő kivonásával kaptuk meg a különbségi áramot (háromszög). (C) A reverzálpotenciál extrapolációs módszerrel történő meghatározása. (D) A steady-state aktivációs paraméterek meghatározása.

Az elektrofiziológiai mérések első lépésében -60 mV-os tartópotenciálról alkalmaztunk 2 s hosszúságú hiperpolarizáló impulzusokat, -70 mV és -140 mV közötti feszültségtartományban. Megfigyeléseink szerint a piramis-neuronok a fenti impulzusprotokoll alkalmazásának hatására egy lassan aktiválódó, befelé irányuló áramot produkáltak, amely inaktivációt nem mutatott (5A és 5B ábra). Az áram kinetikai sajátosságai arra utaltak, hogy az nem a klasszikus befelé egyenirányító csatornák, hanem a hiperpolarizáció hatására aktiválódó, nem-specifikus kationcsatornák aktiválódása miatt jött létre (I_h). Ezen föltételezés egyik lehetséges

bizonyítása az áram megfordulási potenciáljának meghatározása, ami (kevert kationáramról lévén szó) kb. -30 mV körül várható. A reverzálpotenciál meghatározását azonban igen megnehezíti, hogy annak környékén számos, a piramis-sejtek esetében már egyértelműen demonstrált, depolarizáció-aktivált K^+ - és Ca^{2+} -áram aktiválódik, zavarva a h-áram megfordulási potenciáljának meghatározását. Annak érdekében, hogy az egyéb áramok aktiválódásából fakadó zavaró hatásokat kiküszöböljük, a h-áram reverzálpotenciálját az ún. extrapolációs módszerrel határoztuk meg (5C ábra). Ennek során három különböző tartópotenciálról (-60, -70 és -80 mV) kiindulva határoztuk meg a hiperpolarizáló stimulusok kezdetén kialakuló, ún. azonnali áram áram-feszültség karakterisztikáját a -90 és -130 mV közötti tartományban, majd az így nyert pontsorra egyeneseket illesztettünk (-60 mV: négyzet, -70 mV: kör, -80 mV: háromszög). A h-áram inaktivációt nem mutat, ugyanakkor az alkalmazott tartópotenciálokon a csatornák egy része bizonyosan aktivált állapotban van. A h-áram kialakulásáért felelős HCN-csatornák aktivációjának feszültségfüggése alapján biztosan kijelenthető, hogy minél negatívabb tartópotenciál alkalmazására kerül sor, annál nagyobb számú csatorna van nyitott állapotban; az azonnali áram nagysága egy adott membránpotenciálon ennél fogva az aktuálisan nyitott csatornák számával mutat összefüggést. A három különböző tartópotenciálról kiváltott azonnali áramok áram-feszültség karakterisztikájának metszéspontja azt jelzi, hogy az adott teszt-potenciálon folyó áram amplitúdója azonos. Könnyű belátni, hogy akkor és csak akkor lehet a különböző számú csatornán folyó áram nagysága azonos egy adott membránpotenciálon, ha a kérdéses ionokra ható elektrokémiai gradiens értéke nulla, azaz a vizsgált áram megfordulási potenciáljának értékén. Méréseink alapján a piramis-sejtek h-áramának reverzálpotenciálja -32 ± 3 mV ($n = 6$).

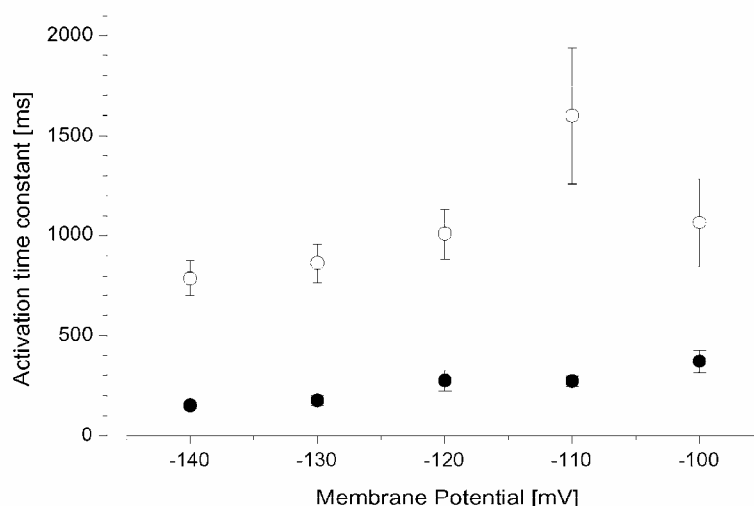
A h-áram steady-state aktivációjának a vizsgálatához farokáram-protokollt használtunk, aminek során 2000 ms hosszúságú, -70 és -140 mV közötti előimpulzusokat követően, -60 mV-on mértük a kialakuló áram amplitúdóját. Az áramamplitúdókat ezt követően a -140 mV-os előimpulzust követően megfigyelt maximális amplitúdóra normáltuk, majd az előimpulzus függvényében ábrázoltuk (5D ábra). Az így nyert pontsort az alábbi Boltzmann-függvénnyel illesztettük:

$$I/I_{max} = \{1 + \exp [(E_{50} - E) / s]\}^{-1}, \quad (2)$$

ahol az I az E amplitúdójú prepulzus potenciál után mért áramerősség, I_{max} a maximális áram, E_{50} a félaaktivációs feszültség, s pedig a feszültségérzékenységet jelző

meredekségi faktor. Megállapítottuk, hogy a piramis-neuronok hiperpolarizáció hatására aktiválódó áramának félaktivációs feszültsége -99 ± 1 mV, az s értéke pedig $10,9 \pm 0,4$ mV ($n = 27$).

Fig. 3



6. ábra

A hiperpolarizáció-aktivált áram aktivációs időkonstansának feszültségfüggése

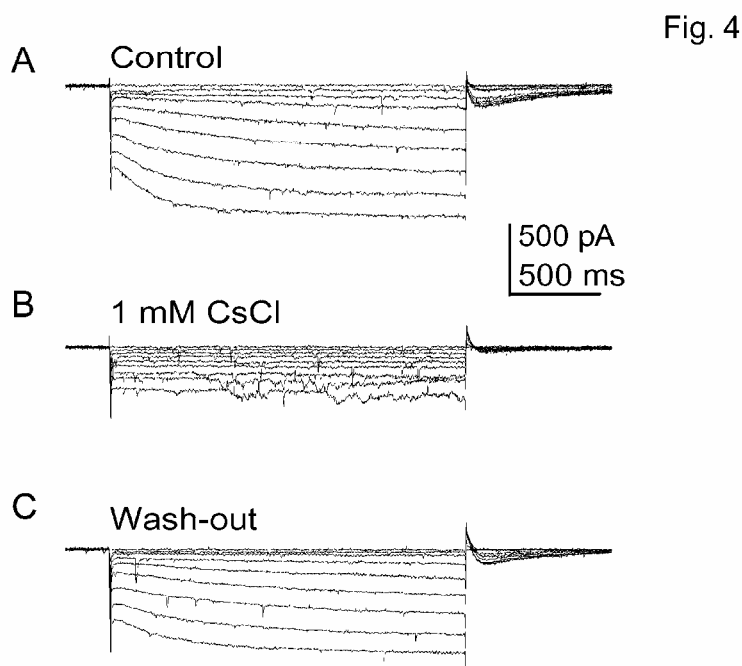
Az időkonstansokat -60 mV-os tartópotenciálról alkalmazott hiperpolarizáló lépcsők hatására létrejövő áramgörbék két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel történő illesztésével határoztuk meg. A gyorsabb (τ_1 - fekete kör) és lassabb (τ_2 - üres kör) aktivációs időkonstansokat a feszültség függvényében ábrázoltuk.

A h-áram aktivációs szakaszának illesztésével meghatároztuk az aktivációs kinetikát jellemző időkonstansok értékét is (6. ábra). A -140 és -100 mV közötti hiperpolarizáció hatására megfigyelt áramgörbék egy- és két exponenciális tagot tartalmazó függvényekkel illesztettük. Eredményeink szerint a piramis-neuronok h-áramának aktivációját a két exponenciális tagot tartalmazó függvény pontosabban illeszti, az aktivációs időkonstansok értékei a hiperpolarizáló impulzus nagyságától függően 150 - 300 ms (τ_1) és 800 - 1500 ms (τ_2) között változtak.

3.1.2. A HCN-áram farmakológiai vizsgálata és összefüggése a piramis-sejtek spontán aktivitásával

Irodalmi adatokból ismert, hogy az extracellulárisan alkalmazott CsCl a h-áramot hatékonyan gátolja (Banks és munkatársai, 1993; Schlichter és munkatársai, 1991;

Bader és munkatársai, 1982; Mayer és Westbrook, 1983), így a jelen munkában is sor került a CsCl hatásának vizsgálatára (7. ábra). Megállapítottuk, hogy 1 mM CsCl jelenlétében a piramis-neuronok hiperpolarizáció-aktivált áramának amplitúdója $85 \pm 9\%$ -kal csökkent a kontrollhoz képest (-140 mV-os membránpotenciál, $n = 12$). A szer 5 mM-os koncentrációjának alkalmazása során a gátlás mértéke hasonlóan bizonyult ($87 \pm 7\%$, $n = 5$). Az esetek legnagyobb részében a szer hatása kimosható volt.



7. ábra

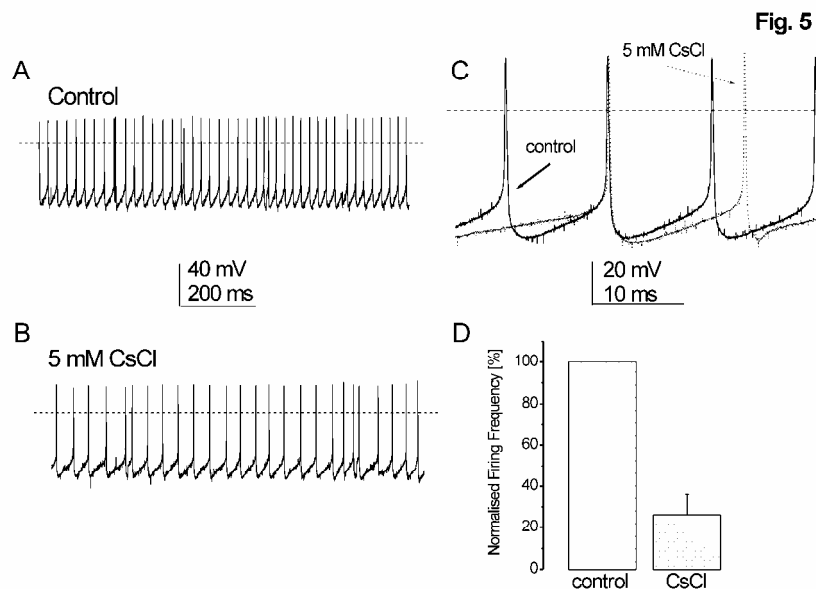
Extracelluláris CsCl hiperpolarizáció-aktivált áramra kifejtett hatása

(A) Az áramgörbéket -60 mV-os tartópotenciálról alkalmazott, egymást 10 mV-onként követő, 2 s hosszúságú feszültséglépcsők hatása alatt rögzítettük. A maximális hiperpolarizáció -140 mV volt. (B) A kontroll áram mérése után 1 mM CsCl extracelluláris alkalmazására került sor ugyanazon protokoll használata mellett. (C) Ugyanazon neuronon 9 perces, kontroll oldattal történő mosást követően regisztrált áram.

Kísérleteink során a piramis-sejtek nagyobb része (98 vizsgált sejt közül 69) spontán akcióspotenciál-tüzelést mutatott. Mivel a h-áramnak szerepe lehet egyes ingerlékeny struktúrák spontán aktivitásának kialakításában, ezért megvizsgáltuk, hogy az azt blokkoló CsCl milyen hatással van az általunk tanulmányozott piramis-neuronok

spontán aktivitására (8. ábra). Ezen kísérletek során áram-clamp elrendezésben, külső ingerlés nélkül regisztráltuk a piramis-sejtek spontán aktivitását kontroll körülmények között, valamint 1–5 mM CsCl jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a CsCl hatására az egyes akciós potenciálokat megelőző lassú depolarizáció meredeksége csökkent, és ezzel egyidejűleg a tüzelés frekvenciája a kontroll körülmények között tapasztaltak mintegy 26%-ára esett vissza ($n = 5$).

Mivel a CsCl a h-áram hatékony gátlása mellett egyéb ioncsatornák működését is befolyásolhatja, ezért a vizsgálatok további részében a HCN-csatornák specifikus gátlószerének tartott ZD7288 (BoSmith és munkatársai, 1993; Harris és Constanti, 1995) hatását is megvizsgáltuk (9. ábra). Eredményeink szerint 10 μ M ZD7288 jelenlétében a hiperpolarizáció-aktivált áram amplitúdója a kontroll körülmények között tapasztaltak körülbelül 20%-ára csökkent. Elvégeztük a spontán aktivitásra kifejtett hatás vizsgálatát is, aminek során azt tapasztaltuk, hogy a CsCl hatásához hasonlóan, a HCN-csatornákra specifikus ZD7288 jelenlétében a piramis-neuronok spontán aktivitása a kontroll körülmények között tapasztalt érték mintegy 24%-ára csökkent ($n = 5$).



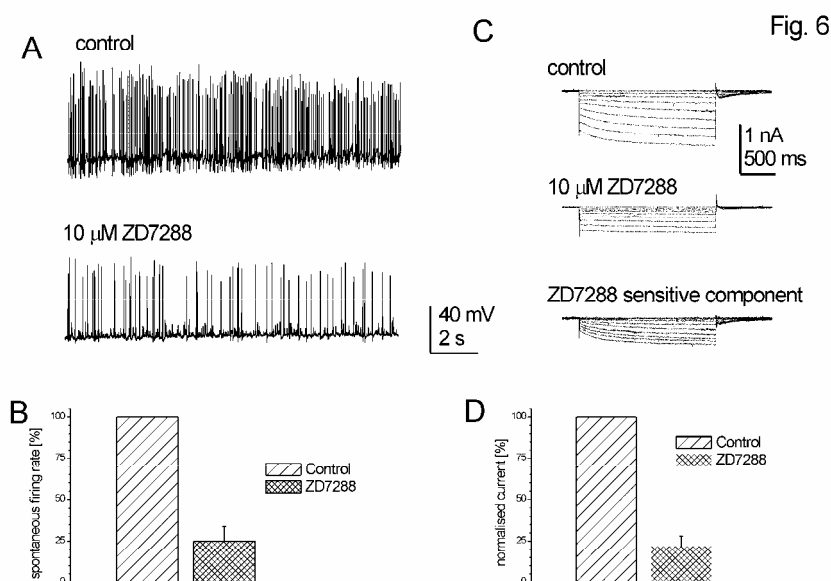
8. ábra

Extracelláris CsCl hatása a piramis-sejt spontán aktivitására.

Ezen kísérletek során áram-clamp technika használatával, ingerlés nélkül regisztráltuk a sejtek spontán aktivitását. (A) Kontroll körülmények között rögzített spontán aktivitás. (B) Ugyanazon sejt 5 mM CsCl alkalmazása alatt tapasztalható aktivitása. (C) A kontroll és CsCl hatása alatt regisztrált aktivitás egymásra vetítése és összehasonlítása rövidebb időskála alkalmazásával. (D) Az eredmények

összefoglalása. A CsCl hatására regisztrált akcióspotenciál-tüzelést sejtenként normáltuk a kontroll tüzelési frekvenciára. A normalizált frekvenciák átlaga került feltüntetésre.

A kísérletek túlnyomó részét (metodikai megfontolásokból) fiatal, 8–13 napos állatokon végeztük, de történtek vizsgálatok a 18 és 23 nap közötti életkori tartományban is. Az idősebb állatokról nyert adatok birtokában megállapíthattuk, hogy a h-áram idősebb korban is jelen van patkány nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejteken.



9. ábra

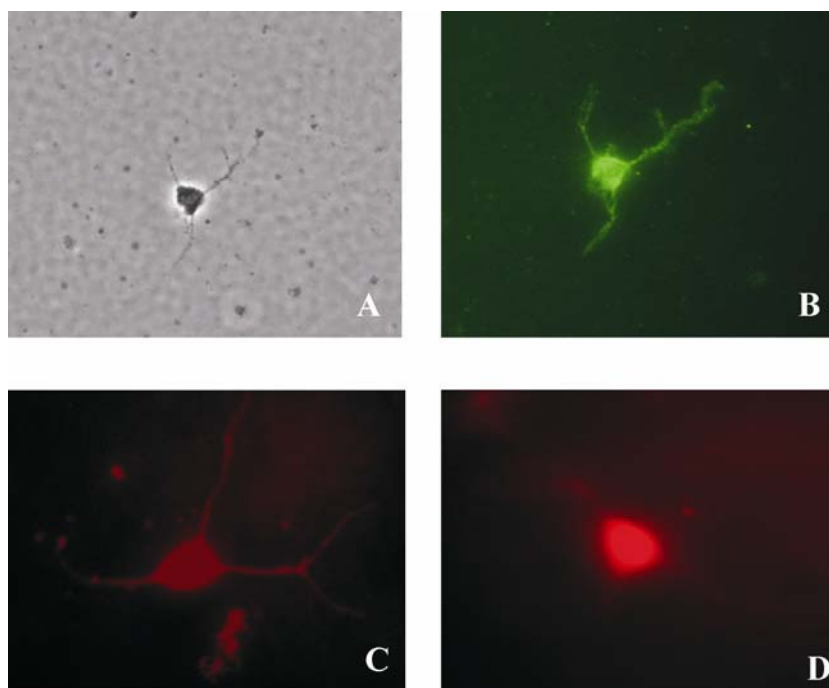
ZD7288 hatása a piramis-sejtek hiperpolarizáció-aktivált áramára és spontán tüzelési frekvenciájára

(A) Egy piramis-sejten regisztrált spontán aktivitás kontroll körülmények között és 10 μ M ZD7288 jelenlétében. (B) A ZD7288 spontán aktivitásra gyakorolt hatása. A ZD7288 jelenlétében tapasztalt tüzelési frekvenciát a kontroll frekvenciára normáltuk, majd az így nyert adatok átlagát tüntettük fel. (C) ZD7288 hiperpolarizáció-aktivált áramra kifejtett hatása. -60 mV-ról alkalmaztunk hiperpolarizáló impulzusokat -140 mV-ig, 2 s hosszúságú, egymást 10 mV-onként követő lépcsőkkel. A kontroll áram rögzítése után 10 μ M ZD7288 jelenlétében is regisztráltuk a kialakuló áramot. A legelső áramgörbe a kontroll és a szer hatása alatt regisztrált görbék egymásból kivonásával kapott ZD7288-szenzitív áram. (D) A ZD7288 hiperpolarizáció-aktivált áramra kifejtett hatásának összefoglalása. Az áramamplitúdót a -140 mV-os feszültséglépcső alatt regisztrált steady-state és azonnali áramok különbségeként definiáltuk. A ZD7288 jelenlétében mért adatokat a kontroll amplitúdóra normáltuk, majd a normalizált adatok átlagát ábrázoltuk.

3.1.3. A piramis-neuronok HCN-csatornáinak alegység-összetétele

A piramis-neuronok h-áramának elektrofiziológiai jellemzésén túlmenően sor került az azt létrehozó HCN-csatornák alegység-összetételének immuncitokémiai vizsgálatára is, izolált neuronokat alkalmazva e célra (10. és 11. ábra). A kísérletek

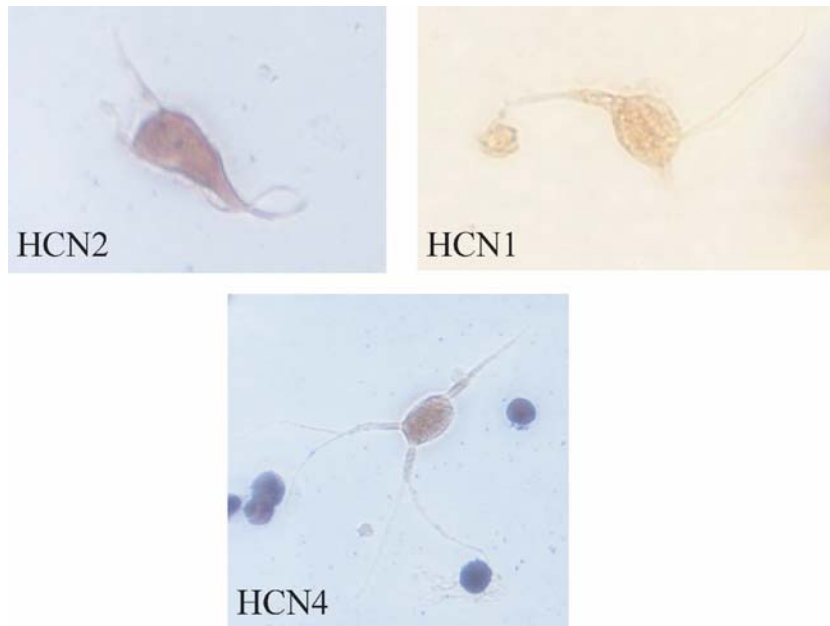
során a HCN1, HCN2 és HCN4 alegységek ellen termeltetett antitesteket alkalmaztunk. Bár a piramis-neuronok jellegzetes morfológiai sajátosságai enzimatisz izolálást követően is jól megfigyelhetők, az egyes HCN-alegységek jelenlétének immunkémiai ellenőrzésén túl számos esetben sor került a neuronspecifikus enolázra (NSE) specifikus immunreakció kivitelezése is. Az általunk tanulmányozott neuronok piramis-sejt mivoltát a jellegzetes morfológiai jegyek alapján állapítottuk meg. A primer antitest alkalmazását követően fluorofórral (FITC és Texas Red) vagy kromogénnel (DAB) konjugált másodlagos antitesteket használtunk. A reakció specifitását egyrészt a HCN-csatornákat nem expresszáló astrocytakultúrán elvégzett kísérletekkel, másrészt a blokkoló peptid jelenlétében kivitelezett kontroll alkalmazásával kapott negatív vagy igen gyenge immunpozitivitással igazoltuk. Az immuncitokémiai vizsgálatok eredményei alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a nucleus cochlearis piramis-sejtjeinek h-áramát kialakító ioncsatornák összeszerelődésében a HCN1, HCN2 és HCN4 alegységek egyaránt szerepet játszanak.



10. ábra

A HCN-alegységek immuncitokémiai vizsgálata

A képeket Nikon Axiovert 600 mikroszkóppal, 200x nagyítással készítettük. (A) Izolált piramis-sejt fáziskontraszt-mikroszkópos képe. (B) HCN2-specifikus immunreakció ugyanezen a neuronon (FITC). (C, D) HCN-1- és HCN-4-specifikus immunfestés (Texas Red), különböző piramis-sejteken.



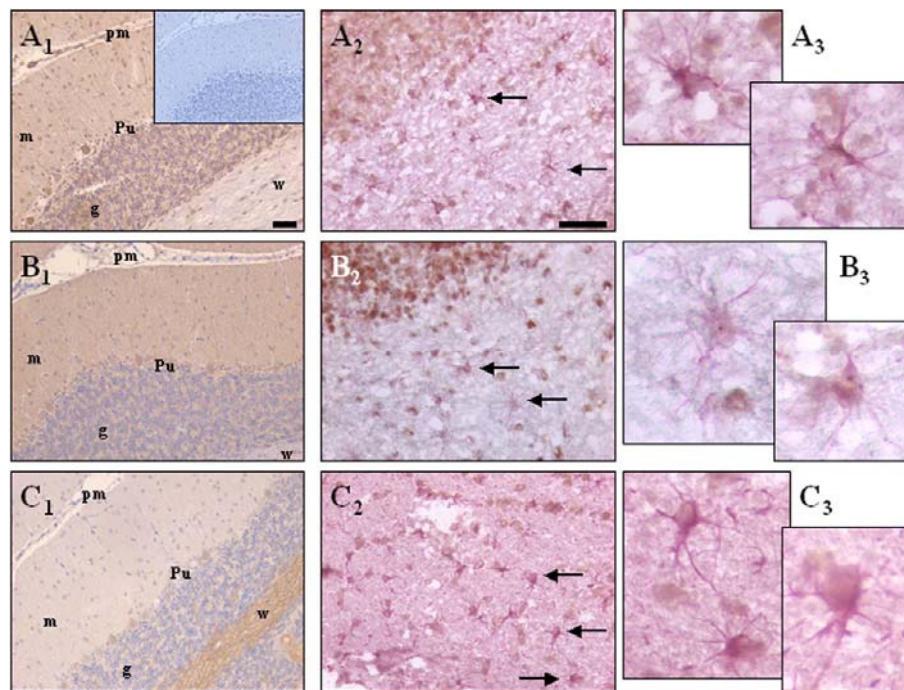
11. ábra

HCN1, HCN2 és HCN4-immunfestés izolált piramis-sejteken

Az immunjelölést DAB alkalmazásával tettük láthatóvá. A pozitív eredményt a sötétbarna szín jelzi.

3.2. TASK-csatornák jelenlétének és megoszlásának vizsgálata ember és patkány központi idegrendszerében

3.2.1. A TASK-immunreaktivitás megoszlása patkány cerebellumban



12. ábra

TASK-alegységek immunfestése patkány cerebellumban

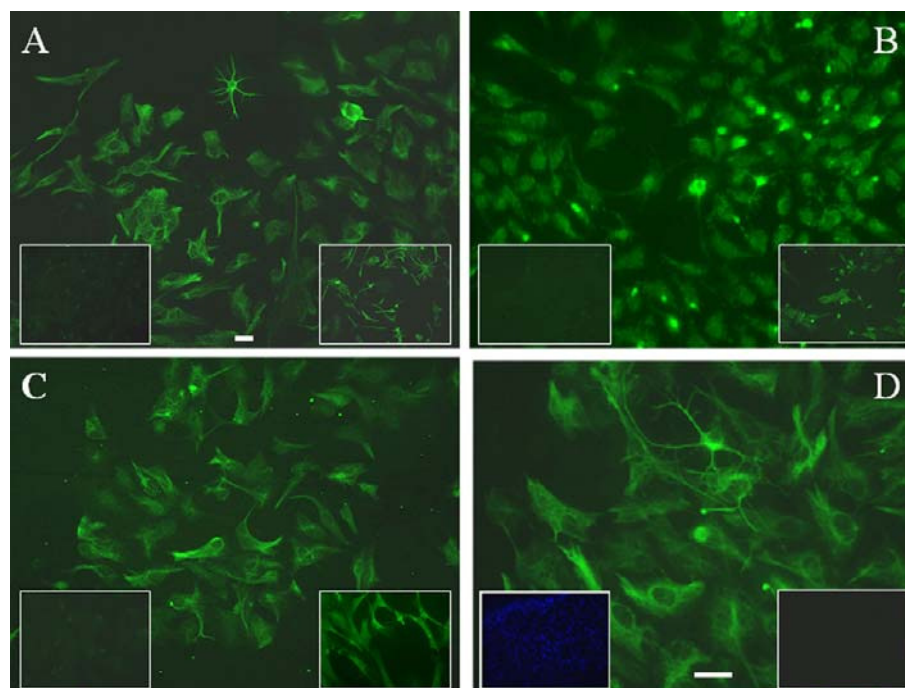
(A₁) TASK-1 immunfestés formalinnal fixált, parafinba ágyazott, hematoxilinnal háttérfestett szövettani metszeten. A pozitív immunreakció barna színű. (A₂) TASK-1- (barna) és GFAP-jelölés (lila) patkány cerebellum fagyasztott metszeten. A nyilak TASK-1-re és GFAP-ra egyaránt pozitív astrocytákat mutatnak. (A₃) Néhány, az előző panelen látható sejt nagyobb nagyítással. A B és C paneleken ugyanilyen eloszlásban a TASK-2 és TASK-3 immunfestés eredményei láthatók. A kalibrációs vonalak 40 µm-nek felelnek meg. Rövidítések: **pm**: pia mater, **g**: szemcsesejt, **m**: molekuláris réteg, **w**: fehérállomány, **Pu**: Purkinje-sejtek. Az A₁ panel jobb felső sarkában a primer antitest nélkül kivitelezett kontroll festés látható.

A TASK-1, TASK-2 és TASK-3 immunpozitivitás vizsgálatát patkány cerebellumból készült, formalin-fixált, parafinba ágyazott szövettani metszeteken (4 µm) végeztük (12. ábra). Az elsődleges antitestek alkalmazását követően kromogénnel konjugált másodlagos antitesteket és hematoxilines háttérfestést alkalmaztunk. A szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy a patkány cerebellumban TASK-1, TASK-2 és TASK-3 csatornaalegységek egyaránt megtalálhatók. Különösen erős TASK-1 pozitivitást mutattak a Purkinje-sejtek és a pia mater, de pozitívnak bizonyult a molekuláris és a szemcsesejtes réteg is. A TASK-2 immunpozitivitás megoszlása jórészt megegyezett a TASK-1-specifikus

reakcióival, ám intenzitása annál gyengébbnek bizonyult. Megállapítottuk továbbá, hogy a patkány cerebellumban a legkifejezettebb TASK-3 pozitivitást a Purkinje-sejtek mutatják, ám a molekuláris és a szemcsesejtes réteg is pozitívnak bizonyult. Erős TASK-3 jelölést figyelhattunk meg a cerebellum fehérállományában is, ugyanakkor nem tapasztaltunk TASK-3-specifikus jelölést a pia mater területén. Megfigyeléseink szerint a Purkinje-sejtek egy része lényegesen gyengébb TASK-3-specifikus reakciót produkált, mint a közelükben elhelyezkedő Purkinje-neuronok, ami felveti annak lehetőségét, hogy ez a sejttípus a TASK-expresszió vonatkozásában nem teljesen homogén.

Fagyasztott metszetekben kettős immunjelölést is alkalmaztunk a cerebelláris astrocyták esetleges TASK-expressziójának tanulmányozása végett. Ezekben a kísérletekben az astrocyták azonosítására GFAP elleni immunreakciót végeztünk, és megállapítottuk, hogy a cerebelláris astrocyták TASK-1, TASK-2 és TASK-3 immunpozitivitást egyaránt mutatnak.

3.2.2. TASK-immunreaktivitás jelenléte szövettenyészetben fenntartott astrocytákon

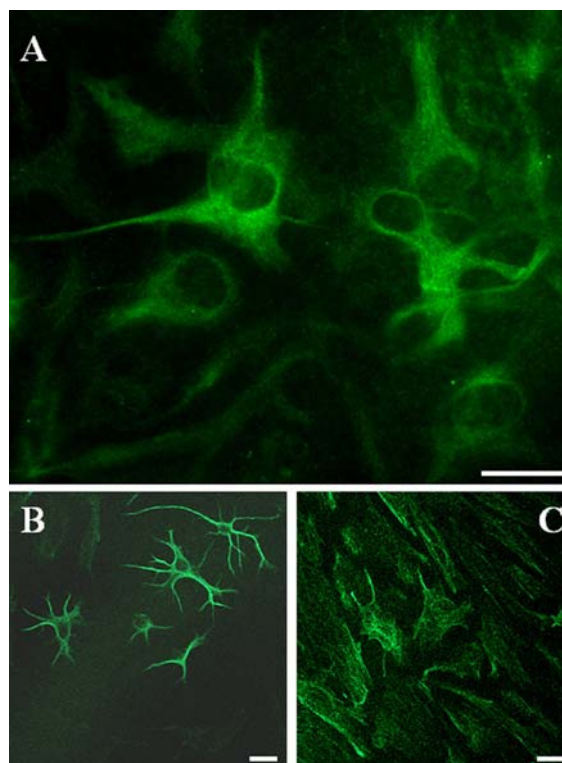


13. ábra

Patkány astrocytatenyészet TASK-specifikus immunjelölése

(A) TASK-1, (B) TASK-2, (C) TASK-3 immunjelölések eredményei cerebelláris astrocytatenyészetben. A bal alsó paneleken a blokkoló peptid jelenlétében kivitelezett immunreakció, a jobb alsó paneleken a nucleus cochlearis astrocytatenyészetben végzett immunfestések eredménye látható. (D) Glia specifikus (anti-GFAP) immunreakció. A bal oldali kis ábrán a DAPI-val végzett sejtmagfestés, míg a jobb oldali a

primer antitest alkalmazása nélküli kontroll látható. A kalibrációs egyenes 20 μm -nek felel meg. Az A, B és C panelek nagyítása megegyező.



14. ábra

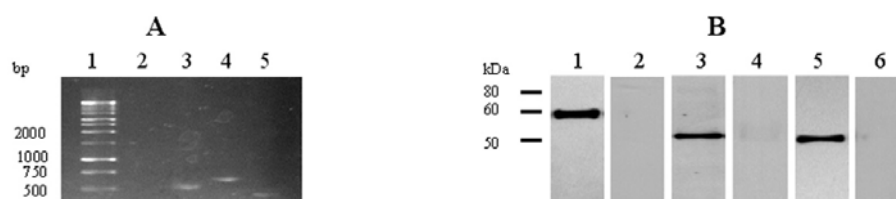
TASK immunfestés patkány hippocampusból származó astrocytatenyészetben

(A) TASK-3 jelölés immunfluoreszcens mikroszkóppal felvett nagy nagyítású képe, ahol a TASK-3 eloszlás intracelluláris eloszlása jól megfigyelhető. (B, C) A TASK-1 és TASK-2 festés konfokális mikroszkópos képe. Mindkét konfokális felvétel a sejt magasságának felénél húzódó síkban készült. A kalibrációs egyenesek 20 μm -esek.

A cerebelláris astrocyták TASK-1-, TASK-2- és TASK-3-specifikus immunpozitivitását primer astrocytatenyészeteken végzett fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatokkal is megerősítettük. A különböző morfológiai jegyek és az egyes sejtek által mutatott GFAP-pozitivitás mértéke alapján lehetővé vált az astrocyták két típusának, a GluR és a GluT sejteknek az elkülönítése (Matthias és munkatársai, 2003). Az erős GFAP-pozitivitást mutató, viszonylag kis sejttellettal és abból kiinduló számos nyúlvánnyal rendelkező sejtek a GluT, míg a gyengébb GFAP-festődést mutató, jellegzetesen téglalakú sejtek a GluR astrocytákra feleltethetők meg. Megfigyeléseink szerint a két astrocytatípus egymástól némileg eltérő TASK-pozitivitást mutatott: míg a GluT astrocyták igen erős TASK-1 festődéssel rendelkeztek, addig a GluR sejtek némileg gyengébb (ám bizonyosan pozitív) TASK-1 expresszióval bírtak. A TASK-2 és TASK-3 festődés mindkét típusú astrocytán hasonló erősségűnek, ám a TASK-1-specifikus reakciónál gyengébbnek mutatkozott. Hippocampusból (14.

ábra) és nucleus cochlearisból nyert astrocytákkal indított tenyészeteken is elvégeztük a TASK-alegységek megoszlásának és jelenlétének vizsgálatát, amik a cerebelláris astrocyták esetében tapasztaltnal teljesen megegyező eredményt adtak.

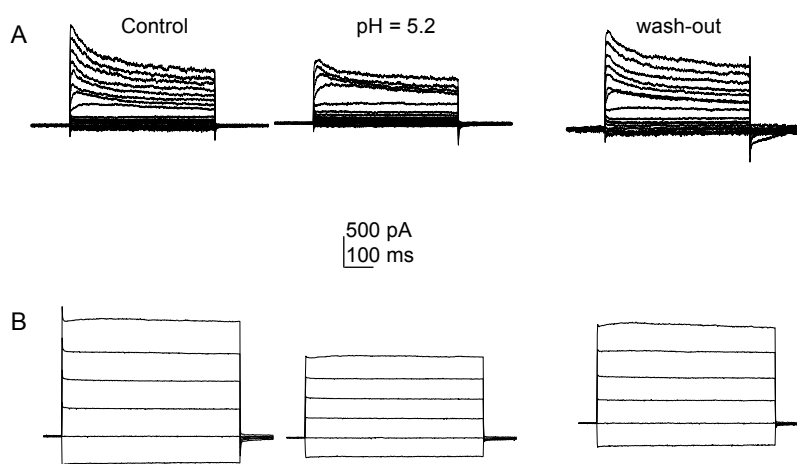
Az astrocytatenyészeteken végzett immuncitokémiai vizsgálatok eredményeit molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával is megerősítettük (15. ábra). Ezen kísérletek során igazoltuk a TASK-1- TASK-2- és TASK-3-specifikus mRNS jelenlétét RT-PCR segítségével, valamint a megfelelő fehérjék expresszióját Western-blot módszerrel.



15. ábra

TASK-1, -2 és -3 expresszió cerebelláris astrocytakultúrában

(A) TASK-1, -2 és -3 alegységek jelenlétének detektálása RT-PCR módszerrel. 1. sáv: nukleotid standard (bp: bázispár); 2. sáv: non-templát kontroll; 3. sáv: TASK-1; 4. sáv: TASK-2, 5. sáv: TASK-3. (B) TASK-1, -2 és -3 proteinek Western-blot analízise. 1., 3., 5. sáv: TASK-1, -2 és -3; 2., 4. és 6. sáv: blokkoló peptid jelenlétében elvégzett kontroll vizsgálatok ugyanezen alegységek esetén. A TASK-1 csatornák molekulamérete 60 kD, míg a TASK-2 és -3 csatornáké 50 kD.



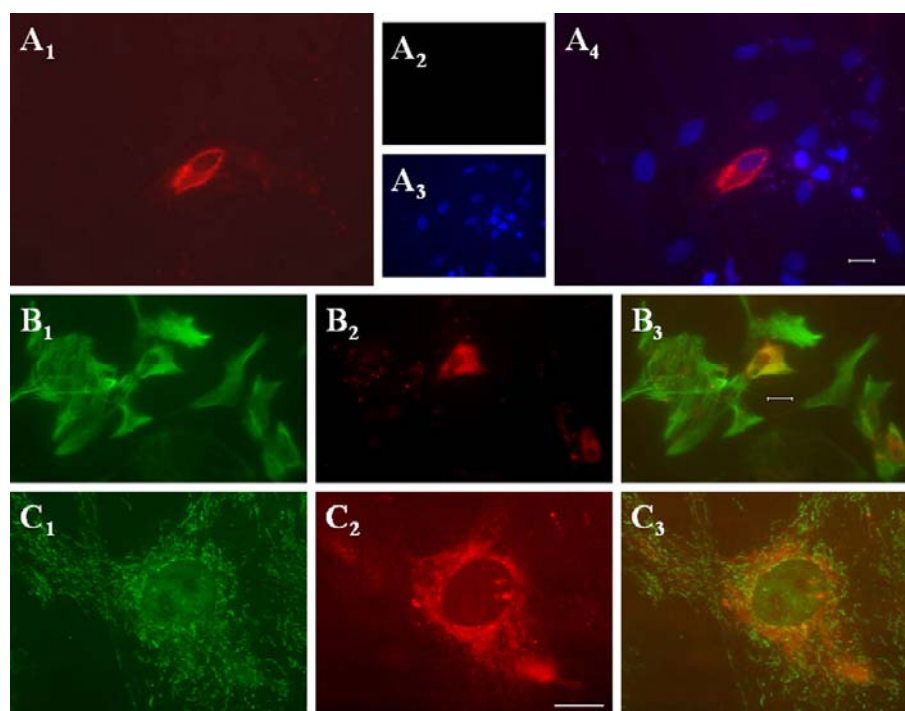
16. ábra

Savszenzitív áram regisztrálása szövettenyészetben fenntartott astrocytáiban

Az impulzusprotokoll leírását lásd az „Eredmények” részben. A kontroll extracelluláris oldatban rögzített áramgörbék felvétele után az extracelluláris oldat pH-ját 5,2-re módosítottuk. A jobb oldalon látható ábrák a kimosás utáni helyzetet demonstrálják. Az áramgörbék jellege alapján az A panelen bemutatott sejtet GluR, míg a B panelen bemutatottat GluT sejtnek azonosítottuk.

Jelen kísérletsorozatban sor került a TASK-csatornák jelenlétének funkcionális bizonyítására is. Kísérleteinket cerebelláris astrocytatenyészetben, a feszültség-clamp technika teljes-sejtes elrendezésben végeztük (16. ábra). -20 mV-os (vagy az esetek egy részében -100 mV-os) tartópotenciálról alkalmaztunk egymást 10 vagy 20 mV-onként követő, 500 ms időtartamú feszültséglépcsőket. A kialakuló áramot először 7,2-es pH-jú kontroll extracelluláris oldatban, majd lényegesen savasabb ($\text{pH} = 5,2$) körülmények között regisztráltuk. Megállapítottuk, hogy az astrocyták által prezentált áram amplitúdója savas ($\text{pH} = 5,2$) extracelluláris oldatban a kontroll áramamplitúdó mintegy 63 ± 4 %-ára csökkent ($n = 12$), ami a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TASK-csatornák funkcionális expresszióját jelzi. Hippocampális és nucleus cochlearisból származó astrocytatenyészetek esetén hasonló megállapítást tehettünk.

3.2.3. A TASK-csatornák expressziója az astrocyták endoplasmaticus reticulumában



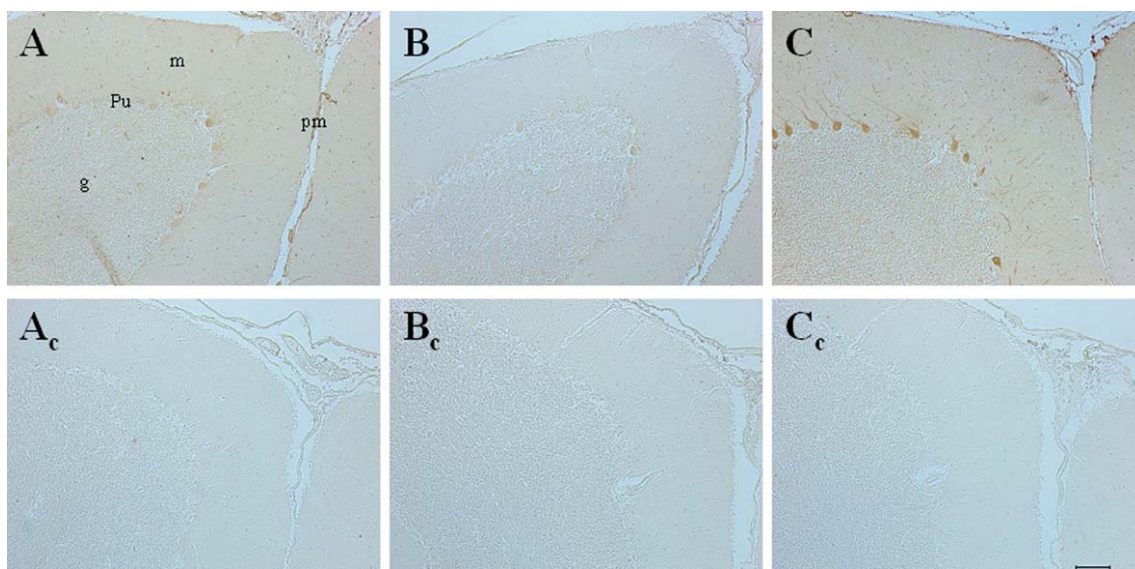
17. ábra

A TASK csatornák és a pDsRed2-ER plazmid fehérjetermékének kolokalizációja hippocampus astrocytakultúrán.

(A₁) Endoplasmaticus reticulumot jelölő plazmiddal sikeresen transzfektált astrocyta. Az ER vörösen fluoreszkáló jelölést kapott. (A₄) Az ER jelölés és a DAPI sejtmagfestés kolokalizációs felvétele. A képen több sejt is megfigyelhető, ahol a transzfekció sikertelennek bizonyult. (A₂) Negatív kontroll. (A₃) Ugyanazon látótér DAPI festése. (B₁) Hippocampális astrocytatenyészet TASK-1 festése. (B₂) A pDsRed2-ER plazmiddal történő transzfekció eredménye ugyanabban a látótérben. (B₃) Az előző két panel kolokalizációs képe. A C panelsor ugyanilyen elrendezésben és nagyobb nagyítással a TASK-2 jelölés eredményét mutatja. Kalibráció: 20 μm .

Kísérleteink során tanulmányoztuk a különböző TASK-csatornaalegységek astrocytákon belüli megoszlását is (14. ábra). A konfokális mikroszkópiás eredmények felvetették, hogy a TASK-csatornák intracellulárisan, esetleg az endoplasmaticus reticulum (ER) membránjához kapcsoltn is megjelenhetnek. Ezen hipotézis ellenőrzése végett az astrocytatenyészeteket a pDsRed2-ER plazmiddal transzfektáltuk, aminek fehérjeterméke a transzfekció után 24 órával vörösen fluoreszkál, és az endoplasmaticus reticulum membránját specifikusan jelöli. Megállapítottuk, hogy a TASK-specifikus immunreakció és az ER-specifikus jelölés jelentős átfedést mutatott (17. ábra). A pixelanalízis eredményei alapján $48 \pm 12\%$ -os kolokalizációt állapítottunk meg a TASK-1 csatornák esetében, míg a kolokalizáció mértéke $25 \pm 7\%$ -nak adódott a TASK-2, és $23 \pm 11\%$ -nak a TASK-3 csatornák vizsgálata során ($n = 5$).

3.2.4. TASK-expresszió a humán cerebellumban



18. ábra

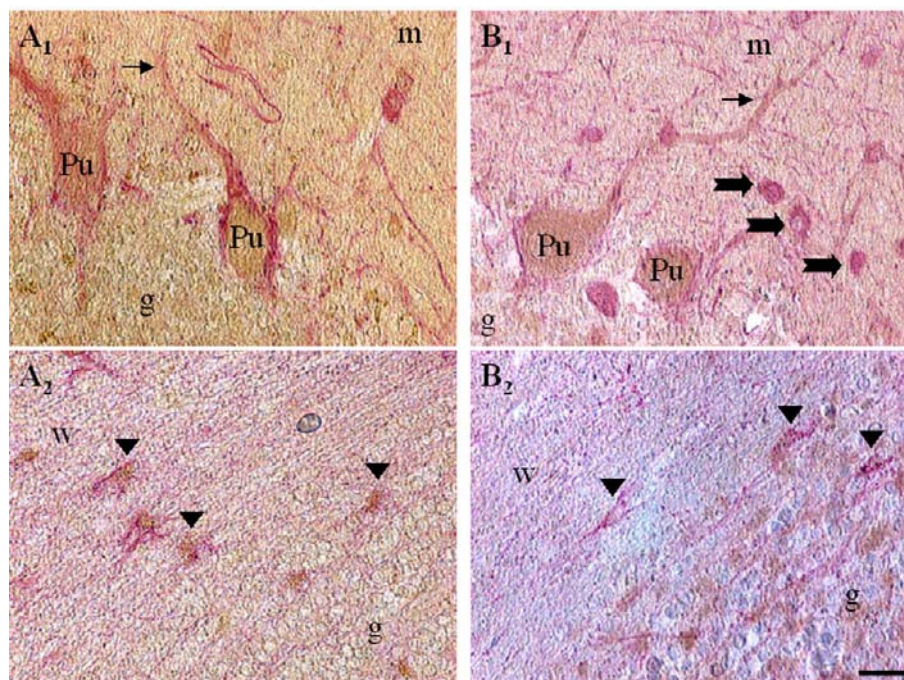
Humán cerebellum TASK-specifikus immunfestése

A $4 \mu\text{m}$ vastagságú szövettani metszeteket formalinfixált, parafinba beágyazott humán cerebellumból készítettük. (A) TASK-1, (B) TASK-2, (C) TASK-3 immunfestés eredménye. Az A_c , B_c és C_c ábrák a primer antitest blokkoló peptiddel történő előinkubálását követően elvégzett kontroll festések eredményeit mutatják. Háttérfestést nem alkalmaztunk. A kalibrációs egyenes $100 \mu\text{m}$ hosszúságú. Rövidítések: **pm**: pia mater, **g**: szemcsesejt, **m**: molekuláris réteg, **Pu**: Purkinje-sejtes réteg.

A patkány cerebellumon végzett kísérletek mellett elvégeztük a TASK-csatornák expressziójának vizsgálatát a humán cerebellumban is (18. ábra). Megállapítottuk, hogy az emberi agy esetében a TASK-3-specifikus reakció a legerősebb, de intenzív jelölést mutatott a TASK-1-specifikus immunjelölés is. Különösen erőteljesnek bizonyult a

Purkinje-sejtek és a pia mater TASK-1 és TASK-3 expressziója. Kísérleteinkben a TASK-2 csatornák expressziója az emberi kisagyban nem bizonyult számottevőnek, kizárólag a Purkinje- és a szemcsesejtek mutattak gyenge TASK-2 pozitivitást.

Vizsgálataink további részében kettős immunfestést is végeztünk a TASK-elleni antitestek és glia specifikus GFAP, valamint a neuronokat jelölő NFP (neurofilament protein) felhasználásával (19. ábra). Ezen kísérletek igazolták a Purkinje-sejtek TASK-1 és TASK-3 pozitivitását. Erős pozitivitást tapasztaltunk a Purkinje-sejtek dendritjei esetében is. Érdekes módon a molekuláris réteg kisebb, NFP-pozitív sejtjei a TASK-1-specifikus reakcióra pozitívnak bizonyultak, ám jelentős részük nem mutatott TASK-3-specifikus festődést. Hasonlóan a patkány cerebellum esetében tapasztalhatókhoz, a GFAP-val és TASK-ellenes antitestekkel végzett kettős jelölés során a soknyúlványú, pókszerű, GFAP-pozitív sejtek TASK-1 és TASK-3 expressziót egyaránt mutattak.



19. ábra

TASK- és neuron- illetve TASK- és glia specifikus festés humán cerebellumban

Formalinnal fixált, 4 μ m vastagságú szövettani metszetek. (A_1 , A_2) TASK-1 specifikus immunreakciók. (B_1 , B_2) TASK-3 specifikus reakciók. A TASK-specifikus reakciók barna színűek. Minden esetben kettős festést végeztünk. Az A_1 és B_1 paneleken a TASK-festés neuronspecifikus jelöléssel (anti-NFP), míg az A_2 és B_2 ábrákon glia specifikus markerrel (anti-GFAP) lett kombinálva. A neuron- és glia specifikus reakciók lilás színűek. Háttérfestést nem alkalmaztunk. A képeket olajimmerziós objektívvel (60x) rögzítettük. A kalibrációs egyenes 20 μ m nagyságú. Rövidítések: g: szemcsesejtes réteg, m: molekuláris sejtes réteg, w: fehérállomány, Pu: Purkinje-sejtes réteg. Az A_1 és B_1 paneleken látható vékony nyilak a Purkinje-sejtek jól látható nyúlványait jelzik. A B_1 panel vastag nyilai azon NFP-pozitív sejteket mutatják, ahol nem látható TASK-pozitivitás. Az A_2 és B_2 paneleken látható háromszögek az egyidejűleg GFAP- és TASK-pozitív astrocytákat jelzik.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1 A nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejtek HCN-áramának jelentősége a jellegzetes aktivitási mintázat kialakításában

A nucleus cochlearis dorsalis piramis-neuronjai hiperpolarizáló stimulusok hatására egy lassan aktiválódó, inaktivációt nem mutató áramféleséget produkáltak. Ezen áramkomponens elektrofiziológiai tulajdonságai, különösképpen az igen pozitívnak adódott megfordulási potenciálja (-32 mV) egyértelműen jelezték, hogy létrehozásáért a hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott csatornák aktivitása felelős. Az általunk megfigyelt megfordulási potenciálhoz hasonló értékekről számoltak be a nucleus corporis trapezoidei fősejtjeiről (Banks és munkatársai, 1993), hippocampális neuronokról (Halliwell és Adams, 1982) és a macska sensorimotoros cortex egyes neuronális struktúráiról (Spain és munkatársai, 1987) elvezetett h-áram eseteiben.

A reverzálpotenciál értéke mellett a piramis-sejtek hiperpolarizáció hatására aktiválódó áramának farmakológiai sajátosságai is annak kevert kation jellegére utaltak; a csatornák hatékonyan gátolhatónak bizonyultak mind 1 mM CsCl alkalmazásával (Bader és munkatársai, 1982; Mayer és Westbrook, 1983; Schlichter és munkatársai, 1991; Banks és munkatársai, 1993), mind a HCN-csatornák specifikus gátlószerének tartott ZD7288 alkalmazásával (BoSmith és munkatársai, 1993; Harris és Constanti, 1995).

Az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a nucleus cochlearis piramis-neuronjai mellett a hallórendszer egyéb struktúrái is rendelkeznek h-árammal. A hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationáram jelenlétét sikerült igazolni a belső szőrsejteken, I. típusú ganglion spirale neuronokon, a nucleus cochlearis bushy-neuronjain, a nucleus corporis trapezoidei fősejtjein és az oliva superiort felépítő idegsejteken (Banks és munkatársai, 1993; Golding és munkatársai, 1999; Bal és Oertel, 2000; Cuttle és munkatársai, 2001; Szabó és munkatársai, 2003).

Régóta ismeretes volt az a tény, hogy a nucleus cochlearis dorsalisba szúrt mikroelektrodákkal még a mag teljes deafferentációja után is lehet akciós potenciálokat rögzíteni, azonban ezen spontán aktivitás forrására vonatkozólag megosztott volt a tudományos közvélemény. Jelen munka arra világított rá, hogy az izolált, túlélő

agyszeletekben elhelyezkedő piramis-neuronok spontán aktivitással rendelkeznek. A kísérleti eredmények alapján azt is megállapíthattuk, hogy a nucleus cochlearis dorsalis korábban leírt spontán aktivitásának hátterében (legalábbis részben) a piramis-neuronok intrinsic aktivitása áll, amit a h-áram jelenléte tart fenn. Említést érdemel, hogy a h-áram jelenléte számos nem-neuronális (pl. szívizom; DiFrancesco, 1993) és neuronális (McCormick és Pape, 1990; Bal és McCormick, 1997) struktúra számára biztosítja a spontán aktivitás képességét.

Elfogadva a piramis-sejtek h-áramának jelenlétét és annak kapcsolatát a sejtek spontán aktivitásával, két érdekes probléma fogalmazható meg:

1. Honnan származhat a piramis-neuronok ZD7288 (és CsCl) rezisztens aktivitása (ami a teljes aktivitás mintegy 25 %-a)?
2. Mi lehet annak a magyarázata, hogy a hallórendszer egyéb struktúrái, amik ugyancsak bizonyítottan rendelkeznek HCN árammal, spontán akciós potenciálokat nem képesek létrehozni (pl. a bushy-neuronok)?

Bár a fenti kérdések pontos és minden kétséget eloszlató megválaszolása még további kísérletek elvégzését teheti szükségessé, valószínűnek látszik, hogy a piramis-neuronokon túlmenően más struktúrák (elsősorban a nucleus cochlearis dorsalis egyes interneuronjai) is rendelkezhetnek a spontán aktivitás képességével. Ezek a neuronok mélyebben helyezkedhetnek el az agyszeletben, így az alkalmazott gátlószerekre kevésbé érzékenyek, ugyanakkor szinaptikus kapcsolataik révén képesek a piramis-sejteket bizonyos mértékben aktiválni. Ez a teória összhangban áll azokkal a véleményekkel, amik szerint a nucleus cochlearis szemcsesejtjei is hozzájárulhatnak a mag spontán aktivitásának fenntartásához.

A második kérdés megválaszolásához a piramis-neuronok felszíni membránjában található, h-áram kialakításáért felelős ioncsatornák molekuláris szerkezetének feltérképezése lehet a kulcs, amit jelen tanulmányban immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával tettünk meg. Ismeretes, hogy a h-áram kialakításáért felelős HCN-csatornák négy lehetséges alegység (HCN1-HCN4) homo- vagy heterotetramerikus összeszerelődésével jöhetnek létre (Santoro és munkatársai, 1997; Santoro és munkatársai, 1998; Ludwig és munkatársai, 1998; Ludwig és munkatársai, 1999; Ishii és munkatársai, 1999; Seifert és munkatársai, 1999). Az egyes alegységek által alkotott homotetramerikus struktúrák meglehetősen eltérő elektrofiziológiai sajátosságokkal rendelkeznek. A nucleus cochlearis piramis-neuronjai által expresszált HCN-csatornák elektrofiziológiai sajátosságai (kiváltképpen a hiperpolarizáció hatására

aktiválódó áram aktivációs kinetikája) arra utaltak, hogy azok bizonyosan nem lehetnek HCN1 homotetramerek. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei ezt a feltételezésünket megerősítették, és rámutattak, hogy a piramis-neuronok sejtfelszíni membránjában valamennyi olyan HCN-alegység megtalálható, ami ellen a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető ellenanyag létezik (HCN1, HCN2 és HCN4). Ezen, a HCN-alegységek jelenlétére vonatkozó megállapításaink tökéletes összhangban állnak azon korábbi megfigyelésekkel, miszerint a HCN1-, HCN2- és HCN4- alegységekre specifikus mRNS kimutatható a nucleus cochlearis területén (Santoro és munkatársai, 2000).

A jelen munka eredményei alapján az is felvethető, hogy a piramis-neuronok HCN2/HCN4 heterotetramer csatornákkal is rendelkezhetnek, hasonlóan a thalamicus kapcsolóneuronok esetében megfigyelt szituációhoz (Bal és McCormick, 1997). Tekintettel arra, hogy a thalamicus kapcsolóneuronok ugyancsak képesek spontán tüzelésre, igen kecsegtető feltételezésnek tűnik, hogy a neuronális struktúrák esetében a HCN2/HCN4 alegység-kombináció lehet felelős az intrinsic aktivitás kialakításáért. Mindezeket figyelembe véve nem kizárható, hogy a hallórendszer többi tagja azért nem rendelkezik a spontán tüzelés képességével, mert ezen struktúrák membránjában nem kerül sor HCN2/HCN4 heteromerek formálódására. A hipotézis igazolása azonban a nem túl távoli jövő feladata kell legyen.

4.2. TASK-csatornák jelenlétének és megoszlásának vizsgálata ember és patkány központi idegrendszerében

A TASK-csatornák cerebelláris jelenlétére vonatkozó kísérletes eredményeink egyik legfontosabb megállapítása, hogy a patkány és az ember cerebellum esetében az egyes TASK-csatorna típusok megoszlása korántsem azonos. Patkány cerebellum TASK-1 expressziójának vizsgálata során igen erős reakciót tapasztaltunk a Purkinje-sejteken és a pia mater területén, valamint a cerebelláris astrocyták esetében. Némileg gyengébb, de egyértelműen pozitív immunfestést mutatott a molekuláris és a szemcsesejtes réteg is. Ezen megállapítások teljes összhangban állnak Kindler és munkatársai (2000) megállapításaival, akik a TASK-1 immunreaktivitás hasonló megoszlásáról számoltak be patkány cerebellumból származó metszeteken. A két munkacsoport által bemutatott eredmények azonossága azért nagyon fontos, mert a TASK-2 immunreaktivitás során az irodalmi adatoktól némileg eltérő eredményről

számoltunk be, a TASK-3 csatornák cerebelláris megoszlását pedig elsőként vizsgáltuk, így fontosnak tartottuk annak demonstrálását, hogy az általunk alkalmazott technikával reprodukálhatók a korábban mások által nyert adatok.

Ugyancsak igazolni tudtuk a cerebelláris astrocyták Millar és munkatársai (2000) által bemutatott azon képességét, hogy a TASK-1 csatornák expresszióját szövettényészeti körülmények között is mutatják. Ezen túlmenően, a jelen disszertáció alapjául szolgáló tudományos munka során azt is bemutattuk, hogy a patkány központi idegrendszerének egyéb struktúráiból (hippocampus, nucleus cochlearis) izolált astrocyták is rendelkeznek TASK-csatornákkal, azaz a gliasejtek TASK-expressziója egy általános, lokalizációtól független sajátosságnak tűnik. Bár Karschin és munkatársai (2001) eredményei megmutatták, hogy a TASK-csatornák egyes típusaira specifikus mRNS megtalálható a nucleus cochlearis területén, a mi munkacsoportunk bizonyította elsőként ezen csatornák fehérje szintű expresszióját a nucleus cochlearis egyik morfológiailag azonosított sejtípusában.

A TASK-2 csatornák patkány cerebellumban tapasztalható megoszlásának vizsgálata során a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal (Gabriel és munkatársai, 2002) jórészt megegyező megállapításra jutottunk. Az egyéb struktúráknál erőteljesebb TASK-2 pozitivitást tapasztalhattunk a Purkinje-neuronok esetében, míg a szemcsesejtes- és a molekuláris rétegben gyengébb reakciót regisztrálhattunk. A jelen munka eredményeit összevetve a Gabriel és munkatársai (2002) által közölt adatokkal, két figyelemre méltó különbséget tapasztalhattunk. Egyrészt a Purkinje-sejtek TASK-2-specifikus immunreaktivitása alkalmanként gyengébbnek adódott a jelen tanulmányban. Úgy véljük, hogy a jelenség oka az általunk alkalmazott háttérfestés volt, ugyanis azokban az esetekben, amikor a hematoxilines háttérfestést nem alkalmaztuk (pl. fagyasztott metszetekben, kettős immunjelölések alkalmával) a Purkinje-sejtek igen intenzív TASK-2 specifikus reakciót mutattak. A másik igen lényegesnek mondható eltérés az eddigi adatokhoz képest, hogy a jelen munkában egyértelmű pozitivitást tapasztalhattunk az astrocyták TASK-2 expressziójának vonatkozásában, szemben a Gabriel és munkatársai (2002) által közölt eredményekkel, ahol a szerzők nem számoltak be TASK-2 pozitivitásról a GFAP-val jelölt sejteken. Tekintettel a két munkacsoport által közölt, gyökeresen eltérő eredményre, nagy gondot fordítottunk az astrocyták TASK-2 expressziójának megerősítésére. Megítélésünk szerint az alábbi pontok bizonyítják, hogy az általunk látott astrocyta TASK-2 pozitívitas valós eredményeket tükröz, és nem egy műtermékről van szó:

1. A FITC- és a DAB-konjugált immunreakciók azonos, pozitív eredményt adtak. Nem tapasztaltunk immunreakciót az elsődleges antitestek hiányában vagy az elsődleges antitestekre specifikus blokkoló peptid jelenlétében, ami alapján kizárható a másodlagos antitestek aspecifikus kötődése.
2. A TASK-2 csatornák különböző epitópjaira specifikus, különböző fajban termeltetett, különböző cégtől származó elsődleges antitestek teljesen egybeeső eredményt adtak.
3. Az immunreakció szövettani metszeteken is és szövettenyészeti körülmények között is demonstrálható volt.
4. Az egyéb molekuláris biológiai vizsgálómódszerek ugyancsak igazolták az astrocytatenyészetben történő TASK-2 expressziót mind mRNS (RT-PCR), mind fehérjék (Western-blot) szintjén.
5. A szövettani metszetekben látott, a TASK-2 immunreaktivitás intenzitásában tapasztalt regionális különbségek ugyancsak az aspecifikus kötődés ellen szólnak.

A fenti pontok alapján meggyőződésünk, hogy az astrocyták általunk tapasztalt TASK-2 specifikus festődése valódi reakciót takar. Megítélésünk szerint a kísérleti eredmények különbözőségének három lehetséges oka lehet. Felmerülhet az alkalmazott állatok életkorának esetleges különbözősége, hiszen korábban már jelezték a TASK-1 csatornák expressziójának életkorfüggését (Brickley és munkatársai, 2001). Ez a lehetőség azonban nem túl valószínű, hiszen a jelen munkában sor került fiatal (néhány napos) és idős (30 napos) patkányok vizsgálatára egyaránt, és minden esetben tapasztaltuk az astrocyták TASK-2 pozitivitását. A második lehetséges ok az egyes munkacsoportok által használt patkánytörzsek különbözősége (Sprague-Dawley és Wistar), de fölöttébb kétségesnek tűnik, hogy a két törzs ennyire különbözne egymástól, így ezt a magyarázatot is elvetettük. A harmadik (és legvalószínűbb) magyarázat a formális fixálás körülményeire vonatkozik.

Régóta ismert, hogy az univerzális fixálószerként alkalmazott formaldehid a szokásosan alkalmazott foszfátpufferben metilén-glikollá alakul, és tulajdonképpen ez az anyag felelős a fehérjék fixációjáért. A metilén-glikol reakcióba lép a fehérjék amino-, imino-, amido-, peptid-, guanidil-, karboxil- és SH-csoportjaival, valamint azok aromás gyűrűivel (Nitschmann és Hadorn, 1944; Fraenkel-Conrat és munkatársai, 1947; Fraenkel-Conrat és Olcott, 1948a,b; Fraenkel-Conrat és Mecham, 1949), és

keresztkötéseket hoz létre, ami a fehérjestruktúra fixációját eredményezi. A folyamat során azonban nem pusztán a fehérjék immobilizációja történik, hanem mélyreható változások következnek be azok másodlagos, harmadlagos és negyedleges struktúrájában is, ami elrejtheti az elsődleges ellenanyagok támadáspontjául szolgáló epitópokat. Mivel a fenti folyamat nemritkán okozza gyenge vagy ál-negatív immunreakciók kialakulását, a formalinos fixáció után általában javasolt valamilyen antigénfeltárás alkalmazása. Az antigénfeltárásra szolgáló technikák a pH módosításával (akár csökkentett, akár megnövelt), hőhatással vagy valamilyen proteolitikus enzim alkalmazásával próbálják meg az epitópot „kicsomagolni” és azt az elsődleges ellenanyag számára „láthatóvá” tenni. Mivel a jelen munkában is sor került formalinban fixált metszetek tanulmányozására, a kísérletek kezdetén nagy gondot fordítottunk az optimális antigénfeltárási technika megtalálására, amint azt Montero (2003) is javasolja; a kísérletek további részében azután azokat rendszeresen alkalmaztuk. Mivel Gabriel és munkatársai (2002) nem tesznek említést bármiféle antigénfeltárás alkalmazására, így valószínűnek tartjuk, hogy ennek hiánya okozhatta az astrocyták általuk megfigyelt TASK-2 negativitását.

Különös módon Karschin és munkatársai (2001) nem tapasztaltak TASK-1- és TASK-3-specifikus in situ hibridizációt sem a cerebelláris Purkinje-sejtek, sem annak molekuláris rétege esetében. Tekintettel a Kindler és munkatársai (2000; TASK-1), valamint a mi munkacsoportunk (TASK-1 és TASK-3) által tapasztalt, fehérje szintű vizsgálatok erős pozitivitására, igazolódni látszik az a tétel, hogy egy adott fehérjére specifikus mRNS jelenléte vagy hiánya nem szükségképpen tükrözi a fehérjeproduktum jelenlétét vagy hiányát.

Az astrocyták TASK-expresszióját részletesebben is tanulmányoztuk a patkány agyának különböző területeiből (cerebellum, hippocampus, nucleus cochlearis) izolált, szövettenyésztési körülmények között fenntartott sejteket alkalmazva. Megállapítottuk, hogy bár a patkány agyából izolált astrocyták mindhárom vizsgált TASK-csatornát expresszálták (a TASK-1 típust a legerőteljesebben, a TASK-2 és TASK-3 típusokat gyengébben) az astrocyták két fő változata, az ún. GluR- és GluT-típusú astrocyták (Matthias és munkatársai, 2003) jelentősen különböztek egymástól a TASK-expresszió tekintetében. Míg a GluT sejtek igen intenzív TASK-1 reakciót adtak, a GluR sejtek TASK-1-specifikus immunfestődése gyengébbnek mutatkozott.

Az astrocyták két típusán végzett elektrofiziológiai méréseinkkel a TASK-csatornák aktivitása is igazolható volt. Bár a TASK-csatornák specifikus

jelentőségének meghatározása a gliasejtek esetében még számos további kísérletet igényel, az mindenképpen feltételezhető, hogy a TASK-csatornák és a rajtuk keresztül történő K^+ -mozgás igen fontos szereppel bírhat a neuronok közelében bekövetkező extracelluláris K^+ -koncentráció-emelkedések kompenzálásában.

A jelen munka arra is rámutatott, hogy az astrocyták TASK-specifikus immunjelölése egy igen finom, hálózatszerű mintázat kialakulásához vezetett, amiről konfokális mikroszkópia alkalmazásával bebizonyosodott, hogy intracelluláris festődést takar. További vizsgálataink azt is igazolták, hogy a TASK-csatornák egy része az endoplasmaticus reticulum membránjában található. Említésre érdemes, hogy TASK-1-specifikus DNS-sel transzfektált COS-sejtek esetében már beszámoltak arról, hogy ott a TASK-1 csatornák az endoplasmaticus reticulum és a sejtfelszíni membrán között oda-vissza vándorolnak (Girard és munkatársai, 2002). A jelen tézisekben végzett munka eredményei arra utalnak, hogy a TASK-csatornák ezen mozgása (ami a sejtfelszíni membránban található TASK-denzitás gyors és hatékony módosítását jelentheti) fiziológiás körülmények között (azaz nem transzfektált sejteken) is jelen lehet. További vizsgálatokat igényel viszont annak tisztázása, hogy az endoplasmaticus reticulum membránjában elhelyezkedő TASK-csatornák csupán egy gyorsan mobilizálható tartalékként funkcionálnak, aminek mobilizálása révén a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő csatornák száma igen gyorsan növelhető, vagy a TASK-csatornák speciális szerepet játszanak az endoplasmaticus reticulum membránja által körülhatárolt tér és a cytoplasma többi része közötti K^+ -mozgásban. Utóbbi felvetés esetleg megmagyarázhatja a hosszú idő óta sejtett, ám mindeztáig kísérletesen nem igazolt tényt, hogy az endoplasmaticus reticulum belseje és a cytoplasma között jelentős potenciálkülönbség nem alakulhat ki. A TASK-csatornák intracelluláris membránokban tapasztalható jelenléte ugyancsak magyarázatot adhat a különböző kompartmentekből történő Ca^{2+} kiáramlását kompenzáló ionmozgások kialakulására.

Különösen jelentősnek tartjuk a jelen munka azon megállapításait, amik az emberi cerebellumban történő TASK expresszióra vonatkoznak. Igen fontosnak véljük, hogy az általunk talált TASK-1, TASK-2 és TASK-3 expressziós mintázat tökéletes összhangban áll a Medhurst és munkatársai (2001) által közölt mRNS megoszlási mintázattal, nevezetesen a TASK-3 expresszió bizonyult a legjelentősebbnek, a TASK-1 immunpozitivitás jelentős, ám kevésbé erőteljes volt, mint a TASK-3; ugyanakkor TASK-2 specifikus immunfestés alig volt tapasztalható. Bár a protein szintű és az

mRNS szintű expresszió nem mindig van összhangban, a humán cerebellumban tapasztalt egyezés föltétlenül említésre érdemes.

Az emberi cerebellumban tapasztalt TASK megoszlás számos olyan kérdést vet föl, aminek tanulmányozása a jövő feladata kell legyen. Mi lehet annak az oka, hogy olyan jelentős különbség tapasztalható a patkány és a humán cerebellum TASK-3 megoszlásában? Ismeretes, hogy a két csatorna közeli rokonságban áll egymással, mintegy 60%-os szekvenciahomológiát mutatva (Kim és munkatársai, 1999; Rajan és munkatársai, 2000; Czirják és Enyedi, 2002; Talley és munkatársai, 2002), hasonló funkcionális jellegzetességekkel. Milyen olyan (eddig vélhetően még nem felismert) funkciója lehet a TASK-3 csatornának, ami miatt az emberi cerebellumban jóval intenzívebben expresszálódik, mint a patkányéban? Miért nincs szükség a TASK-2 csatornára az emberi cerebellumban, miközben a patkányéban számottevő mennyiségben expresszálódik? Az emberi cerebellumban (különösen a Purkinje sejteken) tapasztalható intenzív TASK-1 és TASK-3 festődés annak is felveti a lehetőségét, hogy ezen struktúrákban esetleg TASK-1/TASK-3 heterodimerek kialakulására kerülhet sor (Czirják és Enyedi, 2002; Kang és munkatársai, 2004).

A két fajban tapasztalt megoszlásbeli differencia arra is ráirányítja a figyelmet, hogy nagy óvatossággal kell kezelni a TASK-csatornák expressziós mintázatára vonatkozó, ám különféle kísérleti állatokból származó adatokat, mivel azok nem feltétlenül tükrözik az emberi központi idegrendszerben (vagy általánosságban az emberi szöveteken) tapasztalható helyzetet.

A TÉZISEKBEN ELŐFORDULÓ HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

- Accili E.A., Proenza C., Baruscotti M., DiFrancesco D. (2002) From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol Sci.* 17: 32-37.
- Adrian R.H. (1969) Rectification in muscle membrane. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 19: 340-369.
- Ashmole I., Goodwin P.A., Stanfield P.R. (2001) TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflügers Arch.* 442: 828-833.
- Attwell D., Wilson M. (1980) Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J. Physiol.* 309: 287-315.
- 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.
- Bal R., Oertel D. (2000) Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.* 84: 806-817.
- Bal T., McCormick D.A. (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_h. *J Neurophysiol.* 77: 3145-3156.
- Bang H., Kim Y., Kim D. (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* 275: 17412-17419.
- Banks M.I., Pearce R.A., Smith P.H. (1993) Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J Neurophysiol.* 70: 1420-1432.
- Bell C.C. (2002) Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behav. Evol.* 59: 312-326.
- BoSmith R.E., Briggs I., Sturgess N.C. (1993) Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_f) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* 110: 343-349.
- Brawer J.R., Morest D.K., Kane E.C. (1974) The neuronal architecture of the cochlear nucleus of cat. *J. Comp. Neurol.* 155: 251-300.
- Brickley S.G., Revilla V., Cull-Candy S.G., Wisden W., Farrant M. (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409: 88-92.
- Brown H.A., DiFrancesco D., Noble S. (1979) Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.* 81: 175-204.
- Brown H.A., DiFrancesco D. (1980) Voltage clamp investigations of currents underlying pacemaker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 308: 331-351.

- Buckler K.J., Williams B.A., Honore E. (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* 525: 135-142.
- Catterall W.A. (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *TINS* 16: 500-506.
- Cant N.B., Gaston K.C. (1982) Pathways connecting the right and left cochlear nuclei. *J. Comp. Neurol.* 212: 313-326.
- Cant N.B., Benson C.G. (2003) Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Res. Bulletin* 60: 457-474.
- Charpak S., Dubois-Dauphin M., Raggenbass M., Dreifuss J.J. (1989) Vasopressin excites neurones located in the dorsal cochlear nucleus of the guinea-pig brainstem. *Brain Res.* 483: 164-169.
- 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.
- Chen K., Waller H.J., Godfrey D.A. (1995) Muscarinic receptor subtypes in rat dorsal cochlear nucleus. *Hear. Res.* 89: 137-145.
- Chen K., Waller H.J., Godfrey D.A. (1998) Effects of endogenous acetylcholine on spontaneous activity in rat dorsal cochlear nucleus slices. *Brain Res.* 783: 219-226.
- Coetzee W.A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M.S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 233-285.
- Cuttle M.F., Rusznák Z., Wong A.Y., Owens S., Forsythe I.D. (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J. Physiol.* 534: 733-744.
- Czirják G., Fischer T., Spät A., Lesage F., Enyedi P. (2000) TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 14: 863-874.
- Czirják G., Enyedi P. (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J. Biol. Chem.* 277: 5426-5432.
- Czirják G., Enyedi P. (2003a) Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits. *Mol. Pharmacol.* 63: 646-652.
- Czirják G., Enyedi P. (2003b) TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 16: 621-629.
- Decher N., Maier M., Dittrich W., Gassenhuber J., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. (2001) Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett.* 492: 84-89.
- Devor A. (2000) Is the cerebellum like cerebellar-like structures? *Brain Res. Rev.* 34: 149-156.

- DiFrancesco D. (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol.* 55: 455-472.
- Doupnik C.A., Davidson N., Lester H.A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Op. Neurobiol.* 5: 268-277.
- Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. (1997) TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464-5471.
- Fink M., Duprat F., Lesage F., Reyes R., Romey G., Heurteaux C., Lazdunski M. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* 15: 6854-6862.
- Fink M., Lesage F., Duprat F., Heurteaux C., Reyes R., Fosset M., Lazdunski M. (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 17: 3297-3308.
- Fraenkel-Conrat H., Brandon B.A., Olcott H.S. (1947) The reaction of formaldehyde with proteins. IV. Participation of indole groups. *Gramicidine. J. Biol. Chem.* 168: 99-118.
- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. (1948a) The reaction of formaldehyde with proteins. V. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J. Am. Chem. Soc.* 70: 2673-2684.
- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. (1948b) The reaction of formaldehyde with proteins. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole and indole groups. *J. Biol. Chem.* 174: 827-843.
- Fraenkel-Conrat H., Mecham D.K. (1949) The reaction of formaldehyde with proteins. VII. Demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J. Biol. Chem.* 177: 477-486.
- Gabriel A., Abdallah M., Yost C.S., Winegar B.D., Kindler C.H. (2002) Localization of the tandem pore domain K⁺ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 98: 153-163.
- Girard C., Duprat F., Terrenoire C., Tinel N., Fosset M., Romey G., Lazdunski M., Lesage F. (2001) Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 249-256.
- Girard C., Tinel N., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M., Borsotto M. (2002) p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1. *EMBO J.* 21: 4439-4448.
- Golding N.L., Ferragamo M.J., Oertel D. (1999) Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 19: 2897-2905.
- Hagiwara S., Jaffe L.A. (1979) Electrical properties of egg cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8: 385-416.
- Halliwel J.V. and Adams P.R. (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain. Res.* 250: 71-92.

- Hamill O.O., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
- Harasztosi Cs., Forsythe I.D., Szűcs G., Stanfield P.R., Rusznák Z. (1999) Possible modulatory role of voltage-activated Ca^{2+} currents determining the membrane properties of isolated pyramidal neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *Brain Res.* 839: 109-119.
- Harris N.C., Constanti A. (1995) Mechanism of block by ZD7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea-pig substantia nigra neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 74: 2366-2378.
- Hille B., Schwarz W. (1978) Potassium channels as multi-ion single file pores. *J. Gen. Physiol.* 72: 409-442.
- Hirsch J.A., Oertel D. (1988) Intrinsic properties of neurones in the dorsal cochlear nucleus of mice, in vitro. *J. Physiol.* 396: 535-548.
- Ishii T.M., Takano M., Xie L.H., Noma A., Ohmori H. (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274: 12835-12839.
- Juiz J.M., Albin R.L., Helfert R.H., Altschuler R.A. (1994) Distribution of GABA_A and GABA_B binding sites in the cochlear nucleus of the guinea pig. *Brain Res.* 639: 193-201.
- Kang D., Han J., Talley E.M., Bayliss D.A., Kim D. (2004) 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., Preisig-Muller R., Rajan S., Derst C., Grzeschik K.H., Daut J., Karschin A. (2001) Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K^+ channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 18: 632-648.
- Katz B. (1949) Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 2: 285-299.
- Kendall J.M., Badminton M.N., Dormer R.L., Campbell A.K. (1994) Changes in free calcium in the endoplasmic reticulum of living cells detected using targeted aequorin. *Anal. Biochem.* 221: 173-181.
- Ketchum K.A., Joiner W.J., Sellers A.J., Kaczmarek L.K., Goldstein S.A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* 376: 690-695.
- Kim 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.
- Kindler C.H., Pietruck C., Yost C.S., Sampson E.R., Gray A.T. (2000) Localization of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1 in the rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 80: 99-108.
- Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N., Jan L.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-133.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lauritzen I., Zanzouri M., Honoré E., Duprat F., Ehrengruber M.U., Lazdunski M., Patel A.J. (2003) K⁺-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 32068-32076.
- Lázár J., Szabó T., Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2003) Distinct features of recombinant vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2228-2240.
- 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. *EMBO 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.
- Lesage F., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M. (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and G_s, G_i, and G_q protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 275: 28398-23405.
- Lorente de No R. (1981) *The primary acoustic nuclei*, Raven Press, New York.
- Ludwig A., Zong X., Jeglitsch M., Hofmann F., Biel M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591.
- Ludwig A., Zong X., Stieber J., Hullin R., Hofmann F., Biel M. (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO Journal* 18: 2323-2329.
- Ludwig A., Budde T., Stieber J., Moosmang S., Wahl C., Holthoff K., Langebartels A., Wotjak C., Munsch T., Zong X., Feil S., Feil R., Lancel M., Chien K.R., Konnerth A., Pape H.C., Biel M., Hofmann F. (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* 22: 216-224.
- Lüthi A., McCormick D.A. (1998) H-current: Properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21: 9-12.

- 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.
- Martin M.R., Rickets C. (1981) Histogenesis of the cochlear nucleus of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 197: 169-184.
- Matthias K., Kirchhoff F., Seifert G., Huttmann K., Matyash M., Kettenmann H., Steinhauser C.J. (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *Neurosci.* 23: 1750-1758.
- 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.
- McCormick D.A., Pape H.C. (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol.* 431: 291-318.
- Medhurst A.D., Rennie G., Chapman C.G., Meadows H., Duckworth M.D., Kelsell R.E., Glozier I.I., Pangalos M.N. (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 86: 101-114.
- 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.
- Millar J.A., Barratt L., Southan A.P., Page K.M., Fyffe R.E., Robertson B., Mathie A. (2000) A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 3614-3618.
- Montero C. (2003) The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 1-4.
- Moore J.K. (1986) Cochlear nuclei: Relationship to the auditory nerve. In: *Neurobiology of hearing: The cochlea*, eds Altschuler R. A., Hoffman D. W., Bobbin R. P., Raven Press, New York.
- Moosmang S., Biel M., Hofmann F., Ludwig A. (1999) Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* 380: 975-980.
- Mu D., Chen L., Zhang X., See L-H., Koch C.M., Yen C., Tong J.J., Spiegel L., Nguyen K.C.Q., Servoss A., Peng Y., Pei L., Marks J.R., Lowe S., Hoey T., Jan L.Y., McCombie W.R., Wigler M.H., Powers S. (2003) Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell.* 3: 297-302.
- Mugnaini E., Osen K.K., Dahl A.L., Friedrich V.L.Jr., Korte G.F. (1980a) Fine structure of granule cells and related interneurons (termed Golgi cells) in the cochlear nuclear complex of cat, rat, and mouse. *J. Neurocytol.* 9: 537-570.
- Mugnaini E., Warr W.B., Osen K.K. (1980b) Distribution and light microscopic features of granule cells in the cochlear nuclei of cat, rat, and mouse. *J. Comp. Neu.* 191: 581-606.

- Nitschmann von H.S., Hadorn H. (1944) Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd. V. Über des Verhalten der e-Aminogruppen des Lysins und der Peptidogruppen. *Helv. Chim. Acta.* 27: 299-312.
- Oertel D., Wu S.H. (1989) Morphology and physiology of cell in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.* 283: 228-247.
- 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.
- Pape H.C. (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 299-327.
- Patel A.J., Honore E., Maingret F., Lesage F., Fink M., Duprat F., Lazdunski M. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* 17: 4283-4290.
- Patel A.J., Honore E., Lesage F., Fink M., Romey G., Lazdunski M. (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* 2: 422-426.
- Patel A.J., Maingret F., Magnone V., Fosset M., Lazdunski M., Honore E. (2000) TWIK-2, an inactivating 2P domain K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 275: 28722-28730.
- Pei L., Wiser 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.* 163:129-58.
- Pfeiffer R.R. (1966) Classification of response patterns of spike discharges for units in the cochlear nucleus: tone-burst stimulation. *Exp. Brain Res.* 1: 220-235.
- Proenza C., Tran N., Angoli D., Zahynacz K., Balcar P., Accili E.A. (2002) Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 277: 29634-29642.
- Rajan S., Wischmeyer E., Xin Liu G., Preisig-Muller R., Daut J., Karschin A., Derst C. (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidin as pH sensor. *J. Biol. Chem.* 275: 1650-16657.
- Rajan S., Wischmeyer E., Karschin C., Preisig-Muller R., Grzeschik K.H., Daut J., Karschin A., Derst C. (2001) THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 276: 7302-7311.
- 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 labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 213: 426-447.

- Roderick H.L., Campbell A.K., Llewellyn D.H. (1997) Nuclear localisation of calreticulin in vivo is enhanced by its interaction with glucocorticoid receptors. *FEBS Lett.* 405: 181-185.
- Rudy B. (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience.* 25: 729-749.
- 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 Ca^{2+} homeostasis in neurones of the cochlear nucleus. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 7: 68-75.
- 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.
- Sano Y., Inamura K., Miyake A., Mochizuki S., Kitada C., Yokoi H., Nozawa K., Okada H., Matsushime H., Furuichi K. (2003) A novel two-pore domain K^+ channel, TREK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem.* 278: 27406-27412.
- Santoro B., Grant S.G., Bartsch D., Kandel E.R. (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 14815-14820.
- Santoro B., Liu D.T., Yao H., Bartsch D., Kandel E.R., Siegelbaum S.A. (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-729.
- Santoro B., Chen S., Luthi A., Pavlidis P., Shumyatsky G.P., Tibbs G.R. (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci.* 20: 5264-5275.
- Schlichter R., Bader C.R., Bernheim L. (1991) Development of anomalous rectification (I_h) and of a tetrodotoxin-resistant sodium current in embryonic quail neurones. *J. Physiol.* 442: 127-145.
- Seifert R., Scholten A., Gauss R., Mincheva A., Lichter P., Kaupp U.B. (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 9391-9396.
- Spain W.J., Schwindt P.C., Crill W.E. (1987) Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 57: 1555-1576.
- Stanfield P.R. (1988) Intracellular Mg^{2+} may act as a cofactor in ion channel function. *TINS* 11: 475-477.
- Szabó Zs., Harasztosi Cs., Sziklai I., Szűcs G., Rusznák Z. (2002) Ionic currents determining the membrane characteristics of type I spiral ganglion neurons 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: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J. Biol. Chem.* 277: 17733-17742.

- Waller H.J., Godfrey D.A. (1994) Functional characteristics of spontaneously active neurons in rat dorsal cochlear nucleus in vitro. *J Neurophysiol.* 71: 467-478.
- Watkins C.S., Mathie A. (1996) A non-inactivating K^+ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 491: 401-412.
- Webster D.B., Trune D.R. (1982) Cochlear nuclear complex of mice. *Am. J. Anat.* 163: 103-130.
- Yanagihara K., Irisawa H. (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* 385: 11-19.
- Zagotta W.N., Olivier N.B., Black K.D., Young E.C., Olson R., Gouaux E. (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425: 200-205.
- Zhang S., Oertel D. (1993) Cartwheel and superficial stellate cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *J. Neurophys.* 69: 1384-1397.
- Zhang S., Oertel D. (1994) Neuronal circuits associated with the output of the dorsal cochlear nucleus through fusiform cells. *J. Neurophysiol.* 71: 914-930.

ÖSSZEFOGLALÁS

A nucleus cochlearis nem pusztán a nervus acusticus akcióspotenciál-mintázatának egyszerű továbbítója, hanem a hallási információ feldolgozásának első agytörzsi állomása is. A nucleus cochlearist felépítő neuronok működésében jelentős szerepet játszanak a hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationáram háttérében álló HCN csatornák, valamint a „szivárgó” K^+ -áramért felelős, a sejtek bemenő ellenállását és ingerlékenységét meghatározó TASK csatornák.

Jelen munkában bizonyítottuk, hogy a nucleus cochlearis piramis-neuronok spontán aktivitással rendelkeznek. A piramis-sejtek (hasonlóan a hallópálya más neuronjaihoz) sejtfelszíni membránjukban expresszálják a h-áram kialakulásáért felelős HCN-csatornákat. Az áram gátlása a spontán aktivitás frekvenciáját jelentős mértékben csökkentette, ami arra utal, hogy a HCN-csatornákon folyó áram nagymértékben járul hozzá a piramis-sejtek spontán aktivitásának kialakulásához. A piramis-neuronok HCN-csatornáinak immuncitokémiai vizsgálata megmutatta, hogy azok felépítésében a HCN1, HCN2 és HCN4 alegységek egyaránt szerepet játszanak.

Munkánk további részében a TASK-csatornák előfordulását vizsgáltuk különböző központi idegrendszeri preparátumokon. Patkány cerebellumban a TASK-1, -2 és -3 csatornák expresszálódtak a Purkinje-sejteken, a molekuláris és szemcsesejtes rétegben, valamint az astrocytáknak. A TASK-1, -2 és -3 csatornák expressziója cerebelláris, hippocampális és nucleus cochlearisból készített astrocytatenyészeteken is kimutatható volt. A TASK alegységek funkcióképes csatornává történő összeszerelődését elektrofiziológiai mérésekkel is alátámasztottuk. A GluT és GluR astrocyták TASK-1 festődésében némi különbséget tapasztaltunk: az előbbi erősebb, utóbbi gyengébb expressziót mutatott. Bizonyítottuk, hogy a TASK-pozitivitás jelentős része helyezkedik el az astrocyták endoplasmaticus reticulumának membránjában. A humán cerebellum immunhisztokémiai vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy itt a TASK-3 festődés a legintenzívebb, bár a TASK-1 is jelen van. A humán cerebellum TASK-2 expressziója igen gyengének bizonyult. Eredményeink egyebek között rámutattak, hogy a TASK-csatornák megoszlása hasonló, de nem azonos a patkány és emberi cerebellumban, így a rágsálókról nyert immunhisztokémiai adatok csak kellő körültekintéssel alkalmazhatók a humán szövetekre.

SUMMARY

The cochlear nucleus is not a simple relay station responsible for passing the incoming activity pattern of the auditory nerve, but it is the first structure performing an analysis of the auditory stimuli. It has been noticed earlier that the hyperpolarization-activated non-specific cationic current as well as the current produced by the activity of the TASK channels have important roles in maintaining the function of the neurones, especially as the activity of the TASK channels is responsible for determining the input impedance and hence excitability of the neurones.

In the present work we provide evidence that the pyramidal cells of the dorsal cochlear nucleus have spontaneous activity. Similarly to other structures of the auditory pathways, pyramidal cells express HCN channels in their surface membrane. The activity of the HCN channels is responsible for the genesis of the h-current, whose inhibition markedly reduced the frequency of spontaneous activity of the pyramidal cells, indicating that it had important contribution to the genesis of the intrinsic firing. The immunocytochemical investigation of the pyramidal HCN channels suggested that HCN1, -2 and -4 subunits all contribute to their assembly.

In the subsequent part of our work the expression pattern of the TASK channels has been studied in the central nervous system. The rat cerebellum possessed all three investigated types (TASK-1, -2 and -3) of TASK channels. The Purkinje cells, granule cell layer, molecular layer and astrocytes all exhibited TASK immunopositivity. Expression of TASK-1, -2 and -3 channels could also be demonstrated in astrocyte cultures prepared from the cerebellum, hippocampus and cochlear nucleus. The results of our functional studies confirmed the presence and activity of the TASK channels in the astrocytes. Difference could be observed in the intensity of TASK-1 immunolabelling exhibited by the GluT and GluR astrocytes; as GluT cells showed stronger TASK-1 positivity than GluR ones. We also provided evidence that a significant number of TASK channels are situated in the membrane of the endoplasmic reticulum. The immunohistochemical experiments on human cerebellum showed particularly strong TASK-3 positivity. TASK-1 channels were also present here, and only weak TASK-2 specific immunoreactivity could be observed. Our results indicate that the distribution of TASK-channels is similar but not identical in the human and in

the rat cerebellum; hence data obtained from rodents should be adapted to the human brain with caution.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Kovács László Professzor Úrnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának, valamint az intézet valamennyi munkatársának, amiért támogatottak és segítettek munkám elvégzésében.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Rusznák Zoltánnak munkám során nyújtott útmutatásáért és baráti támogatásáért.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen munkatársaimnak és szerzőtársaimnak: Szűcs Géza Professzor Úrnak, Dr. Varga Attilánénak, Harasztosi Csabának, Pór Ágnesnek, Pocsai Krisztinának, Kovács Ilonának és Bíró Tamásnak figyelmes és önzetlen segítségükért.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Kovács, I., Rusznák, Z. (2003) HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2189-2199. (IF: 5,259)
2. Rusznák, Z., Pocsai, K., Kovács, I., Pór, Á., Pál, B., Bíró, T., Szűcs, G. (2004) Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* (közlésre elfogadva, nyomtatás alatt) (IF: 5,259)

Idézhető kivonatok

1. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) HCN2 subunits contribute to the intrinsic activity of the pyramidal neurones in the dorsal cochlear nucleus of the rat. *Clin. Neurosci.*, 56: special edition 2, 65.

Előadások és poszterek

1. Harasztosi, Cs., Pál, B., Szabó, L., Rusznák, Z., Szűcs, G. (1997) Neuronok izolálása patkány nucleus cochlearisából enzimatis módszerrel, MÉT LXII. Vándorgyűlése, Pécs.
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. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) Patkány nucleus cochlearis piramis-neuronok spontán aktivitását kialakító pacemaker áram vizsgálata, LXVII. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.

4. Pór, Á., Pál, B., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) HCN1, HCN2 and HCN4 subunits in the pyramidal neurones of the dorsal cochlear nucleus of the rat, 3rd FEPS Congress, Nice, France.
5. Rusznák, Z., Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G. (2003) Characterisation and function of an h-current presented by the cochlear pyramidal cells of the rat, 3rd FEPS Congress, Nice, France.
6. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) Electrophysiological investigation of the ionic channels expressed by neurones of the rat cochlear nucleus, XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg.

A tézisekben fel nem használt egyéb tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. Voltage-gated and background K^+ channel subunits expressed by the bushy cells of the rat ventral cochlear nucleus. Hearing Research (bírálatra elküldve)
2. Pál, B., Rusznák, Z., Harasztosi, Cs., Szűcs, G. Depolarization-activated K^+ currents of the bushy neurones of the rat cochlear nucleus in a thin brain slice preparation. Acta Physiologica Hungarica (bírálatra elküldve)

Előadások és poszterek

1. Pál, B., Czakó, D. (2000) Menetes válltűződrót alkalmazása a felkar proximalis vég törések kezelésében, Fiatal Traumatológusok Fóruma, Lakitelek.
2. Pál, B., Horkay, P. (2000) A humerus proximalis vég töréseinek kezelése a DOTE Traumatológiai Tanszék gyakorlatában (1995-1999), Kórházi Tudományos Tanács Ülése, HBM Kenézy Kórház, Debrecen.
3. Pál, B. (2001) Vállízületi arthroplastika, Kórházi Tudományos Tanács Ülése, HBM Kenézy Kórház, Debrecen.
4. Pál, B., Harasztosi, Cs., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2002) Cholinergic modulatory mechanisms in the dorsal cochlear nucleus of the rat, IBRO International Workshop, Debrecen.
5. Rusznák, Z., Pál, B., Pór, Á., Forsythe, I.D., Szűcs, G. (2003) Patkány nucleus cochlearis bushy-neuronok membránsajátságait meghatározó depolarizáció-aktivált K^+ -áramok vizsgálata, LXVII. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.
6. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2003) Kv4.2 channel subunits contribute to the transient outward current of the rat cochlear bushy cell, 3rd FEPS Congress, Nice, France.

7. Pór, Á., Pál, B., Pocsai, K., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) Patkány nucleus cochlearis sejtek membránsajátságait kialakító csatornaféleségek immuncitokémiai vizsgálata, LXVII. MÉT Vándorgyűlés, Pécs.
8. Pór, Á., Pál, B., Rusznák, Z., Szűcs, G. (2003) Immunocytochemical investigation of the ionic channels expressed by neurones of the rat cochlear nucleus, XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg.