

**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.**

BEVEZETÉS

A nucleus cochlearis alapvető szerepet játszik a hangingerek központi idegrendszeri feldolgozásában, hiszen ez az a struktúra, ahol a nervus acusticus által szállított akcióspotenciál-mintázat elsődleges analízise elkezdődik. A mag fiziológiás működésének tanulmányozása során fontos felismerés volt, hogy a benne található projekciós neuronok különböző módon reagálnak az őket érő stimulációra, ily módon járulva hozzá a nucleus cochlearis jelfeldolgozó, integráló és jeltovábbító működéséhez.

A nucleus cochlearis dorsalis részének legfontosabb projekciós neuronját a piramis-sejtek képezik. A piramis-sejtek háromszögletű, mintegy 20-25 μm átmérőjű sejttesttel, és az ebből induló apicalis és basalis dendritfával rendelkeznek. Az apicalis dendritfa a nucleus cochlearis szemcsesejtjeitől, a basalis nyúlványok pedig a hallóideg befutó rostjaitól kapnak serkentő hatású, glutamáterg bemenetet. Az eddigi vizsgálatok eredményei rámutattak, hogy a piramis-neuronok igen komplex jelanalízisre képesek, hiszen a pillanatnyi membránpotenciáljuktól, így végsősoron az éppen aktiválható ioncsatornák minőségétől függően, gyökeresen különböző akcióspotenciál-mintázat kialakítására képesek. A piramis-sejtek viselkedése és jelfeldolgozó működése ezáltal élesen különbözik a nucleus cochlearis másik kiemelkedő jelentőségű projekciós neuronjára, az ún. bushy-sejtekre jellegzetes választól. Korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a piramis-sejtek sajátos aktivitásának hátterében átmenetileg aktiválódó, depolarizáció hatására megnyíló K^+ -csatornák; lassú inaktivációt mutató (ún. kései típusú) K^+ -áramok; perzisztens Na^+ -csatornák és különböző típusú Ca^{2+} -áramok (T-, P/Q-, L-, N- és R-típus) állnak.

A piramis-sejtek másik, a bushy-sejtektől ugyancsak eltérő tulajdonsága, hogy spontán aktivitással rendelkeznek, aminek a pontos eredete mindeztáig tisztázatlan. Egyes vélemények szerint a piramis-neuronok saját, intrinsic ingerképző sajátossággal rendelkeznek; más szerzők úgy vélik, hogy a piramis-neuronok spontán aktivitása csak egyes, velük szinaptikus kapcsolatban álló struktúrák aktivitásának következménye. A kérdés megválaszolását nem segíti, hogy az önálló aktivitással rendelkező sejtfeleségek esetében gyakorta expresszáldó áramféleség, a hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationáram (ami pl. a sinuatrialis csomó spontán aktivitásáért is felelős) kialakulásáért felelős ioncsatornák (hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott [HCN] csatornák) expresszióját a hallórendszer számos struktúrájában kimutatták, ám a létükre és aktivitásukra vonatkozó vizsgálatok piramis-neuronok esetében nem történtek. Mindezekből kiindulva,

vizsgálataink egyik részében a piramis sejtek spontán aktivitását és az annak esetleges forrását jelentő ioncsatornák vizsgálatát végeztük el.

A legújabb kísérletes adatok szerint a sejtfelszíni membrán nyugalmi K^+ -konduktanciájának, így a különböző sejtek nyugalmi membránpotenciáljának, bemenő ellenállásának (valamint ingerlékeny struktúrák esetében excitábilításának) kialakításáért egy igen sajátos molekuláris szerkezetű K^+ -csatornaféleséghez tartozó molekulák, az ún. TASK-csatornák (TWIK-related acid sensitive K^+ channel; TWIK: twin-pore in weak inward rectifier K^+ channel) felelősek. Mivel a TASK-csatornák egyes típusaira specifikus mRNS-t nagy mennyiségben mutatták ki a hallórendszer különböző területein, egyebek között a patkány nucleus cochlearisában is, logikusnak tűnt azt feltételezni, hogy a nucleus cochlearis fő projekciós neuronjainak működésében ezen ioncsatornák is fontos szerepet játszhatnak. A célzott és a nucleus cochlearis egyes konkrét neuronjait érintő vizsgálatokat megelőzően azonban szükségesnek láttuk tisztázni, hogy a gliasejtek expresszálják-e ezen ioncsatornákat, hiszen a neuron-glia kölcsönhatás (és minden azt módosító tényező) jelentősen befolyásolhatja az idegsejtek működését. Mivel lehetőségünk nyílt arra, hogy a TASK-csatornák egyes típusainak megoszlását a humán központi idegrendszer esetében is tanulmányozzuk, elsőként szolgáltatva ezáltal tudományos adatokat a TASK-csatornák emberi agyban fellelhető lokalizációjáról, kompromisszumos megoldásként a cerebellumot választottuk vizsgálataink fő célpontjául. Döntésünket az indokolta, hogy a cerebellum egy könnyen azonosítható, viszonylag egyszerű szövettani szerkezetű, ugyanakkor a nucleus cochlearisszal fejlődéstani rokonságban álló képlet. Ez a választás azért is szerencsésnek bizonyult, mivel voltak irodalmi adatok a TASK-csatornák egyes típusainak patkány cerebellumban megfigyelhető megoszlásáról, így lehetőségünk nyílt az ember és patkány közötti, TASK-expresszió szintjén fellelhető különbségek megfigyelésére és leírására.

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 hátterében gyakran meghúzódó 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?

MÓDSZEREK

Az elektrofiziológiai méréseket részben 8-14 napos Wistar patkányok nucleus cochlearisából készített, 100-200 μm vastagságú szeleteken; részben 3-8 napos egyedekből enzimatikus módszer alkalmazásával izolált astrocytákból készített szövettenyészeteken végeztük. Az akciós potenciálok és a membránpotenciál változásainak rögzítése a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjának alkalmazásával történt. A szeletekben elhelyezkedő piramis-neuronok kétséget kizáró morfológiai azonosítására a pipetta-oldatban található Lucifer Yellow fluoreszcens festék szolgált. A szeletekben történő mérések során vagy Nomarski-optikát vagy (a fluoreszcens festékekkel való feltöltés után) epifluoreszcens megvilágítást alkalmaztunk.

A HCN-csatornák alegységösszetételének meghatározása végett HCN1-, HCN2- és HCN4-specifikus immunreakciót alkalmaztunk enzimatikus módszerrel izolált piramis-neuronokon.

A TASK-1, TASK-2 és TASK-3 csatornák expresszióját astrocyta-tenyészetben vagy 4 μm vastag szövettani metszeteken tanulmányoztuk. Az astrocytatenyészet a vizsgálatok végzésekor általában 4-5 napos volt, és 70–80%-os konfluenciát mutatott. Az immunkémiai vizsgálatok során gliaspecifikus antigének (anti-GFAP; glial fibrillary acidic protein) jelenlétének meghatározására is sor került a sejtek egyértelmű azonosítása végett. Mind a GFAP-, mind a TASK-specifikus immunreakciót fluoreszcens fluorofórral (FITC) konjugált másodlagos antitestek alkalmazásával tettük láthatóvá. Az astrocytatenyészetek által mutatott immunreakciót immunfluoreszcens vagy konfokális lézermikroszkóp alkalmazásával rögzítettük. Az immuncitokémiai eredményeket Western-blot és RT-PCR-reakciók elvégzésével is megerősítettük.

Az astrocytatenyészetek vizsgálata során alkalmanként sor került a sejtek pDsRed2-ER vektorral történő transzfekciójára is, a TASK-csatornák endoplasmaticus reticulumban történő kifejeződésének igazolása végett. A transzfekció után 24 órával a tenyészetet formalinnal fixáltuk, majd elvégeztük a TASK-specifikus immunfestést. A vörös (endoplasmaticus reticulumra specifikus) és a zöld (TASK-specifikus) képpontok kolokalizációjának mértékét pixelanalízis alkalmazásával számszerűsítettük.

Patkány és humán cerebellumból származó szövettani minták vizsgálatakor nem-fluoreszcens (kromogén) immunfestést alkalmaztunk. A humán szövetből formaldehid-fixált, paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk, míg a patkány cerebellumból formaldehid-fixált és folyékony nitrogénben fagyasztott metszeteket is alkalmaztunk (a

metszetek vastagsága minden esetben 4 μm volt). A formaldehid-fixált szövetmintákat antigénfeltárásnak vetettük alá (pronázos kezelés vagy 0,01 M TRIS-pufferben történő, mikrohullámú sütőben végzett inkubálás).

A szövettani minták immunhisztokémiai vizsgálata során alkalmanként kettős immunjelölést (glia- vagy neuronspecifikus és TASK-specifikus reakció kombinálása) is végeztünk. A metszetek egy része esetében hematoxilines háttérfestést is alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

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

1.1. A HCN-áram általános jellemzése

A nucleus cochlearis dorsalis piramis-neuronok elektrofiziológiai vizsgálata során az alkalmazott mikroelektrodákat olyan oldattal töltöttük fel, ami egy fluoreszcens festéket tartalmazott (Lucifer Yellow). A festék a mérés alatt a sejtbe diffundált, így a mérés végeztével láthatóvá vált az éppen vizsgált neuron sejttestének alakja, valamint nyúlványrendszerének egy tekintélyes része. A piramis-neuronokat a mintegy relatíve nagy (mintegy 20-25 μm átmérőjű), kifejezetten háromszög alakú sejttest, és az annak csúcsaiból kiinduló apicalis és basalis dendritfa megléte alapján azonosítottuk.

Kísérleteink során -60 mV-os tartópotenciálról alkalmaztunk 2 s hosszúságú hiperpolarizáló impulzusokat a -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. Az áram megfordulási potenciálját extrapolációs módszerrel határoztuk meg, és az -32 ± 3 mV-nak bizonyult (átlag $\pm$ SEM, $n = 6$). Az áram lassú aktivációja, az inaktiváció hiánya, valamint megfordulási potenciálja alapján arra következtettünk, hogy az a hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationáramnak (I_h) felel meg, aminek kialakulásáért a HCN-csatornák felelősek.

A piramis-neuronok hiperpolarizáció hatására aktiválódó konduktanciájának félaktivációs feszültsége (E_{50}) -99 ± 1 mV-nak, az aktiváció feszültségérzékenységét jellemző meredekségi faktora (s) pedig $10,9 \pm 0,4$ mV-nak adódott ($n = 27$). A h-áram aktivációs szakaszának illesztésével meghatároztuk az aktivációs kinetikát jellemző időkonstansok értékét is. Megállapítottuk, hogy azokat két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illeszthettük a legpontosabban, az aktivációs időkonstansok értékei a hiperpolarizáló impulzus nagyságától függően 150-300 ms (τ_1) és 800-1500 ms (τ_2) között változtak.

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 hatékony gátolja, így a jelen munkában is sor került a CsCl hatásának vizsgálatára.

Megállapítottuk, hogy 1 mM CsCl jelenlétében a piramis-neuronok hiperpolarizáció-aktivált áramának amplitúdója 85 ± 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 ($87 \pm 7\%$, $n = 5$).

Kísérleteink során a piramis-sejtek nagyobb része (98 vizsgált sejt közül 69) spontán akcióspotenciál-tüzelést mutatott. Mivel a h-áramnak fontos szerepet tulajdonítanak a spontán aktivitás kialakításában, ezért megvizsgáltuk, hogy az azt blokkoló CsCl milyen hatással van az általunk tanulmányozott neuronok spontán aktivitására. 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 hatását is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint 10 μ M ZD7288 jelenlétében a hiperpolarizáció-aktivált áram amplitúdója és az azt expresszáló piramis-neuronok spontán aktivitása a kontroll körülmények között tapasztalt értékek mintegy 20%-ára csökkent ($n = 5$).

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. A kísérletek során a HCN1, HCN2 és HCN4 alegységek ellen termeltetett primer 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 specifikus immunreakció kivitelezése is. Az immuncitokémiai vizsgálatok eredményei alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a nucleus cochlearis piramis-sejtjeinek HCN-áramát kialakító ioncsatornák összeszerelődésében a HCN1, HCN2 és HCN4 alegységek egyaránt szerepet játszanak.

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

2.1. A TASK-immunreaktivitás megoszlása patkány cerebellumban

Formaldehid-fixált, paraffinba ágyazott, patkány cerebellumából származó szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy abban 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 reakcióéval, ám intenzitása annál gyengébbnek bizonyult. Megállapítottuk továbbá, hogy a patkány cerebellum Purkinje-sejtjei kifejezett TASK-3 pozitivitással rendelkeznek, ugyanakkor a molekuláris és a szemcsesejtes réteg is pozitívnak bizonyult. Nem tapasztaltunk TASK-3-specifikus jelölést a pia mater területén. Erős TASK-3 jelölést figyeltünk meg a cerebellum fehérállományában is.

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

2.2. TASK-immunreaktivitás jelenléte szövettenyészetben fenntartott astrocytákon

A cerebellaris astrocyták TASK-1, TASK-2 és TASK-3-specifikus immunpozitivitását primer astrocytatenyészeteken végzett immuncitokémiai vizsgálatokkal is megerősítettük. A különböző morfológiai jegyek és az egyes sejtek által mutatott GFAP-pozitivitás mértéke alapján lehetővé vált az astrocyták két típusának (GluR és GluT sejtek) elkülönítése. 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, de a TASK-1-specifikus reakciónál gyengébbnek mutatkozott. Hippocampusból és nucleus cochlearisból nyert astrocytákkal indított tenyészeteken is elvégeztük a TASK-alegységek megoszlásának és jelenlétének vizsgálatát, amik a cerebellaris astrocyták esetében tapasztalttal teljesen megegyező eredményt adtak.

Az astrocytatenyészeteken végzett immuncitokémiai vizsgálatok eredményeit molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával is megerősítettük. Ezen kísérletek során

igazoltuk a TASK-1- TASK-2- és TASK-3-specifikus mRNS jelenlétét (RT-PCR), valamint a megfelelő fehérjék expresszióját (Western-blot).

Jelen kísérletsorozatban sor került a TASK-csatornák jelenlétének funkcionális bizonyítására is. Megállapítottuk, hogy az astrocyták által depolarizáló stimulusok hatására produkált áram amplitúdója savas ($\text{pH} = 5,2$) extracelluláris oldatban a kontroll áramamplitúdó mintegy $63 \pm 4 \%$ -ára csökkent ($n = 12$), ami a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TASK-csatornák funkcionális expresszióját jelzi. Hippocampalis és nucleus cochlearisból származó astrocytatenyészetek esetén hasonló megállapítást tehattünk.

2.3. A TASK-csatornák expressziója az astrocyták endoplasmaticus reticulumjában

Kísérleteink során tanulmányoztuk a különböző TASK-csatornaalegységek astrocytákon belüli megoszlását. A konfokális mikroszkópiás eredmények felvetették, hogy a TASK-csatornák intracellulárisan, az endoplasmaticus reticulum (ER) membránjában is megjelenhetnek. Ezen hipotézis ellenőrzése végett az astrocytatenyészeteket a pDsRed2-ER plazmiddal transzfektáltuk, aminek fehérjeterméke az endoplasmaticus reticulum membránját specifikusan jelöli. Megállapítottuk, hogy a TASK-specifikus immunreakció és az ER-specifikus jelölés jelentős átfedést mutatott. 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 esetében ($n = 5$).

2.4. TASK-expresszió a humán cerebellumban

A patkány cerebellumon végzett kísérletek mellett elvégeztük a TASK-csatornák expressziójának vizsgálatát a humán cerebellumban is. 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. Kísérleteink eredménye szerint a TASK-2-csatornák expressziója nem számottevő, kizárólag a Purkinje- és a szemcsesejtek mutattak gyenge TASK-2 pozitivitást.

Kettős immunjelölés alkalmazásával azt is megállapíthattuk, hogy (hasonlóan a patkány központi idegrendszerében tapasztaltakhoz) az emberi cerebellum astrocytái is mutatnak TASK-1 és TASK-2 expressziót.

MEGBESZÉLÉS

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. A piramis-neuronok hiperpolarizáció hatására aktiválódó árama 1 mM CsCl extracelluláris alkalmazásával, valamint a HCN-csatornák specifikus gátlószerének tartott ZD7288 alkalmazásával igen hatékonyan gátolható volt, további bizonyítékát adva a fenti megállapításnak.

A HCN-csatornák által létrehozott áram (korábbi nevén h-típusú áram) jelenlétére és aktivitására elsőként a szívizom és a fotoreceptorok elektromos sajátságait vizsgáló kutatások derítették fényt. Megállapítást nyert, hogy ezen konduktancia különös jelentősége abban áll, hogy egyes sejtek számára a spontán tüzelés képességét biztosítják, hiszen a nyugalmi membránpotenciál környékén aktiválódva egy kevert kationáram megjelenését biztosítják, ami a sejtmembrán depolarizációját, így akciós potenciál kialakulását okozza. Kiemelkedően fontos a HCN-csatornák ezen feladata a szív ingerképző rendszerében, de számos irodalmi adat áll rendelkezésre annak vonatkozásában is, hogy a HCN-csatornákat egyes neuronok (pl. thalamicus kapcsolóneuronok) is expresszálják, így azok is rendelkeznek a spontán aktivitás képességével. Ezen túlmenően, a HCN-csatornák nagy jelentőségűek lehetnek az őket expresszáló sejtfeleségek nyugalmi membránpotenciáljának kialakításában, valamint azok ingerlékenységének szabályozásában. Az eddigieken túlmenően a HCN-csatornák jelenléte és aktivitása megakadályozhatja az őket expresszáló neuronok hosszantartó gátlását is.

Számos korábbi kutatás mutatott rá arra a tényre, hogy a hallórendszer különböző struktúrái is rendelkeznek HCN-csatornákkal. A hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationáram jelenlétét sikerült igazolni a belső szőrsejteken, az I. típusú ganglion spirale neuronokon, a nucleus cochlearis bushy-neuronjain, a nucleus corporis trapezoidei fősejtjein és az oliva superiort felépítő idegsejteken. A jelen vizsgálatokban a fenti sort kiegészíthettük a nucleus cochlearis dorsalis legfontosabb projekciós neuronjával, a piramis-sejtekkel.

Régóta ismeretes volt az a tény, hogy a nucleus cochlearis dorsalisba szúrt mikroelektrodákkal még a mag teljes deafferenciációja 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. Ezen spontán tüzelés frekvenciája a HCN-áram szokásos gátlószereinek jelenlétében (CsCl és ZD7288) a kontroll aktivitás mintegy negyedére csökkent. Mérések alapján megállapíthattuk, hogy a nucleus cochlearis dorsalis korábban leírt spontán aktivitásának hátterében (legalábbis részben) a piramis-neuronok intrinsic aktivitása áll, amit a HCN-csatornák működése tart fenn. Elfogadva a fenti megállapítás helyességét, 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 további 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 a HCN-csatornák gátlószereire 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 HCN-csatornák molekuláris szerkezetének feltérképezése lehet a kulcs, amit immunhisztokémiai módszerek alkalmazásával tettünk meg. Ismeretes, hogy a HCN-csatornák négy lehetséges alegység (HCN1-HCN4) homo- vagy heterotetramerikus összeszerelődésével jönnek létre. Az egyes alegységek által alkotott homotetramerikus struktúrák meglehetősen eltérő elektrofiziológiai sajátosságokkal rendelkeznek, így a kizárólag HCN1 alegységekből álló csatornák viszonylag gyorsan aktiválódnak (aktivációs időállandó < 100 ms), míg a HCN3 és a HCN4 alegységekből álló csatornák ennél lényegesen lassabbak. Az egyes heteromer csatornák vélhetően az egyes alegységek által hordozott sajátosságok egyfajta „átlagát” tükrözik. 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 kutatások 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. A jelen munka alapján az is felvethető, hogy a piramis-neuronok HCN2/HCN4 heterotetramer csatornákkal rendelkeznek, hasonlóan a thalamicus kapcsolóneuronok esetében megfigyelt szituációhoz. Tekintettel arra, hogy a thalamicus kapcsolóneuronok ugyancsak rendelkeznek a spontán tüzelés képességével, 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 aktivitás képességével, mert ezen struktúrák membránjában nem kerül sor HCN2/HCN4 heteromerek formálódására. A hipotézis igazolása a nem túl távoli jövő feladata kell legyen.

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

A K^+ -csatornák molekuláris szerkezetük alapján három főcsaládba (szuperfamíliába) sorolhatók. A feszültségvezérelt K^+ -csatornák (Kv-család) közös jellegzetessége, hogy az őket felépítő alegységek 6 transzmembrán domént, valamint egy pórusformáló hurkot tartalmaznak, és a funkcióképes molekula kialakulásához négy ilyen alegység összekapcsolódására van szükség. A befelé egyenirányító K^+ -csatornák (Kir-család) tagjait kialakító alegységek ugyanakkor mindössze két transzmembrán doménnal bírnak, amik a pórusformáló hurkot övezik. Hasonlóan a Kv-család tagjaihoz, a kész struktúra kialakulásához ebben az esetben is 4 alegység összeszerelődésére van szükség. Az eddigiektől gyökeresen eltérő módon, a K^+ -csatornák legújabbban felfedezett csoportja 4 transzmembrán szakasszal rendelkezik. Az egyes alegységek két, egymás után („tandem” elrendezésben) elhelyezkedő pórusformáló hurkot tartalmaznak; a funkcióképes csatorna kialakulása ugyanakkor két alegység összekapcsolódását (azaz dimerizációt) feltételez. A molekuláris biológiai és morfológiai jellegzetességek alapján a K^+ -csatornák ezen legújabb

csoportját 4TM-PP csatornákként jelölik, de gyakran alkalmazzák az „ikerpórusú” K^+ -csatorna elnevezést is.

Az ikerpórusú K^+ -csatornák családja számos tagot tartalmaz, melyek közül kiemelkedő jelentőségűnek tűnnek az extracelluláris pH változására igen érzékenyen reagáló ún. TASK-csatornák. Az ubikviter megoszlást mutató TASK-csatornákról feltételezik, hogy meghatározó szerepük lehet a sejtek nyugalmi K^+ -konduktanciájának kialakításában, ezáltal az ingerlékeny és nem-ingerlékeny sejtek nyugalmi membránpotenciáljának, valamint az excitábilis struktúrák ingerlékenységének szabályozásában. A TASK-csatornák tulajdonképpen két alcsoportra oszthatók, ugyanis a TASK-1, TASK-3 és a TASK-5 csatornák lényegesen nagyobb szekvenciahomológiát mutatnak egymással, mint a TASK-2 és a TASK-4 csatornákkal, mely utóbbiakat újabban egy teljesen különböző alcsoportba, a TALK-családba sorolnak.

Korábbi tanulmányok igen erőteljes TASK-specifikus mRNS expressziót jeleztek a hallópálya különböző területein (így a nucleus cochlearisban is), ám mindezidáig nem került sor annak ellenőrzésére, hogy a TASK-csatornák vajon valóban megjelennek-e fehérjék szintjén is. Két további igen figyelemre méltó tény keltette fel a érdeklődésünket a saját kísérleteinket megelőzően; nevezetesen, hogy bizonyos adatok arra utaltak, hogy esetleg az astrocyták is expresszálhatják a TASK-csatornák egyes reprezentánsait, másrészt, hogy (egy szöveti homogenizátumon végzett mRNS-szintű vizsgálattól eltekintve) semmiféle adat nem állt rendelkezésre az ember központi idegrendszerében történő TASK-expresszióról. Mivel a munkánk során szerettünk volna összehasonlítást végezni a patkány és az ember központi idegrendszerében történő TASK-megoszlás vonatkozásában, a cerebellum formájában egy olyan struktúrát választottunk, ami szövettanilag könnyen vizsgálható, ugyanakkor viszonylag szoros fejlődéstani kapcsolatban áll a nucleus cochlearis dorsalisal.

A TASK-csatornák cerebellaris megoszlására vonatkozó kísérletes eredményeink egyik legfontosabb megállapítása, hogy a patkány és az ember cerebellum esetében az egyes TASK-csatorna típusok megoszlása korántsem azonos. Míg a patkány esetében a TASK-1-specifikus immunreakció volt a legintenzívebb és a TASK-3-specifikus festés a legkevésbé erős, addig az emberi cerebellumban a TASK-3 csatornák jelenléte volt a legerőteljesebb. Megfigyelhető volt a TASK-1 specifikus reakció is (bár ennek erőssége elmaradt a TASK-3 csatornák esetében tapasztalttól), ugyanakkor a TASK-2-specifikus reakció gyakorlatilag hiányzott, csak a Purkinje-sejtek mutattak érzékelhető (ám igen gyenge) festődést. A fenti adatok igen jó összhangban voltak a cerebelláris lízátumon egy más laboratórium által végzett mRNS szintű vizsgálat eredményeivel. A humán cerebellumot vizsgálva kiemelkedően

erőteljes volt a Purkinje-sejtek és a pia mater TASK-3 és kisebb mértékben a TASK-1-specifikus reakciója. Kettős immunjelölés alkalmazásával azt is sikerült megmutatnunk, hogy az emberi kisagy astrocytái ugyancsak expresszálják mind a TASK-1, mind a TASK-3 csatornákat.

Az astrocyták TASK-expresszióját részletesebben is tanulmányoztuk a patkány agyának különböző területeiből (cerebellum, hippocampus, nucleus cochlearis) izolált, szövettenyészeti körülmények között fenntartott sejteket alkalmazva. Megállapítottuk, hogy bár 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 jelentősen különböztek egymástól a TASK-expresszió tekintetében. Míg a kicsiny sejttessel, ugyanakkor sok és vékony nyúlvánnyal bíró GluT sejtek igen intenzív TASK-1 reakciót adtak; a zömökebb felépítésű, kevés és vaskos nyúlvánnyal rendelkező 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.

Megfigyeléseink szerint 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. Érdekes módon 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. 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.

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 enzimatisz 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 posztterek

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.