

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

Pór Ágnes

Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán

Prof. Dr. Szűcs Géza

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

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. BEVEZETÉS.....	4
1.1. A nucleus cochlearis felépítése.....	4
1.2. A citoplazmatikus Ca^{2+} szerepe és szabályozása neuronokban.....	7
1.3. Ca^{2+} belépés az extracelluláris térből.....	9
1.3.1. Feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák jellegzetességei.....	9
1.3.2. Ligandvezérelt Ca^{2+} -permeabilis ionszűrők; glutamát-receptorok.....	10
1.4. Ca^{2+} -felszabadulás az intracelluláris raktárakból.....	16
1.5. Ca^{2+} -kötő fehérjék szerepe a kalcium-homeosztázisban.....	18
1.6. Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok jelentősége a neuronok működésében.....	20
1.7. Munkacsoportunk korábbi, a disszertáció anyagát megalapozó eredményei.....	25
1.8. Célkitűzések.....	25
2. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK.....	26
2.1. Kísérleti állatok, a preparálás főbb lépései.....	26
2.2. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése.....	26
2.2.1. Neuronok enzimatiszta izolálása.....	26
2.2.2. Az izolált sejtek előkészítése az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérésére.....	27
2.2.3. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérése.....	28
2.2.4. Az alkalmazott kémiai anyagok összetétele.....	28
2.2.5. Az alkalmazott statisztikai próbák.....	29
2.3. Immunhisztokémia.....	30
2.4. Retrográd jelölés.....	31
2.5. Mikroszkópok.....	32
3. EREDMÉNYEK.....	33
3.1. A glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek jellemzése izolált piramis-sejteken.....	33
3.1.1. AMPA és NMDA receptorok jelentősége a Ca^{2+} -tranziensek létrejöttében.....	33
3.1.2. Az NMDA-típusú ionotróp glutamát-receptorok aktivációja.....	35
3.1.3. Az AMPA-receptorok hatása a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció-változásokra.....	37
3.2. Kalciumkötő fehérjék jelenlétének és megoszlásának vizsgálata a CN projekciós neuronjaiban.....	41
3.2.1. Kalciumkötő fehérjék a DCN-ben.....	41

3.2.2. Kalciumkötő fehérjék a VCN-ben.....	44
3.3. A Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok vizsgálata.....	50
3.3.1. A K^+ -depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek megszűnésének kinetikája.....	50
3.3.2. Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak szerepe a Ca^{2+} -eltávolításban.....	53
3.3.3. A sejtmembrán transzportrendszereinek szerepe az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésében.....	55
4. MEGBESZÉLÉS.....	58
4.1. Glutamát-függő Ca^{2+} -tranziensek izolált piramis-sejteken.....	58
4.2. Ca^{2+} -kötőfehérjék előfordulása felnőtt patkány nucleus cochlearisának projekciós neuronjaiban.....	61
4.3. A citoplazmatikus Ca^{2+} eltávolítására szolgáló mechanizmusok.....	62
IRODALOMJEGYZÉK.....	66
ÖSSZEFOGLALÁS.....	86
SUMMARY.....	87
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	88
A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE.....	89
A TÉZISEKBEN FEL NEM HASZNÁLT EGYÉB TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE.....	91

1. BEVEZETÉS

1.1. A nucleus cochlearis felépítése

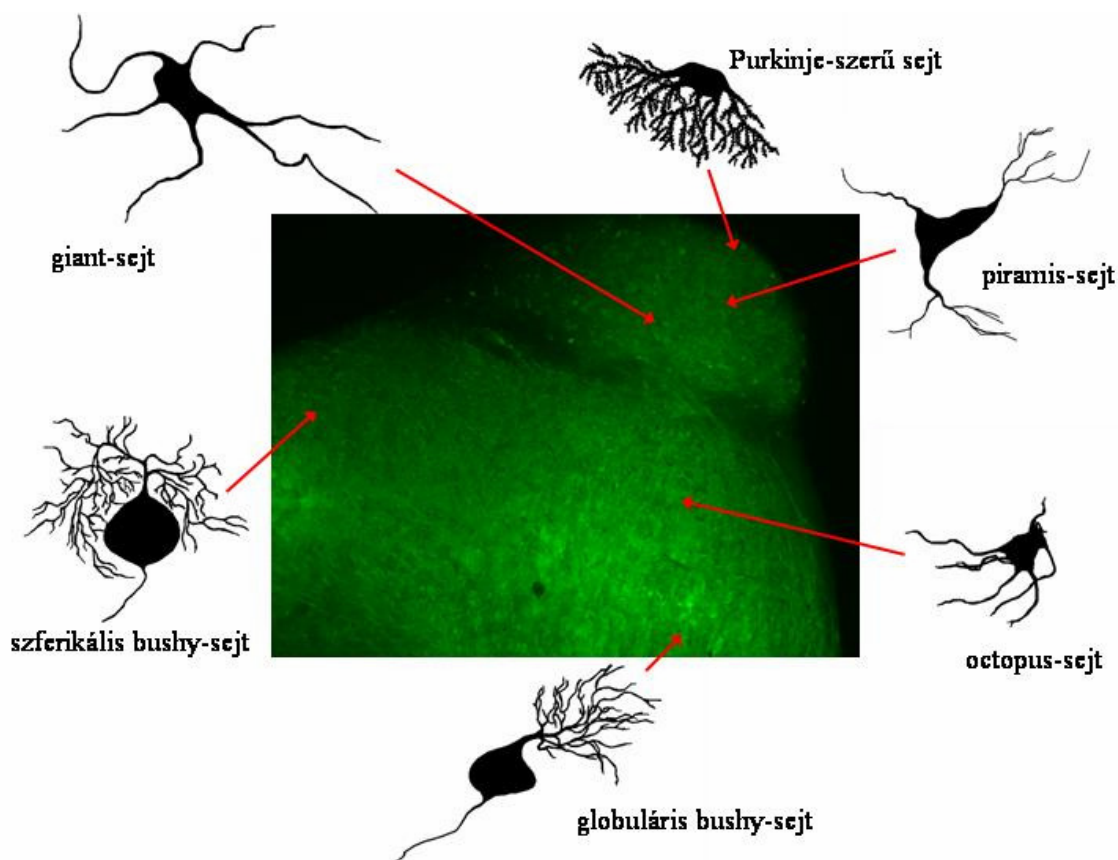
A külvilágból érkező hanghullámok fizikai paraméterei egyidejűleg számos információt hordoznak (hangerősség, hangmagasság, hangszín, a hangforrás lokalizációja). Ezen információk kódolása a cochlea szőrsejtjeiben kezdődik, a hangszín és a hangmagasság esetében a receptorok tonotopikus elrendeződése révén, a hangerősség vonatkozásában az ingerületbe jött szőrsejtek számának és a kialakuló receptorpotenciál nagyságának segítségével. A szőrsejtektől az elsődleges érzőneuronok, a ganglion spirale bipoláris sejtjei akciós potenciál sorozatok formájában szállítják el a hallási információt a magasabb hallóközpontok irányába, így elsőként a nucleus cochlearis területére.

Az ingermintázatnak megfelelő hallási érzet kialakulásához elengedhetetlen, hogy a kódolt hallási információ a feldolgozás minden szintjén hűen továbbítódjon, (megőrizve pl. a tonotopikus elrendeződést). Fontos a kétoldali hallórendszerben kialakuló akcióspotenciál-sorozatok időviszonyainak megtartása is a hangforrás térbeli lokalizációjának meghatározása érdekében.

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

A nucleus cochlearis legfontosabb bemenetét képező nervus acusticusban kétféle rosttípust különböztethetünk meg: a vastag, mielinizált, I-es típusú rostokat, melyek a belső szőrsejtek felől, valamint a II-es típusú, vékony, mielinizálatlan rostokat, melyek a külső szőrsejtek irányából szállítanak akciós potenciál sorozatokat a cochlearis magba. Tekintettel arra, hogy a cochleában található belső szőrsejtek a hangingerek elsődleges receptorai, nem meglepő, hogy a nucleus cochlearis projekciós neuronjai az I-es típusú rostokkal hoznak létre szinaptikus kapcsolatot. A kiváltott ingerületi folyamat modulálásában szerepet játszó II-es típusú rostok ugyanakkor főleg a szemcsesejtekhez visznek információt, melyek azután (parallel rosthálózatukon keresztül) közvetve vagy közvetlenül módosítják a projekciós neuronok működését. A nucleus cochlearisba szállított ingerületi mintázatot módosíthatják magasabb központokból induló és a magban végződő leszálló rostok is, így pl. a nucleus medialis corporis trapezoideiból

érkező kolinerg axonok (Brawer és mtsai, 1974; Cant és Gaston, 1982; Moore, 1986; Chen és mtsai, 1995).



1. ábra
A nucleus cochlearis projekciós neuronjai

A nucleus cochlearis ventralis és dorsalis részében különböző neuronfélések találhatók (1. ábra). A ventralis magterületet (VCN) a VIII. agyideg itt belépő axonjai két további részre, egy elülső (anterior; AVCN) és egy hátsó (posterior; PVCN) területre osztják (Moore, 1986). Az elülső résznek elsősorban kapcsoló funkciója van (Frisina és mtsai., 1995), míg a PVCN szerepe a hallási információ időben hű továbbítása (Moller, 1972, 1976; Frisina, 1985). A dorsalis magterület (DCN) jelentős rendezettséget mutat, hiszen három jól elkülöníthető, koncentrikus sejtréteg fedezhető fel szerkezetében (Lorente de Nó, 1933, 1981; Osen, 1969; Brawer és mtsai., 1974; Browner and Baruch, 1982; Webster and Trune, 1982). A DCN igen jelentős szerepet játszik a hangforrás térbeli lokalizációjában (Young és mtsai., 1992), illetve az akusztikus információ időviszonyainak feldolgozásában (Kim és mtsai., 1990).

Az AVCN egyik jelentős sejtípusát a szferikális bushy-sejtek képezik (1. ábra). A mag periferiáján elhelyezkedő, 20-28 μm átmérőjű neuronok kerek vagy ovális

sejttestjéből dúsan elágazó, a szóma közvetlen közelében maradó dendritfa, illetve az axon indul ki (Webster és Trune, 1982). A sejttesten és proximális dendritfán található a hallóideg végződése (Held-féle végbunkók). A szferikális bushy-sejtek axonjai a magból kilépve, az azonos oldali lateralis és mindkét oldali medialis oliva superior irányába továbbítják az információt (Harrison és Warr, 1962; Friauf és Ostwald, 1988).

A bushy-sejtek másik típusát globuláris bushy-neuronok jelentik, melyek a PVCN-ben, a belépő nervus acusticus rostok között foglalnak helyet (1. ábra). Morfológiájuk nagyrészt megegyezik a szferikális típusú sejtekével, kivéve, hogy a dendritfa ritkásabb és a sejttesttől távolabbra terjed ki (Webster és Trune, 1982). Ezek a sejteken is megtalálhatók a hallóideg rostok végződése (főleg a szómán és a dendritfa kezdeti szakaszán). A globuláris bushy-sejtek a cochlea belső szőrsejtjeiben keletkezett hallási információt nagy hűséggel továbbítják az ellenoldali nucleus medialis corporis trapezoidei területére.

A PVCN másik projekciós neuronpopulációját az octopus sejtek képezik, melyek a DCN-hez közel találhatóak (1. ábra), átmérőjük mintegy 30-35 μm . Amint nevük is utal rá, a sejttestből induló számos dendrit polipra emlékeztető megjelenéssel a tér egy irányába terjed ki (Osen, 1969). A hallóideg felől mind a szóma, mind a kiterjedt dendritfa kap bemenetet, az axon pedig mindkét oldali oliva superiorba, illetve az ellenoldali lemniscus lateralisba szállít információt.

A DCN legtöbbet vizsgált sejtfelesége a piramis-sejt populáció, mely a középső sejtrétegben foglal helyet (1. ábra). E neuronok jellegzetessége a háromszög alakú, mintegy 25 μm átmérőjű sejttest, amelynek csúcsaiból a basalis és apicalis dendritfa, illetve az axon ered (Osen, 1969). Az apicalis dendritfa a mag legkülső, molekuláris rétegébe jut, ahol az itt található szemcsesejtek parallel-rostjaival képez szinapszist, míg a basalis dendritfán a belső rétegben az akusztikus rostok végződnek. Mindkét szinaptikus bemenet glutamaterg serkentő hatású (Lorente de No, 1981; Webster és Trune, 1982; Rhode és mtsai, 1983). A piramis-sejtekhez a gátló hatású csillag- és „cartwheel”-sejtek is adnak szinaptikus bemenetet (Oertel és Wu, 1989). A nervus cochlearis a piramis-sejtek sejttestjén is képez szinapsziszokat, a piramis neuronok axonja pedig az ellenoldali colliculus inferior felé projiciál (Osen, 1972; Ryugo és mtsai, 1981).

A cochlearis mag valamennyi neurontípusa közül legnagyobbak a DCN legbelső rétegében található óriássejtek (1. ábra), melynek nagysága 40-50 μm közötti (Osen, 1969). A sokszögű szóma csúcsaiból indulnak ki a többi sejthez képest hosszabb és vastagabb dendritek, melyek akár 500-600 μm távolságra is kiterjedhetnek. Mivel a

messzire kinyúló dendritek számos akusztikus rosttal állnak szinaptikus kapcsolatban, az óriássejtek nagy receptormezővel bírnak, ennél fogva fontos szerepük lehet a hallási információk integrálásában. E sejt serkentő glutamaterg és gátló glicinerg bemenetet is kap a CN néhány más sejttípusától, axonja pedig az ellenoldali colliculus inferior területére tart (Oliver, 1984).

A DCN felszínén található Purkinje-szerű sejtek (1. ábra) viszonylag nagy sejttesttel (20-25 μm), illetve vastag, határozottan tüskés, a DCN belseje felé terjedő dendritfával rendelkező neuronok. Kifejezett hasonlóságot mutatnak a kisagy Purkinje-sejtjeihez, amit számos szerző azzal magyaráz, hogy az egyedfejlődés során onnan vándorolnak le a cochlearis magba, ugyanakkor megtartanak néhány, a Purkinje-sejtekre emlékeztető tulajdonságot (Hurd and Feldman, 1994; Spatz, 1997). Újabb vizsgálatok alapján valószínű, hogy a Purkinje-szerű sejtek nemcsak a nervus acusticus felől, de a kúszórostok által az oliva inferior (Rossi és Borsello, 1993), illetve a parallelrostok által a szemcsesejtek felől is kapnak szinaptikus bemenetet (Spatz, 1997). Annak ellenére, hogy ismert a Purkinje-szerű sejtek gátló GABAerg természete (Mugnaini, 1985), számos kérdés nyitott még működésükkel kapcsolatban. Axonjainak projekciós területe ugyancsak ismeretlen, feltételezik, hogy a kisagy irányába jelenthetnek kimenetet (Huang és mtsai., 1982; Spatz, 1997).

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

Régóta ismert, hogy számos sejtfunkció aktiválásához elengedhetetlen az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelkedése (izomkontrakció, exokrin és endokrin szekréció, mitózis, stb.). Az ingerlékeny sejtek működésének fontos eleme a membránpotenciál gyors és átmeneti megváltozása, azaz akciós potenciálok kialakulása. Az akciós potenciálok kialakulásának háttérében általában a membrán Na^+ -konduktanciájának gyors és átmeneti megnövekedése, és az ennek következtében kialakuló Na^+ -beáramlás áll (Hodgkin és Huxley, 1952), de bizonyos esetekben akciós potenciál akkor is kialakul, ha az extracelluláris oldatban a Na -ionokat más, divalens kationokkal helyettesítették, így pl. Ca -ionnal (Fatt és Katz, 1953; DiFrancesco és mtsai., 1989; Ito és Kuriyama, 1971). Ez arra utal, hogy az ingerlékeny sejtek membránjában Ca^{2+} -csatornák jelenlétével is számolni kell, melyeken keresztül a kalcium a sejtbe juthat, depolarizációt eredményezve.

A neuronokban a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) módosíthatja egyes sejt felszíni ioncsatornák kapuzási paramétereit (pl. Ca^{2+} -függő K^+ - és Cl^- -csatornák), befolyásolva ezáltal a sejt membránsajátságait, így ingerlékenységét.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése alapvető jelentőségű a neurotranszmisszió folyamatában, továbbá intracelluláris enzimek aktivitása is függhet a Ca-ionok jelenlététől (pl. protein kináz C), az úgynevezett „Long-Term Potentiation” (LTP) jelensége pedig a neuronszintű tanulási folyamatok egyik lehetséges értelmezését kínálja (Malenka és Nicoll, 1999).

A szabályozás szempontjából lényeges, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció gyorsan magasabb szintet érjen el, de ezt követően rövid időn belül újra a nyugalmi szintre térjen vissza (Ca^{2+} -tranziensek kialakulása). A citoplazmában megjelenő Ca-ionok egyik forrása az extracelluláris tér, ahonnan a sejtmembránban található, depolarizáció hatására aktiválódó feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon keresztül Ca^{2+} belépés valósul meg. Emellett a kémiai szinapszisok poszt-szinaptikus membránjában található ligandvezérelt ionotróp receptorok közül is számos mutat permeabilitást Ca^{2+} iránt. Legjelentősebbek a glutamát-receptorok (Hollmann és Heinemann, 1994), de említést érdemelnek a nikotin-típusú acetilkolin receptorok is. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedésében, neurontípusonként változó mértékben, jelentős lehet az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás szerepe is (Simpson és mtsai., 1995).

A szervezetben végbemenő regulációs folyamatok közös sajátossága, hogy a kívánt hatás kifejlődése után a szabályozó paraméter értéke a nyugalmi szintre tér vissza. Ez különösen érvényes a neuronális Ca^{2+} -függő folyamatok esetén, hiszen a rendkívül magas vagy túl hosszú ideig tartó magas intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció az idegsejtekben súlyos citotoxikus, degeneratív következményekkel járhat (Missiaen és mtsai, 2000). Nem meglepő, hogy a neuronok az intracelluláris Ca^{2+} szintet igen hatékonyan csökkentő mechanizmusokkal rendelkeznek.

A citoplazmába belépő Ca-ionokat átmenetileg kalciumkötő fehérjék puffereket. Ezek jelentőségét mutatja, hogy koncentrációjuk emelkedését követően kisebb intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásokat produkál a sejt (Fierro és Llano, 1996). A Ca^{2+} visszavétele az intracelluláris raktárakba az endoplazmatikus retikulum membránjában található SERCA (sarco-endoplasmic reticular Ca^{2+}) pumpa által valósul meg. Jelentős a mitokondriumok Ca^{2+} akkumuláló szerepe is, elsősorban nagy Ca^{2+} -terhelés esetén (Herrington és mtsai, 1996). Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésének legegyszerűbb módja természetesen az extracelluláris térbe történő transzport. Ebben a neuronok membránban jelen lévő Ca^{2+} -pumpa (Carafoli és Stauffer, 1994) és a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus (Blaustein és mtsai, 1991; Philipson és Nicoll, 2000) vesz részt.

1.3. Ca²⁺ belépés az extracelluláris térből

1.3.1. Feszültségvezérelt Ca²⁺-csatornák jellegzetességei

A plazmamembrán feszültségvezérelt Ca²⁺-csatornái aktivációs küszöbük alapján két csoportba oszthatók (Carbone és Lux, 1984; Huguenard, 1996). Az ún. Low-Voltage Activated (LVA) csoport egyetlen képviselője a T-típusú csatorna, mely kismértékű depolarizáció hatására, kb. -70 mV-nál nyílik meg (Nowycky és mtsai, 1985; Beam és Knudson, 1988). A csatorna konduktanciája viszonylag alacsony, mintegy 8 pS. Említésre méltó ezenkívül, hogy ez az egyetlen csatorna, mely gyors aktivációját követően tranziens jellegű Ca²⁺-áramot produkál (azaz gyorsan inaktiválódik).

A High-Voltage Activated (HVA) Ca²⁺-csatornák jellegzetessége, hogy jóval pozitívabb membránpotenciálon aktiválódnak, illetve Ba²⁺-ra permeabilisabbak, mint Ca²⁺-ra (a T-típusú csatorna esetében a Ca²⁺-ra és Ba²⁺-ra mutatott permeabilitás nagyjából megegyezik). A HVA családba több csatorna-altípus tartozik, melyek szelektív gátlószerek alkalmazásával azonosíthatóak.

Az L-típusú Ca²⁺-csatornák specifikus gátlószerei a dihidropiridin (DHP) származékok (pl. nifedipin, nitredipin). Ezen csatornák kb. -20 mV-nál nyílnak, konduktanciájuk számottevő (~25 pS), inaktivációt csak hosszú, kb. 10 s-os impulzus alkalmazása esetén mutatnak (Francini és mtsai, 1992). Az N-típusú Ca²⁺-csatorna átmenetet képvisel a T- és az L-típus között, hiszen már -40 mV-on aktiválódik, inaktivációs tendenciát nem mutat, az egyedi csatornák konduktanciája kb. 12-15 pS. Ezen csatornaféleség szelektív gátlószere a ω -conotoxin. A HVA csoportba tartoznak a P- és a Q-típusú Ca²⁺-csatornák, melyek egymáshoz nagyon hasonló sajátságokat mutatnak, de gátlószerek alkalmazásával elkülöníthetők egymástól: míg a P-típusú csatorna a ω -Agatoxin IVA-val szelektíven gátolható, addig a Q-áram csak kisebb érzékenységet mutat ezen toxin iránt. Létezik végül egy olyan HVA Ca²⁺-csatorna altípus, amelyik egyetlen fent említett gátlószerral nem gátolható, így ezt mint R- (azaz rezisztens) típusú Ca²⁺-csatornát szokás említeni.

A specifikus blokkolószerek mellett a feszültségvezérelt Ca²⁺-csatornák különböző di- és trivalens kationokkal is gátolhatóak (Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Gd³⁺ és La³⁺). Ezen ionok közül néhány hatásosabban gátol meghatározott Ca²⁺-csatornákat, így Ni²⁺-kal elsősorban az LVA, Cd²⁺-kal pedig főleg a HVA áram nagysága csökkenthető.

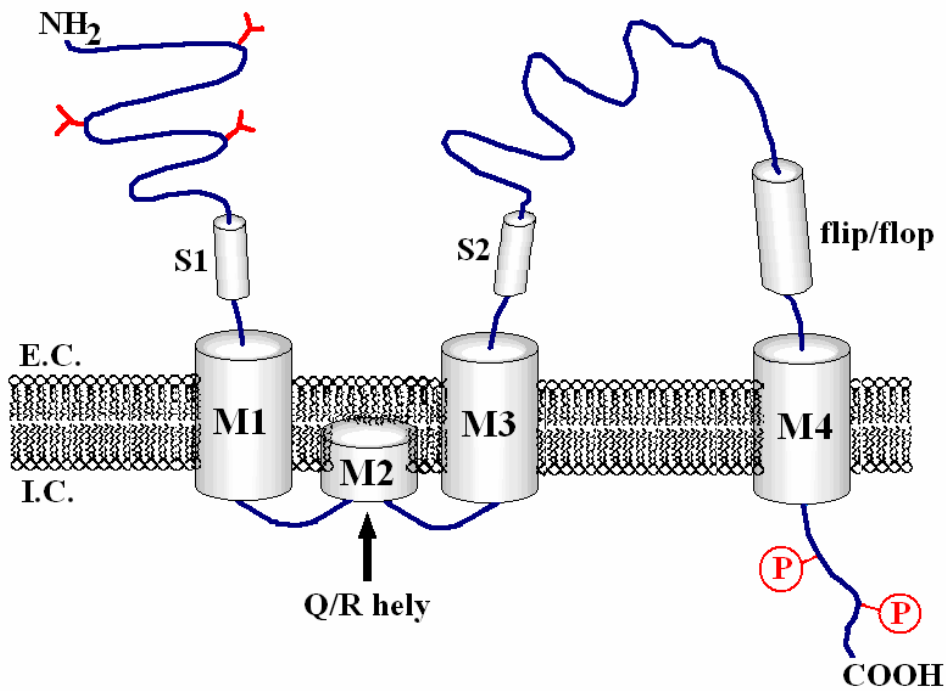
A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerkezete alapvetően hasonló a depolarizáció által aktivált Na^+ - és K^+ -csatornákéhoz. Ugyanakkor az egyes Ca^{2+} -csatorna altípusok eltérő aktivációs, inaktivációs és farmakológiai sajátosságaiért a szerkezetükben megfigyelhető eltérések felelősek. Ismert, hogy ebből a szempontból döntően az α_1 -alegység variabilitása meghatározó (McCleskey, 1994; Hofmann és mtsai, 1994; Dolphin 1995; Perez-Reyes és mtsai, 1998; Chuang és mtsai, 1998). A β -alegységnek az inaktivációs kinetika meghatározásában van kiemelkedő szerepe (Qin és mtsai, 1996).

A egyes feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák - eltérő aktivációs küszöbük miatt - különböző funkcióval bírnak. A kis depolarizációra megnyíló és alacsony konduktanciával rendelkező T-típusú Ca^{2+} -csatorna aktiválódása, megfelelően nagy csatornadenzitás mellett, akár spike-jellegű depolarizációs hullámok kialakulását is eredményezheti (Wang és mtsai, 1991; Viana és mtsai, 1993), aminek jelentősége van a távoli dendriteken kialakuló posztzinaptikus elektrotónusos potenciálok felerősítésében, így az adott bemenet hatékonyságának fokozásában (Huguenard és Prince, 1994). Ezzel szemben a HVA csatornák az ingerületi folyamat létrehozásában nem vesznek részt (hiszen kialakult akciós potenciál hatására nyílnak meg). Aktiválódásuk következménye az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése és különböző Ca^{2+} -függő sejtfolyamatok kialakulása (pl. transzmitterfelszabadulás).

1.3.2. Ligandvezérelt Ca^{2+} -permeábilis ioncsatornák; glutamátreceptorok

A ligandvezérelt ioncsatornák specifikus kémiai anyagok, ligandok megkötését követően ionok mozgását teszik lehetővé a membrán két oldala között. A csatornák szelektivitása eltérő, a Ca^{2+} -permeábilis ionotróp receptorok közül (glutamát-, acetilkolin- és purinoreceptorok) a glutamátreceptorok jelentősége a legnagyobb, hiszen ezek fordulnak elő a legnagyobb gyakorisággal serkentő szinapszisokban az agy különböző területein.

Az ionotróp glutamátreceptorokat eredetileg farmakológiai befolyásolhatóságuk alapján különítették el NMDA és nem-NMDA típusokba. A nem-NMDA receptorcsaládon belül található az AMPA (2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionát), kainát és delta altípusok.



2. ábra
Az ionotróp glutamát receptorok szerkezete

Korábban a glutamát receptorokat, a klasszikus ligandvezérelt ioncsatornához hasonlóan, négy transzmembrán domént tartalmazó (Gasic és Hollmann, 1992), öt alegységből szerveződő receptornak tekintették (Ferrer-Montiel és Montal, 1996). A ma elfogadott álláspont szerint a csatorna tetramer szerkezetű (Rosenmund és mtsai, 1998; Robert és mtsai, 2001) és az egyes alegységek az extracelluláris N-terminális és az intracelluláris C-terminális szakasz mellett három transzmembrán szegmenst tartalmaznak (M1, M3, M4), míg az M2 szakasz egy intracelluláris oldalon belépő és a membránon visszahajló láncrész (lásd 2. ábra; Dingledine és mtsai, 1999). A receptorszerkezet kialakításához az alegységek extracelluláris N-terminális részén található glikozilációs helyek is hozzájárulnak, ugyanis ezek a receptoralegységek összeszerelődését szabályozzák és fenntartják a receptor ligandkötéséhez szükséges konformációt (2. ábra; Kawamoto és mtsai, 1994; 1995). A ligandkötésért felelős oldalláncokat az N-terminális rész M1 domént megelőző S1 szakasza, valamint az M3 és M4 domén közötti hurok S2 részlete tartalmazza (2. ábra; Kuusinen és mtsai, 1995).

Bár az ionotróp glutamát receptorok meglehetősen változatos altípusainak expressziójáért is már 22 gén felelős, az altípusok száma jelentősen növelhető poszttranszkripciós módosításokkal. Az AMPA receptorok M3 és M4 doménje közötti hurok mintegy 38 aminosavból álló szakasza kétféle elsődleges szekvenciát vehet fel a mRNS alternatív vágása eredményeként, melyeket az alegységek flip és flop

változatának nevezzük (Sommer és mtsai, 1990). A két változat funkcionális különbségeket is mutat, miszerint a flop változatot tartalmazó receptorokhoz képest a flip alegységűek lassabban deszenzitizálódnak (Mosbacher és mtsai, 1994), így jelentősebb szerepük lehet a tanulás és emlékezés alapját szolgáló hosszú távú potencírozás kialakulásában (LTP; Sommer és mtsai, 1990). Ugyancsak mRNS szinten bekövetkező módosítás az AMPA- és bizonyos kainátreceptorok pórusformáló M2 doménjének Q/R régiójában megfigyelhető aminosavcsere. Eredetileg ebben a régióban glutamin (Q) található, mely a mRNS szerkesztésével argininre (R) cserélődhet (Sommer és mtsai, 1991). Mivel a glutamin tartalmú, nem szerkesztett alegység biztosítja a csatorna Ca^{2+} -permeabilitását, nem meglepő, hogy a szerkesztett (R) változat létrejöttkor a csatorna impermeabilissá válik Ca^{2+} -mal szemben.

Jelen ismereteink szerint az AMPA receptoroknak négy alegységtípusa van (GluR1-4). A receptoralegységek aminosavsorrendjének összehasonlításából kiderült, hogy a GluR2 Q/R régiójában a Ca^{2+} -impermeabilitást okozó arginin található (Sommer és mtsai, 1991). Az AMPA receptorok homo- és heteromer szerkezetet egyaránt létrehozhatnak és megállapítható, hogy a GluR2 tartalmú AMPA receptorkomplexekben a szerkesztett alegység-változat funkcionális dominanciája érvényesül (Hume és mtsai, 1991), azaz ezek a csatornák kevésbé átjárhatóak Ca^{2+} -ionok számára, viszont Na^{+} -ionokra permeabilisak ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 0,01-0,05$; Burnashev és mtsai, 1992). A GluR2 alegységet nem tartalmazó csatornakomplexnek a Ca^{2+} -permeabilitása elég kifejezett ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 1-3$; Burnashev és mtsai, 1995).

A receptorkomplexek összeállításának nagyfokú variabilitása ellenére az AMPA receptorok néhány dologban megegyeznek. Ilyen tulajdonságok az AMPA hatására kialakuló gyors deszenzitizáció, a csatorna alacsony konduktanciája (<1 pS; Keinänen és mtsai, 1990; Sommer és mtsai, 1990), illetve a NBQX általi szelektív, kompetitív gátlás (Kelly és Zhang, 2002). A GluR1-4 alegységek főleg posztszinaptikusan fordulnak elő (Petralia és Wenthold, 1992), ahol gyors serkentő posztszinaptikus potenciált (EPSP) eredményeznek. A GluR2 alegységet nem tartalmazó receptorok ezenkívül közvetlen szerepet játszhatnak az LTP létrejöttében, mivel nagymennyiségű Ca^{2+} -t képesek beengedni a sejtbe.

A nem-NMDA glutamát-receptorokhoz tartozó kainátreceptoroknak öt alegysége ismert: GluR5-7, KA1 és KA2. Azontúl, hogy glutamát és AMPA is aktiválhatja a csatornát, a legnagyobb válasz kainát megkötésekor tapasztalható. Az öt alegység további két alcsoportba osztható a receptorok kainátkötő képessége alapján. Míg a GluR5-7 alegységek kis affinitással ($K_D=50$ nM), a KA1 és a KA2 alegységek nagy

affinitással ($K_D=5 \text{ nM}$) kötik a kainátot. Említésre méltó, hogy a kainátreceptorok közül a KA1 és KA2 alegységek esetén egyáltalán nem mutatható ki poszttranszkripció módosítás, a GluR5 és GluR6 alegységek viszont mRNS szerkesztésen eshetnek át az M2 doménban (Sommer és mtsai, 1991,1992; Bettler és mtsai, 1992; Lomeli és mtsai, 1992) Az AMPA receptoroknál tapasztaltakkal ellentétben azonban nem minden alegység lesz szerkesztett (R) változatú, illetve a receptorok Ca^{2+} -permeabilitása sem szűnik meg teljesen ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 0,47$), ami azt sugallja, hogy nem egyedül a Q/R hely felelős a kainátreceptor Ca^{2+} -permeabilitásáért (Egebjerg és Heinemann, 1993). Ezzel összhangban Köhler és munkatársai (1993) kimutatták, hogy a GluR6 M1 doménjében két aminosavnak más aminosavakkal történő helyettesítése megváltoztatja a csatorna ion-permeabilitását, így ennek a szakasznak a szerepe is jelentős lehet a csatorna tulajdonságainak meghatározásában.

Expressziós kísérletekben kimutatták, hogy a GluR5 és GluR6 alegységek funkcionális homomer csatornákat képeznek (Egebjerg és mtsai, 1991), azonban a KA1 és KA2 homomerek esetén elektrofiziológiai válasz nem volt tapasztalható (Werner és mtsai, 1991; Herb és mtsai, 1992; Sakimura és mtsai, 1992). Sakimura (1992) és Herb (1992) munkacsoportjai kimutatták, hogy a KA1 és KA2 alegységek funkcionális heteromer csatornákat hoznak létre a GluR5 vagy GluR6 alegységekkel, azok szerkesztett és nem szerkesztett változataival egyaránt. Nem találtak viszont bizonyítékot arra, hogy a GluR7 alegység részt venne funkcionális homo- vagy heteromer csatorna felépítésében (Lomeli és mtsai, 1992; Partin és mtsai, 1993).

A kainátreceptorok és az AMPA receptorok hasonló tulajdonsága a gyors deszenzitizáció, azonban a GluR1-4 csatornák a ligand jelenléte alatt végig fenntartott áramot produkálnak, míg a GluR5 és GluR6 receptorok tranziens jellegű áramot hoznak létre tökéletes deszenzitizációval (Sommer és mtsai, 1992). Jóllehet a kainátreceptorok expressziós szintje szignifikánsan kisebb az agyban mint az AMPA csatornáké (főleg GluR5 esetén; Bettler és mtsai, 1990), jelentős szerepük van a serkentő ingerületátvitelben. Az AMPA receptorokhoz hasonló, jelentős Ca^{2+} -permeabilitásuk ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 1,2$; Egebjerg és Heinemann, 1993) következtében hozzájárulnak a serkentő posztzinaptikus potenciál (EPSP) kialakulásához, illetve az LTP létrejöttében is kiemelkedő jelentőségűek. Tekintettel arra, hogy a mérések során kapott eredmények sok esetben az AMPA és a kainátreceptorok együttes működését tükrözik, elengedhetetlen, hogy a számos nem szelektív antagonistán túl (CNQX, DNQX), specifikus blokkolószerekkel határozzuk meg az egyes receptorok részesedését a

kialakult válaszokban (AMPA szelektív gátlószerek: NBQX, GYKI 52466, GYKI 53655; kainátreceptor szelektív blokkoló: oxim NS-102).

A nem-NMDA glutamát-receptorok kevésbé ismert családját képezik a deltareceptorok, két alegységgel ($\delta 1$, $\delta 2$; Yamazaki és mtsai, 1992a; Lomeli és mtsai, 1993). A deltareceptorok meglehetősen alacsony és diffúz expressziós mintázatot mutatnak az emlős agyban, főleg a kisagy és a hippocampus bizonyos sejtjeiben fordulnak elő (Lomeli és mtsai, 1993). Sejtvonalon végzett transzfekciós vizsgálatok során nem sikerült csatornaaktivitást regisztrálni kainát, AMPA vagy glutamát jelenlétében és a hatás kialakulását lehetővé tevő ligandkötőhelyek jelenlétét sem sikerült kimutatni (Lomeli és mtsai, 1993). Mindez azt sugallja, hogy a deltareceptorok olyan farmakológiailag nem befolyásolható, ligandkötőhely nélküli glutamát-receptor családba tartoznak, melynek feladata egy, a receptorkomplexre irányuló modulációs vagy struktúrális hatás biztosítása.

A glutamát-receptorok fenti csoportjaitól több lényegi vonásban is eltérőek az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptorok, melyeknek öt alegysége különíthető el (NMDAR1, NMDAR2A-D vagy NR1, NR2A-D). Újabban leírtak két NR3 alegységet is, ezek sajátosságairól azonban még nincsenek biztos adatok. Expressziós rendszerekben végzett vizsgálatok során kiderült, hogy az egyes NR2 alegységekből álló homomerek inaktívak, míg az NR1 alegység funkcionális homomer csatornákat alakíthat ki (Sugihara és mtsai, 1992). NR1 és NR2 alegységek heteromer szerkezetben funkcionális csatornát hoznak létre, azonban az NR2 alegységek egymással nem koexpresszálódnak (Monyer és mtsai, 1992). A változatos alegységkombinációk funkcionális eltérésekkel is járnak, heteromer szerkezet esetén nagyobb áramamplitúdók mérhetőek, különösen az NR1/NR2A és NR1/NR2B kombinációban (Meguro és mtsai, 1992; Kutsuwada és mtsai, 1992), ami a csatornák magasabb konduktanciájával magyarázható (Stern és mtsai, 1992, 1994). Az NMDA receptorok nem válaszolnak AMPA-ra vagy kainátra, de aktiválhatóak NMDA-val. Leírták, hogy a kiváltott válasz nagyobb, ha glicin jelenlétében alkalmazzák az agonistát (Yamazaki és mtsai, 1992b), sőt, néhány esetben az is igazolódott, hogy glicin nélkül az agonista nem is aktiválja a receptort (Nakanishi, 1992). Ennek alapján úgy tűnik, hogy a glicin, mint koagonista, elősegíti az agonista hatását.

Az NMDA és a nem-NMDA receptorok szembevető különbözőségének elsődleges oka az M2 domén Q/R helyén található aszparagin, mely több jellegzetes tulajdonságot kölcsönöz az NMDA receptornak. Az egyik fő eltérés a Q/R régióban glutamint vagy arginint tartalmazó AMPA és kainátreceptorokhoz képest a mintegy

hetvenszer nagyobb Ca^{2+} -permeabilitás (Yamazaki és mtsai, 1992b). Ezen túlmenően az aszparagin oldallánca alkalmas Mg^{2+} -k megkötésére a ioncsatorna intracelluláris felszínhez közel. A Mg^{2+} csak jelentős depolarizáció hatására távozik el a pórusból (Nakanishi és mtsai, 1992). Tekintettel arra, hogy Ca^{2+} belépés csak a Mg^{2+} leválása után valósulhat meg, az NMDA receptorok látszólagos feszültségfüggő Mg^{2+} blokkjáról beszélhetünk (Nowak és mtsai, 1984).

Az NMDA receptorok elsődlegesen a posztszinaptikus membránban fordulnak elő, aktiválásuk az AMPA- és a kainátreceptorok ismétlődő stimulációjával létrehozott posztszinaptikus depolarizáció (korai EPSP) hatására következik be, ekkor a csatornák kinyílnak és rajtuk jelentős mennyiségű Na^+ és Ca^{2+} áramlik a sejtbe ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}=10:6$), aminek kiemelkedő jelentősége van a késői EPSP kialakulásában. Az NMDA receptorválasznak azonban mind a kialakulása, mind a megszűnése igen lassan megy végbe. Bár a glutamát megkötése gyorsan bekövetkezik, a csatorna mégis lassan nyílik meg (Dzubay és Jahr, 1996), ami a csatorna sok nyitott és zárt állapotával magyarázható (Gibb és Colquhoun, 1992), de okozhatja a glicinkötés kialakulásához vagy a Mg^{2+} -blokk megszűnéséhez szükséges idő is. Az a tény, hogy az NMDA receptorok az AMPA csatornákhöz képest nagyobb affinitással kötik a glutamátot ($EC_{50\text{NMDA}} = \text{néhány } \mu\text{M}$; $EC_{50\text{AMPA}} = 0,5\text{-}10 \text{ mM}$), magyarázatot adhat arra, hogy miért marad a ligand hosszabb ideig a receptoron, így hozva létre a lassabb, hosszabb ideig tartó választ (Lester és Jahr, 1992). A fentiek következtében az NMDA receptorok szerepe tűnik jelentősebbnek a hosszú távú potenciáció (LTP) kialakításában. Az NMDA receptorválasz számos antagonistával gátolható, így kompetitív (pl. AP-5: 2-amino-5-phosphonopentanoic acid) és nem kompetitív (MK-801) blokkolókkal egyaránt.

Számos tanulmány számolt be az ionotróp glutamátreceptorok megoszlásáról a nucleus cochlearisban és a különböző emlősfajokban meglepően hasonló eredmények születtek. A GluR2-4 AMPA receptorok a mag egész területén megtalálhatóak (Kemmer és Vater, 2001; Korada és Schwartz, 2000; Petralia és mtsai, 1996, 2000; Schwartz és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 1998), azonban a GluR1 alegység előfordulása csak néhány területre korlátozódik (Petralia és mtsai, 2000; Schwartz és mtsai, 2000; Zheng és mtsai, 2000). Az NMDA receptorok közül az NR1 kiterjedten fordul elő a magban, míg az NR2 alegységek csak bizonyos sejtípusokban mutathatók ki (Petralia és mtsai, 2000). Igen fontos tény, hogy a GluR2 alegység expressziója a mag területén feltűnően alacsony (Petralia és mtsai, 1996; Schwartz és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 1998), ezért jelentős Ca^{2+} belépés valósulhat meg az AMPA receptorokon keresztül

glutamaterg ingerületátvitelkor. Úgy tűnik, hogy az akusztikus rostok által a nucleus cochlearis sejtjeihez szállított információ gyors és pontos továbbításának feltétele a gyors kinetikájú és deszenzitizációjú AMPA receptorok működése. Irodalmi adatok alapján ismertté vált, hogy azon neuronok, melyek egyedül a hallórostoktól kapnak bemenetet, gyors EPSP-t hoznak létre, tekintettel alacsony GluR2 expressziójukra. Ezzel szemben azon sejtek, melyek az akusztikus rostokon túl a parallel rostokkal is szinaptikus kapcsolatban állnak, intenzívebb GluR2 expressziójuk miatt lassabb EPSP-produkálnak (Schwartz és mtsai, 2000; Gardner és mtsai, 1999).

Különösen komplex képet mutat a DCN-ben található piramis-sejtek glutamát receptorainak megoszlása. A hallóideg-rostokkal szinaptikus kapcsolatban álló bazális dendritfán döntően GluR4 jelenléte igazolható (Rubio és Wenthold, 1999), míg a parallel rostokat fogadó apikális dendritfán GluR2/3 (Hunter és mtsai, 1993) mutatható ki. Ami a többi nem-NMDA alegységet illeti, a GluR1-et nem expresszálják a piramis-sejtek, a GluR6/7 és a KA2 alegységek pedig kis mennyiségben mutathatóak ki a DCN-ben (Petralia és mtsai, 1994, 1996). Az NMDA alegységek közül az NR1 és az NR2A-C jelenléte igazolódott a piramis-sejteken, míg az NR2D csak alacsony expressziót mutatott (Sato és mtsai, 1998). Az NR2A/B heteromer receptorok mindkét dendritfán megtalálhatóak, közel egyforma megoszlásban. Az NR1 alegység ugyanakkor egyenlőtlen eloszlást mutat a piramis-sejten, csak az apikális dendritfán sikerült kimutatni jelenétét, a bazális dendritekben nem expresszálódik (Bilak és mtsai, 1996).

1.4. Ca²⁺-felszabadulás az intracelluláris raktárakból

A neuronok Ca²⁺-homeosztázisa szempontjából fontos, bár típusonként eltérő jelentőségű az intracelluláris Ca²⁺-raktárakból történő Ca²⁺-felszabadulás. Az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában található rianodinreceptorok (RyR) az extracelluláris térből belépő Ca²⁺ hatására aktiválódnak (Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás; CICR). Az ER Ca²⁺-csatornáinak másik típusa a felszíni membrán metabotróp receptorai (pl. mGluR1-6 glutamát-, purino-, muszkarinos kolinerg és szerotonin receptorok) hatására keletkező inozitol-triszfoszfát (IP3) hatására nyílik meg (IP3-indukált Ca²⁺-felszabadulás; IICR).

Mindkét csatornaféleség homotetramer szerkezetű, az egyes alegységek négy transzmembrán doménből állnak (Radermacher és mtsai, 1992; Furuichi és mtsai, 1994). A jelentős szerkezeti hasonlóság ellenére a két csatorna tulajdonságai eltérőek. Míg a RyR Ca²⁺-konduktanciája 100-150 pS (Ashley, 1989), addig az ennél kisebb

méretű IP₃-csatorna konduktanciája jóval kisebb (10-26 pS; Bezprozvanny és mtsai, 1991). A RyR és az IP₃ receptoroknak számos, szövetspecifikusan előforduló izoformája létezik. A RyR1 a harántcsíkolt izomban, a RyR2 a szívizomban, a RyR3 pedig az agyban fordul elő elsősorban. Az agyban mindhárom izoforma jelenléte kimutatható, jóllehet a RyR2 izoforma expressziója a legintenzívebb (Sharp és mtsai, 1993a, 1993b). Az IP₃ receptorok mindhárom ismert izoformája (IP₃R1-3) jelen van az agy különböző területein, közülük az IP₃R1 mennyisége dominál (Furuichi és mtsai, 1994).

A RyR működése befolyásolható többek között koffein vagy rianodin alkalmazásával. A koffein 5 mmol/l-nél kisebb koncentrációban érzékenyíti a csatornát Ca²⁺ iránt, így már alacsonyabb intracelluláris Ca²⁺-koncentráció esetén aktiválódik a RyR. 5 mmol/l-nél több koffein már önmagában is nyitja a csatornát (Sitsapesan és Williams, 1990), így akár a belső raktár teljes kiürülése is megtörténhet. Az elsősorban nyitott konformációjú csatornához kötődő rianodin kisebb koncentrációban (<10 µmol/l) közbülső konduktanciaszinten stabilizálja a csatornát, magasabb koncentrációban (kb. 100 µmol/l) a csatorna használatfüggő („use-dependent”) gátlását hozza létre.

A RyR és az IP₃ csatornák számos, a működésüket befolyásoló modulációs hellyel is rendelkeznek (foszforiláció, adenin-nukleotid kötés), de a legjelentősebb talán az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció hatása. Mindkét csatorna bezárul, ha az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció túl alacsony (<0,1 µmol/l) vagy túl magas (>1 µmol/l; Bezprozvanny és mtsai, 1991). Ez a visszacsatolás igen fontos a neuronok megfelelő Ca²⁺-homeosztázisa, így optimális funkciója szempontjából. Az IP₃ receptorok működése a lumenális oldalon található Ca²⁺-nal is befolyásolható, ugyanis míg magas lumenális Ca²⁺-koncentráció fokozza a Ca²⁺-felszabadulást a belső raktárakból (Oldershaw és Taylor, 1993), alacsony koncentráció esetén dominál az ER Ca²⁺-akkumulációja (Nunn és Taylor, 1992; Taylor, 1992).

Annak ellenére, hogy az ER a neuronok valamennyi részén megtalálható (szóma, dendrit, axonvégződés), az IP₃ és a RyR csatornák megoszlása az idegsejtekben nem egyenletes és a különböző agyterületeken valamint sejtípusokban is meglehetősen nagy variabilitást mutat (Sharp és mtsai, 1993a, 1993b; Takei és mtsai, 1992).

Több szerző mutatott ki összefüggést a Ca²⁺-raktárak mobilizációja és neuronális események között. A belső raktárak szerepe kiemelkedő az axonképzésben (Kocsis és mtsai, 1994), a neuronális differenciációban és érésben (Holliday és mtsai, 1991), valamint a neurotranszmisszióban (Bouchard és mtsai, 2003). Számos vizsgálat

bizonyította, hogy az NMDA receptorok által létrehozott sejtválaszok kialakulásában (pl. LTP) jelentős szerep hárul az intracelluláris Ca^{2+} -raktárakra (Obenaus és mtsai, 1989; Harvey és Collingridge, 1992; Bortolotto, 1993), ugyanis az ER mintegy felerősíti és megnyújtja a felszíni csatornák által létrehozott Ca^{2+} -jelet (Meldolesi, 2002). Korábbi feltételezés szerint csak az idegrendszer perifériás területein található neuronok rendelkeznek nyugalmi állapotban is Ca^{2+} -nal töltött belső raktárakkal, melyek feladata a különböző Ca^{2+} -függő folyamatok aktiválása. Ezzel szemben a centrálisan elhelyezkedő neuronok Ca^{2+} -raktárai üresek, szerepük a Ca^{2+} akkumulációja révén a sejtek megóvása a Ca^{2+} citotoxikus hatásától (Shmigol és mtsai, 1994). Ezt az elképzelést később Kano és munkacsoportja (1995) megcáfolta, kimutatva, hogy kisagyi Purkinje sejtek esetén is kiváltható Ca^{2+} -felszabadulás a belső raktárakból.

Tekintettel arra, hogy mind az expresszált RyR és IP3 csatornák száma, mind az intracelluláris illetve luminális Ca^{2+} -koncentrációk sejtenként eltérőek, nem meglepő, hogy az ER-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás jelentős variabilitást mutat, és a kétféle csatorna sejtenként eltérő részeseledést mutat a Ca^{2+} -tranziensek kialakításában. A variabilitást fokozza a csatornatípusok közötti interakció: az IICR elősegíti a CICR-t, míg a RyR-on keresztül felszabadult Ca^{2+} a foszfolipáz-C és az IP3 receptor érzékenyítésén keresztül fokozza az IICR-t.

1.5. Ca^{2+} -kötő fehérjék szerepe a kalcium-homeosztázisban

A neuronok aktivitását kísérő magas intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésében számos eltávolító mechanizmus mellett fontos szerepet kapnak a neuronok citoplazmájában található kalciumkötő fehérjék, melyek a Ca^{2+} átmeneti megkötésével pufferelik az intracelluláris Ca^{2+} -okat. Míg ezen fehérjék egy csoportjának a jelenléte a szervezet legtöbb sejtípusában kimutatható (kalmodulin, α -aktinin, protein kináz C), a neuronok csak rájuk jellemző pufferfehérje-készlettel is rendelkeznek (kalretinin, kalbindin). A kalciumkötő fehérjék funkciójuk szerint is feloszthatóak két csoportra. A jól körülírt szabályozó feladattal rendelkező ún. „trigger” proteinek különböző enzimek és ioncsatornák működését modulálják (pl. kalmodulin), a pufferfehérjéknek ezzel szemben elsődleges feladata a neuronok aktivitásával párhuzamosan kialakuló intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változások lassítása és csökkentése (parvalbumin, kalretinin, kalbindin). Annak ellenére, hogy ismereteink szerint a pufferfehérjék közvetlenül nem vesznek részt speciális sejtfunkciók létrehozásában, a Ca^{2+} pufferelésével befolyásolhatnak különböző Ca^{2+} -függő szabályozó folyamatokat (Baimbridge és mtsai, 1992).

A kalciumkötő fehérjék közös szerkezeti sajátossága az „EF hand” domén, mely egy úgynevezett hélix-hurok-hélix szerkezetű konszenzus aminosavszekvenciát tartalmaz (Pochet és mtsai, 1990; Heizmann és Hunziker, 1991). Az egyes proteinek több doménnel is rendelkezhetnek, így több Ca^{2+} kötésére is képesek. A neuronok konvencionális fehérjéi közül a kalretinin (CR) öt, a kalbindin (CB) négy kalciumionot köt meg, míg a parvalbumin (PA) három kötőhellyel rendelkezik, melyek közül kettő Ca^{2+} helyett Mg^{2+} -t is köthet. Tekintettel arra, hogy a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mellett a CR és CB szabad, ionmentes formában van jelen, a Ca^{2+} -kal meglehetősen gyorsan lépnek reakcióba, ha azok koncentrációja a citoszólban megemelkedik. Ezzel szemben a PA nyugalomban Mg^{2+} -okat köt, melyek csak magasabb intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció esetén cserélődnek ki Ca^{2+} -ra. Ennek eredményeként a PA jóval lassabban köti meg a Ca^{2+} -t, a folyamat kinetikáját elsősorban a Mg^{2+} disszociációs állandója határozza meg (Lee és mtsai, 2000).

Számos neuron funkcionális vizsgálata bizonyította, hogy a kötőfehérjék jelentős pufferkapacitást képviselnek. Ennek eredményeként a sejtbe belépő Ca^{2+} jelentős része szinte azonnal a kötőfehérjékhez kapcsolódik, miközben csak kis mennyisége (mintegy 0,1-1 %) marad szabad formában a citoplazmában (Gorman és Thomas, 1980; Neher és Augustine, 1992; Belan és mtsai, 1993a,b; Müller és mtsai, 1993; Tse és mtsai, 1994). A magas pufferkapacitás mellett a proteinek meglehetősen alacsony affinitással kötik a Ca^{2+} -okat (K_{dCR} és $K_{dCB} = 0,3-0,5 \mu\text{mol}$, $K_{dPA} = 0,01-0,1 \mu\text{mol}$; Stevens és Rogers, 1997).

Bár a kalciumkötő fehérjék funkciójával kapcsolatban még számos kérdés megválaszolatlan, néhány fontos tény már ismert. A proteinek jelentős pufferoló hatásuk révén megvédik a neuronokat a magas és/vagy hosszan tartó intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedés citotoxikus hatásától. Erre utal az a megfigyelés, miszerint az intracelluláris pufferkapacitás növelése esetén a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nem változik meg, de csökken a depolarizáció hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziens nagysága, a felszálló szár meredeksége és megváltozik a leszálló szár kinetikája (Chard és mtsai, 1993). A pufferfehérjék a neuronok működését úgy is befolyásolják, hogy megváltoztatják az akciós potenciál időtartamát, a Ca^{2+} -függő K^+ -áram csökkentésével elősegítik a neuronok tüzelését (Baimbridge és mtsai, 1992), illetve a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatorna Ca^{2+} -függő inaktivációjának csökkentésével fokozzák a sejt ingerlékenységét (Köhr és mtsai, 1991; Hillman és mtsai, 1991). Tekintettel arra, hogy az intracelluláris tér jelentős pufferkapacitása miatt a Ca^{2+} citoszólikus diffúziója meglehetősen lelassul, lokális Ca^{2+} -válaszok alakulhatnak ki az intracelluláris térben,

aminek kifejezett jelentősége lehet transzmitter felszabadulás során. Szintén a kalciumkötő proteinek pufferoló képességével és alacsony affinitásával magyarázható, hogy az intracelluláris térben a szabad Ca^{2+} -koncentráció koncentrikus körben, kívülről befelé csökkenést mutat, azaz a legmagasabb ($\mu\text{mol/l}$ -es nagyságrendű) Ca^{2+} -koncentrációt közvetlenül a plazmamembrán alatt mérhetjük (Augustine és Neher, 1992).

A pufferfehérjék sejten belüli eloszlására vonatkozó adatok ellentmondásosak. Több tanulmány szerint azok a citoplazmában diffúz módon helyezkednek el, más (elektronmikroszkópos) vizsgálat során az derült ki, hogy elsősorban az idegvégződések apikális részére lokalizálódnak, mikrovezikulákhoz és a mitokondrium külső membránjához asszociálódva (Dechesne és mtsai, 1991). Hack és munkatársai (2000) csirke nucleus magnocelluláris sejtekben közvetlenül a plazmalemma alatt mutatták ki a CR-t, melynek lokalizációja szembetűnően változott az életkorral.

Számos munkacsoport vizsgálta a pufferfehérjék expresszióját a központi idegrendszer különböző területein (Baimbridge és mtsai, 1992; Hirsch és Oertel, 1988) és közülük néhányan jelentős hasonlóságokat fedeztek fel a különböző neuronfélések pufferfehérje mintázata között, ami közös fejlődési eredetet vagy funkcionális kapcsolatot tételez fel (Baimbridge és mtsai, 1992). A kisagy, az agykéreg és a hippocampus területén a pufferfehérjék és a GABA-termelő sejtek szisztematikus kolokalizációja mutatható ki, sőt, az egyes proteinek csak a GABAerg sejtek jól elkülöníthető populációiban expresszálódnak (Celio, 1986, 1990; Rogers, 1992). Ezek a megfigyelések a kalciumkötő fehérjék és egyes neuronműködések kapcsolatát sugallják. Ezzel szemben más adatok azt mutatták, hogy a kalciumkötő fehérjék nagyon változó expressziós mintázatot mutathatnak a különböző neuronfélések esetén, és nincs összefüggés a sejtek pufferfehérje tartalma valamint funkciója között (Vater és Braun, 1994). Igaz, a CR és a CB szerkezete között megfigyelhető mintegy 58%-os homológia feltételezi a két fehérje hasonló funkcióját és azt, hogy egymást helyettesíthetik (D'Orlando és mtsai, 2001).

1.6. Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok jelentősége a neuronok működésében

A neuronok Ca^{2+} -homeosztázisának hosszútávú fenntartásában is fontosak azok a mechanizmusok, melyek az intracelluláris térből eltávolítják a sejtaktivitás kapcsán bekerülő Ca^{2+} -okat. Ez részben az extracelluláris tér irányába valósulhat meg, ebben a plazmamembrán Ca^{2+} -pumpája (PMCA), illetve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmusa játszik szerepet. Másrészt a Ca^{2+} eltávolítása történhet az ER-ba és a mitokondriumokba

történő felvétel révén. Az idegsejtekben az egyes mechanizmusok részaránya meglehetősen nagy változatosságot mutat, sőt, ugyanazon sejt esetén is a kialakuló Ca^{2+} -válasz nagysága befolyásolja a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok működését és részeseződését (Fierro és mtsai, 1998).

A sejtmembránban található, Schatzmann által (1966) leírt Ca^{2+} -pumpa abba a P-típusú ATP-áz családba tartozik, mely a szervezet legtöbb sejtípusában megtalálható. A számos izoformában előforduló pumpa tömege meglehetősen nagy (135 kDa, kb. 1200 aminosav), 10 transzmembrán domént tartalmaz (Carafoli, 1992). A PMCA működésének szabályozásában jelentős szerepe van a Ca^{2+} -kalmodulin komplexnek, mely az intracelluláris C-terminális részben található regulatórikus helyhez kötődve fokozza a Ca^{2+} transzportsebességét. A PMCA alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ esetén aktiválódik, így a sejttevékenység során megemelkedő citoszólikus Ca^{2+} -koncentrációval párhuzamosan az eltávolító folyamat is elkezdődhet. Irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a citoplazmába bejutó Ca^{2+} közel 30 %-a rögtön a bejutás után visszakerül az extracelluláris térbe (Tepikin és mtsai, 1991, 1994). Tekintettel arra, hogy a PMCA meglehetősen gyors kinetikát mutat, hatékonyan módosíthatja a neuronok működése kapcsán kialakuló Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját és időviszonyait. Ezt a hatást leginkább a gátlószereinek (pl. LaCl_3) jelenlétében megfigyelt változásokból lehet megbecsülni. Szenzoros neuronon végzett kísérletek során La^{3+} alkalmazásakor a tranziensek leszálló szára jelentősen módosult, amennyiben a gátlószer jelenlétében fennmaradó platófázis alakult ki. Ha a PMCA mellett az ER Ca^{2+} -pumpáját is gátolták, szinte teljesen eltűnt a Ca^{2+} -tranziens leszálló szára, ami a két pumpa együttes szerepére hívja fel a figyelmet (Kostyuk és mtsai, 1989; Usachev és mtsai, 1993).

A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus alapvető sajátossága a citoplazmatikus Ca^{2+} elektrokémiai gradienssel szemben történő transzportja az extracelluláris térbe, amit a Na -ionok elektrokémiai gradiensnek megfelelő mozgása tesz lehetővé. Leírták azonban a folyamat bizonyos kémiai anyagok hatására bekövetkező megfordulását is, amikor a glutamát hatására megemelkedő intracelluláris Na^+ -koncentráció eredményeként befelé irányul a Ca^{2+} -transzport (Kiedrowski és mtsai, 1994). Jóllehet a transzportfehérje számos szövetben előfordul, leggyakrabban szívizomból izolálták. Jellegzetessége a kb. 1000 aminosavból álló és 11 transzmembrán domént tartalmazó szerkezet (Nicoll és mtsai, 1990). A transzport első lépéseként egy Ca^{2+} a fehérje citoplazmatikus felszínén található nagy affinitású helyhez kötődik, ahonnan, a protein konformációváltozását követően, az extracelluláris oldalon leválik. Ekkor 3 Na^+ kapcsolódik ugyanehhez a régióhoz, melyek egy újabb konformációváltozást követően a sejtbe transzportálódnak.

A sejtbe bejutott extra pozitív töltés miatt a cseremechanizmus elektrogén természetéről szokás beszélni.

Kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy mi a szerepe neuronokban a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmusnak a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció biztosításában és sejtaktivitást követően citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció csökkentésében. A kisszámú adat alapján azonban úgy tűnik, hogy a perifériás és a centrális neuronokban a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -antiport jelentősége eltérő. Több munkacsoport kimutatta, hogy a perifériás neuronok nem expresszálják membránjukban a fehérjét (Thayer és Miller, 1990; Benham és mtsai, 1992; Shmigol és mtsai, 1995), míg a centrális idegsejtekben a cseremechanizmus gátlása jelentős neurotoxicitás kialakulását eredményezi glutamát alkalmazása kapcsán (Andreeva és mtsai, 1991). Mivel nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ esetén az antiport transzportsebessége rendkívül alacsony, Ca^{2+} -eltávolító szerepe csak magas citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció esetén figyelhető meg.

Az ER membránjában található Ca^{2+} -pumpa (SERCA) legtöbb sejtben a PMCA-val együtt expresszálódik. Annak ellenére, hogy a SERCA és a PMCA pumpák egyaránt a P-típusú Ca^{2+} ATP-áz családba tartoznak, szerkezetük és működésük nem teljesen azonos. A SERCA pumpa is 10 transzmembrán doménből áll, melyek közül az M4, M6 és M9 szakasz kitüntetett jelentőségű a Ca^{2+} -transzportban (Clarke és mtsai, 1989). Három altípusa ismert, melyek közül a SERCA1 elsődlegesen harántcsíkolt izomban fordul elő, a SERCA2 számos szövetben megtalálható, míg a SERCA3 megoszlása kevésbé ismert. A pumpa két Ca^{2+} -ion transzportját végzi egyszerre, melyek a citoplazmatikus felszínen elhelyezkedő nagy affinitású kötőhelyekhez kötődnek. A pumpa ATP-függő foszforilációja és a következményesen kialakuló konformációváltozása eredményeképpen a Ca^{2+} a lumenális oldalra helyeződik át, majd leválik az alacsony affinitásúvá vált kötőhelyről. A folyamat végén az alacsony affinitású hely H^+ -t köt, majd a pumpa defoszforilálódik és újbóli konformációváltozással visszarendeződik a kiindulási állapotba.

A SERCA pumpa kalmodulin inszenzitív, a Ca^{2+} azonban közvetlenül befolyásolja a pumpa működését: magas citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ fokozza a Ca^{2+} transzportját az ER-ba, míg magas lumenális Ca^{2+} tartalom gátolja a pumpa működését. A SERCA pumpa hatásosan és szelektíven gátolható tapszigarginnal (TG; nmol/l-es koncentrációban; Thastrup és mtsai, 1990) és ciklopiazonsavval (CPA; $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban; Seidler és mtsai, 1989).

Annak ellenére, hogy az idegsejtek SERCA pumpa tartalma nem kérdéses, jelentősen megoszlának a vélemények annak szerepéről a Ca^{2+} -eltávolító

folyamatokban. Shmigol és munkatársai (1994) egér hátsó gyöki ganglionokból izoláltak neuronokat, és a sejtek Ca^{2+} -válaszainak kinetikáját elemezve két sejtpopulációt találtak. Az ún. kis sejtek által létrehozott Ca^{2+} -tranziensek leszálló szára minden esetben lassú kinetikát mutatott és TG jelenlétére nem reagált. A nagy sejtek tranziensei ezzel szemben gyorsabb kinetikájúak voltak és TG hatására jelentősen lassult leszálló száruk. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a SERCA pumpa szerepe a Ca^{2+} -válaszok kinetikájának meghatározásában csak bizonyos idegsejtféleségek esetén jelentős. Tekintettel arra, hogy a pumpa, nagy Ca^{2+} -affinitása következtében, már alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ esetén is aktiválódik, kiemelkedő jelentősége van a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kialakításában.

A mitokondriumok szerepe az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásában régóta ismert. Kezdetben feltételezték, hogy a mitokondriumok funkciója egyszerűen az intracelluláris Ca^{2+} felvétele és raktározása. Később kimutatták, hogy a mitokondriális Ca^{2+} -transzporterek affinitása sokkal kisebb annál, semhogy a nyugalmi vagy a stimuláció során megemelkedett citoszólikus Ca^{2+} -koncentráció esetén jelentősen aktiválódjanak. Napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy más lehetőségek is vannak a Ca^{2+} eltávolítására és raktározására (lásd fent), ugyanakkor a mitokondriális Ca^{2+} -felvétel a mitokondriális mátrix enzimeinek szabályozásával hozzájárul a sejt energiaforgalmának beállításához. Emellett a mitokondriumokat továbbra is a citoszólikus Ca^{2+} -koncentráció változások időbeli és térbeli szabályozóiként lehet tekinteni (Brini, 2003).

A Ca^{2+} a külső mitokondriális membránon az ún. VDAC (voltage dependent anion channel) útvonalon jut keresztül, ami más ionok és kisméretű molekulák átjutását is lehetővé teszi. A Ca^{2+} átjutását a csatornán keresztül feltételezhetően az IP_3 -receptor szabályozza (Hajnoczky és mtsai, 2002). A belső mitokondriális membránon a Ca^{2+} -okat egy szelektív uniporter juttatja keresztül, a hajtóerő a belső membrán két oldala közötti, -180 mV körüli potenciálkülönbség. Az uniportert a ruténiumvörös, divalens kationok (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+}) és lantanidák gátolják, utóbbiakat az uniporter szintén képes szállítani (Brini, 2003).

A mitokondriumokban Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok is működnek, ezek a $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ illetve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport. Az előbbi alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál telítődik, így kevésbé effektív, míg a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport jelentősebb szereppel bír a Ca^{2+} -forgalomban. Utóbbi gátlószereként a Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , valamint egyes, gyógyszerként is alkalmazott molekulák (amilorid, diltiazem, clonazepam, CGP37157) említhetők.

A felsorolt mitokondriális transzportmechanizmusok mellett újabban került a figyelem középpontjába egy nem szelektív, nagy vezetőképességű csatorna, az úgynevezett PTP (permeability transition pore), amely az apoptózis korai szakaszában aktiválódva a mitokondriumok duzzadását, a külső membránjuk repedését és így caspase kofaktorok, (pl. citokró-m-c) citoplazmába kerülését idézi elő (Brini, 2003).

A mitokondriumok hatékony és gyors Ca^{2+} -felvétele elhelyezkedésükkel magyarázható. Azon mitokondriumokban ugyanis, amelyek a Ca^{2+} -felszabadulás (vagy a Ca^{2+} -belépés) helyszíneéhez – azaz az ER-hoz és a sejt felszíni Ca^{2+} -csatornához – közel helyezkednek el, a lokálisan kialakuló magas Ca^{2+} -koncentráció miatt az uniporterek hatékonyan tudnak működni. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az ER és a mitokondriumok felszínének 5%-a szoros kapcsolatban van egymással (Rizzuto és mtsai, 1998). Montero és munkatársai kimutatták, hogy kromaffin sejtekben a mitokondriumok két csoportra oszlanak: a magas citoszólikus koncentrációhoz közel található jelentős szerepet játszanak a Ca^{2+} felvételében, a távol levők nem vesznek fel Ca^{2+} -okat (Montero és mtsai, 2000).

A mitokondriumok Ca^{2+} -homeosztázisban játszott legfontosabb szerepe valószínűleg az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásainak térbeli és időbeli szabályozása. A mitokondriumok képesek arra, hogy a rövid, nagy intenzitású Ca^{2+} -jelet időben elhúzódozóbbá és kisebb amplitúdójúvá tegyék (lásd Friel, 2000). Erre utal például az a megállapítás, hogy astrocytá-kban és szívizomsejtekben az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca^{2+} mitokondriális depolarizációt és Ca^{2+} -felvételt eredményezett (Duchen és mtsai, 1998, Jacobson és mtsai, 1998). Egyes, polarizált sejtekben az intracelluláris Ca^{2+} -megoszlás szabályozásában is szerepet kapnak a mitokondriumok. Pancreas acinaris sejtekben például a granuláris régiót körülvevő mitokondriumok megakadályozzák a Ca^{2+} -koncentráció növekedés terjedését a szekretoros pólustól a basolateralis régió felé (Tinel és mtsai, 1999).

A Ca^{2+} és a mitokondriumok kapcsolatára vonatkozó érdekes új adat szerint az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változása piramis-sejtekben módosítja a mitokondriumok mikrotubulusok mentén megfigyelhető mozgását: a nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció esetén maximális motilitást lehetett megfigyelni, míg 1-2 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációnál a mitokondriumok mozgása megszűnt (Yi és mtsai, 2004).

1.7. Munkacsoportunk korábbi, a disszertáció anyagát megalapozó eredményei

A disszertációban bemutatott kísérleteket alapozták meg munkacsoportunk korábbi munkái, amelyek a nucleus cochlearis piramis-sejtjeinek felszínén található feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák funkciójának megismerését célozták. Izolált sejteken igazoltuk, hogy e neuronok LVA és HVA (L-, N-, P/Q-típusú) csatornákat egyaránt expresszálnak (Harasztosi és mtsai, 1999, 2001). Vizsgáltuk az egyes csatorna altípusok szerepét az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció befolyásolásában (Harasztosi és mtsai, 2001; Rusznák és mtsai, 2000, 2001). A K^+ -depolarizáció hatására létrejött intracelluláris Ca^{2+} -tranziensek kialakításában valamennyi Ca^{2+} -csatorna részt vesz ugyan, de az N-típusú csatorna működése a meghatározó. Adataink szerint a piramis-sejtek nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációja alacsony, a kiváltott Ca^{2+} -tranziensek pedig minden esetben gyors kinetikájú fel- és leszálló szárral rendelkeztek. A piramis-neuron koffein-szenzitív Ca^{2+} -raktárai nyugalomban üresnek tűntek, a depolarizáció hatására azonban feltöltődtek Ca-ionokkal.

1.8. Célkitűzések

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

1. Extracellulárisan alkalmazott glutamát hatására kialakuló citoplazmatikus Ca^{2+} -tranziensek sajátosságainak vizsgálata a nucleus cochlearis dorsalis részéből enzimatikusan izolált piramis-neuronokon. Az NMDA és AMPA receptorok valamint a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerepe a tranziensek létrejöttében. A K^+ és a glutamát hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziensek sajátosságainak összehasonlítása.

2. A nucleus cochlearis projekciós neuronjaiban a Ca^{2+} -puffer fehérjék (kalbindin, kalretinin és parvalbumin) jelenlétének és megoszlásának vizsgálata úszószeleteken, immunhisztokémiai módszerekkel. Az egyes fehérjék kolokalizációjának vizsgálata kettős immunjelöléssel.

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

2. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Kísérleti állatok, a preparálás főbb lépései

A kísérletekhez Wistar patkányokat használtunk (Rusznák és mtsai, 2001). A nucleus cochlearis preparálását kb. -2°C -os, csökkentett Na^{+} -koncentrációjú mesterséges cerebrospinalis folyadékban (továbbiakban aCSF) végeztük (az oldat összetételét lásd az 1. táblázatban). Az állat dekapitációját követően sagittalis metszést ejtettünk a fejbőrön, valamint a nyaki csonkon maradt izomzaton. Ezt követően átmetsztük a cranialis nyakcsigolyák csigolyaívét, majd a koponyán egy sagittalis és egy, a két orbitát összekötő, coronalis irányú metszést ejtettünk. A koponytetőt ezen vágások után eltávolítottuk. A bulbus olfactoriusok, valamint az erek és agyidegek (köztük a legmarkánsabb nervus trigeminus) átmetszése után az agyat kibuktattuk. Ezt követően a nagyagyat leválasztottuk az agytörzsről, majd preparálómikroszkóp alatt az arachnoideát és a plexus chorioideust eltávolítottuk. Ekkor a kisagy megemelésével láthatóvá vált a nucleus cochlearis, ami viszonylag könnyen azonosítható a környezetéből kissé kidomborodó könnyecsepp alakja alapján.

2.2. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése

2.2.1. Neuronok enzimátikus izolálása

A kísérletekhez 6-11 napos patkányokat használtunk. A megtisztított agytörzsről a nucleus cochlearist csipesz segítségével lefejtettük, majd kb. felénél történő harántmetszéssel elkülönítettük a ventralis és a dorsalis részeket, lehetővé téve a DCN-ben található piramis-neuronok könnyebb izolálását.

A DCN-t tartalmazó szövetdarabot ezután 31°C -ra melegített, 95 % O_2 -t és 5 % CO_2 -ot tartalmazó gázkeverékkel folyamatosan buborékolgatott, immár szokásos Na^{+} -koncentrációjú („normál”) aCSF-ben inkubáltuk (összetételét lásd az 1. táblázatban), amely 0,3 mg/l kollagenázt (type IA) és 1,2 mg/l proteázt (type XIV) is tartalmazott (40 perc). Az enzimhatást 1 g/l koncentrációjú, normál aCSF-ben oldott tripszin inhibitor (type I-S) segítségével állítottuk le (1-2 perc). Az immár elkocsonyásodott szövetdarabkát polírozott végű Pasteur-pipettával végzett igen óvatos mechanikai trituráció segítségével diszpergáltuk HEPES-pufferelt aCSF-ben (összetételét lásd az 1. táblázatban).

1. táblázat
A kísérletekben alkalmazott oldatok

	Normál aCSF	Alacsony Na⁺- tartalmú aCSF	HEPES pufferelt aCSF	HEPES pufferelt B oldat (extracellu- lális oldat)
pH	7,2	7,2	7,2	7,2
Ozmolaritás (mOsm/l)	330	330	330	330
Vegyszer	Koncentráció mmol/l-ben			
NaCl	125	∅	135	100
KCl	2,5	2,5	3	3
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25	∅	∅
NaHCO ₃	26	26	∅	∅
CaCl ₂	2	2	2	5
MgCl ₂	1	1	1	1
Mioinozitol	3	3	∅	∅
Aszkorbinsav	0,5	0,5	∅	∅
Na-piruvát	2	2	∅	∅
Glükóz	10	10	10	10
Szacharóz	∅	250	45	60
HEPES	∅	∅	10	10

Az oldatok ozmolaritását rendszeresen ellenőriztük (Automatic Osmometer, Knauer, Germany) és a táblázatban feltüntetett értéken tartottuk szükség esetén szacharóz hozzáadásával. Az oldatok pH-ját 7,4-re állítottuk be.

2.2.2. Az izolált sejtek előkészítése az [Ca²⁺]_i mérésére

Az izolált neuronokat tartalmazó sejtuszpenziót fedőlemezre cseppentettük, majd 30 perces ülepítést követően az inkubáló oldatot 10 % lószérumot tartalmazó Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) tápfolyadékra cseréltük. A sejteket ebben az oldatban pihentettük mintegy 3-4 órán keresztül 37°C-on, 5 % CO₂ jelenlétében. A mérés kezdete előtt 30 perccel 3 μmol/l Fura-2 Ca²⁺-indikátor festéket (észterifikált forma) adtunk az inkubáló oldathoz (Fura-2-AM; TEFLABS, Austin, USA). Az inkubálás végeztével az extracelluláris oldatot HEPES-pufferelt aCSF-oldatra cseréltük (HEPES-B; összetételét lásd az 1. táblázatban).

2.2.3. Az $[Ca^{2+}]_i$ mérése

Az $[Ca^{2+}]_i$ mérés Deltascan-1 (Photon Technology International, New Brunswick, USA) rendszeren, szobahőmérsékleten történt. A Fura-2 festéket xenonlámpa fényéből monokromátorok segítségével előállított, 340 és 380 nm hullámhosszúságú monokromatikus fényrel felváltva gerjesztettük; a festék által kibocsátott fényt pedig 510 nm-en regisztráltuk. A mérések során a mintavételezés frekvenciája 50 Hz volt. A két gerjesztő hullámhosszon kapott emisszós intenzitásokból a sejt mellett mérhető, ún. háttérintenzitást kivontuk, majd a 340 és 380 nm-es gerjesztő hullámhosszak esetén mért fényintenzitások hányadosát képeztük az OSCAR nevű számítógépes program alkalmazásával (Photon Technology International, New Brunswick, USA). A valós $[Ca^{2+}]_i$ -t az alábbi képlet alkalmazásával számítottuk:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D * [R - R_{min} / R_{max} - R] \quad (1)$$

ahol R a mérések során a fényintenzitásokból számított hányados, R_{min} a 0 extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció esetén számított hányados, R_{max} a festék szaturációját biztosan előidéző Ca^{2+} -koncentráció mellett számított hányados, K_D pedig a festék ún. funkcionális disszociációs konstansa. Az R_{max} , R_{min} és K_D értékek meghatározását kalibrációs mérésekben végeztük el.

A mért eredmények analízise során csak azokat a sejteket vettük figyelembe, amelyek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációja 30 nmol/l alatt volt.

2.2.4. Az alkalmazott kémiai anyagok összetétele

A Ca^{2+} -tranzienseket a kísérletek egy részében az extracelluláris K^+ -koncentráció 20 vagy 50 mmol/l-ra emelésével váltottunk ki. Az emelt K^+ -koncentrációjú oldatok elkészítése során a HEPES-B-oldathoz mértük az 1 mol/l-es KCl törzsoldat megfelelő mennyiségét, miközben a szacharóztartalmat csökkentettük az ozmolaritás állandó szinten tartása érdekében. Glutamát-indukált kalcium tranzienseket glutamát (L-glutamát Na^+ -sója) megfelelő koncentrációinak alkalmazásával váltottunk ki, az oldatokat minden kísérlet előtt frissen készítettünk egy mélyhűtött, 1 mol/l-es glutamát törzsből HEPES-B oldat felhasználásával. A sejteket a mérés során folyamatosan perfundáltuk a HEPES-B-oldattal, a többi oldatot egy gyors cserét biztosító, gravitációs elven működő mikroperfúziós rendszer segítségével juttattuk a sejtek környezetébe.

A Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok vizsgálata során a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere jelentőségének a felderítése érdekében az extracelluláris oldat Na^+ -koncentrációját 30 vagy 0 mmol/l-re csökkentettük, Li^+ vagy szacharóz alkalmazásával. A LaCl_3 -ot (3 mmol/l) tartalmú oldatot közvetlenül a kísérletek előtt, egy mélyhűtött, 1 mol/l-es törzsoldat segítségével állítottuk elő. A tapszigargint (TG) DMSO-ban oldottuk, 500 $\mu\text{mol/l}$ -es törzsoldatot készítetve. Mivel a TG alkalmazott koncentrációja 50 nmol/l volt, az oldat egyúttal 0,01%-os DMSO-t is tartalmazott. A ciklopiazonsav (CPA) alkalmazása ugyancsak DMSO törzsoldatból történt (3 mmol/l). A CPA általunk alkalmazott koncentrációja 3 $\mu\text{mol/l}$ volt, ez egyúttal 0,1% DMSO jelenlétét okozta.

A piramis-sejtek glutamát receptorainak tanulmányozása során számos gátlószert és oldatot alkalmaztunk. Míg az AP5 (50 mmol/l) és a glicin (100 mmol/l) törzsoldat elkészítéséhez desztillált vizet alkalmaztunk, a CNQX (20 mmol/l) és az NBQX (1 mmol/l) oldása DMSO-ban történt. Valamennyi törzsoldatot mélyhűtőben tároltuk, a végleges hígítások közvetlenül a kísérletek megkezdése előtt történtek (AP5, CNQX: 100 $\mu\text{mol/l}$; NBQX: 10 $\mu\text{mol/l}$; glicin: 50 $\mu\text{mol/l}$). A mérések során tehát a CNQX adásakor 0,5 %-os, míg az NBQX alkalmazásakor 1 %-os DMSO kezelés is történt. Annak érdekében, hogy a DMSO esetleges hatásait megítélhessük, kontroll kísérleteket végeztünk. Megállapítottuk, hogy a DMSO egyik fenti koncentrációban sem fejtett ki hatást a Ca^{2+} -tranziensekre.

A kísérletekben alkalmazott Na^+ -mentes extracelluláris oldatban a NaCl -ot szacharóz helyettesítette, azonban a megfelelő pH beállításához használt NaOH és a kísérletekben alkalmazott Na -glutamát miatt ez az oldat kb. 10 mmol/l Na^+ -t tartalmazott, ezért helyesebb „az alacsony Na^+ -tartalmú oldat” elnevezés. A csökkentett Ca^{2+} -tartalmú extracelluláris oldat Ca^{2+} -koncentrációját 1 mmol/l EGTA jelenlétében 10 $\mu\text{mol/l}$ -nek számítottuk. A csökkentett Mg^{2+} -tartalmú HEPES-B oldatban 1 mmol/l helyett 20 $\mu\text{mol/l}$ MgCl_2 volt jelen. A méréseink során 200 $\mu\text{mol/l}$ -es végkoncentrációban alkalmazott CdCl_2 -t a kísérletek előtt frissen készítettük, mélyhűtött 100 mmol/l-es vizes törzsoldatból.

2.2.5. Az alkalmazott statisztikai próbák

A dózis-hatás adatok és a kiváltott Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának illesztését a Microcal Origin 6.0 nevű program alkalmazásával végeztük. A dolgozatban szereplő valamennyi adat átlag \pm S.E.M. formában szerepel. A statisztikai szignifikanciát a Student-féle t-próba megfelelő változatainak alkalmazásával határoztuk meg. Az egyes szignifikanciaszintek teljesülését a disszertáció ábráin jelöltük.

2.3. Immunhisztokémia

A kísérletek során 30 napos Wistar patkányok nucleus cochlearisából készítettünk úszószeleteket. A kalciumkötő fehérjék kolokalizációjának vizsgálata céljából kettős jelöléseket végeztünk.

2. táblázat

Az alkalmazott elsődleges és másodlagos antitest-kombinációk és hígítások

Elsődleges antitest	Másodlagos antitest
Piramis-sejt, Purkinje-szerű sejt, Bushy-neuronok, Octopus-sejt	
Poliklonális kecske anti-calbindin IgG (1:500) ¹	Nyúlban termelt kecske-ellenes FITC-konjugált IgG (1:500) ²
Monoklonális egér anti-parvalbumin IgG (1:10,000) ³	Majomban termelt egér-ellenes Alexa Fluor® 555-konjugált IgG (1:1,000) ⁵
Bushy-neuronok	
Poliklonális nyúl anti-calretinin IgG (1:2,000) ³	Kecskében termelt nyúl-ellenes Texas Red-konjugált IgG (1:500) ²
Monoklonális egér anti-parvalbumin IgG (1:10,000) ³	Lóban termelt egér-ellenes FITC-konjugált IgG (1:500) ²
Octopus-sejt	
Poliklonális kecske anti-calbindin IgG (1:500) ¹	Csirkében termelt kecske-ellenes Texas Red-konjugált IgG (1:500) ¹
Poliklonális nyúl anti-calretinin IgG (1:2,000) ³	Sertésben termelt nyúl-ellenes FITC-conjugated IgG (1:500) ⁴

¹Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA); ²Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA); ³Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); ⁴DAKO (Glostrup, Denmark); ⁵Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon, USA)

A kipreparált agytörzset mediansagittalisan megfeleztük, de a nucleus cochlearist nem választottuk le az agytörzsről. Miután a mag környékét megtisztítottuk az agyhártya maradványaitól, a fél agytörzset 4 %-os paraformaldehidben fixáltuk (4 °C, 4 óra), majd háromszor 10 percig mostuk 0,1 mol/l-es foszfátpufferben (PB; 0,1 mol/l Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,1 mol/l NaH₂PO₄ x H₂O; pH = 7,4; [Reanal Rt.,

Budapest]). Ezt követően vibratóm segítségével (Campden Instruments, Loughborough, UK) 60 µm vastag szagittális szeleteket készítettünk a nucleus cochlearisból, melyeket PB-ben (10 perc), majd Tris-pufferelt sóoldatban mostuk (TBS; 8 mmol/l Tris-base [Invitrogen, California, USA], 42 mmol/l Trizma HCl, 150 mmol/l NaCl; pH = 7,4; 3 x 10 perc). Az aspecifikus kötőhelyeket 10 % normál lószérummal blokkoltuk (1 óra, szobahőmérséklet), mely 0,1 % Triton-X-100 tartalmú TBS-ben volt oldva. Ezt követően a primer antitestekkel inkubáltuk a szeleteket egy éjszakán át, szobahőmérsékleten. Az alkalmazott antitest-kombinációkat és a hígításokat a 2. táblázat mutatja be.

A második napon, miután a szöveteket TBS-ben mostuk (3 x 10 perc), a fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos antitesttel történő inkubáció következett (3 óra, szobahőmérséklet, lásd a 2. táblázatot). Végül a szeleteket ismételt TBS-ben mostuk (3 x 10 perc), majd a sejtmagok jelölése érdekében DAPI tartalmú Vectashield fedőanyaggal (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) fedtük le őket.

Vizsgálataink során kontroll kísérleteket is végeztünk. A CB specifikus reakciójának ellenőrzésére a primer antitestet annak specifikus blokkolópeptidével inkubáltuk együtt (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Tekintettel arra, hogy CR és PA esetén blokkolópeptid kereskedelmi forgalomban nem elérhető, ebben az esetben a kontroll vizsgálatokat a primer antitest elhagyásával hajtottuk végre.

2.4. Retrográd jelölés

A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak retrográd jelöléséhez az irodalomból ismert (Li. és mtársai, 1997; Necker és mtársai, 2001) fluoreszcens jelölőanyagot, a tetrametilrhodamin-konjugált dextranszt alkalmaztuk (ms = 3000; Molecular Probes Inc., Oregon, USA). Annak érdekében, hogy az axonális kapcsolatok megtartottak maradjanak, a magot nem választottuk le az agytörzsről és az agytörzset sem feleztük meg. Tekintettel arra, hogy a nucleus cochlearisból kilépő projekciós neuronok axonjai az agytörzs felszíni rétegeiben haladnak tovább, egy finom tű segítségével ejtett felszíni karcollással ezen axonok könnyen átvághatóak voltak. Az ejtett vágásba a jelölő molekulákat ugyanezen tű segítségével juttattuk be. Piramis-sejtek jelölése esetén az agytörzset a DCN dorzomediális részén, a dorsalis acusticus stria területén karcolltuk meg. A VCN-ben található sphericalis bushy-sejtek jelölése esetén az agytörzset a VCN elülső részétől rostralisán sértettük, míg a jelölőanyagot a VCN caudalis részébe történő juttatásával a VCN globuláris bushy-sejtjeinek jelölését valósítottuk meg.

A jelölést követően az agytörzset aCSF-ben (lásd 1. táblázat) inkubáltuk sötétben, 95 % O₂ / 5 % CO₂ jelenlétében (8 óra, szobahőmérséklet), majd a szövetet 4 %-os paraformaldehidbe helyeztük 12 órára. PB-ben történt három mosás után 50 µm vastag szagittális szeleteket készítettünk a jelöléssel ipsilaterális nucleus cochlearisból. A szeleteket TBS-ben mostuk (3 x 10 perc) majd DAPI tartalmú Vectashield fedőanyaggal fedtük le őket.

A metodikai leírásban szereplő, másként nem jelölt vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) szállította.

2.5. Mikroszkópok

A retrográd jelölések vizsgálata fluoreszcens mikroszkóp (Eclipse 600W; Nikon, Tokyo, Japan), míg az immunreakciók kimutatása fluoreszcens és konfokális (LSM 510; Zeiss, Jena, Germany) mikroszkóp segítségével történt. A fluoreszcens mikroszkóppal történő felvételek elkészítéséhez és feldolgozásához a Spot RT v3.5 és az Adobe Photoshop 7.0 programokat alkalmaztuk. Konfokális mikroszkópia esetén a vizsgálni kívánt sejtekről 0,5-0,8 µm-enként felvételeket készítettünk 60x objektív felhasználásával, majd az Adobe Photoshop 7.0 program segítségével az egyes felvételeket egymásra illesztettük.

3. EREDMÉNYEK

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

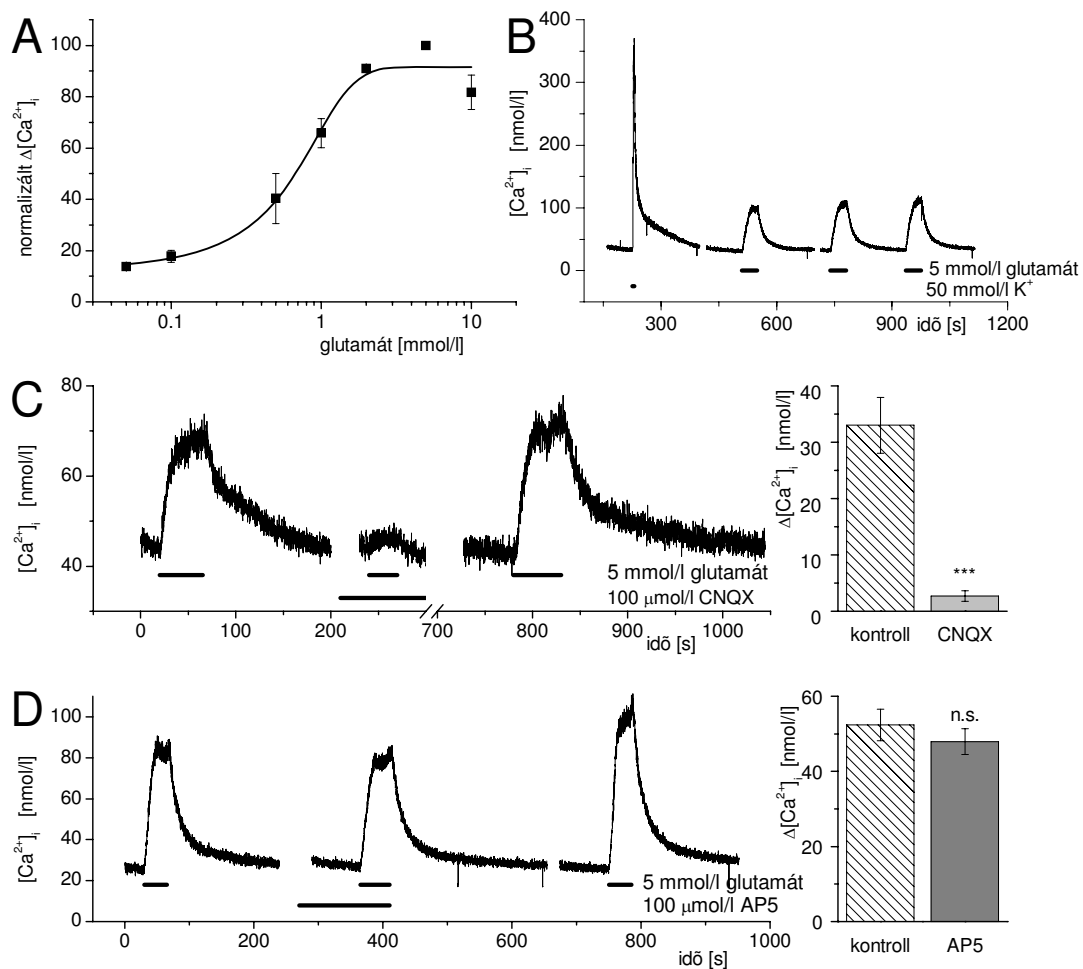
3.1.1. AMPA és NMDA receptorok jelentősége a Ca^{2+} -tranziensek létrejöttében

A glutamát által kiváltott Ca^{2+} -válaszok kvantitatív vizsgálata során először meghatároztuk az extracellulárisan alkalmazott glutamát dózis-hatás görbét. Egy-egy neuronon több különböző koncentrációkban alkalmaztuk a neurotranszmittert. Mivel az egyes sejtek glutamátérzékenysége eltérő, minden kísérletben használtunk 5 mmol/l glutamátot és a más koncentrációkkal kapott adatokat az ezen koncentrációval kapottra normáltuk. Az így nyert dózis-hatás görbe a 3. ábra A részén látható. A Ca^{2+} -tranziensek 50-100 $\mu\text{mol/l}$ glutamát alkalmazásakor jelentek meg, 5 mmol/l pedig telítődózisnak bizonyult. Az átlagolt adatpontok illesztésével a félmáximális glutamátkoncentráció 513 $\mu\text{mol/l}$ -nek, míg a Hill-koefficiens 1,03-nak bizonyult, 1:1 arányú ligand-receptor interakciót sugallva.

Az egyes neuronok eltérő glutamátérzékenységének zavaró hatását úgy igyekeztünk kiküszöbölni, hogy a kísérletekben a telítődózis 5 mmol/l-es koncentrációt alkalmaztuk, legalább 5 s-ig. A 3. ábra B részén megfigyelhető, hogy 5 mmol/l koncentrációjú glutamátot 40 s hosszan ismételt alkalmazva egyforma Ca^{2+} -tranzienseket lehetett kiváltani, tehát sem a Ca^{2+} -háztartás módosulásával, sem deszenzitizációval nem kellett számolnunk.

5 mmol/l glutamát 22,7 és 77,6 nmol/l közötti nagyságú Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki, ezek átlagos amplitúdója $46,1 \pm 3,0$ nmol/l volt ($n = 66$). Egyes neuronokon magas extracelluláris K^+ -koncentrációt és glutamátot egyaránt alkalmaztunk Ca^{2+} -tranziensek kiváltására, a kétféle válasz összehasonlítása céljából. Ezen sejtekben az 50 mmol/l KCl által kiváltott tranziensek átlagos amplitúdója $217,7 \pm 20,2$ nmol/l volt, míg 5 mmol/l glutamát $60,8 \pm 6,8$ nmol/l amplitúdójú tranzienseket váltott ki ($n = 9$).

A Ca^{2+} -eltávolítás sebességét a kontroll körülmények között kiváltott Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának exponenciális függvénnyel történő illesztéséből határoztuk meg ($n = 58$). 37 sejt esetében egyetlen exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel volt illeszthető a leszálló szár, az időállandó (τ) $21,5 \pm 1,7$ s-nak adódott. A többi esetben ($n = 21$) két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehetett jobb illesztést elérni, az időállandók értékei $6,7 \pm 0,5$ (τ_1) $27,2 \pm 2,5$ s (τ_2) voltak.



3. ábra

A glutamát által kiváltott Ca^{2+} -tranzienek alapvető jellemzői.

A. Extracellulárisan, különböző koncentrációkban alkalmazott glutamát hatása 14 esetben. A csúcserőket a tranziens előtti alaponhoz képest adtuk meg, és az 5 mmol/l-es koncentrációjú glutamáttal ugyanazon sejten kiváltott tranziens csúcserőjére normalizáltuk. Az így meghatározott relatív amplitúdókat átlagoltuk, az ábrán fekete négyzettel jelöltük. A dózis-hatás görbe folytonos vonalát a pontok megillesztésével kaptuk meg. (Az illesztés a Microcal Origin szoftver segítségével történt.)

B. Emelt extracelluláris KCl-koncentráció, majd glutamát által kiváltott Ca^{2+} -tranzienek. Figyelmet érdemel a glutamáttal kiváltott tranziens alakja.

C. 5 mmol/l glutamát által kiváltott Ca^{2+} -tranzienek kontroll körülmények között, valamint 100 μ mol/l CNQX alkalmazásával. A CNQX kimosását a jobb oldali görbe demonstrálja. A jobb oldali oszlopdiagram 5 kísérlet eredményét foglalja össze.

D. 5 mmol/l glutamáttal kiváltott Ca^{2+} -tranzienek kontroll körülmények között, majd 100 μ mol/l AP5 jelenlétében, valamint az AP5 kimosása után. Az oszlopdiagram 7 mérés eredményének statisztikai összegzése.

(* ** $p < 0,001$; n.s.- statisztikailag nem szignifikáns)

A K^+ -depolarizációval és a glutamáttal kiváltott Ca^{2+} -tranziensek megszűnésének sebességét 8 neuronon hasonlítottuk össze. A depolarizáció által kiváltott tranzienseket két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel lehetett jobban illeszteni, a számított időállandók alacsonyabb értékeket mutattak, mint a glutamát-indukált tranziensek (depolarizáció-indukált tranzienseknél $\tau_1 = 3,0 \pm 0,4$ és $\tau_2 = 17,8 \pm 2,8$ s; a glutamáttal kiváltott tranziensek esetén $\tau_1 = 8,1 \pm 0,6$; $\tau_2 = 26,6 \pm 5,9$ s).

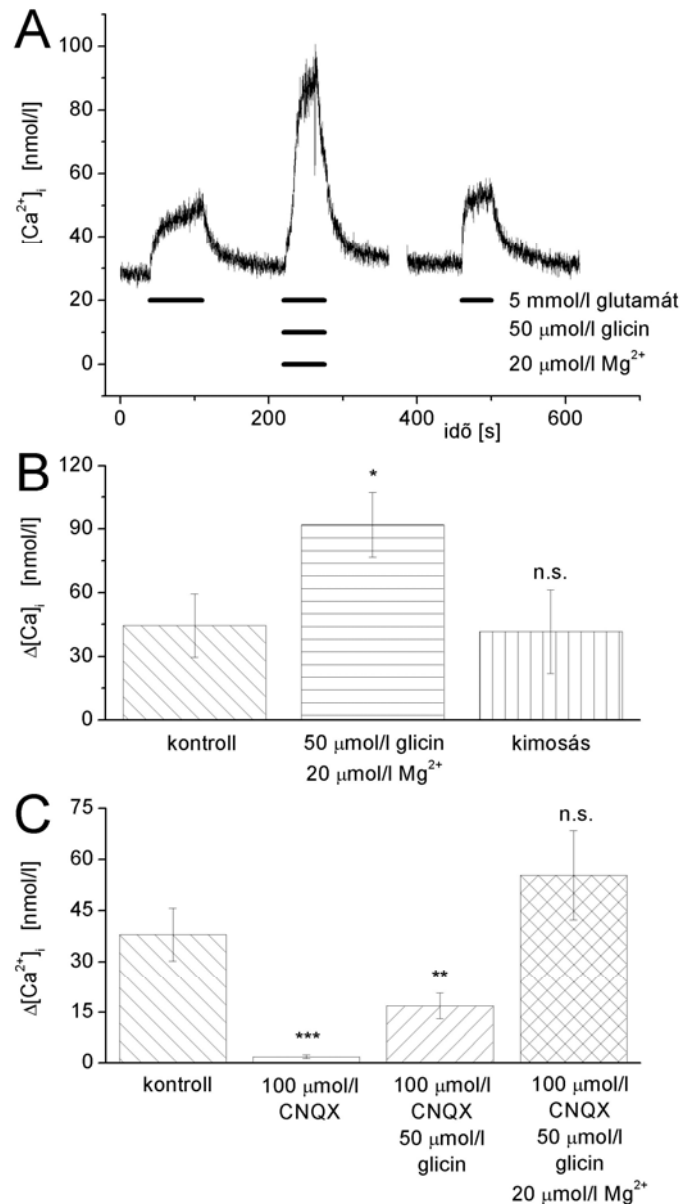
Kísérleteink további részében a különböző ionotróp glutamát-receptorok Ca^{2+} -tranziensek létrehozásában játszott szerepét vizsgáltuk az egyes típusokra specifikus antagonisták használatával. A 3. ábra C részén látható, hogy az AMPA receptorokat blokkoló CNQX (100 $\mu\text{mol/l}$) hatására az 5 mmol/l glutamát által kiváltott tranziensek $33 \pm 4,9$ nmol/l-ről $2,7 \pm 0,9$ nmol/l-re csökkentek ($n = 13$). A hatás számos esetben visszamosható volt.

Az NMDA receptorok szerepét 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5 alkalmazásával vizsgáltuk. A szer alkalmazása során a Ca^{2+} -tranzienst a kontroll $52,4 \pm 4,2$ nmol/l-es amplitúdóról $48 \pm 3,4$ nmol/l-re csökkent, a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($n = 7$).

Mivel az AMPA-receptorok gátlásához használt CNQX az NMDA receptorokat is blokkolhatja (Mead és Stephens, 1999), ezért egy jóval specifikusabb AMPA antagonistát, az NBQX hatását is vizsgáltuk (10 $\mu\text{mol/l}$). 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5-tel és 200 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} -mal történt előkezelés után a glutamát-indukált tranziens amplitúdója $25 \pm 4,8$ nmol/l volt, ezt NBQX $12,1 \pm 3$ nmol/l-re csökkentette, a hatás szignifikáns volt ($p < 0,01$) és kimoshatónak bizonyult ($n = 6$).

3.1.2. Az NMDA-típusú ionotróp glutamát-receptorok aktivációja

Mivel az AP5 nem befolyásolta a glutamát-indukált Ca^{2+} -tranzienseket, arra lehetett következtetni, hogy az izolált idegsejtek nem rendelkeznek funkcióképes NMDA receptorokkal. A lehetőség tisztázása érdekében az NMDA-receptorok működését különböző módszerekkel stimuláltuk, és vizsgáltuk a Ca^{2+} -tranziensekben bekövetkező következményes változásokat.



4. ábra

Az NMDA receptorok aktivációja.

A. 5 mmol/l glutamáttal kiváltott Ca²⁺-tranziensek kontroll körülmények között, 50 μmol/l glicin jelenlétében, 20 μmol/l koncentrációjú Mg²⁺-ot tartalmazó oldatban, majd a kimosás követően.

B. Az A panelen demonstrált kísérlet eredményeinek összefoglalása. (n=5).

C. NMDA receptorok aktivációja az AMPA receptorok blokkolását követően. Az első oszlop a kontroll tranziensek amplitúdóját szemlélteti, a második 100 μmol/l CNQX blokkoló hatását mutatja. A következő lépésben 5 mmol/l glutamát és 100 μmol/l CNQX mellett 50 μmol/l glicint is alkalmaztunk. A kísérlet utolsó lépéseként az előbb alkalmazott szereket 20 μmol/l-re csökkentett Mg²⁺-koncentráció mellett alkalmaztunk (n=7).

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s.- statisztikailag nem szignifikáns)

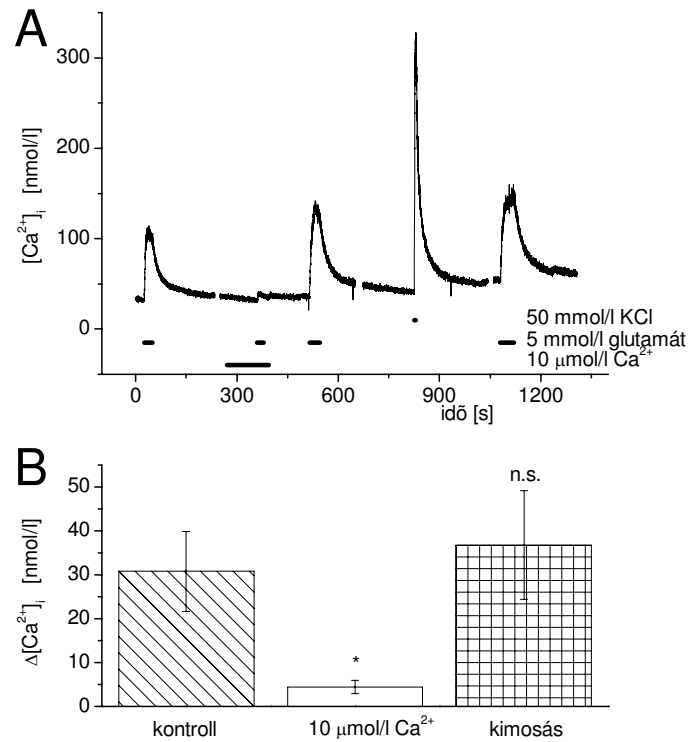
A 4. ábra A részén látható kísérlet során a kontroll Ca^{2+} -tranziens kiváltása után $50 \mu\text{mol/l}$ glicin és $20 \mu\text{mol/l}$ Mg^{2+} -koncentráció mellett megismételtük a glutamát adását. Az utóbbi esetben jelentősen növekedett a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója, a kimosást követően pedig visszatért a kontroll körülmények között tapasztaltnak.

A B panelen az eredmények összefoglalása látható oszlopdiagram formájában. A kontroll tranziensek amplitúdója átlagosan $44,5 \pm 14,9 \text{ nmol/l}$ volt, glicin és alacsony Mg^{2+} alkalmazásakor $91,9 \pm 15,3 \text{ nmol/l}$ -re nőtt, a visszamosás során $41,6 \pm 19,7 \text{ nmol/l}$ -os értéket kaptunk ($n = 5, p < 0,05$).

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

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

Az 5. ábra A részén látható kísérlet a glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek létrejöttéhez szükséges Ca^{2+} extracelluláris eredetét igazolja. Kontroll körülmények között 5 mmol/l glutamát átlagosan $30,8 \pm 9,1 \text{ nmol/l}$ amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki. A csökkentett Ca^{2+} -tartalmú extracelluláris oldattal történő inkubációt $30 - 50 \text{ s}$ -mal követően ez az érték $4,4 \pm 1,5 \text{ nmol/l}$ -re csökkent. A hatás megfordíthatónak bizonyult, a Ca^{2+} visszaadását követően átlagosan $36,8 \pm 12,4 \text{ nmol/l}$ amplitúdójú tranzienseket rögzítettünk ($n = 6; p < 0,05$; 5B. ábra).



5. ábra

Az extracelluláris Ca^{2+} szerepe a glutamát indukált Ca^{2+} -tranziensek kialakulásában.

A. A kontroll körülmények között rögzített glutamát-indukált tranziens megszűnését követően az extracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt $10 \mu\text{mol/l}$ -re csökkentettük, és ezen körülmények között alkalmaztunk újra 5 mmol/l glutamátot. A Ca^{2+} -koncentráció visszaállítása után ismételt glutamátot, KCl-ot, és újra glutamátot alkalmaztunk. A glutamát-indukált tranziens amplitúdója és időfüggése minden esetben hasonlóan bizonyult.

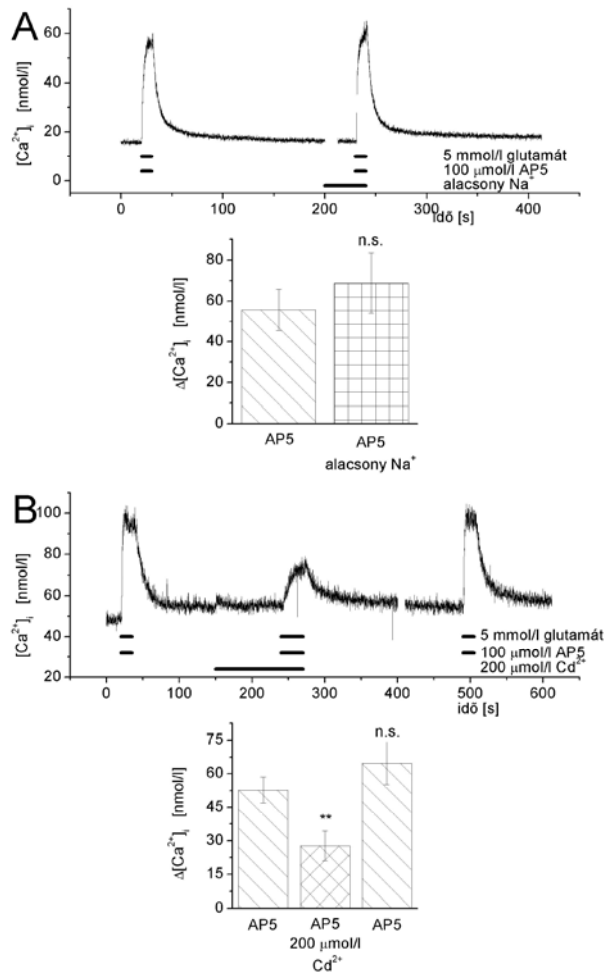
B. Az alacsony extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensekre kifejtett hatásának összefoglalása ($n=6$).

(* $p < 0,05$; n.s.- statisztikailag nem szignifikáns)

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

A fenti adatok arra engednek következtetni, hogy az AMPA receptor-függő Ca^{2+} -tranziensek létrejöttéért elsősorban a Ca^{2+} extracelluláris térből történő belépése felelős. A Ca^{2+} -belépés azonban különböző útvonalakon mehet végbe. A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerepét a depolarizáció nagyságának csökkentésével

illetve a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlásával vizsgáltuk. A mérés során az NMDA-receptorok esetleges aktivációját 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5 alkalmazásával gátoltuk.



6. ábra

A feszültségfüggő Ca^{2+} -belépés gátlásának hatása a glutamát-indukált transziensekre.

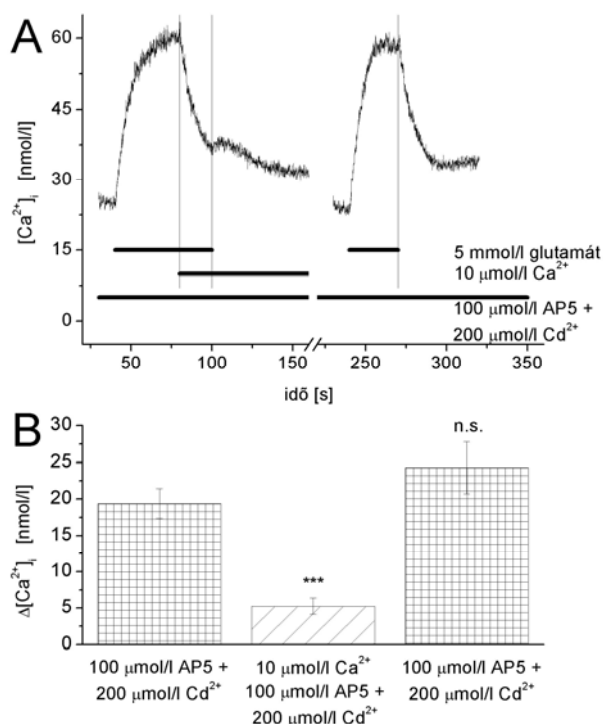
A. 5 mmol/l glutamát által kiváltott Ca^{2+} -tranzienek kontroll körülmények között és alacsony Na^+ -tartalmú oldatban. A glutamáttal együtt 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5-öt is alkalmaztunk. Az oszlopdigrammok 5 kísérlet eredményét foglalják össze.

B. Kontroll körülmények között és 200 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} 90 s-os előinkubálását követően kiváltott glutamát-indukált Ca^{2+} -tranzienek. (5 mmol/l glutamáttal együtt 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5-öt is alkalmaztunk.) Az oszlopdigramm 11 kísérlet eredményét összegzi. A Cd^{2+} jelenlétében a Ca^{2+} -tranzien felszálló szárának meredeksége csökken.

(** $p < 0,01$; n.s.- statisztikailag nem szignifikáns)

Ahogy azt a 6. ábra A részén láthatjuk, az extracelluláris Na^+ -szintet 10 mmol/l-re csökkentve nem tapasztaltunk eltérést az 5 mmol/l glutamát által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójában: kontroll esetben a tranziensek nagysága $55,6 \pm 10,2$, alacsony Na-tartalmú oldatban pedig $68,8 \pm 14,7$ nmol/l volt ($n = 5$).

A 6. ábra B részén látható, hogy a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon történő Ca^{2+} -belépés gátlása Cd^{2+} alkalmazásával (200 $\mu\text{mol/l}$) a tranziensek amplitúdóját $52,8 \pm 5,8$ nmol/l-ről $27,7 \pm 6,7$ nmol/l-re csökkentette ($n = 11$). A hatás az esetek nagyobb részében kimosható volt. Az amplitúdó csökkenése mellett a tranziensek kialakulásának sebessége is minden esetben csökkent.



7. ábra

Az extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésének hatása az AMPA receptorok által létrehozott Ca^{2+} -tranziensekre.

A. 5 mmol/l glutamát 100 $\mu\text{mol/l}$ AP5-tel és 200 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} -mal együtt alkalmazva Ca^{2+} -tranzienszt hozott létre. A Ca^{2+} -tranziens maximum értékének elérésekor a mérőoldat Ca^{2+} -koncentrációját 10 $\mu\text{mol/l}$ -re csökkentettük, melyet a glutamát-kezelés végeztével is fenntartottuk. A mérőoldat Ca^{2+} -koncentrációjának visszaállítását után újabb glutamát-indukált tranziens volt kiváltható. (A függőleges vonalak az oldatcsere időpontját jelölik a görbén.)

B. A fenti kísérletek eredményének összefoglalása ($n=6$). Az első oszlop a kontroll Ca^{2+} -tranziensek csúcspontját jelöli, a második a 20-25 s hosszúságú Ca^{2+} -elvonás során tapasztalt intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt, a harmadik a visszaállított extracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjú oldat által kiváltott tranziens maximumát mutatja.

(*** $p < 0,001$; n.s.- statisztikailag nem szignifikáns)

Mivel az NMDA-receptorokon keresztül történő Ca^{2+} -belépés lehetősége a receptorok serkentése nélkül kicsi, a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák pedig csak a kialakuló Ca^{2+} -tranziensek mintegy 50%-áért felelősek, a további Ca^{2+} -belépés magyarázataként már csak az AMPA-receptorok szerepét lehetett feltételezni. Ezt a lehetőséget a 7. ábrán látható kísérlettel vizsgáltuk. A korábbiakhoz hasonlóan 5 mmol/l glutamáttal váltottunk ki Ca^{2+} -tranzienst (100 $\mu\text{mol/l}$ AP5 és 200 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} jelenlétében). A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlása miatt a tranziensek amplitúdója átlagosan csak $19,4 \pm 2$ nmol/l volt, és a felszálló szár meredeksége is kisebbnek bizonyult. Amikor a tranziens elérte a maximumot, a glutamát jelenlétében az extracelluláris oldat Ca^{2+} -koncentrációját 10 $\mu\text{mol/l}$ -re csökkentettük. A tranziens a glutamát jelenléte ellenére azonnal csökkenni kezdett és 20-25 s elteltével $5,2 \pm 1,1$ nmol/l-re állt be. Az extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció értékének visszaállítása után megismételt glutamátkezelés a kontrollhoz hasonló nagyságú tranzienseket eredményezett ($24,3 \pm 3,5$ nmol/l). A Ca^{2+} -tranziens leszálló szárán látható másodlagos koncentrációnövekedés mechanizmusát nem vizsgáltuk.

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

3.2.1. Kalciumkötő fehérjék a DCN-ben

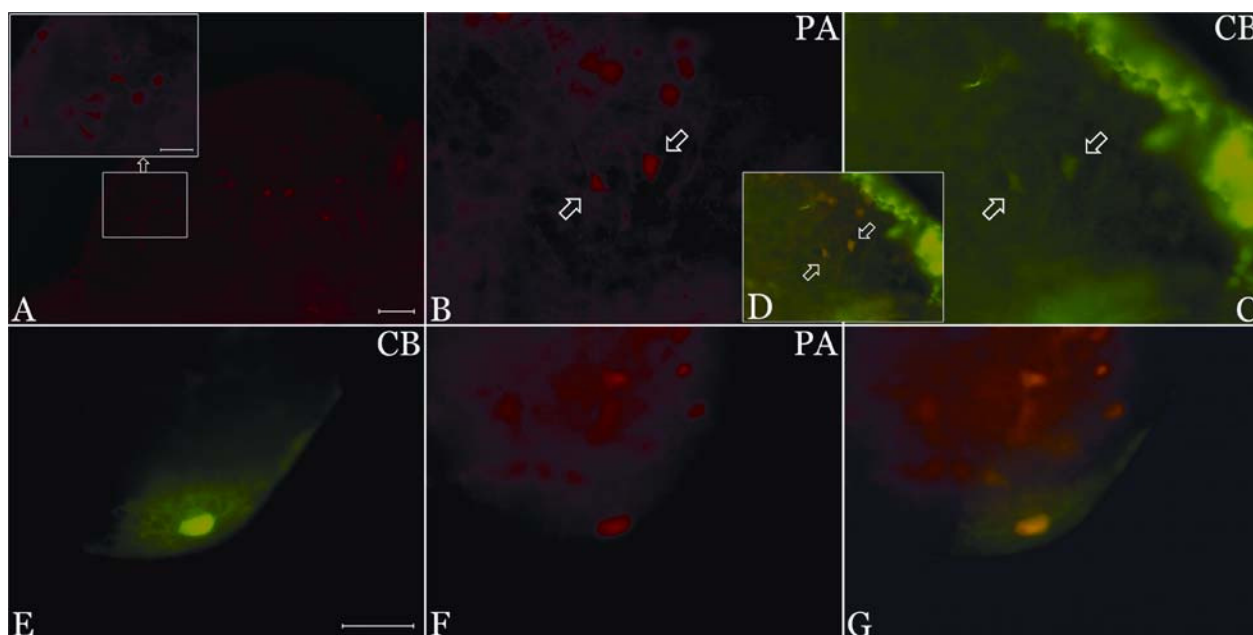
A DCN legtöbbet vizsgált projekciós neuronja a piramis-sejt. Tekintettel arra, hogy e sejtek axonjai a stria acustica dorsalison keresztül érik el az ellenoldali colliculus inferiort, az ezen a területen ejtett átmetszés felől a neuronok retrográd módon feltölthetőek voltak fluoreszcens festékekkel. Amint a 8A. ábrán látható, a jelölt piramis-sejtek a DCN második, piramis-sejtes rétegében helyezkednek el. A lokalizáció mellett azonosításukat segíti a tipikus, háromszög alakú sejttestjük; a szómájuk nagysága (átlagos átmérő $21,3 \pm 0,4$ μm ; lásd 3. táblázat) és a gyakran látható három nyúlvány (8A. ábra betétje).

A piramis-sejtek kalciumkötő fehérje expressziójának vizsgálata során CB/PA és CR/PA kettős jelöléseket alkalmaztunk. A 8B. ábra a neuronok intenzív és homogén PA pozitivitását mutatja, a nyilakkal jelzett sejtek esetén a nyúlványok kezdeti szakasza is jelölődött. A 8. ábra C része mutatja be ugyanezen sejtek CB jelölődését, a jobb felső részén megfigyelhető, pozitív struktúra az ependyma, mely viszont PA-t nem

tartalmazott. Az ábra D része a B és a C részek egymásra illesztésével készült, a citoplazmában megfigyelhető narancssárga szín a CB és PA kolokalizációját jelzi.

A piramis-neuronok CR tartalmát is megvizsgáltuk kísérleteinkben, de ezen fehérje jelenlétét nem sikerült kimutatni (nem közölt adat).

A piramis-neuronok retrográd jelölése során a mag belső rétegében néhány nagy sejt ($39,5 \pm 1,9 \mu\text{m}$) is feltöltődött (lásd 8A. ábra), melyek projekciójuk, nagyságuk és lokalizációjuk alapján óriás-sejtként azonosíthatóak. Ezen neuronok immunhisztokémiai vizsgálata során bebizonyosodott, hogy csak CB-t expresszálnak, PA és CR pozitívitas nem volt kimutatható esetünkben (nem közölt adat).



8. ábra

A nucleus cochlearis dorsalis piramis- és Purkinje-szerű sejtjeinek kalbindin és parvalbumin kolokalizációs képe.

A. A nucleus cochlearis dorsalisból készült szelet kis nagyítású képe, rodaminnal történt retrográd jelölést követően. (kalibrációs egyenes = $100 \mu\text{m}$) A nucleus cochlearis dorsalis mélyebb részén elhelyezkedő nagy, rodaminnal jelölt sejtek a óriás-sejtek. A kis panel a rodaminnal jelölt piramis-sejteket mutatja nagyobb nagyítással (kalibrációs egyenes = $50 \mu\text{m}$).

B,C: PA (B) és CB (C) immunopozitivitás a piramis-neuronok kettős festése során. A nyilak két olyan sejtet jelölnek, amelyek morfológiai jegyeik alapján piramis-sejtként azonosíthatóak.

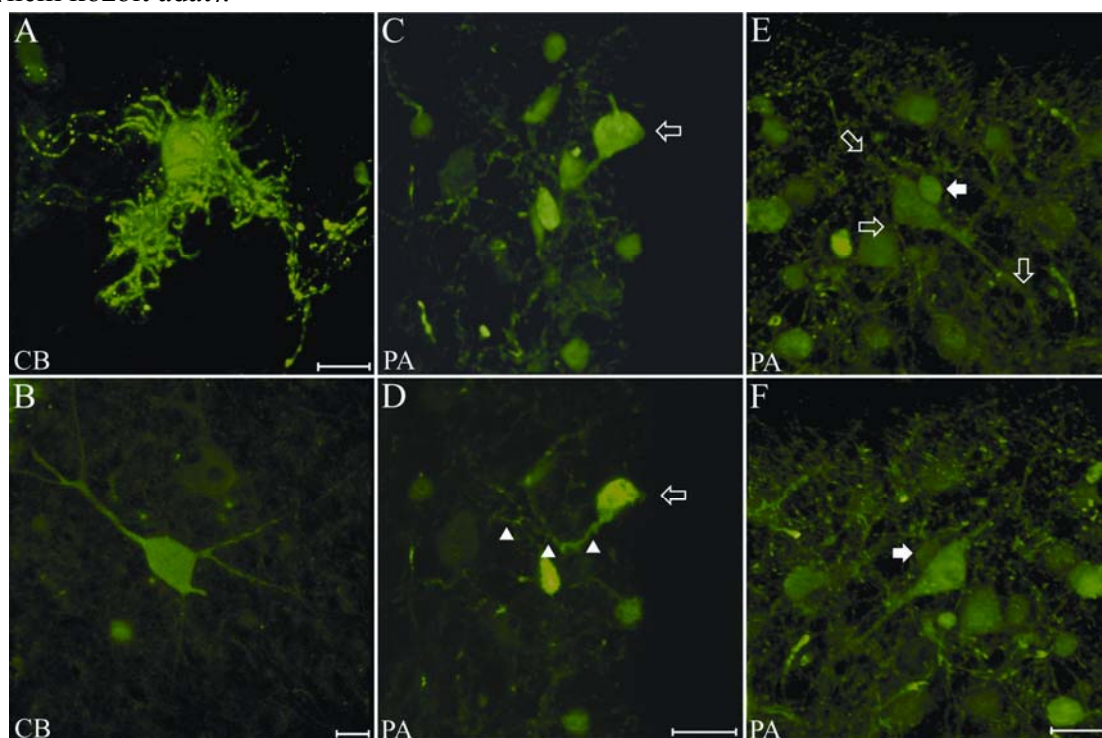
D. B és C panelek egymásravezített képe.

E: CB immunopozitivitás szomatikus és dendritikus megjelenése Purkinje-szerű sejten.

F: PA jelölés ugyanazon sejt szomatikus régiójában.

G. Az E és F panel egymásravezített képe. (B, C, E, F és G panelek esetén a kalibrációs egyenes= $50 \mu\text{m}$).

A DCN-ben található Purkinje-szerű sejtek (PLC) projekciós területe feltételezések szerint számos fajban (így patkányban is) a kisagy. Amint a 8E. ábrán látható, ez a sejtféleség a DCN felszínén helyezkedik el és jelentős CB pozitivitást mutat mind a sejttestben (szóma átlagos átmérője $24,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$; 3. táblázat), mind a kiterjedt dendritfában. A PA jelölés esetén (8F. ábra) a sejttest intenzív és homogén jelölődést mutatott, a dendritfa azonban alig volt észrevehető. Az E és F ábrarészek az összeillesztésével kapott 8G. ábra jól szemlélteti a CB és PA jelölések közötti különbséget. A CR jelenlétének vizsgálatára során CB/CR kettős festést végeztünk, az eredmények alapján úgy tűnik, hogy Purkinje-szerű sejtek nem expresszálnak CR-t (nem közölt adat).



9. ábra

Nucleus cochlearis dorsalis piramis- és Purkinje-szerű sejtek konfokális mikroszkóppal felvett képe kalbindin és parvalbumin jelölést követően.

A. CB pozitív Purkinje-szerű sejt rekonstruált képe. A kiterjedt dendritfa jól megfigyelhető. A rekonstrukció 80 külön felvételtől származott, amelyek egyenként $0,55 \mu\text{m}$ vastagságúak voltak.

B. CB pozitivitást mutató piramis-sejt rekonstruált képe (65 külön felvételtől összeállítva, amelyek $0,56 \mu\text{m}$ vastagságúak voltak.)

C, D. PA pozitív Purkinje-szerű sejt azonosított neuronon. A C panel a rekonstruált felvételt mutatja (50 , egyenként $0,6 \mu\text{m}$ vastagságú felvételtől), míg a D panelen ugyanezen sejtről, a sejt felső részétől $9,02 \mu\text{m}$ -re készült felvétel látható. Jól látható egy vastag, gazdagon elágazó nyúlvány (nyílhegyek), de kevésbé intenzíven jelölődött, mint a szóma (nyíl).

E, F. Rekonstruált piramis-sejt PA pozitívítása (50 felvétel, egyenként $0,51 \mu\text{m}$ vastagságban). Az E panelen üres nyilak jelzik a háromszögű szóma három sarkából kiinduló főbb nyúlványokat. A teli nyíl egy jóval kisebb, szferikális sejtet jelöl (szemcsesejtként azonosítottuk), amelynek jól látható a dendritfája. Az F panel ugyanezen területet a metszet ellenkező oldaláról mutatja. Ebben az esetben a piramis-sejt háromszögű sejttestje részben takarja a szemcsesejtet. A kalibrációs egyenesek $20 \mu\text{m}$ hosszúak.

3. táblázat

A nucleus cochlearis projekciós neuronok sejttestjének átmérője

	Referencia tartomány (μm)	Sejtméret ($\text{átlag} \pm \text{SEM } \mu\text{m-ben}$)	n=
Piramis-neuron	15-25 ¹	21.2 \pm 0.38	30
Purkinje-szerű sejt	25 ²	24.3 \pm 0.8	15
Óriás-sejt	40-50 ³	39 \pm 1.7	14
Globuláris bushy-sejt	20-28 ⁴	23.4 \pm 0.6	32
Szferikális bushy-sejt	20-28 ⁴	20.6 \pm 0.5	13
Octopus-sejt	30-35 ⁴	30.7 \pm 1.7	13

¹ Fiori és Mugnaini (1981)

² Hurd és Feldman (1994)

³ Osen (1969)

⁴ Moore (1986)

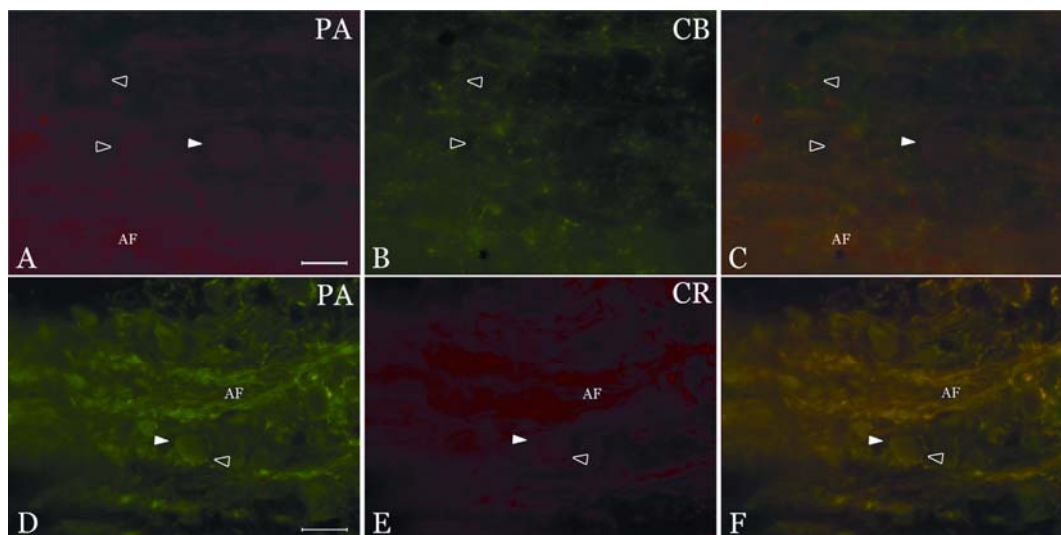
Fluoreszcens mikroszkóppal végzett megfigyeléseinket konfokális mikroszkópiával is alátámasztottuk (9. ábra). Az ábra A része a Purkinje-szerű sejtek szómájának és dendritfájának intenzív CB pozitivitását szemlélteti. A 9C. és 9D. ábrán látható másik sejt esetén, mely lokalizációja, mérete és a csak kis részletében látható (számtalan irányba elágazó és tüskés) dendritfa alapján ugyancsak PLC-ként azonosítható, látható az erősen PA pozitív sejttest és a jóval kevésbé jelölődő dendritfa. A konfokális mikroszkóppal kapott képek megerősítették a piramis-sejtek esetén tapasztalt CB (9B. ábra) és PA pozitivitásokat (9E. és 9F. ábra). A 9E. és 9F. ábrákon az is megfigyelhető, hogy a piramis-neuronok körül található legtöbb idegrost és sejt ugyancsak kifejezett PA-pozitivitást mutat.

3.2.2. Kalciumkötő fehérjék a VCN-ben

A DCN-hez hasonlóan, a VCN-ben található neuronok azonosítása is lokalizációjuk, méretük és alakjuk alapján történt. A 10. ábrán a globuláris bushy-sejtek immunhisztokémiai vizsgálata látható, ezek a neuronok az akusztikus idegrostok belépési helyén találhatóak, az axonok között jellegzetes oszlopszerű elrendeződésben (lásd például a 10D. ábrát).

A globuláris bushy-sejtek által expresszált kalciumkötő fehérjék vizsgálata során PA/CB és PA/CR kombinációban végeztünk kettős jelöléseket. Amint az megfigyelhető, egyértelmű PA pozitívítás mutatható ki a szómában (és az akusztikus rosrokban; 10A. és 10D. ábra). A bushy-sejtek felszínén (teli nyíl) számos intenzív, foltszerű jelölődés tapasztalható (üres nyíl), melyek az akusztikus rostok axonvégződéseinek felelnek meg. A CB-jelölés esetén (10B. ábra) sem a sejttest, sem a

hallóidegrostok nem voltak kimutathatóak, ugyanakkor pozitivitás volt megfigyelhető az axonvégzódésekben. Amint az az A és B ábrarészek egymásra illesztésével készült 10C. ábrán látható, a gyenge CB-pozitivitás miatt a PA-jelölés dominanciája érvényesül. A CR jelenlétének vizsgálata során a PA-hoz hasonló eloszlási mintázatot tapasztaltunk (lásd 10D., 10E és 10F. ábrák).



10. ábra

Nucleus cochlearis ventralis globularis bushy-sejtek parvalbumin, kalbindin és kalretinin megoszlása.

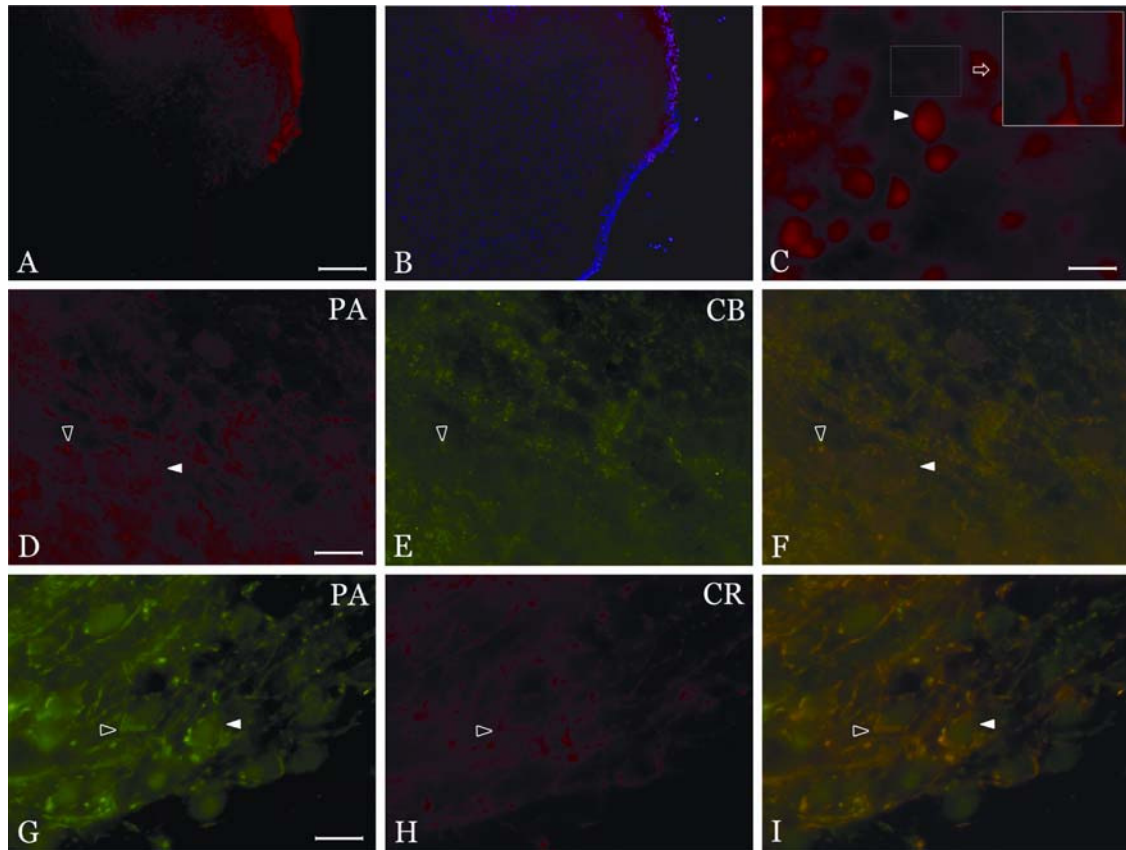
A, B. PA (A) és CB (B) kettős jelölés. A PA immunpozitivitás megfigyelhető a bushy-sejtek citoszóljában (teli nyilak), a nervus acusticus rostjaiban (AF) és az axonvégzódésekként azonosítható, üres nyílheggyel jelzett foltszerűen festődő területeken. A CB pozitivitás az axonvégzódésekre korlátozódik.

C. Az A és B panelek egymásravezített képe.

D, E. PA (D) és CR (E) kettős jelölés. Mindkét kalciumkötő fehérje jelen van a globularis bushy-sejtek sejttestében (teli nyilak), a nervus acusticus rostjaiban (AF) és az axonvégzódésekben (üres nyilak).

F. A D és E panelek egymásravezített képe. A kalibrációs egyenes 25 μm -es, minden panel ugyanolyan nagyítású.

A bushy-neuronok másik csoportját alkotják szferikális bushy-sejtek, melyek a VCN elülső részén, a perifériához közel helyezkednek el. Ezek a neuronok a VCN-től rostralisán végzett sértés felől retrográd jelölhetőek. Amint a 11. ábra A és B részén látható, a mag elülső részén egy nagyobb sejtpopuláció jelölődött retrográd töltést követően, míg más sejtekbe nem jutott el a jelölőanyag (lásd a DAPI reakciót a 11B. ábrán). Nagyobb nagyítással világosan látható a jelölt sejtek jellegzetes hosszúk alakja és a sejttestből kilépő két nyúlvány (11C. ábra, nyíl). A szferikális bushy-sejt gazdagon elágazó dendritfáját a 11C. ábra betétje szemlélteti. A szferikális bushy-sejtként azonosított neuronok átlagos átmérője $21,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$ volt (3. táblázat).



11. ábra

Nucleus cochlearis ventralis szferikális bushy-sejtek parvalbumin, kalbindin és kalretinin kolokalizációs képe.

A, B. Rodaminnal töltött sejtek megoszlása a nucleus cochlearis anteroventralis részében, a felszínhez közel. (Kalibrációs egyenes = 75 μm) A tájékozódást a B panel DAPI-val jelölt képe könnyíti meg.

C. Rodaminnal töltött neuronok nagyobb nagyítással (kalibrációs egyenes = 25 μm). A nyílhegy egy jellegzetes bushy-sejtet mutat, amelynek a dendritfája a kis panel nagyítású képén figyelhető meg.

D, E. PA (D) és CB (E) kettős jelölés. A szómán mérsékelt diffúz PA-positivitás látható (teli nyíl), míg az erősen festődő foltok az axonvégzódéseknek felelnek meg (üres nyílhegyek). A CB-positivitás csak az axonvégzódéseken figyelhető meg, amelyek kirajzolják a nem festődő sejtek körvonalait.

F. D és E panelek egymásravezített képe.

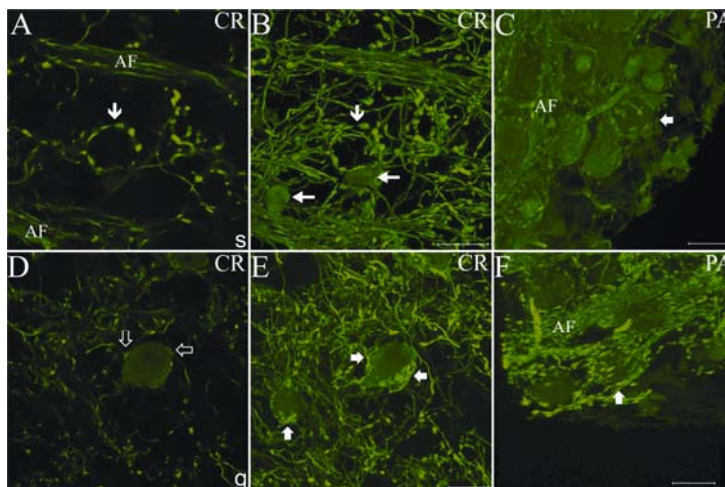
G, H. PA (G) és CR (H) kettős festés. A PA-megoszlás hasonló képet mutat, mint a D panelen. (A D panellel azonos jelekkel jelölve. A G panelen érdemes megfigyelni az óriás szinapszis morfológiai jegyeit.) A CR megoszlása megfelel a CB által mutatottnak.

I. G és H panelek egymásravezített képe.

A kalibrációs egyenesek a D-I paneleken 25 μm -nek felelnek meg.

A globuláris bushy-sejtekhez hasonlóan, a szferikális neuronok esetén is PA/CB és PA/CR kombinációban végeztünk jelöléseket. A 11D. és 11G. ábrarészekén homogén citoplazmatikus immunpozitivitás figyelhető meg PA-jelölés esetén (teli nyíl). A sejttestet körülvevő rostok PA jelölődése ugyancsak egyértelmű, és sok esetben az axonvégzódések erős pozitivitása (lásd üres nyíl) mintegy kirajzolja a sejttest kontúráját. A szferikális bushy-sejtek immunhisztokémiai vizsgálata azt is bizonyította, hogy ezek a neuronok nem expresszálnak szómájukban sem CR-t, sem CB-t, míg a sejttest körül található különféle idegrostok és axonvégzódések immunpozitivitást mutattak CB-ra

(11E. ábra) és CR-re (11H. ábra) egyaránt. A fentiekkel összhangban a kombinált képeken (11F. és 11I.) a kolokalizációt tükröző narancssárga szín csak a pericelluláris régióban figyelhető meg.



12. ábra

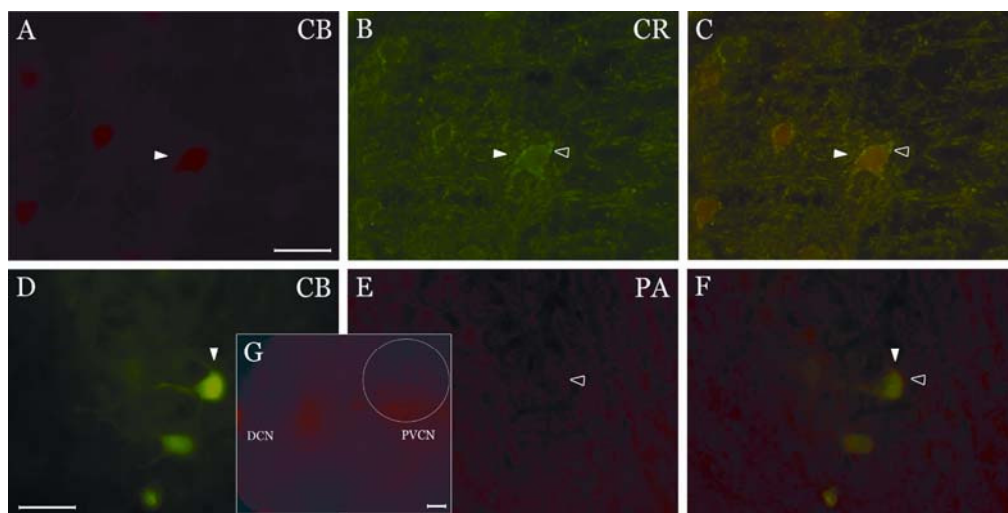
Nucleus cochlearis ventralis szferikális és globularis bushy-sejtek konfokális mikroszkóppal felvett képe.

- A.** Szferikális (s) bushy-sejt CR negatív sejttestje ($0,74 \mu\text{m}$ vastagságú, a sejt felső részétől $9,03 \mu\text{m}$ -re). Egyes nervus acusticus rostok (AF) jól festődnek, illetve a nagyméretű axonvégződésekből expresszált CR a szferikális bushy-sejtek negatív szómájától éles kontúrral különülnek el.
- B.** Rekonstruált felvétel (40 felvételtől), jól megfigyelhető az akusztikus rostok erősen pozitív hálózata. A szferikális bushy-sejtek sejttestjei nem jelölődtek (l. lefelé mutató nyíl). Egyes, bushy-sejtként nem azonosítható sejtek kifejezett CR-pozitivitást mutattak (balra mutató nyilak).
- C.** PA-jelölt szferikális bushy-sejt régió. Az akusztikus rostok (AF) és a szferikális bushy-sejtek szómái PA-pozitívnak bizonyultak. A nyíl az akusztikus rostok és a szferikális bushy-sejtek által formált óriás szinapszist mutatja (a rekonstrukció $40, 0,75 \mu\text{m}$ vastagságú felvétel alapján készült).
- D.** CR pozitív globularis bushy-sejtről (g) készült felvétel ($0,59 \mu\text{m}$ vastag, a sejt felső részétől $8,32 \mu\text{m}$ távolságra). Jól láthatóak egyes akusztikus rostok (AF). Az üres nyíl a rostok és a pozitívan jelölt globularis szómák közötti óriás szinapszist jelöli.
- E.** Rekonstruált kép (40 felvételtől, a D panelhez hasonlóan). Jól megfigyelhetőek az erősen pozitív akusztikus rostok és a globularis bushy-sejtek szómái. A teli nyilak a szinaptikus terminálok finom struktúráját jelölik.
- F.** PA-jelölés a globularis bushy-sejtek régiójában. Az akusztikus rostok és a bushy-sejtek szómái PA-pozitívak. A nyíl az akusztikus rostok bushy-sejteken található axonvégződését mutatja. Kalibráció = $20 \mu\text{m}$.

A 10. és 11. ábrákon bemutatott eredmények alátámasztására konfokális mikroszkóppal is végeztünk vizsgálatokat. Ennek alapján egyértelművé vált az az éles kontraszt, ami az intenzív CR pozitívást mutató akusztikus idegrostok és végződéseik, illetve a CR-negatív szferikális bushy-sejt szóma között fennáll (12A. és 12B. ábra). Tekintettel arra, hogy a globularis bushy-sejtek sejttestje kifejezett CR-pozitivitást mutatott (12D. és 12E. ábrák), a CR jelenléte vagy hiánya fontos eszköz lehet a kétféle sejt típus elkülönítésére. A konfokális mikroszkóppal készített rekonstruált felvételek nemcsak megerősítették a kétféle bushy-sejt szómájának PA-pozitivitását (12C. és 12F.

ábrák), de a sejteket körülvevő akusztikus idegrostok és idegvégződések elrendeződése is egyértelműen láthatóvált (12B., 12C., 12E. és 12F. ábrák).

Az octopus-sejtek a VCN hátsó részén, a DCN közelében helyezkednek el jellegzetes, szigetszerű sejtcsoportot létrehozva (13G. ábra). A 13. ábra A és D részén egy CB-pozitivitást mutató octopus-sejt nagy nagyítású képe látható. A legtöbb ilyen neuron sejttestje kerek, átlagosan $31,5 \pm 2,1 \mu\text{m}$ átmérőjű (lásd 3. táblázat), és dendritfájuk jellegzetes polipszerű elrendeződést mutat (13D. ábra, nyíl).



13. ábra

Nucleus cochlearis ventralis octopus-sejtek kalbindin, kalretinin és parvalbumin kolokalizációja.

A,B. CB (A) és CR (B) kettős jelölés. A szóma erősen és homogéneen CB pozitív (lásd teli nyíl). A sejttest mellett a szomszédos rostok és axonvégződések is CR-pozitivitást mutattak (üres nyílhegy).

C. Az A és B panelek egymásravezített képe.

D, E. CB (D) és PA (E) kettős jelölés. A CB eloszlás hasonló az A panelen láthatóhoz. A PA jelen van a rostokon és az axonvégződésekben (üres nyílhegy), de a sejttesten nem található.

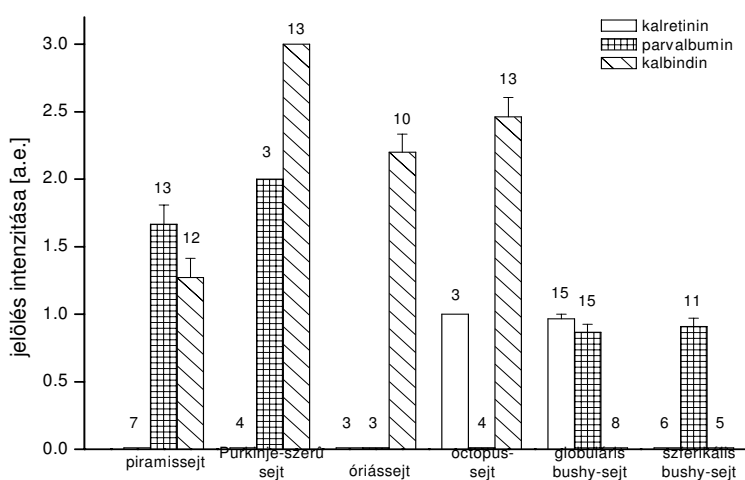
F. A D és E panelek egymásravezített képe. (D-F kalibráció = $50 \mu\text{m}$)

G. A nucleus cochlearis kis nagyítású képe (kalibráció = $100 \mu\text{m}$). A körrel jelölt régióban helyezkednek el az octopus-sejtek.

Habár a CB/CR kombinációban végzett kettős jelölés során igazolódott az octopus-sejt szómájának CR expressziója, ennek intenzitása jelentősen kisebb, mint a szomszédos rostokban és axonvégződésekben megfigyelhető immunreakció (13B. ábra). Említésre méltó, hogy ezek a struktúrák csak igen gyenge CB-jelölődést mutattak. A 13. ábra A és B részeinek egymásra illesztésével készült C ábrarészen jól látható a CB és CR kolokalizációja a szómában, és nyilvánvaló a CR-nek a rostokban megfigyelhető dominanciája. Tekintettel arra, hogy PA expresszió nem mutatható ki a sejttestben (13E. ábra), az összeillesztett ábrán (13F.) nem figyelhető meg CB/PA kolokalizáció.

Annak érdekében, hogy az egyes kalciumkötő fehérjék különböző sejttípusokban tapasztalt expressziós szintjét összehasonlíthassuk, szemikvantitatív

értékelési rendszert vezetünk be. A jelölődés mértékétől függően minden azonosított sejt kapott egy számot 0-tól (immunnegativitás) 3-ig (intenzív jelölődés a szómán és a nyúlványokon egyaránt). Közbülső értékeket is meghatároztunk: 0,5 - alig észrevehető pozitivitás; 1 - határozott, de gyenge jelölődés; 2 – erős jelölődés, de a nyúlványok nem láthatóak. Valamennyi vizsgált sejtnek és az általuk expresszált kalciumkötő fehérjéknek a szemikvantitatív analízisét a 14. ábra szemlélteti.

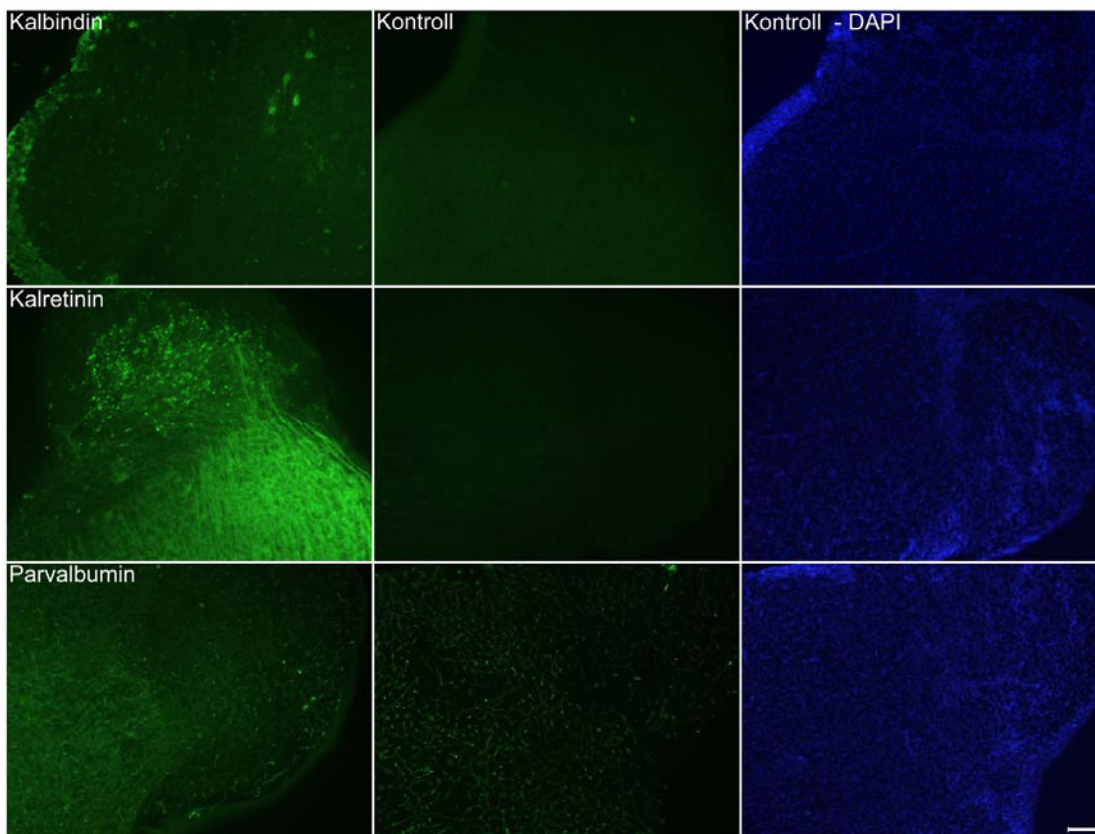


14. ábra

A kalciumkötő fehérjék eloszlásának kvantitatív értékelése nucleus cochlearis projekciós neuronok esetén.

Az oszlopok az átlagot \pm S.E.-t jelenítik meg, a számok az egyes jelölésekhez tartozó pozitívként azonosított sejtek számát mutatják. (A. e. = arbitrális egység)

Az egyes antitestekkel bekövetkező aspecifikus jelölődés lehetőségének kizárására kontroll vizsgálatokat végeztünk (15. ábra). Preadszorpciós kontroll alkalmazására csak a CB-ra vonatkozóan nyílt lehetőségünk, a CR és a PA esetén a primer antitest elhagyásával végeztük a kontroll vizsgálatot. Mindhárom esetben esetén egyértelmű negativitást tapasztaltunk (középső oszlop), miközben a primer antitest jelenlétében tapasztalt immunreakciók alapvetően eltérő mintázatokat mutattak (bal oldali oszlop).



15. ábra

Kontroll immunhisztokémiai vizsgálatok.

Bal oldali oszlop. CB-, CR- és PA-specifikus immunfestődés.

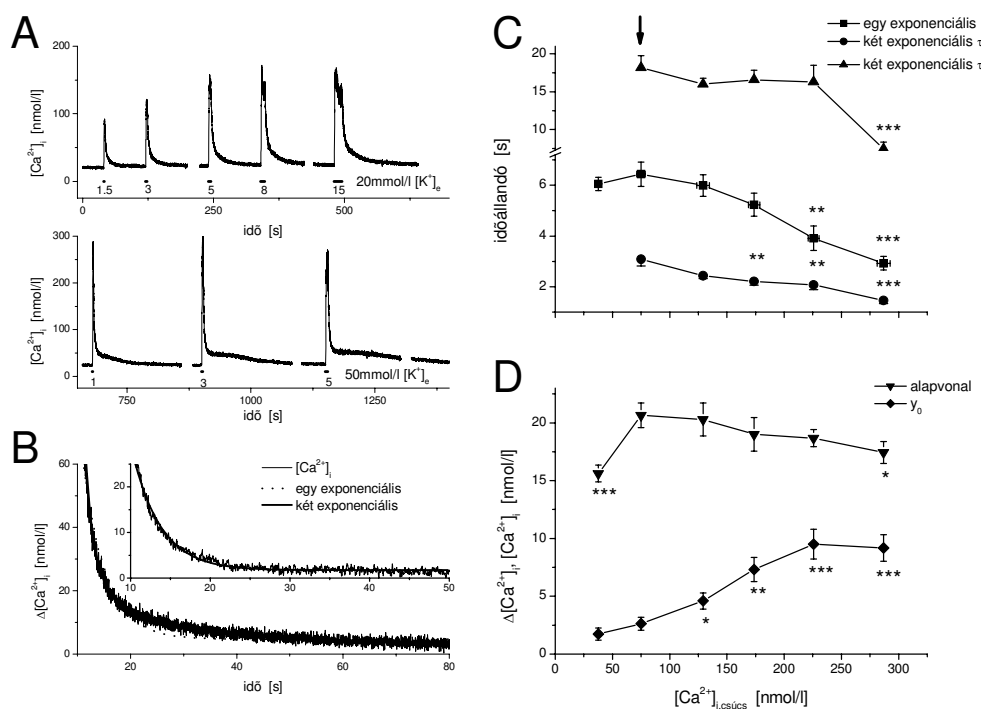
Középső oszlop. A CB preabszorpciós kontrollja esetén, valamint a CR és PA elhagyásával tapasztalt negatív immunreakció.

Jobb oldali oszlop. Az ábrán bemutatott nucleus cochlearis szeletekről készített DAPI sejtmagfestés.

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

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

A piramis-sejtek citoplazmájából történő Ca^{2+} -eltávolítási folyamatokat a K^+ -depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának illesztésével, az időállandók meghatározásával tanulmányoztuk. Annak érdekében, hogy az eltávolító mechanizmusok intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció függését megvizsgáljuk, különböző extracelluláris K^+ -koncentrációjú oldatokat alkalmaztunk, eltérő inkubációs időekkel. A 16A. ábra felső része 20 mmol/l K^+ különböző időtartamú alkalmazásait mutatja. 1,5 s-os kezelés kis amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienst eredményezett, a jelek nagysága nőtt 8 s-os kezelésig, ám a 8 és 15 s-os inkubáció alatti tranziensek amplitúdója már nem különbözött.



16. ábra

A KCl-depolarizáció által indukált Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának kvantitatív jellemzése.

A. Különböző extracelluláris K^+ -koncentrációkkal kiváltott Ca^{2+} -tranziensek. A felső görbéken 20, az alsón 50 mmol/l-es KCl-koncentrációt használtunk, az időtartamot másodpercben a görbék alatti vonalakhoz tartozó számok jelölik.

B. Az 1. típusú (fent), illetve a 2. típusú Ca^{2+} -tranziensek (lent) leszállószárának illesztése egy (szaggatott vonal), illetve két exponenciális tagot (folytonos vonal) tartalmazó függvénnyel. A Ca^{2+} -tranzienseket az alapvonalhoz korrigáltuk, és a jobb láthatóság kedvéért a leszállószárat tüntettük fel. A felső panelen jól látható, hogy az egy és két exponenciális tagot tartalmazó illesztések egybevágnak.

C, D. A Ca^{2+} -tranziensek illesztésének adatai. A paraméterek Ca^{2+} -függését a csúcs Ca^{2+} -koncentráció, illetve a leszállószár típusa szerinti csoportosítással kívántuk demonstrálni. Az átlagolt csúcserőtekek szórását (S.E.M.) a C panelen a vízszintes vonalak jelölik. A C ábrán az egy időkonstanssal (τ) történő illesztések, a két exponenciálissal végzett illesztések két időállandója (τ_1 , τ_2), a D ábrán az alapvonal (háromszög), illetve a tranziens előtti és utáni alapvonal különbségének (pedestal, y_0 , négyszöggel jelölve) átlagai láthatóak, a vertikális vonalak a szórást (S.E.M.) jelölik. (A szignifikanciát Student-féle kétmintás t-próbával kalkuláltuk; * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001)

A Ca^{2+} -tranziensek leszálló szára – a tranziens csúcskoncentrációjától függően – háromféle kinetikát mutatott. A kis amplitúdójú tranziensek leszálló szárát jól lehetett illeszteni egyetlen exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel (1. típus, 16A. ábra felső része), míg nagyobb Ca^{2+} -tranziensek esetén a leszálló szárat csak két exponenciális tagot tartalmazó függvény írta le megfelelően (16A. ábra felső része; 3-20 s; 2. típus). A két típus közötti átmenetet a 45 és 82 nmol/l-es Ca^{2+} -csúcserőtekek között lehetett megfigyelni. A 16B. ábra a leszálló szárok két típusát hasonlítja össze és illusztrálja az illesztések eredményeit.

A 3. típusú leszálló szár a neuronok mintegy 10%-ánál volt megfigyelhető (16A. ábra, alsó rész). Ha 50 mmol/l K^+ -ot 1-5 s-ig alkalmaztunk, a Ca^{2+} -tranziens megszűnésének korai szakasza egy exponenciális tagot tartalmazó függvényvel volt illeszthető. Ezt követően platófázis alakult ki, majd a megszűnés jóval kisebb sebességgel folytatódott.

Az 16. ábra C és D része a K^+ -depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának kvantitatív analizisét foglalja össze. A Ca^{2+} -eltávolítás Ca^{2+} -koncentráció függésének vizsgálatakor 5 csoportra osztottuk a vizsgált Ca^{2+} -tranzienseket amplitúdójuk szerint. A 100 és 300 nmol/l közötti tartományban 50 nmol/l-enként határoztunk meg egy-egy csoportot. Az 5. csoportba a 0 – 100 nmol/l közötti csúccsal rendelkező tranziensek kerültek, ezeket az 1. vagy 2. típusba tartozásuk szerint további két alcsoportba soroltunk. Az egyes csoportokon belül átlagoltuk az amplitúdókat és az illesztéssel kapott paramétereket. Érdekes, hogy a 0 - 100 nmol/l-es tartományban az 1. típusú tranziensek átlagos amplitúdója $37,6 \pm 2,6$ nmol/l, míg a 2. típusúaké $74,9 \pm 3,7$ nmol/l volt.

A 16. ábra C része a Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának időállandóit mutatja be. Az 1. típusú tranziensek megszűnésének időállandója $6,43 \pm 0,48$ s volt (egy exponenciális tag, τ). A 2. típusú tranziensek illesztésekor két exponenciális tagot tartalmazó függvényt használtunk. A kisebb időállandó (τ_1) a 0 – 100 nmol/l közötti tranzienseknél $3,09 \pm 0,26$ s volt, értéke magasabb Ca^{2+} -tranzienseknél jelentősen csökkent ($1,46 \pm 0,11$ s-ra a 250 – 300 nmol/l-es tartományban). A nagyobb időállandó (τ_2) $18,15 \pm 1,6$ s volt a 0 – 100 nmol/l-es tartományban, értéke nem változott jelentősen magasabb Ca^{2+} -koncentrációk esetén, csak a 250 – 300 nmol/l-es tartományban volt megfigyelhető szignifikáns csökkenés ($7,42 \pm 0,92$ s, $p < 0,001$).

A tranziensek leszálló szárának illesztésekor alkalmazni kellett egy állandó tagot, ami az intracelluláris Ca^{2+} -szint tranziens előtti és utáni értékének különbségével azonos. A 16. ábra D része demonstrálja, hogy ez a különbség a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának növekedésével emelkedett. Látható továbbá, hogy a tranzienseket megelőzően az intracelluláris Ca^{2+} -szint kielégítően alacsony volt és csak kis mértékben (15 és 25 nmol/l között) változott a kísérletek alatt.

Ismeretes, hogy a nagy affinitású fluoreszcens Ca^{2+} -indikátorok (pl. a Fura-2) maguk is befolyásolják a Ca^{2+} -koncentráció változások időbeliségét. Annak érdekében, hogy a Fura-2 esetleges ilyen hatását kimutassuk, egy alacsony affinitású Ca^{2+} -indikátorral (Fluo-3) is regisztráltunk Ca^{2+} -tranzienseket. Ezen tranziensek kinetikai

paraméterei hasonlóak voltak a Fura-2 alkalmazásakor kapott értékekkel (2. típusú tranziensek esetén $\tau_1 = 4,16 \pm 0,52$ s, $\tau_2 = 20,78 \pm 4,5$ s, n = 4).

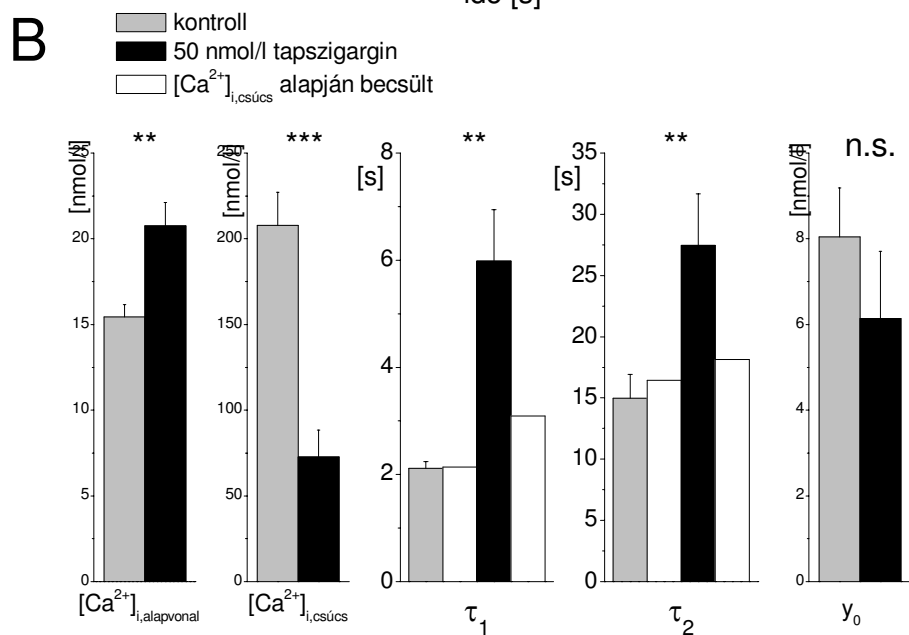
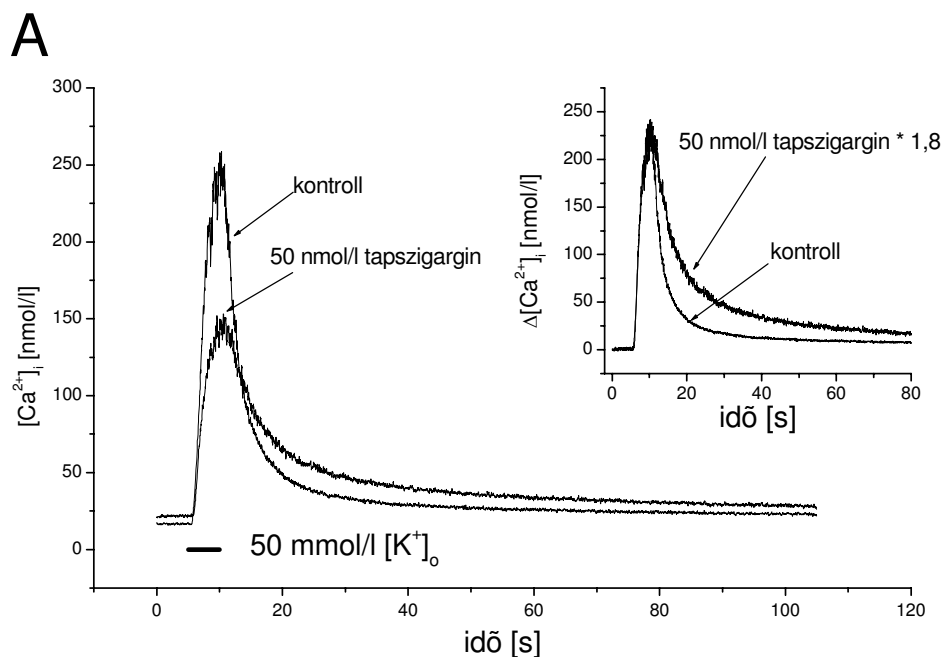
3.3.2. Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak szerepe a Ca^{2+} -eltávolításban

Az a tény, hogy a 2. és 3. típusú tranziensek leszálló szára több exponenciális tagot tartalmazó függvényel illeszthető, valószínűsíti több Ca^{2+} -eltávolító mechanizmus egyidejű aktivitását. Az intracelluláris raktárakba történő Ca^{2+} -felvétel jelentőségét TG és CPA alkalmazásával teszteltük. A 17. ábra A részén látható, hogy 50 nmol/l TG hatására a K^+ -depolarizációval kapott tranziens csúcserőke és leszálló szárának sebessége jelentősen kisebb volt, mint kontroll körülmények között. A tranziensek megszűnési sebességének jobb összehasonlíthatósága érdekében a két görbét úgy vetítettük egymásra, hogy megelőzően azonos amplitúdójúvá tettük őket (17A. ábra, betét).

A TG alkalmazásával nyert eredményeket a 17B. ábrán foglaltuk össze. A TG kezelés alatt a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelkedett, a Ca^{2+} -tranziens csúcsa pedig szignifikáns csökkenést mutatott. Habár TG kezelés alatt a 2. típusú tranziensek megtartották jellegüket, mindkét időállandó értéke szignifikánsan megemelkedett ($\tau_1 = 2,11 \pm 0,13$ s, $\tau_2 = 14,98 \pm 1,95$ s kontroll körülmények között, TG kezelést követően pedig a $\tau_1 = 5,99 \pm 0,96$ s, a $\tau_2 = 27,46 \pm 4,21$ s, $p < 0,001$).

A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának csökkenése felveti azt a lehetőséget, hogy önmagában ez a változás állhat az időállandók növekedésének hátterében. A kérdés vizsgálata érdekében a 17B. ábrán üres oszlopokkal jelöltük azon időállandó értékeket, melyek korábbi adataink alapján (lásd 16C. ábra) az adott amplitúdóhoz tartozhatnak. Jól megfigyelhető, hogy a várt és mért értékek a kontroll esetben megegyeznek, míg a TG jelenlétében kapott időállandó növekedés sokkal nagyobb volt, mint ami a Ca^{2+} -tranziens amplitúdójának csökkenése alapján jósolható.

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



17. ábra

Tapszigargin hatása a KCl-depolarizáció indukált Ca^{2+} -tranziensekre.

A. 50 mmol/l koncentrációjú extracelluláris KCl-al kiváltott Ca^{2+} -tranziensek vizsgálata kontroll körülmények között és 50 nmol/l tapszigarginnal végzett 2 perces kezelést követően. A kis panel ugyanezt a két tranziens mutatja, de itt a tapszigargin jelenlétében rögzített tranziens a kontroll amplitúdójára skáláztuk a leszálló szárak jobb összehasonlíthatósága végett.

B. Az A panelen látható kísérlet eredményének összefoglalása oszlopdiaagram formájában. (Két sejt esetében az illesztést az alapvonal oszcillációja miatt nem lehetett kivitelezni, ezért ezek esetén csak az alapvonal és a csúcs Ca^{2+} -koncentrációk kerültek feltüntetésre.)

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

kimutattuk, hogy a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornákon folyó áram CPA és TG hatására nem mutatott változást (nem közölt adat).

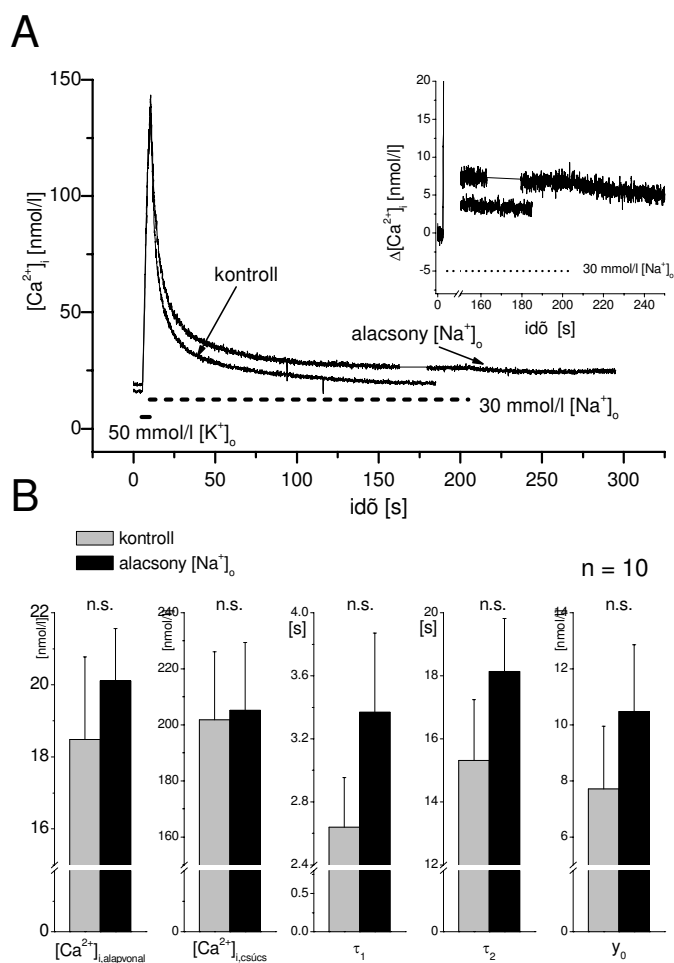
A SERCA-gátlószereknek a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójára gyakorolt hatása felveti azt a kérdést, hogy a tranziensek kialakulásához mennyiben járulhat hozzá az intracelluláris raktárakból származó Ca^{2+} . A kérdés vizsgálatához előbb 20 mmol/l koffeinnel, majd K^+ -depolarizációval váltottunk ki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

3.3.3. A sejtmembrán transzportrendszereinek szerepe az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésében

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

Amint az a 18. ábrán látható, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus gátlása csökkentette a piramis-sejtek Ca^{2+} -eltávolító képességét. A Ca^{2+} -tranziens megszűnésének időállandói emelkedtek: a τ_1 értéke $2,64 \pm 0,32$ s-ról $3,37 \pm 0,5$ s-ra, a τ_2 értéke $15,32 \pm 1,92$ s-ról $18,14 \pm 1,68$ s-ra ($n = 10$), azonban egyik változás sem bizonyult szignifikánsnak. A 18A. ábra betétjén is megfigyelhető a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport kismértékű szerepe a Ca^{2+} -eltávolításban: az alacsony Na^+ -tartalmú oldatot kontroll oldatra visszacsereélve, a leszálló szár sebessége megnő.

A PMCA útvonalat 3 mmol/l La^{3+} alkalmazásával gátoltuk. A feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák blokkolásának következményeit úgy küszöböltük ki, hogy a La^{3+} -t a K^+ -depolarizáció megszüntetésével egyidejűleg alkalmaztuk. A La^{3+} jelentősen, de reverzibilisen változtatta meg a Ca^{2+} -tranziens leszálló szárának lefutását (19A. ábra): az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció rövid csökkenés után megállt és egy platófázis alakult ki, ami a La^{3+} alkalmazásának időtartama alatt változatlanul fennmaradt. A La^{3+} eltávolítása után a Ca^{2+} -szint ismét csökkent, de lassabban mint a platót megelőzően. Az ábra B része az A panelen bemutatott kísérletek eredményeit foglalja össze.



18. ábra

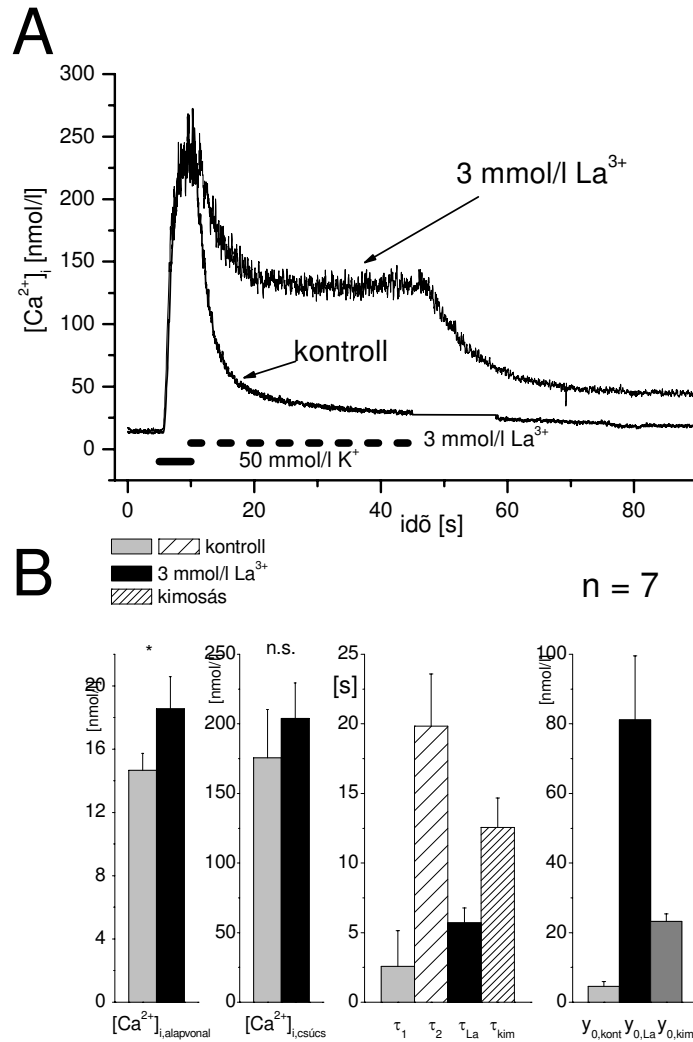
A Na^+/Ca^{2+} -cseremechanizmus jelentősége a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranzienseket követő Ca^{2+} -eltávolításban.

A. A Ca^{2+} -tranzienseket KCl-depolarizációval váltottuk ki (50 mmol/l, 5 s, kétszer egymás után). Az első tranzienszt kontroll körülmények között rögzítettük, a másodikat 30 mmol/l-re csökkentett extracelluláris Na^+ -koncentrációjú oldatban váltottuk ki, 200 s időtartamig alkalmazva. A kis panel a görbék azon részét mutatja, ahol az extracelluláris Na^+ -ot az alacsony koncentrációról a kontroll koncentrációra állítottuk vissza.

B. Az A panelen látható kísérlet adatainak összefoglalása oszlopdiaqramon ($n = 10$).

La^{3+} jelenlétében mind az alapvonal, mind a tranziens amplitúdója változatlan, a kontroll tranziensek időállandói pedig hasonlóak a korábban kapottakhoz ($\tau_1 = 2,57 \pm 0,65$ s, $\tau_2 = 19,85 \pm 3,45$ s, $n = 7$). La^{3+} alkalmazását követően a leszálló szár mindkét szakasza egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel volt illeszthető. Az első szakasz időállandója ($\tau_{La} = 5,7 \pm 1,07$ s) valamivel nagyobb volt, mint a kontroll τ_1 , míg a La^{3+} kimosása utáni időállandó ($\tau_{wo} = 12,56 \pm 2,11$ s) kisebb volt, mint a kontroll τ_2 (a különbségek statisztikailag nem szignifikánsak). A platófázis amplitúdója ($y_{0,La}$)

$81,2 \pm 18,3$ nmol/l, a kimosást követően kialakuló Ca^{2+} -szint ($y_{0,\text{wo}} = 23,2 \pm 2,2$ nmol/l) pedig nagyobb volt, mint amit kontroll körülmények között tapasztaltunk a Ca^{2+} -tranziensek után ($p < 0,001$).



19. ábra

A felszíni membrán Ca^{2+} -pumpájának (PMCA) szerepe a KCl-depolarizációval kiváltott tranzienseket követő intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésében.

A. KCl-depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek (50 mmol/l, 5 s). Az első kontroll körülmények között, a második 3 mmol/l La^{3+} extracelluláris alkalmazása során (35 s) került rögzítésre.

B. Az A panelen látható kísérletek adatainak összefoglalása oszlopdiaagram segítségével (n = 7).

4. MEGBESZÉLÉS

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

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

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

Kísérleteinkben a piramis-neuronok glutamát érzékenysége alacsonyabb volt, mint amit más izolált sejteken vagy sejt-kultúrákon találtak (Kudo és Ogura, 1986; Hattori és mtsai, 1998; Haak, 1999; Hay és Lindsley, 1999). Azt is megállapítottuk, hogy az általunk kapott glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek kisebbek voltak, mint amit nucleus suprachiasmaticus (Haak, 1999) vagy hippocampus neuronokon leírtak (Kudo és Ogura, 1986). A különbségek oka nem világos, szóba jön, hogy az enzimátikus izolálás során a neuronok elveszítik a felszíni glutamát-receptorok egy részét. Erre utalhat, hogy a depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek sokkal kevésbé különböztek a mások által kapott értékektől (Tymianski és mtsai, 1993; Zirpel és mtsai, 1995; Metzger és mtsai, 2000). Megemlítendő továbbá, hogy eredményeink az AMPA-receptorok fontos szerepét jelzik a tranziensek létrejöttében, márpedig ezen receptorok alacsony glutamát-érzékenysége korábbról ismert (lásd pl. Patneau és Mayer, 1990).

A különféle gátlószerekkel kapott eredmények szerint a glutamát hatására létrejövő Ca^{2+} -tranziensek eredete kizárólagosan az extracelluláris tér. Az AP5 hatástalansága arra utal, hogy az NMDA-receptorok részvétele a tranziensek kialakításában elhanyagolható. Ennek a következtetésnek azonban ellentmond az a tény, hogy az NMDA receptorokra is ható, AMPA-receptor gátló CNQX jobban csökkentette a tranzienseket, mint az AMPA-receptorokra specifikusabb NBQX. Az

ellentmondás lehetséges magyarázata az általunk alkalmazott AP5 koncentráció alacsony értéke lehet. Némileg ellentmondásosak a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák szerepére vonatkozó megállapításaink is: a Cd^{2+} mintegy 50 %-os csökkenést eredményezett, a depolarizáció mérséklése a külső Na^+ megvonásával viszont gyakorlatilag hatástalan volt. Ebben az esetben magyarázatként az vethető fel, hogy a megmaradó kevés Na^+ is elegendő a Ca^{2+} -csatornák aktiválásához szükséges mértékű depolarizáció kialakításához illetve az a lehetőség is felmerül, hogy a Cd^{2+} gátolja az AMPA-receptorokat is (Joels és mtsai, 1989).

A fenti megfigyelések összegzése után adódott a következtetés, hogy a glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek kialakulásához az AMPA receptorokon keresztüli Ca^{2+} -belépésnek is hozzá kell járulni. Számos adat található arra vonatkozóan, hogy a DCN neuronjaiban a GluR1-4 alegységek nagy mennyiségben vannak jelen, jóllehet az egyes sejtek expressziója között különbségek is kimutathatók (Hunter és mtsai, 1993; Petralia és mtsai, 1996, 2000; Rubio és Wenthold, 1997). Arra is vannak adatok, hogy a hallórendszer neuronjain az AMPA-receptorok Ca^{2+} -permeabilitása nagyobb, mint a más agytörzsi struktúrákban található idegsejteké (Otis és mtsai, 1995; Ravindranathan és mtsai, 2000). Más megfigyelések szerint a DCN piramis-sejtek Ca^{2+} -impermeabilis AMPA-receptorokat tartalmaznak (Gardner és mtsai, 1999, 2001), ami összhangban van azzal a ténnyel, hogy az ezen sajátságért felelős GluR2 alegység (Keller és mtsai, 1992; Geiger és mtsai, 1995) jelen van ezekben a neuronokban. Ezek a tények mindenesetre ellentmondanak annak a szerepnek, amit az AMPA-receptoroknak tulajdonítottunk a Ca^{2+} tranziensek kialakításában.

Az ellentmondás feloldásának több lehetősége van. Szóba jön, hogy kisszámú Ca^{2+} -permeabilis AMPA-receptor is elegendő a tranziensek létrehozásához az adott kísérleti feltételek mellett (izolált sejteken a teljes receptorkészlet egyidejű aktiválása). Lehetséges, hogy a piramis sejtek citoplazmatikus Ca^{2+} -pufferkapacitása alacsony (Korada és Schwartz, 2000), ezért kis mennyiségű Ca^{2+} -belépés is eredményezhet mérhető koncentrációváltozást (ennek ellentmondanak a puffer-fehérjék expressziójára vonatkozó újabb adataink, lásd alább). Végezetül említést érdemel, hogy rágcsőkon a glutamát receptorok összetétele a hallópálya neuronjaiban a hallási funkció érése során változik (Lohmann és Friauf, 1996), az általunk használt fiatal patkányokban tehát alacsonyabb lehet a GluR2 alegység mennyisége, mint a Gardner és mtsai (1999, 2001) által vizsgált idősebb egerekben. Hasonló, érési folyamatot kísérő AMPA-receptor módosulást patkány gerincvelői motoneuronokban le is írtak (Metzger és mtsai, 2000).

4. Táblázat

Ca²⁺-kötőfehérjék expressziója a nucleus cochlearis projekciós sejtjeiben különféle fajok esetén

Sejttípus	CR		PA		CB	
	Jelen munka	Korábbi adatok	Jelen munka	Korábbi adatok	Jelen munka	Korábbi adatok
Piramis-neuron	–	– patkány ¹ – ugróegér ²	+	patkány n.a. + ugróegér ²	+	+ patkány ¹ + ugróegér ² ; csincsilla ³ – denevér ⁴
Purkinje-szerű sejt	–	n.a.	+ szóma – dendritek	+ szóma patkány ^{5,6} – dendritek patkány ^{5,6} + tengerimalac ⁶	+ szóma + dendritek	+ szóma és dendritek patkány ^{1,5,6,7,8} + tengerimalac ⁶
Óriás-sejt	–	n.a.	–	n.a.	+	+ patkány ^{6,7} ; csincsilla ³ – tengerimalac ⁶
Globuláris bushy-sejt	+	+ patkány ¹	+	patkány n.a. + ugróegér ²	–	– patkány ¹ + ugróegér ² ; csincsilla ³ ; denevér ⁴
Szferikális bushy-sejt	–	– patkány ^{1,9} – ugróegér ² + tengerimalac ^{10,11}	+	patkány n.a. + ugróegér ²	–	– patkány ¹ + ugróegér ² ; csincsilla ³ – denevér ⁴
Octopus-sejt	+	+ patkány ^{1,9} + tengerimalac ¹²	–	patkány n.a. + ugróegér ² ; egér ¹³	+	+ patkány ^{1,5,7,14} + ugróegér ² ; egér ¹³ ; denevér ⁴ ; csincsilla ³

‘Jelen munka’ jelzi az értekezésben bemutatott kísérletek eredményeit míg ‘Korábbi adatok’ alatt irodalmi közléseket kell érteni (ezek azonosítása az irodalomjegyzék és a felső indexben megadott sorszám segítségével lehetséges). N.a. (nincs adat) jelzi, amennyiben nem találtunk egyértelmű állítást adott Ca²⁺-kötőfehérje előfordulására vonatkozóan valamelyik sejttípusban.

¹Rogers és Resibois (1992); ²Korada és Schwartz (2000); ³Frisina és mtsai (1995); ⁴Zettel és mtsai (1991); ⁵Hurd és Feldman (1994); ⁶Spatz (1997); ⁷Friauf (1994); ⁸Rossi és Borsello (1993); ⁹Resibois és Rogers (1992); ¹⁰Caicedo és mtsai (1996); ¹¹Caicedo és mtsai (1997); ¹²Winsky és Jacobowitz (1995); ¹³Idrizbegovic és mtsai (1998); ¹⁴Celio (1990)

4.2. Ca²⁺-kötőfehérjék előfordulása felnőtt patkány nucleus cochlearisának projekciós neuronjaiban

Tekintettel jelentőségükre, a Ca²⁺-kötőfehérjék központi idegrendszeri előfordulásával számos korábbi tanulmány foglalkozott, ezek egy részében a nucleus cochlearisra vonatkozó megállapítások is fellelhetők. Kijelenthető ugyanakkor, hogy az adatok heterogének, többféle fajon, különböző életkorú egyedekben történtek a mérések (lásd 4. táblázat). Mindenképpen helye volt ezért egy olyan kísérletsorozatnak, amelyik adott species felnőtt (tehát kifejelett hallórendszerrel bíró) egyedeiben hasonlítja össze a különféle projekciós neuronok pufferfehérje tartalmát. A megközelítés átfogó jellege mellett metodikailag is újat nyújtottunk azzal, hogy kettős jelöléseket végeztünk és kritikus esetekben konfokális mikroszkópiával támasztottuk alá megállapításainkat.

A korábbi adatokkal részben megegyezően azt találtuk, hogy a DCN sejtjeiben a CB jelenléte dominál, CR pedig nem mutatható ki. Különösen fontosnak tartottuk a piramis-sejtek citoplazmatikus Ca²⁺-pufferkapacitásának becslését. Míg korábbi megfigyelések patkányban csak a CB jelenlétére vonatkozóan voltak egyértelműen pozitívak (Rogers és Resibois, 1992), esetünkben, az ugrógérhez hasonlóan (Korada és Schwartz, 2000), a PA jelenléte is igazolódott. Ez arra utal, hogy a piramis sejtek jelentős pufferkapacitással rendelkezhetnek, tehát az ennek hiányára vonatkozó következtetés (Korada és Schwartz, 2000) értelmezése további munkát igényel.

A patkány Purkinje-szerű sejtek esetében ismert volt a szoma CB és PA pozitivitása, míg a dendritek esetében intenzív CB pozitivitást és alacsony szintű PA előfordulást írtak le (Hurd és Feldman, 1994; Spatz, 1997). Adataink szerint ez a különbség sokkal élesebb: mind fluoreszcens, mind konfokális mikroszkóppal a dendritek csaknem teljes PA-negativitását állapítottuk meg. A DCN óriás-sejtjei esetében igazoltuk, hogy ezek a sejtek sem CR-t, sem PA-t nem expresszálnak (Friauf, 1994; Spatz, 1997).

A VCN neuronjaiban a CB jelenléte nem annyira domináns, mint azt a DCN esetében láttuk, ugyanakkor megjelenik a CR. Munkánk során jellegzetes különbséget tudtunk kimutatni a bushy sejtek két altípusának pufferfehérje expressziójában. A globuláris sejtek esetében már ismert volt a CB-negativitás és CR-pozitivitás (Rogers és Resibois, 1992), ezt kiegészítettük a PA jelenlétére vonatkozó megfigyeléssel, ami azt is jelenti, hogy ez a neuron is két különböző kötőfehérjével rendelkezik.

A patkány szferikális bushy sejtek esetében korábban a CR és CB hiányát írták le. Adataink ebben az esetben is jelzik a PA kismértékű jelenlétét, hasonlóan az ugrógérhez (Korada és Schwartz, 2000). Ez a megállapítás azért jelentős, mert jelzi, hogy a projekciós neuronok e típusa patkányban is tartalmaz legalább egy Ca^{2+} -pufferfehérjét, más fajokhoz hasonlóan (Frisina és mtsai, 1995; Caicedo és mtsai, 1997; Korada és Schwartz, 2000).

Az octopus-sejtek esetében adataink megerősítő jellegűek a CR és CB jelenlétére vonatkozóan, ugyanakkor újak annyiban, hogy egyértelműen igazolták a PA hiányát, azon fehérjét, amelynek expresszióját más fajok esetében kimutatták ezen sejttypusban (Idrizbegovic és mtsai, 1998; Korada és Schwartz, 2000).

Az intenzív vizsgálatok ellenére a Ca^{2+} -kötőfehérjék szerepére vonatkozóan kevés biztos információ áll rendelkezésre. Általánosságban kijelenthető, hogy feladatuk a sejtek védelme a túlságosan magas vagy hosszantartó citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció növekedéssel szemben. Erre utal, hogy jelentős expressziójuk mutatható ki olyan neuronokon, amelyek különösen nagy Ca^{2+} -terhelésnek vannak kitéve akár jelentékeny felszíni elektromos aktivitásuk, akár más Ca^{2+} -belépési útvonalak aktiválódása miatt. Előbbi esetre példa a PA kolokalizációja a $\text{Kv}3.1\text{b}$ K^+ -csatorna alegységekkel, melyek jelenléte jelentős tüzelési aktivitással rendelkező idegsejtekre jellemző (Weiser és mtsai, 1995; Sekirnjak és mtsai, 1997; Chow és mtsai, 1999), utóbbira pedig az a megfigyelés, hogy a GluR2 AMPA-receptor alegység jelenléte vagy hiánya (azaz az AMPA receptor Ca^{2+} -permeabilitásának mértéke) összefüggést mutathat a sejt Ca^{2+} -kötőfehérje expressziós mintázatával (Kondo és mtsai, 1997; Korada és Schwartz, 2000).

A bemutatott eredmények többféle módon is hasznosíthatók. A fehérjék expressziós mintázatának ismerete megkönnyítheti az egyes sejtfeleségek azonosítását. A felnőttkori megoszlás pontos feltérképezése elősegítheti az egyedfejlődés során tapasztalt változások (Friauf, 1994; Lohmann és Friauf, 1996) értelmezését. A citoplazmatikus Ca^{2+} -pufferkapacitás ismeretében jobban megítélhetők a Ca^{2+} -koncentráció változások idő- és térbeli következményei illetve a neuronok Ca^{2+} -citotoxicitással szembeni érzékenysége.

4.3. A citoplazmatikus Ca^{2+} eltávolítására szolgáló mechanizmusok

A neuronok fiziológias működésének fennmaradása szempontjából döntő fontosságú, hogy az aktivitásukat kísérő ionmozgások okozta változások minél

kisebbség legyenek illetve minél hamarabb visszaálljon a nyugalmi helyzet. A Ca^{2+} esetében az előbbi feladatot részben a pufferfehérjék látják el, az utóbbit pedig különféle transzportmechanizmusok, amelyek az ionokat visszajuttatják az extracelluláris térbe vagy ideiglenesen az ER-ban tárolják őket. A Ca^{2+} -eltávolítás jellemzésére a depolarizációval kiváltott tranziensek leszálló szárát jellemző kinetikai paramétereket használtuk fel. Adataink szerint három különböző leszálló szár típus különíthető el, ezeket korábban más sejteken is megfigyelték (Mironov és mtsai, 1993; Fierro és mtsai, 1998; Lee és mtsai, 2000) de kísérleteink igazolták először, hogy ugyanazon sejt képes produkálni őket, a Ca^{2+} -terhelés mértékétől függően. Az általunk kapott időállandók egyébként jó egyezést mutattak a korábban közölt értékekkel (Duchen és mtsai, 1990; Thayer és Miller, 1990; Benham és mtsai, 1992; Tatsumi és Katayama, 1993; Sidky és Baimbridge, 1997; Brain és Bennett, 1998, Fierro és mtsai, 1998; Vanselow és Keller, 2000).

A Ca^{2+} -tranziensek időbeli lezajlását jelentősen befolyásolja a sejt Ca^{2+} -pufferkapacitása. Tekintettel arra, hogy a Fluo-3 és a Fura-2 tranziensek kinetikai paraméterei hasonlóak, a Fura-2 pufferelő hatását kismértékűnek tekinthetjük. Ami a pufferfehérjék szerepét illeti, az aránylag kicsiny Ca^{2+} -tranziensek magas pufferkapacitásra utalnak (Fierro és mtsai, 1998). Ezt valószínűsítik a CB és PA együttes jelenlétére utaló immunhisztokémiai adataink is (lásd korábban). Az a tény azonban, hogy a megszűnés időállandói Ca^{2+} -függést mutatnak, azt jelezheti, hogy adott kísérleti körülmények között a pufferek közel vannak a szaturációhoz (Bers és Berlin, 1995; Diaz és mtsai, 2001), tehát vagy kapacitásuk kicsi, vagy előterhelésük nagy. Az immunhisztokémiai és kinetikai eredmények összeegyeztetése további munkát, elsősorban pontosabb kvantitatív becsléseket igényel.

Az egyes transzportfolyamatok Ca^{2+} -eltávolításban játszott szerepének megítélésére többé-kevésbé szelektív gátlásukat és a kapott módosulások elemzését használtuk. A megközelítésnek több hibaforrása van, első rögtön a gátlószerek vitatható specificitása. A másik fő probléma az útvonalak közötti esetleges kölcsönhatás: egy-egy transzport gátlása csökkentheti más útvonal(ak) aktivitását, de az is elképzelhető, hogy a kiesett transzportot más mechanizmusok aktivitásfokozódása kompenzálja. A lehetőségek tisztázására megkíséreltük több transzportútvonal egyidejű gátlását, ezek a kísérletek azonban nem adtak egyértelmű eredményeket. A TG és La^{3+} kombinált adása például növelte a plató nagyságát, CPA jelenlétében pedig a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere szerepe vált nyilvánvalóbbá (nem közölt adatok).

A megalapozott következtetések levonását nehezítette, hogy ezeket a kísérleteket az izolált neuronok rosszul túrték.

Legellentmondásosabbak a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere szerepével kapcsolatos adatok. Egyes megfigyelések ennek fontosságára utalnak (Thayer és Miller, 1990; Benham és mtsai, 1992; Mironov és mtsai, 1993; Tatsumi és Katayama, 1993; Fierro és mtsai, 1998), míg mások szerint a cseremechanizmus jelentősége kicsi (Duchen és mtsai, 1990; Thayer és Miller, 1990; Sidky és Baimbridge, 1997; Surin és mtsai, 2000). Saját adataink az utóbbi álláspontot támasztják alá, egyben megkérdőjelezzik azt a véleményt, mely szerint a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -csere elsősorban a központi idegrendszer centrális struktúráiban játszik fontos szerepet (Kostyuk és Verkhratsky, 1995).

A PMCA szerepét 3 mmol/l La^{3+} alkalmazásával vizsgáltuk. Az ion ebben a koncentrációban feltehetően a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cserét is gátolja (Powis és mtsai, 1994; Shimizu és mtsai, 1997), de ha elfogadjuk, hogy ennek a mechanizmusnak a szerepe kicsi, a megfigyelt drámai változást indokolt a PMCA kikapcsolása következményének tulajdonítani. Az a tény, hogy ezen transzportlehetőség megszűnése plató kialakulását eredményezte, megerősíteni látszik feltevésünket, mely szerint a tranziens leszálló szárának kinetikáját a Ca^{2+} -terhelés mértéke és a rendelkezésre álló eltávolító kapacitás közötti arány szabja meg. Hasonló elképzelést korábban más szerzők is megfogalmaztak (Thayer és Miller, 1990; Mironov és mtsai, 1993).

A Ca^{2+} ER-ban történő tárolása jelentős szereppel bírhat a piramis sejtek Ca^{2+} -tranzienzeinek megszűnésében, erre utal, hogy a SERCA pumpa gátlása egyértelműen csökkenti a tranziens leszálló szárának megszűnési sebességét, összhangban korábbi megfigyelésekkel (Benham és mtsai, 1992; Mironov és mtsai, 1993; Tatsumi és Katayama, 1993; Fierro és mtsai, 1998). Nem lehet azonban teljesen kizárni azt a lehetőséget, hogy a tranziens leszálló szárának lassulása csak látszólagos, a tényleges Ca^{2+} -eltávolítás hatékonyságát valamely raktár-függő Ca^{2+} -csatorna megnyílása és az azon keresztüli Ca^{2+} -belépés rontja le (Usachev és Thayer, 1999).

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

irodalmi adat is utal rá, hogy a depolarizáció-indukált tranzienseknek lehet egy Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás összetevője (Shmigol és mtsai, 1995).

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

IRODALOMJEGYZÉK

Andreeva N., Khodorov B., Stelmashook E., Cragoe E., Victorov I. (1991) Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res.* **548**: 322-325.

Ashley R.H. (1989) Activation and conductance properties of ryanodine-sensitive calcium channels from brain microsomal membranes incorporated into planar lipid bilayers. *J. Membrane Biol.* **111**: 179-189.

Augustine G.J., Neher E. (1992) Neuronal Ca^{2+} signalling takes the local route. *Curr. Opin Neurobiol.* **2**: 302-307.

Baimbridge K.G., Celio M.R., Rogers J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS.* **15**: 303-308.

Beam K.G., Knudson C.M. (1988) Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **91**: 781-798.

Belan P., Kostyuk P.G., Snitsarev V., Tepikin A. (1993a) Calcium clamp in isolated neurones of the snail *Helix pomatia*. *J. Physiol (London)* **462**: 47-58.

Belan P.V., Kostyuk P.G., Snitsarev V.A., Tepikin A.V. (1993b) Calcium clamp in single nerve cells. *Cell Calcium.* **14**: 419-425.

Benham C.D., Evans M.L., McBain C.J. (1992) Ca^{2+} efflux mechanisms following depolarization evoked calcium transients in cultured rat sensory neurones. *J. Physiol. (London)* **455**: 567-583.

Bers D.M., Berlin J.R. (1995) Kinetics of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decline in cardiac myocytes depends on peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Am. J. Physiol.* **268**: C271-C277.

Bettler B., Boulter J., Hermans-Borgmeyer I., O'Shea-Greenfield A., Deneris E.S., Moll C., Borgmeyer U., Hollmann M., Heinemann S. (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5-expression in the nervous system during development. *Neuron* **5**: 583-595.

Bettler B., Egebjerg J., Sharma G., Pecht G., Hermans-Borgmeyer I., Moll C., Stevens C.F., Heinemann S. (1992) Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron.* **8**: 257-265.

Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**: 751-754.

Bilak M.M., Bilak S.R., Morest D.K. (1996) Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor in the cochlear nucleus of the mouse. *Neurosci.* **75(4)**: 1075-1097.

Blaustein M.P., Goldman W.F., Fontana G., Krueger B.K., Santiago E.M., Steele T.D., Weiss D.N., Yarowsky P.J. (1991) Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **639**: 254-274.

Bortolotto Z.A., Collingridge G.L. (1993) Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. *Neuropharmacology.* **32(1)**: 1-9.

Bouchard R., Pattarini R., Geiger J.D. (2003) Presence and functional significance of presynaptic ryanodine receptors. *Prog. Neurobiol.* **69(6)**: 391-418.

Brain K.L., Bennett M.R. (1998) Calcium transients evoked by action potentials in the somata of chick ciliary neurons. *J. Auton. Nerv. Syst.* **71**: 120-133.

Brawer J.R., Morest D.K., and Kane E.C. (1974) The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* **155**: 251-300.

Brini M. (2003): Ca²⁺ signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* **34**: 399-405.

Browner R.H. and Baruch A. (1982) The cytoarchitecture of the dorsal cochlear nucleus in the 3-month- and 26-month-old C57BL/6 mouse: A Golgi impregnation study. *J. Comp. Neurol.* **211**: 115-138.

Burnashev N., Monyer H., Seeburg P.H., Sakmann B. (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron.* **8**: 189-198.

Burnashev N., Zhou Z., Neher E., Sakmann B. (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J. Physiol.* **485**: 403-418.

Caicedo A., d'Aldin C., Puel J.L., Eybalin M. (1996) Distribution of calcium-binding protein immunoreactivities in the guinea pig auditory brainstem. *Anat. Embryol. (Berlin)* **194**: 465-487.

Caicedo A., d'Aldin C., Eybalin M., Puel J.L. (1997) Temporary sensory deprivation changes calcium-binding proteins levels in the auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* **378**: 1-15.

Cant N.B., Gaston K.C. (1982) Pathways connecting the right and left cochlear nuclei. *J. Comp. Neurol.* **212**: 313-326.

Carafoli E. (1992) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev.* **71**: 129-153.

Carafoli E., Stauffer T. (1994) The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J. Neurobiol.* **25**: 312-324.

Carbone E., Lux H.D. (1984) A low-voltage-activated, fully inactivating calcium channel in vertebrate sensory neurones. *Nature.* **310**: 501-502.

Celio M.R. (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science.* **231(4741)**: 995-997.

Celio M.R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* **35(2)**: 375-475.

Chard P.S., Bleakman D., Christakos S., Fullmer C.S., Miller R.J. (1993) Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J. Physiol.* **472**: 341-357.

Chen K., Waller H.J., Godfrey D.A. (1995) Muscarinic receptor subtypes in rat dorsal cochlear nucleus. *Hearing Res.* **89**: 137-145.

Chow A., Erisir A., Farb C., Nadal M.S., Ozaita A., Lau D., Welker E., Rudy B. (1999) K⁺ channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* **19**: 9332-9345.

Chuang R.S., Jaffe H., Cribbs L., Perez-Reyes E., Swartz K.J. (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* **1**: 668-674.

Clarke D.M., Loo T.W., Inesi G., MacLennan D.H. (1989a) Location of high affinity Ca²⁺ binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature* **339**: 476-478.

Clarke D.M., Maruyama K., Loo T.W., Leberer E., Inesi G., MacLennan D.H. (1989b) Functional consequences of glutamate, aspartate, glutamine, and asparagine mutations in the stalk sector of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**: 11246-11251.

Dechesne C.J., Winsky L., Kim H.N., Goping G., Vu T.D., Wenthold R.J., Jacobowitz D.M. (1991) Identification and ultrastructural localization of a calretinin-like calcium-binding protein (protein 10) in the guinea pig and rat inner ear. *Brain Res.* **560**: 139-148.

Diaz M.E., Trafford A.W., Eisner D.A. (2001) The role of intracellular Ca buffers in determining the shape of the systolic Ca transient in cardiac ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **442**: 96-100.

DiFrancesco D., Ducouret P., Robinson R.B. (1989) Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science.* **243**: 669-671.

Dingledine R. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51**: 7-61.

Dolphin A.C. (1995) The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp. Physiol.* **80**: 1-36.

Duchen M.R., Valdeomillos M., O'Neill S.C., Eisner D.A. (1990) Effects of metabolic blockade on the regulation of intracellular calcium in dissociated mouse sensory neurones. *J. Physiol. (London)* **424**: 411-426.

Duchen M.R., Leyssens A., Crompton M. (1998) Transient mitochondrial depolarisations in response to focal SR calcium release in single rat cardiomyocytes. *J. Cell. Biol* **142**: 975-988.

Dzubay J.A., Jahr C.E. (1996) Kinetics of NMDA channel opening. *J. Neuroscience.* **16**: 4129-4134.

Egebjerg J., Bettler B., Hermans-Borgmeyer I., Heinemann S. (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature.* **351**: 745-74.

Egebjerg J, Heinemann S.P (1993) Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**: 755-759.

Fatt P., Katz B. (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* **120**: 171-204.

Ferrer-Montiel A.V., Montal M. (1996) Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA).* **93**: 2741-2744.

Fierro L., Llano I. (1996) High endogenous calcium buffering in Purkinje cells from rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* **496**: 617-625.

Fierro L., DiPolo R., Llano I. (1998) Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *J Physiol. (London)* **510**: 499-512.

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

Francini F., Pizza L., Traina G. (1992) Inactivation of the slow calcium current in twitch skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* **448**: 633-653.

Friauf E., Ostwald J. (1988) Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* **73**: 263-284.

Friauf E. (1994) Distribution of calcium-binding protein calbindin-D28k in the auditory system of adult and developing rats. *J. Comp. Neurol.* **349**: 193-211.

Friel D.D. (2000) Mitochondria as regulators of stimulus-evoked calcium signals in neurons. *Cell calcium* **28 (5/6)**: 307-316.

Frisina R.D., Smith R.L., and Chamberlain S.C. (1985) Differential encoding of rapid changes in sound amplitude by second-order auditory neurons *Exp. Brain Res.* **60**: 417-422.

Frisina R.D., Zettel M.L., Kelley P.E., and Walton J.P. (1995) Distribution of calbindin D-28k immunoreactivity in the cochlear nucleus of the young adult chinchilla. *Hearing Res.* **85**: 53-68.

Furuichi T., Kohda K., Miyawaki A., Mikoshiba K. (1994) Intracellular channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**: 294-303.

Gardner S.M., Trussell L.O., Oertel D. (1999) Time course and permeation of synaptic AMPA receptors in cochlear nuclear neurons correlate with input. *J. Neuroscience.* **19**: 8721-8729.

Gardner S.M., Trussell L.O., Oertel D. (2001) Correlation of AMPA receptor subunit composition with synaptic input in the mammalian cochlear nuclei. *J. Neurosci.* **21**: 7428-7437.

Gasic G.P., Hollmann M. (1992) Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 507-536.

Geiger J.R., Melcher T., Koh D.S., Sakmann B., Seeburg P.H., Jonas P., Monyer H. (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* **15**: 193-204.

Gibb A.J., Colquhoun D. (1992) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus. *J. Physiol.* **456**: 143-179.

Gorman A.L.F., Thomas M.V. (1980) Intracellular calcium accumulation during depolarization in mollusc neurone. *J. Physiol. (London)* **308**: 259-285.

Haak L.L. (1999) Metabotropic glutamate receptor modulation of glutamate responses in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* **81**: 1308-1317.

Hack N.J., Wride M.C., Charters K.M., Kater S.B., and Parks T.N. (2000) Developmental changes in the subcellular localization of calretinin. *J. Neurosci.* **20**: 1-5.

Hajnoczky G., Csordas G., Yi M. (2002) Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria. *Cell Calcium* **32 (5-6)**: 363-377.

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.

Harasztosi Cs., Rusznák Z., Kovács L., Szűcs G. (2001) Effects of divalent cations on voltage-gated Ca^{2+} channels and depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients of freshly isolated pyramidal cells of the rat dorsal cochlear nucleus. *Gen. Physiol. Biophys* **20(4)**: 349-360.

Harrison J.M., Warr W.B. (1962) A study of the cochlear nuclei and ascending auditory pathways of the medulla. *J. Comp. Neurol.* **119**: 341-380.

Harvey J., Collingridge G.L. (1992) Thapsigargin blocks the induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* **139(2)**: 197-200.

Hattori Y., Shibuya I., Tanaka K., Kabashima N., Ueta Y., Yamashita H. (1998) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in isolated in rat supraoptic neurons. *J. Neuroendocrinol.* **10**: 383-389.

Hay M., Lindsley K.A. (1999) AMPA receptor activation of area postrema neurons. *Am. J. Physiol.* **276**: R586-590.

Heizmann C.W., Hunziker W. (1991) Intracellular calcium-binding proteins: more sights than insights. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 98-103.

Herb A., Burnashev N., Werner P., Sakmann B., Wisden W., Seeburg P.H. (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron.* **8**: 775-785.

Herrington J., Park Y.B., Babcock D.F., Hille B. (1996) Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron.* **16**: 219-228.

Hillman D., Chen S., Aung T.T., Cherksey B., Sugimori M., Llinas R.R. (1991) Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(16)**: 7076-80.

Hirsch J.A., Oertel D. (1988) Synaptic connections in the dorsal cochlear nucleus of mice, in vitro. *J. Physiol. (London)* **396**: 549-562.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**: 449-472.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952b) The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**: 473-496.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952c) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**: 497-506.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952d) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**: 500-544.

Hofmann F., Biel M., Flockerzi V. (1994) Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 399-418.

Holliday J., Adams R.J., Sejnowski T.J., Spitzer N.C. (1991) Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons. *Neuron.* **7(5)**: 787-96.

Hollmann M., Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 31-108 .

Huang C., Liu G., Huang R. (1982) Projections from the cochlear nucleus to the cerebellum. *Brain Res.* **244**: 1-8.

Huguenard J.R., Prince D.A. (1994) Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *J. Neurosci.* **14**: 5485-5502.

Huguenard J.R. (1996) Low-threshold calcium currents in central nervous system neurones. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 329-348.

Hume R.I., Dingledine R., Heinemann S.F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science.* **253**: 1028-1031.

Hunter C., Petralia R.S., Vu T., Wenthold R.J. (1993) Expression of AMPA-selective glutamate receptor subunits in morphologically defined neurons of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neuroscience.* **13**: 1932-1946.

Hurd L.B. II. and Feldman M.L. (1994) Purkinje-like cells in rat cochlear nucleus. *Hearing Res.* **72**: 143-158.

Idrizbegovic E., Bogdanovic N., Canlon B. (1998) Modulating calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the cochlear nucleus by moderate noise exposure in mice. A quantitative study on the dorsal and posteroventral cochlear nucleus. *Brain Res.* **800**: 86-96.

Ito Y., Kuriyama H. (1971) Membrane properties of the smooth-muscle fibres of the guinea-pig portal vein. *J. Physiol.* **214**: 427-441.

Jacobson D., Duchon M. R. (1998) Fluorescence imaging of the mitochondrial permeability transition in rat cortical astrocytes in culture. *J. Physiol.* **506**: 75.

Joels M., Yool A.J., Gruol D.L. (1989) Unique properties of non-N-methyl-D-aspartate excitatory responses in cultured Purkinje neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **86**: 3404-3408.

Kano M., Garaschuk O., Verkhratsky A., Konnerth A. (1995) Ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in rat cerebellar Purkinje neurons. *J. Physiol. (London)* **487**: 1-16.

Kawamoto S., Hattori S., Oji Í., Hamajima K., Mishina M., Okuda K. (1994) Ligand-binding properties and N-glycosylation of $\alpha 1$ subunit of the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)-selective glutamate receptor channel expressed in a baculovirus system. *Eur. J. Biochem.* **223**: 665-673.

Kawamoto S., Hattori S., Sakimura K., Mishina M., Okuda K. (1995) N-Linked glycosylation of the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate

(AMPA)-selective glutamate receptor channel $\alpha 2$ subunit is essential for the acquisition of ligand-binding activity. *J. Neurochem.* **64**: 1258-1266.

Keinänen K., Wisden W., Sommer B. et al. (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science.* **249**: 556-560.

Keller B.U., Hollmann M., Heinemann S., Konnerth A. (1992) Calcium influx through subunits GluR1/GluR3 of kainate/AMPA receptor channels is regulated by cAMP dependent protein kinase. *EMBO J.* **11**: 891-896.

Kelly J.B., Zhang H. (2002) Contribution of AMPA and NMDA receptors to excitatory responses in the inferior colliculus. *Hearing Res.* **168**: 35-42.

Kemmer M., Vater M. (2001) Cellular and subcellular distribution of AMPA-type glutamate receptors subunits and metabotropic glutamate receptor 1alpha in the cochlear nucleus of the horseshoe bat (*Rhinolophus rouxi*). *Hearing Res.* **156**: 128-142.

Kiedrowski L., Brooker G., Costa E., Wroblewski J.T. (1994) Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron* **12**: 295-300.

Kim D.O., Sirianni J.G., Chang S.O. (1990) Responses of DCN-PVCN neurons and auditory nerve fibers in unanesthetized decerebrate cats to AM and pure tones: analysis with autocorrelation/power spectrum. *Hearing Res.* **45**: 95-113.

Kocsis J.D., Rand M.N., Lankford K.L., Waxman S.G. (1994) Intracellular calcium mobilization and neurite outgrowth in mammalian neurons. *J Neurobiol.* **25(3)**: 252-64.

Köhler M., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H. (1993) Determinants of Ca^{2+} permeability in both TM1 and TM2 of high-affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron.* **10**: 495-500.

Köhr G., Lambert C.E., Mody I. (1991) Calbindin-D28K (CaBP) levels and calcium currents in acutely dissociated epileptic neurons. *Exp Brain Res.* **85(3)**: 543-51.

Kondo M., Sumino R., Okado H. (1997) Combinations of AMPA receptor subunit expression in individual cortical neurons correlate with expression of specific calcium-binding proteins. *J. Neurosci.* **17**: 1570-1581.

Korada S., Schwartz I.R. (2000) Calcium binding proteins and the AMPA glutamate receptor subunits in gerbil cochlear nucleus. *Hearing Res.* **140**: 23-37.

Kostyuk P.G., Mironov S.L., Tepikin A.V., Belan P.V. (1989) Cytoplasmic free calcium in isolated snail neurons as revealed by fluorescent probe fura-2: mechanisms of Ca recovery after Ca load and Ca release from intracellular stores. *J. Membrane Biol.* **110**: 11-18.

Kostyuk P., Verkhatsky A. (1995) *Calcium Signalling in the Nervous System*, Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

Kudo Y., Ogura A. (1986) Glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ concentration in isolated hippocampal neurones. *Br. J. Pharmacol.* **89**: 191-198.

Kutsuwada T., Kashiwabuchi N., Mori H., Sakimura K., Kushiya E., Araki K., Meguro H., Masaki H., Kumanishi T., Arakawa M. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature.* **358**: 36-41.

Kuusinen A., Arvola M., Keinänen K. (1995) Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J.* **14**: 6327-6332.

Lee S.-H., Schwaller B., Neher E. (2000) Kinetics of Ca²⁺ binding to parvalbumin in chromaffin cells: implications for Ca²⁺ transients of neuronal dendrites. *J. Physiol.* **525**: 419-432.

Lester R.A.J., Jahr C.E. (1992) NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J. Neuroscience.* **12**: 635-643.

Li Y.Q., Takada M., Kaneko T., Mizuno N. (1997) Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **378**: 283-294.

Lohman C., Friauf E. (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J. Comp. Neurol.* **367**: 90-109.

Lomeli H., Wisden W., Köhler M., Keinänen K., Sommer B., Seeburg P.H. (1992) High affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett.* **307**: 139-143.

Lomeli H., Sprengel R., Laurie D.J., Kohr G., Herb A., Seeburg P.H., Wisden W. (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett.* **315**: 318-322.

Lorente de Nó R. (1933) Anatomy of the eighth nerve. III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope.* St. Louis 43, 327-350.

Lorente de Nó R. (1981) *The primary acoustic nuclei*. New York: Raven Press.

Malenka R.C., Nicoll R.A. (1999) Long-term potentiation- a decade of progress? *Science*. **285**: 1870-1874.

McCleskey E.W. (1994) Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*. **4**: 304-312.

Mead A.N., Stephens D.N. (1999) CNQX but not NBQX prevents expression of amphetamine-induced place preference conditioning: a role for the glycine site of the NMDA receptor, but not AMPA receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**: 9-15.

Meguro H., Mori H., Araki K., Kushiya E., Kutsuwada T., Yamazaki M., Kumanishi T., Arakawa M., Sakimura K., Mishina M. (1992) Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*. **357**: 70-74.

Meldolesi J. (2002) Rapidly exchanging Ca^{2+} stores: ubiquitous partners of surface channels in neurons. *News Physiol Sci*. **17**: 144-149.

Metzger F., Kulik A., Sendtner M., Ballanyi K. (2000) Contribution of Ca^{2+} -permeable AMPA/KA receptors to glutamate-induced Ca^{2+} rise in embryonic lumbar motoneurons in situ. *J. Neurophysiol.* **83**: 50-59.

Mironov S.L., Usachev Y., Lux H.D. (1993) Spatial and temporal control of intracellular free Ca^{2+} in chick sensory neurons. *Pflügers Arch.* **424**: 183-191.

Missiaen L., Robberecht W., van den Bosch L., Callewaert G., Parys J.B., Wuytack F., Raeymaekers L., Nilius B., Eggermont J., De Smedt H. (2000) Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease. *Cell Calcium*. **28**: 1-21.

Moller A.R. (1972) Coding of amplitude and frequency modulated sounds in the cochlear nucleus of the rat. *Acta Physiol. Scand.* **86**: 223-238.

Montero M., Alonso M. T., Carmicero E., Cuchillo I., Garcia A. G., Garcia-Sancho J., Alvarez J. (2000.): Millimolar $[\text{Ca}^{2+}]$ transients in mitochondria close to couplings of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release. *Nat. Cell. Biol* **2**: 57.-60.

Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors- molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. **256**: 1217-1221.

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.

Mosbacher J., Schoepfer R., Monyer H., Burnashev N., Seeburg P.H., Ruppersberg J.P. (1994) A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science*. **266**: 1059-1062.

Mugnaini E. (1985) GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.* **235**: 61-81.

Müller T.H., Partridge L.D., Swandulla D. (1993) Calcium buffering in bursting Helix pacemaker neurones. *Pflügers Arch.* **425**: 499-505.

Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. **258**: 597-603.

Necker R. (2001) Spinocerebellar projections in the pigeon with special reference to the neck region of the body. *J. Comp. Neurol.* **429**: 403-418.

Neher E., Augustine G.J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol (London)* **450**: 273-301.

Nicoll D.A., Longoni S., Philipson K.D. (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Science* **250**: 562-565.

Nowak L., Bregetovski P., Ascher P., Herbert A., Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. **307**: 462-465.

Nowycky M., Fox A.D., Tsien R.W. (1985) Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature*. **391**: 896-900.

Nunn D.L., Taylor C.W. (1992) Luminal Ca²⁺ increases the sensitivity of Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate. *Mol. Pharmacol.* **41**: 115-119.

Obenaus A., Mody I., Baimbridge K.G. (1989) Dantrolene-Na (Dantrium) blocks induction of long-term potentiation in hippocampal slices. *Neurosci Lett.* **98(2)**: 172-178.

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.

Oldershaw K.A., Taylor C.W. (1993) Luminal Ca²⁺ increases the affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate for its receptor. *Biochem. J.* **292**:631-633.

Oliver D.L. (1984) Dorsal cochlear nucleus projections to the IC in the cat, a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* **224**: 155-172.

D'Orlando C., Fellay B., Schwaller B., Salicio V., Bloc A., Gotzos V., and Celio M.R. (2001) Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res.* **909**: 145-158.

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.

Otis T.S., Raman I.M., Trussell L.O. (1995) AMPA receptors with high Ca^{2+} permeability mediate synaptic transmission in the avian auditory pathway. *J. Physiol. (London)* **482**: 309-315.

Partin K.M., Patneau D.K., Winters C.A., Mayer M.L., Buonanno A. (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA vs kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron.* **11(6)**: 1069-1082.

Patneau D.K., Mayer M.L. (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J. Neurosci.* **10**: 2385-2399.

Perez-Reyes E., Cribbs L.L., Daud A., Lacerda A.E., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., Lee J.H. (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* **391**: 896-900.

Petralia R.S., Wenthold R. (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **318**: 329-354.

Petralia R.S., Wang Y.X., Wenthold R.J. (1994) Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunit. KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* **349**: 85-110.

Petralia R.S., Wang Y.X., Zhao H.M., Wenthold R.J. (1996) Ionotropic and metabotropic glutamate receptors show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations in the dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* **372**: 356-383.

Petralia R.S., Rubio M.E., Wang Y.X., Wenthold R.J. (2000) Differential distribution of glutamate receptors in the cochlear nucleus. *Hearing Res.* **147**: 59-69.

Philipson K.D., Nicoll D.A. (2000) Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu. Rev. Physiol.* **62**: 111-133.

Pochet R., Lawson D.E.M., Heizmann C.W. (1990) Calcium-binding proteins in normal and transformed cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **269**: 1-223.

Powis D.A., Clark C.L., O'Brien K.J. (1994) Lanthanum can be transported by the sodium-calcium exchange pathway and directly triggers catecholamine release from bovine chromaffin cells. *Cell Calcium* **16**: 377-390.

Qin N., Olcese R., Zhou J., Cabello O.A., Birnbaumer L., Stefani E. (1996) Identification of a second region of the beta-subunit involved in the regulation of calcium channel inactivation. *Am J. Physiol.* **271**: 1539-1545.

Radermacher M., Wagenknecht T., Grassucci R., Frank J., Inui M., Chadwick C., Fleischer S. (1992) Cryo-EM of the native structure of the calcium release channel/ryanodine receptor from sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* **61**: 936-940.

Ravindranathan A., Donevan S.D., Sugden S.G., Greig A., Rao M.S., Parks T.N. (2000) Contrasting molecular composition and channel properties of AMPA receptors on chick auditory and brainstem motor neurons. *J. Physiol (London)* **523**: 667-684.

Resibois A., Rogers J.H. (1992) Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neurosci.* **46**: 101-134.

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.

Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F. S., Fogarty K. E., Lifshitz L. M., Tuft R. A., Pozzan T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* **280**: 1763-1766.

Robert A., Irizarry S.N., Hughes T.E., Howe J.R. (2001) Subunit interactions and AMPA receptor desensitization. *J. Neurosci.* **21**: 5574-5586.

Rogers J.H. (1992) Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res.* **587(1)**: 147-157.

Rogers J.H., Resibois A. (1992) Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neurosci.* **51**: 843-865.

Rosenmund C., Stern-Bach Y., Stevens C.F. (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* **280**: 1596-1599.

Rossi F. and Borsello T. (1993) Ectopic Purkinje cells in the adult rat: olivary innervation and different capabilities of migration and development after grafting. *J. Comp. Neurol.* **337**: 70-82.

Rubio M.E., Wenthold R.J. (1997) Glutamate receptors are selectively targeted to postsynaptic sites in neurons. *Neuron* **18**: 939-950.

Rubio M.E., Wenthold R.J. (1999) Differential distribution of intracellular glutamate receptors in dendrites. *J. Neuroscience.* **19(13)**: 5549-5562.

Rusznák Z., Harasztosi Cs., Stanfield P.R., Kovács L., Szűcs G. (2000) Potassium-depolarization-induced cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ transients in freshly dissociated pyramidal neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *Pflügers Arch.* **440**: 462-466.

Rusznák Z., Harasztosi Cs., 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. 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.

Sakimura K., Morita T., Kushya E., Mishina M. (1992) Primary structure and expression of the gamma2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron.* **8**: 267-274.

Sato K., Kuriyama H., Altschuler R.A. (1998) Differential distribution of NMDA receptor subunit mRNA in the rat cochlear nucleus. *Microsc. Res. Tech.* **41**: 217-223.

Schatzmann H.J. (1966) ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. *Experientia* **22**: 364-368.

Schwartz I.R., Keh A., Eager P.R. (2000) Differential postsynaptic distribution of GluRs 1-4 on cartwheel and octopus cell somata in the gerbil cochlear nucleus. *Hearing Res.* **147**: 70-76.

Seidler N.W., Jona I., Vegh M., Martonosi A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**: 17816-17823.

Sekirnjak C., Martone M.E., Weiser M., Deerinck T., Bueno E., Rudy B., Ellisman M. (1997) Subcellular localization of the K^+ channel subunit Kv3.1b in selected rat CNS neurons. *Brain Res.* **766**: 173-187.

Sharp A.H., Dawson T.M., Ross C.A., Fotuhi M., Mourey R.J., Snyder S.H. (1993a) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: immunohistochemical localization to discrete areas of rat central nervous system. *Neurosci.* **53**: 927-942.

Sharp A.H., McPherson P.S., Dawson T.M., Aoki C., Campbell K.P., Snyder S.H. (1993b) Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in rat brain. *J. Neurosci.* **13**: 3051-3063.

Shimizu H., Borin M.L., Blaustein M.P. (1997) Use of La^{3+} to distinguish activity of the plasmalemmal Ca^{2+} pump from $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in arterial myocytes. *Cell Calcium* **21**: 31-41.

Shmigol A., Kirischuk S., Kostyuk P., Verkhratsky A. (1994) Different properties of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in peripheral and central mammalian neurones. *Pflügers Arch.* **426**: 174-176.

Shmigol A., Verkhratsky A., Isenberg G. (1995) Calcium induced calcium release in rat sensory neurones. *J. Physiol (London)* **489**: 627-636.

Sidky A.O., Baimbridge K.G. (1997) Calcium homeostatic mechanisms operating in cultured postnatal rat hippocampal neurones following flash photolysis of nitrophenyl-EGTA. *J. Physiol. (London)* **504**: 579-590.

Simpson P.B., Challis R.A.J., Nahorski S.R. (1995) Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. *Trends Neurosci.* **7**: 299-306.

Sitsapesan R., Williams A.J. (1990) Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol. (London)* **423**: 425-439.

Sommer B., Keinänen K., Verdoorn T.A., Wisden W., Burnashev N., Herb A., Köhler M., Takagi T., Sakmann B., Seeburg P.H. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science.* **249**: 1580-1585.

Sommer B., Köhler M., Sprengel R., Seeburg P.H. (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channel. *Cell.* **67**: 11-19.

Sommer B., Burnashev N., Verdoorn T.A., Keinänen K., Sakmann B., Seeburg P.H. (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J.* **11**: 1651-1656.

Spatz W. B. (1997) Differences between guinea pig and rat in the dorsal cochlear nucleus: expression of calcium-binding proteins by cartwheel and Purkinje-like cells. *Hearing Res.* **107**: 136-146.

Stern P., Behe P., Schoepfer R., Colquhoun D. (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNA's: comparison with native receptors. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* **250**: 272-277.

Stern P., Miroslav C., Colquhoun D., Stephenson F.A. (1994) Single-channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line: comparison with results from *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **476(3)**: 391-397.

Stevens J., Rogers J.H. (1997) Chick calretinin: purification, composition, and metal binding activity of native and recombinant forms *Protein Expr. Purif.* **9(2)**: 171-181.

Sugihara H., Moriyoshi K., Ishii T., Masu M., Nakanishi S. (1992) Structure and properties of 7 isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **185**: 826-832.

Surin A., Storozhevych T., Yuravichus A., Sorokina E., Arsen'eva E., Vinskaya N., Borodin A., Pinelis V., Khodorov B. (2000) Contribution of the plasmalemmal Ca^{2+} pump to clearance of glutamate-imposed Ca^{2+} load in cerebellar granule cells. *J. Physiol. (London)* **528**: 69P-70P.

Takei K., Stukenbrok H., Metcalf A., Mignery G.A., Sudhof T.C., Volpe P., De Camilli P. (1992) Ca^{2+} stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the $InsP_3$ receptor, Ca^{2+} -ATPase, and calsequestrin. *J. Neurosci.* **12**: 489-505.

Tatsumi H., Katayama Y. (1993) Regulation of the intracellular free calcium concentration in acutely dissociated neurones from rat nucleus basalis. *J. Physiol. (London)* **464**: 165-181.

Taylor C.W. (1992) Kinetics of inositol 1,4,5-trisphosphate stimulated Ca^{2+} mobilization. In: *Inositol Phosphates and Calcium Signalling*, ed. by Putney J.W., Raven Press, New York.

Tepikin A.V., Kostyuk P.G., Snitsarev V.A., Belan P.V. (1991) Extrusion of calcium from a single neuron of the snail *Helix pomatia*. *J. Membrane Biol.* **123**: 43-47.

Tepikin A.V., Llopis J., Snitsarev V.A., Gallacher D.V., Petersen O.H. (1994) The droplet technique: measurement of calcium extrusion from single isolated mammalian cells. *Pfugers Arch.* **428**: 664-670.

Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990) Thapsigargin, a tumor promotor, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2466-2470.

Thayer S.A., Miller R.J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J. Physiol. (London)* **425**: 85-115.

Tymianski M., Charlton M.P., Carlen P.L., Tator C.H. (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* **13**: 2085-2104.

Tinel H., Cancela J. M., Mogami H., Gerasimenko J. V., Gerasimenko O. V., Tepikin A. V., Petersen O. H. (1999.) Activa mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol triphosphate evoked local cytosolic Ca^{2+} signals. *EMBO J.* **18**: 4999.-5008.

Tse A., Tse F.W., Hille B. (1994) Calcium homeostasis in identified rat gonadotrophs. *J. Physiol.* **477**: 511-525.

Usachev Y., Shmigol A., Pronchuk N., Kostyuk P., Verkhratsky A. (1993) Caffeine-induced calcium release from internal stores in rat sensory neurones. *Neurosci.* **57**: 845-859.

Usachev Y.M., Thayer A. (1999) Ca^{2+} influx i resting rat sensory neurones that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores. *J. Physiol. (London)* **519**: 115-130.

Vanselow B.K., Keller B.U. (2000) Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J. Physiol. (London)* **252**: 433-445.

Vater M, and Braun K. (1994) Parvalbumin, calbindin D-28k, and calretinin immunoreactivity in the ascending auditory pathway of horseshoe bats. *J. Comp. Neurol.* **341**: 534-558.

Viana F., Bayliss D.A., Berger A.J. (1993) Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* **69**: 2137-2149.

Wang X.J., Rinzel J., Rogawski M.A. (1991) A model of the T-type calcium current and the low-threshold spike in thalamic neurons. *J. Neurophysiol.* **66(3)**: 839-850.

Wang Y.X., Wenthold R.J., Ottersen O.P., Petralia R.S. (1998) Endbulb synapses in the anteroventral cochlear nucleus express a specific subset of AMPA-type glutamate receptor subunits. *J. Neuroscience.* **18**: 1148-1160.

Webster D.B and Trune D.R. (1982) Cochlear nuclear complex of mice. *Am. J. Anat.* **163**: 103-130.

Weiser M., Bueno E., Sekirnjak C., Martone M.E., Baker H., Hillman D., Chen S., Thornhill W., Ellisman M., Rudy B. (1995) The potassium channel subunit KV3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons. *J. Neurosci.* **15**: 4298-4314.

Werner P., Voigh M., Keinänen K., Wisden W., Seeburg P.H. (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature.* **351**: 742-744.

Winsky L., Jacobowitz D.M. (1995) Effects of unilateral cochlea ablation on the distribution of calretinin mRNA and immunoreactivity in the guinea pig ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* **354**: 564-582.

Yamazaki M., Araki K., Shibata A., Mishina M. (1992a) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**: 886-892.

Yamazaki M., Mori H., Araki K., Mori K.J., Mishina M. (1992b) Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. *FEBS. Lett.* **300**: 39-45.

Yi M., Weaver D., Hajnoczky G. (2004) Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J. Cell. Biol.* **167 (4)**: 661-672.

Young E.D., Spirou G.A., Rice J.J., and Voigt H.F. (1992) Neural organization and responses to complex stimuli in the dorsal cochlear nucleus. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **336**, 407-413.

Zettel M.L., Carr C.E., O'Neill W.E. (1991) Calbindin-like immunoreactivity in the central auditory system of the mustached bat, *Pteronotus parnelli*, J. Comp. Neurol. **313**: 1-16.

Zheng L., Godfrey D.A., Waller H.J., Godfrey T.G., Chen K., Kong W. (2000) Metabolism of the dorsal cochlear nucleus in rat brain slices. Hearing Res. **143**: 115-129.

Zirpel L., Lachica E.A., Rubel E.W. (1995) Activation of a metabotropic glutamate receptor increases intracellular calcium concentrations in neurons of the avian cochlear nucleus. J. Neurosci. **15**: 214-222.

ÖSSZEFOGLALÁS

A nucleus cochlearis a hallópálya kiemelkedő jelentőségű része, hiszen a VIII. agyideg által a Corti-szervből szállított hallási információ analízise itt kezdődik el, azáltal, hogy az a magban található többféle másodlagos érzőneuronra tevődik át, ezek a sejtek pedig eltérő agyterületekre prociálnak. Tekintettel arra, hogy ezek az idegsejtek a nervus acusticussal igen intenzív szinaptikus kapcsolatban állnak, jelentős depolarizáció és Ca^{2+} -terhelés alakulhat ki rajtuk.

Jelen munkában elsősorban a nucleus cochlearis piramis-neuronok Ca^{2+} -homeosztázisának szabályozását vizsgáltuk. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérésével igazolódott, hogy glutamát hatására jelentős mértékű Ca^{2+} -belépés következik be ezen sejtekben. A glutamát-indukált Ca^{2+} -tranziensek létrejöttében az AMPA-receptorok és a feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák jelentősége a domináns, míg az NMDA-receptorok szerepe elhanyagolható kontroll kísérleti körülmények között.

A neuronok működésének hosszútávú fennmaradásához elengedhetetlen, hogy a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció rövid időn belül a nyugalmi szintre csökkenjen vissza. Ennek biztosításában, Ca^{2+} -puffer hatásuk révén, jelentős szerepet játszanak egyes, sejten belüli Ca^{2+} -kötő fehérjék. Immunhisztokémiai módszerekkel bizonyítottuk, hogy a nucleus cochlearis projekciós neuronjai legalább egy, de többségükben két kalciumkötő fehérjét expresszálnak citoplazmájukban, ami a sejtek Ca^{2+} -terheléssel szembeni jelentős védekezőképességét sugallja.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkentésének a leghatékonyabb mechanizmusai azok, melyek az intracelluláris térből eltávolítják a sejtaktivitás kapcsán bekerülő Ca-ionokat. A piramis-neuronok funkcionális vizsgálata során szerzett eredményeink rámutattak, hogy a Ca^{2+} -eltávolításban a felszíni membránban található Ca^{2+} -pumpának (PMCA), illetve az endoplazmatikus retikulum membránjában elhelyezkedő Ca^{2+} -pumpának (SERCA) van kiemelkedő szerepe, míg a plazmamembránban található $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -cseremechanizmus jelentősége elhanyagolható.

SUMMARY

The cochlear nucleus has an outstanding importance in the audition as the analysis of the auditory information carried by the 8th cranial nerve from the organ of Corti begins here. The acoustic information is processed by the projection neurones of the cochlear nucleus, which send their axons to different brain areas. As these projection cells have highly active synaptic connections with the acoustic nerve, their Ca^{2+} load seems to be rather strong.

In the present work the regulation of the Ca^{2+} homeostasis was studied in the pyramidal neurones of the cochlear nucleus. By measuring the intracellular Ca^{2+} concentration we proved that glutamate induced significant Ca^{2+} entry to the pyramidal neurones. Mostly the AMPA receptors and voltage-gated Ca^{2+} channels had dominant importance in the genesis of glutamate-induced Ca^{2+} transients, whereas the role of NMDA receptors seemed to be negligible under control circumstances.

In order to maintain the physiological functions and homeostatic processes of the neurones, it is essential to rapidly decrease the increased intracellular Ca^{2+} concentration to the resting level. To achieve this, intracellular Ca^{2+} buffer proteins have outstanding roles in compensating for the high intracellular Ca^{2+} concentration. Immunohistochemical methods applied in our work showed that most of the projection neurones expressed two calcium binding proteins in the cytoplasm suggesting a remarkable buffer capacity of these cells.

The most effective mechanisms in the reduction of the elevated intracellular Ca^{2+} concentration are the various transport mechanisms that are capable of removing the Ca^{2+} entering during cell activity. The functional examination of the pyramidal cells indicated that the Ca^{2+} pump located in the surface membrane (PMCA) and the Ca^{2+} pump situated in the endoplasmic reticulum (SERCA) had important roles in removing the cytoplasmic Ca^{2+} , whereas the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger -located in the plasma membrane- had negligible contribution to this process.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt Dr. Kovács László Professor Úrnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának szeretném hálámat kifejezni, hogy lehetővé tette számomra, hogy intézetében végezhessem PhD tanulmányaimat, és támogatott munkám elvégzésében.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Szűcs Géza Professor Úrnak és Dr. Rusznák Zoltánnak munkámban nyújtott értékes tanácsaikért, szakmai vezetésükért és baráti támogatásukért.

Köszönöm Prof. Dr. Matesz Klárának és Dr. Szűcs Péternek, a DE OEC Anatómiai Intézet munkatársainak az immunhisztokémia és a retrográd jelöléses technika elsajátításában, valamint Dr. Szentesi Péternek, a DE OEC Élettani Intézet munkatársának a konfokális felvételek elkészítésében nyújtott segítségét.

Barátsággal gondolok szerzőtársaimra és az Élettani Intézet valamennyi munkatársára, különösképpen Dr. Varga Attilánának, Dr. Harasztosi Csabának, Pocsai Krisztinának köszönöm figyelmes, önzetlen, baráti segítségüket.

Köszönöm Dr. Kovács Ilonának a Kenézy Gyula Kórház Patológia Osztály vezetőjének és az osztály valamennyi dolgozójának, hogy türelmükről és megértésükről biztosítottak a munka során.

Hálával tartozom férjemnek és családomnak, amiért mellettem álltak minden nehézségben és gondoskodó szeretetükkel biztosították tanulmányaimat.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

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

Idézhető kivonatok

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

Előadások és poszterek

1. Pór, Á., Harasztosi, Cs., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2001) Ionotróp glutamát-receptorok jelentősége patkány nucleus cochlearis dorsalisból izolált piramis-sejtek Ca^{2+} -homeosztázisában, LXVI. MÉT Vándorgyűlés, Szeged.
2. Rusznák, Z., Pór, Á., Harasztosi, Cs., Szűcs, G. (2001) Role of ionotropic glutamate receptors in the Ca^{2+} homeostasis of isolated pyramidal cells of the rat cochlear nucleus, Sheffield University Meeting of the Physiological Society, Sheffield, UK.

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

A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Pál, B., Pór, Á., Szűcs, G., Kovács, I., Rusznák, Z. (2003) HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2189-2199. **(IF: 4,995)**
2. Rusznák, Z., Pocsai, K., Kovács, I., Pór, Á., Pál, B., Bíró, T., Szűcs, G. (2004) Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1532-1542. **(IF: 4,995)**
3. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2005) Voltage-gated and background K⁺ channel subunits expressed by the bushy cells of the rat ventral cochlear nucleus. *Hearing Res.* 199(1-2): 57-70. **(IF: 1,502)**

Idézhető kivonatok

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

Előadások és poszterek

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

11. Pocsai, K., Pór, Á., Pál, B., Kovács, I., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2004) TASK-1 distribution in the auditory system and cerebellum, IBRO Konferencia, Budapest.
12. Pál, B., Pór, Á., Pocsai, K., Szűcs, G., Rusznák, Z. (2004) Patkány nucleus cochlearis bushy-sejtek által expresszált feszültségvezérelt K-csatorna alegységek jelenlétének vizsgálata immunhisztokémiai és elektrofiziológiai módszerekkel, LXVIII. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.
13. Rusznák, Z., Pocsai, K., Kovács, I., Pór, Á., Pál, B., Szűcs, G. (2004) TASK-csatornák jelenlétének és megoszlásának vizsgálata patkány központi idegrendszerében és humán cerebellumban, LXVIII. MÉT Vándorgyűlés, Debrecen.