

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



**Pocsai Krisztina**

---

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

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



**Pocsai Krisztina**

**Témavezető: Dr. Rusznák Zoltán**

---

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

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. A K<sup>+</sup>-csatornák szerkezete és csoportosítása

A sejt felszíni membrán K<sup>+</sup>-csatornáinak aktivitása jelentős módon képes befolyásolni az őket expresszáló sejtek elektromos sajátosságait, így a nyugalmi membránpotenciál értékét, az excitábilis struktúrák ingerlékenységét, a szinapszisokban történő neurotranszmitter-felszabadulást és a szinaptikus transzmisszió hatékonyságát. Az újabb vizsgálati eredmények szerint a K<sup>+</sup>-csatornák a klasszikus elektrogén funkciókon túl képesek az általános sejt működést, így a differenciálódást, proliferációt és apoptosist is befolyásolni; továbbá egyes K<sup>+</sup>-csatornák aktivitása elősegítheti az őket expresszáló sejtek hypoxiás körülmények közötti túlélését is. A K<sup>+</sup>-csatornák aktivitásának komoly szerepe lehet egyes patológiás folyamatokban is, amit jól demonstrál, hogy bizonyos K<sup>+</sup>-csatornák overexpresszióját prostata-, vastagbél-, tüdő-, emlő- és bőrdaganatokban is leírták. Meggyőző adatok szólnak amellett, hogy a K<sup>+</sup>-csatornák nem pusztán jelen vannak az említett kórfolyamatokban, de komoly jelentőségük lehetnek azok pathogenesisében is.

A K<sup>+</sup>-csatornák molekuláris szerkezetük szerint nem egységesek; az őket felépítő alegységek száma és struktúrája alapján három főcsoportba oszthatók. A legnagyobb számú tagot számláló csoportot a feszültségfüggő (depolarizáció hatására aktiválódó) K<sup>+</sup>-csatornák (Kv-csatornák) alkotják. A Kv-csatornák négy alegységből állnak, melyek mindegyikében hat transzmembrán domén található. Ezen csatornáknak kiemelkedő jelentőségük van az első az akciós potenciálokat (AP) követő repolarizáció és utóhiperpolarizáció kialakításában, az AP-k késleltetésében, vagy akár azok kialakulásának megakadályozásában, azaz igen jelentősek a kialakuló AP-k alakjának, időtartamának és frekvenciájának meghatározásában.

A K<sup>+</sup>-csatornák további főbb csoportjait a befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-csatornák és a két pórusformáló domént tartalmazó K<sup>+</sup>-csatornák képezik. Az utóbbi osztályba tartozó ioncsatornák molekuláris szerkezetükben, viselkedésükben és funkcióikban jelentősen különböznek az addig ismert K<sup>+</sup>-csatornáktól. Általánosságban elmondható, hogy a funkcionális molekulát felépítő alegységek négy transzmembrán domént és két pórusformáló hurkot tartalmaznak, ahol a pórus kialakításában szerepet játszó hurkok az alegységen belül egymás után helyezkednek el; a működőképes struktúra kialakulása pedig az alegységek dimerizációjával valósul meg.

A két pórusformáló hurkot tartalmazó  $K^+$ -csatornák családjának egyik alcsoportját a TASK-csatornák képezik (TWIK- [twin-pore domain in weak inward rectifier  $K^+$  channels] related, acid-sensitive  $K^+$  channels). Ezek a molekulák igen érzékenyen reagálnak az extracelluláris pH változásaira: az extracelluláris pH savas irányba való eltolódása a záródásukat okozza. A molekuláris biológiai és a funkcionális vizsgálatok rámutattak, hogy a pH iránti érzékenységet (legalábbis részben) a csatornafehérje 98-as pozíciójában, a permeábilis pórus külső szájadékaiban elhelyezkedő hisztidin felelős.

A TASK-csatornák farmakológiája jelentősen eltér a többi  $K^+$ -csatorna esetében megszokottól, és megkülönböztetett figyelmet érdemel hogy bizonyos gáznemű altatószerek (pl. halotán) aktiválják a TASK-család egyes tagjait, ami az őket expresszáló neuronok hiperpolarizációját, így azok ingerlékenységének csökkenését okozza. Ez a megfigyelés kiválóan magyarázza a halotán jól ismert altató, központi idegrendszert gátló hatását.

A TASK-csatornák élettani szerepe igen sokrétű; egyebek között jelentőségük lehet a perifériás kemoreceptorok hypoxia iránti érzékenységének biztosításában, a patkány mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjeinek szekretoros funkciójában, és fontos szerepet töltenek be a központi idegrendszerben zajló neurotranszmisszió regulációjában is. Egyes sejtekben a TASK-1- és a TASK-3-csatornák az apoptózis indukálásában is fontos szerepet játszanak.

Egyre több adat szól amellett, hogy a különböző  $K^+$ -csatornák a fiziológias funkciókon túl bizonyos kóros folyamatokban is szerepet játszhatnak. Meggyőző adatok szólnak amellett, hogy a sejt felszíni membránban lévő  $K^+$ -csatornák aktivitása elengedhetetlen a sejtproliferációhoz, és az is egyre nyilvánvalóbbnak tűnik, hogy ez lényeges lehet egyes humán daganatok fejlődésében és növekedésében egyaránt. A tumorgenezisben betöltött funkció szempontjából különösen fontosnak tűnnek a TASK-3-csatornák. A hatás annyira jelentős, hogy a TASK-3-csatornát kódoló gént (Kcnk9) immár hivatalosan is protoonkogénnek tartják, ám továbbra sem világos, hogy a TASK-3-csatornák milyen mechanizmus révén rendelkeznek tumorigén hatással. Az egyik elképzelés szerint a sejt felszíni membránban elhelyezkedő  $K^+$ -csatornák aktiválódása hiperpolarizálja a membránt, melynek hatására megnő a Ca-ionok elektrokémiai grádiense, így a háttér  $Ca^{2+}$ -csatornákon keresztül nagyobb mennyiségű  $Ca^{2+}$  áramlik be a sejtekbe, ami lényeges hatást gyakorol proliferációjukra és differenciálódásukra. Egy másik lehetséges magyarázat értelmében a sejt felszíni membránon keresztül történő  $K^+$ -

kilépés csökkentené az intracelluláris  $K^+$ -koncentrációt, ami közvetlenül befolyásolná egyes enzimek (pl. kaspázok) aktivitását. Az sem elképzelhetetlen azonban, hogy a TASK-3-csatornák fokozott jelenléte valamilyen módon növeli az őket overexpresszáló sejtek hypoxiával szembeni ellenállását. Sejttenyésztési körülmények között fenntartott neuroblastoma sejteken végzett kísérletek eredményei szerint a TASK-3-overexpresszió határozottan növelte a sejtek hypoxia- és serumdeprivációval szembeni toleranciáját, ami nyilvánvaló szelektív előnyt jelenthet a daganatsejtek számára a solid daganatok központi, kevésbé vascularisált régiójában. Továbbra sem világos azonban, hogy a TASK-3-overexpresszió milyen mechanizmus révén biztosítja a sejtek túlélését az említett hypoxiás környezetben.

## **1.2. A nucleus cochlearis jelentősége, szerkezete és főbb sejtípusai**

A hangérzékelés során a primáer kisülési mintázat dekódolása történik, aminek fontos és korai lépése a hallóideg rostjain érkező AP-sorozatok „szétosztása” olyan neuronhálózatok között, amelyeket felépítésük alkalmassá tesz arra, hogy ugyanazon jelmintázatot az eredeti hanginger egyes paraméterei szerint (hangerősség, hangmagasság, hangszín, hangforrás lokalizációja) dekódolják. A rendelkezésre álló adatok szerint a nucleus cochlearis szerkezete alkalmassá teszi arra, hogy a benne megtalálható neuronok ilyen eltérő sajátosságú hálózatokként működjenek. Mint minden komplex sejtösszetétellel rendelkező központi idegrendszeri struktúránál, úgy a cochlearis mag esetében is számos megválaszolandó kérdés merül fel a szerkezetre vonatkozóan: Hányféle neurontípus különíthető el a magban? Milyen kapcsolatban állnak egymással az egyes neurontípusok? Milyen működési jellegzetességek kapcsolhatók az egyes sejtfeleségekhez? Bár az elmúlt évtizedekben folytatott vizsgálatok még nem adtak választ a fenti kérdések mindegyikére, a cochlearis mag szerkezetéről kialakult egy olyan elképzelés, amelyik a legkülönfélébb emlős fajok esetében is helytállónak tűnik.

Általánosan elfogadott, hogy a nucleus cochlearisban található sejtfeleségek különböző morfológiával, funkcióval, szinaptikus kapcsolatokkal és membránsajátságokkal rendelkeznek. A mag elülső ventralis része elsősorban a bushy-, és a csillagsejteket tartalmazza; míg a posterior régióban javarészt az octopus-sejtek helyezkednek el. A dorsalis magrészben négy koncentrikus, egymástól viszonylag jól elkülöníthető réteg található, melynek legfelszínesebb területét a molekuláris réteg

képezi, melyben főként a szemcsesejtek axonjai, és szórványosan a szemcsesejtek sejttestjei is találhatóak. Ezt követi a fusiform- vagy piramis-sejtek rétege, amely magában foglalja a piramis-, a szemcse-, a cartwheel- és a csillagejteket. A harmadik rétegben a piramis-sejtek basalis dendritfái és néhány ún. vertikális-neuron található; itt végződnek továbbá a nervus acusticus leszálló rostjai is, kapcsolatot teremtve valamennyi itt található sejtfeleséggel. A cochlearis mag legmélyebb rétegében az óriás- és a multipoláris-sejtek sejttestjei figyelhetők meg.

### 1.3. A munka célkitűzései

A munka tervezése és kivitelezése során tanulmányozott legfontosabb kérdések és problémák az alábbiak voltak:

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

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

1.b. Kidolgozható-e egy elfogadható sejtazonosítási algoritmus, ami megengedi az enzimatikusan izolált bushy-neuronok felismerését?

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

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

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

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

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

3. A fenti kísérletek során merült fel egy újonnan fejlesztett, TASK-3-ellenes monoklonális antitest tesztelésének („validálásának”) az igénye, amit összekötöttünk szöveti preparátumokban és sejttenyészetekben található melanoma malignum sejtek

TASK-3-expressziójának vizsgálatával. A munka kezdetén az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

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

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

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

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

## **2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

A nucleus cochlearis bushy-neuronjainak vizsgálatára részben enzimatikusan izolált, részben agyszeletekben elhelyezkedő neuronok vizsgálatával került sor. A Kv1.1-, 1.2-, 1.3-, 1.6-, 3.1b-, 3.2-, 3.4-, 4.2- és 4.3-alegységek expressziójának vizsgálata céljából részben immunfestést, részben túlélő agyszeletekben kivitelezett funkcionális méréseket alkalmaztunk, a patch-clamp technika teljes-sejtes változatának használatával. Az izolált agyszeleteken végzett elektrofiziológiai mérések során két, alegységspecifikusnak ismert gátlószert, a Kv4.2- és/vagy a Kv4.3-alegységeket is tartalmazó csatornákra specifikus phrixotoxin-2-t (PaTx2) valamint a Kv3.4-alegységeken át folyó áramot hatásosan gátló BDS-I-et alkalmaztunk.

A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak morfológiai vizsgálatát célzó kísérletekben azok sejttestjeit a projekciójuknak megfelelő helyen alkalmazott laesiókba juttatott, dextránnal konjugált tetrametilrodaminnal töltöttük fel, kihasználva, hogy a jelölőanyagot a neuronok axonális transzport révén mind antero-, mind retrográd irányba szállítják. A rodaminnal feltöltött neuronokat tartalmazó agytörzsből 50-60 µm vastag metszeteket készítettünk, amiket konfokális analízisnek vetettünk alá.

A TASK-3-csatornák jelenlétét és egy új fejlesztésű hTASK-3-specifikus antitest validálását célzó kísérleteinkben részben beágyazott, melanoma malignumot tartalmazó szövetmintákat; részben sejtenyészeti körülmények között fenntartott melanoma malignum sejteket alkalmaztunk. Az ellenanyag specificitásának és alkalmazhatóságának bizonyítására Western blot technikát, valamint a TASK-3-

csatornát kódoló vektorral tranziensen transzfektált C2C12- és stabilan transzfektált HEK293-sejteket alkalmaztuk.

### **3. EREDMÉNYEK**

#### **3.1. A nucleus cochlearis bushy-neuronjai által expresszált K<sup>+</sup>-csatorna-alegységek**

A bushy-neuronok kizárólag az aVCN területén előforduló, komplex dendrithálózattal rendelkező neuronok. A bushy-neuronokra jellegzetes, hogy tartós depolarizáció jelenlétében gyorsan adaptálódó (II. típusú) választ produkálnak, ami alkalmassá teszi őket arra, hogy a nervus acusticuson érkező aktivitási mintázatot rendkívüli időbeli hűséggel legyenek képesek reprodukálni („primary-like” tüzelés). A bushy-sejtek ezen sajátossága a hangforrás térbeli lokalizációjának meghatározásában jelentős. A bushy-neuronok jellegzetes tüzelési mintázatának hátterében részben membránjuk időkonstansának kicsiny volta áll, aminek következtében a beérkező serkentő stimulusokat követően igen gyors válaszok kialakítására képesek. A jelen vizsgálatsorozatban arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a jellegzetes elektromos sajátosságok hátterében kimutatható-e a sejtfelszíni K<sup>+</sup>-csatornák valamilyen speciális megoszlása és összetétele.

A kísérletek egy részét enzimatikusan izolált bushy-neuronokon végeztük. Mivel a patkány nucleus cochlearis számos különböző sejtípust tartalmaz, megpróbáltuk egy olyan sejtazonosítási algoritmus kidolgozását, aminek révén nagy biztonsággal kiválaszthatók voltak a bushy-neuronok. A sejtazonosítási protokollnak megfelelően az izolált sejteket csak abban az esetben azonosítottuk bushy-neuronként, amennyiben azok kerek vagy kissé hosszúkás, kb. 20 µm átmérőjű sejttesttel rendelkeztek, és legalább egy, de legfeljebb két nyúlványuk volt. Amennyiben a sejttestből csak egy processzus indult ki, akkor annak dúsan elágazónak kellett lennie, mert ilyen dendritfával csak a bushy-sejtek rendelkeznek. A pozitív azonosítás további feltétele volt, hogy amennyiben a sejttestből két nyúlvány eredt, akkor az egyiknek elágazó, a másiknak pedig nem elágazó morfológiát kellett mutatnia.

A kísérletek során rendszeresen végeztünk preadszorpciók kontroll vizsgálatokat, amiket mindig a nekik megfelelő „valódi” immunreakcióval együtt



végeztük. A kontroll és a valódi immunreakció eredményeként azonosított bushy-sejtekről úgy készítettünk digitális felvételeket, hogy mind a kamera expozíciós ideje, mind erősítése ugyanakkora volt, mint a tényleges immunjelölés végeztével készült képeken. Ezt a technikát alkalmazva a preadszorpciós kontroll vizsgálatok nem csupán az immunjelölődés eredményeinek megerősítésére szolgáltak, hanem lehetővé tették az immunreakció intenzitásának szemikvantitatív értékelését is. Az immunjelölődés erősségének megítélése során a preadszorpciós kontroll esetében tapasztalt intenzitást tekintettük alapnak, és ehhez viszonyítottuk a valódi reakció intenzitását.

Az enzimatikusan izolált bushy-neuronokon végzett immuncitokémiai kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy azok több, tranziens  $K^+$ -áram kialakulásáért felelős alegységet is expresszálnak. A Kv3.4-alegység jelen volt mind a sejttesten, mind a nyúlványokon, és a festődés jellegzetes foltos megjelenésűnek bizonyult. Kv4.3-alegység ellenes antitest alkalmazásakor hasonló eredményeket kaptunk, de a jelölődés döntően a sejtmagra és annak környékére lokalizálódott. Kv4.2-alegység jelenlétét is bizonyítottuk a sejttesten és a nyúlványokon egyaránt; ugyanakkor megállapítottuk, hogy a bushy-sejtek a Kv1.4-alegységet nem expresszálják.

A bushy-sejtekről ismert, hogy depolarizáció hatására egy dendrotoxinra érzékeny áramkomponenst is produkálnak. Mivel a DTX-re érzékeny áram megjelenése háttérben olyan  $K^+$ -csatornák állnak, amik Kv1.1-, 1.2- és/vagy 1.6-alegységeket tartalmaznak, ezen alegységekre specifikus antitestek alkalmazására is sor került. Mindhárom alegység jelenlétét kimutattuk: a Kv1.1- és Kv1.6-alegységeket elsősorban a sejttesten figyeltük meg, míg a Kv1.2-alegység expressziója a sejttesten és a nyúlványokon is jelentős volt. Megállapíthattuk továbbá, hogy a három vizsgált alegység közül a Kv1.6-expresszió volt a legkevésbé erőteljes.

Korábbi elektrofiziológiai vizsgálatok rámutattak, hogy a bushy-neuronok igen erőteljes repolarizációs képességgel rendelkeznek, ami arra utalt, hogy a késői típusú  $K^+$ -áramok kialakításáért felelős Kv-alegységek jelentős szerepet töltenek be membránsajátságaik kialakításában. A jelen vizsgálatsorozat keretében az izolált bushy-neuronokon három olyan alegység expresszióját ellenőriztük, melyek ilyen késői típusú  $K^+$ -áram kialakításáért felelősek. Eredményeink szerint a bushy-neuronok esetében a Kv3.1-alegységek a leglényegesebbek a késői típusú  $K^+$ -csatornák kialakításában és összeszerelődésében. Értékelhető, ám az előbbinél gyengébb immunreakciót tapasztaltunk a Kv1.3-alegységekre specifikus antitestek alkalmazása után. A harmadik, szintén késői típusú áram kialakításáért felelős Kv3.2-alegységekre

specifikus immunreakció jelen volt ugyan, de a három vizsgált alegység közül ennek intenzitása tűnt a legjelentéktelenebbnek. A fenti kísérleteket kiegészítettük a TASK-1-csatornák expresszióját vizsgáló immunreakciókkal is. A bushy-sejtek valamennyi vizsgált életkorban egyértelmű TASK-1-pozitivitást mutattak, aminek intenzitása az életkor előrehaladtával folyamatosan növekedett.

Az eredmények megbízhatóságának tesztelése végett a fenti, izolált neuronok felhasználásával végzett kísérletek egy részét nucleus cochlearisból készített úszószeletek alkalmazásával is megismételtük. Mivel az enzimatikusan izolált bushy-neuronokon kapott eredmények az úszószelet alkalmazásával nyert adatoknak mindenben megfeleltek, megállapíthattuk, hogy a sejtazonosítási protokoll és az immunreakciók eredményeinek interpretálása egyaránt megfelelő volt.

A fenti, morfológiai jellegű vizsgálatokat funkcionális kísérletekkel is kiegészítettük, aminek során izolált agyszeletben elhelyezkedő bushy-neuronok vizsgálatára került sor. Ezen elektrofiziológiai vizsgálatok során -80 mV-os tartópotenciált és 100 ms hosszú depolarizációs lépcsőket alkalmaztunk -10, +10 és +30 mV-os értékekig. Megállapítottuk hogy a Kv4.2- és/vagy Kv4.3-alegységeket tartalmazó  $K^+$ -csatornák specifikus gátlószerének tartott PaTx2 egyértelműen csökkentette bushy-sejtekről elvezethető tranziens  $K^+$ -áram egy részét. Az inaktiválódó áramkomponens egy részének szelektív gátlása különösen a kisebb, -10 és +10 mV-os depolarizációs lépcsők alkalmazása során volt nyilvánvaló. Amennyiben ennél erőteljesebb depolarizációs lépcsőt alkalmaztunk (+30 mV), a maradó (steady-state) áramkomponens részleges gátlása is kialakult. A kísérletek egy másik részében a BDS-I nevű alegység-specifikus gátlószer alkalmazására került sor, ami az olyan  $K^+$ -csatornákon folyó áramok gátlására képes, amik összeszerelődésében Kv3.4-alegységek vesznek részt. Megállapítottuk, hogy a BDS-I ugyancsak hatékonyan csökkentette a tranziens áram csúcsának nagyságát. Vizsgáltuk még a PaTX2 és BDS-I együttes alkalmazásának következményét is: amikor a két gátlószer egyidejűleg volt jelen az extracelluláris oldatban, a tranziens áram jelentősen csökkent, de nem tűnt el teljesen. Ebből a megfigyelésből arra következtettünk, hogy a Kv4.2/Kv4.3- és a Kv3.4-alegységek mellett még más K-csatornaalegységek is részt vehetnek a bushy-sejtek tranziens áramainak kialakításában.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a bushy-neuronok működésében és a rájuk jellegzetes tüzelési mintázat kialakításában igen jelentős a Kv3.1-alegységek jelenléte és hozzájárulása az általános membránsajátságokhoz. Ez a késői típusú áramot

kialakító csatornaalegység különösen jelentős az akciós potenciálokat követő gyors repolarizáció biztosításában, ezáltal felruházza a sejtet a nagy frekvenciájú akciós potenciálok tüzelésének képességével. Bár kétségkívül a Kv3.1-alegységek tűnnek a legjelentősebbek a bushy-neuronok késői típusú áramának kialakításában, ezt a funkciót nem egyedül végzik. A bushy-sejtek által mutatott, a Kv3.1-alegységeknél gyengébb, de egyértelműen megfigyelhető Kv1.3- és Kv3.2-pozitivitás arra enged következtetni, hogy ezen alegységek is hozzájárulhatnak a késői típusú  $K^+$ -áramok kialakításához, így a megfelelően gyors repolarizáció biztosításához is.

Eredményeink szerint a bushy neuronok számos olyan Kv-alegységet is expresszálnak, amik tranziens, gyorsan inaktiválódó (a korábbi terminológia szerint „A”-típusú) áram kialakítását végzik. Részben az immuncitokémiai, immunhisztokémiai adatok, részben a Kv3.4- és Kv4.2/4.3-alegységekre specifikus gátlószerekkel végzett funkcionális kísérletek világítottak rá arra, hogy a bushy-sejteken kialakuló tranziens  $K^+$ -áram kialakulásához mind Kv3.4-, mind Kv4.2/4.3-alegységeket tartalmazó  $K^+$ -csatornák aktivitása hozzájárul; ugyanakkor a Kv1.4-alegység jelenléte és jelentősége elhanyagolható.

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

A bushy-sejtek vizsgálatához enzimatikusan izolált neuronokat alkalmaztunk, és bár a technika számos előnnyel járt, komoly fogyatékoságai is voltak. A továbblépés lehetőségét az úszószelet technika rendszeres alkalmazásában láttuk, hiszen itt mind a pontosan megőrzött morfológiai jegyek, mind a neuronok lokalizációja komoly segítséget nyújthatott a pontos és egyértelmű sejtazonosításhoz. A lehetséges megoldások között merült fel egy fluoreszcens jelölőanyag, a rodamin alkalmazásának lehetősége, ami azért tűnt különösen kecsegtetőnek, mert a festéket az agytörzs megfelelő pontján végzett laesioba juttatva az axon mentén mind antero-, mind

retrográd irányba szállítódott, ezáltal feltöltötte a sérült axonokhoz tartozó neuronok sejttestét is; módot adva az egyes nucleus cochlearis sejttípusok szelektív jelölésére.

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

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

A második sejtréteg legjellegzetesebb neuronjai a piramis-sejtek, melyek háromszögletű sejttestjének két pólusáról egy-egy dendritfa ered, a harmadik szöglet pedig az axon kiindulópontjának felel meg. A distalis dendritfa a mag felszíne felé, a külső szemcsesejtes rétegbe nyúlik, ahol az ezen sejtek parallel-rostjai által alkotott hálózattal szinaptizál. A DCN harmadik rétegébe nyúló proximalis dendritfa és a sejttest az ezen magrészbe leszálló acusticus rostoktól kap bemenetet. Ha tekintetbe vesszük, hogy a szemcsesejtekhez cochlearis, somatosensoros és magasabb központokból leszálló információk egyaránt eljutnak, a piramis-sejtek kettős afferenciációja egy jelentős integráció lehetőségét sugallja. Ugyanerre a következtetésre jutunk, ha megfontoljuk, hogy ezen neuronok többféle aktivitásmintázat generálására képesek; sőt, az afferens ingerlés intenzitásától és jellegétől, valamint a nyugalmi membránpotenciál aktuális értékétől függően ugyanaz a neuron is megváltoztathatja aktivitási mintázatát.

A nucleus cochlearis sejtjei közül a legnagyobb sejttesttel (akár 50-60  $\mu\text{m}$  átmérőjű) az óriássejtek rendelkeznek. Ezek a neuronok mind a VCN, mind a DCN területén megtalálhatók. Egy-egy óriássejt dendritjeit igen nagy távolságra (500-600  $\mu\text{m}$ ) lehet követni, és azok szinte az egész nucleus cochlearist behálózzák. Ez az anatómiai elrendezés arra utal, hogy az óriássejtek mind közvetlenül az acusticus rostok jelentős hányadától, mind számos interneuronról kapnak és integrálnak bemeneteket. Az óriássejtek az őket ért megfelelő intenzitású stimuláció hatására két utóhiperpolarizációs hullám által kísért AP-t tüzelnek.

A DCN területén található az ún. Purkinje-szerű sejtek (PLC), amik nagy valószínűséggel ugyancsak a projekciós neuronok közé tartoznak. Mint arra nevük is utal, ezek a neuronok ontogenetikai rokonságban vannak a kisgyermeki Purkinje-sejtekkel; sőt, egyes szerzők az egyedfejlődés során „eltévedt”, azaz ectopiás Purkinje-sejteknek tekintik őket. A PLC-k sejtteste a DCN felszíne felé néz, míg az igen nagy és dúsan elágazó dendritfa a mag belseje felé nyúlik. Rendkívül kevés adat áll rendelkezésre a PLC-k szinaptikus bemeneteire vonatkozóan, ugyanakkor léteznek olyan vélemények, miszerint a PLC-k axonjai eljuthatnak a kisgyermeki magvakba.

Annak érdekében, hogy a nucleus cochlearis különböző neurontípusainak egyértelmű azonosításához kellő információra tegyünk szert, rodamin segítségével feltöltött nucleus cochlearis neuronok morfológiai analízisét végeztük el, döntően konfokális mikroszkópia alkalmazásával. A sejtek rodaminos jelölése információt nyújtott azok projekciós útvonaláról és lehetővé tette azok izolált feltöltését, aminek révén megítélhető volt a nucleus cochlearison belül elfoglalt helyzetük. A konfokális mikroszkópia az egyedi sejtek vizualizálásán túl lehetőséget teremtett a sejtek térbeli struktúrájának rekonstrukciójára, valamint azok tetszőleges irányból történő vizsgálatára is. A vizsgálatsorozat egyik legfontosabb célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy az egyes projekciós neuronokat nem „ideális” síkban vizsgálva vajon mekkora a tévesztés lehetősége a morfológiai hovatartozás meghatározása során.

Megállapítottuk, hogy a PLC-k többé-kevésbé gömb alakú sejttesttel (átmérő:  $32 \pm 4 \mu\text{m}$  [ $n = 8$ ]) és rendkívül gazdagon elágazó dendritfával rendelkeztek, és igazoltuk, hogy ez a sejt típus valóban projiciál a cerebellumba.

A bushy-sejtek általában könnyen azonosíthatók voltak a nervus acusticus nucleus cochlearison belül futó, párhuzamosan rendezett kötegei között elhelyezkedő, hosszú sorokat formáló képletekként. A nucleus cochlearisból készült szeleteket vizsgálva rekonstruálhatóvá váltak az egyes sejtek, amik gömb vagy kissé elnyújtott

sejttesttel rendelkeztek (átmérő:  $22 \pm 3 \mu\text{m}$ , az egyedi értékek 18 és  $25 \mu\text{m}$  között változtak;  $n = 22$ ), amikből két nyúlvány eredt, általában a soma ellentétes pólusairól.

Az octopus-neuronokat meglehetősen változatos morfológiai jegyeket mutató, de általában kissé elnyújtott sejttesttel rendelkező sejtekként azonosítottuk, a soma átlagos átmérője  $26 \pm 4 \mu\text{m}$  volt (az egyes sejtek esetében mért értékek 18 és  $32 \mu\text{m}$  között változtak;  $n = 20$ ). A jelen tanulmány keretein belül vizsgált octopus-sejtek többsége három nyúlvánnyal rendelkezett, de voltak közöttük olyanok is, amik 2, 4 vagy 5 processzussal bírtak.

A nucleus cochlearis talán legkönnyebben felismerhető sejt típusa az óriássejt, ami hatalmas sejttesttel, és legalább három nyúlvánnyal rendelkezett. A jelen munkában vizsgált óriássejtek legnagyobb átmérője  $37 \pm 9 \mu\text{m}$  ( $n = 31$ ) volt, az egyedi értékek  $27$ - $64 \mu\text{m}$  között változtak azaz a  $60 \mu\text{m}$ -nél nagyobb átmérőjű óriássejtek sem szokatlanok a nucleus cochlearisban. Az esetek egy részében somájuk viszonylag vékony, polygonális volt. Bár az óriássejtek könnyen felismerhetőnek tűnnek (és általában valóban azok), a szeletben elfoglalt helyzetük és orientáltságuk alkalmanként megtévesztő morfológiát eredményezett.

A nucleus cochlearis piramis-neuronjai több szempontból is hasonlatosak az óriássejtekhez, és a két sejtféleség elkülönítése gyakran okoz nehézséget. Tekintettel arra, hogy a piramis-neuronok háromszögletű sejttesttel rendelkeznek, amiből három processzus ered, a piramis-neuronok nagyon hasonló megjelenést mutathatnak az óriássejtekhez, különösen, ha azok is három nyúlvánnyal bírnak (mely feltétel a jelen munka keretében tanulmányozott óriássejtek 50%-ára igaznak bizonyult). Ebben az esetben a két sejt típus csak a nucleus cochlearison belül elfoglalt helyzete (a piramis-sejtek a DCN második, a felszínnel párhuzamosan futó rétegében található; az óriássejtek pedig elszórtan, a nucleus cochlearis teljes területén előfordulhatnak), és a sejttest mérete (a piramis-neuronok kb.  $20 \mu\text{m}$  átmérőjűek, az óriássejtek ennél általában jóval nagyobbak) alapján különíthető el. A sejttest átmérője magától értetődő azonosítási lehetőségnek tűnik, ami alapján az óriás- és a piramis-neuronok biztonsággal differenciálhatók. A jelen tanulmányban a piramis-neuronok átmérőjét  $23 \pm 3 \mu\text{m}$ -nek találtuk ( $n = 16$ ), ugyanakkor a három nyúlvánnyal jellemezhető (azaz a piramis-sejtektől legnehezebben elkülöníthető) óriássejtek somája ennél nagyobb,  $34 \pm 7 \mu\text{m}$  ( $n = 15$ ) volt. Ami még az átlagos értékeknél is fontosabb, a piramis- és a három nyúlvánnyal rendelkező óriássejtek sejttestének átmérője  $18$ - $27 \mu\text{m}$  (piramis-sejt) és  $27$ - $53 \mu\text{m}$  (óriássejt) között mozgott, aminek alapján biztonsággal kijelenthetőnek

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

A konfokális mikroszkóp használata nem pusztán arra adott módot, hogy az egyes nucleus cochlearis neuronok térbeli megjelenését rekonstruáljuk, és ezáltal jobban megérthessük azok sejttestjeinek és nyúlványainak magon belüli elrendeződését és egymáshoz viszonyított helyzetét; de arra is módot adott, hogy az egyes neuronok morfológiai sajátosságait olyan síkban is megvizsgálhassuk, ami a szokásos morfológiai tanulmányok során nem vagy csak ritkán kerül alkalmazásra. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a nucleus cochlearis szeletek metszése során megválasztott sík döntően befolyásolja az egyes neurontípusok morfológiai azonosíthatóságát, és a sejteknek esetenként olyan mértékben „szokatlan” vetületét hozhatja létre, hogy azok téves azonosítása szinte törvényszerűen bekövetkezik.

Tekintettel a jelen disszertációban részletezett sejtazonosítási problémákra, nyilvánvalónak látszik, hogy a konfokális mikroszkópia alkalmazása a nucleus cochlearis különböző sejtípusainak vizsgálata során felbecsülhetetlen segítséget nyújthat a megbízható klasszifikációhoz. A jelen eredmények nem csupán arra mutatnak rá, hogy ez a megközelítés a nucleus cochlearis neuronjainak morfológiai azonosítása céljára is alkalmas, hanem azt is felvetik, hogy néhány korábbi adat átértelmezése is szükségessé válhat az egyes sejtek valószínűnek látszó téves azonosítása miatt.

### **3.3 Melanoma malignum sejtek TASK-3-expressziója**

A humán TASK-3-csatornát kódoló gén a 8. kromoszóma hosszú karján kódolódik (8q24.3), a specifikus mRNS szintézise két exonról történik. Bár a TASK-3-csatornát kódoló gén viszonylag közel kódolódik a *c-myc* jelű, jól ismert onkogénhez, számos tumorszövetből származó mintában megfigyelték a TASK-3-csatornát kódoló *kcnk9* gén önálló amplifikációját, ami rámutat a csatorna jelentőségére egyes rosszindulatú daganatok keletkezésében. A TASK-3-csatornák gyakorlatilag érzéketlenek a szokásos K<sup>+</sup>-csatorna-gátlószerekre, miközben hatékonyan blokkolhatók ruténiumvörös alkalmazásával, de egyes fémionok, így a Zn<sup>2+</sup> és a réz is képes a TASK-csatornák gátlására. Tekintettel arra, hogy egyes központi idegrendszeri betegségekben, a központi idegrendszert érő sérülések esetén, valamint egyes anyagcsere-betegségekben

a cink- és a rézionok koncentrációja megnövekedhet az extracelluláris térben, a TASK-csatornákra kifejtett hatásuknak komoly klinikai jelentőségük lehet.

A jelen disszertáció keretében olyan TASK-3-ellenes antitesteket (köztük egy újonnan fejlesztett monoklonális antitestet) vizsgáltunk immunhisztokémiai és immuncitokémiai körülmények között, melyek alkalmasak lehetnek egy nagy esetszámot felölelő retrospektív vizsgálat lebonyolítására annak kiderítése végett, hogy vajon van-e összefüggés a rosszindulatú tumorminták biológiai, hisztopatológiai és klinikai viselkedése és típusa, valamint a TASK-3-expresszió mintázata és erőssége között.

A kísérletek első lépésében az antitesteket formalinban fixált, hisztopatológiailag igazolt melanoma malignumot tartalmazó szövetmintákon alkalmaztuk. A formalinos fixálás miatt nagy gondot fordítottunk a megfelelő antigénfeltárási technika kiválasztására, különösen azon korábbi megfigyelésünk tükrében, hogy beágyazott metszeteken alkalmazva a TASK-3-specifikus ellenanyagokat könnyen álnegatív vagy igen gyenge intenzitású jelölődést tapasztalhatunk. Megállapítottuk, hogy a szöveti preparátumban elhelyezkedő melanoma malignum sejtek intenzív TASK-3-specifikus reakciót adnak, miközben a kötőszövetben értékelhető immunpozitivitás nem volt megfigyelhető. Ugyancsak TASK-3-pozitívnak bizonyultak a metastaticus daganatokban található melanoma malignum sejtek. Eredményeink szerint mindhárom alkalmazott TASK-3-specifikus antitest egyértelmű és hasonló megoszlást mutató immunpozitivitást produkált a szöveti preparátumokban. Fontos megjegyezni, hogy bár az immunpozitivitás az esetek egy részében a sejtfelszíni membránt is érintette, a legerőteljesebb reakciót legtöbb esetben intracellulárisan tapasztaltuk, ami gyakran határozottan szemcsés megjelenést mutatott. A jelölődés gyakran mutatott határozott perinuclearis lokalizációt, és a tumoros óriássejtek vagy osztódó alakok esetében a magok közötti térben is erőteljes reakciót tapasztaltunk. Számos esetben a sejtmag egyik pólusán tapasztalhattuk a legerőteljesebb immunreakciót. Amennyiben a melanoma sejtek nyúlványai a metszési síkba kerültek, úgy azokban is intenzív reakciót figyelhattunk meg.

Mivel a TASK-3-csatornák különösen jelentősek lehetnek egyes rosszindulatú daganatok kialakulásában, érdekesnek tűnt annak vizsgálata, hogy vajon a melanoma malignum sejtek benignus „rokonai”, azaz a melanocyták ugyancsak mutatnak-e TASK-3-expressziót, vagy ez a malignusan transzformált sejtféleségre jellegzetes, azt esetleg a benignus változattól megkülönböztető marker. A melanoma malignum sejtekhez



hasonlóan legtöbb melanocytá is erős TASK-3-pozitivitást mutatott, és az gyakran kifejezetten szemcsés megjelenésű volt. Az immunpozitivitás megoszlása alapvetően ugyanaz volt, mint a melanoma malignumot tartalmazó mintákban (intenzív perinuclearis jelölődés), és a benignus naevusból készített metszeteken is nyilvánvaló volt a nuclearis polymorphismus (azaz intenzíven, gyengén vagy egyáltalán nem jelölődött sejtmagok egyidejű jelenléte).

A vizsgálatok következő fázisában immuncitokémiai körülmények között is meg kívántunk győződni az antitestek alkalmazhatóságáról, valamint a melanoma sejtek TASK-3-expressziójáról. A vizsgálatok ezen szakaszában három különböző típusú, sejtenyészeti körülmények között fenntartott melanoma malignum sejtvonal alkalmazására került sor, melyek egyike primaer, bőr eredetű melanomából származott, a másik kettő pedig metastaticus melanomákból izolált sejteket tartalmazott. Mindhárom TASK-3-specifikus antitest erős és reprodukálható reakciót adott a primaer és a metastaticus sejtvonalakon egyaránt. Függetlenül az alkalmazott antitest típusától, a cytoplasmaticus immunpozitivitás általában a sejtmag egyik pólusa és (polynuclearis sejtek esetében) a nucleusok között látszott koncentrálni, egyfajta szövetszerű hálózatot alkotva, ugyanakkor az immunpozitivitás néhány esetben a sejtfelszíni membránt is érintette.

Az immunreakciók valódiságának egyértelmű igazolása végett a sejtenyészetben fenntartott sejtvonalakból izolált fehérjeminták alkalmazásával Western-blot vizsgálatokat is végeztünk. Az immuncitokémiai és immunhisztokémiai reakciók eredményével teljes összhangban a melanoma sejtek magfrakciójából készített mintán végzett vizsgálat a teljes sejtlizátum esetében tapasztaltnál képest lényegesen erősebb, a várt molekulatömegnek megfelelő reakciót eredményezett. Ez a megfigyelés azt bizonyította, hogy a melanoma malignum sejtek nuclearis TASK-3-pozitivitása valóban a fehérje szokatlan lokalizációjának volt az eredménye.

A kísérletek során többféle pozitív kontrollt is alkalmaztunk. Ennek első lépéseként patkány mellékvesén is végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat, mivel már korábban funkcionális vizsgálatokkal igazolták a zona glomerulosa sejtek sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TASK-3-csatornák jelenlétét. A vizsgálatok eredményeként igen intenzív immunpozitivitást figyelhettünk meg a zona glomerulosa rétegben, továbbá ugyancsak egyértelműen pozitív, de valamivel gyengébb intenzitású reakciót tapasztalhattunk a mellékvese velőállományában is. A mellékvesét övező kötőszövet, továbbá a mellékvese-kéreg másik két sejtrétege nem mutatott érdemi

TASK-3-pozitivitást. Fontos megjegyezni, hogy az egyébként intenzíven festődő zona glomerulosa sejtekben a sejtmagok egyáltalán nem voltak TASK-3-pozitívak, ugyanakkor a sejtfelszíni membrán erőteljes jelölődését tapasztalhattuk, ami arra utalt, hogy a melanoma malignum sejtek esetében tapasztalt meglehetősen gyenge sejtfelszíni jelölődés valóban azt jelezte, hogy a csatornafehérje valóban kicsiny mennyiségben volt jelen a melanoma sejtek felszínén.

Következő lépésben természetes körülmények között TASK-3-csatornát nem expresszáló sejtvonalakat transzfektáltunk TASK-3-fehérjét kódoló vektorokkal (mind tranziens, mind stabil transzfekciós rendszer alkalmazására sor került), majd TASK-3-specifikus immunfestést végeztünk. Megállapítottuk, hogy a sikeresen transzfektált sejtek mindkét transzfekciós rendszerben intenzív és specifikus TASK-3-reakciót mutattak.

A pozitív kontroll vizsgálatok után még egy módszert alkalmaztunk annak megerősítésére, hogy a melanoma malignum nuclearis TASK-3-pozitivitása valódi immunreakció eredményét tükrözi, és nem valamiféle műtermékről van szó. Ennek érdekében egy olyan fúziós fehérjét kódoló vektort konstruáltunk, ami a TASK-3-csatornát, valamint az ahhoz a C-terminális végén kovalensen kötött fluoreszcens fehérjét (Green Fluorescent Protein, GFP) kódolt, majd ezzel a DNS-szekvenciával transzfektáltuk a sejtenyészetben fenntartott melanoma malignum sejteket. A sikeresen transzfektált melanoma malignum sejtek intenzív fluoreszcens jelet produkáltak, így azok egyértelműen elkülöníthetők voltak a környező, nem transzfektálódott sejtektől. Megállapítottuk, hogy a zöld fluoreszcencia megoszlása megegyezett azzal, amit az immuncitokémiai eredmények alapján vártunk: a fúziós protein egyértelműen jelen volt a cytoplasmában, a melanoma sejtek nyúlványában, valamint a sejtmagjukban (miközben a nucleolus területét megkímélte). Ez a megfigyelés egyértelműen jelzi, hogy a TASK-3-fehérje valóban bekerülhet a melanoma malignum sejtek nucleusába.

A fenti kísérletsorozat végén megállapíthattuk, hogy a vizsgált antitestek specifikusak és használhatók; továbbá hogy a melanoma malignum sejtek esetében tapasztalt szokatlan immunjelölődési mintázat a TASK-3-csatornák valódi megoszlását tükrözi. Ennek tükrében érdekesnek tűnik a kérdés, hogy a TASK-3-fehérje vajon miért nem jelenik meg a várt mennyiségben a sejtfelszíni membránban. A jelenség lehetséges magyarázata az lehet, hogy a TASK-3-fehérje intracelluláris szállítása megköveteli a csatornafehérje és egy 14-3-3 jelű, ún. adapter-fehérje közötti szoros kölcsönhatást. Bár az még most sem teljesen világos, hogy az említett adapter fehérje hogyan képes a

TASK-3-csatorna sejtfelszíni membránba történő kihelyeződését biztosítani, annyi bizonyos, hogy a két fehérje közötti megfelelő interakció hiánya a TASK-3-csatornák membránba történő kihelyeződését jelentősen csökkenti. További kísérleteket igényel viszont annak eldöntése, hogy ez a kölcsönhatás a 14-3-3 fehérje melanoma sejtekből való hiánya, a TASK-3-csatorna megfelelő pozíciójában bekövetkező esetleges mutáció vagy valamilyen eddig nem mérlegelt ok miatt szenved zavart.

## A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

### ***In extenso közlemények***

1. Pál B., Pór Á., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z. (2005) Voltage-gated and background K<sup>+</sup> channel subunits expressed by the bushy cells of the rat ventral cochlear nucleus. *Hearing Res.* 199: 57-70. (**IF: 1,578**)

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

3. Pocsai K., Pál B., Pap P., Bakondi G., Kosztka L., Rusznák Z., Szűcs G. (2007) Rhodamine backfilling and confocal microscopy as a tool for the unambiguous identification of neuronal cell types: A study of the neurones of the rat cochlear nucleus. *Brain Res. Bulletin* 71: 529-538 (**IF: 2,481**)

### **Idézhető előadáskivonatok**

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

### **Előadások és posztterek**

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

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

3. Pál B., Pór Á., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z. (2004) Patkány nucleus cochlearis bushy-sejtek által expresszált feszültségvezérelt K-csatorna alegységek jelenlétének vizsgálata immunhisztokémiai és elektrofiziológiai módszerekkel. 68. MÉT Konferencia, Debrecen.

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

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

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

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

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

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

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

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

# A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

## ***In extenso* közlemények**

1. Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór Á., Pál B., Bíró T., Szűcs G. (2004) Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1532-1542 (**IF: 4,812**)

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

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

## **Idézhető előadáskivonatok**

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

## **Előadások és posztterek**

1. Rusznák Z., Pál B., Pór Á., Pocsai K., Szűcs G. (2003) Characterisation and function of an h-current presented by the cochlear pyramidal cells of the rat. Meeting of the Federation of European Physiological Societies, Nice, France.

2. Pál B., Pór Á., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z. (2003) HCN2 alegységek szerepe patkány nucleus cochlearis dorsalis piramis-sejtek spontán aktivitásában. IX. MITT Konferencia, Balatonfüred.

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

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

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

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

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