

**Feszültségvezérelt K<sup>+</sup>-csatornaalegységek expressziós mintázata  
a ganglion spiraleban és nucleus cochlearisban**

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés**

Írta:

Bakondi Gábor

Témavezető:

Dr. Rusznák Zoltán



# Tartalom

DEBRECEN, 2008. ....	1
<b>Tartalom</b> .....	2
<b>Rövidítések</b> .....	4
<b>Bevezetés</b> .....	6
Cochlea .....	6
Ganglion Spirale .....	11
Nucleus Cochlearis .....	14
Általános bevezető a K <sup>+</sup> - csatornákhöz .....	20
Feszültségfüggő K <sup>+</sup> - (Kv) csatornák .....	21
Hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornák .....	25
<b>A munka célkitűzései</b> .....	29
<b>Anyagok és Módszerek</b> .....	30
A kísérletek során használt oldatok .....	30
Kísérleti állatok .....	30
A ganglion spirale preparálása tengerimalacból .....	31
Fluoreszcens immunhisztokémia cochlearis úszószelet preparátumon .....	32
Immunhisztokémia paraffinba ágyazott mintákon .....	33
Mikroszkópia .....	34
Az SGC-k kvantitatív analízise .....	35
Western-blot .....	36
Fluoreszcens immunhisztokémia patkány nucleus cochlearis úszószelet preparátumon .....	37
Retrográd jelölés .....	39
Sejtazonosítás .....	40
A patkány nucleus cochlearison végzett immunhisztokémiai adatok validálása .....	42
<b>Eredmények</b> .....	44
A Kv4.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	44
A Kv4.3-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	49
A Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	51
A Kv1.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	55
A Kv1.6-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	58
A Kv1.1-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	60
A Kv3.1-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban .....	62
<b>Megbeszélés</b> .....	64
A nucleus cochlearis neuronok Kv-alegység expressziós mintázata .....	65
Az eredmények funkcionális jelentősége .....	70
<b>Eredmények</b> .....	73
A tengerimalac ganglion spirale neuronok morfológiai jellemzői a „cochlearis úszószelet” preparátumban .....	73
A tengerimalac ganglion spirale neuronok morfológiai jellemzői beágyazott preparátumban .....	76
Az alacsony feszültség hatására aktiválódó, DTX-érzékeny K <sup>+</sup> -áramért felelős alegységek expressziója az SGC-kben .....	79
A gyorsan inaktiválódó K <sup>+</sup> -áramért felelős alegységek jelenléte .....	81
Két, a késői típusú K <sup>+</sup> -áramért felelős alegység jelenléte és megoszlása .....	85
A HCN-specifikus antitestek validálása .....	86
A ganglion spirale neuronok HCN-alegység expressziós mintázata .....	87

A HCN1- és HCN3-alegységek apiko-bazális grádiense .....	91
<b>Megbeszélés</b> .....	92
Az SGC-k morfológiai heterogenitása .....	93
Tranziens áramért felelős K <sup>+</sup> -csatornaalegységek jelenléte a tengerimalac ganglion spiraleban .....	94
Az SGC-k által expresszált DTX-érzékeny és késői típusú K <sup>+</sup> -áramok .....	95
A hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationcsatornák jelenléte és alegységösszetétele a ganglion spiraleban .....	96
Ioncsatorna-alegységek apiko-bazális grádiense a ganglion spiraleban .....	97
Az I-es és II-es típusú sejtek közti eltérések .....	98
<b>Összefoglalás</b> .....	100
<b>Summary</b> .....	101
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	102
<b>Közlemények</b> .....	115
<b>Tárgyszavak</b> .....	116
<b>Keywords</b> .....	116
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	117
<b>Függelék</b> .....	118

## Rövidítések

4-AP: 4-aminopiridin

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav

AP: akciós potenciál

ATP: adenzin-trifoszfát

aVCN: nucleus cochlearis anteroventralis

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CNBD: ciklikus nukleotid- kötő domén

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol

DCN: nucleus cochlearis dorsalis

DTX: dendrotoxin

ECL: kemilumineszcencia

EF: elongációs faktor

EPSP: excitatórikus posztszinaptikus potenciál

GABA:  $\gamma$ -amino-vajsav

GFAP: glial fibrillar acidic protein

GluR: glutamát-receptor

HCN: hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatorna

HVA: magas feszültségen aktiválódó

IHC: belső szőrsejt

Kv: feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna

LOC: lateralis olivocochlearis

LVA: alacsony feszültségen aktiválódó

MNTB: nucleus medialis corporis trapezoidi

MOC: medialis olivocochlearis

mRNS: messenger ribonukleinsav

NMDA: N-metil-D-aszpartát

NPY: neuropeptid-Y

NSE: neuron-specifikus enoláz

NT-3: neurotrofin-3



O H C: külső szőrsejt

P K A: protein kináz A

P K C: protein kináz C

p V C N: nucleus cochlearis posteroventralis

S A P: synapse-associated protein-

S G C: spiral ganglion cell

S O C: oliva superior complex

T E A: tetraetil-ammonium

## Bevezetés

Cochlea

A hanghullámok rezgéseit a középfül hallócsontocskái továbbítják a foramen ovalen keresztül a belsőfül folyadékterébe, aminek következtében megváltozik a membrana basilaris membrana tectoriához képest elfoglalt helyzete (Kimura, 1975; Smith, 1968; Spoendlin, 1979). A folyamat eredményeként a Corti-féle szerv érzékszerveinek (szőrsejtek) apikális végén található csillók elmozdulnak, ami a csillók csúcsán található mechanoszenzitív, nem-specifikus kationcsatornák aktiválódásához, és az endolymphában található  $K^+$ -ionok sejtbe történő mozgásához vezet, ami a szőrsejtek depolarizációját okozza. Az egyedi szőrsejtek depolarizációjának pontos következménye az adott szőrsejt típusától függ.

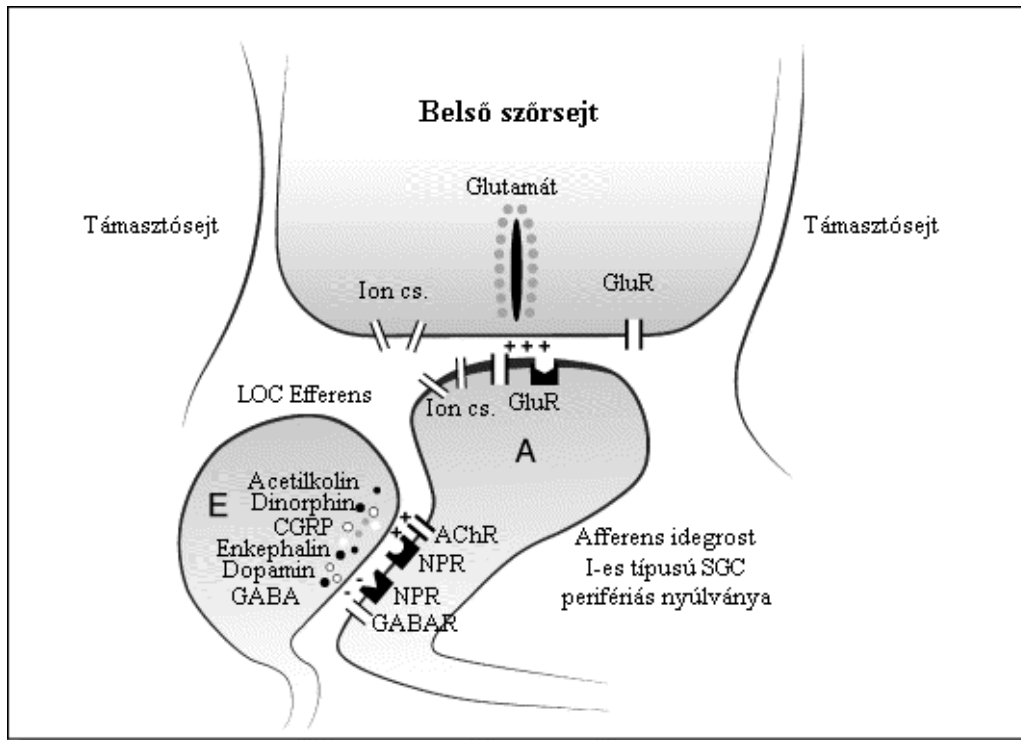
A Corti-féle szerv szőrsejtjeinek két típusa ismert. A belső szőrsejtek (inner hair cell, IHC) körte alakú, centrális helyzetű sejttaggal rendelkező sejtek, amelyek egy sorba rendeződve találhatók a ductus cochlearisban. A jelenleg elfogadott nézet szerint a belső szőrsejtek tekinthetők a hallórendszer „valódi” érzékszerveinek. A Corti-féle szerv másik meghatározó sejtfelesége a külső szőrsejtek (outer hair cell, OHC) csoportja. A külső szőrsejtek henger alakú sejtek, sejttagjuk kerek és a sejt bazális részén található. A külső szőrsejtek általában 3, de néha 4-5 sorba rendeződve helyezkednek el, és főleg efferens beidegzéssel rendelkeznek. A külső szőrsejtek elősegítik a Corti-féle szerv valódi érzékszerveinek (azaz a belső szőrsejteknek) a működését, és közvetve fokozzák azok érzékenységét.

A két sejtfeleség különböző működésének hátterében a sejtmembrán depolarizációját követő történések eltérő jellege áll. A belső szőrsejtek esetében a depolarizáció neurotranszmitter-felszabadulást eredményez a sejt bazális részén (Kros és mtsai, 1990; Roberts és mtsai, 1990; Zhang és mtsai, 1999), ami az azzal szinaptikus kapcsolatban álló hallóidegrostban akciós potenciálok kialakulását, és így tovaterjedő elektromos aktivitást hoz létre. Mivel az apikális felszínen a csillók mozgásának frekvenciája megegyezik a hanginger frekvenciájával, a szőrsejt – hallóideg szinapszis nagyon aktív. Annak érdekében, hogy a szőrsejtek frekvenciafüggő transzmitterfelszabadulásával a szinapszis lépést tudjon tartani, mind a poszt-szinaptikus eseményeknek, mind a reaktivációnak igen gyorsan le kell játszódnia. A rendelkezésre álló neurokémiai és immuncitokémiai bizonyítékok szerint a belső szőrsejt – hallóideg szinapszisban (1. ábra) glutamát tölti be a neurotranszmitter szerepét (Godfrey és mtsai, 1976; Altschuler és mtsai, 1989; Drescher és Drescher, 1992), ami gyors reaktiválhatóságú alegységekből felépülő ionotróp receptorokon fejti ki hatását.

Bár az immuncitokémiai és *in situ* hibridizációs vizsgálatok mind  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav- (AMPA), mind pedig N-metil-D-aszpartát- (NMDA) receptoralegységek jelenlétét kimutatták a belső szőrsejtekkel szinaptikus kapcsolatot létesítő ún. I. típusú ganglion spirale neuronok perifériás nyúlványain (spiral ganglion cell, SGC; Matsubara és mtsai, 1996; Safieddine és Eybalin, 1992b), a kísérletes adatok arra utalnak, hogy a szinaptikus transzmisszió folyamatáért döntően az AMPA-receptorok felelősek (Ruel és mtsai, 1999). A belső szőrsejt - I-es típusú SGC szinapszis ultrastrukturális vizsgálatai azt is megmutatták, hogy a posztzinaptikus komplexben GluR2/3- (glutamát receptor 2/3) és GluR4-alegységek is jelen vannak, ugyanakkor GluR1-alegységek nem találhatók ebben a struktúrában (Matsubara és mtsai, 1996; Ottersen és mtsai, 1998). Az AMPA-receptor-alegységeknek ezen összetétele hasonló ahhoz, amit a hallópálya távolabbi részeiben is leírtak (Hunter és mtsai, 1993; Petralia és mtsai, 2000), és ami egyes feltételezések szerint a hangingerek feldolgozásához szükséges gyors deszenzitizációs kinetikát lehetővé teszi (Trussell, 1997).

Léteznek olyan adatok is, melyek szerint az ionotróp glutamát receptorok mellett metabotróp glutamát receptorok is részt vehetnek a fenti szinapszis működésében (Kleinlogel és mtsai, 1999). Úgy tűnik, hogy egyes glutamát receptorok preszinaptikusan is jelen vannak, ami egy esetleges autokrin szabályozó kör jelenlétére és szerepére utal (Matsubara és mtsai, 1996). Egyes kutatócsoportok eredményei alapján az is valószínűsíthető, hogy a belső szőrsejtek és a ganglion spirale neuronok közötti szinapszisban nem a glutamát az egyetlen neurotranszmitter. A P2X<sub>2</sub>-receptorok jelenléte a hallóidegen arra utal, hogy az ATP is részt vehet a hallóideg működésének szabályozásában, bár az ATP pontos forrása jelenleg még nem ismert (Housley és mtsai, 1999).

Általánosságban elmondható, hogy a nagy aktivitású glutamaterg szinapszisok hátránya azok excitotoxicitása, és ez a veszély a belső szőrsejtek és az I-es típusú SGC-k közötti szinapszisok esetében is fennáll. Ha túl nagy a zajterhelés, a belső szőrsejtek túl sok neurotranszmittert szabadítanak fel, aminek hatására az I-es típusú SGC-k perifériás nyúlványai megduzzadnak (Juiz és mtsai, 1989; Robertson, 1983), ami akár az érintett idegvégződések megrepedését is okozhatja. A folyamat során az érintett perifériás nyúlvány visszahúzódik a habunula perforata irányába, egészen a myelinhüvely kezdetéig (Pujol, 1994). A glutamát receptorok gátlása a fenti neurotoxikus folyamat valószínűségét és intenzitását egyaránt csökkenti (Puel és mtsai, 1994).



1. ábra Egy belső szőrsejt afferens (A) és efferens (E) kapcsolatainak vázlata (Raphael és Altschuler, 2003 alapján)

A "Belső Szőrsejteket" támasztősejt veszik körül. A szőrsejteknek mind a bazális, mind pedig a laterális falában (utóbbi nincs ábrázolva) található ioncsatornák (Ion cs.), többek között feszültségérzékeny kalcium-, és  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^{+}$ -csatornák is. A belső szőrsejtek transzmittere, a glutamát, egy szalagszerű struktúra körül sorakozó nagy, kerek vezikulumokban tárolódik, amelyek a megfelelő pillanatban a szinaptikus részbe ürítik tartalmukat. Az IHC-k afferens (A) beidegzését az I-es típusú SGC-k látják el. Az aktív zóna posztszinaptikus membránjában található glutamátreceptorok (GluR) között vannak AMPA-típusú ionotróp (bal oldali), illetve feltehetően metabotróp típusú (jobb oldali) receptorok is. A preszinaptikus membránban is előfordulhatnak glutamátreceptorok, amelyeknek a feedback szabályozásban lehet szerepük. A posztszinaptikus membránban ioncsatornák is találhatóak, köztük olyan  $K^{+}$ -csatornák is, amelyek összetétele a cochlea tengelye mentén változik. Az efferens beidegzését (E) a LOC rendszer a felelős, és elsősorban az afferens rostokon végződnek. A laterális efferensekben számos neurotranszmittert leírtak (melyek lehetnek excitatórikusak vagy inhibítórikusak), és egy-egy idegrost egyszerre több transzmittert is tartalmazhat. A posztszinaptikus membránban előfordulnak mind ionotróp (excitatórikus hatású nikotinos típusú ACh- és inhibítórikus hatású GABA-A -receptorok), mind pedig metabotróp (neuropeptid receptorok [NPR], melyeknek lehet excitatórikus, inhibítórikus vagy egyéb hatásuk) receptorok.

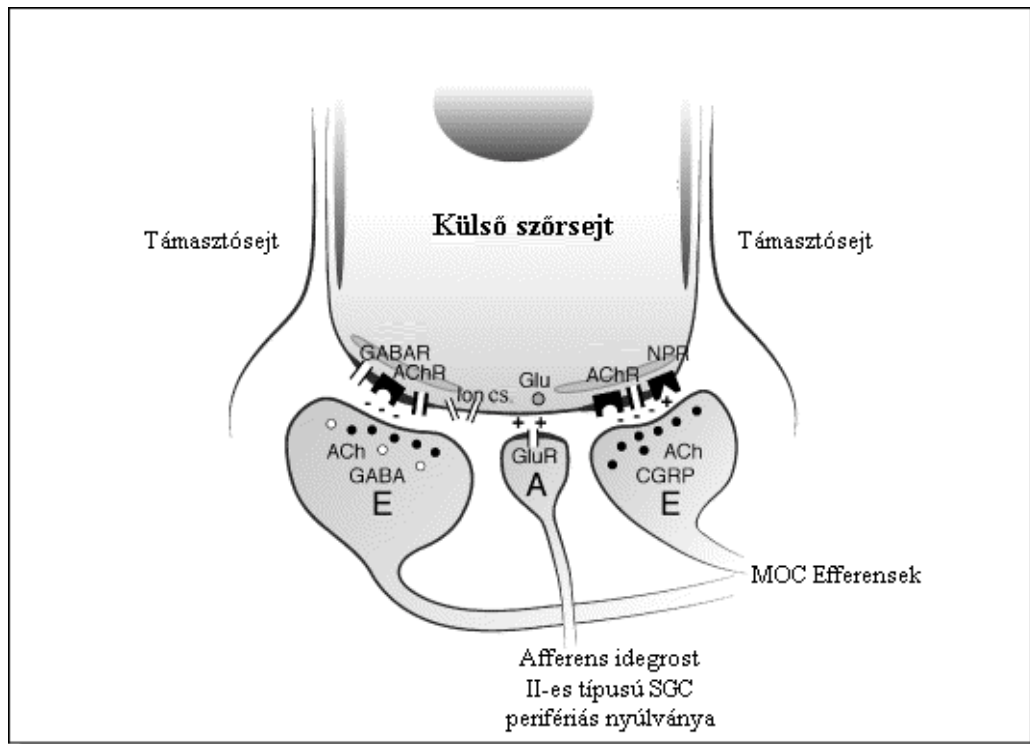
A belső szőrsejtekkel szinaptikus kapcsolatot létesítő I-es típusú SGC-k az összes ganglion spirale neuron mintegy 90-95 %-át alkotják. Egy I-es típusú neuronnak csak egy perifériás nyúlványa van, amely általában egyetlen (néha két) szőrsejttel létesít kapcsolatot. Egy belső szőrsejthez ugyanakkor akár 10-30 SGC is kapcsolódhat, a pontos szám fajfüggő (Lieberman és mtsai, 1990). A belső szőrsejtek és az I-es típusú SGC-k közötti szinaptikus kapcsolatok spontán aktivitásuk alapján csoportosíthatók: megkülönböztethetők nagy,

közepes és alacsony spontán aktivitású rostok (Lieberman, 1980; Merchan-Perez és Liberman, 1996); valamennyi szőrsejt kap beidegzést mindhárom rosttípustól. A spontán aktivitás jelenleg elfogadott magyarázata az, hogy az ioncsatornák a sztereociliumok nyugalmi helyzetében is részlegesen nyitott állapotban vannak, ami kismértékű transzmitterfelszabadulást eredményez.

A fenti szinapszis működését a szőrsejtek spontán és kiváltott aktivitása mellett egyes modulációs pályák és mechanizmusok is befolyásolják. A lateralis olivocochlearis (LOC) efferensek az agytörzs oliva superior lateralisából erednek, és fajtól függően főleg vagy kizárólag az ipsilaterális cochleába küldenek végződéseket (Guinan Jr. és mtsai, 1984; Warr, 1980; Warr és mtsai, 1997). Ezek a myelinhüvely nélküli rostok a vestibularis ideggel hagyják el az agytörzset, majd az ún. Oort-anastomosisban egyesülnek a hallóideggel, és így lépnek be a cochleába, ahol az I-es típusú SGC-k perifériás nyúványain végződnek. A LOC efferensek közé tartozó rostokban számos neurotranszmittert kimutattak (acetilkolin [Altschuler és mtsai, 1985b; Eybalin és Pujol, 1987], enkephalin [Altschuler és mtsai, 1984], dinorphin [Altschuler és mtsai, 1985a], dopamin [Usami és mtsai, 1988], calcitonin gene-related peptide [CGRP, Lu és mtsai, 1987] és GABA [Fex és mtsai, 1986]). A lokalizációs vizsgálatok szerint egy-egy neuron és processzus egyszerre többféle neurotranszmittert is tartalmaz (Safieddine és Eybalin, 1992a; Safieddine és mtsai, 1997). A fenti modulációs pálya pontos funkciója jelenleg nem ismert, azonban léziós vizsgálatok során (Lieberman, 1990) egyaránt csökkent a hallóideg spontán aktivitásának frekvenciája, és az összetett akciós potenciál amplitúdója. Egyes tanulmányok szerint a laterális efferensekből felszabaduló különböző neurotranszmitterek eltérő módon módosíthatják az I-es típusú SGC-k perifériás nyúványainak nyugalmi membránpotenciálját. Az acetilkolin (Felix és Ehrenberger, 1992), dinorphin (Sahley és Nodar, 1994) és a CGRP (Adams és mtsai, 1987) csökkentik a nyugalmi membránpotenciált, ezáltal fokozzák a glutamát hatását. Ezzel szemben a dopamin (Oestreicher és mtsai, 1997), enkephalin (Burki és mtsai, 1992) és GABA (Altschuler és mtsai, 1984) inhibitorikus hatásúak, hiperpolarizálják a membránt, így csökkentik az I-es típusú SGC-k érzékenységét a glutamáttal szemben.

A külső szőrsejtek funkciója jelentősen eltér a belső szőrsejteknél leírtaktól. Ezen struktúrákban a transzdukciós csatornák nyitása által kiváltott transzdukciós áram kétféle választ vált ki. A nagyobb jelentőségű válasz a külső szőrsejtek hosszának és merevségének gyors változása, aminek következtében az adott területen megváltozik a Corti-féle szerv alakja, ami fokozza a belső szőrsejtek válaszkészségét, azaz nő a cochlea érzékenysége az

adott frekvencián. A külső szőrsejtek depolarizációját kísérő neurotranszmitterfelszabadulás a bazális régióban jóval kisebb mértékű és jelentőségű, mint a belső szőrsejtek esetében.



2. ábra Egy külső szőrsejt afferens (A) és efferens (E) kapcsolatainak vázlatja (Raphael és Altschuler, 2003 alapján)

A külső szőrsejtek efferens (E) beidegzését a MOC rendszer látja el, egy OHC bázisán több MOC rost is végződik. Az efferens végződés acetylcholin (ACh) mellett valószínűleg GABA-t és CGRP-t is tartalmaznak. Az OHC-k poszt-szinaptikus membránjának aktív zónája tartalmaz mind ionotróp, mind pedig metabotróp ACh receptorokat, de GABA-receptorok és a CGRP hatásáért felelős neuropeptid-receptorok is találhatóak itt. A poszt-szinaptikus válasz kialakításában egyes ioncsatornák (Ion cs.), köztük  $K^+$ -csatornák is, részt vesznek. A külső szőrsejtek afferens (A) beidegzéséért a II-es típusú SGC-k felelősek. A transzmitter szerepét glutamát (Glu) tölti be, amely kis vezikulumokból szabadul fel a sejt bázisán, és a poszt-szinaptikus glutamát-receptorokon (GluR) keresztül fejt ki hatását.

A külső szőrsejtek afferens (sensoros) innervációját az ún. II-es típusú SGC-k biztosítják (2. ábra, Brown, 1987), amelyek az összes ganglion spirale neuron 5-10%-át alkotják. Egy II-es típusú SGC 3-10 szőrsejtet innervál, és ezen neuronok (az I-es típusú SGC-vel ellentétben) nem rendelkeznek myelinhüvellyel. Bár a külső szőrsejtek és a II-es típusú SGC-k közötti szinapszisok működéséről csak kevés adat áll rendelkezésre, a glutamát meghatározó szerepe ebben a struktúrában is igazoltnak látszik (Usami és mtsai, 1992; Kuriyama és mtsai, 1993; Kuriyama és mtsai, 1994).

A II-es típusú SGC-k valószínűleg a medialis olivocochlearis (MOC) reflexív részei. A MOC efferensek a corpus trapezoideum ventrális magjából erednek. Egyes állatokban (pl.

tengerimalac, macska) az oliva superior komplex (SOC) más mediális lokalizációjú magjaiból (pl. nucleus periolivaris superiorból) is indulnak ki rostok, míg más állatokban (pl. patkány) ez nem jellemző (Guinan Jr. és mtsai, 1984; Warr, 1980). A MOC nyúlványok mind az ipsilateralis, mind pedig a contralateralis cochleat innerválják, bár a contralateralis cochlea beidegzése jelentősebb. Számos MOC rost ad kollaterálisokat a nucleus cochlearisba, mielőtt a vestibularis ideggel együtt elhagynák az agytörzset. Az Oort-anastomosisig együtt haladnak a vestibularis ideggel, majd egyesülnek a hallóideggel, és azzal lépnek be a cochleába, végül a külső szőrsejtek bázisán végződnek. Egy rost több külső szőrsejtet is innervál. Farmakológiai, hisztokémiai és immuncitokémiai vizsgálatok szerint a rendszer legfontosabb neurotranszmittere az acetilkolin (Bobbin és Konishi, 1971; Robertson és Johnstone, 1978; Eybalin és Pujol, 1987; Warr, 1975), ami a külső szőrsejteket hiperpolarizálja, azaz csökkenti válaszkészségüket. Az acetilkolin mellett a GABA (Eybalin és mtsai, 1988; Altschuler és mtsai, 1989) jelenlétét is kimutatták már, ami ugyancsak hiperpolarizációt vált ki. A CGRP jelenlétére vonatkozó eredmények ellentmondásosak (Luebke és Dickerson, 2002; Kitajiri és mtsai, 1985; Sliwinska-Kowalska és mtsai, 1989).

#### Ganglion Spirale

A szőrsejteket beidegző ganglion spirale neuronok somaja a cochlea tengelyében, a modiolusban található, perifériás nyúlványaik a szőrsejtek afferens innervációját látják el, míg centrális nyúlványaik a nervus acusticusot alkotják. Az I-es típusú SGC-k alkotják a sejtpopuláció 90-95 %-át, és a belső szőrsejtek afferens beidegzését biztosítják (Berglund és Ryugo, 1987). Sejttestük ovális alakú és relatíve nagyméretű (Santos-Sacchi, 1993; Chen, 1997; Jagger és Housley, 2002; Szabó és mtsai, 2002), bár az utóbbi paraméter fajspecifikus, és nagyban függ az alkalmazott preparátumtól is. Az I-es típusú SGC-k különlegessége, hogy nemcsak a nyúlványaikat, de a sejttestüket is vastag myelinhüvely borítja, és így a soma is részét képezi a vezetési útvonalnak. Az I-es típusú SGC-k spontán aktivitással rendelkeznek, ami részben a belső szőrsejtek már említett spontán neurotranszmitter-felszabadításának az eredménye, részben pedig (mivel glutamát-receptor-antagonisták a spontán aktivitást nem szüntetik meg teljesen) ezen neuronok intrinzik membrántulajdonságaiból fakad (Chen, 1997).

A II-es típusú SGC-k száma az I-es típusú neuronoknak mintegy tizede. Sejttestük gömbölydedebb, méretük pedig kisebb, mint az I-es típusú neuronoké (Chen, 1997; Jagger és Housley, 2002). A II-es típusú SGC-k a külső szőrsejtek afferens beidegzését látják el; egy idegsejt több, akár 3-10 szőrsejtet is innerválhat. Bár a jelenség pontos szerepe nem ismert,

mindenképpen megemlítendő, hogy a II-es típusú SGC-k a külső szőrsejtek mellett a Corti-féle szerv támasztósejtjeit is beidegzik (Fechner és mtsai, 2001); ezen kapcsolat pontos jelentősége azonban mindmáig ismeretlen. A II-es típusú SGC-k spontán aktivitással nem rendelkeznek, és myelinhüvelyük sincs.

A ganglion spirale neuronok igen nehezen hozzáférhető helyen vannak, így vizsgálatuk nem könnyű. Igen elterjedt funkcionális vizsgálati módszer a SGC-k enzimátikus (vagy enzim nélküli, kizárólag mechanikai) izolálása. Az izolálást követően vagy azonnal sor kerül a kísérletekre (Santos-Sacchi, 1993; Chen, 1997; Garcia-Díaz, 1999; Szabó és mtsai, 2002; Nakagawa és mtsai, 2005), vagy a protokoll végén nyert neuronokat sejtenyésztési körülmények között tartják fenn (Lin, 1997; Mo és Davis, 1997a, 1997b; Adamson és mtsai, 2002; Zhou és mtsai, 2005). Az izolálási technikák hátránya, hogy az eljárás során alkalmazott enzimek lényeges hatással lehetnek a neuronok morfológiájára és fiziológiájára.

A sejtenyésztésben fenntartott SGC-k egyik előnye, hogy ezen neuronoknak lehetőségük van legalább részben regenerálódni az izolálási eljárás okozta sokkból. A módszer előnyös lehet különböző anyagoknak (pl. neurotrofinok) az SGC-kre gyakorolt hatásának vizsgálata során is. Komoly hátránya ugyanakkor ezen technikának, hogy igen nehéz (sőt, szinte lehetetlen) a fiziológiával megegyező körülményeket teremteni a sejtenyésztésben, így a neuronok csatornamintázata és egyéb tulajdonságai is igen jelentős változásokon mehetnek keresztül a tenyésztésben. Fontos megjegyezni, hogy bár a tenyésztésben fenntartott idegsejtek nyúlványokat fejlesztenek, ezek vizsgálatából messzemenő következtetéseket nem lehet levonni az *in vivo* processzusokra vonatkozóan. A sejtizolálás további hátránya, hogy nem lehet összehasonlítani az eredetileg egymás közelében elhelyezkedő sejteket. Igen nehézkes továbbá a sejtek morfológiai azonosítása, amit az is bonyolít, hogy az I-es típusú SGC-k az izolálást követően levedlik myelinhüvelyüket. Bár az I-es típusú SGC-k ezen jól ismert „vedlése” kifejezetten előnyös az elektrofiziológiai mérések esetében, a két sejtfeleség biztonságos elkülönítését jelentősen megnehezíti, hiszen ekkor azt csak a sejtek mérete és a nyúlványok csomkjai alapján lehet megtenni. Az enzimátikus izolálás további komoly hátránya, hogy a neuronoknak csak viszonylag kis százaléka éli túl az izolálási eljárást, így elsősorban az I-es típusú sejtek vizsgálatára alkalmas.

A sejtizolálás mellett túlélő szövetmetszeteken (Jagger és Housley, 2002; Jagger és Housley, 2003) is lehetséges elektrofoziológiai méréseket végezni (ún. „cochlear slice preparation”). Az eddig említett technikák közül talán ez tükrözheti legélethűbben a fiziológiás állapotokat; komoly hátránya viszont, hogy nehezen kivitelezhető. Utóbbi



megállapítást jól illusztrálja az a tény, hogy ezidáig csupán egy munkacsoport végzett ilyen kísérleteket.

Bár funkcionális adatok nem várhatók az immunhisztokémiai vizsgálatoktól, a hagyományos paraffinba ágyazott szövetmetszeteken végzett immunfestések is sok értékes információval szolgálhatnak. Ezen technika során a mintákat igen hosszú (legalább 12-24 órás, Zhong és Liu, 2004) formalinos fixálásnak kell alávetni, majd a csontszövet miatt a fixált modiolusok dekalcinálása is szükséges, amit a paraffinba történő beágyazás, és a kellően vékony szövettani metszetek készítése követ. A módszer egyik hátránya az igen hosszú fixálási és dekalcinálási idő, amely során a sejtek morfológiája jelentős mértékben megváltozik, torzul, jelentősen megnehezítve a két neurontípus megkülönböztetését. A morfológiai azonosítást tovább nehezíti, hogy a metszési sík az egyes neuronokat eltérő helyen metszi el, így nehéz megállapítani azok pontos méreteit, és a nyúlványok is csak ritkán és rövid távolságig követhetők nyomon. A formalinos fixálással összefüggő további jelentős probléma, hogy a hosszú fixálás miatt létrejövő fehérje keresztkötések elfedhetik az antigéneket, ami álnegatív vagy gyenge immunjelölődést eredményezhet. A helyzet antigénfeltárással javítható, ám mivel minden antitest esetében külön kell meghatározni az alkalmazandó antigénfeltárási eljárást, a ganglion spirale metszetek immunhisztokémiai vizsgálata igen idő-, anyag- és munkaigényes. A technika további hátránya, hogy mivel az egyes metszetek igen vékonyak (ált. 4  $\mu\text{m}$ ), egy-egy metszeten egyidejűleg a cochlea SGC-populációjának csak kis hányada vizsgálható.

Mivel az I-es és II-es típusú SGC-k igen eltérő funkciókkal rendelkeznek, fontos a két neurontípus megbízható megkülönböztetése. Erre a célra már számos hisztológiai markert kipróbáltak; így az I-es típusú SGC-k jelölésére használtak neuropeptid-Y - (NPY, Anniko és mtsai, 1995) és parvalbumin- (Soto-Prior és mtsai, 1995), míg a II-es típusú SGC-k jelölésére GFAP- (glial fibrillar acidic protein, Anniko és mtsai, 1995), peripherin- (Jagger és Housley, 2003) és SAP- (vagy SAP108-, [synapse-associated protein] Reid és mtsai, 2004) ellenes antitesteket. Az alkalmazott markerek meglepően nagy száma is jelzi, hogy mind a mai napig nincs teljesen elfogadott, és minden kétséget kizáróan specifikus antigén, amely lehetővé tenné az SGC-k két típusának egyértelmű elkülönítését. A problémát tovább bonyolítja, hogy sem az I-es, sem pedig a II-es típusú SGC-k nem alkotnak homogén populációt. A szőrsejtekhez hasonlóan a ganglion spirale neuronok is tonotopikusan helyezkednek el, és számos jellemzőjükről leírták, hogy a modiolus tengelye mentén változik (pl. a bázis közelében lévő neuronok nagyobbak, míg az apex közelében elhelyezkedők kisebbek).

A morfológiai eltérések mellett a tüzelési mintázatban is mutatkoznak eltérések az egyes neuronok esetében. Általánosságban elmondható, hogy az SGC-k küszöb feletti ingerlés hatására a stimulus kezdetén egy akciós potenciált (AP) tüzelnek, míg magas frekvenciájú inger során a sejtek adaptálódnak: az akciós potenciálok időtartama nő, az amplitúdójuk és a csúcs eléréséhez szükséges idő csökken, és alkalmanként egy-egy AP ki is marad (Lin, 1997). Az egyes neuronok azonban eltérő látenciával és adaptációs képességekkel rendelkeznek, ami egyrészt függ az adott neuron típusától, és (a morfológiai jellemzőkhöz hasonlóan) a cochleában elfoglalt helyétől is. Így az I-es típusú SGC-k esetében az apikális neuronok (amelyek az alacsonyabb frekvenciájú hangokra reagálnak) hosszabb látenciával és lassabb adaptációval jellemezhetők, míg a bázis neuronjainak (amelyek a magasabb frekvenciájú hangok érzékelését végzik) látenciája rövid, és gyorsan adaptálódnak (Adamson és mtsai, 2002; Reid és mtsai, 2004). Az I-es típusú SGC-khez képest a II-es típusú neuronok általában lassabban adaptálódnak, alacsonyabb az ingerküszöbük és elnyújtottabb a válaszuk (Reid és mtsai, 2004). Bár a II-es típusú SGC-k esetében is léteznek adatok, amelyek arra utalnak, hogy a tüzelési mintázat a modiolus tengelye mentén változik, ezen eredmények meglehetősen ellentmondásosak. Egyes szerzők szerint a II-es típusú neuronok esetében a változások hasonlóak az I-es típusú neuronoknál leírtakhoz (Jagger és Housley, 2003), míg mások ezzel ellentétes eredményeket kaptak, és arról számoltak be, hogy az apikális neuronok adaptációja gyorsabb (Reid és mtsai, 2004).

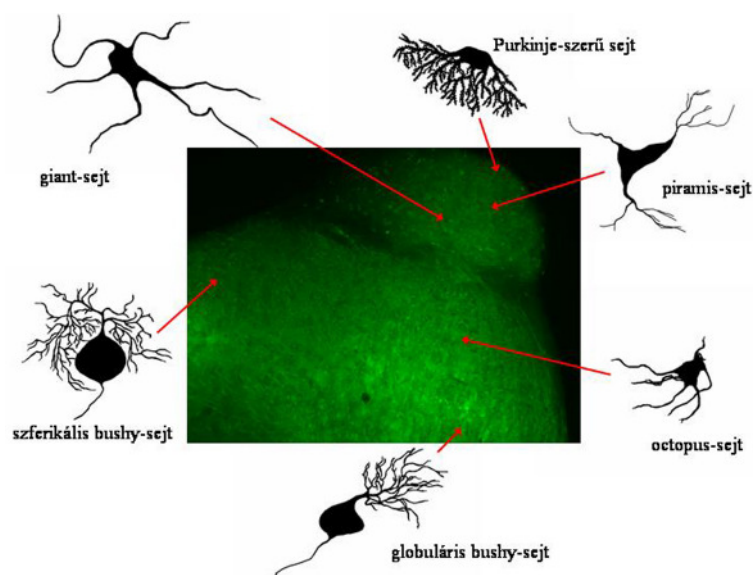
Léteznek olyan adatok, melyek szerint a modiolus tengelye mentén megfigyelhető változások (mind a morfológiai, mind pedig az elektrofiziológiai jellemzők) nem „előre programozott” tulajdonságai az idegsejteknek, hanem egy külső, a ganglion spirale neuronoktól független szabályozási mechanizmus következményei (Zhou és mtsai, 2005). Ilyen szabályozó vegyület lehet a neurotrophin-3, amelynek a modiolus tengelye mentén változik a koncentrációja, és ez befolyással lehet a neuronok csatorna- és tüzelési mintázatára.

#### Nucleus Cochlearis

A hanginger feldolgozásának következő állomása a nucleus cochlearis, amely a nervus acusticustól kapja az információkat. Fontos megemlíteni, hogy a nucleus cochlearis nemcsak jeltovábbító szereppel rendelkezik, hanem már itt elkezdődik az akusztikus információ feldolgozása. Ezen folyamat során a hangingerek különböző komponensei eltérő útvonalakra kerülnek, amelyek gyakran egymással párhuzamosan futnak, és a hallórendszer magasabb központjaiba szállítanak információkat. Közismert, hogy ezen útvonalak némelyike képes

megtartani a hangingerek időbeli kódolását, ugyanakkor más útvonalaknál ez a képesség nincs meg.

A ganglion spirale rostok a magba érve elágaznak, és két köteggként haladnak tovább. A rostralisabb elhelyezkedésű rostok a nucleus cochlearis elülső ventrális (anteroventralis nucleus cochlearis, aVCN) részébe tartanak (3. ábra). Ez a régió főleg bushy-, és stellate-sejteket tartalmaz (Wu és Oertel, 1984). A n. acusticus caudalisabb, leszálló nyálábja a mag hátulsó ventrális területén (posteroventralis nucleus cochlearis, pVCN) keresztül a nucleus cochlearis dorsalisba (DCN) jut (Moore, 1986). A pVCN legjelentősebb sejtjei az octopus-neuronok. A DCN-ben négy, koncentrikusan elhelyezkedő réteget lehet elkülöníteni (Brawer és mtsai, 1974). A legkülső réteg a molekuláris réteg (1. réteg), amely főleg a szemcsesejtek axonjait tartalmazza, bár néhány szemcsesejt somaja is megtalálható itt. Közvetlenül a molekuláris réteg alatt helyezkedik el a fuziform- (vagy piramidális-) réteg (2. réteg), ahol döntően a piramis-, szemcse-, cartwheel- és stellate-neuronok sejttestjei találhatók. A DCN 3. rétegében a piramis-sejtek bazális dendritfája és néhány kisebb jelentőségű neuron (pl. verticalis-sejtek) található. A hallóideg leszálló rostjainak egy része a piramis-sejtek bazális dendritfáján létesít szinaptikus kapcsolatot. A DCN legmélyebb része (4. réteg) főleg az óriás- és a nagy multipoláris-sejtek somáját tartalmazza.



3. ábra Patkány nucleus cochlearis sagittalis metszete

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

A ganglion spiraleból kétféle rost érkezik a nucleus cochlearisba: az I-es típusú SGC-k myelinizált, vastag nyúlványai; valamint a II-es típusú SGC-k jóval vékonyabb, myelinhüvellyel nem rendelkező rostjai. Míg az előbbiek a nucleus cochlearis nagyobb, döntően projekciós sejtjeivel (pl. piramis- és bushy-neuronok) állnak kapcsolatban, addig az utóbbiak a szemcsesejteken végződnek, amelyek aztán az információt az igen kiterjedt parallel rosthálózaton keresztül továbbítják a nucleus cochlearis különböző területeire. A fentiekből kitűnik, hogy a nucleus cochlearis legfontosabb információforrása maga a hallóideg, azonban fontos megemlíteni, hogy a mag az SOC -tól is kap acetilkolinerg rostokat, amelyek aktivitása jelentősen módosíthatja a nucleus cochlearis jelfeldolgozó működését.

Jelen munkában a nucleus cochlearis számos projekciós neurontípusa közül a bushy-, óriás-, piramis-, szemcse- és octopus-neuronokat vizsgáltuk, így a továbbiakban csak ezen sejtek fontosabb jellemzőit tekintem át.

### *Bushy-sejtek*

A bushy-neuronok sejtteste kerek vagy ovális alakú, amelyből egyetlen, kezdetben vastag, majd dúsan elágazódó dendrit és egy elágazás nélküli axon indul ki. Ezen sejtek kizárólag a VCN-ben fordulnak elő. Bár a bushy-neuronoknak két altípusa ismert (szferikális és globuláris bushy-sejtek, Harrison és Irving, 1965; 1966), mivel a két csoport elektrofiziológiai tulajdonságai megegyeznek, jelen munkában nem tettünk közöttük különbséget.

A bushy-sejtek a sejttestükön ún. óriásszinapszisokban végződő hallóidegrostoktól kapják az információkat (Held-féle végbunkó; Lorente de No, 1933; Tolbert és mtsai, 1982), dendritfájuk pedig valószínűleg az egymással folytatott kommunikációban játszik szerepet (Cant és Morest, 1979; Tolbert és mtsai, 1982). A szferikális- és globuláris-neuronok eltérő területekre projiciálnak: míg a szferikális-sejtek axonjai az ipsilateralis nucleus olivaris medialisba és laterálisba továbbítják a jeleket, addig a globuláris-sejtek a nucleus medialis corporis trapezoideibe (MNTB) projiciálnak, ahol a fősejtek sejttestén egy újabb óriásszinapszisban (Held-kehely) végződnek.

Izolált tengerimalac bushy-neuronokon végzett elektrofiziológiai mérések (Manis és Marx, 1991) azt mutatták, hogy ezek a sejtek nagyon gyorsan adaptálódó (II-es típusú) választ produkálnak: az ingerküszöböt meghaladó inger hatására egyetlen AP-t tüzelnek a stimulus kezdetekor. A bushy-sejtek ezen tulajdonsága azért jelentős, mert a gyors adaptáció következményeként képesek pontosan meghatározni a hanginger kezdetének időpontját, ami elengedhetetlen a hangforrás térbeli lokalizációjához. Ugyancsak a gyors adaptációnak

köszönhető, hogy ezen idegsejtek még igen magas frekvenciák esetében is képesek a hallóidegből érkező aktivitási mintázattal megegyező tüzelési mintázatot produkálni („primary-like” aktivitás, Rhode és mtsai, 1983a; Wu és Oertel, 1984).

Az eddigi elektrofiziológiai tanulmányok szerint a bushy-neuronok legjelentősebb  $K^+$ -áramai között van egy magas és egy alacsony küszöbpotenciálú áram, melyek közül az utóbbi viszonylag lassú aktivációval rendelkezik, és a nyugalmi membránpotenciál értékén is részlegesen aktivált állapotban van (Manis és Marx, 1991).

### *Octopus-sejtek*

A bushy-sejtekhez hasonlóan az octopus-neuronok is a VCN-ben találhatóak (Harrison és Irving, 1966), kerekded vagy kissé megnyúlt sejttestük átmérője mintegy 30–35  $\mu\text{m}$ . Megjelenésükre jellemző, hogy a sejttest ugyanazon oldalából több vastag dendrit indul ki, ami polipra emlékeztető megjelenést kölcsönöz ezen sejtfeleségnek (Osen, 1969). Fontos megemlíteni, hogy az octopus-sejtek dendritjei a hallóideg leszálló ágait ott keresztezik, ahol azok konvergenciája a legnagyobb mértékű, ezáltal a lehető legtöbb (legalább 60) acusticus axonnal létesíthetnek szinaptikus kapcsolatot.

Mivel az octopus-neuronoknak rendkívül alacsony a bemenő ellenállásuk (kb. 2,4 M $\Omega$ ), és membránjuk időkonstansa is igen alacsony (0,21 ms), egy AP kiváltásához igen nagy depolarizációs áramra van szükség. Ennek funkcionális következménye az a jól ismert jelenség, hogy számos, az octopus-sejttel kapcsolatban álló idegrost egyidejű aktivitása szükséges egy AP kiváltásához. Ugyancsak a jellegzetes membránsajátságok következménye, hogy az octopus-sejtek AP-ja viszonylag alacsony amplitúdójú (10–30 mV) és meglehetősen gyorsan lezajlik (0,24–0,54 ms, Golding és mtsai, 1999). Az octopus-sejtekre az ún. „onset” tüzelési mintázat jellemző, azaz az inger kezdetén tüzelnek egy AP-t. Ezek alapján az octopus-sejteket a nucleus cochlearis koincidencia detektorainak tekintik (Rhode és mtsai, 1983a; Webster és Trune, 1982).

Az octopus-neuronok axonjai alkotják a stria acustica intermediat, ami a SOC periolivaris sejtcsoportjaiba projiciál.

### *Piramis- (fuziform)-sejtek*

A piramis-sejtek kizárólag a DCN-ben fordulnak elő. Jellegzetes ovális vagy háromszög alakú sejttestük van, aminek átmérője kb. 25  $\mu\text{m}$  (Osen, 1969; Webster és Trune, 1982). Apikális dendritfájuk behatol a nucleus cochlearis molekuláris rétegébe, ahol kúpos nyúlványrendszer formáz, és az ottani parallel rostokkal képez szinapszisokat (Lorente de

No, 1933; Lorente de No, 1981; Rhode és mtsai, 1983b; Webster és Trune, 1982). Az apikális dendritfa átmérője általában nem haladja meg a 400  $\mu\text{m}$ -t. A bazális dendritek viszonylag kevésbé ágazódnak el, a dendritfa pedig leginkább gömbszerű megjelenésű. A bazális nyúlványokkal kapcsolatban álló hallóidegrostok a cochlea egy viszonylag szűk régiójából származnak; ugyanakkor a hallóideg egyes rostjai a piramis-sejtek somaival is kapcsolatban állnak (Kane, 1974; Schweitzer és Cant, 1984). A piramis-sejtek axonjai a stria acustica dorsalisban futva a contralateralis colliculus inferiorba projiciálnak (Osen, 1972; Ryugo és mtsai, 1981). Mivel a piramis-sejtek axonjai viszonylag vékonyak, valószínűtlennek tűnik, hogy képesek lennének megőrizni a beérkező hanginger időbeliségét.

A piramis-sejtek bemenő ellenállása 86  $\text{M}\Omega$ , nyugalmi membránpotenciáljuk  $-50$  és  $-60$  mV között változik (Zhang és Oertel, 1994). Jellegzetességük, hogy az afferens ingerlés intenzitásától és jellegétől, valamint a sejt aktuális nyugalmi membránpotenciáljától függően három, jól megkülönböztethető tüzelési mintázatot produkálhatnak („pauser”, „chopper” és „buildup” aktivitás, Kanold és Manis, 1999). Egyes feltételezések szerint a piramis-sejtek aktivitása jelentős lehet a hangforrás térbeli lokalizációjának meghatározásában (Young és mtsai, 1992).

### *Óriássejtek*

Az óriásneuronok a nucleus cochlearis legnagyobb sejtjei, és mind a VCN-ben, mind pedig a DCN-ben megtalálhatók (Osen, 1969). Sejttestük átmérője akár az 50  $\mu\text{m}$ -t is elérheti, és akárcsak maga a sejt, sejtmagjuk és sejtmagvacskájuk is nagyméretű. Bár sagittalis síkban sejttestük általában háromszög vagy poligonális alakú, más síkokban a perikarion meglepően vékony lehet, ami arra utal, hogy az óriásneuronok sejtteste meglehetősen lapos (Harrison és Irving, 1965; 1966; Moore és Osen, 1979; Webster és Trune, 1982).

Az óriássejteket esetenként nehéz megkülönböztetni a VCN legnagyobb multipoláris-sejtjeitől vagy a DCN egyes neuronjaitól (az ún. „radiate”-neuronoktól), bár a pontos azonosításban segítséget jelenthet, hogy az óriássejtek dendritjei hosszúak és vaskosak, sejttestük pedig szögletesebb, mint az említett két neurontípusé.

Az óriássejtek dendritfái a nucleus cochlearis igen nagy területét behálózzák, akár 500–600  $\mu\text{m}$ -es távolságba is elérnek. Úgy tűnik, hogy ez az egyetlen neurontípus, amelynek nagyméretű dendritjei egyaránt behatolnak a VCN szemcsesejtes- és a DCN molekuláris rétegébe. Az óriássejtek dendritjei által lefedett hatalmas területnek köszönhetően különösen nagyszámú acusticus idegrosttól kapnak információt, ennek köszönhetően számos

hallóidegrost jeleit képesek integrálni (Rhode és mtsai, 1983b). Ezen szerepüket funkcionális mérések eredményei is alátámasztják, melyek szerint az óriássejtek által tüzelte AP-ok frekvenciája és dinamikája igen tág határok között mozoghat. Az óriássejteknek a projekciós területe is igen nagy kiterjedésű, axonjaik és collaterálisai a contralateralis colliculus inferiorba, továbbá a contralateralis nucleus cochlearisba is szállítanak információkat (Osen, 1972; Ryugo és mtsai, 1981).

Az óriássejtek nagy amplitúdójú AP-jait két utóhiperpolarizáció követi (Zhang és Oertel, 1993). Az első utóhiperpolarizáció során a membránpotenciál minden esetben a nyugalmi membránpotenciálnál negatívabb értékig süllyed, függetlenül a tüzelést kiváltó stimulus nagyságától, míg a második utóhiperpolarizáció amplitúdója ennél sokkal változatosabb mértékű. Az óriássejteket a hallóideg rostjai közvetlenül aktiválják, de stimulálhatják őket a VCN excitatórikus interneuronjai (pl. a szemcsesejtek) is, amelyek mono- vagy poliszinaptikus kapcsolatban állnak az óriássejtekkel. A nucleus cochlearis más interneuronjai (pl. a tuberculoventralis-sejtek) glicinerg inhibítórikus rostokat küldenek az óriásneuronokhoz (Davis és mtsai, 1996).

### *Szemcsesejtek*

A szemcsesejtek a nucleus cochlearis legkisebb, ám legnagyobb számban előforduló neuronjai (Mugnaini és mtsai, 1980). Kicsi, gömbölyű sejttestük átmérője 6–8  $\mu\text{m}$ , ami kicsivel több, mint cerebellaris megfelelőik esetében. A cochlearis szemcsesejtek dendritjei is hosszabbak (kb. 70  $\mu\text{m}$ ), mint cerebellaris társaiké, és kis villákban vagy karmokban végződnek. Bár mind a DCN-ben, mind pedig a VCN-ben megtalálhatók, a szemcsesejtek általában eléggé perifériásan, a hallóideg végződéseitől távol helyezkednek el (Fekete és mtsai, 1984; Lorente de No, 1981). Ennek ellenére egyes hallóideg-collateralisok elérhetnek a szemcsesejtes régióig, továbbá a mag centrális területein is található néhány szemcsesejtes rész, amelyekhez vagy közvetlenül a hallóideg, vagy annak collaterálisai kapcsolódhatnak (Kane, 1974). A szemcsesejtek a cochlearis moharostoktól is kapnak beidegzést, amelyek az olivocochlearis kötegből, a colliculus inferiorból, valamint a lemniscus lateralis dorsalis és ventralis magjaiból erednek. A szemcsesejtek axonjai alkotják a nucleus cochlearis parallel-rosthálózatát, ami a nucleus cochlearis számos más sejtípusával is (pl. piramis-neuronokkal) kapcsolatban áll.

Figyelembe véve, hogy a szemcsesejtek mind a hallórendszerrel, mind pedig a nucleus cuneatus-tól kapnak információkat, fontos szerepük lehet a somatosensoros és acusticus

információk összevetésében. Ezen sajátosságukból fakadóan a szemcsesejteknek nagy jelentőségük lehet pl. a fil. pozíciójának a hangforrás helyzetéhez való igazításában.

Tartós depolarizáció hatására a szemcsesejtek AP-sorozattal válaszolnak, aktivációjukhoz pedig rendkívül kicsi depolarizációs áram is elegendő (10–35 pA, Rusznák és mtsai, 1997). Egyes eredmények szerint a szemcsesejtek spontán aktivitással is rendelkezhetnek, aminek háttérében egyaránt állhatnak intrinzik membrántulajdonságaik és a szemcsesejteken konvergáló excitatórikus ingerek; bár az sem kizárható, hogy mindkét mechanizmus jelentős. A szemcsesejtek spontán tüzelése végső soron a velük kapcsolatban álló egyéb neuronok (pl. piramis-, stellate- vagy cart wheel-neuronok) tüzeléséhez vezethet.

Általános bevezető a  $K^+$ -csatornákhöz

A káliumcsatornákat elsőként a neuronok membránjában, az akciós potenciál kialakításában betöltött funkciójuk alapján azonosították, mai tudásunk szerint azonban szinte valamennyi sejt típusban megtalálhatók. Általánosságban elmondható, hogy a feszültségvezérelt  $K^+$ -csatornák túlnyomó többségében az egyes csatornaalegységek tetramereket alkotva hozzák létre a  $K^+$ -permeábilis pórust.

Bár a  $K^+$ -csatornák evolúciója még nem teljesen tisztázott, az alapján, hogy minden biológiai rendszerben megtalálhatók, feltételezhetően ősi fehérjék. Valamennyi teljesen feltérképezett genom, legyen az eukarióta vagy prokarióta, tartalmaz legalább egy  $K^+$ -csatornát, és ez az ioncsatorna típus a legelterjedtebb az élővilágban. A jelenlegi elépzések szerint a  $Na^+$ - és  $Ca^{2+}$ -csatornák valószínűleg a  $K^+$ -csatornákból alakultak ki génduplikációval.

A  $K^+$ -csatornáknak számos alcsaládja ismert, amelyeket általában a pórus nyitására felelős jel alapján különböztetünk meg (pl.: feszültségfüggő,  $Ca^{2+}$ -dependens, G-fehérjék vagy poliaminok által vezérelt csatornák). A  $K^+$ -csatornák számát jelentősen növeli, hogy közülük igen soknál leírták az „alternatív splicing” jelenségét.

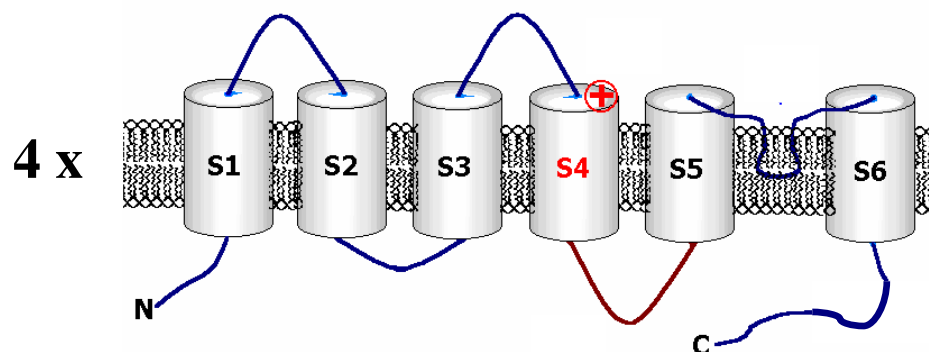
Tekintettel arra, hogy az élő sejtek túlnyomó többségében az intracelluláris  $K^+$ -koncentráció magasabb az extracellulárisnál, a  $K^+$ -csatornák nyitása stabilizálja a nyugalmi membránpotenciált, továbbá a membrán hiper- vagy repolarizációját eredményezheti. Általános előfordulásuknak és nagy változatosságuknak köszönhetően a  $K^+$ -csatornák igen szerteágazó élettani (és patológias) folyamatokban jelentősek.



## Feszültségfüggő $K^+$ - (Kv) csatornák

A depolarizáció hatására aktiválódó  $K^+$ -csatornák az ioncsatornák egyik legnagyobb és legváltozatosabb csoportját képezik; emberben az ismert alegységek száma eléri a negyvenet. Az mRNS posztttranszkripciós módosítása („alternatív splicing”) tovább növeli a lehetséges variációk számát. Bár az egyes csatornák biofizikai tulajdonságai és funkciói között jelentős eltérések lehetnek, általánosságban elmondható, hogy az AP-okat követő repolarizáció és utóhiperpolarizáció kialakításáért, valamint (egyes típusaik) az AP-ok késleltetéséért vagy azok kialakulásának megakadályozásáért felelősek.

A jelenleg ismert csatornaalegységeket szekvenciahomológia alapján 12 főcsoportba (Kv1-12) sorolják be. Az első négy főcsoport homológiát mutat a *Drosophila melanogaster* *Shaker* (Kv1), *Shab* (Kv2), *Shaw* (Kv3) és *Shal* (Kv4) génjeivel (Misonou és Trimmer, 2004). Az ezeket az  $\alpha$ -alegységeket kódoló humán géneket KCN-nek nevezték el, a négy főcsoporthoz pedig az A-D betűket rendelték (azaz Kv1 = KCNA, Kv2 = KCNB, Kv3 = KCNC, Kv4 = KCND).

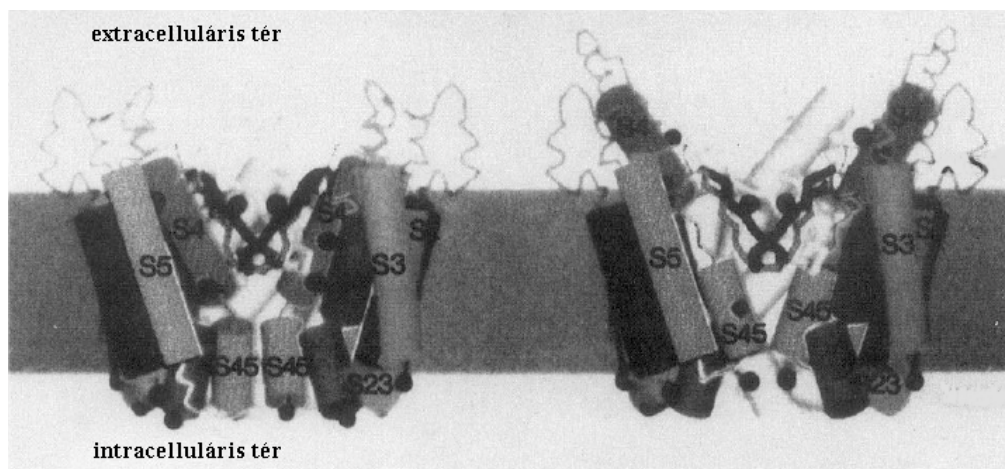


4. ábra A feszültségvezérelt  $K^+$ -csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

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

A funkcióképes Kv-csatornák négy alegységből állnak. Az egyes alegységek hat transzmembrán domént tartalmaznak (S1-S6, Catterall és mtsai, 1993), és mind a C-, mind pedig az N-terminális a membrán intracelluláris oldalán található. A transzmembrán domének közül az S4 felelős a feszültségérzékelésért, az S5 és S6 között pedig a

pórusformáló hurok (P-hurok) található (4. ábra, Jan és Jan, 1997; Sansom és mtsai, 2002; Yellen, 2002; Armstrong, 2003).



5. ábra Egy feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna transzmembrán régiójának szerkezeti modellje (Durrell és Guy, 1992 alapján)

A  $K_v$ -csatorna transzmembrán szegmenseit  $\alpha$ -helikális hengerek alkotják. Az S2 és S3 (S23) valamint S4 és S5 (S45) szegmenseket összekötő helikális domének is fel vannak tüntetve. A P-hurkot vastag vonal jelöli. A pontok a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornában általánosan megtalálható, töltéssel rendelkező aminosav oldalláncokat jelölik. Az ábrán két alegység látható, a másik két alegység nincs ábrázolva. Két feltételezett szerkezet látható: a baloldali a csatorna zárt, a jobboldali pedig a csatorna nyitott állapotát illusztrálja.

Egy  $K_v$ -csatorna felépítésére jellemző, hogy a négy alegység 24  $\alpha$ -hélixéből 16 egy külső hengert formál, amely körülvesz egy 8 transzmembrán  $\alpha$ -hélixből álló belső hengert, amiben pedig egy 8 antiparalel  $\beta$ -száלבól álló cső található (5. ábra, Durell és Guy, 1992; Guy és Conti, 1990). A külső hengert az S1, S2, S3 és S5 domének alkotják, míg a belsőt az S4 és S6  $\alpha$ -hélixek. A pórust a P-hurok alkotják, mindegyik alegység egy  $\beta$ -hajtúkannyarral járul hozzá a 8 antiparalel  $\beta$ -száלבól álló csőhöz.

A pórus különösen fontos része egy glicin-tirozin-glicin (GYG) aminosav-tripletet tartalmazó, igen konzervatív régió, ami döntő (bár nem kizárólagos) jelentőségű a  $K^+$ -szelektív pórus kialakításában (Catterall és mtsai, 1993). Az S4 domén számos pozitív töltéssel rendelkező aminosavat (lizint és arginint) tartalmaz, és ezen domén konformációváltozása felelős az ioncsatornák feszültségfüggő kapuzásáért.

A  $K_v$ -csatornák heterogenitásának egyik alapja a csatornaalegységek nagy száma, de a változatosságot tovább növeli, hogy mind homomer mind pedig heteromer formában előfordulnak *in vivo*. Fontos megjegyezni, hogy a tetramerizáció nem teljesen kötetlen:

általános szabályként elmondható, hogy jellemzően csak az ugyanazon főcsoportba tartozó alegységek alkotnak heterotetramereket.

A feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák a depolarizációra való érzékenységük és inaktivációs tulajdonságaik alapján három nagy funkcionális csoportba oszthatók (Dodson és Forsythe, 2004): (1) dendrotoxinra (DTX) érzékeny, már kis depolarizáció hatására is aktiválódó, lassan inaktiválódó csatornák; (2) erőteljes depolarizáció hatására aktiválódó, inaktivációt nem vagy csak igen lassan mutató, ún. késői típusú áramot létrehozó csatornák; (3) gyorsan, feszültségfüggő módon inaktiválódó, tranzienst csatornák.

Az alacsony feszültségen aktiválódó („low voltage-activated”, LVA) csatornák kis depolarizáció hatására (a nyugalmi membránpotenciáltól kb. -60 mV-ig, ami magában foglalja az AP küszöbpotenciál értékét is) aktiválódnak. Ezen áramért a Kv1.1-, Kv1.2- vagy Kv1.6-alegységekből felépülő csatornák a felelősek. Bár a Kv1-csatornák aktivációja már az első AP alatt elkezdődik, viszonylag lassú aktivációjuk miatt az első AP-ra csak minimális hatásuk van, ugyanakkor az aktiválódásuk következményeként a további AP-ok kiváltásához már nagyobb inger szükséges. Ezen áramtípus specifikus gátlószere a fekete mamba mérgéből izolálható dendrotoxin I (érdeemes megemlíteni, hogy a mérge egy másik összetevője a dendrotoxin-K, ami a Kv1.1-alegység szelektív blokkoló szere).

Ezt az áramtípust a hallórendszer számos elemében leírták, így az SGC-ken (Adamson és mtsai, 2002), a nucleus cochlearis idegsejtjein (Dodson és mtsai, 2003) és az MNTB neuronjain (Brew és Forsythe, 1995) is.

Lassan inaktiválódó, késői típusú áramot („delayed rectifier”) hoznak létre a Kv1.3, Kv1.5, Kv2.1, Kv2.2, Kv3.1 és Kv3.2  $\alpha$ -alegységekből felépülő csatornák. Ezen csatornák aktiválódásához jelentős mértékű depolarizáció szükséges, azaz tipikusan a „high voltage-activated” (HVA) csatornák csoportjába tartoznak. Ezen áramtípusra jellemző, hogy jelentős késéssel aktiválódik, és nem (vagy csak nagyon lassan) inaktiválódik. A késői típusú áramot kialakító csatornák klasszikus gátlószere a közepes koncentrációban alkalmazott tetraetilammónium ( $TEA^+$ ), bár nagy koncentrációban 4-aminopiridinre (4-AP) is érzékenyek. Ezen áram az akciós potenciált követő repolarizációs fázist gyorsítja fel (vagyis a rövid AP-ok létrehozásában tölt be alapvető szerepet), lehetővé téve az őket expresszálo struktúrák minél gyorsabb tüzelését (Rudy és McBain, 2001; Wang és mtsai, 1998; Brew és Forsythe, 1995). Érdekes, hogy a többi főcsoport képviselőivel ellentétben a Kv2 alegységek kombinálódhatnak más főcsoportba tartozó, ún. „kiegészítő alegységekkel” is.

A lassan inaktiválódó, késői típusú áramot a hallórendszer kezdeti szakaszának minden elemében leírták, egyebek között a szőrsejtben (Géléc és mtsai, 2004), az SGC-

kben (García-Díaz, 1999), valamint a nucleus cochlearis (Pál és mtsai, 2004; Rothman és Manis, 2003) és az MNTB (Brew és Forsythe, 1995) neuronjaiban is.

A harmadik csoportba a tranziens  $K^+$ -áramok (klasszikus terminológiával élve az „A-típusú” áramok) tartoznak. Az ebbe a csoportba tartozó csatornák között mind LVA (Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3), mind pedig HVA (Kv3.4) csatornák előfordulnak. A depolarizációt követő aktivációjuk után 10–100 ms-on belül inaktiválódnak, ami tranziens konduktanciaváltozást eredményez. A nyugalmi membránpotenciál értékén ezen csatornák általában inaktivált vagy részlegesen inaktivált állapotban vannak, de már kis membránpotenciál-változások is jelentősen befolyásolhatják az inaktiváció mértékét. Mindebből következően hiperpolarizáció hatására fokozódik az A-áram aktiválhatósága, ezáltal pedig a szinaptikus aktivitás jelentősen befolyásolhatja a tranziens  $K^+$ -áramot expresszázó neuronok ingerlékenységét. Az A-áramok tranziensen csökkenthetik az első néhány csúcs látenciaidejét, és/vagy módosíthatják a csúcsok közötti időtartamot egy AP-sorozaton belül. A tranziens áramok a szinaptikus integrációban is szerepet játszhatnak oly módon, hogy a kezdeti excitatórikus posztzinaptikus potenciál (EPSP) alatt inaktiválódnak, és így a szummáció során a második EPSP már alacsonyabb küszöbpotenciál-értéken válhat ki AP-t (Rehm és Lazdunski, 1988). Az A-típusú áram hatásos gátlószere a 4-AP, a TEA<sup>+</sup> pedig csak kevésbé gátolja ezeket a csatornákat.

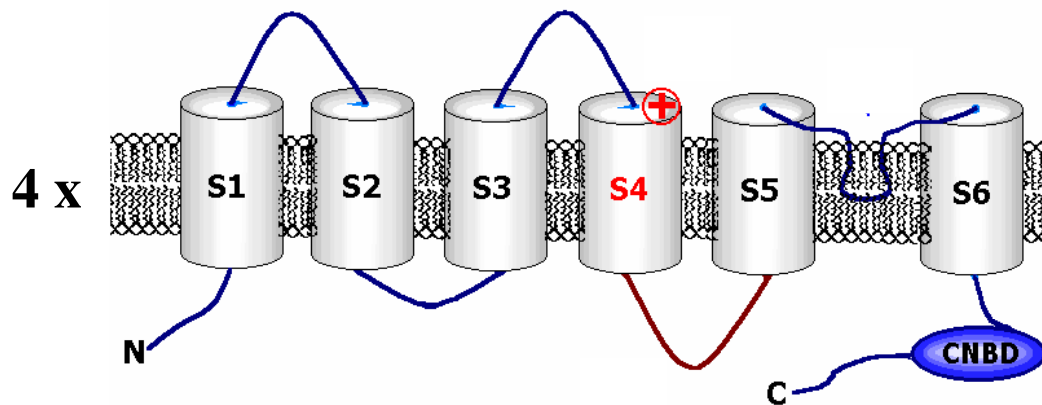
Tranziens  $K^+$ -áram jelenlétét leírták a szőrsejteknél (Eatock és Rüsck, 1997), ugyanakkor a ganglion spirale neuronokon végzett vizsgálatok egymásnak némileg ellentmondó eredményeket hoztak, mivel egyes munkacsoportoknak sikerült kimutatni a jelenlétét (Jagger és Housley, 2002; Szabó és mtsai, 2002), míg másoknak nem (Santos-Sacchi, 1993; Lin, 1997). A nucleus cochlearis számos projekciós neuronja is rendelkezik A-típusú árammal (Kanold és Manis, 1999; Rusznák és mtsai, 1997).

A helyzetet még tovább bonyolítja, hogy a Kv-csatornák tulajdonságait ún. kiegészítő fehérjék is módosíthatják, amelyek a csatornák kapuzását és/vagy sejten belüli megoszlását szabályozhatják. Ilyen fehérjék egyebek között a Kv-Beta (Kv $\beta$ ) alegységek, a KChIP-ek (Kv channel-interacting proteins), a KChAP-k ( $K^+$  channel-associated protein), a KCNE-gének által kódolt fehérjék és a 14-3-3 proteinek is (Li és mtsai, 2006). Ezen kiegészítő fehérjék pontos funkciója és hatásmechanizmusa még nem minden esetben ismert, azonban egyre több adat utal arra, hogy fontos szerepet játszanak a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák működésének szabályozásában.

Hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornák

A hiperpolarizáció-aktivált, ciklikus nukleotidokra érzékeny, nem-specifikus kationcsatornákat (HCN-csatornák) a Kv-csatornák főcsoportjába sorolják. Bár elsőként a szív nodus sinoatrialis sejtjeiben azonosították őket (Yanagihara és Irisawa, 1980), számos perifériás és centrális neuronban is megtalálhatók. Ezen csatornák hiperpolarizáció hatására lassan aktiválódnak (-50 - -60 mV-nál negatívabb potenciálokon), az általuk létrehozott áramot pedig szívben  $I_f$  (finny)-nek (Brown és mtsai, 1979), míg neuronokon  $I_H$ -nak (Halliwell és Adams, 1982) nevezik. A spontán tüzelés képességével rendelkező idegsejtekben (pl. a thalamocorticalis reléneuronok [Bal és McCormick, 1997] vagy a cerebellaris Purkinje-sejtek [Williams és mtsai, 2002]), valamint a szív ingerképző elemeiben (DiFrancesco, 1993) a h-áram igen jelentős szerepet tölt be a ritmikus aktivitásért felelős pacemaker-potenciál kialakításában. A spontán aktivitással nem rendelkező sejtek esetében is nagy jelentősége lehet a h-áramnak: részt vehet a nyugalmi membránpotenciál beállításában (pl. a szem fotoreceptorokban [Bader és mtsai, 1979; Moosmang és mtsai, 2001; Demontis és mtsai, 2002] vagy a savanyú íz érzékeléséért felelős receptorokban [Stevens és mtsai, 2001]), valamint mérsékelheti a hiperpolarizációs és depolarizációs válaszok nagyságát. A HCN-csatornákat dendriteken is leírták (pl. hippocampalis CA1 neuronok esetében [Magee, 1998]), ahol a dendritikus integrációban lehet szerepük. Jelen vannak továbbá egyes preszinaptikus terminálokban is, ahol a szinaptikus jelátvitel szabályozásában vehetnek részt (pl. a cerebellaris kosársejtjeiben [Santoro és mtsai, 1997]).

A Kv-csatornákhöz hasonlóan a funkcionális HCN-csatornák is tetramerek. Az egyes HCN-alegységek hat transzmembrán régiót tartalmaznak (6. ábra), melyek közül a pozitív töltéssel rendelkező S4 felelős a feszültségérzékelésért. További hasonlóság, hogy alegységenként egy pórusformáló P-régiót tartalmaznak, melyben megtalálható a  $K^+$ -szelektív pórus kialakításáért felelős GYG aminosav-triplet. Ettől az aminosav-triplettől eltekintve azonban a HCN-csatornák aminosavszekvenciája jelentős eltérést mutat a többi  $K^+$ -csatornáétól, valószínűleg ezzel magyarázható ezen csatornák kevésbé markáns  $K^+$ -szelektivitása.



6. ábra A HCN-csatornák egy alegységének molekuláris szerkezete

A HCN-alegységeknek a Kv-csatornaalegységekhez hasonlóan 6 transzmembrán doménjük van, melyek közül a negyedik domén felelős a feszültség-érzékelésért, azonban a Kv-alegységektől eltérően az alegységek C-terminálisán van egy ciklikus nukleotid kötő domén (CNBD), ami befolyásolja a csatornák működését. A funkcionális HCN-csatornák is tetramereket formálnak.

A cAMP jelentős mértékben befolyásolja a  $I_h$ -áram aktivációját, az aktivációs potenciált pozitív irányba tolja el. Lényeges megemlíteni, hogy a cAMP nem fehérjefoszforiláció révén fejt ki hatását a  $I_h$ -áramra, hanem egy, a citoplazmatikus C-terminálison található, 120 aminosavból felépülő ciklikus nukleotid kötő doméne (CNBD, Chen és mtsai, 2001; Wainger és mtsai, 2001) keresztül. A CNBD homológ más ciklikus nukleotid kötő fehérjék hasonló régióival (pl. cAMP- és cGMP-függő protein kinázok, catabolite-activating protein [CAP], valamint az olfactoricus neuronok és fotoreceptorok ciklikus nukleotid-függő ioncsatornái, [Santoro és Tibbs, 1999]). A CNBD deléciója a cAMP hatásához hasonló eredménnyel jár, és a  $I_h$ -áram aktivációját nagyjából a cAMP telítési koncentrációjánál megfigyelhető értékkel tolja el pozitív irányba (Yu és mtsai, 1993).

A cAMP kötődése után a hiperpolarizáció hatására az  $I_h$  teljesebben és gyorsabban aktiválódik. Természetesen a cAMP szintjét csökkentő neurotranszmitterek a  $I_h$ -áram aktiválódását csökkentik, az aktivációs görbét negatívabb feszültségértékek felé tolják el. A HCN-alegységekhez a cGMP is képes kötődni, és ezáltal befolyásolni azok működését, azonban affinitása egy nagyságrenddel kisebb, mint a cAMP affinitása (DiFrancesco és Tortora, 1991; Ludwig és mtsai, 1998). Az  $I_h$ -nak a ciklikus nukleotidok szintjén keresztül történő szabályozását mind a szívben, mind pedig az idegrendszerben leírták, és a jelenség fontos szerepet játszik a  $\beta$ -adrenerg agonisták által kiváltott szívfrekvencia-növekedésben, és a muszkarinerg acetilkolinreceptor-agonisták szívfrekvencia-csökkentő hatásában egyaránt.

Az agyban számos neurotranszmitterről bebizonyosodott, hogy különböző neuronok h-áramát a cAMP szint módosításán keresztül szabályozzák. Az  $I_h$ -ra mind a szívben (Musialek és mtsai, 1997), mind pedig az agyban (Pape és Mager, 1992) hatással lehet a nitrogén-monoxid is, ami a guanil-cikláz stimulálásával a cGMP szintjét növeli.

A ciklikus nukleotidok kötődése mellett az utóbbi időben felmerült, hogy a HCN-csatornák szabályozása foszforiláción keresztül is megvalósulhat (Yu és mtsai, 1993); több kináz esetében is felmerült ez a lehetőség, mint pl. a protein kináz A (PKA, Vargas és Lucero, 2002; Chang és mtsai, 1991), protein kináz C (PKC, Chang és mtsai, 1991) és tirozin kinázok (Wu és mtsai, 2000; Shibata és mtsai, 1999; Wu és Cohen, 1997; Accili és mtsai, 1997) eseteiben.

Ezidáig 4 HCN-csatornaalegység ismert (HCN1-4), a belőlük felépülő homomer csatornáknak eltérő a kinetikája, steady-state feszültségfüggése; és a cAMP kötődése is különböző mértékben befolyásolja működésüket. A HCN1-alegységből felépülő csatornák hiperpolarizáció hatására viszonylag gyorsan aktiválódnak (néhány 10 ms, Moosmang és mtsai, 2001), és csak minimálisan befolyásolja működésüket a cAMP kötődése. A HCN2-csatornák lassabban aktiválódnak (néhány 100 ms, Ludwig és mtsai, 1999), a cAMP modulációs hatása pedig jelentősnek mondható. A HCN4-alegységekből felépülő homotetramerek nagyon lassan aktiválódnak (néhány s, Ludwig és mtsai, 1999), és a cAMP kötődése ezen csatornák működését befolyásolja legerősebben. Érdekes, hogy a HCN3-alegységekből felépülő csatornák „kilógnak a sorból”: a HCN3 homotetramerek viszonylag lassan aktiválódnak (1-2 s; azaz ez a paraméter a HCN2 és a HCN4 homotetramer csatornákra jellemző értékek között foglal helyet), azonban a csoport többi tagjától eltérően a cAMP nem modulálja az aktivitásukat (Mistrík és mtsai, 2005). Ez annál is inkább meglepő, mivel a HCN3-alegység CNBD-doménje képes a ciklikus nukleotidok megkötésére. A jelenség magyarázata és a többi HCN-csatornától való jelentős eltérés oka jelenleg ismeretlen.

Több sejt esetében is leírták több HCN-alegység egyidejű expresszióját. Bár ez a megfigyelés komolyan felveti a HCN-heterotetramerek kialakulásának lehetőségét, ezidáig csak a HCN1 és HCN2 izoformák esetében sikerült igazolni, hogy mind *in vitro* (Chen és mtsai, 2001; Ulens és Tytgat, 2001), mind pedig *in vivo* (Brewster és mtsai, 2005) képesek heteromereket formálni. Ezen túlmenően heterológ expressziós rendszerekben HCN1-HCN4 (Altomare és mtsai, 2003) és HCN2-HCN4 (Whitaker és mtsai, 2007) heteromerek kialakulását is dokumentálták. A Kv-csatornáknál leírtakhoz hasonlóan a heterotetramerizáció során kialakuló csatornák új, a homotetramer csatornákétól eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek.

Egyes eredmények azt mutatják, hogy a HCN-alegységek is kapcsolódhatnak egy kiegészítő alegységgel (KCNE2, Yu és mtsai, 2001), ami ugyancsak módosíthatja a csatornák elektromos tulajdonságait.

A h-áram idegrendszeri és szívfunkciókra gyakorolt patofiziológiás hatásairól jelenleg kevés adat áll rendelkezésre. Megemlítendő, hogy HCN1 knock-out egerek nehezebben tanulnak meg motoros feladatokat (Nolan és mtsai, 2003), a HCN2 knock-out állatok pedig absence epilepsziában (Ludwig és mtsai, 2003), és sinusarrhythmiában szenvednek. Míg a fentebb említett mutációval rendelkező állatok életképesek és szaporodnak, addig a HCN4 knock-out embriók 10-11,5 napos korukban elpusztulnak (Stieber és mtsai, 2003).

Az  $I_h$  jelenlétét a hallórendszer kezdeti szakaszának több pontján is kimutatták, így az SGC-ken (Chen, 1997), a nucleus cochlearis (Lao és mtsai, 2006; Cuttle és mtsai, 2001) és az MNTB (Banks és mtsai, 1993) neuronjain.



## A munka célkitűzései

A hallópálya kezdeti szakaszának neuronjaiban igen nagy jelentőséggel bírnak a különböző feszültségvezérelt  $K^+$ -áramok.

1. A nucleus cochlearison végzett kísérleteink során vizsgáltuk:

1.a. Egyes Kv-alegységek jelenlétét és megoszlását a nucleus cochlearison belül.

1.b. A nucleus cochlearis legjelentősebb projekciós neuronjainak Kv-csatornaalegység mintázatát.

1.c. A nucleus cochlearis jelentősebb projekciós neuronjainak Kv-csatornaalegység mintázatában mutatkozó eltéréseket.

2. A tengerimalac ganglion spiralen végzett kísérletek során célul tűztük ki:

2.a. Egy olyan metodika kidolgozását, amely lehetővé teszi az SGC-k konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatát, és az I-es és II-es típusú SGC-k pontos, megbízható megkülönböztetését.

2.b. Vizsgáltuk továbbá az SGC-k Kv- és HCN-alegység mintázatát.

2.c. Vizsgáltuk, hogy a morfológiai és funkcionális különbségek mellett a Kv- és HCN-csatorna mintázatban is megfigyelhető-e eltérések az I-es és II-es típusú SGC-k között.

2.d. Vizsgáltuk, hogy a HCN-csatornaalegységek expressziós szintje mutat-e változást a cochlea tengelye mentén.

## Anyagok és Módszerek

A kísérletek során használt oldatok

A vegyszereket a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be (a zárójelben feltüntetett számok a koncentrációt jelölik, mmol/l-ben).

alacsony  $\text{Na}^+$ -tartalmú művi cerebrospinalis folyadék (aCSF): szacharóz (220), KCl (2,5), glükóz (10),  $\text{NaHCO}_3$  (26),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1,25),  $\text{CaCl}_2$  (2),  $\text{MgCl}_2$  (2), mio-inozitol (3), aszkorbinsav (0,5), Na-piruvát (2), pH 7,2, ozmolaritás: 320 mOsm

normál aCSF: NaCl (125), KCl (2,5), glükóz (10),  $\text{NaHCO}_3$  (26),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1,25),  $\text{CaCl}_2$  (2),  $\text{MgCl}_2$  (2), mio-inozitol (3), aszkorbinsav (0,5), Na-piruvát (2), pH 7,2, ozmolaritás: 320 mOsm

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

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

Tween-20 tartalmú foszfát-pufferelt sóoldat (PBST): NaCl (100),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (125), Tween-20 (0,1%), pH: 7,4

Tris-pufferelt sóoldat (TBS): Tris-bázis (42), Trizma-HCl (150), NaCl (150), pH 7,4

Kísérleti állatok

A ganglion spiralen végzett kísérletek során hím, felnőtt, 400-700 g súlyú tengerimalacokat használtunk. A Western-blot kísérleteket 20 tengerimalac ganglion spirálján végeztük, míg a paraffinba ágyazott metszetekhez, illetve a „cochlearis úszószövet” preparátumokon végzett kísérletekhez összesen 69 állat cochleáját használtuk fel.

A nucleus cochlearison végzett kísérleteket vegyes nemű, fiatal (11-17 napos) és idősebb (minimum 25 napos, de általában 1-3 hónapos) Wistar patkányokon végeztük. A vizsgálatokhoz összesen 36 állatot használtunk fel (5 fiatal és 31 idősebb patkányt). A fiatal állatokon kizárólag a Kv1.2-alegység expressziójának életkorfüggését vizsgáltuk.

A kísérleti állatok az Élettani Intézet állatházában természetes nappal-sötétség ciklus mellett éltek. Az állatok táplálék- és ivóvízellátása *ad libitum* biztosítva volt. A kísérletek során mindig törekedtünk arra, hogy az állatoknak a lehető legkisebb diszkomfortot és fájdalmat okozzuk. A kísérleti protokollt jóváhagyta és engedélyezte a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága.

1. Táblázat Tengerimalac ganglion spirale vizsgálatokban alkalmazott elsődleges antitestek

Elsődleges antitest	Milyen fajból	Hígítás (Úszószelet)	Hígítás (Paraffinba ágyazott)	Gyártó
NSE	Egér	1:150	–	<sup>1</sup> DAKO
H C N 1	Kecske	1:50	1:50	<sup>2</sup> Santa-Cruz
H C N 2	Nyúl	1:100	1:100	<sup>3</sup> Alomone
H C N 3	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
H C N 4	Kecske	1:50	1:50	Santa-Cruz
K v 1.1	Nyúl	1:100	–	Alomone
K v 1.2	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 1.4	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 1.6	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 3.1b	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 3.2	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 3.4	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 4.2	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 4.3	Nyúl	1:100	1:100	Alomone
K v 4.3	Nyúl	1:100	1:100	<sup>4</sup> Sigma-Aldrich

<sup>1</sup>DAKO, Glostrup, Denmark

<sup>2</sup>Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

<sup>3</sup>Alomone Labs, Jerusalem, Israel

<sup>4</sup>Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA

A ganglion spirale preparálása tengerimalacból

A ganglion spirale izolálását egy korábban már leírt protokoll alapján végeztük (Szabó és mtsai, 2003). Röviden összefoglalva, a kísérlet napján az állatokat pentobarbitállal (35 mg/kg, i.p.) elaltattuk, majd dekapitáltuk. A sziklacsontokat eltávolítottuk, majd egy fogászati fúróval felnyitottuk őket, láthatóvá téve a cochleát. Az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt izolált modiolusokat 4%-os pufferelt formaldehid oldatban fixáltuk. A

cochlearis úszószelet preparátumok esetén a fixálási idő 2 óra, míg a hagyományos beágyazott minták esetében 24 óra volt.

Fluoreszcens immunhisztokémia cochlearis úszószelet preparátumon

A fluoreszcens immunjelöléseket egy általunk kidolgozott új preparátumon, a „cochlearis úszószeleteken” végeztük, amely a korábban alkalmazott eljárásokhoz képest jobban megőrizte a sejtek morfológiáját. További előnye ezen technikának, hogy a fluoreszcens immunjelölés lehetővé tette konfokális mikroszkóp használatát, ezáltal az egyes sejtek háromdimenziós vizsgálatát, megkönnyítve az I-es és II-es típusú SGC-k megkülönböztetését.

A „cochlearis úszószelet” preparátumokon minden esetben kettős immunjelölést végeztünk: a vizsgált csatornaalegységek illetve S-100 protein vizsgálata mellett minden esetben végeztünk neuronspecifikus enoláz- (NSE) specifikus immunfestést is. Az S-100 protein egy  $Ca^{2+}$ -kötő fehérje, amely az I-es típusú SGC-k myelinhüveljét alkotó Schwann-sejtekben expresszálódik.

2. Táblázat Fluoreszcens kísérletek során használt másodlagos antitestek

Másodlagos antitest	Milyen állatból	Kapcsolt fluorokróm	Hígítás	Gerjesztő lézer	Fényszűrő	Gyártó
anti-Egér	Ló	Texas Red	1:1 000	543 nm He/Ne	LP 560	<sup>1</sup> Vector
anti-Nyúl	Kecske	FITC	1:1 000	488 nm Ar	BP 505-530	Vector
anti-Nyúl	Kecske	Texas Red	1:1 000	543 nm He/Ne	LP 560	Vector
anti-Kecske	Nyúl	FITC	1:1 000	488 nm Ar	BP 505-530	Vector

<sup>1</sup>Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA,

Az immunreakciók során a formalinban fixált modiolusokat finom csipesszel megroppantottuk, hogy a mélyebben fekvő szöveteket is megfelelően átjárják az alkalmazott oldatok, majd a preparátumokat először PB-ben (10 perc), majd TBS-ben (3×10 perc) mostuk. A permeabilizálást és az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 10% sertésszérumot és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó TBS-sel végeztük (60 perc), amit az elsődleges antitestekkel történő inkubáció követett (egy éjszakán át, 4 °C, 1. Táblázat). Az elsődleges antitest alkalmazása után a mintákat mostuk (TBS, 3×10 perc), majd a megfelelő, fluorokrómmal konjugált másodlagos antitestek alkalmazására került sor (3 óra, szobahő, 2. Táblázat), amit újabb mosás követett (TBS, 3×10 perc). Az elsődleges és a másodlagos antitesteket 1% sertésszérum és 0,1% Triton X-100 tartalmú TBS-ben hígítottuk. A protokoll végén a

modiolushoz tapadó csontszilánkokat sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk, a mintákat pedig fedőlemezre helyeztük és 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) tartalmazó (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) médiummal fedtük. A fedés során enyhe nyomással biztosítottuk a sejtek egyenletes eloszlását a tárgylemezen.

### 3. Táblázat Antigén feltárási módszerek

Antigén	Alkalmazott antigénfeltárási technika
Kv3.1b	11 mM citrát-puffer (pH 6,0), 2 perc kuktában
HCN1, HCN4	11 mM citrát-puffer (pH 6,0), 10 perc mikrohullámú sütőben (750 W)
HCN3	8 mM Tris-puffer (pH 8,4), 15 perc mikrohullámú sütőben (750 W)

Immunhisztokémia paraffinba ágyazott mintákon

A formalinban fixált modiolusokat Biodec R-rel dekalcináltuk (8 óra, szobahő, Bio-Optica, Milan, Italy), paraffinba ágyasztuk, majd hagyományos szövet metszeteket készítettünk belőlük. Bár törekedtünk a 4 µm-es szeletvastagságra, a csontszövet jelenléte miatt a szeletek tényleges vastagsága általában meghaladta ezt az értéket.

Bár az antitestek zöménél a dekalcinálási folyamat már önmagában is elégséges antigénfeltárásnak bizonyult, egyes antitestek esetében szükség volt további antigénfeltárást végezni az immunreakció erősségének fokozására (3. Táblázat).

A mennyiben az elsődleges antitestet nyúlban temeltették (1. Táblázat, az összes Kv-ellenes antitest, anti-HCN2, anti-HCN3), a minták endogén peroxidáz aktivitását 3%-os hidrogén-peroxid oldattal gátoltuk (10 perc, szobahő), majd mosás után (PBS, 3×5 perc) az aspecifikus kötőhelyeket „Protein block serum free” reagenssel blokkoltuk (10 perc, szobahő; DAKO, Glostrup, Denmark). Ezt követően a mintákat „Antibody diluent with background reducing agents” reagensben (DAKO) hígított elsődleges antitesttel inkubáltuk (4 °C, egy éjszakán át). A kísérlet második napján a metszeteket mostuk (PBS, 3×5 perc), majd az En Vision rendszerrel (DAKO) inkubáltuk, végül az immunreakciót VIP SK 4600 (Vector) vagy DAB reagens (DAKO) segítségével tettük láthatóvá. Az immunfestés végén enyhe háttérfestést végeztünk (metilzöld, Vector).

A mennyiben az elsődleges antitest kecskében volt termeltetve (HCN1, HCN4), tormaperoxidáz- és alkalikus-foszfataz alapú reakciókat is alkalmaztunk (mindkét módszerrel azonos eredményeket kaptunk). Amikor az alkalikus-foszfataz alapú technikát alkalmaztuk, az antigénfeltárást követően a metszeteket Tris-pufferben mostuk (3×5 perc). Az aspecifikus kötőhelyeket 10 % lószérumot tartalmazó TB-pufferrel blokkoltuk (30 perc, szobahő), majd a

mintákat egy éjszakán át inkubáltuk (4 °C) a primer antitesttel. A kísérlet második napján a metszeteket mostuk (TB, 3×5 perc), majd a biotinilált másodlagos antitesttel inkubáltuk őket (1h, szobahő, 4. Táblázat). Az újabb mosást követően (TB, 3×5 perc) a mintákat alkalikus-foszfátazzal konjugált streptavidinnel inkubáltuk (30 perc, szobahő). Az elsődleges és másodlagos antitesteket, valamint az alkalikus-foszfátazzal konjugált streptavidint 1% lószérumot tartalmazó TB pufferben hígítottuk. A protokoll végén a metszeteket mostuk (TB, 3×5 perc), az immunreakciót pedig fukszinnal (DAKO) hívtuk elő. Amennyiben a szöveteken tormaperoxidáz alapú immunfestést végeztünk, az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os hidrogén-peroxid oldattal gátoltuk (10 perc, szobahő), majd a PBS-es mosást követően (3×5 perc) a metszeteket lószérummal inkubáltuk (10 perc, szobahő) az aspecifikus kötőhelyek blokkolása érdekében. Ezt követően a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel (4 °C, 1,5% lószérumot tartalmazó PBS-ben hígítva), az immunreakciót pedig Vectastain kit (Vector) segítségével, DAB alkalmazásával tettük láthatóvá. Egyes esetekben enyhe háttérfestést is végeztünk (metilzöld).

#### 4. Táblázat Paraffinba ágyazott metszeteken alkalmazott immunrendszerek

Másodlagos antitest	Milyen állatból	Kapcsolt enzim	Hígítás	Gyártó
anti-Nyúl Envision	Kecske	Tormaperoxidáz	"ready-to-use"	DAKO
anti-Kecske	Ló	Biotinilált	1:400	Vector
Pán-specifikus	Ló	Biotinilált	"ready-to-use"	Vector
Streptavidin	-	Alkalikus foszfátáz	1:150	Vector
Streptavidin	-	Tormaperoxidáz	"ready-to-use"	Vector

Mind a fluoreszcens, mind pedig a paraffinba ágyazott metszeteken végzett immunhisztokémiai vizsgálatok során rendszeresen végeztünk kontroll kísérleteket is, melyek során vagy elhagytuk az elsődleges antitestet, vagy azt előinkubáltuk a specifikus immunizáló fehérjéjével. Ezen kísérletek során érdemi immunpozitivitást nem tapasztaltunk.

#### Mikroszkópia

A disszertációban részletezett kísérletek eredményeinek mikroszkópiás vizsgálatához vagy egy Nikon Eclipse 600W típusú konvencionális, fluoreszcens mikroszkópiára is alkalmas, 4×, 10×, 20×, 40× és 60× objektívval felszerelt (az első négy egyszerű „levegős”, az utolsó olajimmerziós) mikroszkóppal (Nikon, Tokió, Japán), vagy egy Zeiss LSM 510

konfokális mikroszkóppal végeztük (Oberkochen, Németország). Konfokális mikroszkópia esetén a disszertációban bemutatott képeket 10×, 20× „levegős”, vagy 40× olajimmerziós vagy 60× víziimmerziós objektívvel készítettük.

Egyszerű fluoreszcens vagy fénymikroszkópia esetében a felvételeket a mikroszkóphoz csatolt „RT colour CCD kamera” és a Spot v3.5 program segítségével nyertük. A kalibrálást minden objektíven külön, Bürker-kamra segítségével végeztük.

A konfokális mikroszkópia során a másodlagos antitestekhez kapcsolt különböző festékeknél alkalmazott gerjesztő lézereket és szűrőket a 2. Táblázatban foglaltuk össze. A kísérletek során vagy egyetlen, 1,0  $\mu\text{m}$  rétegvastagságú képet vettünk fel, vagy a vizsgált terület teljes vastagságán végighaladó (nucleus cochlearis esetében egyenként 0,8-2,0  $\mu\text{m}$ , „cochlearis úszószelet” preparátumoknál 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  vastagságú) rétegfelvétel-sorozatot („Z-stack” képek) készítettünk

A disszertációban bemutatott ábrákat az Adobe Photoshop 7.0 program felhasználásával készítettük.

#### Az SGC-k kvantitatív analízise

Az SGC-k morfológiai karakterizálását célzó kvantitatív analízist „cochlearis úszószelet” preparátumokon végzett NSE-specifikus immunfestésekről készített „Z-stack” képsorozatok segítségével végeztük. Ehhez négy tengerimalac modiolusáról négy képsorozatot vettünk fel. A „Z-stack” képsorozatok használata különösen előnyösnek bizonyult, mivel így megkereshettük a neuronok azon keresztmetszeti képét, ahol a legnagyobb volt az átmérőjük. Ezen keresztmetszeti kép kiválasztása után a sejt körvonalának két legtávolabbi pontját összekötve a Zeiss LSM Image Browser program segítségével megmértük a neuron átmérőjét. Ugyanezen programmal határoztuk meg a sejt legnagyobb kerületét és keresztmetszeti területét is, melyeket a sejt körülrajzolása után a program közvetlenül kiszámolt. Valamennyi a látóterekben teljes egészében látható sejt esetében megkerestük a legnagyobb átmérőhöz tartozó keresztmetszeti képet, majd meghatároztuk a fentebb leírt adatokat. A kiválasztott látóterek száz, morfológiai analízisre alkalmas nagy sejtet tartalmaztak.

Ugyanezen látóterekben vizsgáltuk a kis sejteket is, melyek jellegzetessége, hogy sejttestük átmérője jelentősen kisebb a szomszédos nagy sejtékénél, továbbá kerekdedebbek, és a sejtmagot körülvevő citoplazmatikus gyűrű is vékonyabb, mint a nagy sejtek esetében. Ezen kritériumoknak összesen 11 neuron felelt meg a vizsgált látóterekben.

A legnagyobb átmérő, keresztmetszeti terület és kerület mellett a sejtek alakjának jellemzésére bevezettük az „elongációs faktort” (EF). Ezen paraméter kiszámításához meghatároztuk a legnagyobb átmérőhöz tartozó kör területét, majd ezt az értéket elosztottuk a neuron keresztmetszeti területével. Az EF értéke egy tökéletesen gömb alakú sejt esetében 1 lenne, ugyanakkor minél elnyújtottabb a sejtalak, annál magasabb EF érték rendelhető hozzá.

Paraffinba ágyazott metszeteken is végeztünk morfometriás analízist haematoxylin-eosin festést követően (az erre a célra felhasznált metszetek összesen 10 modiolusból készültek). Ezen vizsgálatokhoz 60× olajimmerziós objektívvel (numerikus apertúra: 1,4) készített képeket használtunk. Az analízis során csak azokat a sejteket vizsgáltuk, amelyeknek jól látható volt a sejtmagjuk, így valószínűleg a legnagyobb (vagy ahhoz közeli) keresztmetszeti síkjuk esett a metszetbe. A kis sejt kritériumai ezen preparátumok esetében a jól látható sejtmag, és a látótér többi sejtjénél jelentősen kisebb sejtest volt. Az egyes sejtek paramétereit a konfokális képeknél leírtakhoz hasonlóan, a Spot RT v3.5 program segítségével határoztuk meg. A morfometriás méréseket megelőzően a rendszert minden esetben kalibráltuk egy Bürker-kamra segítségével.

A morfometriás paramétereket mind a nagy, mind pedig a kis sejtek esetében összegeztük (külön a fluoreszcens és a nem-fluoreszcens képek eredményeit), a kapott értékeket átlag  $\pm$  S.D. formában adtuk meg. A statisztikai szignifikancia számítását a Student-féle t-teszt alapján végeztük.

#### Western-blot

Az anti-HCN antitestek tengerimalacon történő validálásához 8, míg az egyes csatornaegységek esetleges apiko-bazális grádiensének vizsgálatához további 32 modiolust használtunk fel. A gradiens vizsgálatok során az egyes modiolusokat harmadokra vágtuk (apikális, intermedier és bazális harmadokra), és a megfelelő, jéghideg RIPA puffert tartalmazó csövekben gyűjtöttük össze őket. A mintákat ezt követően összezúztuk, szonikáltuk, majd a sejtörmelék eltávolítása céljából 15 percig  $14\ 000 \times g$ -n centrifugáltuk ( $4\ ^\circ\text{C}$ ). A felülúszót egy új csőbe pipettáztuk, majd meghatároztuk a fehérjekoncentrációt (BCA-kit, Pierce, Rockford, IL, USA).

A következő lépésben a sejtizátumokat SDS mintapufferrel kevertük és 10 percig főztük. SDS-PAGE-et követően (10 %-os akrilamid-gél, 50  $\mu\text{g}$  fehérje / sáv) a fehérjéket nedves transzferrel nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat 5 %-os sovány tejporos PBS-ben blokkoltuk (60 perc, szobahőn), majd a primer antitestekkel (anti-HCN1, anti-HCN2 és anti-HCN4 - 1:100, anti-HCN3 - 1:400; 5 %-os sovány tejporos PBST-ben



hígítva) egy éjszakán át inkubáltuk (4 °C). Másnap a mosást követően (PBST 3 × 15 perc) a membránokat 1 órán át inkubáltuk szobahőn a tormaperoxidázzal kapcsolt nyúl- (1:5 000, Amersham, Little Chalfont, England) vagy kecskespecifikus (1:4 000, Sigma) másodlagos antitesttel. Újabb mosást követően (3 × 15 perc PBST, 1 × 15 perc PBS) az immunkomplexeket ECL (enhanced chemiluminescence, Pierce) módszerrel tettük láthatóvá, a detektálást pedig BioMax light röntgenfilm (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA), vagy a LAS-3000 Intelligent Dark Box rendszer (Fuji, Tokyo, Japan) segítségével végeztük. Az immunjelölés specificitásának ellenőrzése céljából valamennyi antitesttel végeztünk preadszorpciós kontroll vizsgálatokat, ezen esetekben immunreaktív sávok nem jelentek meg.

Az immunblot eredményeket denzitometriás analízisnek is alávetettük (Image Pro Plus 4.5.0 program segítségével). Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyenlően történt-e, a nitrocellulóz membránokat 35 percig inkubáltuk 60 °C-on 200 ml 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,5; 2% SDS, 1% β-merkaptóetanol), majd a membránokon újabb immunjelölést végeztünk, ezúttal kecskében temeltetett aktin-specifikus antitesttel (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). A jelek elemzése a fentebb leírtakkal megegyező módon történt. A HCN-specifikus jelölések eredményeit minden esetben az aktin-specifikus immunfestéshez viszonyítva adtuk meg. A modiolusok apikális és intermedier szegmenseinek relatív denzitását a bázis denzitására normalizáltuk. Minden HCN-csatornaalegység esetében 3-4 egymástól független immunblot kísérletet végeztünk, az egyes mérések normalizált relatív denzitási adatait összesítettük, az eredményeket pedig átlag ± S.E.M. formában adtuk meg. A statisztikai szignifikancia megállapításához a Student-féle t-tesztet használtuk, a szignifikancia szintje  $p < 0,05$  volt.

Fluoreszcens immunhisztokémia patkány nucleus cochlearis úszószelet preparátumon

A preparálás menete lényegében egy korábban már leírt módszer (Pál és mtsai, 2005; Pór és mtsai, 2005) szerint történt. A preparálás minden lépését jéghideg alacsony  $\text{Na}^+$ -tartalmú művi cerebrospinalis folyadékban (aCSF) végeztük. Az állat dekapitálása után az agyat gyorsan eltávolítottuk, leválasztottuk az agytörzset, amit 4%-os formalinban fixáltunk (4 óra, 4 °C), majd a szövetarabokat PB-ben mostuk (3 × 10 min). A fixálási periódus végétével a nucleus cochlearisból vibráló mikrotóm segítségével 50- 60 μm vastag szeleteket készítettünk. A szeleteket először PB-ben (10 perc), majd TBS-ben (3 × 10 min) mostuk.

5. Táblázat Patkány nucleus cochlearis úszószelet vizsgálatokban alkalmazott elsődleges antitestek

Elsődleges antitest	Milyen fajból	Hígítás (Úszószelet)	Gyártó
Kv1.1	Nyúl	1:100	Alomone
Kv1.2	Nyúl	1:100	Alomone
Kv1.6	Nyúl	1:100	Alomone
Kv3.1b	Nyúl	1:100	Alomone
Kv3.1b	Nyúl	1:200	Sigma-Aldrich
Kv3.4	Nyúl	1:100	Alomone
Kv3.4	Nyúl	1:200	Sigma-Aldrich
Kv4.2	Nyúl	1:100	Alomone
Kv4.2	Nyúl	1:200	Sigma-Aldrich
Kv4.3	Nyúl	1:100	Alomone
Kv4.3	Nyúl	1:200	Sigma-Aldrich
GFAP	Kecske	1:1 000	Santa-Cruz
synaptophysin	Egér	1:2 000	BioGenex <sup>1</sup>

Az anti-synaptophysin antitest monoklonális, az összes többi antitest pedig poliklonális volt.

<sup>1</sup>BioGenex, San Ramon, California, USA;

Az úszószeleteken végzett immunfestéseket egy korábban leírt protokoll szerint végeztük (Pocsai és mtsai, 2007). A kísérletek során egyszeres vagy kétszeres immunjelölést alkalmaztunk, az utóbbi esetekben az adott Kv-specifikus reakció mellett GFAP- vagy synaptophysin-specifikus jelölést is végeztünk. Ezen utóbbi technika alkalmazásának két célja volt: egyrészt mivel a synaptophysin a preszinaptikus vezikulamembrán elfogadott markere, segítségével láthatóvá tehattük az egyes sejtekkel kapcsolatban lévő szinaptikus végződéseket, és ezáltal jól kivehetően kirajzolódtak egyes neuronok (pl. bushy-sejtek) körvonalai, megkönnyítve a sejtek pontos azonosítását. Ezen túlmenően a Kv- és synaptophysin-specifikus immunjelölés együttes alkalmazása az egyes Kv-alegységek preszinaptikus jelenlétének vizsgálatát is lehetővé tette.

A szövetminták blokkolását és permeabilizálását minden esetben 0,1% Triton X-100-at és 10% ló- vagy kecskeszérumot tartalmazó TBS-pufferrel végeztük (1 óra, 4 °C). Ezt követte az elsődleges antitesttel történő inkubálás (egy éjszakán át szobahőn, vagy 48 óra 4 °C-on, az antitesteket 0,1% Triton X-100-at és 1% ló- vagy kecskeszérumot tartalmazó TBS-ben hígítottuk). Mosás (TBS, 3 × 10 min) után a mintákat a megfelelő fluorokrómmal

kapcsolt másodlagos antitestekkel inkubáltuk (3 óra szobahőn, vagy 24 óra 4 °C-on, az antitesteket 0,1% Triton X-100-at és 1% ló- vagy kecskeszérumot tartalmazó TBS-ben hígítottuk), majd az újabb mosás (TBS, 3 × 10 min) után a szeleteket fedőlemezre helyeztük és lefedtük (DAPI-t tartalmazó Vectashield fedőmédiával). A DAPI szerepe a sejtmagok specifikus jelölése volt, ami segítséget nyújtott az egyes struktúrák (sejtestek vagy a nucleus egyes részeinek, mint pl. a szemcsesejtes réteg) pontos morfológiai azonosításában.

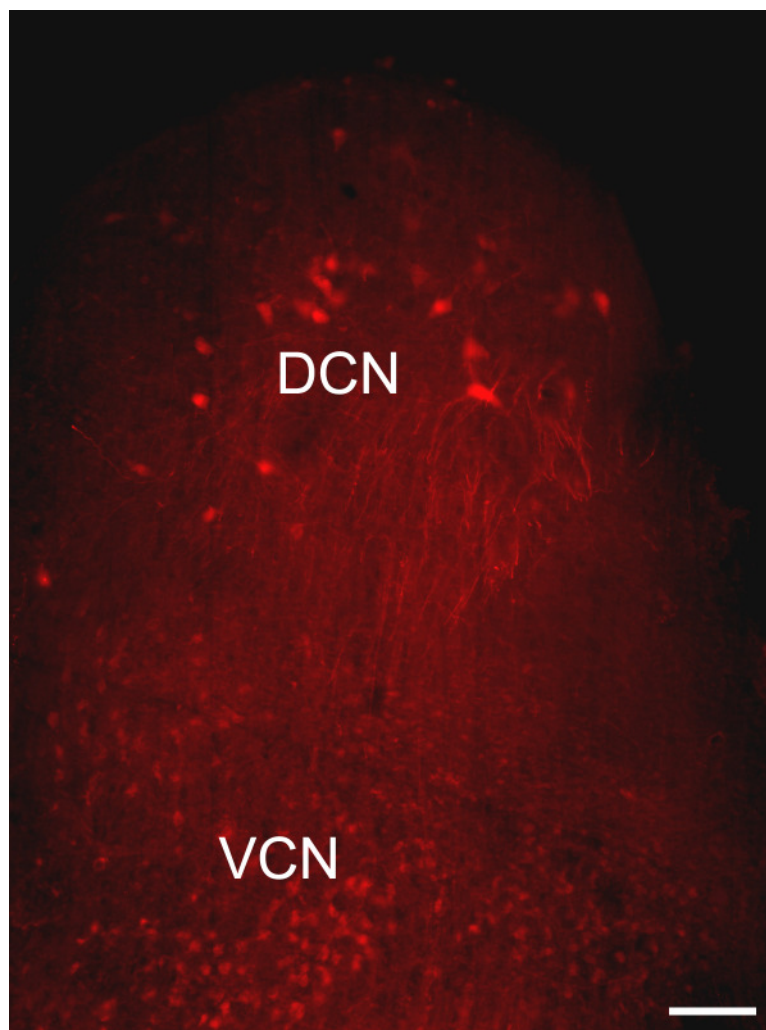
A kettősjelölések esetében a blokkolást 0,1% Triton X-100-at és 10% szarvasmarhaszérumot tartalmazó TBS-pufferrel végeztük (1 óra, 4 °C), majd a megfelelő Kv-specifikus antitesttel és a másik antitesttel (anti-GFAP vagy anti-synaptophysin) egyidejűleg inkubáltuk a szövetmintákat. Mind az elsődleges, mind pedig a másodlagos antitesteket 0,1% Triton X-100-at és 1% szarvasmarhaszérumot tartalmazó TBS-ben hígítottuk. Az immunfestés következő lépései megegyeznek a fentebb leírtakkal.

#### Retrográd jelölés

6 állaton végeztük el a nucleus cochlearis egyes projekciós neuronjainak retrográd jelölését, egy korábban leírt módszer szerint (Pocsai és mtsai, 2007). Ezen kísérletek során a DCN összes, colliculus inferiorba projiciáló neuronját meg kívántuk jelölni, ezért a tetrametilrodamin-dextrán kristályokat az agytörzs ventrális felszínén ejtett sagittális bemetszésbe töltöttük. A retrográd jelölőanyag fakulását megelőzendő, a teljes kísérletet egy sötétszobában végeztük.

A rodamin alkalmazását követően az agytörzset azonnal normál aCSF-be helyeztük, melybe folyamatosan karbogént vezettünk (8-12 órán keresztül). Az inkubálás végén a preparátumot 4% formaldehid oldatban fixáltuk (12 óra, 4 °C), majd 50- 60 μm vastag szeleteket készítettünk, amelyeken utána immunjelölést végeztünk a fentebb leírt protokoll szerint. Egy ilyen, rodaminnal töltött neuronokat tartalmazó nucleus cochlearis úszószeletről készített felvétel látható a 7. ábrán.

Az ily módon készített szeletek lehetővé tették a piramis- és óriássejtek eloszlásának és morfológiájának pontos meghatározását, továbbá a rodaminos töltés és az immunhisztokémia együttes alkalmazása megkönnyítette a rodaminnal jelölt neuronok Kv-alegységmintázatának meghatározását.



7. ábra Rodaminnal töltött nucleus cochlearis neuronok  
A nucleus cochlearis dorsalis projekciós neuronjainak jelölése során a rodaminkristályokat az agytörzs ventralis felszínén ejtett bemetszésbe helyeztük. A felvételt hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. DCN: nucleus cochlearis dorsalis, VCN: nucleus cochlearis ventralis Kalibráció: 100  $\mu\text{m}$ .

#### Sejtazonosítás

Mivel a különböző Kv-alegységek expresszióját a sejteknek egy morfológiailag és funkcionálisan heterogén csoportján vizsgáltuk, egy olyan azonosítási protokollra volt szükség, ami biztosította az egyes idegsejt típusok megbízható és korrekt meghatározását. A szemcsesejtek könnyen felismerhetőek voltak, mivel ők a nucleus cochlearis legkisebb és legnagyobb számban előforduló neuronjai. Kis méretű (5–8  $\mu\text{m}$ ), általában gömbölyű sejttestük, vékony, gyakran ketté- vagy többfelé ágazódó nyúlványaik és jellegzetes elhelyezkedésük (vagy a nucleus cochlearis legfelszínebb rétegeiben, vagy a nucleus cochlearis ventralis és dorsalis részét elválasztó övszerű területen található) alapján egyértelműen azonosítani lehetett őket.

A bushy-sejtek a VCN-ben, az acusticus ideg belépési pontjának közelében voltak megtalálhatók, ahol gyakran oszlopokat vagy kisebb csoportokat alkottak. Bár a VCN-ben vannak multipoláris sejtek is, ezek az említett területtől távolabb helyezkednek el, így nem valószínű, hogy tévesen bushy-sejtekként azonosítottuk őket. A synaptophysin jelölés további segítséget nyújtott a bushy-sejtek azonosításában, mivel gömbölyű vagy enyhén elnyújtott sejttestüket jól kivehetően kirajzolták a synaptophysin-pozitív idegvégződések. A konfokális analízis során valamennyi bushy-sejtként azonosított neuron térbeli képét alaposan megvizsgáltuk, hogy az adott neuron sejttestéből biztosan csak egy nyúlvány eredt-e.

Az octopus-sejteket a pVCN DCN-hez közeli területein kerestük. Ezen neuronok általában csoportosan helyezkedtek el, és az egyes idegsejtek valamelyest elnyújtott sejttestéből számos nyúlvány indult ki, általában egyazon irányban. Az octopus-sejtek azonosítását is megkönnyítette a synaptophysin-specifikus immunfestés, mivel a sejttestek mellett gyakran a nyúlványok kezdeti, viszonylag vastag része is jól látható volt.

A piramis- és óriássejtek megbízható azonosítása bizonyult a legnehezebb feladatnak. Ezen neuronok esetében a synaptophysin jelölés csak korlátozott mértékű segítséget nyújtott, ugyanis a DCN-ben olyan magas volt a synaptophysin-pozitív végződések sűrűsége, hogy ahelyett, hogy a felvételeken kirajzolták volna az egyes sejtek körvonalát, teljesen kitöltötték a neuronok sejttestei közti teret. Egyes esetekben az óriás- vagy piramis-sejtek synaptophysin-negatív somáját ki lehetett venni a synaptophysin-pozitív DCN-ben. A mennyiben a metszési sík megfelelő volt, elég jól fel lehetett ismerni ezen neuronok sejttestének alakját és méretét, ami időnként elégséges volt a sejt azonosításához is, azonban a helyes azonosítás biztosítása érdekében számos esetben rodaminnal jelöltük őket (a fentebb leírt protokoll szerint).

Az alkalmazott technikától függetlenül, az óriás- és piramis-sejtek megkülönböztetésekor gondosan megvizsgáltuk az egyes neuronok méretét, alakját, a nucleuson belüli helyét és a látható nyúlványok elrendeződését. Az óriássejtek általában a DCN mélyebb rétegeiben vagy a VCN-ben, a VCN/DCN határ közelében fordultak elő, sejttestük sokszög alakú volt és több nyúlvánnyal rendelkeztek. A soma mérete ( $> 25 \mu\text{m}$ ) is segített a helyes azonosításban. A piramis-sejtek ellenben kisebb számban voltak jelen, és nehezebb volt megfigyelni őket. Többségük sejtteste háromszög alakú volt, amelynek legnagyobb átmérője nem haladta meg a  $25 \mu\text{m}$ -t.

Bár a feltételezett óriás- és az ún. commissuralis-sejtek megkülönböztetése érdekében nem tettünk külön lépéseket, a jelen munkában óriásneuronként bemutatott sejtek mérete alapján nem tartjuk valószínűnek, hogy bármelyik is egy tévesen azonosított commissuralis-

sejt lenne. Korábban leírták, hogy a commissuralis inhibitorikus sejtek leggyakoribb formáinak (COM1- és COM3-neuronok) átmérője 18–28  $\mu\text{m}$  (átlag: 23  $\mu\text{m}$ ) és 15–20  $\mu\text{m}$  (átlag: 18  $\mu\text{m}$ ). Bár esetenként megfigyeltek egy „óriás” típusú commissuralis sejtet is (COM2), amelynek átmérője 28–33  $\mu\text{m}$  volt, ezen sejtípus előfordulási valószínűsége rendkívül alacsony (Alibardi 2000; 2006).

A kísérletek során minden esetben gondosan mérlegeltük, hogy a vizsgált sejtek morfológiai tulajdonságai elegendő információt nyújtottak-e azok egyértelmű azonosításához. Azon sejteket, amelyek típusát nem tudtuk megbízhatóan megállapítani, kihagytuk az analízisből. A rodaminnal töltött sejtek esetében az egyik leggyakoribb kizáró ok az volt, hogy nem látszottak a nyúlványok, vagy a sejttest orientációjából adódóan nem lehetett egyértelműen megállapítani a processzusok számát és eredési helyét.

A patkány nucleus cochlearison végzett immunhisztokémiai adatok validálása

A jelen munkában felhasznált valamennyi antitest kereskedelmi forgalomban beszerezhető termék. A poliklonális antitestek esetében az immunizáló peptidekkel végzett előinkubálás valamennyi esetben gyakorlatilag negatív immunreakciót eredményezett. Pozitív kontrollkísérleteket is végeztünk, cerebellumból vagy nucleus cochlearisból készített metszeteken. Az általunk vizsgált Kv-alegységek egy részét már leírták a nucleus cochlearis egyes sejtípusain (mRNS, fehérje vagy funkcionális szinten), így ezek a sejtek alkalmasak voltak pozitív kontrollnak. Azt is érdemes megemlíteni, hogy az itt bemutatott adatokat egy 3 évet felölelő időszak alatt gyűjtöttük össze, és az immunjelölési mintázatok ezen idő alatt konzisztensek és reprodukálhatóak voltak, annak ellenére, hogy természetesen ezen idő alatt az antitestek különböző tételeit használtuk. A validálási folyamat részeként minden antitest specificitását ellenőriztük teljes agyból készített mintákon, Western-blot kísérletekkel is.

Bár a már említett kontrollkísérletek mind azt igazolták, hogy valamennyi antitest a helyes Kv-alegységet ismerte fel, annak lehetőségét is alaposan megvizsgáltuk, hogy nem volt-e keresztreakció az úszószövetben az egyes antitestek és a különböző Kv-alegységek között. Minthogy az egyes antitestek alkalmazásával eltérő jelölési mintázatokot láttunk, úgy véljük, hogy rendkívül valószínűtlen, hogy azok ugyanazon fehérjét ismerték volna fel.

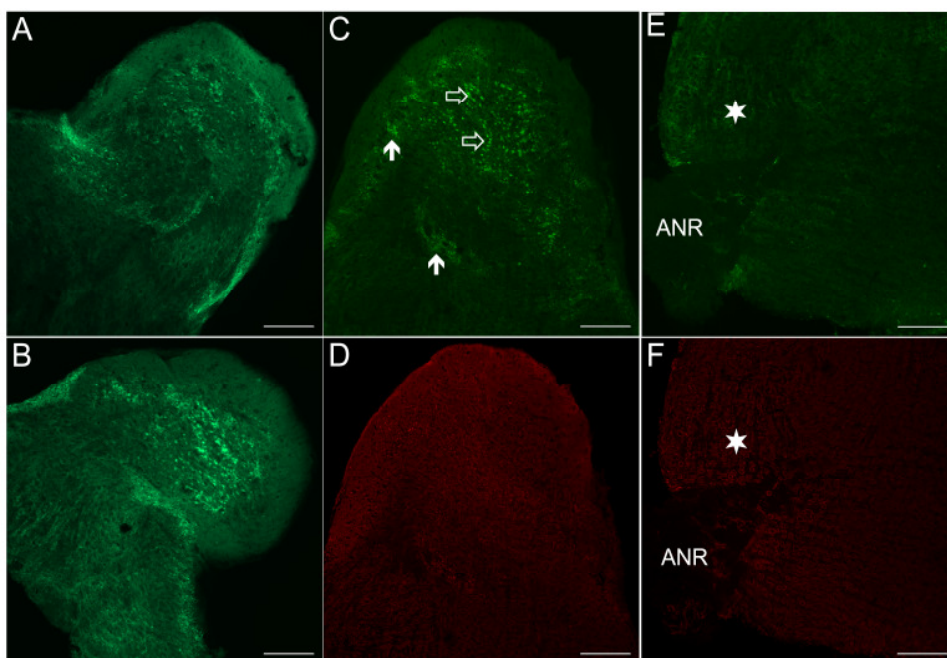
A bemutatott adatok verifikálásának utolsó lépéseként egyes Kv-alegységekre (Kv3.1b, 3.4, 4.2, és 4.3) specifikus antitesteket két különböző gyártótól is beszereztük, és összehasonlítottuk immunpozitivitási mintázataikat. Mivel az adott Kv-alegységre specifikus antitestek epitópjai mindkét gyártó esetében azonosak voltak, ezek a kísérletek nem

tekinthetők ideális kontrolloknak, azonban a többi kontrollkísérlet eredményeivel együtt megfelelően igazolják a bemutatott adatok helyességét.

## Eredmények

### A Kv4.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A Kv4.2-specifikus immunpozitivitás jelenlétének és megoszlásának vizsgálata során két, különböző forrásból származó antitestet használtunk. Ahogy az a 8A és 8B ábrákon látható, a nucleus cochlearisban erős Kv4.2-specifikus immunpozitivitás volt megfigyelhető, amelynek megoszlása a két antitest esetében megegyezett (8A ábra – Alomone-tól vásárolt antitest, 8B ábra – Sigma-tól vásárolt antitest). A 8C-F ábrák a nucleus cochlearis dorsalis (8C és 8D) és ventralis (8E és 8F) részéről készített nagyobb nagyítású képek. A nucleus különböző részeinek könnyebb felismerhetősége érdekében a párhuzamosan végzett synaptophysin-specifikus jelöléseket is feltüntettük (8D és 8F ábrák). Bár mind a DCN-ben, mind pedig a VCN-ben tapasztaltunk Kv4.2-specifikus pozitívítást, a DCN immunjelölődése erősebbnek bizonyult. A DCN-en belül a szemcsesejtes réteg (8C ábra, tömör nyilak) és a DCN egyes mélyebb területei (üres nyilak a 8C ábrán) mutatták a legerősebb immunreakciót.

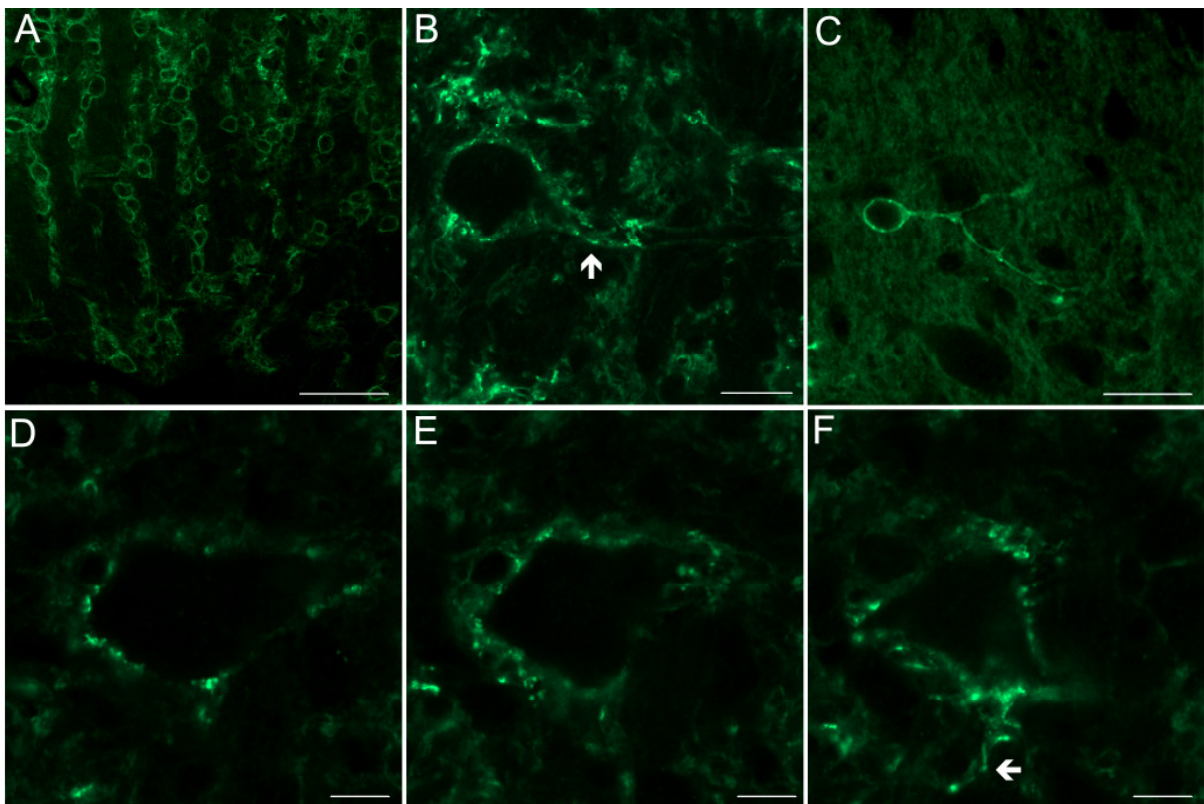


8. ábra A Kv4.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A és B: Az Alomone Labs-tól (A) ill. a Sigma-tól (B) beszerzett primer antitestekkel végzett Kv4.2-specifikus immunfestésekről készített kis nagyítású felvételek. C: A DCN Kv4.2-specifikus immunjelölése. A tömör nyilak a szemcsesejtes régiókra mutatnak, az üres nyilak pedig a DCN mélyebb részeit jelölik. D: A C ábrán látható terület synaptophysin-specifikus jelölése. E: A VCN Kv4.2-specifikus immunjelölése. Csillag jelöli a VCN elülső (anterior) részét, ahol jól láthatók az erősen Kv4.2-pozitív bushy-neuronok sejttesteinek körvonalai. ANR: hallóideg gyök. F: Az E ábrán látható terület synaptophysin-specifikus jelölése. Kalibrációk: 200  $\mu\text{m}$



Az aVCN esetében is erős immunjelölődést tapasztaltunk, ami kirajzolta az egyes sejtek körvonalait (egy ilyen területet a 8E és 8F ábrán csillaggal jelöltünk). Az aVCN-ről készített nagyobb nagyítású képeken (9A ábra) nyakláncszerűen rendeződött, szferikális sejtek voltak megfigyelhetők, amik a VCN globuláris bushy-sejtjeinek feleltek meg. A bushy-neuronok esetében a Kv4.2 jelölődés nem korlátozódott a sejttestre, a nyúlványok felszínén is egyértelműen jelen volt (9B ábra). Minthogy ezen sejtípus Kv4.2 expresszióját korábban már leírták (Pál és mtsai 2005), jelölődésüket jelen kísérletekben pozitív kontrollnak tekintettük. A neuronoknak, a sejt sorok közti területeknek (itt futnak a hallóideg axonjai) és a hallóideggyök belépési pontjának (csillaggal jelölt terület a 8E és 8F ábrákon) immunpozitivitását összehasonlítva látható, hogy a cochlearis axonok Kv4.2 expressziója nem jelentős.

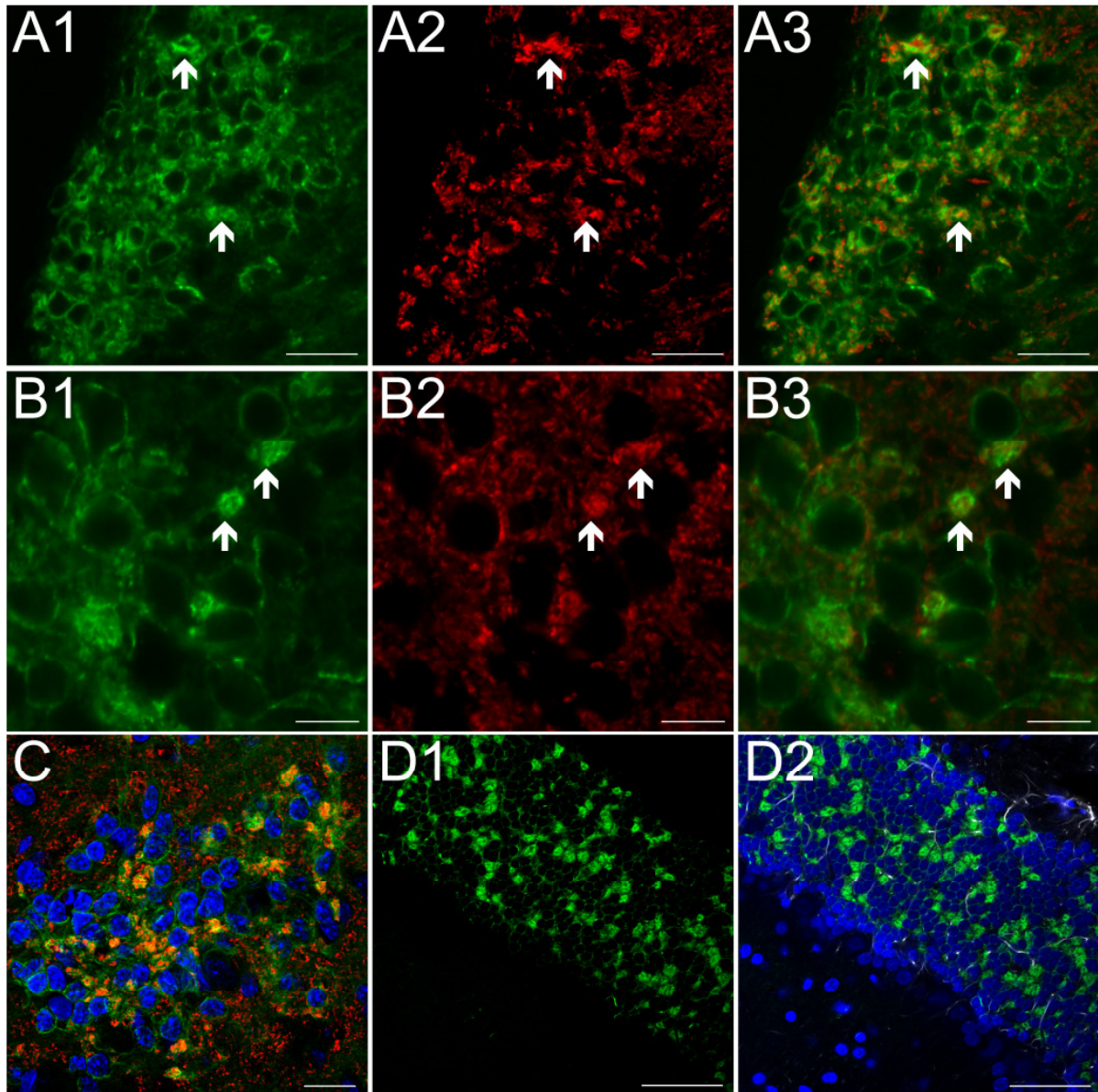


9. ábra A nucleus cochlearis egyes projekciós neuronjainak Kv4.2-immunjelölődése

A: A Kv4.2-negatív hallóidegrostok között elhelyezkedő erősen Kv4.2-pozitív bushy-sejtek oszlopai. B: Egy erősen Kv4.2-pozitív bushy-sejtről készített nagy nagyítású felvétel. A nyíl az egyik nyúlvány kezdeti szakaszát jelöli. C: Egy Kv4.2-pozitív szemcsesejt. D-F: Ugyanazon Kv4.2-pozitív óriássejtről különböző síkokban készített, 1  $\mu$ m vastag optikai szeletek. Az L ábrán a nyíl a sejt egyik nyúlványának kezdeti szakaszát jelzi. Kalibrációk: 100  $\mu$ m (A); 20  $\mu$ m (B-C); 10  $\mu$ m (D-F)

A nagyobb nagyítású képeken látható, hogy a DCN mélyebb rétegeiben található kis neuronok is erősen Kv4.2-pozitívak voltak (erre látható egy példa a 9C ábrán). Az ábrán bemutatott sejt somjának mérete  $6,2 \times 9,9 \mu\text{m}$  volt, amiből egy vékony, kettéágazó nyúlvány indul ki. A processzus a sejttestől távolodva megvastagodott, és gyöngyszerű megjelenés jellemezte. Ezen morfológiai jellemzők alapján a bemutatott (és más hasonló morfológiai jegyeket hordozó neuronokat) cochlearis szemcsesejtként azonosítottuk (Oertel és Wu 1989). Az óriássejtek közül viszonylag kevés mutatott Kv4.2-pozitivitást, egy ilyen sejtről (a sejttest méretei:  $28,2 \times 50,2 \mu\text{m}$ ) készített konfokális rétegfelvételek láthatók a 9D-F ábrákon (a rétegek vastagsága valamennyi esetben  $1 \mu\text{m}$ ). A 9F ábrán a sejt egy Kv4.2-pozitív nyúlványa is megfigyelhető (nyíl).

A 10A1 ábrán a Kv4.2-immunpozitivitás megoszlása látható a nucleus cochlearis szemcsesejtes rétegében, nagy nagyítású felvételen. A Kv4.2-specifikus immunreakció nemcsak a szemcsesejtek somjának felszínén volt megfigyelhető, hanem az egyes neuronok között is láthatóak voltak szferikális, erősen Kv4.2-pozitív képletek, melyek átlagos átmérője  $6,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$  volt (átlag  $\pm$  S.D.; 22 véletlenszerűen kiválasztott struktúra adataiból számítva). Ezen struktúrák pontos azonosítása végett a Kv4.2-specifikus reakcióval párhuzamosan synaptophysin- vagy GFAP-specifikus markereket is használtunk. A 10A1 ábrán bemutatott terület synaptophysin-specifikus jelölésének eredménye a 10A2 ábrán látható, míg a ko-lokalizációs képet a 10A3 ábrán tüntettük fel. Ezen, és az ehhez hasonló kísérletek eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a szemcsesejtes régió erősen Kv4.2-pozitív képletei synaptophysinre is pozitívak voltak (néhány példát nyilakkal jelöltünk), amit a nagyobb nagyítású felvételek (10B1-B3 ábrák, a nyilakkal jelölt területeken különösen szembetűnő a ko-lokalizáció) még inkább alátámasztottak. A Kv4.2- és synaptophysin-pozitív struktúrák a 10C ábrán is jól megfigyelhetők, ahol a DAPI-val jelölt sejtmagvak is láthatók. Az itt leírt példák és további kísérletek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a nucleus cochlearis szemcsesejtes régió Kv4.2-pozitív képleteinek morfológiája a cerebellumban és nucleus cochlearisban már leírt glomeruláris szinapszisokra hasonlít.

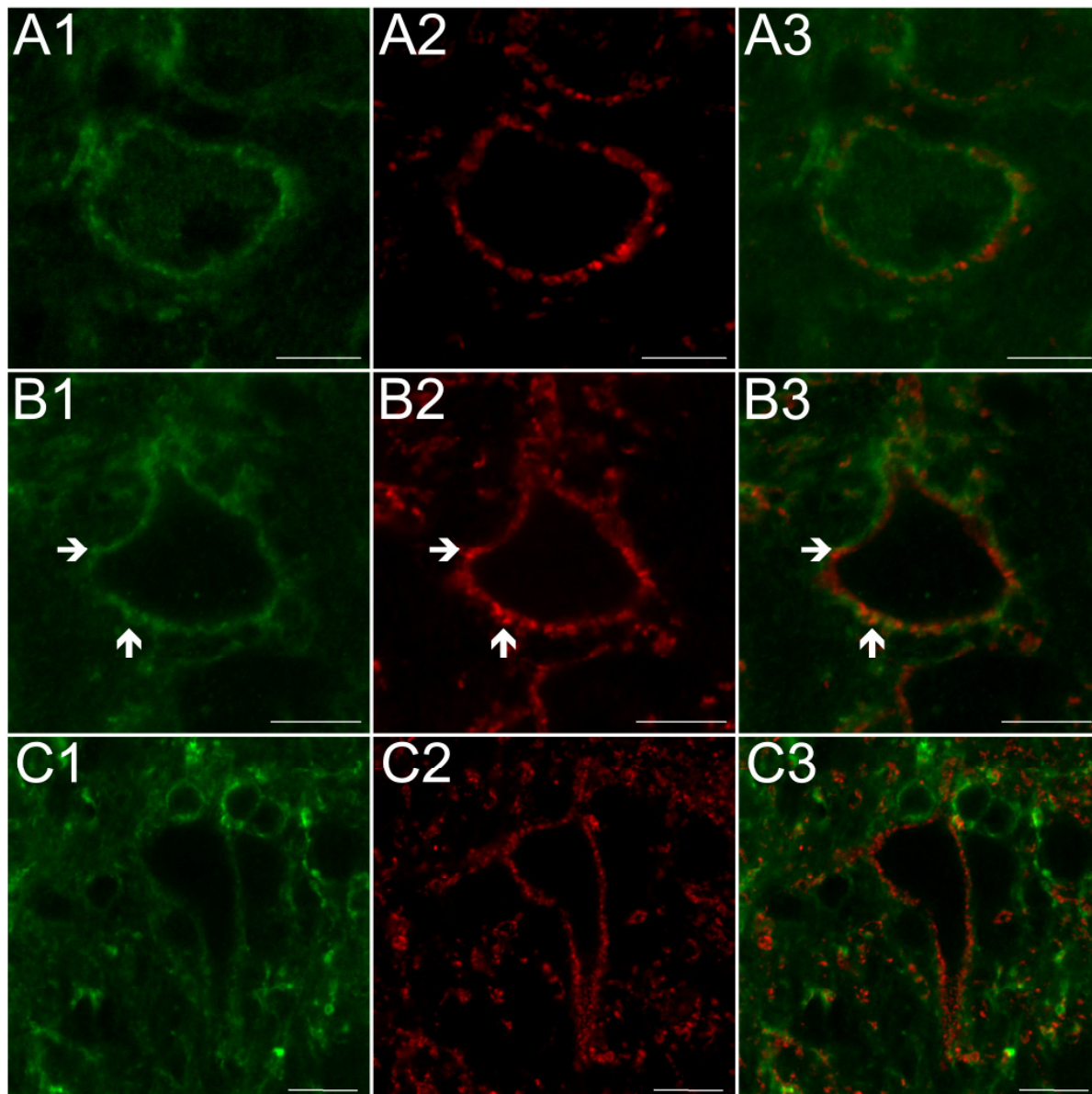


10. ábra A Kv4.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearis szemcsesejtes régiójában

A1–A3: A szemcsesejtes régióról készített nagy nagyítású képek, amelyek a Kv4.2– (A1) és synaptophysin-specifikus (A2) immunpozitivitások megoszlását szemléltetik; feltüntettük továbbá a két immunfestés ko-lokalizációs képét is (A3). A nyilak az egyértelmű ko-lokalizációt mutató területeket jelzik. B1–B3: A szemcsesejtes régióról készített nagyobb nagyítású felvételek, amelyek jól szemléltetik a glomeruláris szinapszisok Kv4.2-pozitivitását. (B1: Kv4.2-specifikus immunjelölés, B2: synaptophysin-specifikus immunjelölés, B3: ko-lokalizációs kép.) A nyilak az egyértelmű ko-lokalizációt mutató területeket jelzik. C: A szemcsesejtes régióról készített ko-lokalizációs kép, amelyen a Kv4.2- (zöld) és synaptophysin-specifikus (piros) immunpozitivitás megoszlása, és a sejmagok (kék) elhelyezkedése látható. D1: A szemcsesejtes réteg és a nucleus cochlearis glomeruláris szinapszisainak Kv4.2-immunpozitivitása. D2: Megegyezik a D1-gyel, de a GFAP-specifikus (fehér) és DAPI jelölés (kék) eredményeit is feltüntettük. Kalibrációk: 50  $\mu\text{m}$  (D1–D3); 20  $\mu\text{m}$  (A1–A3, C); és 10  $\mu\text{m}$  (B1–B3).



A synaptophysin- és Kv4.2-specifikus immunpozitivitásokkal ellentétben a GFAP- és Kv4.2-specifikus kettősjelölések nem mutattak ko-lokalizációt (10D1-D2 ábrák), ami arra utal, hogy a Kv4.2-immunpozitivitás nem áll összefüggésben a gliasejtek jelenlétével és megoszlásával.



11. ábra A Kv4.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearis neuronjaiban

A1-A3: Egy octopus-neuronról készített nagy nagyítású felvételek (A1: Kv4.2-specifikus immunjelölés, A2: synaptophysin-specifikus immunjelölés, A3: ko-lokalizációs kép). B1-B3: Egy másik octopus-sejtről készített felvételek, amelyeken a neuron két nyúlványának kezdeti szakasza is látható. Az ábrák elrendezése megegyezik az A1-A3 ábrákéval. A nyilak egyértelmű Kv4.2 és synaptophysin ko-lokalizációt mutató területeket jelölnek. C1-C3: Egy piramis-sejt Kv4.2- és synaptophysin-specifikus immunjelölődése. Az ábrák elrendezése megegyezik az A1-A3 ábrákéval  
Kalibrációk: 15  $\mu$ m (C1-C3); és 10  $\mu$ m (A1-A3, B1-B3).

A 11A1-B3 ábrák az octopus-sejtes régióról készített nagy nagyítású felvételek, amelyeken két különböző octopus-sejt Kv4.2- és synaptophysin-specifikus immunfestésének eredményei láthatók. A Kv4.2-immunpozitivitás foltos jellegű volt, ami a csatornafehérje aggregációját, csoportokba rendeződését valószínűsíti. Mindezeket túl a Kv4.2-pozitív pontok egy része ko-lokalizációt mutatott a synaptophysin-pozitív szinaptikus végződésekkel (néhány példát nyilakkal jelöltünk), ami felveti a Kv4.2-csatornák preszinaptikus lokalizációjának lehetőségét.

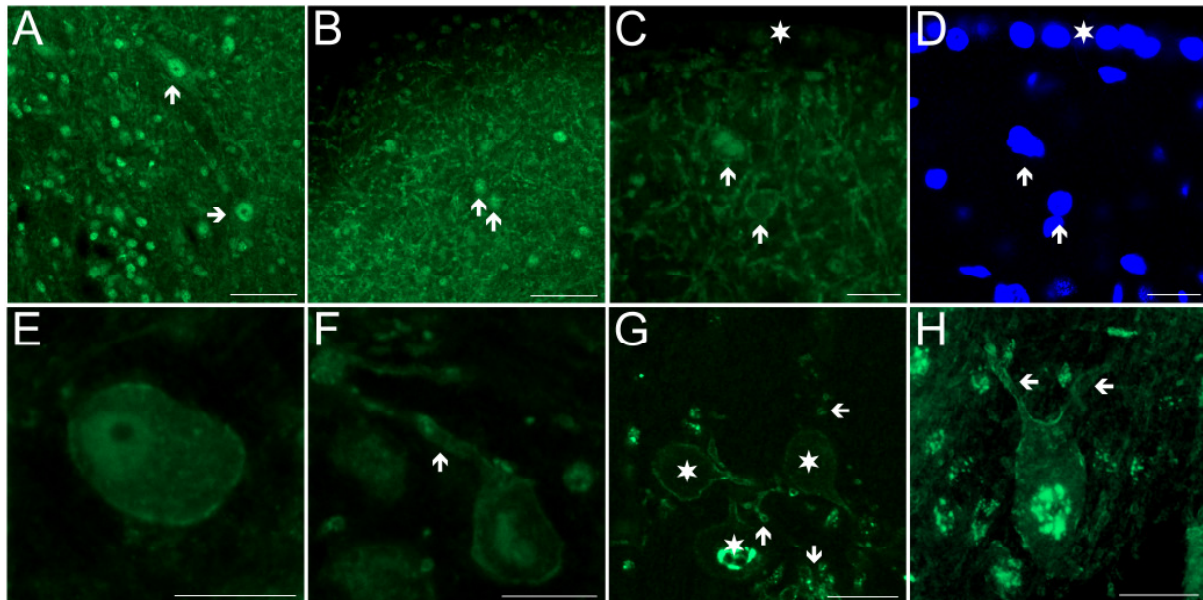
Mint az a 11C1-C3 ábrákon látható, egyes fuziform (piramis)-sejtek is mutattak Kv4.2-immunpozitivitást. Amikor rodaminnal jelölt piramis sejtek Kv4.2 expresszióját vizsgáltuk, a 4 azonosított piramis-sejt közül 3 bizonyult Kv4.2-pozitívnek, míg óriássejtek esetében csupán 1 neuron mutatott Kv4.2-pozitivitást a mindösszesen 5 rodaminnal töltött sejt közül.

A Kv4.3-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

Mind a DCN, mind pedig a VCN mutatott Kv4.3-specifikus immunpozitivitást; a 12A ábra a DCN mélyebb rétegeiben mutatja be a Kv4.3-specifikus immunjelölődés megoszlását. A felvételen jól láthatók az immunpozitív neuropilbe ágyazott neuronok erősen pozitív sejttestei (nyilak). A DCN felső rétegei is egyértelműen Kv4.3-pozitívak voltak, bár az immunjelölés megoszlása eltérő volt (12B ábra), ugyanis ezen a területen a Kv4.3-pozitív nyúlványok hálózatában számos erősen pozitív, kisméretű sejtet lehetett megfigyelni (néhányat nyilakkal jelöltünk). A 12C ábrán az erősen Kv4.3-pozitív sejtek (nyilak) és idegnyúlványok láthatók nagyobb nagyításban. Bár a sejtek pontos típusát ezekben az esetekben nem tudtuk meghatározni, valószínűleg szemcsesejtek vagy a nucleus cochlearis más interneuronjai lehettek. Ezen sejtekkel és a nyúlványokkal ellentétben a DCN felszínét borító ependymaréteg nem mutatott érdemi Kv4.3-immunpozitivitást (ezt a réteget a 12C és 12D ábrákon csillaggal jelöltük).

A nucleus cochlearis projekciós neuronjai közül a bushy-sejtek erős immunpozitivitása mind a sejttest (12E ábra), mind pedig a nyúlványok (nyíllal jelölve a 12F ábrán) esetében egyértelmű volt. A 12G ábrán az aVCN-ről – a hallóideg belépési pontjának környezetéről – készített felvétel látható, ahol jól megfigyelhető három, egy csoportban elhelyezkedő, Kv4.3-pozitív bushy-neuron (csillagokkal jelölve). A sejtmembrán immunjelölődése mind a sejttestek, mind a nyúlványok esetében egyértelmű volt. A sejttestek mellett számos Kv4.3-pozitív nyúlvány keresztmetszete is látható volt (nyilakkal jelölve).

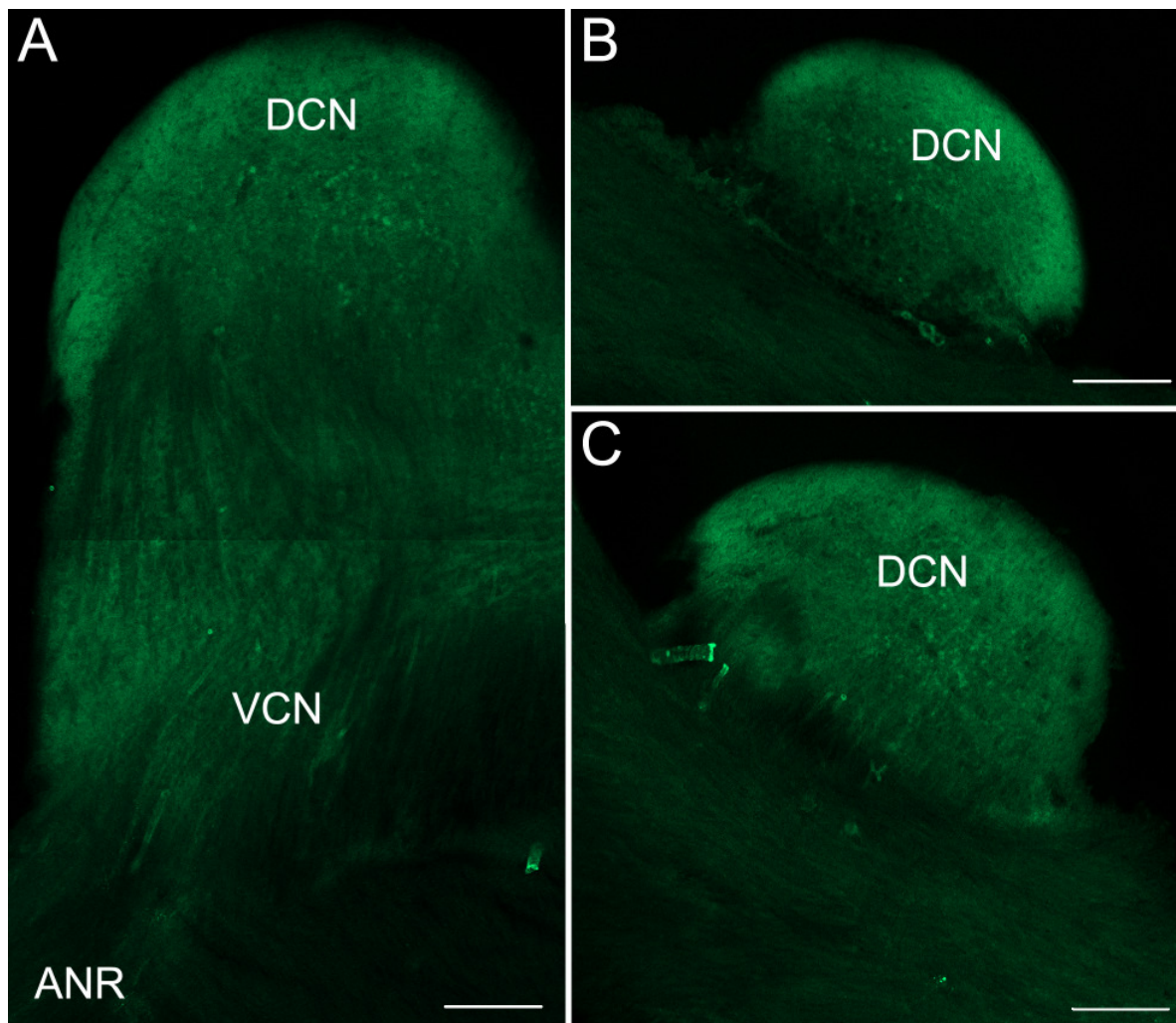
Érdekes módon a Kv4.3-immunpozitivitás intracellulárisan is megfigyelhető volt, főleg a sejtmag közelében, ahol többnyire szemcsés megjelenést mutatott. Bár az intracelluláris immunpozitivitás nem lenne meglepő, hiszen az éppen szintetizált vagy a belső raktárakban található csatornafehérjék is eredményezhetik, a bemutatott megoszlás felvetette a lehetőségét, hogy a primer antitest esetleg keresztreagál egyes intracelluláris proteinekkal. Tekintettel azonban arra, hogy a Kv4.3-immunpozitivitás ezen szokatlan megoszlása egy konzekvensen reprodukálható jelenség volt, és a többi validálási eljárás is pozitív eredményt adott (részletes leírásuk az Anyagok és módszerek fejezetben megtalálható), úgy véljük, hogy a látott állapot a Kv4.3-alegységek tényleges megoszlását mutatja. Mindazonáltal a tanulmány további részében ezt a jelenséget nem vizsgáltuk.



12. ábra A Kv4.3-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A: Kv4.3-specifikus immunpozitivitás megoszlása a DCN-ben. A nyilak két, erősen Kv4.3-pozitív sejtre mutatnak. B: A DCN felszíni részének Kv4.3-pozitivitása. A nyilak két, erősen Kv4.3-pozitív sejtre mutatnak, amelyek a Kv4.3-pozitív idegrostok között helyezkednek el. C: A DCN legfelszínesebb részéről készített nagyobb nagyítású felvétel. A nyilak két erősen pozitív sejtestre mutatnak, a csillag a DCN felszínét borító ependymaréteget jelöli, ami elhanyagolható intenzitású Kv4.3 jelölődést mutat. D: A C ábrán látható terület DAPI jelölése. E: Egy bushy-neuron sejtestéről készített nagy nagyítású felvétel. F: Egy másik Kv4.3-pozitív bushy-sejtről készített felvétel, a nyíl egy nyúlvány kezdeti szakaszát mutatja. G: Három Kv4.3-pozitív bushy-neuronból (csillagok) álló sejtcsoport optikai keresztmetszete. A nyilak idegsejtnyúlványok keresztmetszeteire mutatnak. H: Egy óriássejt rekonstruált konfokális képe (18, egyenként 1  $\mu$ m vastagságú felvétel felhasználásával). A nyilak a neuron két nyúlványára mutatnak. Kalibrációk: 50  $\mu$ m (A-B); 20  $\mu$ m (C-H).

Erős Kv4.3-specifikus immunpozitivitás jellemezte az óriás- (12H ábrán a nyilak két, erősen pozitív nyúlványt jelölnek) és octopus-sejteket is. A rodaminnal jelölt sejteken végzett Kv4.3-specifikus immunfestések során valamennyi egyértelműen azonosított (n = 8) óriássejt pozitív volt. A rodaminos vizsgálatok során egy piramis-sejtet sikerült minden kétséget kizáróan azonosítani, ami ugyancsak Kv4.3-pozitívnek bizonyult.



13. ábra Kis nagyítású felvétel a Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlásáról a nucleus cochlearisban

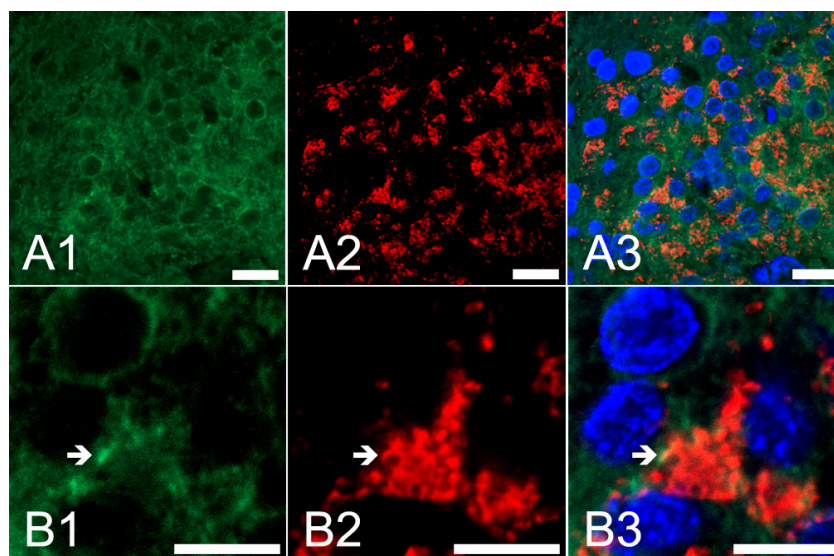
A: Egy teljes nucleus cochlearis (sagittalis metszet) Kv3.4-pozitivitását bemutató metszet. A képet két különálló, de azonos beállításokkal készített felvétel (egy a DCN-ről, egy a VCN-ről) összeillesztésével készítettük. ANR: hallóideg gyök. B és C: Az A ábrán bemutatott nucleus cochlearisból medialisabb irányban készített metszetek. Ezekon a metszeteken csak az erősen pozitív DCN látható. Kalibrációk: 200  $\mu$ m.

A Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A Kv4.2- és Kv4.3-alegységek mellett a Kv3.4-alegységek is részt vehetnek a tranziens áramért felelős  $K^+$ -csatornák felépítésében. Amint az a 13. ábrán látható, a nucleus



cochlearisban a Kv3.4-alegység is expresszálódik. A kis nagyítású felvétel (13A ábra) a Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlását mutatja egy teljes nucleus cochlearisban. Megfigyelhető, hogy ez a csatornaalegység mind a VCN-ben, mind pedig a DCN-ben expresszálódik; ugyanakkor a hallóideg belépési pontja, a cochlearis ideg intranuclearis kötegei és a DCN legfelsőbb rétege nem mutatott érdemi immunpozitivitást. A DCN mélyebb rétegeiben immunpozitív neuronális sejtesteket is megfigyelhettünk. A 13B és 13C ábrákon a 13A ábrán látottal megegyező, nucleus cochlearisból készített sagittalis metszetek láthatók, azonban ezek a nucleus medialisabb részéből készültek, így csak a DCN-t tartalmazzák. Ezen metszeteken, és más hasonló kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy míg a DCN igen erős Kv3.4-pozitivitást mutatott, addig az agytörzs csak gyengén jelölődött, ami arra enged következtetni, hogy a Kv3.4-alegységeket a nucleus cochlearis a szomszédos területeknél erősebben expresszálja.

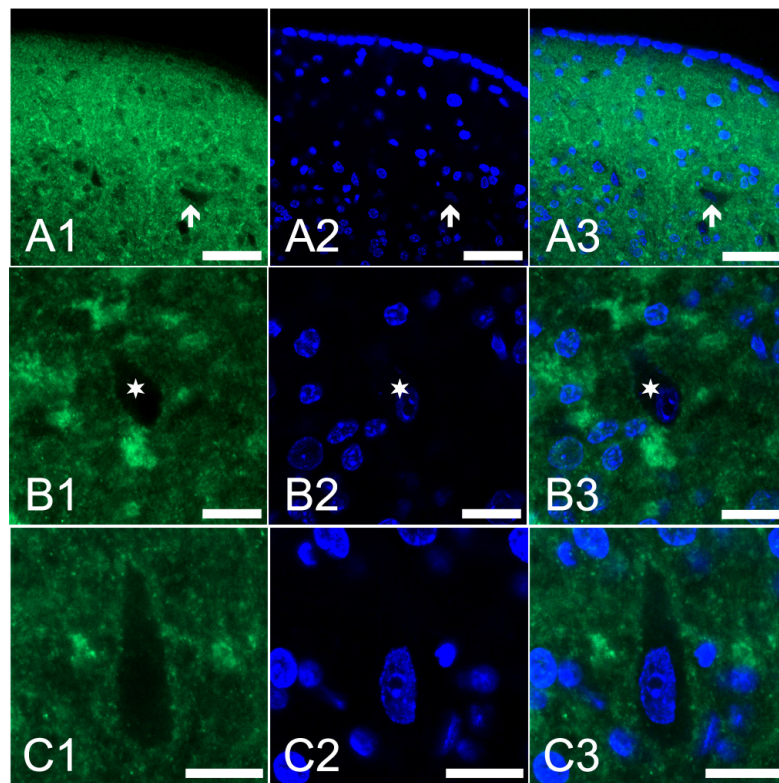


14. ábra Nagy nagyítású felvételek a Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlásáról a nucleus cochlearis szemcsesejtes régiójában  
A1-A3: A nucleus cochlearis szemcsesejtes régiójának Kv3.4- (A1), és synaptophysin- (A2) specifikus immunpozitivitása. A ko-lokalizációs ábrán (A3) a sejtmagvak helyzete is látható. B1-B3: A szemcsesejtes rétegről készített nagy nagyítású felvétel, amelyen jól látható a glomeruláris szinapszisok Kv3.4-pozitivitása. Az ábrák elrendezése megegyezik az A1-A3 ábrákéval, a nyíl egy jelentős synaptophysin - Kv3.4 ko-lokalizációt mutató területet jelöl. Kalibrációk: 20  $\mu$ m (A1-A3), és 10  $\mu$ m (B1-B3).

A 14. ábrán a Kv3.4-specifikus immunpozitivitás nucleus cochlearisban való megoszlása látható nagyobb nagyításban. A 14A1-A3 ábrák a Kv3.4- és synaptophysin-specifikus immunpozitivitás megoszlását mutatják a DCN szemcsesejtes régiójában. Mind a szemcseneuronok sejtmembránja, mind pedig a korábban bemutatott glomerularis



szinapszisok mutattak Kv3.4-pozitivitást, bár a jelölődés nem volt olyan erős, mint a Kv4.2-specifikus immunreakció esetében. Mindazonáltal megfigyelhető volt a Kv3.4- és synaptophysin-specifikus jelölődések ko-lokalizációja (14B1-B3 ábrák, egy példát nyíllal jelöltünk), ami arra utal, hogy ez a csatornaegység is részt vehet a DCN-ben a glomeruláris szinapszisok elektromos tulajdonságainak kialakításában.

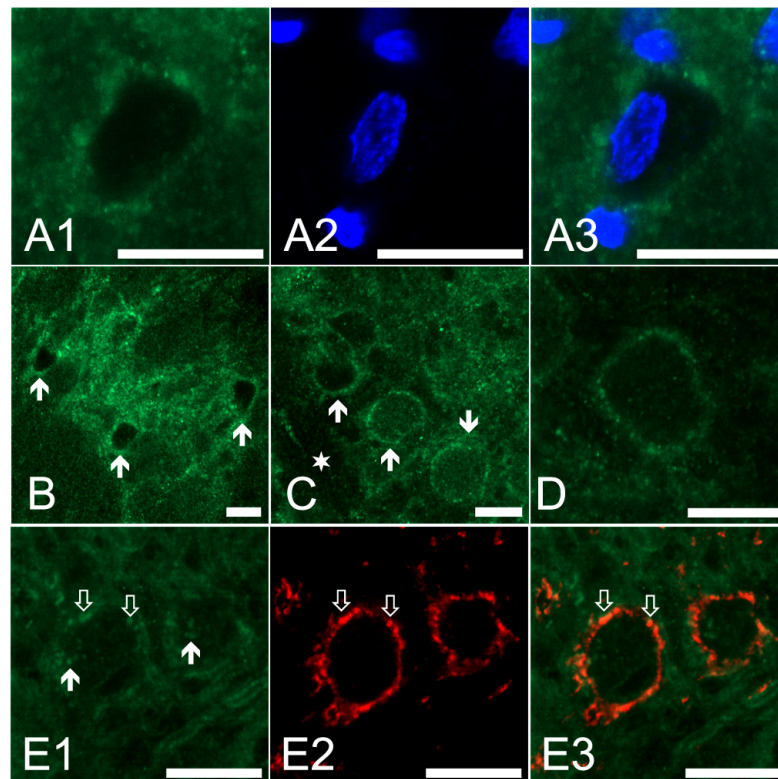


15. ábra Nagy nagyítású felvételek a Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlásáról a DCN projekciós neuronjaiban

A1-A3: A DCN legfelsőbb rétegének Kv3.4-pozitivitását bemutató ábra (A1), a sejtmagvak elhelyezkedése az adott területen (A2), és a ko-lokalizációs kép (A3). A nyíl egy olyan sejtre mutat, amely somaja Kv3.4-negatív területként rajzolódik ki az erősen immunpozitív hálózatban. B1-B3: Egy Kv3.4-pozitív piramis-neuron, a csillag a sejttest pontos helyét jelöli. Az ábrák elrendezése megegyezik az A1-A3 ábrákéval. C1-C3: Egy Kv3.4-pozitív óriássejt. : 50  $\mu$ m (A1-A3); 20  $\mu$ m (B1-C3).

A DCN felső rétegeiben erős Kv3.4-immunpozitivitást lehetett megfigyelni, ami különösen jelentős volt a neuropil esetében (15A1-A3 ábrák). A DCN ezen részében az egyes neuronok somai Kv3.4-negatív területekként jelentkeztek az erősen pozitív DCN-ben (egy ilyen példát jelöl a nyíl). A DCN mélyebb rétegeiben a neuropil immunjelölődése gyengébb volt, ami megkönnyítette az egyes sejtek immunpozitivitásának megállapítását. A 15B1-B3 ábrákon egy piramis-neuron Kv3.4-pozitív sejtteste látható (csillaggal jelölve, a soma méretei: 13,6  $\times$  26,8  $\mu$ m), míg a 15C1-C3 ábrákon egy, a DCN mélyebb régiójában található óriássejt

nagy ( $13,9 \times 49,5 \mu\text{m}$ ), elnyújtott, Kv3.4-pozitív sejtteste látható. Érdemes megemlíteni, hogy a vizsgált idegsejt típusától függetlenül a sejtmembrán Kv3.4-specifikus immunreakciója jellemzően foltos megjelenésű volt. A retrográd jelölést követő Kv3.4-specifikus immunfestéses kísérletek során egy piramis-sejtet sikerült minden kétséget kizáróan azonosítani, és az Kv3.4-pozitívnak bizonyult. A rodaminnal töltött óriássejtek körvonalainak immunpozitivitása ugyanakkor nem haladta meg a neuropilét ( $n = 3$ ).



16. ábra Nagy nagyítású felvételek a Kv3.4-specifikus immunpozitivitás megoszlásáról az aVCN projekciós neuronjaiban

A1-A3: Egy Kv3.4-pozitív octopus-sejt. B: Három Kv3.4-pozitív octopus-neuronból álló sejtcsoport (nyilak). C: Az aVCN-ről készített felvétel, melyen jól kivehető három bushy-neuron sejtteste. A csillag a hallóideg kötegeit jelöli, amelyek nem mutattak jelentős immunpozitivitást. D: Egy erősen Kv3.4-pozitív bushy-sejt körvonala. E1: Kv3.4-pozitív bushy-sejtek, a sejtek felszínén jól látható immunpozitív foltokkal (tömör nyilak). E2: Ugyanazon terület synaptophysin-specifikus immunjelölése. E3: Az E1 és E2 felvételek ko-lokalizációs képe. Az E1-E3 ábrákon az üres nyilak jelentős Kv3.4 - synaptophysin ko-lokalizációt mutató területeket jelölnek. Kalibrációk:  $20 \mu\text{m}$ .

A VCN-ben az octopus-sejtek erős Kv3.4-immunpozitivitást mutattak. A 16A1-A3 ábrák egy ilyen octopus-neuront mutatnak be, amelyen jól megfigyelhető a jellegzetes, excentrikus elhelyezkedésű sejtmag. A 16B ábrán az octopus-sejtek egy csoportja látható, amelyeknek erősen immunpozitív körvonalai (nyilakkal jelölve) jól kivehetőek az ugyancsak pozitív, valószínűleg octopus-sejtek processzusaiból álló hálózatban. A 16C ábrán számos

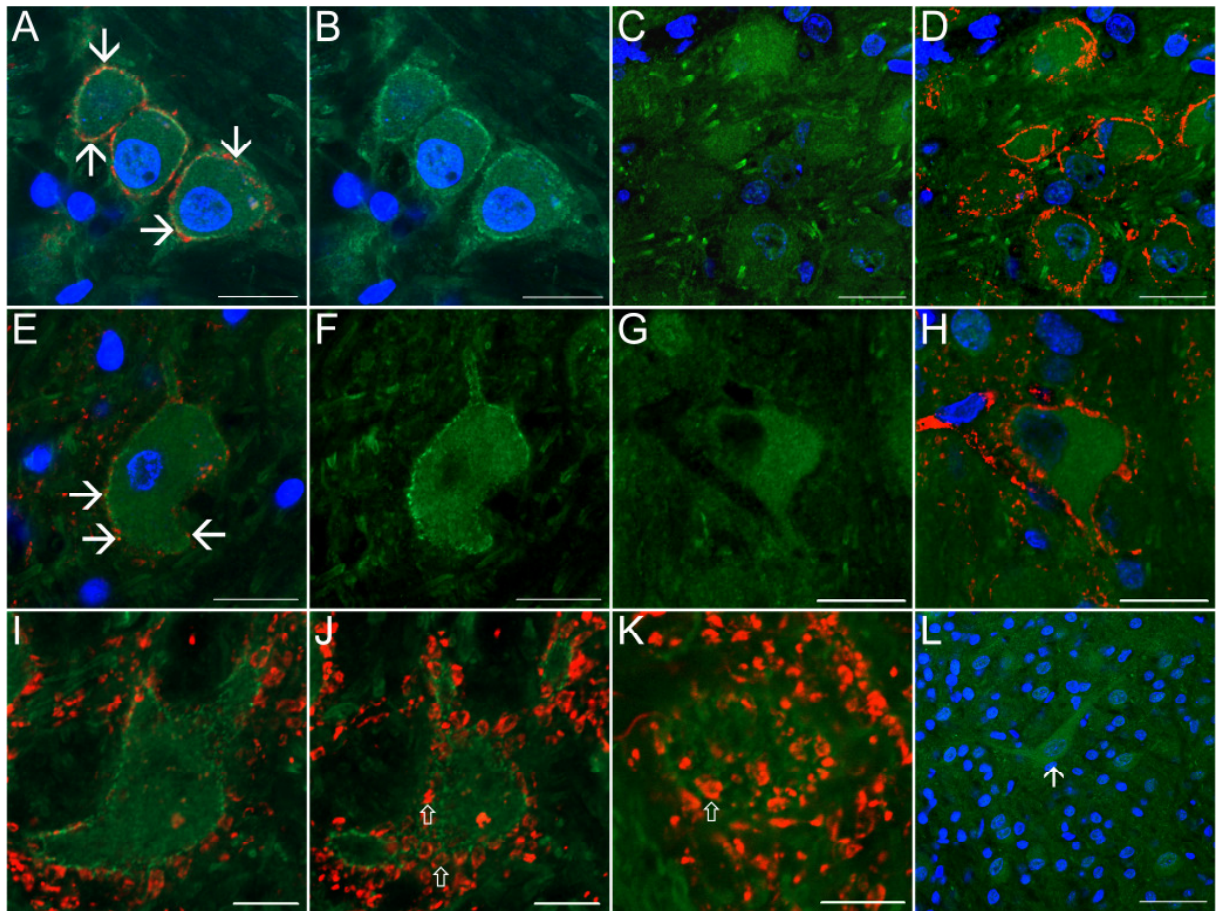
erősen Kv3.4-pozitív bushy-neuron sejtteste (tömör nyilak), és a közelben futó negatív hallóidegrostok (csillag) láthatók. A 16D ábrán bemutatott nagy nagyítású képen jól megfigyelhető a bushy-neuron somájának szemcsés jellegű Kv3.4-immunjelölődése, akárcsak a 16E1-E3 ábrákon bemutatott két bushy-sejtnél. Mivel az utóbbi felvételek optikai síkja a sejtek felszínének közelében volt, az immunpozitív pontok egy része a sejtek felszínén helyezkedett el (néhány példát tömör nyilakkal jelöltünk). A sejtek felszínén található Kv3.4-pozitív területek egy része ko-lokalizációt mutatott a synaptophysin-specifikus immunjelöléssel (üres nyilak), ami felveti a Kv3.4-alegységek preszinaptikus lokalizációjának lehetőségét.

#### A Kv1.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

Korábban már leírták, hogy a nucleus cochlearis egyes sejtjei rendelkeznek egy alacsony feszültségen aktiválódó, dendrotoxinra érzékeny  $K^+$ -árammal (Golding és mtsai, 1995; 1999; Rothman és Manis, 2003; Cao és mtsai, 2007), amelyet a Kv1.1-, Kv1.2- és Kv1.6-alegységekből felépülő csatornák hozhatnak létre. A Kv1.2-alegység megoszlásának vizsgálata különösen érdekesnek ígérkezett, mivel az irodalomban ellentmondásos adatok találhatóak ezen alegység expressziójának változásairól az egyedfejlődés során (Camino és mtsai, 2005; Bortone és mtsai, 2006). Ennek fényében kísérleteink során nagy hangsúlyt fektettünk a fiatal és idősebb állatok Kv1.2-alegység megoszlásában tapasztalható eltérések vizsgálatára.

A 17. ábrán a Kv1.2-specifikus immunpozitivitás idős és fiatal állatokra jellemző megoszlása látható. Általánosságban elmondható, hogy mindkét korcsoportban egyértelműen jelen volt a Kv1.2-alegység, azonban az expressziós mintázatokban jelentős különbségek voltak. Mint az a 17A és 17B ábrákon látható, idős állatok esetében a bushy-sejtek erős immunpozitivitást mutattak, ami a sejtmembránban volt a legintenzívebb. A synaptophysin- és Kv1.2-specifikus kettős jelölések (17A ábra) arra utaltak, hogy bár a Kv1.2-alegységek előfordulhatnak preszinaptikusan is (a nyilak ilyen területekre mutatnak), a Kv1.2-pozitív foltok túlnyomó része nem mutatott ko-lokalizációt a synaptophysinnel.

A fiatal patkányok bushy-neuronjai is Kv1.2-pozitívak voltak, azonban az immunreakció intenzitása alacsonyabb volt, mint az idős állatokban (17C és 17D ábrák), ráadásul ezen esetekben az immunpozitivitás elsősorban intracellulárisan volt jelen, a sejtmembránok jelölődése pedig nem volt szembetűnő. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy bár már a fiatal állatok bushy-neuronjai is expresszálnak Kv1.2 fehérjét, ezek ebben a fejlődési szakaszban még nem transzlokálódnak a sejtmembránba.



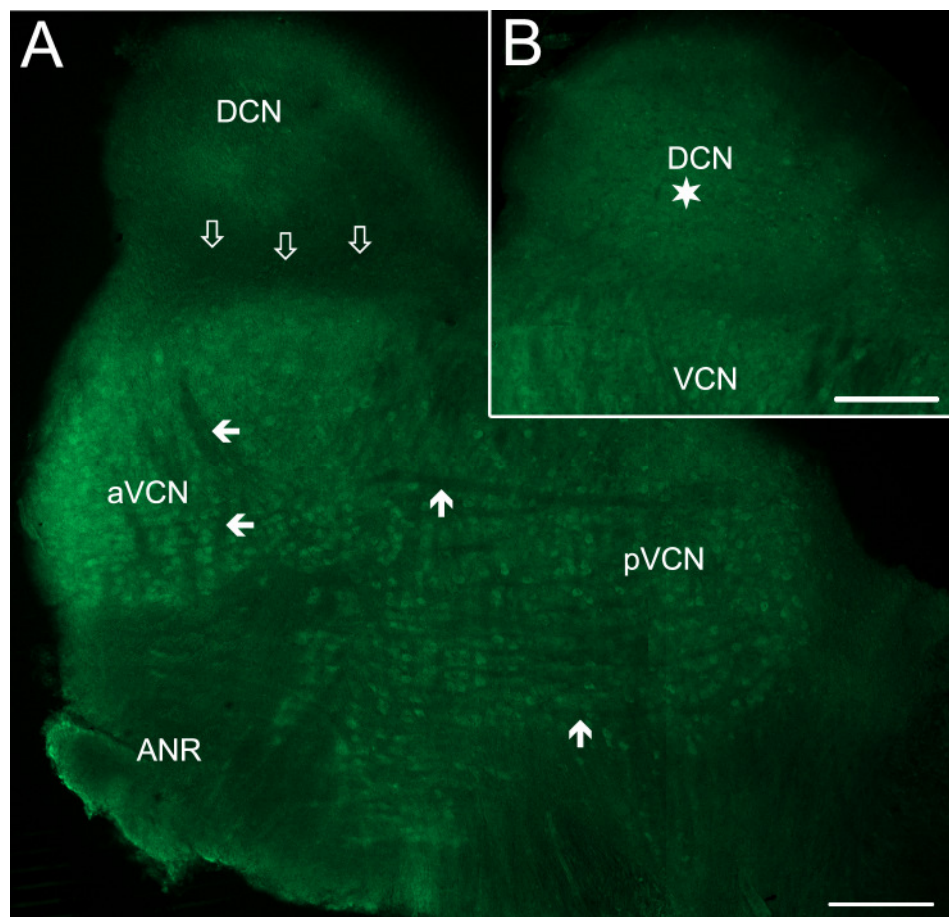
17. ábra A nucleus cochlearis Kv1.2-expressziós mintázata

A: Egy idős állat (2 hónapos) VCN-jén végzett Kv1.2- (zöld) és synaptophysin-specifikus (piros) immunfestés ko-lokalizációs képe, a DAPI jelölés (kék) feltüntetésével. Jól kivehető három bushy-neuron erősen Kv1.2-pozitív körvonala; a nyilak a Kv1.2- és synaptophysin-immunjelölések ko-lokalizációjára mutatnak példákat. B: Ugyanaz, mint az A ábra, csak a synaptophysin-specifikus jelölés nélkül, hogy a Kv1.2-specifikus immunpozitivitást könnyebben meg lehessen ítélni. C: Egy fiatal (12 napos) állat VCN-jéből készített metszeten végzett Kv1.2-specifikus immunfestés, ahol a DAPI jelölés eredményét is megjelenítettük. D: Ugyanaz, mint a C ábra, de a synaptophysin-specifikus immunpozitivitás megoszlása is látható. E és F: Egy idős állat octopus-neuronjának Kv1.2-sepecifikus jelölése, az ábrák elrendezése megegyezik az A és B ábrákéval. G és H: Egy fiatal állat octopus-neuronjának Kv1.2-specifikus jelölése; az ábrák elrendezése megegyezik a C és D ábrákéval. I: Egy idős állat octopus-neuronjának somájáról készített egyetlen optikai szelet ko-lokalizációs felvétele. A zöld jel a Kv1.2-specifikus, a piros pedig a synaptophysin-specifikus immunpozitivitásnak felel meg. J: Az I ábrán látható sejtről 3  $\mu\text{m}$ -rel fentebb készített felvétel, amely lehetővé tette a sejt felszínén található preszinaptikus végződések (piros) és Kv1.2-immunpozitivitás (zöld) vizsgálatát. A nyilak által jelzett területeken megfigyelhető, hogy a szinaptikus boutonokat erősen Kv1.2-pozitív foltok veszik körül, ami valószínűsíti, hogy a preszinaptikus terminálok közvetlen közelében jelen vannak Kv1.2-alegységet tartalmazó  $\text{K}^+$ -csatornák. K: A preszinaptikus végződések (piros) és a Kv1.2-specifikus immunpozitivitás (zöld) egymáshoz viszonyított lokalizációja egy octopus-sejt felszínén, nagy nagyításban. A nyíl jelentése ugyanaz, mint a J ábrán. L: A Kv1.2-specifikus immunpozitivitás megoszlása egy fiatal állat DCN-jében, a sejtmagvak megjelenítésével. A nyíl egy Kv1.2-pozitív óriássejtre mutat. Kalibrációk: 50  $\mu\text{m}$  (L); 20  $\mu\text{m}$  (A-H); 10  $\mu\text{m}$  (I-K).



Hasonló következtetésekre jutottunk az octopus-sejtek vizsgálata során is (17E-H ábrák). Ezen neuronok annyira erős Kv1.2-pozitivitással rendelkeztek, hogy a Kv1.2-specifikus reakció intenzitása alapján könnyen rájuk lehetett találni a pVCN-ben. Az idős állatokban az octopus-neuronok sejtmembránja igen erős, foltos Kv1.2-specifikus jelölődést mutatott, és az immunpozitív foltok egy része ko-lokalizációt mutatott a synaptophysin jelöléssel (17E ábra, nyilak). A fiatal állatok octopus-sejtjeiben is megfigyelhető volt a Kv1.2-immunpozitivitás, azonban az idős állatoknál tapasztalt nagymértékű membránlokalizáció nem volt jellemező (17G és 17H ábrák). A 17I-K ábrákon egy másik octopus-neuronról készített nagy nagyítású felvételek láthatók, amelyeken jól megfigyelhető a Kv1.2-specifikus immunpozitivitás octopus-sejtekre jellemző foltos jellege. A 17I ábrán jól látható az octopus-neuronok tipikus morfológiája, mivel a sejt körvonalát jól kirajzolja a Kv1.2-specifikus immunfestés. Az idegsejten végződő szinaptikus terminálisok is láthatók, melyek némelyike ko-lokalizációt mutatott a Kv1.2-pozitív foltokkal. Hasonló megfigyeléseket tehattunk a 17J ábra alapján is. Ez a felvétel ugyancsak a 17I ábrán látható sejtről készült, azonban az optikai sík 3  $\mu\text{m}$ -rel feljebb (azaz a sejt felszínéhez közelebb) futott, ami lehetővé tette a neuron somájának felszínén található boutonok vizsgálatát is. A Kv1.2-specifikus immunpozitivitás és synaptophysin-pozitív boutonok közötti kapcsolat vizsgálata során nagyobb nagyítású felvételeket is felhasználtunk (egy ilyen felvétel látható a 17K ábrán). Látható, hogy a Kv1.2-pozitív foltok gyakran a szinaptikus végzódések körül, vagy azok közvetlen közelében helyezkedtek el (néhány példát üres nyilakkal jelöltünk a 17J és 17K ábrákon).

Az előzőekkel ellentétben a szemcsesejtes réteg és a nucleus cochlearis glomeruláris szinapszisai nem mutattak jelentős Kv1.2-pozitivitást. A DCN egyértelműen azonosított piramis-sejtjeinek nagy része Kv1.2-pozitív volt (7 rodaminnal töltött piramis-sejt közül 6), és számos óriássejt is expresszálta a fehérjét (34-ből 14). A 17L ábrán egy fiatal állat DCN-jében található tipikus óriássejt látható. Érdemes megemlíteni, hogy fiatal állatokban a Kv1.2-immunpozitivitás főleg a sejttesteken és a proximális nyúlványokon volt megfigyelhető, és annak intenzitása nagyobb volt, mint a DCN környező területein. Ezen elrendezésből fakadóan az egyes sejtek somáját könnyen el lehetett különíteni a környező területektől. Ezzel szemben felnőtt állatokban a DCN neuropiljának Kv1.2-specifikus jelölődése olyan erőssé vált, hogy az immunfestés előtt végzett rodaminos retrográd töltés nélkül az egyes sejteket nem lehetett elkülöníteni és felismerni.



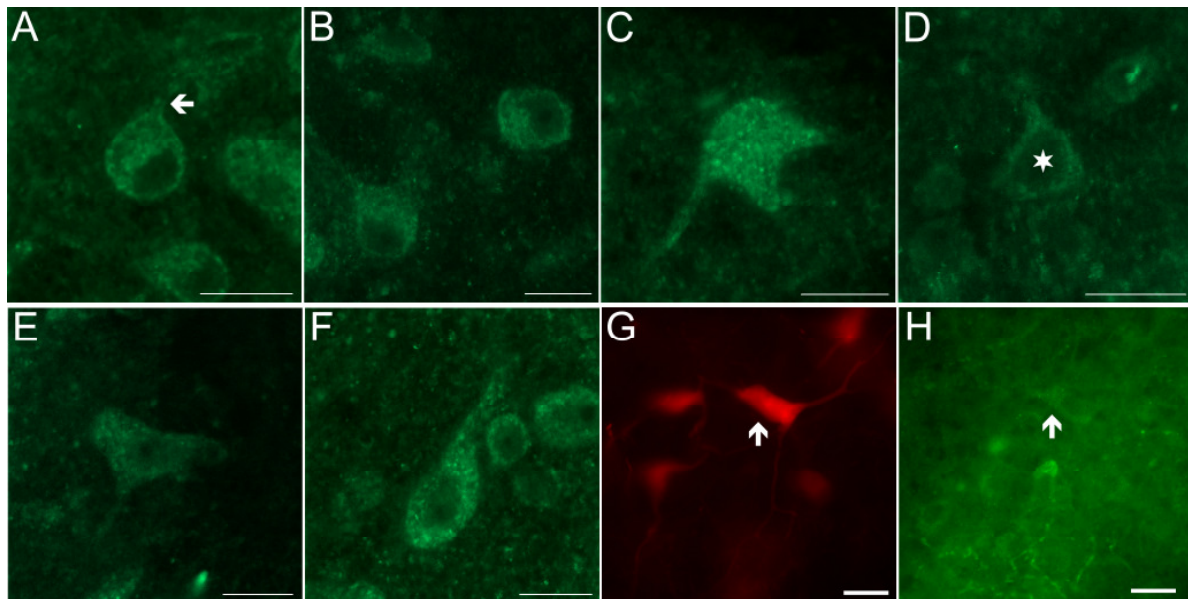
18. ábra A Kv1.6-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban, kis nagyítású felvételen

A: Egy teljes nucleus cochlearis Kv1.6-pozitivitását demonstráló sagittalis metszet. A képet három, a nucleus (DCN, aVCN, pVCN) különböző területéről, azonos beállításokkal készített felvétel összeillesztésével készítettük. A tömör nyilak a magon belül futó Kv1.6-negatív hallóideg kötegekre mutatnak. Az üres nyilak a DCN és VCN határát jelzik, ahol ugyancsak nem látható jelentős Kv1.6-pozitivitás. ANR: hallóideg gyök. B: Egy másik, az A ábrán látott nucleus cochlearisból készített sagittalis metszet, amelyen a DCN-nek egy nagyobb (és mélyebb) része látható. A csillag a DCN mély régióját jelöli, ami a külső rétegeknél erősebb Kv1.6-pozitivitást mutatott. Kalibrációk: 200  $\mu$ m.

#### A Kv1.6-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A 18. ábra a Kv1.6-specifikus immunreakció megoszlását mutatja. A 18A ábrán egy, a DCN-t és VCN-t is tartalmazó sagittalis metszetről készült felvétel látható. A nucleus cochlearis ventralis részében a Kv1.6-specifikus immunpozitivitás kifejezettebb volt, mint a DCN-ben. Fontos megjegyezni, hogy míg a VCN-ben található sejttestek egyértelműen pozitívak voltak, addig a hallóidegrostok (néhány példát tömör nyilakkal jelöltünk) nem, vagy csak elhanyagolható mértékben jelölődtek. A DCN-en belül a nucleus centrális része mutatta a legerősebb jelölődést, ugyanakkor sem a felszíni, sem pedig a VCN-t és a DCN-t elválasztó réteg nem mutatott intenzív Kv1.6-pozitivitást (üres nyilak). A 18B ábrán ugyanazon nucleus

cochlearisból készített, annál medialisabban futó metszet látható, ahol a DCN belső régiójának (csillag) Kv1.6-pozitív sejtjei is kivehetők.



19. ábra Nagy nagyítású felvételek a Kv1.6-specifikus immunpozitivitás megoszlásáról a nucleus cochlearisban

A: Egy Kv1.6-pozitív bushy-neuron, a nyíl egy Kv1.6-pozitív nyúlvány kezdeti szakaszára mutat. B: Kv1.6-pozitív octopus-neuronok három sejtéből álló csoportja. C: Egy octopus-sejt nagy nagyítású felvétele, az optikai sík úgy lett megválasztva, hogy a sejttest felszíne is látható legyen. D: Egy Kv1.6-pozitív piramis-sejt háromszög alakú sejtteste, a csillag a sejtmagot jelöli. E és F: Két, különböző morfológiájú, Kv1.6-pozitív óriássejt a DCN mély régiójában. G: Egy rodaminnal jelölt óriássejt (nyíl). H: A G ábrán látható terület Kv1.6-specifikus immunfestésének eredménye. A nyíl az előző ábrán látható neuron sejttestének helyét jelzi. Kalibrációk: 25  $\mu\text{m}$  (G-H), és 20  $\mu\text{m}$  (A-F).

A 19. ábra a nucleus cochlearis Kv1.6-expressziós mintázatát mutatja. A bushy-sejtek Kv1.6-pozitívak voltak (19A ábra), és mind a sejttestük, mind pedig nyúlványaik kezdeti szakasza jelölődött (nyíl). Megállapítottuk, hogy az octopus-sejtek is erős pozitivitást mutattak. A 19B ábrán egy, a pVCN-ben található, három sejtéből álló octopus-neuroncsoport látható, míg a 19C ábra egy octopus-sejt nagy nagyítású képét mutatja be. A bemutatott esetben az optikai síkot úgy választottuk meg, hogy megítélhessük a sejt felszínének Kv1.6-specifikus immunjelölődését. A bemutatott sejtet a lokalizációja, a jellegzetes, hosszúkás sejttest (legnagyobb átmérő: 24,8  $\mu\text{m}$ ), valamint a soma ugyanazon oldalából kiinduló nyúlványok alapján octopus-neuronként azonosítottuk. A bemutatott felvételen jól megfigyehető, hogy az octopus-sejtek Kv1.6-specifikus immunpozitivitása foltos megjelenésű volt, és az mind a sejttesten, mind pedig a nyúlványok kezdeti szakaszán megfigyelhető volt. A 19D ábrán egy Kv1.6-pozitív piramis-sejt (jól látható a csillaggal jelölt háromszög alakú

sejttest, melynek mérete  $14,9 \times 17,7 \mu\text{m}$  volt), míg a 19E és 19F ábrákon két óriásneuron látható. Míg a 19E ábrán bemutatott sejt somaja sokszög alakú, addig a 19F ábrán látható elnyújtott, inkább fuziform-szerű volt, azonban méretük ( $15,6 \times 38,6 \mu\text{m}$  illetve  $15,8 \times 33,6 \mu\text{m}$ ) és lokalizációjuk (mindketten a DCN legmélyebb rétegeiben helyezkedtek el) alapján egyértelműen óriássejtként azonosíthatjuk őket.

Egy további tipikus óriássejt látható a 19G és 19H ábrákon. A rodaminnal töltött idegsejt gyenge, de egyértelműen pozitív Kv1.6-immunjelölődést mutatott (nyíl). Valamennyi kísérletet számításba véve a 12 óriássejtként azonosított, rodaminnal töltött neuron közül 8 bizonyult Kv1.6-pozitívnak. Piramis-sejtek esetében ugyanez az arány 6 Kv1.6-pozitív neuron volt 8 rodaminnal jelölt idegsejtből.

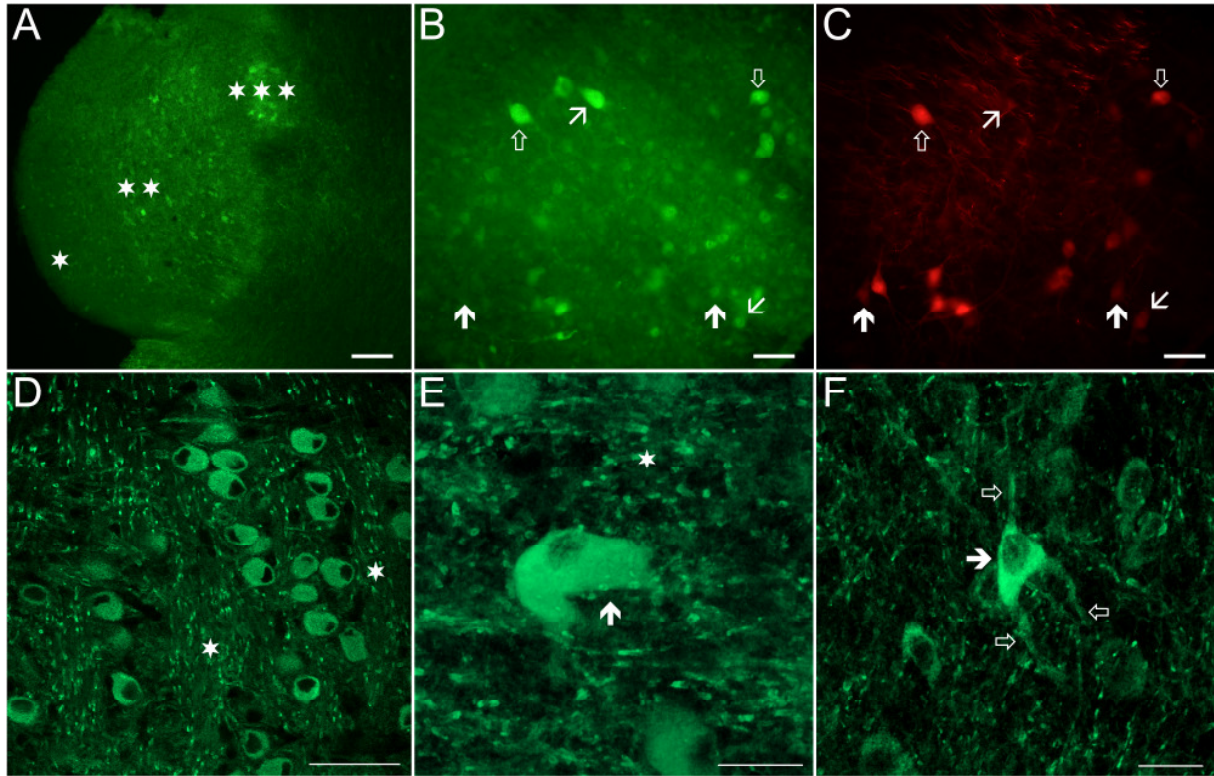
A Kv1.1-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A 20. ábrán a Kv1.1-alegység nucleus cochlearison belüli megoszlását bemutató néhány felvétel látható. A mint azt a 20A ábra mutatja, számos terület mutatott erős Kv1.1-pozitivitást, így a DCN második (fuziform) rétege, amely a piramis-neuronokat (egy csillag) is tartalmazza; a DCN mélyebb rétegei, amelyben főleg az óriássejtek találhatóak (kettős csillag); valamint a VCN octopus-sejtes régiója (három csillag). A bemutatott felvételen jól megfigyelhető, hogy az octopus-sejtek rendelkeztek a legintenzívebb Kv1.1-immunpozitivitással; ugyanakkor a szemcsesejtek immunjelölődése elhanyagolható volt.

A 20B és 20C ábrákon a DCN rodaminnal töltött projekciós neuronjainak Kv1.1-specifikus immunfestésének eredménye látható nagyobb nagyításban, és jól szemléltetik a DCN neuronok Kv1.1-expresszió terén mutatott heterogenitását. Bár egyértelműen kivehetők voltak Kv1.1-pozitív piramis- és óriássejtek is, a Kv1.1-specifikus immunpozitivitás és a rodaminos jelölés között csak részleges volt az átfedés. A rodaminnal nem töltődött, Kv1.1-pozitív sejtek (felfelé mutató ferde nyíl) valószínűleg olyan projekciós neuronok, amelyek axonjai nem sérültek meg a rodaminos töltés során. Ezen idegsejtek mellett láthatók olyan piramis-sejtek is, amelyek jól töltődtek rodaminnal, azonban csak gyenge Kv1.1-pozitivitást mutattak, vagy egyáltalán nem jelölődtek (felfelé mutató tömör nyilak); valamint olyanok is, amelyek közepes (lefelé mutató ferde nyíl) vagy erős intenzitású (lefelé mutató üres nyíl) Kv1.1-pozitivitást mutattak. A korábbi adatokhoz hasonlóan, ezen eltéréseket csak úgy tudjuk magyarázni, ha feltételezzük, hogy sem a piramis-, sem pedig az óriássejtek nem alkotnak homogén sejtpopulációt. Az összes kísérlet eredményét számba véve 29 rodaminnal jelölt óriás-, és 9 piramis-neuront találtunk, melyek közül 18 óriás- (egy ilyen példát üres nyíllal jelöltünk a 20B és 20C ábrán) és 6 piramis-sejt mutatott Kv1.1-pozitivitást. A 20D-F

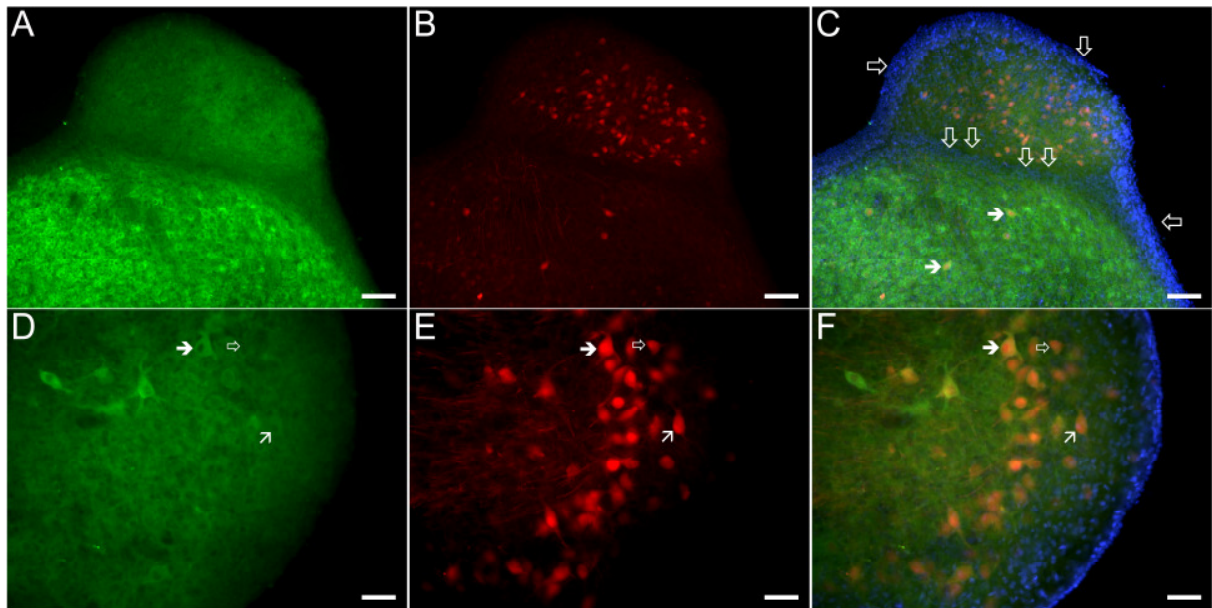


ábrák a Kv1.1-alegység megoszlását mutatják bushy- (20D ábra), octopus- (20E ábra, nyíl) és piramis-sejteken (20F ábra, tömör nyíl). A bemutatott sejtek pozitivitása mellett a hallóidegrostok (csillagokkal jelölt terület), és az egyes neuronok nyúlványainak (pl. üres nyilak a 20F ábrán) intenzív, foltos immunjelölődése is érdekes megfigyelés volt.



20. ábra A Kv1.1-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A: A nucleus cochlearis Kv1.1-specifikus immunpozitivitása. Egy csillag jelöli a fuziform réteget, két csillag a DCN mély részét, míg három csillag jelöli az octopus sejtcsoportot a pVCN-ben. B: Nagy nagyítású felvétel a Kv1.1-specifikus immunjelölés megoszlásáról a DCN-ben. C: Az előző ábrán látható terület rodaminos jelölése. A B és C ábrán a felfelé mutató üres nyíl egy óriás-, a lefelé mutató pedig egy piramis-sejtre mutat, amelyek erősen Kv1.1-pozitívak, és rodamminal is töltődtek. A jobbra mutató ferde nyíl egy rodamminal nem jelölődött, erősen Kv1.1-pozitív óriássejtet jelez. A balra mutató ferde nyíl egy retrográdan jelölt, közepesen Kv1.1-pozitív piramis-sejtet jelöl, míg a két tömör nyíl egy-egy jelentős Kv1.1-pozitivitást nem mutató piramis-neuronra mutat. D: Bushy-sejtek Kv1.1-specifikus immunpozitivitása. A csillagok által jelölt területeken megfigyelhető a hallóidegrostok Kv1.1-pozitivitása. E: Egy erősen Kv1.1-pozitív octopus-sejt (nyíllal jelölve) rekonstruált konfokális képe. A bemutatott képet 25 vertikális, egyenként 1  $\mu$ m vastagságú felvétel felhasználásával készítettük. A csillaggal jelölt területen jól látható a hallóidegrostok Kv1.1-pozitivitása. F: Egy erősen Kv1.1-pozitív piramis-sejt (tömör nyíllal jelölve) rekonstruált konfokális képe. A bemutatott képet 23 vertikális, egyenként 0,8  $\mu$ m vastagságú felvétel felhasználásával készítettük. Az üres nyilak a piramis-neuron Kv1.1-pozitív nyúlványaira mutatnak. Kalibrációk: 100  $\mu$ m (A), 50  $\mu$ m (B-D), és 20  $\mu$ m (E-F).



21. ábra A Kv3.1-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

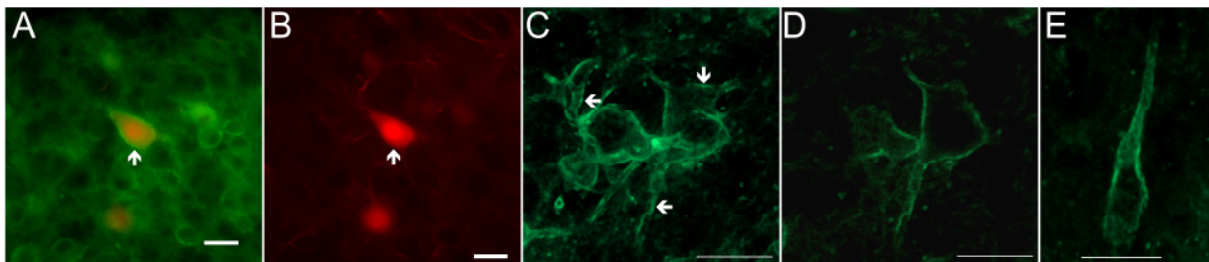
A: Egy sagittalis nucleus cochlearis metszet Kv3.1b-specifikus immunpozitivitása. B: Az A ábrán látható terület, de a projekciós neuronok retrográd jelölésének eredménye látható. C: Az A és B ábrák ko-lokalizációs képe a DAPI jelölés eredményének feltüntetésével. Az egyszeres üres nyíl a felszínes, a kettős üres nyilak a mély szemcsesejtes régre mutatnak. A tömör nyilak két, rodaminnal töltött, erős Kv3.1-specifikus immunpozitivitást mutató neuront jelölnek. D-F: Az ábrák elrendezése megegyezik az A-C ábrákéval, azonban a felvételek egy másik preparátumról készültek nagyobb nagyítással. A jobbra mutató tömör nyíl egy erősen Kv3.1-pozitív, rodaminnal töltött óriássejtre, az üres nyíl egy Kv3.1-negatív, rodaminnal töltött piramis-sejtre, míg a ferde nyíl egy gyengén Kv3.1-pozitív, rodaminnal töltött piramis-sejtre mutat. Kalibrációk: 100  $\mu$ m (A-C), 50  $\mu$ m (D-F)

#### A Kv3.1-specifikus immunpozitivitás megoszlása a nucleus cochlearisban

A 21A ábrán látható kis nagyítású felvétel a Kv3.1b-alegység megoszlását mutatja a nucleus cochlearisban. Bár mind a DCN, mind pedig a VCN egyértelműen pozitív volt, a VCN jelölődése intenzívebbnek bizonyult. Ugyanezen preparátum rodaminos jelölésének eredményét mutatja a 21B ábra, ahol jól kivehetőek a retrográdan töltött projekciós neuronok. A DCN rodaminnal jelölt sejtjeit piramis- és óriásneuronokként azonosítottuk, az egyes idegsejtek pontos típusát lokalizációjuk, a nagyobb nagyítású felvételeken (pl. 22A ábra) meghatározott méretük és alakjuk alapján határoztuk meg. Ugyanezen kritériumok alapján azonosítottuk a VCN-ben található, rodaminnal jelölt óriásneuronokat is. A 21C ábra a 21A és 21B ábrák ko-lokalizációs felvétele, melyen a DAPI jelölést is megjelenítettük. A szemcsesejtek sűrűn elhelyezkedő sejtmagjainak köszönhetően a szemcsesejtes régió azonosítása viszonylag egyszerű volt. Az ábrán üres nyilak jelzik a nucleus cochlearis felszínét borító szemcsesejtes réteget, a kettős üres nyilak pedig a nucleus cochlearis ventralis

és dorsalis részét elválasztó szemcsesejtes rétegre mutatnak. Amint az a 21C ábrán látható, a VCN neuronjainak felszínén expresszálódik a Kv3.1b-csatornaalegység, és egy részük rodaminnal is jelölődött (tömör nyilak). Ezen túlmenően a DCN projekciós idegsejtjei is expresszálják a Kv3.1 fehérjét, bár esetükben az immunpozitivitás intenzitása nem érte el a VCN-ben tapasztalt szintet. Az is megfigyelhető, hogy a szemcsesejtek Kv3.1-pozitivitása jóval gyengébb volt, mint akár a DCN, akár a VCN projekciós neuronjai esetében.

A 21D-F ábrák számos rodaminnal töltött óriás- és piramis-sejtet mutatnak, egy másik preparátum DCN-jéről készített nagyobb nagyítású felvételeken. Ezen, és más, hasonló kísérletek alapján megállapítottuk, hogy az óriássejtek nagy része Kv3.1-pozitív volt (egy ilyen példát jelez a tömör nyíl a 21D-F ábrák jobb oldalán); mindösszesen 27 Kv3.1-pozitív, és 6 negatív óriásneuront sikerült azonosítanunk. Hasonló volt az arány a piramis-sejtek esetében is, a 15 piramis-neuronként azonosított idegsejt közül 12 volt Kv3.1-pozitív (egy ilyen sejtre mutat a ferde nyíl), és csak 3 negatív. Ezen kísérletek arra is rámutattak, hogy az óriássejtekben a Kv3.1-immunpozitivitás általában erősebb volt, mint a piramis-sejtekben. A 22A és 22B ábrákon egy másik tipikus megjelenésű, erősen Kv3.1-pozitív, rodaminnal jelölt óriásneuron látható (nyíl, a bemutatott ábrákon a 21C ábrán szereplő egyik sejtről készített nagy nagyítású felvételek láthatók). Érdeemes megemlíteni, hogy a bemutatott óriássejt közelében számos kisebb (14-17  $\mu\text{m}$  átmérőjű), szferikális, Kv3.1-pozitív sejtet is lehet látni. Mivel ezen sejtek nem jelölődtek rodaminnal, valószínűleg cochlearis interneuronokról van szó, de részletes vizsgálatokat nem végeztünk identitásuk pontos meghatározása céljából.



22. ábra A nucleus cochlearis projekciós neuronjainak Kv3.1-specifikus immunpozitivitása

A: Egy Kv3.1-pozitív, rodaminnal töltött óriássejt nagy nagyítású ko-lokalizációs felvétele (ugyanezen sejt megtalálható a 21. ábra A-C ábráin is kis nagyításban). B: Az A ábrán látható terület, de csak a rodaminos jelölés eredménye látható. C: Erősen Kv3.1-pozitív octopus-sejtek (nyilak) rekonstruált konfokális képe. A bemutatott képet 22 vertikális, egyenként 1  $\mu\text{m}$  vastagságú felvétel felhasználásával készítettük. D: Az előző ábrán látott kép elkészítéséhez felhasznált 22 felvétel egyike. E: Egy octopus-sejt erősen Kv3.1-pozitív nyúlványának összetett konfokális képe. A bemutatott képet 25 vertikális, egyenként 1  $\mu\text{m}$  vastagságú felvétel felhasználásával készítettük. Kalibrációk: 50  $\mu\text{m}$  (A-B) és 20  $\mu\text{m}$  (C-E).

A VCN-ben mind a bushy-, mind pedig az octopus-neuronok erős Kv3.1b-specifikus reakciót mutattak. A 22C ábrán egy octopus-sejtcsoportról készített rekonstruált konfokális kép látható (a 22D ábrán a rekonstruált kép egyik optikai síkja látható). Az octopus-sejtek esetében mind a soma, mind pedig a nyúlványok proximális részének felszíne erős immunpozitivitást mutatott. Az immunjelölődés nem volt homogén, a csatornaalegység jellegzetes csoportosulásokat mutatott (nyilakkal jelöltünk néhány példát). Az intenzív Kv3.1-specifikus immunpozitivitás és az alegységek aggregációja az octopus-sejtek nyúlványain is egyértelműen megfigyelhető volt (22E ábra).

## Megbeszélés

Jelen munka legfontosabb célkitűzése az volt, hogy egy átfogó leírást adjon a nucleus cochlearis megfelelően azonosított neurontípusainak Kv-alegység expressziójáról. Bár egyes Kv-csatorna fehérjék jelenlétét és megoszlását már korábban is leírták, ez az első olyan kísérletsorozat, amely ugyanazon állatfaj azonos korú egyedein vizsgálta 7 különböző Kv-alegység pontos, sejt-specifikus megoszlását. Túl azon, hogy vizsgáltuk az egyes neuronok csatornaalegység-mintázatát, amelynek ismerete lehetővé teszi az adott sejtípusok membrántulajdonságainak megjósolását, azt is kimutattuk, hogy a különböző nucleus cochlearis neuronok egyes Kv-alegységeket eltérő mértékben expresszálnak, amelyeket akár sejt-specifikus markerekként is fel lehet használni: míg az octopus-sejtek esetében a Kv1.1- és Kv1.2-expresszió volt a legjelentősebb, addig az óriássejtek többsége igen erős Kv3.1-pozitivitást mutatott, ugyanakkor a Kv4.2-expresszió a szemcsesejtekben volt a legjelentősebb. Mindezek mellett jelen tanulmányban igazoltuk a nucleus cochlearisban található glomeruláris szinapszisok Kv4.2-pozitivitását is. A glomeruláris szinapszisokat a cerebellumban is erősen Kv4.2-pozitívnak találtuk, ami azt a nézetet támasztja alá, hogy a nucleus cochlearis és a cerebellum eredete azonos, és a két struktúra igen nagyfokú morfológiai hasonlóságot mutat. Végül, de nem utolsó sorban, eredményeink alapján feltételezhető, hogy sem a piramis-, sem pedig az óriássejtek nem alkotnak homogén sejtpopulációt a Kv-expressziós mintázat terén; azaz elképzelhető, hogy ezek a neurontípusok további funkcionális és/vagy morfológiai alcsoportokra oszthatók.

A nucleus cochlearis neuronok Kv-alegység expressziós mintázata

Korábban már leírták, hogy a nucleus cochlearis idegsejtek eltérő típusai jelentősen különböző tüzelési tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezen változatosság egyik lehetséges magyarázata, hogy a különböző neuronok eltérő feszültségfüggő  $K^+$ -áramokkal rendelkeznek. Meglepő módon azonban a nucleus cochlearis neuronok nagy része valamennyi jelentős feszültségfüggő  $K^+$ -áramfajtát expresszálja, így a tranziens-, késői típusú és LVA áramokat is.

Mindazonáltal, mivel különböző alegység-összetételű – és ezáltal eltérő feszültségérzékenységgel, kinetikai tulajdonságokkal és szabályozási mechanizmusokkal rendelkező – csatornák is létrehozhatnak egymáshoz nagymértékben hasonló makroszkópikus  $K^+$ -áramkomponenseket, a jelentősebb idegsejt-típusok Kv-alegység expressziós mintázatának ismerete segíthet a nucleus cochlearis neuronok funkciójának megértésében. Egyes Kv-alegységek expresszióját már vizsgálták a nucleus cochlearis neuronokon, a 6., 7. és 8. Táblázatok ezen korábbi tanulmányok fontosabb eredményeiről nyújtanak rövid áttekintést. Ugyanezen táblázatok a jelen munka eredményeit is tartalmazzák, így ezek könnyen összevethetők a már publikált eredményekkel. A korábbi tanulmányok egy részében nem törekedtek az egyes sejtek típusának pontos meghatározására, ami némileg megnehezíti ezen adatok értelmezését; ezen eredmények mellett azt tüntettük fel, hogy azok a VCN vagy DCN egészére érvényesek. A jelölések intenzitásának megítélésékor a „jelen tanulmány” alatt szubjektív mérlegelés eredményei láthatók, mely során a nucleus cochlearis neuronok immunpozitivitásának erősségét a metszetek háttérfestődésével vagy a nucleus cochlearis egyéb sejtjei által mutatott immunjelölődés intenzitásával hasonlítottuk össze. Bár ezen módszerrel nem lehetett meghatározni az immunreakciók abszolút intenzitását, arra mindenképpen alkalmas volt, hogy a különböző neurontípusok immunjelölődését összevegyük, valamint megállapítsuk, hogy egy adott sejt-típus erős immunreakciót adott-e. Fontos megemlíteni, hogy a különböző laboratóriumok a Kv-alegységek jelenlétét gyakran eltérő szinten vizsgálták (mRNS [pl. Sequier és mtsai, 1990; Fitzakerley és mtsai, 2000; Grigg és mtsai, 2000], fehérje [pl. Wang és mtsai, 1994; Rosenberger és mtsai, 2003; Caminos és mtsai, 2005] vagy funkcionális szinten, alegység-specifikus blokkolószer alkalmazásával [pl. Bal és Oertel, 2001; Dodson és mtsai, 2003; Pál és mtsai, 2004]), ahogy ezt a táblázatokban is feltüntettük.

6. Táblázat Kv-alegységek expressziója a nucleus cochlearisban: DTX-érzékeny, LVA alegységek.

Lokalizáció	Kv1.1		Kv1.2		Kv1.6	
	Jelen tanulmány	Referenciák	Jelen tanulmány	Referenciák	Jelen tanulmány	Referenciák
Hallóideg-rost	erős	+ fehérje patkány <sup>a,b</sup>	erős	+ fehérje patkány <sup>a,b</sup>	negatív	
VCN		+ fehérje egér <sup>c</sup> + RNS patkány <sup>d</sup>		+ fehérje egér <sup>c</sup>		
Bushy-sejtek	erős	+ fehérje patkány <sup>a,b,e,f</sup> + áram patkány <sup>e</sup>	erős	+ fehérje patkány <sup>a,b,e,f</sup> + áram patkány <sup>e</sup>	pozitív	+ fehérje patkány <sup>e,f</sup> + áram patkány <sup>e</sup>
Octopus-sejtek	erős	+ áram egér <sup>g</sup> + fehérje denevér <sup>h</sup> + RNS egér <sup>i</sup> + prot patkány <sup>j</sup>	erős	+ áram egér <sup>g</sup> + RNS egér <sup>i</sup>	pozitív	
DCN		+ fehérje egér <sup>c</sup> + RNS patkány <sup>d</sup>		+ RNS patkány <sup>a</sup>		
Piramis-sejtek	6/3	+/- fehérje denevér <sup>h</sup>	6/1		6/2	
Óriás-sejtek	18/11	+/- prot denevér <sup>h</sup>	24/10		8/4	
Szemcse-sejtek	negatív	- fehérje denevér <sup>h</sup> +/- RNS egér <sup>i</sup>	negatív	- RNS egér <sup>i</sup>	negatív	

„Jelen tanulmány” alatt a jelen munka eredményeit tüntettük fel, „Referenciák” alatt a korábban publikált eredményeket tüntettük fel: <sup>a</sup>Camino et al. (2005) Brain Res 1056:118-131; <sup>b</sup>Bortone et al. (2006) Hear Res 211:114-125; <sup>c</sup>Wang et al. (1994) J Neurosci: 14:4588-4599; <sup>d</sup>Sequier et al. (1990) FEBS Lett 263:163-165; <sup>e</sup>Dodson et al. (2003) J Physiol (Lond) 550:27-33; <sup>f</sup>Pál et al. (2005) Hear Res 199:57-70; <sup>g</sup>Bal and Oertel (2001) J Neurophysiol 86:2299-2311; <sup>h</sup>Rosenberger et al. (2003) J Comp Neurol 462:101-120; <sup>i</sup>Grigg et al. (2000) Hear Res 140:77-90; <sup>j</sup>Jung et al. (2005) Neurol Res 27:436-440. Jelen munkában az egyes sejtek immunpozitivitásának intenzitását a háttérrel és/vagy a nucleus cochlearis más neuronjaival összevetve határoztuk meg. Az „erős” és „pozitív” kifejezések könnyen felismerhető, ill. jelentős, de nem túl intenzív immunreakciókat jelölnek; a „negatív” kifejezés pedig az alig megfigyelhető, vagy teljesen hiányzó immunpozitivitást jelöli. Az óriás- és piramis-sejtek esetében a számok a retrogád módon jelölt és azonosított sejtekre vonatkoznak: az első szám az immunpozitív, a második pedig a negatív sejtek számát adja meg. A korábban leközölt adatoknál feltüntettük, hogy milyen fajban és milyen szinten vizsgálták az adott alegység jelenlétét (RNS, fehérje vagy funkcionális [áram] szinten): az adott alegység jelenlétét „+”, „hiányát” „-”-jellel, míg a nem egyértelmű eredményeket „+/-”-jellel jelöltük.

A 6. Táblázat a DTX-érzékeny LVA csatornaalegységek jelenlétének vizsgálatát célzó kísérletek eredményeit foglalja össze. Látható, hogy a Kv1.1-alegység expresszióját a VCN-ben már számos fajban és sejt típuson leírták (Sequier és mtsai, 1990; Wang és mtsai, 1994; Grigg és mtsai, 2000; Bal és Oertel, 2001; Dodson és mtsai, 2003; Rosenberger és mtsai, 2003; Camino és mtsai, 2005; Jung és mtsai, 2005; Pál és mtsai, 2005; Bortone és mtsai, 2006). A DCN esetében azonban már bonyolultabb a kérdés: bár az alegység jelenlétét a

DCN egészében már leírták (Sequier és mtsai, 1990; Wang és mtsai, 1994), sejtspecifikus vizsgálatokat ezidáig csak denevéren végeztek (Rosenberger és mtsai, 2003). Ebből fakadóan a jelen tanulmány az első, amely a piramis- és óriássejtek Kv1.1-expressziós mintázatában tapasztalható heterogenitást leírta. Ezidáig a Kv1.2- és Kv1.6-alegységek nucleus cochlearisban való előfordulásáról viszonylag kevés kísérletes adat állt rendelkezésre. Mindazonáltal a Kv1.2 expresszióját már leírták a VCN-ben (Wang és mtsai, 1994), és jelenlétét mind a bushy- (Pál és mtsai, 2004; Caminos és mtsai, 2005; Bortone és mtsai, 2006), mind pedig az octopus-neuronokban (Grigg és mtsai, 2000; Bal és Oertel, 2001) kimutatták. A VCN-nel ellentétben a Kv1.2 expresszióját a DCN-ben ezidáig csak mRNS szinten jelezték (Caminos és mtsai, 2005). Jelen munka eredményei azt mutatják, hogy a nucleus cochlearis piramis- és óriásneuronjai egyaránt expresszálják a Kv1.2-alegységet.

A közelmúltban egy tanulmány a Kv1.1- és Kv1.2 expressziójának korfüggését vizsgálta patkány nucleus cochlearisban, mind mRNS, mind pedig fehérje szinten. A laboratórium eredményei szerint mindkét alegység expressziója növekedést mutatott a születéstől a 25. napig, ezt követően pedig a felnőtt korú állatokban mérsékelt csökkenés volt tapasztalható (Bortone és mtsai, 2006). Egy másik, a VCN (egyebek között a bushy-sejtek) Kv1.1- és Kv1.2 expresszióját vizsgáló tanulmány (Caminos és mtsai, 2005) ezzel szemben az expresszió folyamatos és lépcsőzetes csökkenéséről számolt be. A csökkenés a 14. postnatalis nap környékén kezdődött, és felnőtt állatokban már csak nagyon alacsony expressziós szintet sikerült kimutatniuk. Ugyancsak ebben a tanulmányban írták le, hogy a Kv1.2-alegységek idővel eltűntek a sejttestekből, míg ezzel egyidejűleg a hallóidegrostok Kv1.2 expressziója fokozatos növekedést mutatott, és a 21. postnatalis napra igen intenzív szintet ért el. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a születés utáni fejlődés során a Kv1.2 expressziójának nemcsak a szintje, hanem lokalizációja is változhat.

Jelen munka eredményei szerint a Kv1.2-alegység mind fiatal, mind pedig idős állatok nucleus cochlearisában expresszálódik, és (a Bortone és mtsai [2006] által leírtakhoz hasonlóan) a Kv1.2-specifikus immunpozitivitás intenzitása fokozódik az életkorral, többek között a DCN neuropiljében is. Fontos megjegyezni, hogy jelen munkában a Kv1.2-alegységek korfüggő transzlokációját figyeltük meg, ami különösen az octopus- és bushy-neuronok esetében volt jelentős: míg a fiatal állatokban a Kv1.2-immunpozitivitás intracellulárisan volt jelen, addig az idősebb állatokban a sejt felszíni membrán igen erős immunjelölődését tapasztaltuk. Ezen megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a hallórendszer fejlődése során a Kv1.2-alegységet tartalmazó funkcionális  $K^+$ -csatornáknak nemcsak a száma változik, hanem a membránsűrűségük is nő. Bár ezen eredmények



funkcionális jelentőségének igazolásához további kísérletek szükségesek, nem tűnik alaptalannak az a feltételezés, hogy a Kv1.2-csatornák membránsűrűségének növekedése szerepet játszhat a hallórendszer érési folyamataiban.

7. Táblázat Kv-alegységek expressziója a nucleus cochlearisban: a tranziens áramokért felelős csatornaalegységek

Lokalizáció	Kv4.2 (LVA)		Kv4.3 (LVA)		Kv3.4 (HVA)	
	Jelen tanulmány	Referenciák	Jelen tanulmány	Referenciák	Jelen tanulmány	Referenciák
Hallóideg-rost	negatív		negatív		negatív	
VCN		+ RNS patkány <sup>a</sup>				+/- RNS patkány <sup>c</sup>
Bushy-sejtek	erős	+ fehérje patkány <sup>b</sup> + áram patkány <sup>b</sup>	erős	+ fehérje patkány <sup>b</sup> + áram patkány <sup>b</sup>	erős	+ fehérje patkány <sup>b</sup> + áram patkány <sup>b</sup>
Octopus-sejtek	erős	+ RNS egér <sup>c</sup>	erős	- RNS egér <sup>c</sup>	erős	
DCN		+ RNS patkány <sup>a,d</sup>		+ RNS patkány <sup>d</sup>	erős (neuropil)	- RNS patkány <sup>c</sup>
Piramis-sejtek	3/1	+ RNS egér <sup>c</sup>	1/0	+/- RNS egér <sup>c</sup>	1/0	
Óriás-sejtek	1/4	+ RNS egér <sup>c</sup>	8/0	+/? RNS egér <sup>c</sup>	0/3	
Szemcse-sejtek	erős, glomeruláris szinapszisok	+/- RNS egér <sup>c</sup>	pozitív	- RNS egér <sup>c</sup>	pozitív, glomeruláris szinapszisok	

„Jelen tanulmány” alatt a jelen munka eredményeit tüntettük fel, „Referenciák” alatt a korábban publikált eredményeket tüntettük fel: <sup>a</sup>Bortone et al. (2006) Hear Res 211:114–125; <sup>b</sup>Pál et al. (2005) Hear Res 199:57–70; <sup>c</sup>Fitzakerley et al. (2000) Hear Res 147:31–45; <sup>d</sup>Serodio and Rudy (1998) J Neurophysiol 79:1081–1091; <sup>e</sup>Weiser et al. (1994) J Neurosci 14:949–972. Jelen munkában az egyes sejtek immunpozitivitásának intenzitását a háttérrel és/vagy a nucleus cochlearis más neuronjaival összevetve határoztuk meg. Az „erős” és „pozitív” kifejezések könnyen felismerhető, ill. jelentős, de nem túl intenzív immunreakciókat jelölnek; a „negatív” kifejezés pedig az alig megfigyelhető, vagy teljesen hiányzó immunpozitivitást jelöli. Az óriás- és piramis-sejtek esetében a számok a retrogád módon jelölt és azonosított sejtekre vonatkoznak: az első szám az immunpozitív, a második pedig a negatív sejtek számát adja meg. A korábban leközlött adatoknál feltüntettük, hogy milyen fajban és milyen szinten vizsgálták az adott alegység jelenlétét (RNS, fehérje vagy funkcionális [áram] szinten): az adott alegység jelenlétét „+”, hiányát „-”-jellel, míg a nem egyértelmű eredményeket „+/-” vagy „+/?”-jellel jelöltük.

A 7. Táblázat a tranziens (inaktiválódó) áram létrehozásáért felelős K<sup>+</sup>-csatornák felépítésében részt vevő Kv-alegységek jelenlétét és megoszlását vizsgáló tanulmányok eredményeit foglalja össze. Érdeemes megemlíteni, hogy a bemutatott adatokon túl egy, a Kv4-főcsaládba tartozó alegységet kódoló mRNS jelenlétét is leírták már patkányban (Drewe és mtsai, 1992). Bár ezen alegység pontos típusa nem ismert, nem valószínű, hogy a Kv4.1 fehérjét kódoló mRNS-ről van szó, ugyanis más tanulmányok ezen alegység hiányáról számoltak be, mind patkány (Serodio és Rudy, 1998), mind pedig egér (Fitzakerley és mtsai, 2000) nucleus cochlearisban.



Mivel a korábbi tanulmányok elsősorban mRNS szinten vizsgálták a tranzienis áramért felelős  $K^+$ -csatornaalegységek jelenlétét, jelen munkának igen fontos részét képezte a Kv4.2, Kv4.3 és Kv3.4 fehérjék nucleus cochlearisban való előfordulásának vizsgálata. Említést érdemel, hogy bár a glomeruláris szinapszisok jelenlétét morfológiai vizsgálatok alapján a DCN-ben már korábban leírták (Kane, 1974; Alibardi, 2004), a jelen kísérletsorozat az első tanulmány, ami rámutatott ezen képletek erős Kv4.2- és közepesen intenzív Kv3.4 expressziójára.

8. Táblázat Kv3.1b-alegység expressziója a nucleus cochlearisban

Lokalizáció	Kv3.1b (HVA)	
	Jelen tanulmány	Referenciák
Hallóidegrost	negatív	
VCN		+ RNS patkány <sup>a,b,c,d</sup> + fehérje patkány <sup>a</sup>
Bushysejtek	erős	+ fehérje patkány <sup>c</sup>
Octopussejtek	erős	- RNS egér <sup>f</sup> + RNS patkány <sup>g,h</sup> - fehérje patkány <sup>h</sup> + fehérje patkány <sup>i</sup>
DCN		+ RNS patkány <sup>c,d</sup> +/- RNS patkány <sup>b</sup>
Piramissejtek	12/3	+ RNS patkány <sup>g,h</sup> - fehérje patkány <sup>h</sup>
Óriássejtek	27/6	+ RNS patkány <sup>g,h</sup> +/? fehérje patkány <sup>h</sup>
Szemcse-sejtek	negatív	+ RNS egér <sup>f</sup> +/? RNS patkány <sup>g,h</sup> +/? RNS patkány <sup>h</sup>

„Jelen tanulmány” alatt a jelen munka eredményeit tüntettük fel, „Referenciák” alatt a korábban publikált eredményeket tüntettük fel: <sup>a</sup>Weiser et al. (1995) *J Neurosci* 15:4298–4314; <sup>b</sup>Weiser et al. (1994) *J Neurosci* 14:949–972; <sup>c</sup>Perney et al. (1992) *J Neurophysiol* 68:756–766; <sup>d</sup>Bortone et al. (2006) *Hear Res* 211:114–125; <sup>e</sup>Pál et al. (2005) *Hear Res* 199:57–70; <sup>f</sup>Grigg et al. (2000) *Hear Res* 140:77–90; <sup>g</sup>Li et al. (2001) *J Comp Neurol* 437:196–218; <sup>h</sup>Perney and Kaczmarek (1997) *J Comp Neurol* 386:178–202; <sup>i</sup>Jung et al. (2005) *Neurol Res* 27:436–440. Jelen munkában az egyes sejtek immunpozitivitásának intenzitását a háttérrel és/vagy a nucleus cochlearis más neuronjaival összevetve határoztuk meg. Az „erős” és „pozitív” kifejezések könnyen felismerhető, ill. jelentős, de nem túl intenzív immunreakciókat jelölnek; a „negatív” kifejezés pedig az alig megfigyelhető, vagy teljesen hiányzó immunpozitivitást jelöli. Az óriás- és piramis-sejtek esetében a számok a retrogád módon jelölt és azonosított sejtekre vonatkoznak: az első szám az immunpozitív, a második pedig a negatív sejtek számát adja meg. A korábban leközlött adatoknál feltüntettük, hogy milyen fajban és milyen szinten vizsgálták az adott alegység jelenlétét (RNS, fehérjeszinten): az adott alegység jelenlétét „+”, hiányát „-”-jellel, míg a nem egyértelmű eredményeket „+/-” vagy „+/?”-jellel jelöltük.

A nucleus cochlearisban a késői típusú  $K^+$ -áram kialakításában legnagyobb jelentőséggel bíró Kv-alegység a Kv3.1 (8. Táblázat). A szerzők nagy része egyetért abban,

hogy a Kv3.1-specifikus mRNS jelen van a nucleus cochlearisban, a fehérje szintű vizsgálatok eredményei azonban már nem ilyen egyértelműek. Az ellentmondás egyik lehetséges magyarázata a korfüggésbeli változásokra vezethető vissza (Bortone és mtsai, 2006): mivel az mRNS mennyiségében bekövetkező változások időben megelőzik a fehérje szintű változásokat, eltérő eredményeket szolgáltathatnak az mRNS és a protein szinten végzett mérések. Mindazonáltal a bushy-sejtek jelen munkában tapasztalt erős Kv3.1-pozitivitása összhangban van korábbi mérési eredményeinkkel (Pál és mtsai, 2005). A jelen munka ugyancsak fontos eredménye az octopus-sejtek erős Kv3.1 expressziójának demonstrálása. A DCN-t illetően elmondhatjuk, hogy mind a piramis-, mind pedig az óriásneuronok mutattak kisebb mértékű variabilitást a Kv3.1-expresszió terén, ami magyarázatul szolgálhat arra, hogy miért nem sikerült a korábbi tanulmányok némelyikében egyértelműen kimutatni Kv3.1-alegységek jelenlétét.

#### Az eredmények funkcionális jelentősége

Bár jelen munkában nem vizsgáltuk a nucleus cochlearis neuronok aktivitását, Kv-expressziós mintázatuk alapján lehetőségünk nyílt néhány funkcionális feltevés megfogalmazására. A DCN piramis-sejtjei igen változatos tüzelési mintázatokra képesek (Kane, 1974), ami az interneurális kapcsolataiknak (Zhang és Oertel, 1994; Oertel és Young, 2004), és membránpotenciáljuk pillanatnyi értékének (Manis és mtsai, 2003) függvénye. A piramis-sejtek nyugalmi membránpotenciáljának kialakításában fontos szerepet játszanak a HCN-csatornák (Pál és mtsai, 2003), és (a jelen munka eredményei alapján) a különböző LVA  $K^+$ -csatornaalegységek (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6, Kv4.2 és Kv4.3) is. Mivel korábban már leírták, hogy a piramis-neuronok nem képesek megtartani a magas frekvenciájú jelek időbeli kódolását (Babalian és mtsai, 2003), logikusnak tűnik az a feltételezés, hogy a Kv-alegységek ezen kombinációja nem vértézi fel a piramis-neuronokat az időben hű tüzelési mintázat kialakításának képességével.

Az óriássejtek szinaptikus kapcsolatairól és elektromos aktivitásáról viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre. Ennek ellenére több szerző eredményei is azt mutatták (Zhang és Oertel, 1993; Ding és mtsai, 1999; Babalian és mtsai, 2003), hogy membrán- és tüzelési tulajdonságaik igen hasonlatosak a piramis-sejtekéhez. Jelen munka eredményei is azt mutatták, hogy a két neurontípus Kv-expressziós mintázata hasonló, azonban (néhány korábbi tanulmányhoz hasonlóan [Perney és Kaczmarek, 1997; Fitzakerley és mtsai, 2000; Rosenberger és mtsai, 2003]) mind a piramis-, mind pedig az óriássejtek esetében némi heterogenitást lehetett megfigyelni, ami valószínűsíti, hogy a két neurontípust további, eltérő

funkcionális tulajdonságokkal rendelkező alcsoportokra lehet osztani. Ezt a hipotézist támasztja alá az is, hogy korábban már leírtuk ezen idegsejtek jelentős morfológiai változatosságát (Pocsai és mtsai, 2007).

A szemcsesejtek számos forrásból kapnak információkat (így a hallóidegtől is), és a cochlearis parallel rostokon keresztül a DCN különböző neuronjaival létesítenek szinaptikus kapcsolatokat (pl. piramis- és óriássejtek, Mugnaini és mtsai, 1980; Zhang és Oertel, 1993; 1994; Ryugo és mtsai, 2003). Ezidáig viszonylag kevés információ állt rendelkezésre a szemcsesejtek funkcionális tulajdonságait illetően, de leírtak rajtuk egy gyorsan inaktiválódó LVA tranziens áramot (A-típusú), aminek nagy jelentősége van az AP-sorozatoknál az első csúcs látenciaidejének meghatározásában; valamint egy lassan inaktiválódó (késői típusú) komponens is, ami az akciós potenciálok után bekövetkező gyors repolarizációt biztosítja (Rusznák és mtsai, 1997). Jelen vizsgálataink tükrében úgy tűnik, hogy a szemcsesejtek tranziens áramáért valószínűleg Kv4.2-alegységeket tartalmazó  $K^+$ -csatornák a felelősek. Érdeemes megemlíteni, hogy a Kv4.2-alegységek megoszlási mintázata a nucleus cochlearisban, és expressziója egyes preszinaptikus végződéseknél, nagyban hasonlít a cerebellumban megfigyeltékhez (nem publikált, saját adatok). Ezek alapján feltételezhető, hogy a Kv4.2-alegységek, a cerebelláris glomeruláris szinapszisoknál leírtakhoz hasonlóan (Shibata és mtsai, 2000; Shibasaki és mtsai, 2004; Strassle és mtsai, 2005), fontos szerepet játszanak a nucleus cochlearis fejlődésében és működésében.

A bushy-sejteken végzett elektrofiziológiai mérések során számos feszültségfüggő  $K^+$ -áram jelenlétét leírták: LVA (Dodson és mtsai, 2003; Rothman és Manis, 2003; Cao és mtsai, 2007), gyorsan inaktiválódó (Manis és Marx, 1991; Rothman és Manis, 2003) és késői típusú (Rothman és Manis, 2003; Cao és mtsai, 2007) komponenseket, amelyek lehetővé teszik ezen neuronok nagyfrekvenciájú tüzelését. Korábbi, enzimatikusan izolált bushy-sejteken és vékonyselet-preparátumokon (Pál és mtsai, 2005) végzett méréseink, továbbá a jelen munka során kimutatott Kv-alegységek jelenléte jó magyarázattal szolgálhat ezen  $K^+$ -áramok komponenseire.

Az octopus-neuronok nagyon rövid excitatórikus posztszinaptikus potenciálokat tüzelnek (Golding és mtsai, 1995; 1999), így feltehetőleg koincidencia detektorokként működnek (Golding és mtsai, 1995; Oertel és mtsai, 2000). Ezen sejtek igen nagy pontossággal (Golding és mtsai, 1995) képesek továbbítani a beérkező ingereket, még az igen magas frekvenciájú (300-800 Hz-es [Golding és mtsai, 1995; Ferragamo és Oertel, 2002]) tartományokban is, míg az előlötti tartományban "ON/OFF" detektorokként működnek.

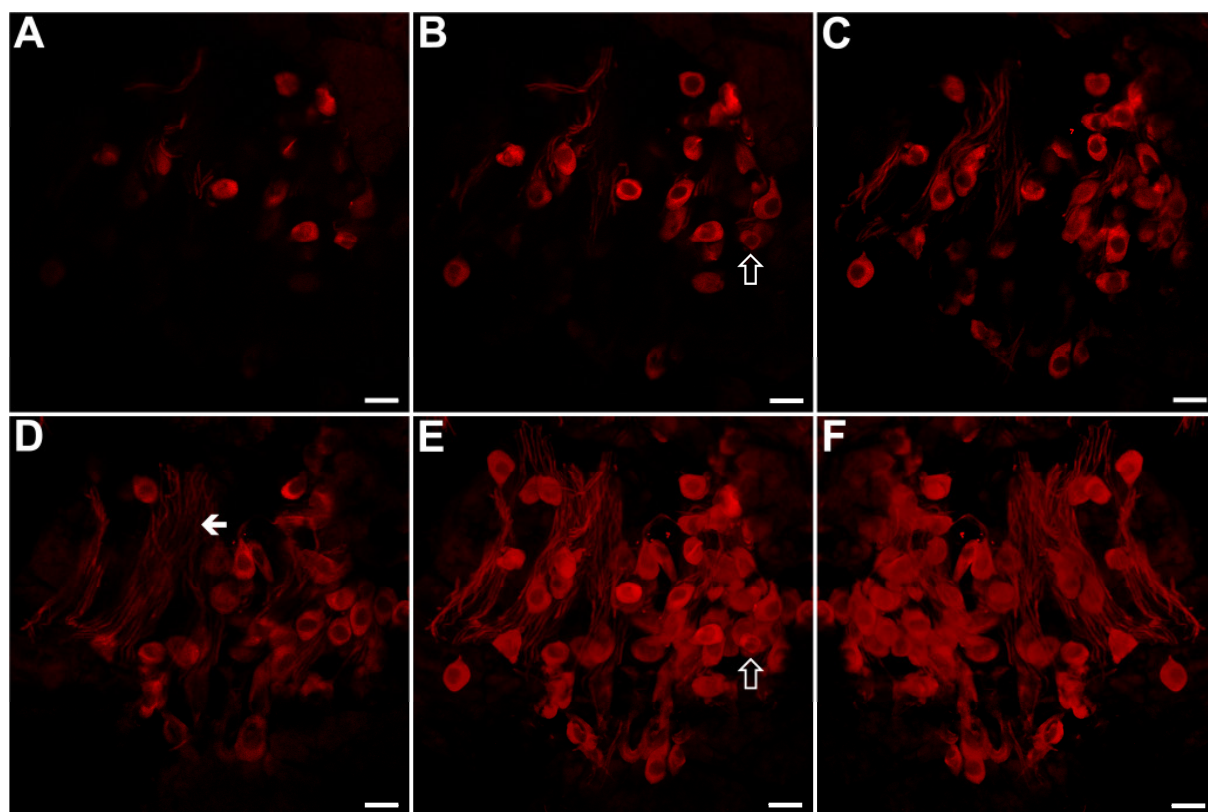
Elektrofiziológiai mérések eredményei azt mutatták, hogy az octopus-sejteknek ezen komplex feladatok ellátásához mindhárom jelentős feszültségfüggő  $K^+$ -áramra szükségük van.

A HCN- (Koch és mtsai, 2004; Notomi és Shigemoto, 2004) és LVA  $K^+$ -csatornák működésének köszönhetően az octopus-sejtek igen alacsony nyugalmi membránpotenciállal és alacsony membránellenállással rendelkeznek. A Kv1.2-alegységek jelen munkában leírt életkorfüggő transzlokációja arra utal, hogy felnőtt állatokban a DTX-érzékeny áram denzitása magasabb, ami ellensúlyozhatja a h-áram denzitásának megemelkedett szintjét. A h-áram expressziójának ezen életkorfüggő növekedését a nucleus cochlearis bushy-neuronjain már leírták (Cuttle és mtsai, 2001), és az octopus-sejtek esetében is felmerültek hasonló változások. A Kv4.2-alegység expressziója az octopus-sejteknek mind a somáján, mind pedig a dendritjeiken megfigyelhető volt, ami arra utal, hogy tranziens  $K^+$ -áramok is részt vehetnek membránjátságaik kialakításában. Minthogy a Kv4.2 fehérje expresszióját már leírták fiatal állatokban (Fitzakerley és mtsai, 2000), feltételezhető, hogy ezen neuronok érési folyamataiban is szerepet játszanak. Az octopus-sejtek HVA  $K^+$ -áramot létrehozó csatornaalegységeket is expresszálnak, amelyek a magas frekvenciájú tüzelést teszik lehetővé. A csatornák ezen szerepét Kv3.1 knock-out egereken végzett kísérletek során az MNTB fősejtjeiben már leírták (Macica és mtsai, 2003).

## Eredmények

A tengerimalac ganglion spirale neuronok morfológiai jellemzői a „cochlearis úszószelet” preparátumban

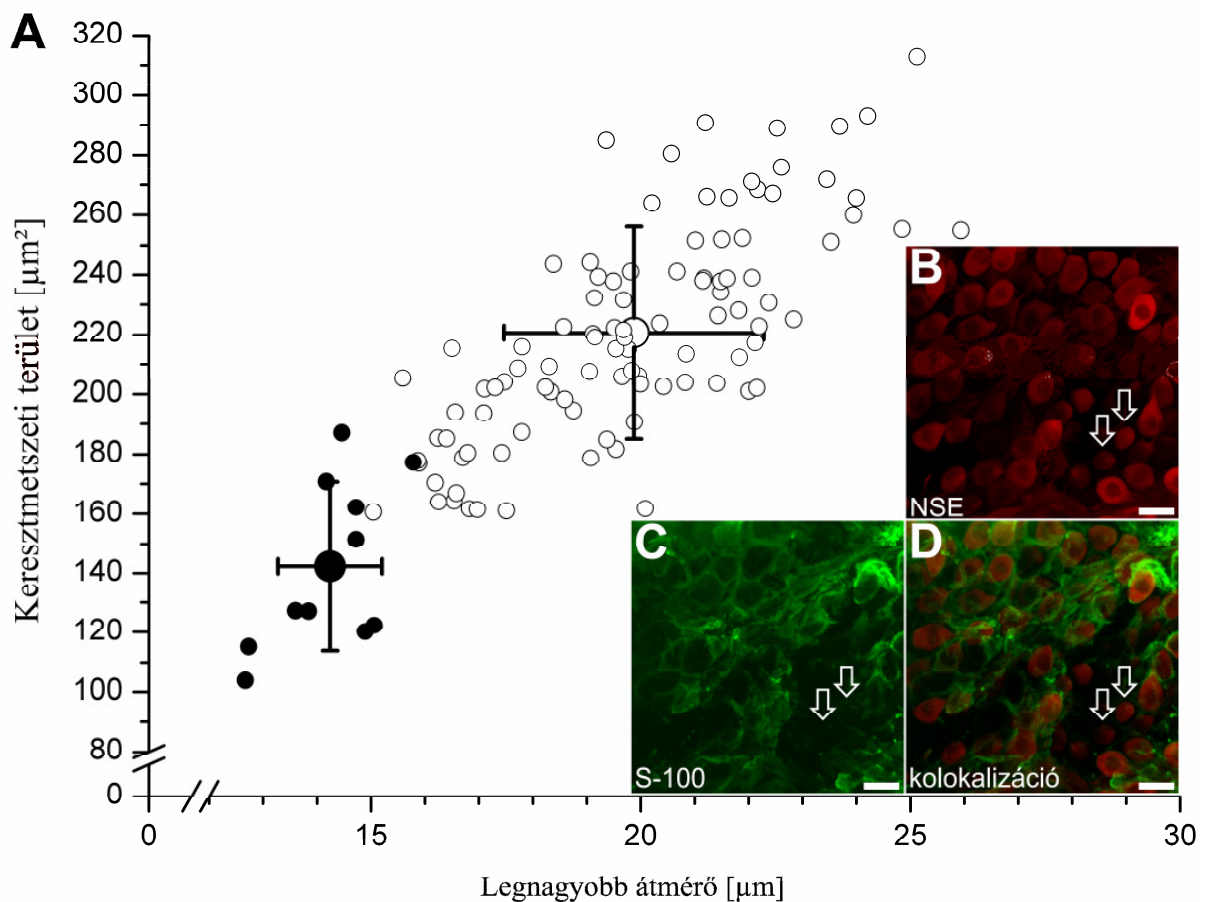
A 23. ábrán NSE jelölt SGC-k láthatók az általunk kifejlesztett cochlearis úszószelet preparátumban. Az 23A ábrán a preparátum tetejéről készített felvétel látható, a 23B ábrán pedig azt az optikai szeletet mutatjuk be, amelyen a nyíllal jelölt sejt legnagyobb keresztmetszete látható. A 23D ábrán az SGC-k erősen NSE-pozitív nyúlványai is megfigyelhetők (nyíl), amelyek lefutása hosszan (a jelen kép esetében kb. 140  $\mu\text{m}$ -en át) követhető. A 23E ábrán egy rekonstruált kép látható, a nyíl a 23B ábrán látott kis sejt helyét mutatja. Az ilyen típusú „rekonstruált” vagy „összetett” képek előnye, hogy az SGC-fészkek



23. ábra Az újonnan kifejlesztett cochlearis úszószelet preparátum alkalmazhatósága ganglion spirale neuronok vizsgálatára

Ganglion spirale neuronok a cochlearis úszószelet preparátumban NSE-specifikus immunjelölést követően. A-D: 1  $\mu\text{m}$  vastag optikai szeletek a preparátum felszínéről (A), illetve 4  $\mu\text{m}$ -rel (B), 9  $\mu\text{m}$ -rel (C) és 16  $\mu\text{m}$ -rel (D) mélyebben. E: Ugyanazon szövetblokk rekonstruált képe (32 optikai szelet felhasználásával). F: Az E ábrán látott rekonstruált kép, 180°-kal elforgatva a függőleges tengelye mentén. Az üres nyilak egy II-es típusú ganglion spirale neuront jelölnek; a D ábrán a tömör nyíl az SGC-k nyúlványaira mutat. Kalibrációk: 20  $\mu\text{m}$ .

háromdimenziós felépítését is megmutatták, így segítségükkel az SGC-k morfológiai tulajdonságait mindig a legmegfelelőbb szögből vizsgálhattuk. Erre példa a 23F ábrán látható felvétel, ami megegyezik a 23E ábrán látható rekonstruált képpel, csak azt elforgattuk 180°-kal a függőleges tengelye körül (ezáltal a preparátum másik oldalát látjuk). Az újonnan kifejlesztett cochlearis úszószelet preparátumokon végzett vizsgálatok során valamennyi NSE-pozitív sejt szferikális, vagy enyhén elnyújtott alakúnak bizonyult, és az esetek nagy részében legalább egy nyúlványuk is látható volt.



24. ábra A nagy (I-es típusú) és kis (II-es típusú) ganglion spirale sejtek elkülönítése

A: A nagy (üres körök) és kis (tömör körök) sejtek keresztmetszeti területeinek ábrázolása a legnagyobb átmérő függvényében (minden kör egy külön sejtet jelöl). A nagy körök az átlagértékeket adják meg (átlag  $\pm$  S.D. formában feltüntetve). B: A ganglion spirale neuronok morfológiai tulajdonságait bemutató rekonstruált kép NSE-specifikus immunjelölést követően. A nyilak II-es típusú sejtteként azonosított neuronokra mutatnak. C: A B ábrán láthatóval megegyező területről készített felvétel, de itt a párhuzamosan végzett S-100-specifikus immunreakció eredménye látható. A nyilak ugyanarra a területre mutatnak, mint a B ábrán, a jelzett kis sejtek pedig egyértelműen S-100-negatívak. Kalibrációk (B és C ábrák): 20  $\mu\text{m}$ .

Az SGC-k morfológiai jellemzőinek meghatározása során a 23. ábrán látottakhoz hasonló optikai szeleteket („Z-stack képek”) használtunk. A vizsgált paramétereket és azok értékeit a 9. Táblázatban foglaltuk össze, míg a 24. ábra a legfontosabb morfológiai jellemzőket mutatja be. Az SGC-ket nagy és kis sejtekre lehetett osztani (a 24B-24D ábrákon a nyilak a kis sejtekre mutatnak). A neuronok átlagos átmérője a nagy sejtek esetében  $19,9 \pm 2,4 \mu\text{m}$  ( $n = 100$ ), míg a kis sejtek esetében  $14,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$  ( $n = 11$ ) volt (24A ábra; a részletes adatok a 9. Táblázatban találhatóak). A kis sejtek aránya 9,9%-nak adódott, azonban mivel a látótérrel minden esetben úgy választottuk meg, hogy azok biztosan tartalmazzanak kis sejteket is, ezen neuronok tényleges előfordulási valószínűsége ennél valószínűleg alacsonyabb.

A mint az a 24A ábrán látható, a cochlearis úszószelet preparátumban a kis és nagy sejtek somatikus átmérője és keresztmetszeti területe eltérő volt. A két sejtípus alakját az elongációs faktoral (részletes leírása az Anyagok és módszerek fejezetben) jellemeztük. Az EF értéke nagy sejtek esetében  $1,42 \pm 0,23$ , kis sejtek esetében pedig  $1,15 \pm 0,28$  volt, azaz a nagy sejtek somája inkább elnyújtottabb, míg a kis sejteké szferikálisabb volt.

Mind a nagy, mind pedig a kis sejtek NSE-pozitívak voltak. A sejtmag mérete mindkét neurontípusban hasonló volt, ugyanakkor a sejtest mérete a kis sejtek esetében kisebb volt, így ezen neuronokban a sejtmagot körülvevő citoplazmatikus gyűrű jelentősen vékonyabb volt, mint a nagy sejtekben, ami igen hasznosnak bizonyult azonosításuk során. Ezen túlmenően a cochlearis úszószelet preparátumban a kis és nagy neuronok átlagos kerülete és keresztmetszeti területe között is jelentős eltérés volt (9. Táblázat), ami lehetővé tette a két sejtípus pontos és megbízható megkülönböztetését.

A rendelkezésünkre álló morfológia adatok alapján, valamint figyelembe véve a nagy és kis sejtek számának arányát, a nagy sejteket I-es típusú, míg a kis sejteket II-es típusú ganglion spirale neuronokként azonosítottuk. Minthogy az I-es típusú sejtekkel ellentétben a II-es típusú neuronok nem rendelkeznek myelinhüvellyel, hipotézisünket S-100 fehérje- és NSE-specifikus kettősfestéssel ellenőriztük. Mivel az S-100-pozitivitás a sejtek myelinhüvellyel áll összefüggésben, csak az I-es típusú sejtek esetében vártunk érdemi jelölődést. Amint az a 24C-24D ábrákon látható, az S-100 fehérje-specifikus immunjelölés eredménye egy kiterjedt immunpozitív hálózat volt, amelyben jól kivehetőek voltak a nagy sejtek somai. A nagy sejtekkel ellentétben a kis sejtek nem mutattak jelentős S-100-pozitivitást, ami a myelinhüvely hiányára utalt, megerősítve az általunk alkalmazott sejtazonosítási eljárás helytállóságát.

9. Táblázat A ganglion spirale sejtek morfológiai tulajdonságait leíró kvantitatív paraméterek

	<b>Legnagyobb átmérő [μm]</b>	<b>Somaticus keresztmetszet [μm<sup>2</sup>]</b>	<b>Somaticus kerület [μm]</b>	<b>Elongációs faktor</b>
<sup>a</sup> <b>Nagy (feltételezett I-es típusú) sejtek (cochlearis úszószelet)</b>	19,9 ± 2,4 (25,93-15,04)	220,6 ± 35,6 (310,9-160,6)	56,5 ± 5,6 (71,54-45,89)	1,42 ± 0,23 (0,93-2,07) *
<sup>b</sup> <b>Kis (feltételezett II-es típusú sejtek) (cochlearis úszószelet)</b>	14,2 ± 1,0 (15,78-12,67)	142,3 ± 28,4 (187,0-103,8)	43,8 ± 4,8 (52,67-36,96)	1,15 ± 0,28 (0,88-1,45) **
<sup>c</sup> <b>Nagy (feltételezett I-es típusú) sejtek (paraffinba ágyazott)</b>	15,4 ± 1,9 (21-10)	112,5 ± 17,0 (154-60)	41,1 ± 3,5 (50-31)	1,69 ± 0,4 (1,05-3,37)
<sup>d</sup> <b>Kis (feltételezett II-es típusú) sejtek (paraffinba ágyazott)</b>	11,4 ± 1,9 (13-8)	67,7 ± 15,8 (94-42)	31,9 ± 4,1 (37-25)	1,53 ± 0,30 (1,14-1,95)
<b>Egér<sup>1</sup></b>				
<b>I-es típusú</b>		129,5		
<b>II-es típusú</b>		114,0		
<b>Patkány<sup>2</sup></b>				
<b>I-es típusú</b>		130 (97-163)		
<b>Kis II-es típusú</b>		101 (94-109)		
<b>Nagy II típusú</b>		148 (130-164)		

<sup>a</sup>: n = 100; <sup>b</sup>: n = 11; <sup>c</sup>: n = 108; <sup>d</sup>: n = 10.

\* és \*\*: 1-1 sejt < 1; az adott sejt esetében nem találtuk a legnagyobb átmérőt indicating that the largest diameter of the cell body was missed in these cases

Átlag ± S.D. A minimum és maximum értékeket is feltüntettük valamennyi paraméter esetében (zárójelben)

<sup>1</sup> Berglund and Ryugo (1987) eredményei alapján

<sup>2</sup> Jagger and Housley (2003) eredményei alapján

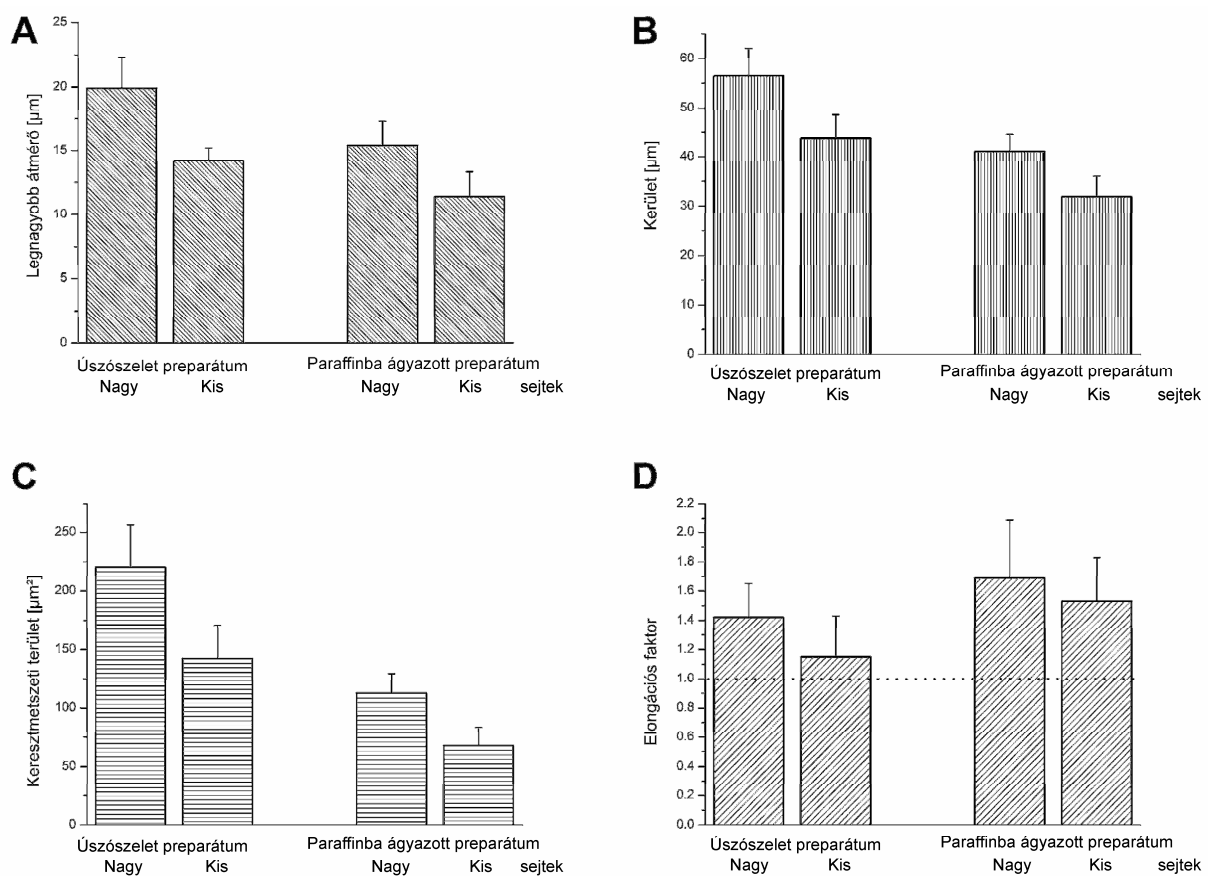
A kis és nagy sejtek paramétereinek különbsége valamennyi esetben statisztikailag szignifikáns volt (p < 0,001; Student-féle t-teszt), ez alól csak az elongációs faktor volt kivétel a paraffinba ágyazott metszetek esetében, ahol nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a két sejtípus között.

A tengerimalac ganglion spirale neuronok morfológiai jellemzői beágyazott preparátumban

Összevetve a beágyazott metszeteken végzett morfometriás mérések adatait a cochlearis úszószelet preparátumokban mért adatokkal, nyilvánvalóvá vált, hogy a hosszabb formalinos fixálás és az azt követő hisztológiai eljárások jelentősen csökkentették a neuronok



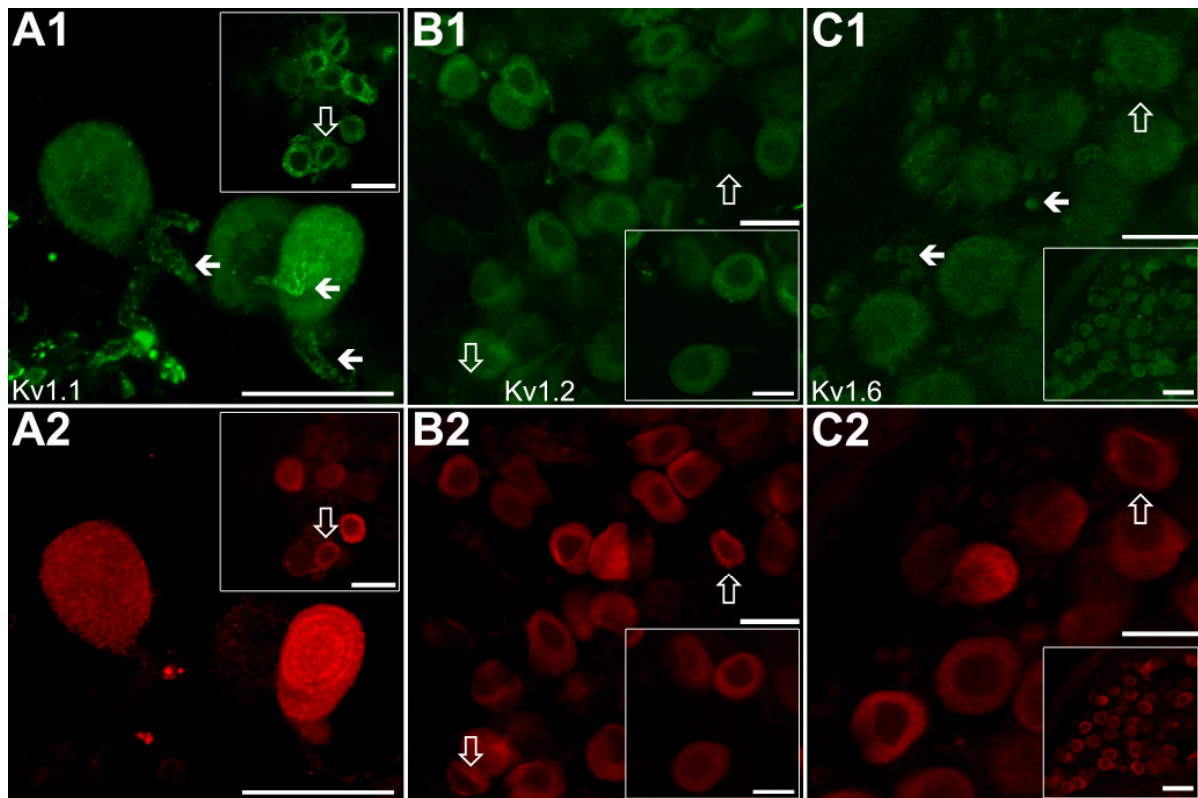
valamennyi jelentős morfológiai paraméterét (somaticus átmérő, terület és keresztmetszeti terület, lásd 9. Táblázat); valamint jelentősen csökkentek a kis és nagy sejtek közti különbségek is (25A–25C ábrák). A hisztológiai feldolgozás a sejtek alakját is jelentősen megváltoztatta, ami részben a jelentősen magasabb EF értékekben, részben a kis és nagy sejtekre jellemző értékek közeledésében nyilvánult meg ( $1,69 \pm 0,4$  a nagy, és  $1,53 \pm 0,3$  a kis sejtek esetében, 25D ábra). A beágyazott preparátumok alkalmazása során nemcsak a sejtek megváltozott morfológiája okozott nehézséget, hanem az is, hogy amennyiben a sejtmag nem került bele a metszési síkba, nem lehetett megállapítani, hogy a metszési sík a sejt középső síkján ment-e keresztül, ami pedig alapvető fontosságú lett volna a sejtek átmérőjének (és a többi morfológiai paraméternek) a meghatározása során.



25. ábra A nagy (I-es típusú) és kis (II-es típusú) ganglion spirale sejteknek a cochlearis úszószeletben és paraffinba ágyazott preparátumban mért morfológiai paramétereinek összehasonlítása

A bemutatott adatok nagy sejtek (cochlearis úszószelet:  $n = 100$ ; beágyazott preparátum:  $n = 108$ ) és kis sejtek ( $n = 11$  és  $n = 10$ ) esetében demonstrálják az SGC-k különböző paramétereit (átlag  $\pm$  S.D.). A: legnagyobb átmérő; B: kerület; C: keresztmetszeti terület; D: elongációs faktor (meghatározásának leírását ld. Anyagok és módszerek fejezetben). A szaggatott vonal az  $EF = 1$  értéket jelzi, ami egy tökéletesen gömb alakú sejtre lenne jellemző. A kis és nagy sejtek paramétereinek különbsége valamennyi esetben statisztikailag szignifikáns volt ( $p < 0,001$ ; Student-féle t-teszt), kivéve a beágyazott metszeteken meghatározott EF értéket, ahol nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a két sejtípus között.

A fenti eredmények és megállapítások alapján kijelenthető, hogy a cochlearis úszószelet preparátum jobban megőrizte az SGC-k geometriáját és méretét, mint a hagyományos technikával készült beágyazott preparátum, és segítségével nagyobb biztonsággal lehetett megkülönböztetni a nagy (I-es típusú) és kis (II-es típusú) sejteket. Jelen vizsgálatsorozatban mindkét bemutatott technikát alkalmaztuk, de eltérő célokra. Az SGC-k által mutatott immunpozitivitások vizsgálata mellett a cochlearis úszószelet preparátumot az I-es és II-es típusú neuronok közti eltérések tanulmányozására használtuk. Ezzel szemben a beágyazott preparátumokon végzett kísérletek célja elsősorban az újonnan kidolgozott technika validálása volt, de ez szolgált a ganglion spirale tengelye mentén esetlegesen fennálló apiko-bazális grádiensek gyors és egyszerű felmérésére is.



26. ábra Cochlearis úszószelet preparátumban vizsgált ganglion spirale sejtek Kv1.1-, Kv1.2- és Kv1.6-immunpozitivitása

A felső sor ábráin (A1-C1) a Kv1.1- (A1), Kv1.2- (B1) és Kv1.6- specifikus (C1) immunreakciók, míg az alsó sorban (A2-C2) ugyanazon látóterek NSE-specifikus jelölésének eredményei láthatók. Az üres nyilak valamennyi esetben II-es típusú sejtekre mutatnak. Érdeemes kiemelni, hogy a B2 ábrán látható II-es típusú SGC nem mutat Kv1.2-pozitivitást. Az A1 és A2 ábrákat 16, egyenként 2  $\mu$ m vastag optikai szeletből rekonstruáltuk. Az A1 képen látható tömör nyilakkal jelölt nyúlványok erősen foltos jellegű Kv1.1-membránjelölődést mutattak. A C1 ábrán látható tömör nyilak Kv1.6-pozitív nyúlványok keresztmetszeteit jelölik. Kalibrációk: 20  $\mu$ m (valamennyi esetben).

Az alacsony feszültség hatására aktiválódó, DTX-érzékeny  $K^+$ -áramért felelős alegységek expressziója az SGC-kben

Jelenlegi ismereteink szerint az alacsony feszültség hatására aktiválódó, DTX-érzékeny  $K^+$ -áram kialakulásáért három Kv-alegység jelenléte (Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.6) lehet felelős. Amint az a 26. ábrán látható, az SGC-kben mind a Kv1.1- (26A1 ábra), mind a Kv1.2- (26B1 ábra), mind pedig a Kv1.6-alegység (26C1 ábra) expresszálódik. A Kv1.1-specifikus jelölés intenzitása erős volt, és valamennyi neuron pozitívnak bizonyult (25/25 sejt, 26A1 és 26A2 ábrák). Az immunjelölődés mind a sejtesteken, mind pedig a nyúlványokon megfigyelhető volt. Bár a Kv1.1-specifikus immunpozitivitás intracellulárisan is jelen volt, a jelölődés a sejtek felszínén is látható volt, ahol (különösen a nyúlványok esetében) kifejezetten foltos jelleget mutatott (tömör nyilak a 26A1 ábrán). A Kv1.1-expresszió terén nem tapasztaltunk különbséget az I-es és II-es típusú sejtek között (lásd 26A1 és 26A2 ábrák inzertjei).

Az SGC-k nagy része Kv1.2-pozitív volt (184/188, az adatokat a 10. Táblázatban foglaltuk össze), az immunjelölődés intenzitása azonban gyengébb volt, mint a Kv1.1-specifikus jelölés esetében. A Kv1.1-specifikus reakcióhoz hasonlóan az immunpozitivitás intracellulárisan is jelen volt (26B1 és 26B2 ábrák). Az immunjelölés elvégzése után elsősorban a sejtestek jelölődtek, bár néhány, egyértelműen Kv1.2-pozitív nyúlvány keresztmetszeti képe is látható volt, amelyeknél az immunreakció a sejtfelszíni membránban volt jelen. Fontos megjegyezni, hogy mind a négy Kv1.2-negatív sejt II-es típusú neuron volt (a 26B1 és 26B2 ábrákon nyilakkal jelöltünk 2 példát). Minthogy jelen munkában a Kv1.2-specifikus jelölések során (kizárólag a cochlearis úszószelet preparátumokat figyelembe véve) összesen 8 II-es típusú neuront sikerült azonosítanunk, arra következtettünk, hogy a Kv1.2-alegységek expressziója tekintetében különbség lehet a két SGC-típus között.

10. Táblázat Kv-alegységek megoszlása a tengerimalac ganglion spiraleban

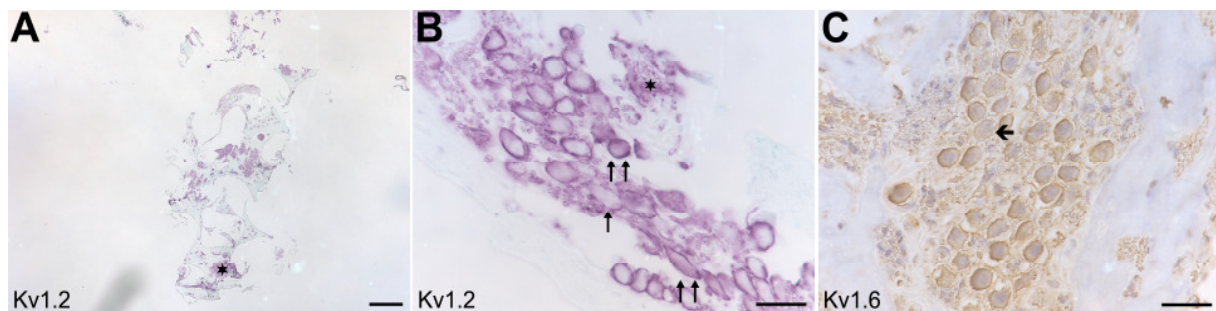
<b>Alegység</b>	<b>Cochlearis úszószelet preparátum</b>	<b>Paraffinba ágyazott preparátum</b>
<b>Kv1.1</b>	25/25	172/180
<b>Kv1.2</b>	184/188	547/572
<b>Kv1.4</b>	87/87	815/840
<b>Kv1.6</b>	104/104	977/1025
<b>Kv3.1b</b>	70/70	484/486
<b>Kv3.2</b>	0/42	3/74
<b>Kv3.4</b>	102/118	379/416
<b>Kv4.2</b>	201/242	337/436
<b>Kv4.3</b>	128/128	576/584

A táblázat valamennyi vizsgált SGC eredményét tartalmazza. Az első szám az immunpozitív neuronok számát adja meg, míg a második szám a vizsgált neuronok számát mutatja.

A ganglion spirale neuronok gyenge Kv1.6-pozitivitást is mutattak (26C1 és 26C2 ábrák). A Kv1.1- és Kv1.2-specifikus jelölésekhez hasonlóan az immunpozitivitás itt is jelen volt mind intracellulárisan, mind pedig a sejtek felszínén. A sejtek nyúlványai is pozitívak voltak, ami az axonok keresztmetszeti képein volt a legszembetűnőbb (néhány példát tömör nyilakkal jelöltünk a 26C1 ábrán). Valamennyi vizsgált sejt Kv1.6-pozitív volt (104/104), és nem tapasztaltunk érdemi eltérést az I-es és II-es típusú sejtek között (a 26C1 és 26C2 ábrákon az üres nyíl egy Kv1.6-pozitív II-es típusú SGC-re mutat).

A Kv1.1-, Kv1.2- (27A és 27B ábrák) és Kv1.6-alegységek (27C ábra) jelenlétét beágyazott preparátumokon is sikerült igazolni. A 27A és 27B ábrák a Kv1.2-specifikus immunjelölés eredményét mutatják kis és nagy nagyítás mellett. Mint az a 27A ábrán látható, a Kv1.2-specifikus immunfestés során csak a sejtfejszkek (egyiküket csillag jelöli) jelölődtek. Ez és további, ehhez hasonló kis nagyítású felvételek segítségével közvetlenül össze lehetett hasonlítani ugyanazon modiolus apikális és bazális területeinek immunpozitivitási intenzitását, azonban az általunk vizsgált Kv-alegységek egyikénél sem tapasztaltunk jelentős eltérést. A nagyobb nagyítású felvételeken (27B ábra) jól látható volt az egyes sejtek immunjelölődése, ami különösen kifejezett volt a sejtek felszínén. Összesen 572 sejt Kv1.2-

pozitivitását vizsgáltuk, melyek közül 547 SGC expresszálta a kérdéses alegységet (96 %-os pozitivitás). A sejtestek mellett a nyúlványok keresztmetszete is pozitívnak bizonyult (egy ilyen példát csillaggal jelöltünk a 27B ábrán). Fontos megjegyezni, hogy az erősen pozitív ganglion spirale neuronok mellett olyan SGC-ket is láttunk, amelyek gyengébb (de egyértelműen pozitív) immunjelölődést mutattak, és ezek a sejtek gyakran egy-egy erősen pozitív neuron közvetlen közelében voltak megfigyelhetők (27B ábrán egyszeres, illetve dupla nyilak jelölnek néhány példát), ami felveti annak lehetőségét, hogy az egyes sejtek eltérő mértékben expresszálják a Kv1.2-alegységet.



27. ábra Ganglion spirale neuronok paraffinba ágyazott metszeteken végzett Kv1.2- és Kv1.6-specifikus immunjelölése

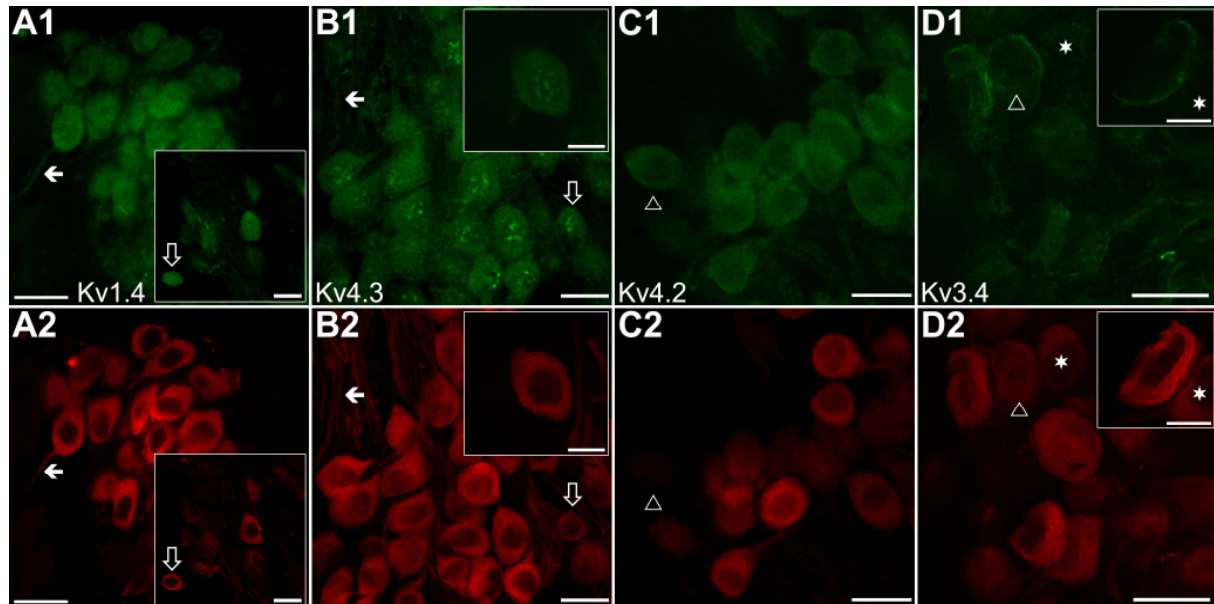
A: Egy teljes modiolusról készített kis nagyítású felvétel, amelyen jól láthatók a Kv1.2-pozitív sejtfejszkek (egyiküket csillaggal jelöltük). B: Kv1.2-specifikus jelölés, nagy nagyításban. A kettős nyilak erősen pozitív sejteket jelölnek, míg az egyszeres nyíl egy gyengén jelölődött neuronra mutat. A csillaggal jelölt területen erősen pozitív idegrostok keresztmetszetei láthatók. C: Kv1.6-specifikus jelölés, a nyíl egy, a környező sejtekhez képest elhanyagolható pozitivitást mutató sejtet jelöl. Ezt és az ehhez hasonló neuronokat Kv1.6-negatív sejteknek minősítettük. Kalibrációk: 250  $\mu$ m (A) 25  $\mu$ m (B, C).

A beágyazott preparátumok Kv1.6-pozitivitása (27C ábra) nagymértékben hasonlított a cochlearis úszószelet preparátumoknál tapasztaltakhoz. Az immunpozitivitás egyaránt jelen volt a sejtek felszínén és intracellulárisan, továbbá a neuronok nyúlványai is Kv1.6-pozitívnak bizonyultak. A Kv1.6-pozitív sejtek aránya 95 % volt (977/1025, egy egyértelműen negatív sejtre tömör nyíl mutat a 27C ábrán).

A gyorsan inaktiválódó  $K^+$ -áramért felelős alegységek jelenléte

Ismeretes, hogy a Kv1.4-, Kv3.4- és Kv4.2/4.3-alegységeket tartalmazó  $K^+$ -csatornák tranziensen aktiválódó  $K^+$ -áramot hoznak létre. A Kv1.4-alegység jelenlétének és megoszlásának vizsgálata a jelen tanulmányban két okból is különösen érdekesnek ígérkezett: egyrészt a Kv1.4-alegységek kapcsolódhatnak DTX-érzékeny Kv-alegységekkel, módosítva az általuk létrehozott áram kinetikáját; másrészt pedig korábban már leírták a Kv1.4-

immunpozitivitás hiányát patkány nucleus cochlearisban (Dodson és mtsai, 2003; Pál és mtsai, 2005), így felmerült a kérdés, hogy vajon ez az alegység a hallórendszer teljes kezdeti szakaszából hiányzik-e, beleértve a ganglion spiralet is.



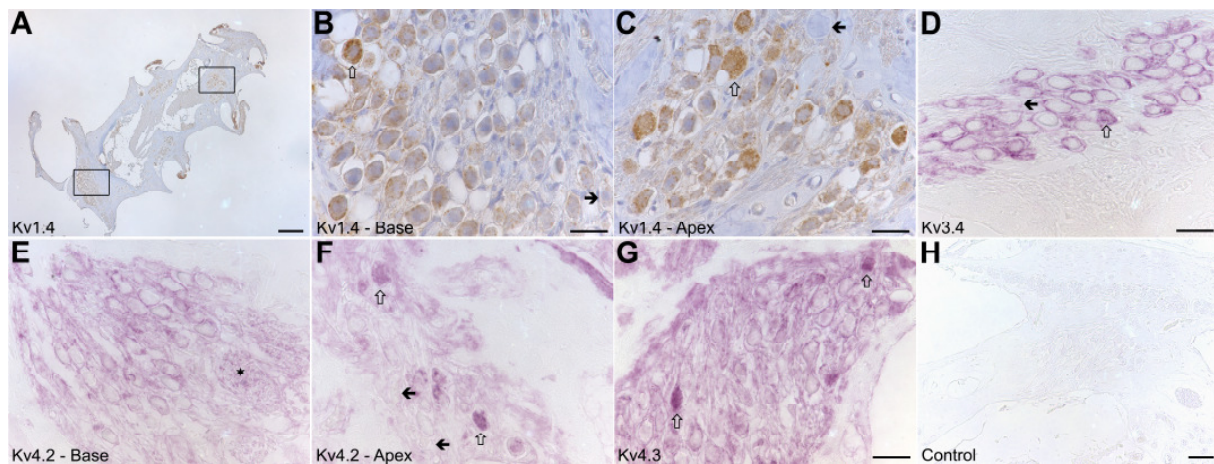
28. ábra A ganglion spirale neuronok Kv1.4-, Kv4.2-, Kv4.3- és Kv3.4-specifikus immunjelölődése cochlearis úszószelet preparátumban  
A felső sor (A1–D1) képein a Kv1.4- (A1), Kv4.3- (B1), Kv4.2- (C1) és Kv3.4-specifikus (D1) immunreakciók, míg az alsó sorban ugyanezen látóterek NSE-specifikus jelölésének eredményei láthatók. Az üres nyilak II-es típusú neuronokra mutatnak. Az A1/A2 és B1/B2 ábrákon a tömör nyilak gyengén Kv1.4- és Kv4.3-pozitív idegnyúlványokra mutatnak. A C1 és C2 ábrákon látható nyílhegyek egy olyan sejtet jelölnek, ami gyenge NSE-, de erős Kv4.2-pozitivitást mutatott. A D1 és D2 ábrákon látható csillagok egy Kv4.3-negatív neuront jelölnek. Kalibrációk: 10  $\mu$ m (C1, C2, D1 és D2), 20  $\mu$ m a többi ábra esetében.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a ganglion spirale neuronok érdeki Kv1.4-expresszióval jellemezhetők (28A1–A2 ábrák). A jelölődés főleg a neuronok sejttestét érintette, intenzitása pedig változó volt. A nyúlványok csak gyenge pozitívitást mutattak (tömör nyilak a 28A1 és 28A2 ábrákon). A Kv1.4-specifikus immunreakció valamennyi vizsgált sejtben jelen volt (87/87), függetlenül azok típusától (28A1 és 28A2 ábrák inzertjei).

A paraffinba ágyazott preparátumban megfigyelt Kv1.4-specifikus jelölés megoszlása hasonló volt a cochlearis úszószeletben tapasztaltakhoz (29A–C ábrák). A bemutatott kis nagyítású felvételen (29A ábra) az immunpozitív SGC-k sejttestei és a gyengébben jelölődött nyúlványaik egyaránt megfigyelhetők. A nagyobb nagyítású felvételeken az egyes sejtek Kv1.4-specifikus immunpozitivitása, valamint annak szemcsés jellege figyelhető meg, ami mind intracellulárisan, mind pedig a sejt felszíni membránban jelen volt. Összességében a



sejtek 97%-a bizonyult Kv1.4-pozitívna (815/840, a 29B és 29C ábrákon a tömör nyilak Kv1.4-negatív neuronokra mutatnak). Érdeemes megfigyelni, hogy egyes sejtek a szomszédos neuronokénál erőteljesebb immunpozitivitást mutattak (üres nyilak a 29B és 29C ábrákon, ezen sejtek aránya 13% volt); ilyen neuronok a cochlea bazális (29B ábra) és apikális (29C ábra) területein egyaránt előfordultak.



29. ábra A ganglion spirale neuronok Kv1.4-, Kv4.2-, Kv4.3- és Kv3.4-specifikus immunjelölődése hagyományos paraffinba ágyazott szövet metszeteiken

A: Egy teljes modiolus Kv1.4-specifikus jelöléséről készített kis nagyítású felvétel. A B és C ábrák a cochlea bazális ill. apikális részéről (a négyzetekkel jelölt területekről) készített felvételek. B: A cochlea bazális területének Kv1.4-specifikus jelöléséről készített felvétel. Az üres nyíllal jelölt sejt különösen erős és szemcsés jellegű immunpozitivitást mutatott, míg a tömör nyíl egy Kv1.4-negatív sejtre mutat. C: A cochlea apikális területének Kv1.4-specifikus immunfestése nagy nagyításban. A nyilak jelentései megegyeznek a B ábránál leírtakkal. D: Kv3.4-specifikus immunreakcióról készített nagy nagyítású felvétel. Az üres nyíl egy különösen erős immunreakciót adó sejtre mutat, a tömör nyíl pedig egy Kv3.4-negatív sejtet jelöl. E: A cochlea bázisánál található ganglion spirale neuronok Kv4.2-specifikus immunpozitivitásáról készített nagy nagyítású felvétel. A csillag erős Kv4.2-specifikus reakciót adó nyúlványok keresztmetszetét jelöli. F: A cochlea apexénél található ganglion spirale neuronok Kv4.2-specifikus immunpozitivitásáról készített nagy nagyítású felvétel. A tömör nyilak Kv4.2-negatív sejteket jelölnek; az üres nyilak két, különösen erős immunreakciót adó sejtre mutatnak. G: A cochlea középső részében található ganglion spirale sejtek Kv4.3-immunpozitivitását bemutató nagy nagyítású felvétel. Az üres nyilak két, különösen erős immunreakciót adó sejtre mutatnak. H: A Kv4.3-specifikus antitestet immunizáló peptidjével végzett preadszorpciós kontrollkísérlet. F: Kv3.1b-specifikus immunreakcióról készített nagy nagyítású felvétel. A két nyíl egy erősen Kv3.1b-pozitív nyúlványra mutat. Kalibrációk: 250  $\mu\text{m}$  (D), 50  $\mu\text{m}$  (H) és 25  $\mu\text{m}$  (többi ábra).

A kísérletek következő lépéseként a Kv4.2- és Kv4.3-alegységek expresszióját vizsgáltuk, amelyek (akárcsak a Kv1.4-alegységek) az LVA tranziens  $\text{K}^+$ -áramok létrehozásában játszanak szerepet. A cochlearis úszószelet preparátumban valamennyi

vizsgált sejt (128/128) Kv4.3-pozitív volt. A Kv4.3-specifikus immunjelölődés elsősorban a sejttesteket érintette (28B1 és 28B2 ábrák), de kisebb mértékben a nyúlványokon is megfigyelhető volt (tömör nyilak a 28B1 és 28B2 ábrákon). Az immunpozitivitás gyakran intracellulárisan is megjelent, és kifejezetten szemcsés jellegű volt. Az I-es és II-es (üres nyilak a 28B1 és 28B2 ábrákon) típusú neuronok egyaránt festődtek.

Az SGC-k Kv4.2-immunpozitivitásának erőssége változatos volt (28C1 és 28C2 ábrák), és elsősorban a sejttesteken volt megfigyelhető (érdemes kiemelni a nyílheggyel jelölt sejtet, ami gyenge NSE-, ugyanakkor erős Kv4.2-specifikus immunpozitivitást mutat), a nyúlványok jelölődése pedig meglehetősen gyenge volt. A cochlearis úszószelet preparátumban a Kv4.2-pozitív sejtek aránya 83% volt (201/242), és nem tapasztaltunk különbséget a két sejtípus között.

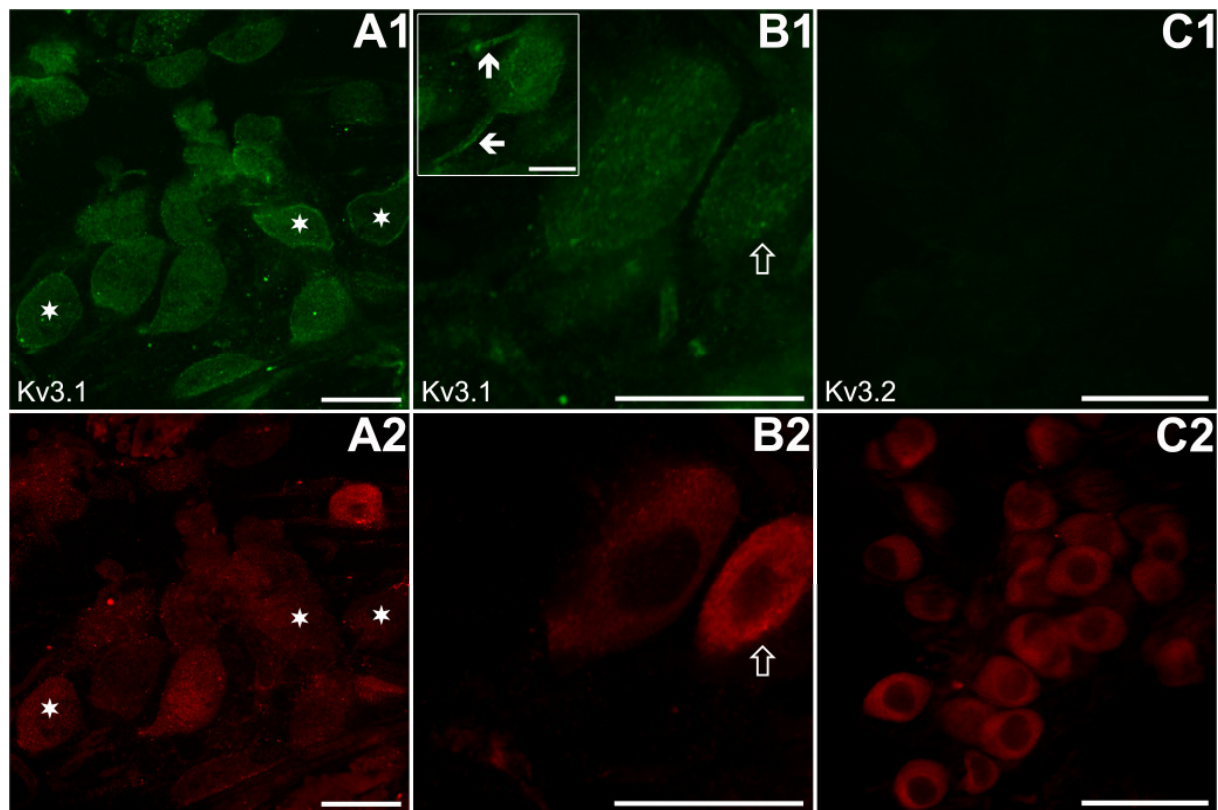
A Kv4.2- és Kv4.3-alegységek expresszióját beágyazott preparátumokon is vizsgáltuk, az eredményeket a 29. ábrán foglaltuk össze. A szövettani metszeteken a sejtek 77%-a bizonyult Kv4.2-pozitívnak (n = 436, 29E és 29F ábrák), a tömör nyilak néhány Kv4.2-negatív sejtet jelölnek. Az immunpozitivitás elsősorban a sejttest körvonalát érintette, de egyes esetekben jelentős intracelluláris festődést is meg lehetett figyelni (pl. az üres nyilakkal jelölt sejtek a 29F ábrán). Az idegsejtek nyúlványainak Kv4.2-specifikus jelölődése is számottevőnek bizonyult (lásd a csillaggal jelölt területet a 29E ábrán).

Az úszószelet preparátumhoz hasonlóan a beágyazott metszetekben található SGC-ket is erőteljes Kv4.3-pozitivitás jellemezte (29G ábra), és különösen intenzív immunjelölődést tapasztaltunk egyes neuronok esetében (pl. a nyilakkal jelölt sejtek a 29G ábrán). A 29H ábrán a számos preadszorpciós kontrollkísérlet egyikének eredménye látható, ahol érdemi immunjelölődés nem figyelhető meg.

A fentebb említett három Kv-alegység jelenléte alapján valószínűsíthető, hogy az SGC-k rendelkeznek LVA  $K^+$ -áramokkal. A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az SGC-k rendelkeznek-e a tranziens HVA  $K^+$ -áramot kialakító Kv3.4-alegységgel. A cochlearis úszószelet preparátumokban vizsgált 118 neuron közül 102 mutatott Kv3.4-specifikus immunpozitivitást (86%, 28D1 és 28D2 ábrák, két Kv3.4-negatív sejtet csillaggal jelöltünk). A pozitív sejtek esetében az immunjelölődés intenzitása változó volt. A Kv3.4-specifikus jelölődés mind az I-es, mind pedig a II-es típusú neuronok sejttestén jelen volt, ugyanakkor a nyúlványok érdemi immunpozitivitást nem mutattak. Egyes neuronok esetében különösen erős volt a sejtmembrán immunpozitivitása (erre példa a 28D1 ábrán nyílheggyel jelölt, illetve az inzerten látható két sejt).



A paraffinba ágyazott preparátumokban az SGC-k túlnyomó többsége Kv3.4-pozitív volt (a vizsgált 416 sejt 91 %-a; 29D ábra). A tömör nyíl egy Kv3.4-negatív neuronra mutat, míg az üres nyíl egy erősen Kv3.4-pozitív sejtet jelöl. Az immunreakció a sejtesteken volt a legkifejezettebb, míg a nyúlványok esetében nem tapasztaltunk különösebben jelentős immunjelölődést.



30. ábra A ganglion spirale neuronok Kv3.1b-, és Kv3.2-specifikus immunreakciója cochlearis úszószelet preparátumban

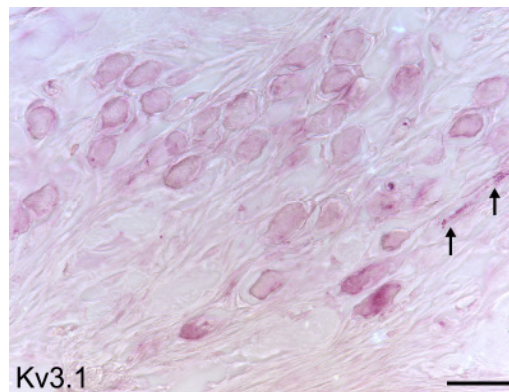
A felső sor (A1-C1) képein a Kv3.1b- (A1-B1), és Kv3.2-specifikus (C1) immunreakciók, míg az alsó sorban ugyanezen látóterek NSE-specifikus jelölésének eredményei láthatók. Az A1 ábrán csillaggal jelölt neuronok sejtmembránja intenzív immunreakciót mutatott. A B1 és B2 ábrákon az üres nyíl egy II-es típusú neuronra mutat. A B1 ábra inzertjén a nyilak egy erősen Kv3.1b-pozitív nyúlványt jelölnek. A C1 ábrán a tengerimalac SGC-k Kv3.2-negativitását demonstráló Kv3.2-specifikus immunjelölés eredménye látható. A C2 ábrán ugyanezen látóter NSE-specifikus immunreakciójának eredménye látható. Kalibrációk: 10  $\mu\text{m}$  (B1 inzert) és 20  $\mu\text{m}$  (a többi ábra esetében).

Két, a késői típusú  $\text{K}^+$ -áramért felelős alegység jelenléte és megoszlása

A késői típusú  $\text{K}^+$ -csatornák felépítésében részt vevő számos Kv-alegység közül jelen munkában a Kv3.1b- és a Kv3.2-alegységek jelenlétét vizsgáltuk. A cochlearis úszószelet preparátumban a sejtek nagy része Kv3.1-pozitív volt (30A1, 30A2, 30B1 és 30B2 ábrák). A sejtek felszíne a citoplazmánál erőteljesebben jelölődött (a 30A1 ábrán csillagokkal jelöltünk

néhány szemléletes példát). A nyúlványok immunjelölődése foltos jellegű volt (lásd pl. a 30B1 ábra inzertjén nyilakkal jelölt sejteket). Mind az I-es, mind pedig a II-es típusú sejtek Kv3.1b-pozitívnak bizonyultak (a 30B1 és 30B2 ábrákon az üres nyilak II-es típusú neuronokat jelölnek).

A beágyazott metszetek esetében az úszószelet preparátumhoz hasonlóan a sejtek nagy része (486/488, 31 ábra), valamint a nyúlványok egy része (nyilak a 31. ábrán) mutatott Kv3.1-expressziót.



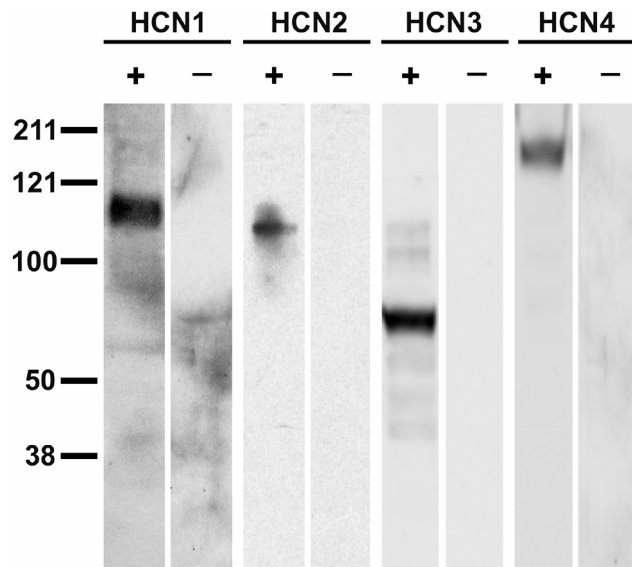
31. ábra A ganglion spirale neuronok Kv3.1b-immunreakciója paraffinba ágyazott szövetmetszeten Kv3.1b-specifikus immunreakcióról készített nagy nagyítású felvétel. A két nyíl egy erősen Kv3.1b-pozitív nyúlványra mutat. Kalibrációk: 25  $\mu$ m

A jelen munkában vizsgált másik, ugyancsak késői típusú áramért felelős Kv-alegység (Kv3.2) nem expresszáldott az SGC-kben. Ezen megfigyelésünket mind a cochlearis úszószelet preparátumokon (30C1 és 30C2 ábrák), mind pedig a beágyazott metszeten végzett kísérletek alátámasztották, ami arra utal, hogy ezen alegység szerepe elhanyagolható az SGC-k késői típusú  $K^+$ -áramának kialakításában.

#### A HCN-specifikus antitestek validálása

A HCN-alegységekből felépülő ioncsatornák aktivációja a hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationáramot ( $I_h$ ) hozza létre. Minthogy az  $I_h$  jelenlétét már leírták az SGC-ken, a létrehozásáért felelős csatornák alegység-összetételéről azonban nem áll rendelkezésünkre információ, mind a négy ismert HCN-csatornaalegység jelenlétét és megoszlását vizsgáltuk. Mivel a jelen munkában használt antitesteket tengerimalacon ezidáig még nem vizsgálták, az immunhisztokémiai eredményeket teljes ganglion spirale mintákon végzett Western-blot kísérletekkel validáltuk. Amint az a 32. ábrán látható, valamennyi HCN-specifikus antitest egyetlen immunpozitív sávot adott a várt molekulatömeg

értékeknél, vagy azok közelében, amik a blokkoló peptidekkel végzett preadszorpciós kontrollkísérletek során eltűntek.

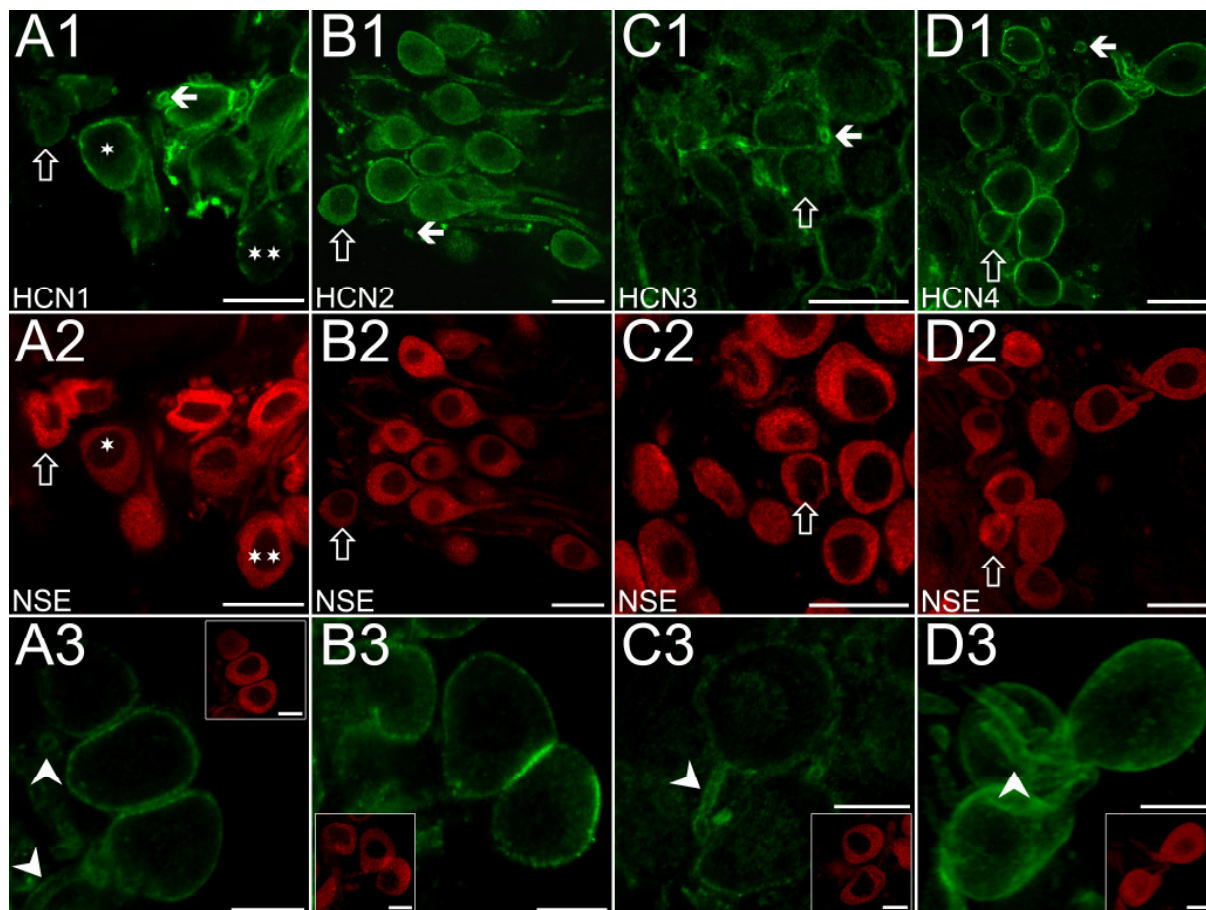


32. ábra Teljes ganglion spiralen végzett Western-blot kísérletek. A „+”-szal jelölt sávok a szövetpreparátumon végzett Western-blot kísérletek, a „-”-szal jelölt sávok pedig a párhuzamosan végzett preadszorpciós kontrollkísérletek eredményeit mutatják be. Az alkalmazott fehérjestandard molekulatömeg-értékeit a baloldalon tüntettük fel (kDa).

A ganglion spirale neuronok HCN-alegység expressziós mintázata

Valamennyi vizsgált HCN-alegység expresszióját sikerült kimutatni a cochlearis úszószelet preparátumokon végzett fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok során (33. ábra). Látható, hogy a sejtmembrán jelölődése különösen intenzív volt, ami így jól kirajzolta az egyes sejtek körvonalát, bár kisebb mértékű citoplazmatikus immunjelölődést is meg lehetett figyelni, különösen a HCN2-specifikus antitest esetében (33B1 ábra).

A HCN1-pozitivitás mind a sejtesteken, mind pedig a nyúlványokon jelen volt (2A1; a tömör nyíl egy immunpozitív nyúlvány keresztmetszetére mutat). A HCN1-pozitivitás enyhén foltos jellegű volt, az immunpozitív területek pedig egyenletesen oszlottak meg a sejt felszínén (a 33A3 ábrán egy nagy nagyítású felvétel látható). Ezen technikával 89 sejtet vizsgáltunk, és valamennyi HCN1-pozitívnak bizonyult, bár az egyes sejtek immunjelölődésének intenzitása eltérőnek bizonyult (pl. a 33A1 ábrán megjelölt sejtek; az egy csillaggal jelölt neuron immunpozitivitása erősebb, mint a két csillaggal jelölt neuroné). Azt is megállapítottuk továbbá, hogy az I-es, illetve II-es típusú SGC-k egyaránt expresszálják a HCN1-alegységet (33A1 és 33A2 ábrák).



33. ábra A ganglion spirale sejtek HCN-pozitivitása cochlearis úszószelet preparátumban vizsgálva

A felső sor (A1–D1) képein a HCN1- (A1), HCN2- (B1), HCN3- (C1) és HCN4-specifikus (D1) immunreakciók, míg az alsó sorban ugyanezen látóterek NSE-specifikus jelölésének eredményei láthatók. Az üres nyilak valamennyi esetben II-es típusú sejteket jelölnek, a tömör nyilak pedig erősen HCN-pozitív nyúlványok keresztmetszetére mutatnak. Az A1–A2 ábrákon az egyszeres csillag egy intenzíven, a kettős csillag pedig egy kevésbé intenzíven festődött sejtet jelöl. Az A3, B3, C3 és D3 ábrák a HCN1-, HCN2-, HCN3- és HCN4-specifikus immunpozitivitások megoszlását mutatják be nagy nagyításban. A nyílhegyek HCN-pozitív nyúlványokra mutatnak. Az inzertek a látóterek NSE-specifikus immunjelölésének eredményeit mutatják. Kalibrációk: 20  $\mu\text{m}$  (A1–D2) és 10  $\mu\text{m}$  (A3–D3).

A HCN2-immunpozitivitás megoszlása (33B1, 33B2 és 33B3 ábrák) hasonló volt a HCN1-specifikus antitestnél tapasztaltakhoz, eltekintve a valamivel erősebb intracelluláris jelölődéstől. Az immunpozitivitás mind a sejtesteken, mind pedig a nyúlványokon (a tömör nyíl erre mutat egy példát) megfigyelhető volt, és némileg foltos jellegűnek bizonyult. A HCN1-specifikus jelöléshez hasonlóan az egyes sejtek (gyakran akár szomszédos neuronok) immunpozitivitásának intenzitása között megfigyelhető volt némi eltérés. Ettől eltekintve azonban valamennyi vizsgált sejt ( $n = 71$ ) HCN2-pozitívnek adódott. Nem tapasztaltunk eltérést az I-es és II-es (üres nyíl a 33B1 ábrán) típusú neuronok jelölődése között.

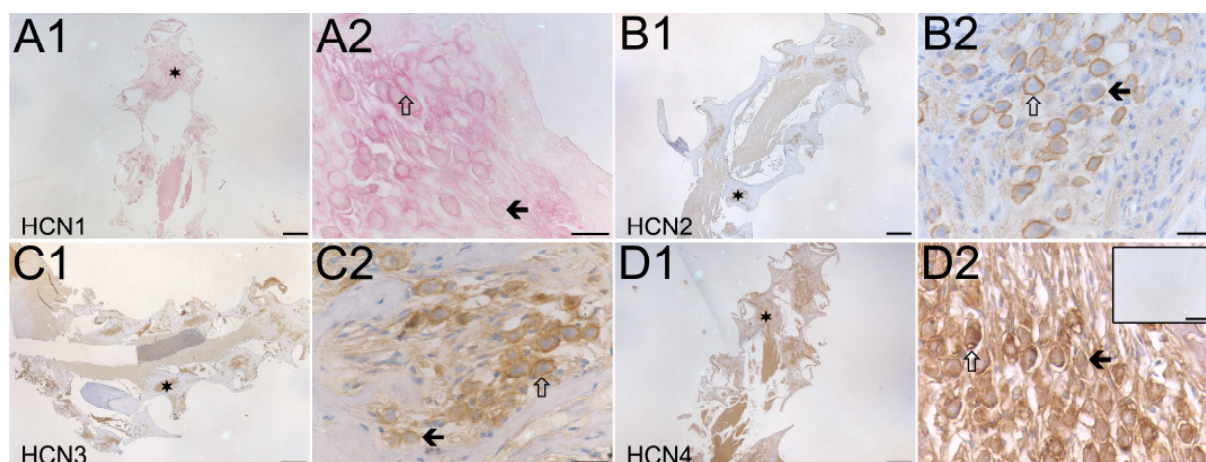
A HCN3-specifikus immunjelölés (33C1-33C3 ábrák) eredménye a HCN1- és HCN2-specifikus reakciókhoz hasonló eredménnyel járt. A 129 vizsgált sejt közül 127 mutatott immunpozitivitást. Az immunjelölődés mind a sejttest, mind pedig a nyúlványok membránjában megfigyelhető volt; sőt, egyes nyúlványok a sománál is intenzívebb reakciót adtak (egy ilyen példát tömör nyíl jelöl). A HCN3 jelölődésre is foltos megjelenés volt jellemző, és a korábbi alegységeknél tapasztalt sejtek közötti intenzitáskülönbség is megfigyelhető volt. Valamennyi vizsgált II-es típusú neuron HCN3-pozitív volt (a 33C1 ábrán nyíllal jelöltünk egy példát).

A HCN1-, HCN2- és HCN3-specifikus immunreakciókhoz képest a HCN4-specifikus immunjelölődés volt a legegyszerűsebb megjelenésű, bár itt is megfigyelhető volt némi foltos jelleg (33D1-33D3 ábrák). Az immunreakció valamennyi HCN4-pozitív sejt (a vizsgált 70 SGC közül 68) esetében jelen volt mind a sejttestek, mind pedig a nyúlványok felszínén. Az I-es és II-es típusú neuronok között nem tapasztaltunk eltérést sem az immunpozitivitás intenzitásában, sem pedig annak megoszlásában. Fontos megjegyezni, hogy a HCN3-, és HCN4-specifikus jelölések esetében a 2-2 negatív sejtet I-es típusú neuronokként azonosítottuk.

Valamennyi HCN-alegység jelenlétét sikerült megerősítenünk paraffinba ágyazott preparátumokon is (34. ábra). A 34A1, 34B1, 34C1 és 34D1 ábrákon az egyes HCN-specifikus immunjelölések eredményeiről készített kis nagyítású felvételek láthatók, ahol a modiolusokban csillagokkal jelöltünk néhány immunpozitív sejtfejszket. A többi képen (34A2, 34B2, 34C2 és 34D2 ábrák) az egyes sejtek HCN-specifikus immunpozitivitását bemutató, nagy nagyítású felvételek láthatók.

A 34A1-34A2 ábrák a HCN1-specifikus immunpozitivitás jelenlétét és megoszlását demonstrálják, a nagy nagyítású képen jól láthatók az egyes sejtek immunpozitív körvonalai. A cochlearis úszószelet preparátumon tapasztaltakhoz hasonlóan az egyes sejtek esetében eltérő volt az immunreakció intenzitása (pl. az üres nyíllal jelölt sejt erősebben jelölődött, míg a tömör nyíllal jelölt gyengébben; az üres és tömör nyilak jelentése valamennyi ábrán azonos). A paraffinba ágyazott metszeteken 2113 SGC HCN1 expresszióját vizsgáltuk, és ezek közül 2087 neuron bizonyult HCN1-pozitívnek. Megjegyzendő, hogy az egyes sejtek jelölődésének intenzitásában jelentős különbségeket figyelhattunk meg.





34. ábra A ganglion spirale sejtek HCN-pozitivitása paraffinba ágyazott preparátumon vizsgálva

A1: HCN1 jelölés, kis nagyítás. A csillag egy az SGC-k sejttestét tartalmazó sejtészket jelöl. A2: A HCN1-specifikus immunreakció eredménye nagy nagyításban. Az üres nyíl egy erősen, a tömör nyíl pedig egy gyengén jelölődött sejtre mutat. A további ábrák elrendezése, valamint a csillagok és nyilak jelentései megegyeznek az A1-A2 ábráknál leírtakkal. B1, B2: HCN2-specifikus immunpozitivitás. C1, C2: HCN3-specifikus immunpozitivitás. D1, D2: HCN4-specifikus immunpozitivitás. A D2 ábra inzertjén egy preadszorpciós kontroll eredménye látható. Kalibrációk: 250  $\mu\text{m}$  (A1, B1, C1 és D1), 25  $\mu\text{m}$  (A2, B2, C2 és D2), és 150  $\mu\text{m}$  (D2 inzertje).

A 34B1-34B2 ábrák a HCN2-specifikus immunpozitivitás jelenlétét és megoszlását mutatják be. A kis nagyítású képen (34B1 ábra) jól látható a ganglion spirale sejtek erős jelölődése, mintahogy a modiolus tengelyében futó axonok kevésbé intenzív pozitivitása is megfigyelhető. Nagy nagyítás mellett (34B2 ábra) egyértelmű a sejtek felszínének erős immunjelölődése, ami a legtöbb neuron esetében élesen kirajzolta a sejt körvonalát. Az SGC-k túlnyomó többsége HCN2-pozitív volt (2756 a 2780 sejtből). Bár a vizsgált sejtek 99 %-a pozitív volt, az egyes sejtek jelölődésének intenzitásában jelentős különbségek mutatkoztak, ami jól megfigyelhető például a 34B1-34B2 ábrákon nyilakkal jelölt sejtek esetében.

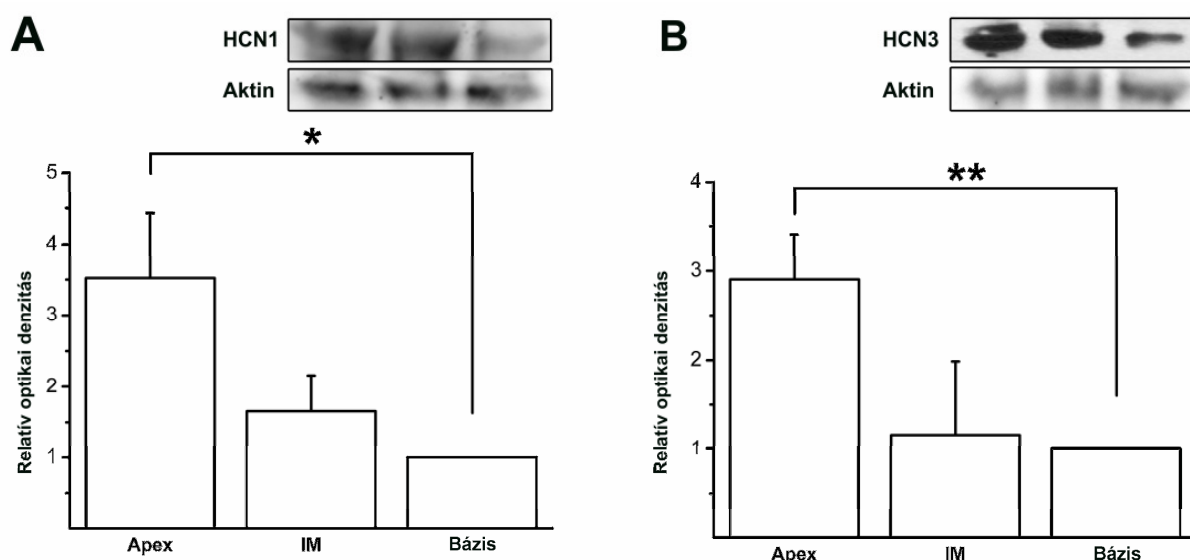
A paraffinba ágyazott preparátumon végzett HCN3-specifikus immunjelölés során (34C1-34C2 ábrák) 1041 SGC közül 999 sejt esetében tapasztaltunk HCN3-pozitivitást. A mint az a 34C2 ábrán látható, a HCN3-specifikus immunjelölődés megoszlásában eltérések figyelhetők meg az egyes neuronok szintjén: néhány sejt igen erős immunpozitivitást mutatott (az üres nyíl egy ilyen neuronra mutat), míg más sejtek kevésbé intenzíven jelölődtek (a tömör nyíl pedig egy ilyen sejtre mutat).

A 34D1-34D2 ábrák a HCN4-specifikus immunjelölés eredményeit mutatják be. Nagy nagyításán jól láthatók az SGC-k erősen HCN4-pozitív körvonalai. Az 1770 vizsgált sejt közül 1706 bizonyult HCN4-pozitívnek.

A 34D2 ábra inzertjén a rendszeresen végzett preadszorpciós kontrollkísérletek egyikének eredménye látható; ezen kontrollkísérletek során sohasem tapasztaltunk érdemi immunjelölődést.

#### A HCN1- és HCN3-alegységek apiko-bazális grádiense

A teljes modiolusokon végzett immunfestések során nem tapasztaltunk jelentős eltérést a ganglion spirale apexében illetve bázisában található SGC-k immunfestődésének intenzitásában. Mindazonáltal, mivel nem végeztünk denzitometriás méréseket, és más képanalizáló eljárással sem vizsgáltuk a felvételeket, nem jelenthettük ki teljes bizonyossággal, hogy a HCN-alegységek egyenletesen oszlanak meg a modiolus tengelye mentén, különösen annak fényében, hogy alkalmanként még az egymás szomszédságában elhelyezkedő sejtek immunpozitivitásának intenzitása között is igen nagy eltérések adódtak.



35.ábra A HCN1- és HCN3-alegységek expressziójának apiko-bazális grádiense tengerimalac ganglion spiraleban

A: A ganglion spirale apikális, intermediaer (IM) és bazális harmadaiból származó szövetminták HCN1-specifikus immunpozitív sávjainak relatív denzitása. Az eredmények 3 független kísérlet eredményeinek átlagát tükrözik; az egyes minták 8-8 modiolus felhasználásával készültek. Az inzertek egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatják, az immunpozitív sávok az apikális, intermediaer és bazális (balról jobbra) mintáknak felelnek meg, míg az alsó sorban az endogén kontrollként használt  $\beta$ -aktin-specifikus sávok láthatók. Az eredményeket átlag  $\pm$  S.E.M. formában adtuk meg. A bazális és apikális minták denzitometriás eredményeinek különbsége statisztikailag szignifikáns volt ( $p < 0,05$ ). B: A HCN3-specifikus kísérletek eredményei ( $n = 4$ ); az ábra elrendezése megegyezik az A ábránál leírtakkal. A bazális és apikális minták denzitometriás eredményeinek különbsége statisztikailag szignifikáns volt ( $p < 0,01$ ).

A HCN-alegységek esetleges apiko-bazális grádiensének vizsgálatát így Western-blot kísérletekkel végeztük. A kísérleteket a modiolusok apikális, intermediaer és bazális harmadából készített szövetmintákon végeztük, az eredményeket pedig denzitometriás módszerrel értékeltük ki. A négy vizsgált HCN-alegység közül a HCN1- és HCN3-alegység expressziós szintje egyértelmű apiko-bazális grádienset mutatott: a HCN1-fehérje szintje az apikális régióban  $3,5 \pm 0,9$ -szer volt magasabb a bazális területeken mért értékeknél (35A ábra), míg a HCN3 protein esetében a különbség  $2,9 \pm 0,5$ -szeres volt (ezek az értékek 3 [HCN1] és 4 [HCN3] különálló kísérlet eredményeit tükrözik; az egyes kísérletek során a mintákat 8-8 modiolusból készítettük). Az apikális és bazális harmadok között tapasztalt eltérések mindkét alegység esetében statisztikailag szignifikánsak ( $p < 0,05$  [HCN1] ill.  $p < 0,01$  [HCN3]) voltak. A HCN1- és HCN3-alegységektől eltérően a HCN2- és HCN4-alegységek esetében nem tapasztaltunk egyértelmű apiko-bazális grádienset.

## Megbeszélés

Jelen munka során kidolgoztunk egy új technikát (cochlearis úszószelet preparátum), amely segítségével a korábban alkalmazott technikáknál megbízhatóbban lehetett megkülönböztetni egymástól az I-es és II-es típusú ganglion spirale neuronokat. Kísérleteink során tengerimalac izolált ganglion spiralekból készített cochlearis úszószelet preparátumokon, valamint hagyományos beágyazott szövettani metszeteken vizsgáltuk az SGC-k Kv- és HCN-csatornaalegység-mintázatát. Az itt bemutatott eredmények azt mutatták, hogy mind az I-es, mind pedig a II-es típusú ganglion spirale neuronok számos Kv-alegységet expresszálnak, így a tranziens, dendrotoxin-érzékeny és késői típusú  $K^+$ -áramokért felelős alegységeket, valamint a h-áram kialakításáért felelős mind a négy ismert HCN-alegységet is. Ezen túlmenően szemikvantitatív Western-blot kísérletekkel a HCN1- és HCN3-alegységek esetében apiko-bazális grádiens jelenlétét is sikerült kimutatnunk: a modiolus apikális harmadában található sejtekben mindkét alegység expressziós szintje kb. háromszorosa volt a bazális harmadban található sejtekének.

A két idegsejt-típus között egyedül a Kv1.2-expresszió terén tapasztaltunk jelentős eltérést, ezt az alegységet ugyanis a II-es típusú sejtek fele nem expresszálta.



## Az SGC-k morfológiai heterogenitása

Bár a ganglion spirale két alapvető idegsejt-típusa igen eltérő kapcsolatokkal és funkciókkal rendelkezik, morfológiai megkülönböztetésük egyáltalán nem egyszerű feladat. 6-8 napos patkányokban például szinte lehetetlen elkülöníteni az I-es és II-es típusú sejteket, a morfológiai eltérések az egyedfejlődésnek csak későbbi stádiumában jelennek meg (Romand és Romand, 1985). Mindazonáltal általánosságban elmondható, hogy míg az I-es típusú sejtek nagyobb méretű, enyhén elnyújtott alakú neuronok, amelyek sejtestét és nyúványait myelinhüvely borítja, addig a II-es típusú sejtek kisebb, szferikálisabb neuronok, és nem rendelkeznek myelinhüvellyel. Az eltérő somaticus átmérő különösen nagy gyakorlati jelentőséggel bír, mivel a legtöbb tanulmányban ez alapján különböztetik meg egymástól a két neurontípust. Az egyes sejt-típusok mérete azonban a vizsgált állat fajától is nagyban függ: egy patkány cochlearis szeletpreparátumon végzett tanulmányban az I-es típusú sejtek átmérője 10-20  $\mu\text{m}$  között változott (Jagger és Housley, 2002), szövettenyésztésben fenntartott ugróegér ganglion spirale neuronok mérete 24 órával az izolálást követően 14  $\mu\text{m}$  volt (Lin, 1997), a tengerimalacból izolált I-es és II-es típusú SGC-k átlagos átmérője pedig 20  $\mu\text{m}$  ill. 15  $\mu\text{m}$ -nek adódott (Santos-Sacchi, 1993).

A jelen munkában alkalmazott cochlearis úszószelet preparátum esetében a korábban leírtakhoz hasonló eredményeket kaptunk: a feltételezett I-es (nagy) illetve II-es (kis) típusú sejtek átlagos átmérője 19,9  $\mu\text{m}$  és 14,2  $\mu\text{m}$  volt, vagyis a leggyakrabban vizsgált állatfajok (egér, patkány, ugróegér és tengerimalac) közül a tengerimalac SGC-i a legnagyobbak. Az eltérő fajból származó SGC-k méretbeli eltérését még jobban tükrözi a neuronok keresztmetszeti területe (patkányban ez a paraméter az I-es típusú sejtek esetében 130  $\mu\text{m}^2$ , míg jelen tanulmányban a tengerimalac I-es típusú sejtek esetében 221  $\mu\text{m}^2$  volt). A jelen munka során végzett morfometriás mérések alapján úgy véljük, hogy tengerimalac ganglion spirale neuronok esetében az I-es és II-es típusú sejtek között a 16  $\mu\text{m}$ -es sejtátmérőnél lehet meghúzni a határvonalat. Mindazonáltal meg kell jegyeznünk, hogy a hagyományos szövettani módszerek jelentősen csökkentették a sejtek méretét: az átmérő átlagosan 23 %-kal, a terület 27 %-kal, a keresztmetszeti terület pedig 49 %-kal csökkent a cochlearis úszószelet preparátumban mért értékekhez képest. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy a különböző tanulmányokban leírt sejt méreteket megfelelő elővigyázatossággal kell kezelni, mivel azok értéke nemcsak a kísérleti állat fajától, hanem az alkalmazott preparálási technikától is nagyban függ.

A cochlearis úszószelet preparátumokon végzett vizsgálatok során a kis sejtek szferikálisabbak voltak, mint a nagy sejtek, S-100 fehérje-pozitivitást nem mutattak (ami a

myelinhüvely hiányára utal), valamennyi morфомetriai paraméterük (legnagyobb átmérő, keresztmetszeti terület és kerület) kisebb volt, és a teljes SGC-populációnak kevesebb mint 10 %-át alkották. Ezen jellemzők alapján a kis sejteket II-es, a nagy sejteket pedig I-es típusú neuronokként azonosítottuk. Meg kell azonban említeni, hogy egy korábbi, patkány cochlearis szeletpreparátumokon végzett tanulmányban a II-es típusú neuronok jelentős morfológiai heterogenitását írták le (Jagger és Housley, 2003). A szerzők a II-es típusú sejteken belül két alcsoportot különítettek el: a kisebb II-es típusú sejtpopuláció keresztmetszeti területe  $101 \mu\text{m}^2$ , a nagyobb II-es típusú sejteké pedig  $148 \mu\text{m}^2$  volt (az igazoltan I-es típusú neuronok átlagos keresztmetszeti területe ezzel szemben  $130 \mu\text{m}^2$ -nek adódott). Ez felveti annak lehetőségét, hogy az I-es típusú neuronokként azonosított sejtpopuláció esetenként „nagy” II-es típusú idegsejteket is tartalmazhatott (Jagger és Housley, 2003). Figyelembe véve azonban ezen „nagy” II-es típusú neuronok igen alacsony számát (egy tanulmányban [Berglund és Ryugo, 1987] mindössze 3 ilyen sejtet sikerült azonosítani), biztonsággal kijelenthetjük, hogy a nagy átmérőjű sejtek igen nagy valószínűséggel az I-es típusú SGC-k közé tartoznak.

Tranziens áramért felelős  $\text{K}^+$ -csatornaalegységek jelenléte a tengerimalac ganglion spiraleban

A tranziens  $\text{K}^+$ -áram jelenléte vagy hiánya az egyik legvitatottabb kérdés az SGC-k ionáramaival kapcsolatban. A ganglion spirale neuronokat érintő vizsgálatok kezdetén nem sikerült ilyen inaktiválódó áramokat kimutatni sem akutan izolált (Santos-Sacchi, 1993), sem pedig szövettenyészetben fenntartott SGC-ken (Lin, 1997), ami arra utalt, hogy az ezen komponens kialakításáért felelős csatornák vagy teljes egészében hiányoznak a sejtekből, vagy kizárólag a nyúlványokban expresszálnak, amelyek a preparálás során elvesztek. Ezzel szemben egy másik, tengerimalacokon végzett tanulmányban kimutattak egy tranziens áramkomponenst, bár ennek amplitúdója igen alacsony volt, és csak  $\text{TEA}^+$  jelenlétében sikerült detektálni (Szabó és mtsai, 2002), ami felvetette annak lehetőségét, hogy a korábbi tanulmányokban más áramkomponensek elfedték ezen áram aktiválódásának jeleit. Más kísérletekben is sikerült kimutatni a tranziens áramkomponens jelenlétét (pl. Sheppard és mtsai, 1992), sőt, annak erőteljes korfüggésére is rámutattak: az inaktiválódó áram az embrionális fejlődés 10. napján jelent meg, majd innentől kezdődően amplitúdója folyamatosan nőtt (Garcia-Díaz, 1999). Cochlearis szeletpreparátumban ugyancsak sikerült kimutatni a tranziens  $\text{K}^+$ -áram jelenlétét az SGC-ken (Jagger és Housley, 2002). Ezen tanulmányban a tranziens áram igen jelentősnek bizonyult: a nyugalmi membránpotenciál

értékén a csatornák mintegy 60 %-a bizonyult aktiválhatónak. Érdekes módon ugyanezen tanulmányban a tranziens áramot izolált sejteken is sikerült kimutatni, ami cáfolta azt a korábbi feltevést, mely szerint ezen csatornák kizárólag az SGC-k nyúlványain helyezkednek el. A cochlearis szeletpreparátumban igazoltan II-es típusú neuronokon is sikerült kimutatni egy tranziens  $K^+$ -áram aktiválódását (Jagger és Housley, 2003).

Az SGC-k által expresszált tranziens áram kinetikájának elemzése arra utalt, hogy az áramnak több komponense is van, vagyis valószínűleg többféle Kv-alegység is részt vesz a tranziens  $K^+$ -áramért felelős csatornák felépítésében, ám ezidáig mindössze a Kv4.2-alegység jelenlétét mutatták ki szövettényezetben fenntartott egér SGC-ken (Adamson és mtsai, 2002). A Kv4.2 expresszióját a jelen tanulmányban is sikerült demonstrálni, emellett azonban kimutattuk a Kv4.3-alegységek jelenlétét is, ami felveti Kv4.2/Kv4.3 heterotetramerek kialakulásának lehetőségét is. A Kv4.2- és Kv4.3- mellett a Kv1.4-alegységek expresszióját is meg kell említeni, ami a Kv1 főcsalád egyéb tagjaival (elsősorban Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.6) asszociálódva részt vehet a DTX-érzékeny áram létrehozásában, és magyarázatul szolgálhat annak komplex kinetikai tulajdonságaira.

Míg a Kv4.2-, Kv4.3- vagy Kv1.4-alegységekből felépülő csatornák LVA tranziens áramot hoznak létre, addig a Kv3.4-alegységeket tartalmazó csatornák pozitívabb membránpotenciálokön aktiválódó tranziens áramot generálnak. Az SGC-k által expresszált tranziens áram inaktivációs és reaktivációs kinetikája alapján már korábban feltételezték Kv3.4-alegységek jelenlétét is (Jagger és Housley, 2002), ám a jelen kísérletek szolgáltatják az első bizonyítékot ezen alegységek előfordulására. Bár a tranziens  $K^+$ -áram pontos szerepe a ganglion spirale sejtekben még vitatott, ezen áramféleség fontos lehet a frekvenciakódolás biztosításában (feltéve, hogy a megfelelő csatornák jelen vannak az SGC-k perifériás nyúlványainak szinaptikus végződéseiben), továbbá különböző, az SGC-k funkcionális tulajdonságait szabályozó mechanizmusok is ezen áram módosításán keresztül fejthetik ki hatásukat. Egyes feltételezések szerint a tranziens áramok fontos szerepet játszhatnak a II-es típusú sejtek működésében is (Jagger és Housley, 2003).

Az SGC-k által expresszált DTX-érzékeny és késői típusú  $K^+$ -áramok

Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a DTX-érzékeny  $K^+$ -áram expressziója a hallórendszer kapcsolóneuronjainak fontos jellemzője. Leírták már egér (Adamson és mtsai, 2002; Mo és mtsai, 2002) és tengerimalac (Szabó és mtsai, 2002) SGC-ken, bushy-sejteken (Pál és mtsai, 2004) és patkány nucleus corporis trapezoidei fősejteken is (Brew és Forsythe, 1995). Ez az áram a sejtek gyors tüzelésekor játszhat fontos szerepet, gátlása pedig

drámai változásokat okoz a gyorsan adaptálódó SGC-k tüzelési mintázatában: a sejtek tartós depolarizáció hatására a gyorsan adaptálódó válasz helyett AP-sorozatot produkálnak. Az LVA  $K^+$ -csatornák működése meggátolhatja a túlzott mértékű depolarizációt és hiperexcitabilitást, ami különösen nagy jelentőségű lehet az SGC-kben a nagy frekvenciájú és a stimuláció időbeliségét pontosan tükröző információfeldolgozás során (Mo és mtsai, 2002).

Bár az egér SGC-k által expresszált DTX-érzékeny áram komplex aktiválási kinetikája alapján feltételezték, hogy többféle DTX-érzékeny csatornaalegység is részt vesz ezen áram kialakításában (Mo és mtsai, 2002), ezidáig csak a Kv1.1- és Kv1.2-alegységek jelenlétét sikerült igazolni egér ganglion spiraleban (Adamson és mtsai, 2002). Jelen munkában igazoltuk, hogy a tengerimalac SGC-k is expresszálják mindkét alegységet, sőt, a Kv1.6-alegység jelenlétét is kimutattuk. Korábban felmerült annak lehetősége, hogy a DTX-érzékeny áramért felelős  $K^+$ -csatornák felépítésében Kv1.4-alegységek is részt vehetnek (Jagger és Housley, 2003), amely felvetés kísérletes bizonyítását eredményeink jelentik.

Az SGC-k magas frekvenciájú tüzelési mintázata csak részben köszönhető a DTX-érzékeny áramnak, ugyanis ez az aktivitási mintázat igen gyors és erős repolarizációt igényel, amiben a késői típusú  $K^+$ -áramok játszanak fontos szerepet. Számos  $K^+$ -csatornaalegység vehet részt a késői típusú áram létrehozásáért felelős  $K^+$ -csatornák felépítésében, melyek közül ezidáig a Kv3.1-alegység jelenlétét egér (Adamson és mtsai, 2002), csirke (García-Díaz, 1999) és tengerimalac (Santos-Sacci, 1993; Szabó és mtsai, 2002) SGC-ken már leírták, vagy valószínűsítették. Jelen munkában elsőként igazoltuk immunhisztokémiai kísérletekkel a Kv3.1b-alegységek jelenlétét a tengerimalac ganglion spiraleban.

Meg kell említenünk, hogy az egereken végzett vizsgálatokkal ellentétben, ahol számos Kv-alegységről (Kv1.1, Kv1.2 és Kv3.1) kimutatták, hogy expressziójuk mértéke változik a cochlea tengelye mentén (Adamson és mtsai, 2002), az általunk végzett immunhisztokémiai kísérletek során a Kv-specifikus immunpozitivitások intenzitása tekintetében nem tapasztaltunk egyértelmű és jelentős apiko-bazális grádienst. Bár az eltérés oka nem világos, elképzelhető, hogy a jelenség fajfüggést (is) mutat.

A hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationcsatornák jelenléte és alegységösszetétele a ganglion spiraleban

Bár az SGC-k ionáramai jelentősen eltérnek a különböző fajokban, az  $I_h$  jelenlétét mind egér, mind pedig tengerimalac SGC-ken (Chen, 1997; Mo és Davis, 1997a; Szabó és mtsai, 2002) leírták. Bár ezen áram pontos szerepe még nem ismert, egyes feltételezések szerint szerepe lehet ezen sejtek intrinsic aktivitásában, depolarizálhatja a membránt az akciós

potenciált követő hiperpolarizációs fázisban, és csökkentheti a membrán időkonstansát is, ezáltal növelve az SGC-kben a membránpotenciál-változások sebességét. Az  $I_h$  az SGC-k nyugalmi membránpotenciáljának beállításában is szerepet játszhat, és elképzelhető, hogy a DTX-érzékeny LVA  $K^+$ -áramoknak és az  $I_h$ -nak fontos szerepe van a pillanatnyi membránpotenciálnak, és így a sejt érzékenységének beállításában. Ezt a hipotézist támasztja alá az a megfigyelés is, hogy DTX hatására a tengerimalac SGC-k nyugalmi membránpotenciálja pozitívabb feszültségértékek irányába tolódik el (Szabó és mtsai, 2002).

Különböző fajok ganglion spirale neuronjain végzett funkcionális vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy az  $I_h$  félaktivációs feszültsége meglehetősen negatív:  $-122$  mV és  $-78$  mV között változott (Chen, 1997; Mo és Davis, 1997a; Szabó és mtsai, 2002), azaz nem valószínű, hogy kizárólag HCN1-homomerek csatornák hozzák azt létre. Ezt támasztja alá még az is, hogy tengerimalac SGC-kben az  $I_h$  aktivációs kinetikája egy két exponenciális tagot tartalmazó függvényvel írható le, ami arra utal, hogy a h-áramért többféle csatornaegység lehet felelős (Chen, 1997). A jelen munkában bemutatott eredmények ezen hipotézist támasztják alá. Minthogy a különböző HCN-egységek cAMP-érzékenysége eltérő, a négy HCN-csatornaegység együttes jelenléte lehetővé teszi az  $I_h$  aktivitásának hatékony modulálását, ezáltal pedig az SGC-k aktivitásának erőteljes szabályozását. Az  $I_h$  heterogenitását egy hipotézis szerint a HCN-csatornaegységek eltérő foszforilációja eredményezi (Mo és Davis, 1997a), a jelen munkában bemutatott eredmények alapján azonban feltételezhető, hogy az egyes sejtek eltérő HCN-csatornaegység mintázata is hozzájárulhat az ismert heterogenitáshoz.

#### Ioncsatorna-egységek apiko-bazális grádiense a ganglion spiraleban

Mivel a ganglion spirale neuronjainak nagy része I-es típusú idegsejt, a funkcionális mérések jelentős részét ezeken végezték, így membrántulajdonságaik már számos faj esetében jól ismertek. Egyes szövettenyészetben fenntartott I-es típusú sejtek gyorsan adaptálódó választ mutattak, míg más sejtekre lassabb adaptáció volt jellemző (Mo és Davis, 1997b). A gyorsan adaptálódó sejtek jellemzően a cochlea apexéből, míg a lassan adaptálódók a cochlea bázisából származtak, membrántulajdonságaik pedig megfeleltek a megjósolt és igazolt tüzelési mintázatoknak (Adamson és mtsai, 2002). Eger SGC-ken végzett immuncitokémiai vizsgálatok során a Kv1.1-, Kv4.2- és Kv3.1-egységek jelentős apiko-bazális grádiensét figyelték meg: a bazális neuronok erősebb Kv3.1- és Kv1.1-, valamint gyengébb Kv4.2-immunpozitivitással rendelkeztek, mint az apikális SGC-k (Adamson és mtsai, 2002). Meg kell azonban jegyezni, hogy cochlearis szeptopreparátumokon végzett kísérletek során

valamennyi vizsgált SGC hasonló módon viselkedett, az azok egy vagy két akciós potenciált tüzeltek az inger kezdetekor (Jagger és Housley, 2002, 2003). Az egymásnak ellentmondó eredmények oka ismeretlen, de a kísérleti állatok eltérő faja esetleg magyarázatul szolgálhat (egér és patkány).

Jelen munkában a HCN1- és HCN3-alegységekről mutattuk ki, hogy mennyiségük a cochlea tengelye mentén változik. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a bazális SGC-k erősebb Kv3.1- és Kv1.1-expresszióval rendelkeznek, míg az apikális neuronok esetében a Kv4.2, HCN1 és HCN3 proteinek expressziós szintje magasabb. Bár elképzelhető, hogy a bazális és apikális SGC-k eltérő membrántulajdonságai az eltérő Kv- és HCN-alegységmintázat eredményei, nem szabad elfelejteni, hogy a csatornaalegységek magasabb expressziós szintje nem jelenti automatikusan a sejtmembránban található funkcionális csatornák számának növekedését is, így ezeket a hipotéziseket megfelelő fenntartásokkal kell kezelni. Ezt is figyelembe véve azonban a jelen munka és korábbi tanulmányok eredményei alapján úgy tűnik, hogy az I-es típusú sejtek nem alkotnak homogén sejtpopulációt, hanem bizonyos fokú funkcionális diverzitás jellemző rájuk, amely (legalábbis részben) az eltérő Kv- és HCN-alegységmintázatnak köszönhető.

Az I-es és II-es típusú sejtek közti eltérések

Hosszú ideig a II-es típusú sejtek meglehetősen rejtélyes neurontípusnak számítottak, mivel alacsony számuk és nehéz azonosíthatóságuk miatt funkcionális tanulmányozásuk igen nehéz, már-már lehetetlen feladatnak számított. Ezidáig kétféle technikát alkalmaztak a II-es típusú neuronok elektrofiziológiai vizsgálatai során: cochlearis szeletpreparátumot, valamint szövettenyészetben fenntartott sejteket. A cochlearis szeletpreparátumon végzett kísérletek során a II-es típusú neuronok egyetlen, rövid látenciaidejű akciós potenciált tüzeltek az inger kezdetén, az azt követő lassú depolarizációs válasz pedig nem különbözött jelentős mértékben az I-es típusú sejtek tüzelési mintázatától (Jagger és Housley, 2003). Ezzel szemben a szövettenyészetben fenntartott egér ganglion spirale neuronokon végzett kísérletek során a II-es típusú sejtek lassabb adaptációt mutattak, mint az I-es típusúak, és az aktivációs küszöbpotenciál értéke is alacsonyabbnak bizonyult (Reid és mtsai, 2004). Ezen ellentmondás okai még nem világosak, bár egy lehetséges magyarázat szerint a szövettenyészetben fenntartott sejtek csatornamintázata nem feltétlenül egyezik meg az *in vivo* neuronokéval, hiszen az SGC-k érését és membrántulajdonságait különböző növekedési faktorok jelentős mértékben befolyásolják (Mou és mtsai, 1998; Jagger és Housley, 2002). A neurotrophin-3-nak (NT-3) az SGC-k tüzelési viselkedésére gyakorolt hatásának vizsgálata

során azt is leírták, hogy ezen növekedési faktornak nem pusztán a jelenléte, de koncentrációja is döntően befolyásolta a neuronok membrántulajdonságait. Fiziológiai körülmények között az NT-3 koncentrációja apiko-bazális grádiens mutat, ami eltérő hatással lehet az eltérő lokalizációjú neuronokra (Zhou és mtsai, 2005). Nyilvánvaló, hogy szövettényezési körülmények között természetesen igen nehéz lenne valamennyi növekedési faktor jelenlétét biztosítani, a koncentrációgrádiensek reprodukálása pedig gyakorlatilag lehetetlen feladat.

Az I-es és II-es típusú sejtek viselkedésében mutatkozó eltéréseknek egy másik lehetséges magyarázata, hogy a II-es típusú neuronok, az I-es típusú sejtekhez hasonlóan, nem alkotnak homogén populációt. Ezt a feltételezést látszik alátámasztani az a megfigyelés is, hogy némely II-es típusú sejt AP-ja az átlagosnál rövidebb látenciaidővel jelentkezett, továbbá az aktivációs küszöbpotenciál alatti membránpotenciál-tartományban gyorsabb kinetikájú membránpotenciál-változásokat produkált, mint a többi II-es típusú SGC (Reid és mtsai, 2004).

Bár a jelen munka és más tanulmányok alapján nem lehet minden kétséget kizáróan eldönteni az I-es és II-es típusú SGC-k esetleges funkcionális különbözőségének kérdését, figyelembe véve, hogy a két neurontípus hasonló Kv- és HCN-alegység mintázattal rendelkezik, valószínűleg nem várhatók nagy eltérések a két neurontípus membrántulajdonságaiban. Mindazonáltal az I-es és II-es típusú sejtek Kv1.2-alegység expressziójában tapasztalt eltérés figyelemre méltó. Bár logikusnak tűnhet a feltételezés, hogy a II-es típusú sejtek egy része által mutatott lassabb adaptáció és alacsonyabb aktivációs küszöb az adott neuron csökkent (vagy teljesen hiányzó) Kv1.2 expressziójára vezethető vissza, nem szabad elfelejteni, hogy számos egyéb, a jelen munkában nem tárgyalt mechanizmus is jelentősen befolyásolhatja ezen idegsejtek membrántulajdonságait. Mindebből fakadóan a Kv1.2-alegységek funkcionális jelentőségének pontos meghatározásához további vizsgálatokra van szükség.

## Összefoglalás

Kísérleteink során egyes feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák jelenlétét illetve megoszlását vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerekkel a hallópálya kezdeti szakaszának két elemében: a ganglion spiraleban és a nucleus cochlearisban. Hét feszültségfüggő  $K^+$ -csatornaalegység expressziós mintázatát vizsgáltuk a nucleus cochlearisban, illetve a mag főbb profekciós neuronjaiban. Eredményeink segítséget nyújthatnak az egyes sejtípusok membrántulajdonságainak megjósolásához. Az egyes neuronok csatornaalegység-mintázatának vizsgálatán túl azt is kimutattuk, hogy a különböző nucleus cochlearis neuronok egyes Kv-alegységeket eltérő mértékben expresszálnak, sőt egyes alegységeket a jövőben akár sejt specifikus markerként is fel lehet használni.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a nucleus cochlearis két nagy fontosságú sejtípusa, a piramis- és óriássejtek alkotnak homogén sejtpopulációt a Kv-expressziós mintázat terén; azaz elképzelhető, hogy ezek a neurontípusok további funkcionális és/vagy morfológiai alcsoportokra oszthatók.

Ugyancsak sikerült kimutatnunk a nucleus cochlearisban található glomeruláris szinapszisok Kv4.2- és Kv3.4-pozitivitását. Minthogy a glomeruláris szinapszisokat a cerebellumban is erősen Kv4.2-pozitívnak találtuk, ezen eredmény is azt a hipotézist támasztja alá, mely szerint a nucleus cochlearis és a cerebellum eredete azonos, és a két struktúra igen nagyfokú morfológiai hasonlóságot mutat.

A hallópálya másik, jelen munkában vizsgált eleme a ganglion spirale volt. Munkánk során kidolgoztunk egy új technikát a ganglion spirale neuronok vizsgálatára, mely a korábban alkalmazott módszereknél jobban megőrizte az idegsejtek morfológiáját, és lehetővé tette az SGC-k háromdimenziós vizsgálatát.

Kísérleteink során kilenc Kv- és mind a négy ismert HCN-alegység jelenlétét és megoszlását vizsgáltuk a tengerimalac SGC-ken. Igazoltuk, hogy a ganglion spirale sejtek egyaránt expresszálnak LVA DTX-érzékeny, késői típusú és A-típusú áram kialakításáért felelős feszültségfüggő  $K^+$ -csatornaalegységeket. Kimutattuk továbbá, hogy az SGC-ken megtalálható mind a négy ismert HCN-alegység, és hogy ezen fehérjék expressziós szintje jelentős eltérést mutat az egyes sejtek szintjén. Ezen túlmenően a HCN1- és HCN3-alegységek esetében kimutattuk, hogy expressziós szintjük a modiolus apikális területein magasabb, mint a bazális területeken.



## Summary

In the present work we studied the presence and distribution of several voltage gated  $K^+$ -channels in two sections of the initial part auditory pathway: the cochlear nucleus and the spiral ganglion. We investigated the expression pattern of seven voltage gated  $K^+$ -subunits in the cochlear nucleus and its major projection neurones. Our results may help to predict the membrane properties of the individual types of cells. Besides investigating the channel subunit pattern we demonstrated that some Kv subunits are preferentially expressed by the various types of CN neurones, some of which could be even used as markers assisting cell identification in future studies.

Our results showed that two major cell types of the cochlear nucleus, the pyramidal and giant neurones do not form homogenous cell populations concerning their Kv expression patterns, thus it cannot be ruled out that functional/morphological subgroups may exist within these cell classes.

We also demonstrated the Kv4.2 and Kv3.4 positivity of the glomerular synapses of the CN. Since glomerular synapses were found to be Kv4.2 positive in the cerebellum as well, these findings further support the view about the common origin and close morphological similarity between the CN and the cerebellum.

The other section of the auditory pathway investigated in the present study was the spiral ganglion. We developed a new preparation for the investigation of the SGCs, that better preserved the morphology of the neurones and allowed the three dimensional analysis of the cells.

In our experiments we investigated the presence and distribution of nine Kv- and all four known HCN-subunits on guinea pig SGCs. We demonstrated, that spiral ganglion cells expressed LVA DTX-sensitive, delayed rectifier and A-type current producing voltage gated  $K^+$ -channel subunits. We also demonstrated, that all four known HCN-subunits were present on the SGCs and that the expression levels of these proteins showed significant cell to cell variability. Moreover we demonstrated that the HCN1 and HCN3 subunits were differentially expressed along the axis of the cochlea: their levels of expression were higher in the apical areas of the modiolus than in the basal areas.

## Irodalomjegyzék

1. Accili E.A., Redaelli G., DiFrancesco D. (1997) Differential control of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) by cAMP gating and phosphatase inhibition in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol.*, 500: 643-51.
2. Adams J.C., Mroz E.A., Sewell W.F. (1987) A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair-cell sensory organ. *Brain Res.*, 419: 347-351.
3. Adamson C.L., Reid M.A., Mo Z-L., Bowne-English J., Davis, R. L. (2002) Firing features and potassium channel contents of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. *J. Comp. Neurol.*, 447: 331-350.
4. Alibardi L. (2004) Mossy fibers in granule cell areas of the rat dorsal cochlear nucleus from intrinsic and extrinsic origin innervate unipolar brush cell glomeruli. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 36: 193-210.
5. Altomare C., Terragni B., Brioschi C., Milanese R., Pagliuca C., Viscomi C., Moroni A., Baruscotti M., DiFrancesco D. (2003) Heteromeric HCN1-HCN4 channels: A comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. 549: 347-359.
6. Altschuler R.A., Hoffman D. W., Reeks K.A., Fex J. (1985a) Localization of dynorphin B-like and alpha-neoendorphin-like immunoreactivities in the guinea pig organ of Corti. *Hear. Res.*, 17: 249-258.
7. Altschuler R.A., Kachar B., Rubio J.A., Parakkal M. H., Fex J. (1985b) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res.*, 338: 1-11.
8. Altschuler R.A., Parakkal M. H., Rubio J.A., Hoffman D. W., Fex J. (1984) Enkephalin-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: ultrastructural and lesion studies. *Hear. Res.*, 16: 17-31.
9. Altschuler R.A., Sheridan C.E., Horn J. W., Wenthold R.J. (1989) Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.*, 42: 167-173.
10. Anniko M., Arnold W., Stigbrand T., Ström A. (1995) The human spiral ganglion. *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 57: 68-77.
11. Babalian A.L., Ryugo D.K., Rouiller E. M. (2003) Discharge properties of identified cochlear nucleus neurons and auditory nerve fibers in response to repetitive electrical stimulation of the auditory nerve. *Exp. Brain. Res.*, 153: 452-460.
12. Bader C.R., Macleish P.R., Schwartz E.A. (1979) A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol.* 296: 1-26.
13. Bal R., Oertel D. (2001) Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.*, 86: 2299-2311.

14. Bal T., McCormick D.A. (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current  $I(h)$ . *J. Neurophysiol.*, 77: 3145–56.
15. Banks M.I., Pearce R.A., Smith P.H. (1993) Hyperpolarization-activated cation current ( $I_h$ ) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J. Neurophysiol.*, 70: 1420–32.
16. Berglund A.M., Ryugo D.K. (1987) Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J. Comp. Neurol.*, 255: 560–570.
17. Bobbin R.P., Konishi T. (1971) Acetylcholine mimics crossed olivocochlear bundle stimulation. *Nat. New Biol.*, 231: 222–223.
18. Bortone D.S., Mitchell K., Manis P.B. (2006) Developmental time course of potassium channel expression in the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.*, 211: 114–125.
19. Boyett M.R., Honjo H., Kodama I. (2000) The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.*, 47: 658–87.
20. Brawer J.R., Morest D.K., Kane E.C. (1974) The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 155: 251–300.
21. Brew H.M., Forsythe I.D. (1995) Two voltage-dependent  $K^+$  conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *J. Neurosci.*, 15: 8011–8022.
22. Brew H.M., Forsythe I.D. (2005) Systematic variation of potassium current amplitudes across the tonotopic axis of the rat medial nucleus of the trapezoid body. 206: 116–132.
23. Brewster A.L., Bernard J.A., Gall C.M., Baram T.Z. (2004) Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol. Dis.*, 19: 200–207.
24. Brown H.F., DiFrancesco D., Noble S.J. (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, 280: 235–36.
25. Brown M.C. (1987) Morphology of labeled afferent fibers in the guinea pig cochlea. *J. Comp. Neurol.*, 260: 591–604.
26. Burki C., Felix D., Ehrenberger K. (1993) Enkephalin suppresses afferent cochlear neurotransmission. *ORL*, 55: 3–6.
27. Caminos E., Vale C., Lujan R., Martinez-Galan J.R., Juiz J.M. (2005) Developmental regulation and adult maintenance of potassium channel proteins (Kv 1.1 and Kv 1.2) in the cochlear nucleus of the rat. *Brain Res.*, 1056: 118–131.
28. Cant N.B., Morest D.K. (1979) The bushy cells in the anteroventral cochlear nucleus of the cat. A study with the electron microscope. *Neuroscience*, 4: 1925–1945.
29. Cao X.J., Shatadal S., Oertel D. (2007) Voltage-sensitive conductances of bushy cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.*, 97: 3961–3975.

30. Chang F., Cohen I.S., DiFrancesco D., Rosen M.R., Tromba C. (1991) Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current *if*. *J. Physiol.*, 440: 367–84.
31. Chen C. (1997) Hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in primary auditory neurons. *Hear. Res.*, 110: 179–190.
32. Chen S., Wang J., Siegelbaum S.A. (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of hcn1 and hcn2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.*, 117: 491–504.
33. Cuttle M.F., Rusznák Z., Wong A.Y., Owens S., Forsythe I.D. (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J. Physiol. (Lond.)*, 534: 733–744.
34. Davis K.A., Miller R.L., Young E.D. (1996) Effects of somatosensory and parallel-fiber stimulation on neurons in dorsal cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.*, 76: 3012–24.
35. Demontis G.C., Moroni A., Gravante B., Altomare C., Longoni B. (2002) Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J. Physiol.*, 542: 89–97.
36. DiFrancesco D. (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.*, 55: 455–72.
37. DiFrancesco D., Tortora P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 351: 145–47.
38. Ding J., Benson T.E., Voigt H.F. (1999) Acoustic and current-pulse responses of identified neurons in the dorsal cochlear nucleus of unanesthetized, decerebrate gerbils. *J. Neurophysiol.*, 82: 3434–3457.
39. Dodson P.D., Billups B., Rusznák Z., Szücs G., Barker M.C., Forsythe I.D. (2003) Presynaptic Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J. Physiol. (Lond.)*, 550: 27–33.
40. Drescher M.J., Drescher D.G. (1992) Glutamate, of the endogenous primary alpha-amino acids, is specifically released from hair cells by elevated extracellular potassium. *J. Neurochem.* 59: 93–98.
41. Drewe J.A., Verma S., Frech G., Joho R.H. (1992) Distinct spatial and temporal expression patterns of K<sup>+</sup> channel mRNAs from different subfamilies. *J. Neurosci.* 12: 538–548.
42. Durrell S.R., Guy R. (1992) Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.*, 62: 238–250.
43. Eatock R.A., Rüscher A. (1997) Developmental changes in the physiology of hair cells. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 8: 265–275.
44. Eybalin M., Parnaud C., Geffard M., Pujol R. (1988) Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti. *Neuroscience*, 24: 29–38.

45. Eybalin M., Pujol R. (1987) Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp. Brain Res.*, 65: 261-270.
46. Fechner F.P., Nadol J.J., Burgess B.J., Brown M.C. (2001) Innervation of supporting cells in the apical turns of the guinea pig cochlea is from type II afferent fibers. *J. Comp. Neurol.*, 429: 289-298.
47. Fekete D. M., Rouiller E.M., Liberman M. C., Ryugo D. K. (1984) The central projection of intracellularly labeled auditory nerve fibres in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 229: 432-450.
48. Felix D., Ehrenberger K. (1992) The efferent modulation of mammalian inner hair cell afferents. *Hear. Res.*, 64: 1-5.
49. Ferragamo M.J., Oertel D. (2002) Octopus cells of the mammalian ventral cochlear nucleus sense the rate of depolarization. *J. Neurophysiol.*, 87: 2262-2270.
50. Fex J., Altschuler R. A., Kachar B., Wenthold R.J., Zempel J. M. (1986) GABA visualized by immunocytochemistry in the guinea pig cochlea in axons and endings of efferent neurons. *Brain Res.*, 366: 106-117.
51. Fitzakerley J.L., Star K.V., Rinn J.L., Elmquist B.J. (2000) Expression of Shal potassium channel subunits in the adult and developing cochlear nucleus of the mouse. *Hear. Res.*, 147: 31-45.
52. Garcia-Díaz J.F. (1999) Development of a fast transient potassium current in chick cochlear ganglion neurons. *Hear. Res.*, 135: 124-134.
53. Géléoc G.S., Risner J.R., Holt J.R. (2004) Developmental acquisition of voltage-dependent conductances and sensory signaling in hair cells of the embryonic mouse inner ear. *J. Neurosci.*, 24: 11148-59.
54. Godfrey D. A., Carter J.A., Berger S.J., Matschinsky F. M. (1976) Levels of putative transmitter amino acids in the guinea pig cochlea. *J. Histochem. Cytochem.*, 24: 468-470.
55. Goethals M., Raes A., van Bogaert P.P. (1993) Use-dependent block of the pacemaker current  $I(f)$  in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. *Circulation* 88: 2389-401.
56. Golding N.L., Ferragamo M.J., Oertel D. (1999) Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J. Neurosci.*, 19: 2897-2905.
57. Golding N.L., Robertson D., Oertel D. (1995) Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J. Neurosci.*, 15: 3138-3153.
58. Grigg J.J., Brew H. M., Tempel B.L. (2000) Differential expression of voltage-gated potassium channel genes in auditory nuclei of the mouse brainstem. *Hear. Res.*, 140: 77-90.

59. Guinan Jr. J.J., Warr W.B., Norris B.E. (1984) Topographic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp., Neurol.* 226: 21-27.
60. Halliwell J.V., Adams P.R. (1982) Voltageclamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.*, 250: 71-92.
61. Harrison J. M., Irving R. (1965) The anterior ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 124: 15-42.
62. Harrison J. M., Irving R. (1966) The organization of the posterior ventral cochlear nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 126: 391-401.
63. Housley G.D., Kanjhan R., Raybould N.P., Greenwood D., Salih S.G., Jarlebark L., Burton L.D., Setz V.C., Cannell M.B., Soeller C., Christie D.L, Usami S., Matsubara A., Yoshie H., Ryan A.F., Thorne P.R. (1999) Expression of the P2X(2) receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the cochlea: implications for sound transduction and auditory neurotransmission. *J. Neurosci.*, 19: 8377-8388.
64. 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. Neurosci.*, 13: 1932-1946.
65. Jagger D.J., Housley G.D. (2002) A-type potassium currents dominate repolarisation of neonatal rat primary auditory neurons in situ. *Neurosci.*, 109: 169-182.
66. Jagger D.J., Housley G.D. (2003) Membrane properties of type II spiral ganglion neurones identified in a neonatal rat cochlear slice. *J. Physiol.*, 552: 525-533.
67. Juiz J. M., Rueda J., Merchan J.A., Sala M.L. (1989) The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear. Res.*, 40: 65-74.
68. Jung D.K., Lee S.Y., Kim D., Joo K.M., Cha C.I., Yang H.S., Lee W. B., Chung Y.H. (2005) Age-related changes in the distribution of Kv1.1 and Kv3.1 in rat cochlear nuclei. *Neurol. Res.*, 27: 436-440.
69. Kane E.C. (1974) Synaptic organisation in the dorsal cochlear nucleus of the cat: a light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 155: 301-330.
70. Kanold P. O., Manis P.B. (1999) Transient potassium currents regulate the discharge patterns of dorsal cochlear pyramidal cells. *J. Neurosci.*, 19: 2195-2208.
71. Kimura R.S. (1975) The ultrastructure of the organ of Corti. *Int. Rev. Cytol.*, 42: 173-222.
72. Kitajiri M., Yamashita T., Tohyama Y., Kumazawa T., Takeda N., Kawasaki Y., Matsunaga T., Girgis S., Hillyard C.J., MacIntyre I., és mtsai (1985) Localization of calcitonin gene-related peptide in the organ of Corti of the rat: an immunohistochemical study. *Brain Res.*, 358: 394-397.

73. Kleinlogel S., Oestreicher E., Arnold T., Ehrenberger K., Felix D. (1999) Metabotropic glutamate receptors group I are involved in cochlear neurotransmission. *Neuroreport*, 10: 1879-1882.
74. Koch U., Braun M., Kapfer C., Grothe B. (2004) Distribution of HCN1 and HCN2 in rat auditory brainstem nuclei. *Eur. J. Neurosci.*, 20: 79-91.
75. Kros C.J., Crawford A.C. (1990) Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J. Physiol.*, 421: 263-291.
76. Kuriyama H., Albin R.L., Altschuler R.A. (1993) Expression of NMDA Receptor mRNA in the rat cochlea. *Hear. Res.*, 69: 215-220.
77. Kuriyama H., Jenkins O., Altschuler R.A. (1994) Immunocytochemical localization of AMPA selective glutamate receptor subunits in the rat cochlea. *Hear. Res.*, 80: 233-240.
78. Leao K.E., Leao R.N., Sun H., Fyffe R.E., Walmsley B. (2006) Hyperpolarization-activated currents are differentially expressed in mice brainstem auditory nuclei. *J. Physiol.*, 576: 849-64.
79. Li Y., Um S.Y., McDonald T.V. (2006) Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *Neuroscientist.*, 12: 199-210.
80. Liberman M.C. (1980) Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear. Res.*, 3: 45-63.
81. Liberman M.C. (1990) Effects of chronic cochlear de-efferentation on auditory-nerve response, *Hear. Res.* 49: 209-223.
82. Liberman M.C., Dodds L.W., Pierce S. (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 301: 443-460.
83. Lin X. (1997) Action potentials and underlying voltage-dependent currents studied in cultured spiral ganglion neurons of the postnatal gerbil. *Hear. Res.*, 108: 157-179.
84. Lorente de No R. (1933) Anatomy of the eight nerve. III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope*, 43: 327-350.
85. Lorente de No R. (1981) The primary acoustic nuclei. Raven Press, New York.
86. Lu S.M., Schweitzer L., Cant N.B., Dawbarn D. (1987) Immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide in the superior olivary complex and cochlea of cat and rat. *Hear. Res.*, 31: 137-146.
87. Ludwig A., Budde T., Stieber J., Moosmang S., Wahl C., Holthoff K., Langebartels A., Wotjak C., Munsch T., Zong X., Feil S., Feil R., Lancel M., Chien K.R., Konnerth A., Pape H.C., Biel M., Hofmann F. (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.*, 22: 216-224.
88. Ludwig A., Zong X., Jeglitsch M., Hofmann F., Biel M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393: 587-91

89. Luebke A., Dickerson I.M. (2002) Role of CGRP receptor component protein (RCP) in CGRP mediated signal transduction, in: A.f.R.i. (Ed.), *Otolaryngol.*, vol. 25, , p. 309.
90. Macica C.M., von Hehn C.A., Wang L.Y., Ho C.S., Yokoyama S., Joho R.H., Kaczmarek L.K. (2003) Modulation of the Kv3.1b potassium channel isoform adjusts the fidelity of the firing pattern of auditory neurons. *J. Neurosci.*, 23: 1133-1141.
91. Magee J.C. (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 18: 7613-24.
92. Manis P.B., Marx S.O. (1991) Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J. Neurosci.*, 11: 2865-2880.
93. Manis P.B., Molitor S.C., Wu H. (2003) Subthreshold oscillations generated by TTX-sensitive sodium currents in dorsal cochlear nucleus pyramidal cells. *Exp. Brain Res.*, 153: 443-451.
94. Matsubara A., Laake J.H., Davanger S., Usami S., Ottersen O.P. (1996) Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J. Neurosci.*, 16: 4457-4467.
95. Merchán-Pérez A., Liberman M.C. (1996) Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J. Comp. Neurol.*, 371: 208-221.
96. Mistrík P., Mader R., Michalakis S., Weidinger M., Pfeifer A., Biel M. (2005) The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 280: 27056-61.
97. Mo Z.-L., Adamson C.L., Davis R.L. (2002) Dendrotoxin-sensitive  $K^+$  currents contribute to accommodation in murine spiral ganglion neurons. *J. Physiol.*, 542: 763-778.
98. Mo Z.-L., Davis R.L. (1997a) Heterogeneous voltage dependence of inward rectifier currents in spiral ganglion neurons. *J. Neurophysiol.*, 78: 3019-3027.
99. Mo Z.-L., Davis R.L. (1997b) Endogenous firing patterns of murine spiral ganglion neurons. *J. Neurophysiol.*, 77: 1294-1305.
100. Moore J.K. (1986) Cochlear nuclei: Relationship to the auditory nerve. In: R.A. Altschuler, D. W. Hoffmann, P.R. Bobbin (Eds.), *Neurobiology of hearing: The cochlea*, Raven Press, New York, 1986, pp. 283-301.
101. Moore J.K., Osen K.K. (1979) The cochlear nuclei in man. *Am. J. Anat.*, 154: 393-418.



102. Moosmang S., Stieber J., Zong X., Biel M., Hofmann F., Ludwig A. (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.*, 268: 1646-52.
103. Mou K., Adamson C.L., Davis R.L. (1998) Time-dependence and cell-type specificity of synergistic neurotrophin actions on spiral ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.*, 402: 129-139.
104. Mugnaini E., Warr W.B., Osen K.K. (1980) Distribution and light microscopic features of granule cells in the cochlear nuclei of cat, rat, and mouse. *J. Comp. Neurol.*, 191: 581-606.
105. Musialek P., Lei M., Brown H.F., Paterson D.J., Casadei B. (1997) Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current,  $I(f)$ . *Circ. Res.*, 81: 60-68.
106. Nakagawaa T., Yamashitaa M., Hisashia K., Usamib S., Kakazua Y., Shibataa S., Nakashimaa T., Koikea K., Kuboa K., Komune S. (2005) GABA-induced response in spiral ganglion cells acutely isolated from guinea pig cochlea. *Neuroscience Research*, 53: 396-403.
107. Nolan M.F., Malleret G., Lee K.H., Gibbs E., Dudman J.T., Santoro B., Yin D., Thompson R.F., Siegelbaum S.A., Kandel E.R., Morozov A. (2003) The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar purkinje cells. *Cell*, 115: 551-564.
108. Notomi T., Shigemoto R. (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 471: 241-276.
109. Oertel D., Bal R., Gardner S.M., Smith P.H., Joris P.X. (2000) Detection of synchrony in the activity of auditory nerve fibers by octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97: 11773-11779.
110. Oertel D., Wu S.H. (1989) Morphology and physiology of cells in slice preparation of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.*, 283: 228-247.
111. Oertel D., Young E.D. (2004) What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends Neurosci.* 27: 104-110.
112. Oestreicher E., Arnold W., Ehrenberger K., Felix D. (1997) Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs. *Hear. Res.*, 107: 46-52.
113. Osen K.K. (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 136: 453-484.
114. Osen K.K. (1972) Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 144: 355-372.
115. Ottersen O.P., Takumi Y., Matsubara A., Landsend A.S., Laake J.H., Usami S. (1998) Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog. Neurobiol.*, 54: 127-148.

116. Pál B., Pór Á., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z. (2005) Voltage-gated and background channel subunits expressed by the bushy cells of the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.*, 199: 57-70.
117. 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.
118. Pál B., Rusznák Z., Harasztosi Cs., Szűcs G. (2004) Depolarization-activated  $K^+$  currents of the bushy neurones of the rat cochlear nucleus in a thin brain slice preparation. *Acta Physiol. Hung.*, 91: 83-98.
119. Pape H.C., Mager R. (1992) Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron*, 9: 441-48
120. Perney T.M., Kaczmarek L.K. (1997) Localization of a high threshold potassium channel in the rat cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 386: 178-202.
121. Petralia R.S., Rubio M.E., Wang Y.X., Wenthold R.J. (2000) Differential distribution of glutamate receptors in the cochlear nuclei. *Hear. Res.*, 147: 59-69.
122. 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. Bull.*, 71: 529-538.
123. Puel J.L., Pujol R., Tribillac F., Ladrech S., Eybalin M. (1994) Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. *J. Comp. Neurol.*, 341: 241-256.
124. Pujol R. (1994) Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *Br. J. Audiol.*, 28: 185-191.
125. Raphael Y., Altschuler R.A. (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res. Bull.*, 60: 397-422.
126. Reid M.A., Flores-Otero J., Davis R.L. (2004) Firing patterns of type II spiral ganglion neurons in vitro. *J. Neurosci.*, 24: 733-742.
127. Rhode W.S., Oertel D., Smith P.H. (1983a) Physiological properties of cells labelled intracellularly with horseradish peroxidase in cat ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 213: 448-463. Reid M.A., Flores-Otero J., Davis R.L. (2004) Firing patterns of type II spiral ganglion neurons in vitro. *J. Neurosci.*, 24: 733-742.
128. Rhode W.S., Smith P.H., Oertel D. (1983b) Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat dorsal cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 213: 426-447.
129. Roberts W.M., Jacobs R.A., Hudspeth A.J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.*, 10: 3664-3684.
130. Robertson D. (1983) Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.*, 9: 263-278.

131. Robertson D., Johnstone B. M. (1978) Efferent transmitter substance in the mammalian cochlea: single neuron support for acetylcholine. *Hear. Res.*, 1: 31-34.
132. Romand R., Romand M.R. (1985) Qualitative and quantitative observations of spiral ganglion development in the rat. *Hear. Res.*, 18: 111-120.
133. Rosenberger M. H., Fremouw T., Casseday J.H., Covey E. (2003) Expression of the Kv1.1 ion channel subunit in the auditory brainstem of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *J. Comp. Neurol.*, 462: 101-120.
134. Rothman J.S., Manis P.B. (2003) Differential expression of three distinct potassium currents in the ventral cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.*, 89: 3070-3082.
135. Ruel J., Chen C., Pujol R., Bobbin R.P., Puel J.L. (1999) AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig. *J. Physiol.*, 518: 667-680.
136. Rusznák Z., Forsythe I.D., Brew H. M., Stanfield P.R. (1997) Membrane currents influencing action potential latency in granule neurons of the rat cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, 9: 2348-2358.
137. Ryugo D.K., Haenggeli C. A., Doucet J.R. (2003) Multimodal inputs to the granule cell domain of the cochlear nucleus. *Exp. Brain Res.*, 153: 477-485.
138. 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.
139. Safieddine S., Eybalin M. (1992a) Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptor mRNAs in cochlear neurones. *Neuroreport*, 3: 1145-1148.
140. Safieddine S., Eybalin M. (1992b) Triple immunofluorescence evidence for the coexistence of acetylcholine, enkephalins and calcitonin gene-related peptide within efferent (olivocochlear) neurons of rats and guinea-pigs. *Eur. J. Neurosci.*, 4: 981-992.
141. Safieddine S., Prior A. M., Eybalin M. (1997) Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig. *Eur. J. Neurosci.*, 9: 356-367.
142. Sahley T.L., Nodar R.H. (1994) Improvement in auditory function following pentazocine suggests a role for dynorphins in auditory sensitivity. *Ear Hear.*, 15: 422-431.
143. Santoro B., Grant S.G.N., Bartsch D., Kandel E.R. (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to Eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 14815-20.
144. Santoro B., Tibbs G.R. (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 868: 741-64.

145. Santos-Sacchi J. (1993) Voltage-dependent ionic conductances of type I spiral ganglion cells from the guinea pig inner ear. *J. Neurosci.*, 13: 3599-3611.
146. Schweitzer L., Cant N.B. (1984) Development of the cochlear innervation of the dorsal cochlear nucleus of the hamster. *J. Comp. Neurol.*, 225: 228-243.
147. Sequier J.M., Brennand J., Barhanin J., Lazdunski M. (1990) Regional expression of a M C D-peptide and dendrotoxin I-sensitive voltage-dependent potassium channel in rat brain. *FEBS Lett.*, 263: 163-165.
148. Serodio P., Rudy B. (1998) Differential expression of Kv4 K<sup>+</sup> channel subunits mediating subthreshold transient K<sup>+</sup> (A-type) currents in rat brain. *J. Neurophysiol.*, 79: 1081-1091.
149. Sheppard D.N., Valverde M.A., Represa J., Giraldez F. (1992) Transient outward currents in cochlear ganglion neurons of the chick embryo. *Neurosci.*, 51: 631-639.
150. Shibasaki K., Nakahira K., Trimmer J.S., Shibata R., Akita M., Watanabe S., Ikenaka K. (2004) Mossy fibre contact triggers the targeting of Kv4.2 potassium channels to dendrites and synapses in developing cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, 89: 897-907.
151. Shibata R., Nakahira K., Shibasaki K., Wakazono Y., Imoto K., Ikenaka K. (2000) A-type K<sup>+</sup> current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J. Neurosci.*, 20: 4145-4155.
152. Shibata S., Ono K., Iijima T. (1999) Inhibition by genistein of the hyperpolarization-activated cation current in porcine sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.*, 128: 1284-90.
153. Sliwinska-Kowalska M., Parakkal M., Schneider M.E., Fex J. (1989) C GRP-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: a light and electron microscopy study. *Hear. Res.*, 42: 83-95.
154. Smith C.A. (1968) Ultrastructure of the organ of Corti. *Adv. Sci.*, 24: 419-433.
155. Soto-Prior A., Cluzel M., Renard N., Ripoll C., Lavigne-Rebillard M., Eybalin M., Hamel C.P. (1995) Molecular cloning and expression of  $\alpha$  parvalbumin in the guinea pig cochlea. *Molecular Brain Research*, 34: 337-342.
156. Spoenclin H. (1979) Sensory neural organization of the cochlea. *J. Laryngol. Otol.*, 93: 853-877.
157. Stevens D.R., Seifert R., Bufe B., Muller F., Kremmer E. (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, 413: 631-35.
158. Stieber J., Herrmann S., Feil S., Loster J., Feil R., Biel M., Hofmann F., Ludwig A. (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pace maker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15235-15240.

159. Strassle B. W., Menegola M., Rhodes K.J., Trimmer J.S. (2005) Light and electron microscopic analysis of KChIP and Kv4 localization in rat cerebellar granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 484: 144-155.
160. Szabó Zs., Harasztosi Cs., Sziklai I., Szűcs G., Rusznák Z. (2002) Ionic currents determining the membrane characteristics of type I spiral ganglion neurons of the guinea pig. *Eur. J. Neurosci.*, 16: 1887-1895.
161. Szabó Zs., Harasztosi Cs., Szűcs G., Sziklai I., Rusznák Z. (2003) A detailed procedure and dissection guide for the isolation of spiral ganglion cells of the guinea pig for electrophysiological experiments. *Brain Res. Prot.*, 10: 139-147.
162. Tolbert L.P., Morest D.K., Yuigelson-Todd D.A. (1982) The neuronal architecture of the anteroventral cochlear nucleus of the cat in the region of the cochlear nerve root: Electron microscopy. *Neuroscience*, 4: 3053-3067.
163. Trussell L.O. (1997) Cellular mechanisms for preservation of timing in central auditory pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: 487-492.
164. Ulens C., Tytgat J. (2001) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J. Biol. Chem.*, 276: 6069-72.
165. Usami S., Hozawa J., Tazawa M., Yoshihara T., Igarashi M., Thompson G.C. (1988) Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 447: 36-45.
166. Usami S., Osen K.K., Zhang N., Ottersen O.P. (1992) Distribution of glutamate-like and glutamine-like immunoreactivities in the rat organ of Corti: a light microscopic and semiquantitative electron microscopic analysis with a note on the localization of aspartate. *Exp. Brain Res.*, 91: 1-11.
167. Vargas G., Lucero M.T. (2002) Modulation by PKA of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.*, 188: 115-25.
168. Wainger B.J., DeGennaro M., Santoro B., Siegelbaum S.A., Tibbs G.R. (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 411: 805-10.
169. Wang H., Kunkel D.D., Schwartzkroin P.A., Tempel B.L. (1994) Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J. Neurosci.*, 14: 4588-4599.
170. Warr W.B. (1975) Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 161: 159-181.
171. Warr W.B. (1980) Efferent components of the auditory system. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.*, 89: 114-120.
172. Warr W.B., Boche J.B., Neely S.T. (1997) Efferent innervation of the inner hair cell region: origins and terminations of two lateral olivocochlear systems. *Hear. Res.*, 108: 89-111.

173. Webster D.B., Trune D.R. (1982) Cochlear nuclear complex of mice. *A m. J. Anat.*, 163: 103–130.
174. Whitaker G. M., Angoli D., Nazzari H., Shigemoto R., Accili E.A. (2007) HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J. Biol. Chem.*, 282: 22900–22909.
175. Williams S.R., Christensen S.R., Stuart G.J., Hausser M. (2002) Membrane potential bistability is controlled by the hyperpolarization-activated current  $I(h)$  in rat cerebellar Purkinje neurons in vitro. *J. Physiol.*, 539: 469–83.
176. Wu J.Y., Cohen I.S. (1997) Tyrosine kinase inhibition reduces  $I(f)$  in rabbit sinoatrial node myocytes. *Pflügers Arch.*, 434: 509–14.
177. Wu J.Y., Yu H., Cohen I.S. (2000) Epidermal growth factor increases  $I(f)$  in rabbit SA node cells by activating a tyrosine kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1463: 15–19.
178. Wu S.H., Oertel D. (1984) Intracellular injection with horseradish peroxidase of physiologically characterized stellate and bushy cells in slices of mouse anteroventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.*, 4: 1577–1588.
179. Yanagihara K., Irisawa H. (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* 385: 11–19.
180. Young E.D., Spirou G.A., Rice J.J., Voigt H.F., Rees A. (1992) Neural organization and responses to complex stimuli in the dorsal cochlear nucleus. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 336: 407–413.
181. Yu H., Chang F., Cohen I.S. (1993) Phosphatase inhibition by calyculin A increases  $I(f)$  in canine Purkinje fibers and myocytes. *Pflügers Arch.*, 422: 614–16.
182. Yu H., Wu J., Potapova I., Wymore R.T., Holmes B., (2001) MinK-related protein 1: A  $\beta$  subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ. Res.*, 88: E84–87.
183. Zhang S., Oertel D. (1993) Giant cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *J. Neurophysiol.*, 69: 1398–1408.
184. Zhang S., Oertel D. (1994) Neuronal circuits associated with the output of the dorsal cochlear nucleus through fusiform cells. *J. Neurophysiol.*, 71: 914–930.
185. Zhang S.Y., Robertson D., Yates G., Everett A. (1999) Role of L-type  $Ca^{2+}$  channels in transmitter release from mammalian inner hair cells I. Gross sound-evoked potentials, *J. Neurophysiol.*, 82: 3307–3315.
186. Zhong S-X., Liu Z-H. (2004) Immunohistochemical localization of the epithelial sodium channel in the rat inner ear. *Hear. Res.*, 193: 1–8.
187. Zhou Z., Liu Q., Davis R.L. (2005) Complex regulation of spiral ganglion neuron firing patterns by neurotrophin-3. *J. Neurosci.*, 25: 7558–7566.

## Közlemények

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

**In extenso** közlemények:

1. **Rusznák Z, Bakondi G, Pocsai K, Pór A, Kosztka L, Pál B, Nagy D, Szucs G.**  
Voltage-gated Potassium Channel (Kv) Subunits Expressed in the Rat Cochlear Nucleus.  
J Histochem Cytochem. 56(5):443-65 IF: 2,449
2. **Bakondi G, Pór Á., Kovács I, Szűcs G, Rusznák Z.**  
Voltage-gated K<sup>+</sup> channel (Kv) subunit expression of the guinea pig spiral ganglion cells studied in a newly developed cochlear free-floating preparation  
Brain Res. 1210: 148-162. (elektronikus formában hozzáférhető) IF: 2,341
3. **Bakondi G, Pór Á., Kovács I, Szűcs G, Rusznák Z.**  
HCN subunit expression pattern of guinea pig spiral ganglion cells  
Bírálat alatt

A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

**In extenso** közlemények:

1. **Pocsai K, Pal B, Pap P, Bakondi G, Kosztka L, Rusznak Z, Szucs G.** 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 Bull.* 71(5):529-38. IF: 1,684
2. **Pocsai K, Kosztka L, Bakondi G, Gonczi M, Fodor J, Dienes B, Szentesi P, Kovacs I, Feniger-Barish R, Kopf E, Zharhary D, Szucs G, Csernoch L, Rusznak Z.**  
Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture.  
*Cell Mol Life Sci.* 63(19-20):2364-76. IF: 4,655
3. **Rusznák Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Dienes B, Fodor J, Telek A, Gönczi M, Szucs G, Csernoch L.**  
Mitochondrial expression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and non-malignant human cells.  
*Virchows Arch.* 452(4):415-26 IF: 2,251

## **Tárgyszavak**

Nucleus cochlearis

Úszószelet preparátum

Ganglion spirale

Immunhisztokémia

Cochlearis úszószelet preparátum

Retrográd jelölés

Konfokális mikroszkópia

## **Keywords**

Cochlear nucleus

Free floating preparation

Spiral ganglion

Immunohistochemistry

Cochlear free floating preparation

Retrograde labelling

Confocal microscopy



## **Köszönetnyilvánítás**

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

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Rusznák Zoltánnak, valamint Szűcs Géza Professor Úrnak munkám során nyújtott útmutatásaikért és baráti támogatásukért. Köszönet illeti Dr. Kovács Ilonát, a Hajdú-Bihar Megyei Kórház Pathológiai Osztályának vezetőjét, és az immunhisztokémiai laboratórium dolgozóit, Pór Ágnes, Károlyiné Editet és Horváth Tímeát az immunhisztokémiai kísérletek kivitelezéséhez nyújtott önzetlen segítségükért.

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

## **Függelék**