

A Corti-féle szerv támasztósejtjeinek vizsgálata fejlődésben lévő és kifejlett hallású egerek hemicochlea preparátumában

Doktori tézisek

Berekméri Eszter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Jancsik Veronika, Ph.D., nyugdíjas tudományos főmunkatárs

Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2020

1. Bevezetés

1.1. A Corti-féle szerv támasztósejtjei

Az emlősök hallószerve, a Corti-féle szerv, a belső fül csontos csigájában helyet foglaló érzékhám. A széles körben kutatott receptorsejtek mellett, támasztósejtek alkotják, amelyek aktívan is részt vesznek a hallás mechanizmusában. A belső szőrsejteket a belső határoló és a belső phalangeális sejt veszi körül. Mellettük áll, a Corti-alagutat övezve, a pillér sejtek két sora, amelyeket a három sorban elhelyezkedő Deiters sejtek követnek. Ezeknek a sejteknek az apikális pólusán helyezkednek el a külső szőrsejtek. A Deiters sejtek sorait a Hensen sejtek követik, amelyek köbös Claudius sejtekkel kapcsolódnak. A Claudius sejtek a külső árokban folytatódnak, amely végül a cochlea oldalfalát alkotó *stria vascularis*ba torkollik.

A pillér és Deiters sejt fejlett mikrotubuláris rendszerrel rendelkezik, ezzel a Corti-szerv strukturális vázát is meghatározzák. Nélkülük a cochleáris (makro)mechanika nem valósulhat meg. A Deiters sejtről emellett feltételezik, hogy a mikromechanikában is szerepet játszik: hosszú nyúlványa érinti a külső szőrsejtek apikális részét, így kihat annak mozgására. A külső szőrsejtek mozgása csökkenti a hallásküszöböt a cochleáris amplifikációnak nevezett jelenség útján.

1.2. A purinerg Ca^{2+} szignalizáció szerepe a hallás folyamataiban

Az ATP, mint parakrin szignalizációs molekula módosítja a hallószerv működését. Egyes receptorai a fejlődés egy-egy kiemelt szakaszában fokozottan vannak jelen, koordinálják a szőrsejt-hallóneuron szinapszis érési folyamatait. A támasztósejtek

intracelluláris Ca^{2+} szintjének ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) szabályozásával modulálni tudják a cochleáris folyadékterek ionkoncentrációját, ezzel a szőrsejtek ingerelhetőségét. A receptorsejtek sérülésekor, ATP indukálta ATP kibocsátás útján, intercelluláris Ca^{2+} hullámok indulnak meg a támasztósejtek között, amelyeket expressziós mintázatváltozás követ. Szerepe a sérülés elhatárolása, sejtszintű védekező mechanizmusok megindítása lehet.

Támasztósejteken és szőrsejteken egyaránt leírtak ionotróp P2X és metabotróp P2Y receptorokat.

1.3. Egyéb, vizsgált jelátviteli rendszerek

Több anatómiai munka foglalkozik a belső fülben lévő tranziens receptor potenciál (TRP) csatornákkal, amelyek minden sejtípuson megtalálhatóak. A TRP ankirin 1 (TRPA1) csatorna kiemelt expresszióját találták Hensen sejteken, de leírták a többi támasztósejt és szőrsejt típuson is. Számos tulajdonsága miatt azt gondolták, hogy része lehet a szőrsejtek mechanoelektromos transzdukciós komplexének, amely feltevés később nem állta meg a helyét.

TRP vanilloid 1 (TRPV1) receptort szintén találtak támasztósejteken és a mai napig ígéretes target molekulának tartják halláskárosodások kezelésére. Mindkét fentebb említett TRP csatorna nem szelektív kation csatorna, nagy Ca^{2+} permeabilitással.

A külső szőrsejtekhez futó, acetyl-kolin (ACh) tartalmazó efferens idegrostok kollaterálisokat adnak le a Deiters és a Hensen sejtek felé. Izolált Deiters sejtekről sikerült kimutatni, hogy Ca^{2+} beáramlással reagálnak ACh adására, amely valószínűleg $\alpha 9$ -es alegységet tartalmazó, nagy Ca^{2+} permeabilitású nikotinos ACh receptoron keresztül valósul meg. Hensen sejtekről, tudomásunk szerint, nincs

olyan adat, amely funkcionálisan is alátámasztaná az efferens beidegzést.

2. Célkitűzés

A halláskárosodások gyógyszeres terápiája megoldatlan. Ennek oka az ismereteink hiánya, amely a hallószerv nehezen hozzáférhető, bonyolult anatómiai felépítéséből ered. A vizsgálatok elősegítése érdekében célunk volt:

Kifejlett hallószervvel rendelkező egerek Corti-szervének Ca^{2+} imaging vizsgálati feltételeinek fejlesztése, jel-zaj arány javítása:

- Célzott, nagy szelektivitású indikátortöltési módszer beállítása hemicochlea preparátumban.
- Ca^{2+} imaging mérések során egyértelműen azonosítható legyen a tranziens forrása.
- A jobb jel-zaj arány elérése a vizsgálatok során.
- A beállított módszer alkalmazható legyen több sejtípus esetében.

A felépítésében unikális, Deiters sejtet, vékony nyúlványával csak egyedi sejtjelöléssel tudjuk tanulmányozni. Célunk volt:

Deiters sejtek purinerg szignalizációs változásait nyomon követni a hallás fejlődése szempontjából kritikus posztnatális időszakban:

- A Deiters sejtek purinerg receptorok által közvetített Ca^{2+} jeleit két kanyarulatban, szubcelluláris kompartmentenként (sejttest és nyúlvány) nyomon követni, a hallás kifejlődése során (P5-25).
- Az egyedi sejtjelölés által lehetővé tett morfológiai változások nyomon követése, szubcellulárisan.

3. Módszerek

3.1. A kísérleti állatok

Kísérleteinkhez 5-25 napos BALB/c egereket használtunk, melyek tartása és szaporítása megfelelt a hatályos törvényi előírásoknak.

3.2. Hemicochlea preparátum elkészítése

Az állatokat izoflurán bódítás után dekapitáltuk, majd az eltávolított cochleákat jéghideg, oxigenizált perilympa-szerű oldatba helyeztük. Rögzítés után sztereomikroszkópos segítséggel, vibratómmal kettémetszettük a cochleákat a csiga tengelye mentén, majd epifluoreszcens mikroszkóp kísérleti kamrájába helyeztük, ahol folyamatosan oxigenizált perilympa-szerű oldattal perfundáltuk (3,5 ml/perc).

3.3. Fluoreszcens indikátorral történő sejtjelölések

Tömeges töltési módszerrel feltölteni kívánt preparátumokat 10 μM fura-2/AM-ben inkubáltuk pluronic F-127 (0,05 térfogat%) jelenlétében 30 percen át. Ezután 15 percen keresztül normál kísérleti oldatban mostuk, hogy az aspecifikus észterázok a festékről lehasítható az acetoximetilészter (AM) csoportot. A megvilágítás és a felvétel paraméterei megegyeztek a fura-2/ K^+ esetében leírtakkal.

Az egy-sejt elektroporációhoz 1 mM végkoncentrációjú OGB-1 vagy fura-2/ K^+ indikátorral töltöttünk meg egy 5 $\text{M}\Omega$ -os boroszilikát üvegpipettát és mikroszkópos vezérlés mellett Burleigh mikromanipulátorral közelítettük meg a töltésre kiválasztott sejtet. A membrán finom megnyomása után stimuláltuk (10 ms, 10 μA). A megtöltött sejttől elemeltük a pipettát. A mérések során OGB-1 indikátor esetén 494 ± 5 nm, fura-2 esetében pedig 340 ± 5 nm és 380 ± 5 nm hullámhosszú fényel gerjesztettük a sejteket. A fluoreszcens képek az alapvonal felvételekor 0,1 és 0,05 Hz frekvenciával készültek, a drog adását követően pedig 1 és 0,5 Hz frekvenciával OGB-1 és fura-2 esetében. A fluoreszcens képek Imaging Workbench 6.0-as szoftver vezérlése alatt készültek.

3.4. Drog adagolás menete

A sejtek stimulálása ATP (100 μM), UTP (100 μM), allil-izotiocianát (AITC, 200, 400 és 2000 μM), kapszaicin (300 és 900 nM) és karbakol (100 μM , mind Sigma-Aldrich) 30 másodpercen keresztül perfúzióba adagolásával történt. A stimulust minden esetben egy legalább 3 perces alapvonal felvétel előzte meg. 2 stimulus között legalább 10 perc várakozási időt hagytunk.

Oldatsere esetében (Ca^{2+} -mentes oldat) a perfúziós cső áthelyezése után legalább 15 perc várakozási időt hagytunk az újabb stimulusig.

3.5. Adatelemzés

A fluoreszcens képek off-line kerültek elemzésre. Az elemzés során kijelöltük a sejtet, sejtkompartmentet és a jelölésbe eső pixelek átlagos intenzitását számította ki a szoftver, amelyből levontuk a háttér intenzitását.

A továbbiakban Igor Pro 6.37 programot használtunk az adatok elemzésére. OGB-1 indikátor esetében normalizált amplitúdókat számítottunk:

$$\frac{dF}{F_0} = \frac{F_t - F_0}{F_0}$$

ahol, F_t a t időben mért intenzitás értéke (a mérőrendszer önkényes egysége), F_0 a kezdőpontban (alapvonalon) mért sejtintenzitás. Fura-2 esetében a két emittált hullámhossz hányadosát számoltuk:

$$R = F_{340}/F_{380}$$

Amplitúdók mérése során az intenzitásgörbe legmagasabb pontját vettük 100 %-nak. A válaszok időtartamának számításakor ezen intenzitás 50 %-ának elérése és erre az értékre történő visszaesés közötti időt néztük (másodpercben).

A görbe alatti területeket (AUC) az Igor Pro 6.37 programban számítottuk ki.

A jel-zaj arány számítások során a kétféle fura indikátorral töltött 12-12 sejtet választottunk ki véletlenszerűen és ezek 100 μM ATP-re adott válaszait vetettük össze:

$$S/N = \Delta R / \delta R$$

ahol ΔR az ATP által kiváltott válasz amplitudója, δR pedig az alapvonal szórása.

A statisztikai elemzés során Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük a csoportok normáleloszlását. Amennyiben lehetséges volt paraméteres próbákat alkalmaztunk (t-tesztek egy és két csoport összevetése esetén, ANOVA, Bonferroni post-hoc teszttel több csoport összevetésekor). Amennyiben a csoport eloszlása nem volt normális, nem-paraméteres tesztek alkalmaztunk (Wilcoxon-teszt egy és két csoport összevetésekor, Kruskal-Wallis teszt, Bonferroni post-hoc teszttel több csoport vizsgálata esetén). A fejlődéstani vizsgálatok során regressziós modelleket alkalmaztunk. A statisztikák R 3.3.2-ben készültek, R Studio környezettel.

3.6. Morfometriai mérések

Deiters sejtek szubcelluláris kompartmentjeinek méréséhez az elektroporációval megtöltött sejtekről készült Z-síkbeli áttekintő felvételeket használtuk (sejtenként 7-9 db). A méréseket FIJI/ImageJ programmal végeztük. A képek egymásra vetítése után mértük le a paramétereket. A szélesség mérések a sejttest illetve a nyúlvány közepén történtek.

A nyúlvány paramétereinek mérésénél csak a fluoreszcens képre tudunk támaszkodni, de annak érdekében, hogy tudjuk a fluoreszcens kép megbízhatóan alkalmazható morfológiai mérésekre a sejttesten mért paramétereket mind a fluoreszcens, mind az ferde megvilágítású képeken lemértük. Amennyiben az ferde megvilágításban mért paraméterek és a fluoreszcens megvilágításban mért paraméterek adatai 5 %-os hibahatáron belül megegyeztek úgy a sejt bekerülhetett az elemzésbe.

4. Eredmények

4.1. Egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszer beállítása és validálása

Ca²⁺ indikátor sejtbe juttatása egy-sejt elektroporációval hemicochlea preparátumban

Az első hallásoptimum megjelenését követően (>P14) hemicochlea preparátumban tölthetőnek bizonyultak a Deiters, Hensen és Claudius sejtek egy-sejt elektroporációs metodikával, 10 μ A és 10 ms elektromos stimulus, 1 mM indikátorkoncentráció használatával. A támasztósejtek mellett mindkét szőrsejt típust sikeresen megjelöltük.

Az egy-sejt elektroporáció a hemicochlea preparátum mindhárom kanyarulatában alkalmas volt egyedi sejt töltésre és a tömeges töltési eljáráshoz képest jobb jel/zaj arányt biztosított. Ennek köszönhetően szubcelluláris méréseket is kiviteleztünk a Deiters sejtek nyúlványán.

ATP-vel reverzibilis és ismételhető Ca²⁺ válaszok válthatók ki Deiters, Hensen és Claudius sejtekben

ATP (100 μ M, 30 s) perfúzióba adagolva visszatérő és ismételhető Ca²⁺ tranzienseket váltott ki Deiters, Hensen és Claudius sejteken. Deiters sejteken a sejtesten túl a nyúlvány ATP-re adott válaszait is detektáltuk. A válaszok karakterisztikájukban eltérőnek mutatkoztak: legnagyobb amplitúdója és AUC-je a Deiters sejtek nyúlványának volt, míg Hensen sejteknél két csúcsú, Claudius sejteknél rövid időtartamú Ca²⁺ tranzienseket mértünk.

A támasztósejtek purinerg receptorainak elkülönítésére Ca²⁺-mentes közegben is kiváltottuk az ATP indukálta Ca²⁺ tranzienseket, amelyek jellemzően kisebb amplitúdóval jelentkeztek, mint a kontroll közegben. Ez szignifikáns volt a Deiters sejtek mindkét kompartmentjén.

TRPA1 és TRPV1 csatornák stimulációja nem idézett elő $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést

TRPA1 agonista, AITC adása (200, 400 és 2000 μ M, 30 s) nem idézett elő Ca^{2+} tranzienszt a mért támasztósejteken. OGB-1 egyhullámhosszú indikátorral töltött sejtek esetében, azonban a fókuszsíkból történő, koncentráció-függő elmozdulást tapasztaltunk. Az intenzitás-változások jobb követhetősége érdekében fura-2/ K^+ , ratiometrikus indikátor alkalmazása mellett is adagoltunk AITC-t, ekkor sem tapasztaltunk $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést.

AITC kezelést követően Deiters és Hensen sejtek ATP indukálta Ca^{2+} tranziensei megközelítik az AITC előtt adott ATP által kiváltott jel értékeit, azonban Claudius sejtekben ez az utókontroll alatta marad a kezdeti értéknek.

TRPV1 agonista, kapszaicin perfundálása (330 és 990 nM, 30 s) sem idézett elő Ca^{2+} tranzienszt egyik támasztósejten vagy kompartmenten sem. Ez esetben a fókuszsíkból való elmozdulást sem tapasztaltuk.

ACh receptor agonista karbakollal Deiters és Hensen sejteken is kiváltható Ca^{2+} tranziens

A beidegzéssel rendelkező támasztósejteken (Deiters és Hensen sejtek) vizsgáltuk karbakol (100 μ M, 30 s) hatását. A Deiters sejtek mindkét kompartmentjén mértünk Ca^{2+} tranzienszt az esetek ~ 33 %-ában, míg Hensen sejtekből ötből egy reagált az AChR agonistára.

4.2 A morfológia és a purinerg szignalizáció fejlődése a Deiters sejtekben

Deiters sejtek sejttestének és nyúlványának morfológiai változásai a posztnatális fejlődés során nem mutatnak tonotópikus eltéréseket

Egy-sejt elektroporációval töltött Deiters sejtek teljes alakja, a nyúlvánnyal, nyomon követhető a szelektív festésnek köszönhetően.

Ez nem csak funkcionális, de morfológiai megfigyeléseket is lehetővé tesz. Vizsgáltuk Deiters sejtek fejlődését, két tonotópikus helyen – apikális és középső kanyarulat, – a posztnatális fejlődés kritikus időszakában (P5-25). A hemicochlea preparátumban a Corti-szerv fejlődése is megfigyelhető (pl.: Corti-alagút, Nuel-féle rés megnyílása). A Deiters sejtek sejttestének növekedése nagyjából a P14-15-ös időszakra eléri a felnőtt kori hosszúságot, szélességében nem változik számottevően. A nyúlvány hossza szintén nem mutat változást, a szélessége viszont P17-18-ig csökken. A koron túl a tonotópikus elhelyezkedés is meghatározza a méreteket: az apikális kanyarulatbeli sejtek nagyobbak, mind szélességben, mind hosszúságban.

A fejlettség-függő spontán Ca^{2+} aktivitás tonotópikus heterogenitást és szubcelluláris különbséget mutat

Az ingerlés nélkül keletkező, spontán Ca^{2+} tranziensek jellemzőek a fejlődési időszakra. Előfordulásuk frekvenciája mindkét kanyarulatban fordítottan arányos a korrall, >P20 esetében már megszűntnek tekinthetők.

A spontán jelek mindkét kompartmenten tapasztalhatóak. A nyúlvány aktivitása tendenciózan meghaladja a sejttestét. Az apikális kanyarulatban kiemelt időpont a P10-11-es fejlődési stádium, amikor a sejtek sokkal aktívabbak voltak a többi időszakhoz képest.

Ca^{2+} tranziensek amplitúdójának, időtartamának és AUC értékének alakulása a fejlődés során

A Deiters sejtek ATP indukálta Ca^{2+} tranzienseinek karakterisztikája átalakul a fejlődés folyamán. A kor előrehaladtával a nyúlvány amplitúdók egyre nagyobbak lesznek, míg az időtartamuk fokozatos csökkenést mutat a P10-11-es periódustól. Az AUC értékek állandónak tekinthetők a fejlődés során. A kanyarulatok összevetése során a középső kanyarulatbeli válaszok tendenciózan nagyobb értékeket vesznek fel.

A sejttest fejlődése során a Ca^{2+} tranziensek amplitúdója a P10-11-es időszakra megugrik, de innen fokozatos csökkenést mutat. A válasz időtartama és AUC értéke ugyanezt a képet mutatja. A kanyarulatok összevetése során nem tapasztaltunk tonotópikus eltéréseket.

Szelektív P2Y receptor aktiváció kor- és tonotópia-függő Ca^{2+} tranzienseket mutat, P2Y dominanciával az apikális kanyarulatban

Az ATP mellett a P2Y receptor specifikus UTP-vel (100 μM , 30 s) történő ingerlés után is mértünk Ca^{2+} tranzienseket, mindkét kompartmenten és kanyarulatban, 3 fejlődés szempontjából kiemelten fontos időszakban (P10-11, P14-15, P17-18). Ezek minden paraméterben az ATP által kiváltott értékek alatt maradtak, de változásuk iránya hasonló volt az ATP indukálta válaszokéhoz.

A nyúlvány amplitúdója növekedett, ugyanakkor a válaszok időtartama csökkent a fejlődéssel. Az AUC érték nem mutatott változást. A kanyarulatok összevetésekor csak az amplitúdókban találtunk eltérést, az apikálisan elhelyezkedő sejtek javára.

A sejttesteknek minden mért értéke (amplitúdó, időtartam, AUC) csökkent a fejlődés során. A kanyarulatok összehasonlításakor itt is az apikális kanyarulatban elhelyezkedő sejtek mutattak nagyobb értékeket.

5. Következtetések

5.1. Egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszer beállítása és validálása egér hemicochlea preparátumban

A hemicochlea preparátum előnyei

A hemicochlea preparátum számos előnnyel rendelkezik, amelyek lehetővé teszik a hallószerv vizsgálatát: megtartott anatómiai felépítés, hozzáférési lehetőség több kanyarulathoz (tonotópikus vizsgálatok), keresztmetszeti képben vizsgálható a Corti-szerv, kifejlett, felnőtt-szerű hallószerv esetében is.

Korábbi munkánk során tömeges indikátortöltési eljárást alkalmaztunk a festék AM formájával. Ekkor a molekulák megragadnak az extracelluláris terekben is, így a háttérfestődés jelentős, ami a jel/zaj arány csökkenését idézi elő. Az AM-kötött indikátormolekulák bármely sejt számára felvehetők, vagyis nem lehet velük szelektíven egy sejtre összpontosítani, a fluoreszcencia szóródása viszont rontja a forrás azonosításának lehetőségét. Ezek mellett a festési eljárás és a deészterifikálás hosszabb időt vesz igénybe, csökkentve a preparátum túlélését.

Az általunk beállított és validált egy-sejt elektroporációs indikátortöltés lehetőséget ad egyedi támasztősejtek vizsgálatára halló egér hemicochlea preparátumában. Az elektroporációs metodika gyors és jobb jel/zaj arányt biztosít, így nő a térbeli felbontó képessége a funkcionális imaging vizsgálatainknak, a fluoreszcencia forrása egyértelműen beazonosítható a háttér minimális jelölődése miatt.

Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltés cochleáris támasztősejtekben

Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltést korábban neuronális dendrit tüskék Ca^{2+} jeleinek méréséhez használták. Az általunk beállított módszer sikerrátája hasonlatos az agyszeletekben leírt neuronok indikátortöltéséhez. A környezetbe kerülő kevés festék nem akadályozta a láthatóságát az olyan szubcelluláris sejtrégióknak, mint a Deiters sejtek nyúlványa.

A tömeges töltés előnye, hogy több sejt megtöltődik a preparátumban, így azonos körülmények között vizsgálhatók és összevethetők a különböző sejtípusok vagy vizsgálhatók olyan jelenségek, mint az intercelluláris Ca^{2+} hullámok. Ugyanakkor egy-sejt elektroporációval is sikeresen tudunk tölteni több sejtet a hemicochleában, bár sokkal nagyobb gyakorlat és ügyesség kell ennek kivitelezéséhez.

Sikeresen alkalmaztuk az egy-sejt elektroporációs indikátortöltést Deiters, Hensen és Claudius sejteken, ugyanakkor a pillér sejtek töltődése nem volt megfelelő. A támasztósejtek mellett a külső és belső szőrsejtek is elektroporálhatónak bizonyultak.

ATP kiváltotta Ca^{2+} jelek detektálhatók Deiters, Hensen és Claudius sejtekben és a szubcelluláris Deiters sejt nyúlványban az elektroporációt követően

Az egy-sejt elektroporáció alkalmazását és megbízhatóságát a sejtek életben maradásának és reakcióképességének igazolásával kívántuk alátámasztani. Ehhez a P2 receptor agonista ATP-t választottuk stimulusnak.

Az elektroporált sejtek esetében ATP-vel visszatérő és ismétlődő $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést figyeltünk meg. A válaszok jel/zaj aránya jobb volt, mint a tömeges töltés mellett. Deiters sejtekben, a szelektív töltés lehetővé tette a szubcelluláris vizsgálatokat.

Az ATP által kiváltott válaszok eltértek karakterisztikájukban: a Hensen sejtek esetében gyakran tapasztalható volt a Ca^{2+} válasz két csúcúsága, a Claudius sejtek mutatták a leggyorsabb visszatérési időt az ATP stimulust követően, a Deiters sejtek nyúlványán voltak mérhetőek a legnagyobb amplitúdójú jelek. Ennek oka lehet, hogy itt található a mért sejtek/kompartmentek közül a legnagyobb denzitásban ATP által aktiválható receptorok. Ugyanakkor az alacsonyabb alapvonal intenzitás és a kisebb kompartment is szerepet játszhat a nagy amplitúdó kialakításában.

A P2X ionotróp és P2Y metabotróp receptorok csoportjainak elkülönítéséhez Ca^{2+} -mentes oldatban váltottuk ki az ATP indukálta Ca^{2+} tranzienszt. Ekkor belső raktárak felszabadulása látható, a P2Y receptorok jelenléte igazolható. A kísérlet önkontollos elrendezése lehetővé teszi, hogy a teljes ATP kiváltotta Ca^{2+} választ, és a kisebb, csak P2Y részvételével létrejövő Ca^{2+} választ ugyanazon a sejten tudjuk összehasonlítani. Egy harmadik stimulus alkalmazása – ismét

Ca²⁺ jelenlétében –igazolja, hogy a sejt élet-és válaszképessége a kísérlet végén is megtartott.

Ca²⁺-mentes közegben mindegyik sejtél megfigyelhető volt az ATP által kiváltott Ca²⁺ tranziens, amelyből funkcionális P2Y receptorokra következtettünk. A tranziensek amplitúdójának csökkenése mutatja, hogy a külső Ca²⁺ beáramlás is hozzájárul az ATP válaszhoz, így P2X receptorok jelenléte bizonyítható.

TRPA1 aktiválása nem váltott ki Ca²⁺ jelet Deiters és Claudius sejtekben, de Hensen sejteken előfordulhat ez a csatorna

TRP csatornák jelenlétét a cochleában anatómiai módszerekkel vizsgálták. A validációs kísérleteink során, funkcionális megközelítést alkalmaztunk: TRPA1 agonista AITC-t és TRPV1 agonista kapszaicint adtunk a perfúzióhoz.

TRPA1 csatornák expresszióját korábban kimutatták újszülött egerek támasztósejtjein. Idősebb állatok preparátumán csak SGN rostok jelölődnek. Kísérleteink ez utóbbi álláspontot igazolják. Az agonista AITC-vel, több koncentrációban sem tudtunk Ca²⁺ tranzienseket kiváltani a sejtekben. Egyetlen, Hensen sejtben kialakuló, kis amplitúdójú Ca²⁺ választ sikerült megfigyelni a 400 μM AITC-re, amely azonban nem jelentkezett a nagyobb koncentrációnál.

TRPA1 agonista a fókuszsíkból való Corti-szerv kitérést idézett elő

Egy dózis-függő, fókuszsíkból való Corti-szerv elmozdulást tapasztaltunk AITC adagolása során. Ezt AITC kiváltotta sejtkontrakció okozta, melyet TRPA1 aktiválódása során feltételeztek szőrsejtek, Deiters sejtek és pillér sejtek esetében is, P0-7-es preparátumban. Ez a kontrakció nem volt megfigyelhető Trpa1 -/- genotípusú egerekben. A munkánk során nem tapasztaltuk a Deiters sejtek direkt kontrakcióját. A többi említett sejtet pedig nem akartuk (OHC) vagy nem tudtuk (PC) vizsgálni. A TRPA1 csatornák jelenlétét a Corti-szervben nem tudjuk kizárni.

Szintén ezen csatornák jelenlétére utalhat a Claudius sejteken tapasztalható második, AITC stimulációk után adott ATP válasz amplitúdójának csökkenése, amely magyarázható a koexpresszáló TRPA1-P2X receptorok keresztinhibíciójával is.

TRPV1 agonista kapszaicinnek semmilyen hatását nem tudtuk kimutatni a belső fül támasztósejtjein

TRPV1 csatornák jelenlétére a belső fülben szintén anatómiai munkákból következtettünk. TRPV1 expresszióról korábban kiderült, hogy faj és korfüggő mintázatot mutat a cochleáris epitheliumban. A hallószervben RNS szintje először emelkedik az embrionális 18 – P8 napig. Más munkák ebben az időszakban nem találtak TRPV1 RNS-t. A TRPV1 fehérjét immunjelöléssel viszont sikerült kimutatni.

Kísérleteink során nem kaptunk Ca^{2+} választ kapszaicin adagolásra, ami TRPV1 csatorna hiányára utal Deiters, Hensen és Claudius sejteken. Ingerléskor fellépő fókuszsíkból való kitérést sem tapasztaltuk.

Ezek alapján kísérleteink nem tudják megerősíteni a TRPV1 csatornák támasztósejteken lévő funkcionális expresszióját.

ACh receptor aktiváció Deiters és Hensen sejtkben is Ca^{2+} tranzienst idéz elő

ACh-t tartalmazó efferensek innerválják a külső szőrsejteket, negatívan szabályozva a cochleáris amplifikációt. Deiters és Hensen sejtekhez efferens kollaterálisok futnak anatómiai pályajelölések alapján. Ennek megerősítésére már történtek funkcionális vizsgálatok is: izolált Deiters sejteken sikerült kiváltani ACh indukált áramokat, amelyekért $\alpha 9$ -alegységet tartalmazó nikotinos ACh csatorna felelős. Hensen sejtek beidegzéséről csak anatómiai megfigyelések vannak.

Széles spektrumú ACh receptor agonistát, karbakolt, használtunk a kísérleteinkben. A reagáló Deiters sejtek aránya (~33 %), hasonló volt izolált Deiters sejtkben tapasztalt arányhoz. A Hensen sejtek 20 %-án sikerült kiváltanunk karbakollal Ca^{2+} tranzienst, amelynek

amplitúdója kisebb volt, mint az ATP által kiváltotté. Ez valószínűsíti a Hensen sejtek és megerősíti a Deiters sejtek kolinerg beidegzését.

5.2. Deiters sejtek morfológiai és purinerg szignalizációs fejlődése

Posztnatális alaktani fejlődés Deiters sejtek esetében a hallás kifejlődésének kritikus időszakában

Az egerek hallószervének érése megközelítőleg a születés utáni harmadik hét végére tekinthető teljesnek.

A hemicochlea preparátumot már korábban is alkalmazták morfológiai paraméterek mérésére, hiszen keresztmetszetben jó rálátást ad a Corti-szervre, ráadásul 3 kanyarulathoz enged hozzáférést. Azonban széles látótérben nem látszik a Deiters sejtek nyúlványa a külső szőrsejtek takarása miatt. Ennek a szubcelluláris régióknak a fejlődése felderítetlen maradt eddig. Kutatások szerint ez a kompartment fontos a cochleáris mikromechanikában. Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltéssel, fluoreszcens képen tanulmányozhatóvá vált a fejlődő Deiters sejtek nyúlványa is.

A sejtek morfológiai fejlődését az első hét végétől nyomon követtük. A Deiters sejtek sejtteste a P14-15-ra elérte a felnőtt méretet és a kezdeti tonotópikus eltérések elmosódtak. Ez hasonló a mongol futóegerekben tapasztaltakhoz. Az általunk mért felnőtt sejtmagasság, nagyobb mint a más egértörzsekben mérték. Ugyanakkor több tanulmány foglalkozik az egértörzsek közötti morfológiai eltérésekkel. BALB/c egértörzsről eddig nem volt ilyen adat.

A nyúlvány nem mutatott hosszváltozást, de az apikális kanyarulatban hosszabb nyúlványok találhatóak. Ez a vártaknak megfelelő, hiszen a szőrsejtek magassága is változik a csiga tengelye mentén. A nyúlványok a szőrsejtek apikális felszínével együtt alkotják a *lamina reticularist*, így a hosszuk korrelál a szőrsejtek hosszával, azonban hosszabbak azoknál, mivel apikálisabban és laterálisan végződnek a kiindulási pontjukhoz képest. A szőrsejtek a középső és

apikális kanyarulat között ~ 1,2-szeresükre nyúlnak. A >P20-as időre ez a középső-apikális kanyarulatbeli növekedés a Deiters sejtek nyúlványa esetében ~1,5-szörös volt. Ez lehet BALB/c törzsbeli sajátosság.

A Nuel-féle tér a szőrsejtek és a Deiters sejtek nyúlványai között a P6-10-es korban nyílik meg, megelőzve a Corti-alagutat. A nyúlványok vastagságának csökkenésével jelenik meg ez az intercelluláris tér. A nyúlvány karcsúsodási folyamata a P17-18-as időpontig tartott.

A spontán Ca^{2+} aktivitás a phalangeális nyúlványon és a sejttesten csökken a kor előrehaladtával

A spontán Ca^{2+} aktivitás és a fiatalkori intercellulárisan terjedő Ca^{2+} hullámok a Corti-szervben jól leírt folyamatok. A Ca^{2+} jeleket a támasztósejtekből félcsatornákon keresztül felszabaduló ATP váltja ki, parakrin módon. Szerepük a szőrsejt-SGN szinapszis érésében, megerősítésében, a gyenge szinapszisok eltávolításában van.

A Deiters sejtek nyúlványán nagyobb a spontán Ca^{2+} aktivitás, mint a mélyebb réteget alkotó sejttesten. Oka lehet az endolymphatikus felszínen elhelyezkedő több félcsatorna: A felszabaduló ATP korábban eléri a receptor aktivációhoz szükséges koncentrációt. E mellett az endolymphatikus felszínen sűrűbben helyezkednek el a purinerg receptorok is.

A spontán jelek frekvenciája az apikális kanyarulatban P10 körül érte el a maximumát. Az aktivitás csökkenés egyes purinerg receptorok tranzienst jelenléte miatt lehet. Több típusról kimutatták, hogy a P10-es érési időszakban jelen van (pl.: P2X1, P2X2/3), majd fokozatosan eltűnik a Corti-szervből. Olyan receptorokról is tudunk, amelyeknek a mennyisége csökken az életkor előre haladtával, de nem szűnik meg az expressziójuk. A receptor mintázat expressziós profiljának változásán túl a félcsatornák expressziója is változhat.

Az apikális kanyarulatban észlelt P10-11 fontos időszak a külső szőrsejt fejlődése szempontjából. Ekkor kezd expresszálódni a prestin motorprotein. Ez a kiemelkedő periódus nem volt jelen a középső kanyarulatban. Ennek oka, hogy a cochleában a Corti-szerv érése bazo-apikális gradienst mutat, így elképzelhető, hogy korábban találhattunk volna növekedett spontán jel aktivitást.

ATP indukálta Ca^{2+} tranziensek alakja függ a fejlődési stádiumtól

A purinerg receptor expresszió a cochleában korfüggő folyamat. A receptor sűrűség a posztnatális első hétben emelkedik a Deiters sejteken, majd P11-12 körül csökkeni kezd. Ez a receptor mintázat magyarázza az általunk is megfigyelt változásokat az amplitúdóban, a válasz időtartamban és AUC értékekben, amelyeket ATP adásakor megfigyeltünk a különböző életkorokban.

A paraméterek növekedtek P5-7-től P10-11-ig, ahol tetőztek az értékek, majd egy lassabb, csökkenő periódus következett.

A nyúlvány amplitúdója emelkedett és a középső kanyarulatban nagyobb értékeket mutatott. Ez egyenlőtlen purinerg receptor eloszlásra utal a cochleán belül.

A válasz időtartama és AUC értéke mindkét kompartmentben csökkenő tendenciát mutatott. Oka a Ca^{2+} pufferelő és eltávolító mechanizmusok egységesebb voltában kereshető, amelyeket eddig csak szőrsejtekben vizsgáltak.

P2X és P2Y receptorok együttesen vesznek részt fejlődésben, tonotópia függően

Az ATP endogén agonistája P2X és P2Y receptoroknak. Hogy tanulmányozhassuk a P2Y receptorok szerepét, a fejlődés kritikus időszakában UTP-t, P2Y agonistát adtunk a perfúzióba.

A UTP által kiváltott Ca^{2+} tranziensek is korfüggők voltak. Ugyanakkor kisebb értékeket vettek fel, mint az ATP kiváltotta jelek. Ezek alapján feltételezhető, hogy mindkét receptor altípus szerepet

játszik az ATP kiváltotta jelátvitelben a fejlődő Deiters sejtek esetében. Ez független a sejt kanyarulatbeli helyzetétől.

A két kanyarulat P2X és P2Y profilja különbözik. Az ATP kiváltotta válaszok nagyobbak a középső kanyarulatban, míg az UTP kiváltotta válaszok amplitúdója az apikális kanyarban nagyobb.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A dolgozat alapját képező publikációk

Berekméri, E., Deák, O., Téglás, T., Sággy, É., Horváth, T., Aller, M., Fekete, Á., Köles, L., Zelles, T., 2019. Targeted single-cell electroporation loading of Ca²⁺ indicators in the mature hemicochlea preparation. *Hear. Res.* 371, 75–86.

<https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.004>

Berekméri, E., Fekete, Á., Köles, L., Zelles, T., 2019. Postnatal Development of the Subcellular Structures and Purinergic Signaling of Deiters' Cells along the Tonotopic Axis of the Cochlea. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8101266>

Berekméri, E., Szepesy, J., Köles, L., Zelles, T., 2019. Purinergic signaling in the organ of Corti: Potential therapeutic targets of sensorineural hearing losses. *Brain Res. Bull.* 1–10.

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.029>

Köles, L., Szepesy, J., Berekméri, E., Zelles, T., 2019. Purinergic Signaling and Cochlear Injury-Targeting the Immune System? *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2979. <https://doi.org/10.3390/ijms20122979>

6.2. Egyéb publikációk

Kalász, H., Tekes, K., Faigl, E.B., Pöstényi, Z., Berekméri, E., Karvaly, G., Adeghate, E., 2017. Monitoring the Level of ¹⁴C-Labelled Selegiline Following Oral Administration. *Open Med. Chem.* J. 11, 1–8.

<https://doi.org/10.2174/1874104501711010001>