

**Dr. Völgyi Béla:**

**„Réskapcsolatok szerepe a retina párhuzamos információs csatornáinak működésében”**  
című MTA Doktori (DSc) értekezésének opponensi véleménye.

Készítette: Dr. Krenács Tibor, tudományos főmunkatárs, PhD, DSc

Az értekezés teljes terjedelmében 101 oldal. Rövid bevezetés után jelölt 13 oldalon áttekinti a retina rétegeinek felépítését és idesejt-típusainak főbb kapcsolatait, funkcióit, regulációs lehetőségeit, majd röviden bemutatja az elektromos szinapszisokként is jellemzett, connexin csatornák (réskapcsolatok) felépítését és potenciális jelentőségét a retinában. Ezt követi a 3 fő csoportba gyűjtött célkitűzések rész, a 9 oldalon tárgyalt anyagok és módszerek, az eredmények és értékelésük 51 oldalas bemutatása, majd az új tudományos eredmények 6 pontban történő kiemelése, valamint az irodalomjegyzék. A munkát 28, a témában a jelölt közreműködésével született közlemények listája zárja, ahol 18-ban első, vagy utolsó szerző.

Már a magas impaktú folyóiratokban megjelent közlemények és azok szerzőtársai, - a gap junction kutatás élvonalát képviselő Paul Goodenough, David Paul a Harvard Egyetemről, valamint jelölt mentora Stewart Bloomfield a New York-i Allami Egyetemről - előre jelzik, hogy magas színvonalú munkáról van szó, ami be is igazolódik.

A connexinek által formált direkt sejt-sejt kommunikációs csatornák közvetlen és gyors metabolikus kommunikációt tesznek lehetővé összekapcsolt sejtek hálózataiban. Ennek jelentőségét először a szívizomban figyelték meg az akciós potenciál gyors és szinkron tovaterjedésében. Logikus tehát, hogy a központi idegrendszerben ahol óriási denzitásban vannak jelen, szintén fontos jelközvetítő szerepük lehet. Azonban erre vonatkozó kutatások eredményei a rendszer komplexitása miatt csak az utóbbi években és csak sporadikusan jelennek meg. Jelölt a retinában jól lokalizált, neurotranszmittereik és elektrofiziológiájuk alapján többnyire karakterizált idegsejt hálózatok közötti homológ és heterológ direkt kommunikációs csatornák lokalizációjának és szerepének feltárásában végez igen jelentős kutatásokat már több mint két évtizede, melyekre a disszertáció is épül.

Az értekezés eredményei szerint a Cx36 típusú elektromos szinapszisok az alapvetően vertikális, a receptoroktól a bipoláris-horizontális-amakrin sejteken a dúcsejtek irányába tartó párhuzamos pályák horizontális kapcsolataiban, az érkező jelek feldolgozásában, szinkronizálásában, a zaj szűrésével a szignál erősítésében, valamint kódolásában vehetnek részt.

Korszerű és szerteágazó módszertant alkalmazott. Immunológiai, molekuláris, jelzőanyag (neurobiotin, Lucifer sárga, GFP) és riporter gén jelölések kombinálásával azonosította a connexin kapcsolt sejttypusokat, amit génmanipulációs, valamint *ex vivo* retina preparátumokon egyes pályarendszerek viszonylag szelektív farmakológiai, vagy genetikai blokkolásával, ill. spontán és fénystimuláció utáni akciós-potenciálok elvezetésével nyert funkcionális információkkal tett teljessé. Művészi tökéletességre fejlesztette a neurobiotin-jelöléssel végzett elektromos szinapszisokkal összekapcsolt neuronhálózatok megjelenítését, ahol különösen fontos az emberi retina idegsejtek közötti réskapcsolatok feltárása.

Olvasmányos, igényesen, de fókuszáltan fogalmazott munka, ahol nagyon hasznosak a rövid részösszefoglalók. Néhol ugyan nehéz követni a leírtakat, de ezt inkább a rendszer komplexitása magyarázza. Apróbb hiányosságok, pontatlanságok azért előfordulnak.

- Így, célszerű lett volna az újabb, molekuláris evolúciós rokonságot tükröző connexin osztályozás ( $\alpha, \beta, \gamma, \sigma, \epsilon$ ) említése is (pl. Cx36 -  $\sigma 2$  Cx; GJD2).

- Egy-két záró összefoglaló rajzolt ábra nagy segítség lett volna az új megfigyelések megértésében, áttekintésében, ebben a többszörös kémiai és elektromos átkapcsolásokkal átszőtt rendszerben; és

- Bár a magas impaktok nyilvánvalóak, de hasznos lett volna egy a szakmai tudományos paramétereket, IF, idézettség, Hirsch-index összefoglaló rövid paragrafus is a munka végére.

- Néhány ábra, különösen az összetett molekuláris morfológiai ábrák, így nyomtatásban (digitálisan nem állt a bíráló rendelkezésére) részletszegény és alulméretezett nem tükrözi pontosan a leírtakat. Például a 9. ábra fekete-fehér képe helyett szerencsés lett volna színes, vagy nagyobb intenzitás-dinamikájú

ábrát alkalmazni. Vagy, ilyen pl. a 6. ábra (de pl. a 15. is. ahol a Cx36 jelölés színére sem utal az aláírásban, fehér vagy zöld), ill. pl. 30a. ábra, ahol  $\text{Ca}^{2+}$  szignálok intenzitási jelei nem azonosíthatók.

- Logikusan a 2. és 3. ábra sorrendjét fel lehetett volna cserélni.

- Egyes ábrák, aláírások, ill. a rájuk vonatkozó szöveges rész hiányosak, például:

39. oldalon a 10. ábra kapcsán neurobiotinnal kapcsolt dúc- és amakrin sejtekre, majd a kapcsolt sejtek körüli dopaminerg A2 sejtől álló gyűrűkre utal, ahol az ábrán azonban a neurobiotin jelölést csak már említi. Jó lett volna a kapcsoltságot is egyúttal bemutatni.

35. oldal. 7. ábra nem csak a Cx36 expresszióról, hanem fényinger indukálta akciós potenciálok, ill. azok küszöbértékeinek összehasonlításáról is szól.

Az általam észlelt elírások is ritkák és nem értelemzavaróak. Néhány példa:

21. old. epofluoreszcens

26. old. ...”mezjének”...

33. old. az egér Vsx1 gén... előbb helyesen, majd csupa nagybetűvel, ami a humán génre utalna, helytelenül szerepel. Itt a mondat sem szabályos ...”kiütése esetén azt figyeltük meg...ami miatt az OFF teljesítményének jelútvonal csökkenésében nyilvánult meg.”

35. old. ...”detektációs”...

36. old. ...”mezjének”...

79. old. BC helyett CB...

80. old. ...”machanizmus”...

Apróbb pontatlanságok, pl. a 22. oldalon félreérthető, hogy a neurobiotin jelölés után „peroxidáz reagensbe tettük”, nyilván sztreptavidin-peroxidáz komplex volt (ABC)... Következő mondat „Ezt egy DAB-os jelölés követte”..., itt hiányzik a hidrogénperoxid szubsztrát említése.

Stíluskritika is elvértve merült fel:

15. oldal „újabb vizsgálatok...” 1983, 1998 és 1999-es irodalmat idéz, melyek minimum 20 évesek.

38. old. ...”dopamin mediálta szignalizáció mediálja”...

59. old. sejthető, de nem derül ki mi a „Neurolucida”...

Az immuncitokémia fogalom szövegben szelektíven feltüntetett sejtípusok kimutatásakor számomra is elfogadható, de a szöveti struktúra megőrzésével járó módszerre inkább illik az immunhisztokémia kifejezés, mert a komplex struktúra és a sztérikus viszonyok a disszertációban is döntő szereppel bírnak.

A retina ideghártyája egy komplexen, szerteágazó kapcsolatokon keresztül szabályozott kompartmentális működésű rendszer. Jelölt az emlős retinaidegek, főként Cx36 típusú réskapcsolatainak előfordulását és funkcionális kapcsolatait térképezte fel szisztematikusan az ideghártya strukturálisan is elkülöníthető rétegeiben és idegsejtjei között. Elektromos szinapszisokat igazolt a retina szinte minden idegsejtípusa, így csap-csap, csap-pálcika, bipoláris-bipoláris, csap-bipoláris, amakrin-bipoláris, amakrin-amakrin, dúc-amakrin, dúc-dúcsejtek között. Bizonyította, hogy a réskapcsolatok sokszor eltérő funkciókat közvetítenek a kapcsolt sejtek típusától függően.

A retina réskapcsolatait illetően számos kérdés merül fel a bírálóban. Így, hogy:

- *Milyen szerepe lehet a Cx36-on kívüli más izotípusú, pl. a Cx45 csatornáknak a vizuális információ közvetítésében?* Hiszen a Cx36 KO állatokban jelölt is kimutatta, hogy a dúc-dúcsejt elektromos kapcsolatokban, jelenlétük ellenére nem kritikus a szerepük. Ugyanakkor, Cx45 KO állatokban igazolta, hogy az apoptózis „halálszignál” közvetítésében ez utóbbi izotípusú csatornák szerepe jelentős. Ennek ellenére a Cx45 csatornák egyéb, pl. jelközvetítő szerepét nem vizsgálta.
- Ráadásul Blankenship és mtsai. (*J. Neurosci.* 2011, 31:9998-10008) részlegesen kolokalizálták a Cx45 és Cx36 fehérjéket bipoláris sejtekben. *Képezhetnek-e ezek az izotípusok heteromer, vagy heterotípusos csatornákat? És eltér-e ezen izotípusok csatornaszelektivitása, pl. neurobiotinra? Kiterjesztik-e a a jeltovábbításra irányuló vizsgálatokat más izotípusú csatornákra is, vagy ez nem lényeges, mert a fő jelközvetítő funkciókat a Cx36 csatornák végzik?*
- Egy csoport, ponty retina horizontális sejtek dentritjein Cx26 típusú félcsatornák szerepét igazolta, a horizontális sejtek csap receptorokra gyakorolt negatív „feedback” funkciójának közvetítésében (*Kamermans és mtsai Science.* 2001, 292:1178-80).
- Ismert, hogy a dokkolási előtti sejtmembrán connexon félcsatornák („hemichannels”) önálló funkciókkal bírnak, pl. ATP szabályozott kijuttatása a sejtekből. *Milyen szerepük lehet a retina ideghártyájában a félcsatornáknak és hogyan lehetne vizsgálni őket szelektíven?*

- A retinában a gliasejtek is képeznek elektromos szinapszisokat (Müller sejtek: Cx43, Cx45; astrocyták: Cx30, Cx43 és Cx45). *Hogyan befolyásolják ezek a vizuális jelek továbbítását, létrehozhatnak-e közvetlen pl. Cx45 metabolikus kapcsolatot a retina idegsejtekkel?*

Jelölt homo- és heterológ réskapcsolatokat igazolt hasonló és eltérő neurotranszmissziót mutató idegsejt kompartmentekben, és számos emlősfaj retinájában végzett erre vonatkozó komparatív vizsgálatokat az egyedfejlődés korai szakaszában. Állatvédelmi szempontból is fontos, hogy a sokféle fajból származó kontroll retinák más célból feláldozott állatokból származtak.

- Megállapította, hogy pl. a tengerimalac és emberi retinában magasabb a szubpedikuláris Cx36 plakkok denzitása. *Kérdés, hogy ez milyen funkcionális előnyt/hátrányt sejtet, más emlősökhöz képest?*

Fényinger hatására retina dúcsejtekből elvezetett akciós potenciálok alapján bizonyította, hogy a csap pályarendszeren történő jeltovábbítás elektromos szinapszis-függő, és a Cx36 KO egerek sötétebb viszonyok között nem látnak.

- *Kérdés, van-e olyan retinaelváltozás, kórkép, ahol a réskapcsolatok hibája, deregulációja bizonyítottan felvethető?*
- *Hogyan változik az elektromos szinapszisok száma, „turnovere”, aktivitása idős korban, ill. krónikus betegségekben, mint a pl. diabeteses retinopathia és ez befolyásolhatja-e a látásromlás egyes típusait?*

Kettős, citokróom C és neurobiotin injekciót követően a résjunkciók farmakológiai gátlásával bizonyította szerepüket a halálszignál terjedésében (“spreading depression”), ahol a károsodás mértéke a nem gátolt csatornájú kontrollokhoz hasonló maradt.

Ehhez kapcsolódva, fokozott szemnyomással indukált ischemia kapcsán kialakult károsodás csak a Cx45 KO állatokban mérséklődött jelentősen, a homo- és heretozygota Cx36 KO egerekben nem. Ez arra utal, hogy a halálszignál közvetítésében a Cx45 típusú csatornák vesznek részt, de nem tárgyalja, hogy milyen sejtekben és hogy mi más szerepük lehet.

- *Hogyan és meddig élnek túl a Cx36, ill. Cx45 KO állatok a vad típusúakhoz képest, milyen egyéb funkciók kiesése okoz komoly, esetleg az élettel összeegyeztethetetlen problémát? Van-e más Cx szubtípus kompenzatórikus felülregulációjára utaló adat, pl. a retinában, hasonlóan a Cx43 KO állatok myocardiumához.*

Végül, érdekes, hogy számos Cx-izotípus mutációját és ezekkel kapcsolatos kórképeket leírtak, de a Cx36-ról ilyen vonatkozásban nincs igazán információ. Van tudomása arról, hogy újabban pl. újgenerációs szekvenálással találtak-e valamilyen kórképben Cx36 mutációt, vagy epigenetikai deregulációt? Ha nem, akkor lehetséges, hogy ellenálló képességük kapcsolatban van az ún. „stabil”, megújulásra nem képes idegszöveti lokalizációjukkal, ill. az idegsejtek relatíve nagy tűrőképességével?

Az értekezés igényesen alkalmazott módszerek hiteles eredményeit foglalja össze, melyek között számos új tudományos megfigyelés van, jelentősebbeknek az alábbiakat tekintem:

- 1) Emberi és egér retinában is Cx36 (δ2; GJD2) csap-csap, csap-bipoláris kapcsolatok működnek, az emberi csap bipoláris sejtek denritikus és axonális kapcsolatot is képeznek egymással.
- 2) Egér retinában A2 amakrin-amakrin sejtek közötti, valamint A2 és bipoláris sejtek közötti Cx36 elektromos szinapszisok a zaj szűrésével a szignál erősítésében vesznek részt.
- 3) A Cx36 réskapcsolatok a posztembrionális életben a szem kinyílásával válnak éretté.
- 4) A WF (széles dendritmezejű), ill. a PA (poliaxonális) amakrin sejtek axonális kapcsoltsága az információcsatornák receptív mezőit növeli.
- 5) A neurobiotin jelöléssel azonosított dúcsejt típusból 16 (vagyis zömük) elektromos szinapszisokkal kapcsolt dúc- ill. amakrin sejtekkel.
- 6) A dúc-dúc, ill. dúc-amakrin sejt réskapcsolatok eltérő spike szinkronizációt közvetítenek.
- 7) A fény hatására felszabaduló dopamin cAMP felülregulálással fokozza a dúcsejtek direkt kommunikációját környezetükkel (populációs üzemmód), míg a sötétben a csatornák áteresztőképessége csökken, ami javítja a dúcsejt által kialakított akciós potenciált.

Összegezve, Völgyi Béla MTA doktori értekezése értékes, a retina vizuális jelkódolásban és továbbításában az elektromos szinapszisok (részjunkciók) alapvető szerepét feltáró munka, ami teljesíti az MTA doktori cím megszerzéséhez szükséges követelményeket és alkalmas a nyilvános vitára bocsátásra.

Budapest, 2019. október 09.



Dr. Krenács Tibor  
MTA doktora