

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A réskapcsolatok szerepe a retina párhuzamos információs
csatornáinak működésében**

Dr. Völgyi Béla PhD

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

PÉCS, 2018

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	1
2. RÖVIDÍTÉSEK.....	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
A RETINA SZERKEZETE A GERINCES ÁLLATOKBAN.....	5
RETINA RÉTEGEI	5
AZ IDEGHÁRTYA SEJTTÍPUSAI.....	8
AZ ON-OFF REGULÁCIÓ	11
A RÉSKAPCSOLATOK SZEREPE AZ NEURONOK KÖZTI KOMMUNIKÁCIÓBAN	12
A DÚCSEJTEK TRACER-KAPCSOLTSÁGA	14
A CONNEXIN FEHÉRJÉK EXPRESSZIÓJA.....	15
A DÚCSEJTEK AKCIÓS POTENCIÁL SZINKRONIZÁCIÓJA.....	15
4. CÉLKITŰZÉS	18
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	19
A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT ÁLLATOK	19
A FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK MINTÁINAK ELŐKÉSZÍTÉSE	20
AZ <i>IN-VITRO</i> RETINA PREPARÁTUM FÉNYSTIMULÁCIÓJA.....	20
TÁJÉKOZÓDÁS AZ ÉLŐ RETINÁN	21
A PREPARÁTUMOKON VÉGZETT NEUROBIOTIN IONTOFORÉZIS ÉS INTRACELLULÁRIS ELVEZETÉS	21
EXTRACELLULÁRIS ELVEZETÉS AZ <i>IN-VITRO</i> RETINA PREPARÁTUMON	22
SZÖVETTANI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK	22
POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓS VIZSGÁLATOK	24
WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK	25
MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK	26
DENZITOMETRIA ÉS AZ ADATOK STATISZTIKAI ELEMZÉSE	26
6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE	28

ELEKTROMOS SZINAPSZISOK AZ EMLŐS RETINA PÁRHUZAMOS PÁLYARENDSZEREIBEN.....	28
<i>Réskapcsolatok a csap pályarendszerben</i>	<i>29</i>
<i>Réskapcsolatok a pálcika pályarendszerben</i>	<i>34</i>
A DÚC- ÉS AMAKRIN SEJT RÉSKAPCSOLATOK	41
<i>Az amakrin sejtek által alkotott réskapcsolatok.....</i>	<i>41</i>
<i>Az egérretina dúcsejtjeinek kategorizálása és tracer-kapcsoltsága</i>	<i>45</i>
<i>A Cx36 szerepe az egérretina dúcsejt réskapcsolatok felépítésében</i>	<i>54</i>
<i>Az egérretina dúcsejtek akciós potenciál szinkronizációs mintázatai.....</i>	<i>60</i>
<i>A szinkronizáció létrehozásában részt vevő retinális hálózatok.....</i>	<i>62</i>
A RETINÁLIS ELEKTROMOS SZINAPSZISOK KÉPI INFORMÁCIÓ FELDOLGOZÁSÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPE	67
<i>Az elektromos szinapszisok és a halálszignál terjedése</i>	<i>67</i>
<i>A dúcsejt réskapcsolatok szerepe a retinális kód kialakításában.....</i>	<i>71</i>
<i>A dúcsejt réskapcsolatok retinális adaptációban betöltött szerepe.....</i>	<i>74</i>
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	79
8. IRODALOMJEGYZÉK	80
9. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	96
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	100

1. BEVEZETÉS

A látás kétségtelenül a legfontosabb szenzoros folyamatunk, melynek során a retina (ideghártya) segítségével a külvilág ingereinek mintegy 85%-át érzékeljük. A retina a szemfenéken található, fényérzékeny idegszövet. Az emberi szem 130 millió fotoreceptora szabályos mátrixszerű rendben borítja a retina külső (ínhártya felőli) felszínét, így ezek mindegyike csak a látótér egy-egy kis részletének fényváltozásait érzékeli. A látótér képkockákra, "pixelekre" történő felbontása miatt gyakran vonunk funkcionális párhuzamot az emberi látószerv és a digitális fényképezőgép között. Az utóbbi esetben a fényképező fényérzékeny chipje (CCD; CMOS) által előállított nyers formátumú pixel-regisztrált adatok tárolása és továbbítása igen nagy kapacitást igényel, ami a modern digitális fotótechnika korlátait is jelenti. Emiatt elengedhetetlen, hogy a képi információ méretét egy erre alkalmas tömörítő algoritmus a töredékére csökkentse még mielőtt a regisztrált adattömeg további felhasználásra kerülne. Az emberi szem hasonló problémával áll szemben, amikor a fotoreceptorok mintegy 130 megapixelnyi információját az alig 3 mm átmérőjű látóidegen keresztül kell időben folyamatosan továbbítani az agy felé. Az adattömeg méretének csökkentésében a retina interneuronjainak és ezek kapcsolatrendszerének kiemelten fontos szerep jut. Az interneuronok közreműködése segítségével a kimeneti dúcsejtek már nem fotoreceptorszerű pixel-információt, hanem dúcsejt-típustól függő mintázatinformációt (luminancia-kontraszt; szín-kontraszt; orientáció; mozgás; mozgás iránya; sötétedés stb.; Sanes és Masland 2015; Seabrook és mtsai 2017) küldenek az agy felé. Az egyes mintázatinformáció-elemek kódolásáért tehát különböző dúcsejt-típusok felelnek, melyek kimenetei párhuzamos információs csatornák mentén jutnak el a látórendszer felsőbb központjaihoz. A dúcsejtek száma az emberi szemben mintegy 1 millió, ami a fotoreceptorokból származó nyers információ tömeg 1/130-adára történő redukcióját jelenti. A modern retinális neurobiológia egyik alapvető feladata éppen az, hogy feltárja azokat a retinális interneuron-hálózatokat, melyek ezt a rendkívüli mértékű tömörítési mechanizmust lehetővé teszik. Adattömörítésre ad például lehetőséget az, ha a dúcsejtek a látott kép egyes aspektusait egymástól függetlenül (aszinkron), másokat pedig a szomszédos dúcsejtek között szinkronizált akációs potenciálok formájában kódolják és ugyanazon információs csatornán (multiplexelve) küldik az agy felé (Meister 1996; Brivanlou és mtsai 1998). A központi idegrendszer minden területén található

interneuron-hálózatok, melyek projektoros neuronok aktivitását hangolják össze azzal, hogy szinkronban oldják fel őket a gátlás alól (Deans és mtsai 2001; Leznik és Llinas 2005), vagy szinkron serkentést szolgáltatnak (Szabadics és mtsai 2006) kémiai jelátvivő molekulákkal (transzmitterekkel). Hasonló kapcsolatok felelősek a retinális dúcsejtek aktivitásának szinkronizációjáért is (Mastronarde 1983a; DeVries 1999; Greschner és mtsai 2011). Ugyanakkor a dúcsejteket (ganglion cell – GC) összekapcsoló dúcsejt-dúcsejt elektromos szinapszisok (GC-GC) alapvető szerepe is bizonyításra került (Brivanlou és mtsai 1998; Schubert és mtsai 2005a; b; Völgyi és mtsai 2005; 2009; 2013a; b). A központi idegrendszer különböző területein előforduló elektromos szinapszisok (gap junction, réskapcsolat) szerepét sokáig elhanyagolhatónak tekintette a szakirodalom. Ugyanakkor az utóbbi két évtized ez irányú kutatómunkája bizonyítja, hogy az elektromos szinapszisok szerepe elengedhetetlen nemcsak a fent említett aktivitási szinkronizációban, hanem a neuronális hálózatokon továbbított információ jel-zaj arányának javításában és az információ továbbításában is (Bloomfield és Völgyi 2009). A disszertációban a továbbiakban azt részletezem, hogy a mintegy két évtizedes kutatómunkánk hogyan járult hozzá a fenti témakör ismereteinek bővítéséhez.

2. RÖVIDÍTÉSEK

ACh <i>Acetylcholine</i> , acetilkolin	GC ganglion cell, ganglion sejt (dúcsejt)
AC amacrine cell, amakrin sejt	GC-GC dúcsejt-dúcsejt réskapcsolat
AMPA α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	GC-AC dúcsejt-amakrin sejt réskapcsolat
AP4, APB 2-amino-4-foszfobutirát	GCL ganglion cell layer, ganglion sejtek rétege
BC bipolar cell, bipoláris sejt	GFP green fluorescing protein, zöld fluoreszkáló fehérje
β-gal β -galaktozidáz	GJ gap junction, réskapcsolat vagy elektromos szinapszis
BSC broad spike correlation, széles akciós potenciál szinkronizáció	H₂O₂ hidrogén peroxid
BSA <i>bovine serum albumin</i>	HRP <i>horse radish peroxidase</i> , tormaperoxidáz
C cone, csap	HC horizontal cell, horizontális sejt
cAMP ciklikus adenzin-monofoszfát	IC immuncitokémia
CaR calretinin	INL inner nuclear layer, belső sejtés réteg
cDNS komplementer DNS	IPL inner plexiform layer, belső rostos réteg
CCF cross correlation function, keresztkorrelációs görbe	ISI interspike interval, inter-spike időköz
CGL <i>corpus geniculatum laterale</i> , oldalsó térdes test	KO knock-out, génkiütött
cGMP ciklikus guanozin monofoszfát	L cone zöld (közepes hullámhossz) fényre érzékeny csapreceptor
CT circadian time	L/M opszin zöld/piros opszin
Cx connexin	LY Lucifer Yellow, Lucifer sárga festék
CytC cytochrome C, citokróm C	M cone piros (hosszú hullámhossz) fényre érzékeny csapreceptor
D₁, D₂ 1 és 2 típusú dopamin receptorok	MEA multielectrode array, sokelektrodás rendszer
DAB diamino-benzidin	mGluR6 6-os típusú metabotróp glutamát receptor
DAPI diamino phenil indol	MSC medium spike correlation, közepes akciós potenciál szinkronizáció
DB3 diffuse bipolar type 3, 3 típusú difúz elágazású bipoláris sejt	mRNS hírvivő RNS
DEPC dietilpirokarbonát	MT és V5 felsőbb agykérgi látóközpontok
EDTA etilén-diamin-tetraecetsav	NF narrow-field, keskeny dendritmezejű
FMB flat midget bipolar cell, lapos szinapszist létrehozó kis bipoláris sejt	NFL neurofibrillar layer
GABA γ -aminobutyric acid, γ -amino-vajsav	NJ neighbor-joining
GBB giant bistratified bipolar cell, óriás kettős elágazású bipoláris sejt	

NPY Neuropeptide Y	R rod, pálcika
NSC narrow spike correlation, keskeny akciós potenciál szinkronizáció	Rec recoverin
OFL optic fibers layer	RFP red fluorescing protein, vörös fluoreszkáló fehérje
ON DS ON direction selective, ON irány szelektív	RGS retinális ganglion sejt
ON-OFF DS ON-OFF direction selective, ON-OFF irány szelektív	RNS ribonukleinsav
ONL outer nuclear layer, külső magvas réteg	RIPA radioimmunoprecipitation assay puffer
OPL outer plexiform layer, külső rostos réteg	ROX 5-carboxy-X-rhodamine, qPCR festék
PA poliaxonális amakrin sejt	Rpl13a 60S riboszomális fehérje L13a alegység
PBS phosphate buffered saline, foszfát pufferelt sóoldat	S cone kék (rövid hullámhossz) zöld fényre érzékeny csapreceptor
PBST PBS, Tween-20-val	S opszin kék opszin
PCR polimeráz láncreakció	SIM structured illumination microscopy
PE pigment epithelial layer, pigmenthám réteg	S/N signal/noise ratio, jel-zaj arány
PFA paraformaldehid	TBST Tris-pufferelt sóoldat Tween-20-val
PLAP illetve placentális alkalikus phosphatase	tdTomato vörös fluoreszkáló festék
PR fotoreceptorok rétege	Triton-X 100 4-(1,1,3,3-Tetramethyl(butyl)phenyl-polyethylene glycol
PV parvalbumin	VGAT vezikuláris GABA transzporter
PVDF polyvinylidene difluoride	VIP vasoactive intestinal peptide
qPCR kvantitatív <i>real-time</i> polimeráz láncreakció	WB western blot
	WF wide-field, széles dendritmezejű
	ZT zeitgeber time

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A RETINA SZERKEZETE A GERINCES ÁLLATOKBAN

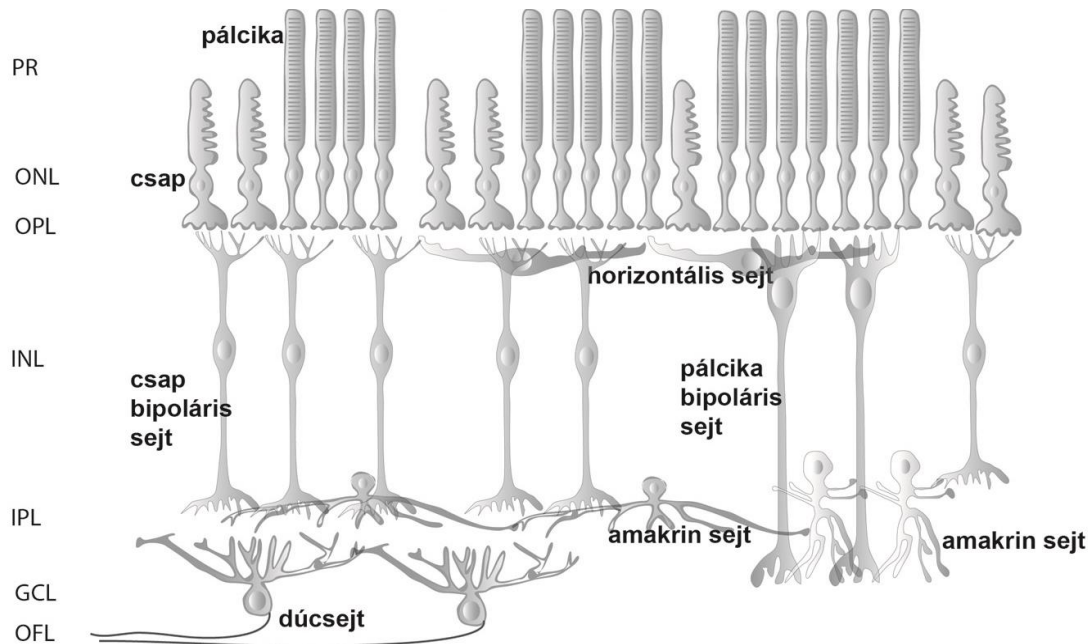
A látórendszer az emberi szervezet legdifferenciáltabb és egyúttal a legnagyobb fontossággal bíró érzékszervrendszere. Emiatt a gerinces állatok retinája a modern neurobiológia egyik kedvelt vizsgálati objektumává vált. Az ideghártya szerkezete ugyan valamelyest alkalmazkodott az egyes gerinces fajok eltérő életkörülményeihez, de a legalapvetőbb alaktani és működési elvek a több százmillió éves evolúció során sem változtak (Wässle és Boycott 1991). A retina szintjén a fényinger kódolása mellett már információfeldolgozó folyamatok is zajlanak, melynek alapját a retina rendkívül bonyolult neuronhálózata szolgáltatja. Az ideghártya a fényfelfogó fotoreceptorokon, valamint az efferens rostokat szolgáltató dúcsejteken kívül három interneuron osztály képviselőit tartalmazza, a bipoláris- (bipolar cell - BC), a horizontális- (horizontal cell - HC) és az amakrin sejteket (amacrine cell – AC), melyek minden gerinces retinában megtalálhatók. Ugyancsak egységes a különböző gerinces osztályok esetében az a rendező elv, amely a szigorúan rétegzett szerkezetet alakítja ki (Rodieck 1988).

RETINA RÉTEGEI

A retina szerkezeti felépítésére és sejtjeinek osztályozására vonatkozó vizsgálati eredmények Schultze (1866), Ramon y Cajal (1893) és Polyak (1941) munkássága nyomán már régóta ismertek. Ezek alapján három, az idegsejtek sejttestjeit tartalmazó és az ezeket határoló/elválasztó rostos réteget különböztethetünk meg. Az elfogadott nevezéktan szerint minden esetben az ínhártya felőli részeket külső-, az üvegtest felőlieket pedig belső rétegeknek nevezzük. Ennek megfelelően a következő rétegeket különítjük el (1. ábra):

1. A pigmenthám réteg (pigment epithelial layer – PE; megjegyzés: ezek az 1. ábrán nincsenek feltüntetve) szorosan egymás mellett álló hámsejtekből áll, melyek elszigetelik a retinát az érhártyától. A sejtek melanintartalma a szemfenékre érkező fény egy részének elnyelésében játszik fontos szerepet. A pigmenthám fényelnyelése megakadályozza a szem belüli fényvisszaverődést (ezt a funkciót a fényképezőgépek esetében a test matt-fekete belső felülete biztosítja). A hámsejtek apikális felszínén megfigyelhető ujjszerű nyúlványok a fény-indukáló hatására a csapok (cone – C) és pálcikák (rod – R) közé ékelődnek. Ezzel a folyamattal a pigmenthám

sejtjei a fotoreceptorok számára ingerként ható fénysugarak mennyiségét szabályozzák, így a fényadaptáció folyamatában vesznek részt. A pigmenthám sejtjei trofikus tényezőket termelnek (Hicks és Curtois 1992), melyek jelenléte elengedhetetlen a fotoreceptorok szabályos működéséhez. A hámsejtek a fotoreceptorok degenerálódó külső szegmenseinek a fagocitózisát is ellátják, valamint méregtelenítési folyamatokban is részt vesznek.



1. ábra. Az emlős retina fő rétegei és sejtípusai

GCL – dúcsejtek rétege, INL – belső sejtes réteg, IPL – belső rostos réteg, OFL – optikus rostok rétege, ONL - külső sejtes réteg, OPL - külső rostos réteg, PR – csapok és pálcikák rétege.

2. A csapok és pálcikák rétege (photoreceptors layer - PR) a receptorsejtek külső nyúlványait tartalmazza, melyek ultrastrukturális képen jellegzetes, szorosan egymásra rétegzett membránsákok (pálcikák) vagy membránbetűrődések (csapok) figyelhetők meg. Ez a membránrendszer ad helyet az összetett pigmentmolekuláknak és a különleges fényátalakító biokémiai kaskádrendszer tagjainak. Ezek alapján elmondható, hogy a PR a fototranszdukció helye.

3. A külső sejtes rétegben (outer nuclear layer - ONL) helyezkednek el több sorban a fotoreceptorok sejttestjei.

4. A külső rostos réteg (outer plexiform layer - OPL) a receptorok terminálisait, a másodlagos neuronok (bipoláris- és horizontális sejtek) nyúlványait és az ezek által létrehozott szinapszisokat tartalmazza. A bipoláris sejtek a vertikális információ továbbításban fontosak és a fotoreceptorok impulzusait továbbítják a dúcsejtek felé. A horizontális sejtek ellenben gátló interneuronok, melyek negatív visszacsatolása (feedback) alapvető fontosságú a retinális sejtek központ-környéki receptív mezejének kialakításában.

5. A belső sejtes rétegben (inner nuclear layer - INL) a retinális interneuronok (bipoláris-, horizontális-, interplexiform és amakrin sejtek) sejttestjei foglalnak helyet úgy, hogy a horizontális és bipoláris sejtek szómái az INL külső (fotoreceptorokhoz közelebbi), míg az amakrin és interplexiform sejtek sejttestjei a belső (dúcsejtekhez közeli) INL félben találhatók.

6. A belső rostos réteg (inner plexiform layer - IPL) a másodlagos szinaptikus kapcsolatok helye, ahol az információ alapvetően a bipoláris sejtek felől a dúcsejtek irányába áramlik. Ugyanakkor ebben a rétegben kapják bemeneteiket az amakrin sejtek is, melyek főleg gátló kimenetet szolgáltatnak a dúc-, bipoláris és egyéb amakrin sejtek számára. Az IPL állománya egy disztális "a" (IPL külső 2/5-e) és egy proximális "b" (IPL belső 3/5-e) alrétegre osztható. Egy alternatív felosztás szerint az IPL területét öt egyenlő alrétegre (sztrátum) oszthatjuk, melyeket az INL felől (sztrátum 1 - 5) számokkal jelölik. Az a-alréteg a sztrátum 1 és 2, a b-alréteg a sztrátum 3, 4 és 5 -t tartalmazzák.

7. A dúcsejtek rétegében (ganglion cell layer - GCL) a dúcsejtek és a rendellenes helyzetű (displaced) amakrin sejtek sejttestjei találhatók.

8. Az optikus rostok rétegében (optic fiber layer - OFL) a dúcsejtek axonális nyúlványai figyelhetők meg, amelyek a vakfolt területén elhagyják a retinát, majd a szemet.

9. A Müller-sejtek a retina gliasejtjei (megjegyzés: ezek a sejtek az 1.ábrán nincsenek feltüntetve). A retina idegsejtjeivel ellentétben nem alkotnak külön réteget. Sejttestjeik az INL-ben találhatók az interneuron szómák között. A vertikálisan haladó Müller-sejt nyúlványok végtalpai a retina két felszínén (üvegtest és pigmenthám felőli) határoló membránokat képeznek. A proximális (az üvegtest felőli) határoló membrán folytonos, így kémiaiilag is izolálja a retinát, ezzel szemben a disztális membrán nem összefüggő és a Müller-sejtek végtalpai között megfigyelhető résekben a receptorsejtek

nyúlványai helyezkednek el. A Müller-sejteknek lényeges szerepe van a retinális neuronok normális anyag- és ionforgalmának fenntartásában, különös tekintettel a kálium ion (K^+) homeosztázisra (Newman és mtsai 1984).

Az alábbiakban az egyes sejtsztyályok részletesebb leírása következik, melynek célja a fontosabb csoportok, alcsoportok bemutatása és filogenetikai összehasonlítása.

AZ IDEGHÁRTYA SEJTTÍPUSAI

Fotoreceptorok. Transzmitterként glutamátot termelnek és szabadítanak fel. Alaktani és működési szempontból két altípusuk van, ezek a pálcikák és a csapok. A pálcikák hosszú külső szegmensekkel rendelkeznek, terminálisaik (rod spherules) kicsik, gömb alakúak. Ezzel szemben a csapok rövid külső szegmensekkel és nagy, lapos végtalpakkal (cone pedicles) jellemezhetők. Mindkét receptortípus a receptív mezejére eső fény hatására hiperpolarizációval válaszol. Bár a pálcikák és a csapok egyaránt 3-4 nagyságrendet átfogó fényintenzitás-tartományban működnek (a detekciós alsó határtól a szaturációig), a pálcikák fénnel szembeni érzékenysége jóval nagyobb (Hecht és mtsai 1942). Sötétadaptált retina esetén akár egyetlen foton abszorpciója is fényválaszt alakíthat ki a pálcikareceptorokban, míg a csapok esetén 10-100 foton együttes abszorpciója vált ki választ. A csapok ingerküszöbe tehát nagyságrendekkel magasabb, mint a pálcikáké, emiatt a pálcikák alacsony fényintenzitás mellett (sötét, szürkület, szkotopikus körülmények), a csapok pedig magas fényintenzitás (nappali megvilágítás, fotopikus körülmények) mellett aktívak (Fain és Dowling 1973). Ez a megosztottság a legtöbb gerinces állatra jellemző. Ugyanakkor akad néhány kivétel is, például a ráják ideghártyája csak pálcikákat tartalmaz (Dowling és Ripps 1970), míg egyes gyíkok retinájában csak csapreceptorok találhatók (Walter és mtsai 1986). Ezen kívül megfigyelhető különbség az egyes állatcsoportok csapjainak kromatikus tulajdonságaiban is. A csapok a bennük található színanyagok fényelnyelési maximumai alapján az emberi retinában háromfélék lehetnek: a kék (rövid hullámhosszú ~ 420 nm, S csap), a zöld (közepes hullámhosszú ~ 531 nm, L csap) és a piros (hosszú hullámhosszú ~ 558 nm, M csap) fényre érzékenyek (Darnall és mtsai 1983). A három eltérő csap jelenléte folytán kialakuló trikromácia az emlősök körében filogenetikailag új jelenség, csak az óvilági majmokra jellemző (Darnall és mtsai 1983). Az eddig vizsgált többi emlősfajban egy hosszú és egy rövid hullámhossz-tartományra érzékeny csaprendszer működik (Perlman és Daw 1970; Caldwell és Daw 1978), így ezek az állatok dikromaták. Alacsonyabbrendű

gerincesek esetében további diverzifikáció figyelhető meg a halak iker- és kettőscsapjai (Walls 1942), a kétéltűek vörös és zöld pálcikái (Ramon y Cajal 1893), valamint a hüllők és a madarak retinájában előforduló olajcsepp tartalmú csapok (Walls 1942) tekintetében.

Horizontális sejtek. A horizontális sejtek γ -amino-vajsavat termelő, ún. GABA-erg interneuronok. A legtöbb vizsgált emlősfajban két típusát különíthetjük el. Az egyik típus képviselői dendrit és axon nyúlványokkal egyaránt rendelkeznek (axon bearing, B-típusú horizontális sejtek). Dendritjeik a csapreceptorokkal, a sejttesttől akár milliméterekkel távolabbra eső axonterminálisaik pedig kizárólag pálcikákkal szinaptizálnak (Kolb és Famiglietti 1974; Dacheux és Raviola 1982). A másik típus sejtjei axon nélküliek (axonless, A-típusú horizontális sejtek), nyúlványaik csak csapreceptorokkal tartanak kapcsolatot (Gallego 1971; Kolb 1974; Dacheux és Raviola 1982). A rágcsálók egy része (egér, patkány), valamint a főemlősök csak B-típusú horizontális sejtekkel rendelkeznek (Polyak 1941; Stell 1965; Kolb 1970, Kolb és mtsai 1980; Peichl és González-Soriano 1994). Szubmammális gerincesekben az említettektől több-kevesebb eltérés figyelhető meg. A halak, kétéltűek és madarak többségében több hullámhosszfüggetlen (luminozítás-) és hullámhosszfüggő (kromatikus-) horizontális sejtípus is található (Stell 1967).

Bipoláris sejtek. Az emlős bipoláris sejtek fő bemeneteik alapján pálcikabipoláris és csapbipoláris altípusokba sorolhatók, de minden típusuk glutamátot termel, így serkentő. A pálcikabipoláris sejtek posztszinaptikus felszínként szolgáló dendritágai a fotoreceptorok axonterminálisaiba mélyen benyúlva ún. invaginációs szinapszisokat alkotnak (Kolb 1970) és a receptív mezejüket ért fény hatására depolarizációval (Dacheux és Raviola 1986) válaszolnak. A pálcikabipoláris axonok az IPL legproximálisabb rétegében ágazódnak el. A csapbipoláris sejteket fényválaszuk alapján ON (depolarizáló) és OFF (hiperpolarizáló) csoportokra lehet osztani. Az előbbi csoport tagjai az OPL-ben a csapreceptorokkal szintén invaginációs szinapszisokon keresztül tartanak kapcsolatot. Az OFF csapbipoláris sejtek dendritvégágai nem hatolnak be a fotoreceptorok végtalpaiba, hanem nagy felszínű, elterülő, ún. lapos (flat) szinapszist alkotnak. Az ON sejtek az IPL 3-4, az OFF sejtek az IPL 1-2 alrétegében végződnek és kimeneteiket különböző dúc- és amakrin sejtek felé továbbítják. Alaktani és neurokémiai szempontból a bipoláris sejtek 9-12 altípusa különíthető el minden emlősfajban (Boycott és Wassle 1999; Haverkamp és mtsai 2003; Ghosh és mtsai

2004; Euler és mtsai 2014). A szubmammális gerincesekben szerveződésük és működésük eltér az emlősökétől, ugyanis ezeknél az állatoknál főleg kevert (csap és pálcika) bemenettel rendelkező bipoláris sejtek találhatók (Lettvin és mtsai 1961), valamint előfordulnak olyanok is, amelyek ellentmondanak az ON-OFF szegregáció elvének (Witkovsky és mtsai 1994; Ammermüller és Kolb 1995). Alaktanilag a szubmammális bipoláris sejtek 12-nél több típussal rendelkező, diverzebb sejtsztyált alkotnak (Shkolnik-Yarros és Podugolnikova 1977; Zhang és Wu 2009).

Amakrin sejtek. Morfológiai szempontból a gerinces retina legdiverzebb populációja és mintegy 25-30 (vagy több) sejtípust tartalmaz. Sejttestjeik elhelyezkedhetnek az INL-ben vagy a GCL-ben (displaced amakrin sejt). A legtöbb amakrin sejt csak dendritfával rendelkezik, de léteznek több axont is tartalmazó ún. poliaxonális amakrin (PA) sejtek. A nyúlványok arborizációjukat tekintve típustól függően az IPL egész keresztmetszetén átnyúló (diffúz) vagy egy, két, illetve több keskeny sávban elágazóak lehetnek. A dendritfa kiterjedése alapján széles dendritmezejű (wide field, WF) és keskeny dendritmezejű (narrow field, NF) amakrin sejteket különböztetünk meg. A csoport fiziológiai szempontból sem egységes, fényválaszuk lehet fázisos vagy tónusos, illetve ON-, OFF- és ON-OFF (a fényimpulzus be- és/vagy kikapcsolására érzékeny). Az amakrin sejtek alapvetően gátló interneuronok, transzmitterük glicin vagy γ -amino vajsav (GABA), melyek mellett egyes amakrin sejt típusok még egy-egy neuroaktív anyaggal is jellemezhetőek (acetilkolin, dopamin, szerotonin, vazoaktív intesztinális polipeptid, P anyag, szomatosztatin, neuropeptid Y, enkefalin, kalcitonin gén függő peptid stb).

Dúcsejtek. A retina efferens sejtjei. Axonjaik egy kötegben az optikus idegen keresztül hagyják el a szemet, és a felsőbb látóközpontok felé haladnak. Morfológiai alapon mintegy 20 altípusuk különböztethető meg (Badea és Nathans 2004; Kong és mtsai 2005; Coombs és mtsai 2006; Völgyi és mtsai 2009; Farrow és Masland 2011; Baden és mtsai 2016). A dúcsejtek dendritikus elágazásaik és fényválaszuk alapján ON, OFF és ON-OFF típusúak lehetnek. A dúcsejtek a látott képet elemeire bontják, minden egyes típus a látott kép egy-egy specifikus aspektusának (luminanciakontraszt, színkontraszt, orientáció, mozgás, mozgás iránya, objektum közeledése stb.) detektálására specializálódott. A dúcsejtek altípusainak száma tehát megszabja azoknak az információs csatornáknak a számát, melyeken keresztül a látási információ elemeire bontva párhuzamosan halad az agy felé.

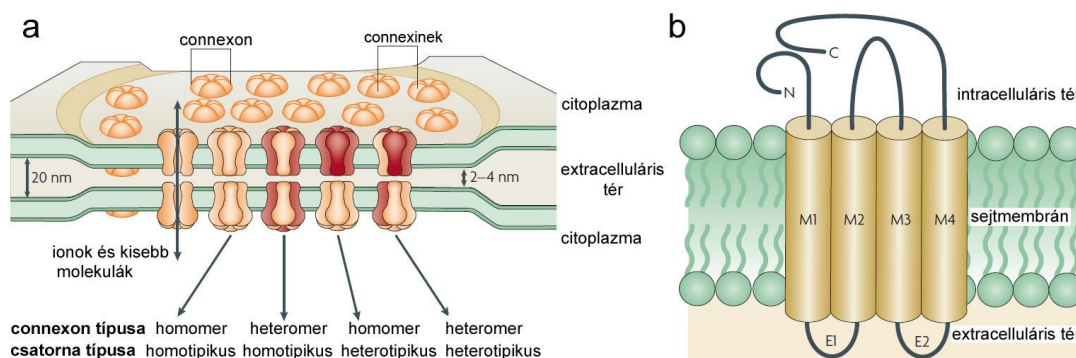
AZ ON-OFF REGULÁCIÓ

Míg a fotoreceptorok fényválaszuk alapján homogén csoportnak tekinthetők (mindegyik hiperpolarizációval válaszol a receptív mezejére eső fényre), addig a többi retinális sejt nem. Hartline (1938) úttörő munkája eredményeképpen vált ismertté, hogy az optikus kötegben futó dúcsejt axonok fényválaszuk alapján három csoportra oszthatók. Az ON rostok a fény bekapcsolásakor, az OFF rostok a kikapcsoláskor, míg az ON-OFF rostok mindkét esetben megnövekedett frekvenciájú akciós potenciál sorozattal válaszolnak. Arra is fény derült, hogy minden egyes dúcsejt a retina egy bizonyos kis területére eső fény be- és/vagy kikapcsolására válaszol megváltozott külső frekvenciával. További vizsgálatok kiderítették, hogy a dúcsejtek esetében ezek a mezők konzentrikusak, és a sejtek ellentétesen válaszolnak a központjukra eső fénypontra, illetve a perifériára eső fénygyűrű hatására (Kuffler 1953). Azt a területet, melynek ingerlésével a vizsgált neuronban potenciálváltozások mutathatók ki, a sejt receptív mezejének nevezik (Barlow 1953). Ez a fogalom minden szenzoros rendszerbeli neuronális struktúra egyik fő funkcionális jellemzője. A hatvanas években megfelelő mikroelektrodákkal a többi retinális sejt típus fiziológiai tulajdonságai is vizsgálhatóvá váltak. Ekkor derült ki az is, hogy a bipoláris sejtek az információáramlás útjában a legelső retinális sejtek, melyek ON-OFF regulációval rendelkeznek (Werblin és Dowling 1969), így ezek a neuronok azok, amelyekről a két csatorna (ON és OFF) a kezdetét veszi. Ez a funkcionális elkülönülés fennmarad az átkapcsolások után, talamikus és kortikális szinteken egyaránt (Horton és Sherk 1984, Schiller 1992). Legkorábban az extrasztriális látókérgi területeken kapcsolódik össze újra a két pálya. Mivel a fotoreceptorok nemcsak fényválaszuk alapján, hanem az általuk termelt transzmitter tekintetében is homogének, így a bipolárisok két csoportjának eltérő fiziológiai tulajdonságai csak a posztzinaptikus oldalon található receptorok eltéréseivel magyarázhatók. Alátámasztotta ezt az elképzelést az is, hogy a glutamát agonistaként ismert 2-amino-4-foszfonobutirát (AP4 vagy APB) különbözőképpen hat az ON és az OFF bipoláris sejtekre (Slaughter és Miller 1981). Az is bebizonyosodott, hogy az ON csap-bipoláris és a pálcika-bipoláris sejtek dendritjein jelfordító metabotróp glutamátreceptorok (mGluR6), míg az OFF csapbipolárisokon jeltartó ionotróp receptorok (AMPA, kainát) találhatók (Nelson és mtsai 1976; Stell és mtsai 1977; Dacheux és Raviola 1986; Nawy és Jahr 1990). Nagy előrelépést jelentett a retina kutatásában annak a ténynek a felfedezése, hogy a két csatorna elemei morfológiai alapon is jól elkülöníthetők egymástól, ugyanis a fotoreceptorok a külső rostos rétegben

az ON elemekkel ribbonszinapszist, míg az OFF elemekkel bazális szinapszist alkotnak (Nelson és mtsai 1976). Az IPL-ben nem a szinapszisok morfológiája az útmutató, hanem azok lokalizációja. Az OFF bipolárisok és OFF dúcsejtek az IPL disztális harmadában létesítenek kapcsolatot egymással, míg az ON bipoláris-dúcsejt szinapszis a proximális IPL-ben jön létre (Kolb és Famiglietti 1974; 1976). A rendezettség szembetűnő, de felmerül a kérdés, hogy miért kellett kialakulnia a két párhuzamos rendszernek. Talán a legkézenfekvőbb magyarázat az, hogy a látásérzet kialakulása szempontjából mind a növekvő, mind a csökkenő fényintenzitásokról szükséges excitatorikus információt szállítani a látókéregbe. Így minimalizálható leginkább az információvesztés lehetősége (Schiller 1992).

A RÉSKAPCSOLATOK SZEREPE AZ NEURONOK KÖZTI KOMMUNIKÁCIÓBAN

A központi idegrendszer szerkezeti egységeiben az idegsejtek közötti kommunikáció főleg kémiai ingerületátvitel segítségével zajlik. Itt a preszinaptikus sejt neurotranszmittert szabadít fel, mely receptor molekulákon keresztül ingerli a posztzinaptikus idegsejtet. Ugyanakkor az utóbbi 40 év kutatásai egyértelművé tették, hogy létezik az idegsejtek közötti kapcsolattartásnak egy másik formája is. Ez utóbbi esetben az egymással kommunikáló idegsejtek citoplazmája specializált fehérje-csatornák, réskapcsolatok segítségével átjárható ionok és kisebb molekulák (<1000 Dalton) számára (2. ábra; Goodenough és Revel 1970).



2. ábra. A réskapcsolat szerkezete

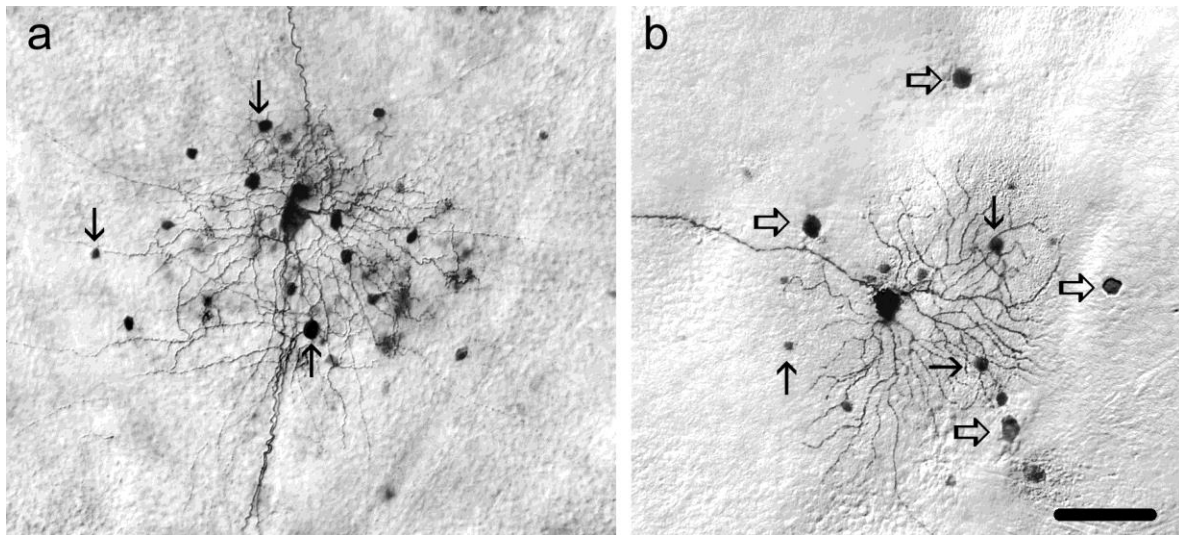
a. Egy réskapcsolat szerkezetének rajza a lehetséges connexin alegység konfigurációkkal. **b.** A 4 transzmembrán domént tartalmazó connexin fehérje szerkezete és sejtmembránban való elhelyezkedése. C – C-terminális, E1 és E2 – extracelluláris hurkok, M1-M4 – transzmembrán domének, N – N-terminális (Bloomfield és Völgyi 2009).

Korai elektronmikroszkópos munkákban ritkán figyeltek meg réskapcsolatokat, ami miatt szerepük másodrendűnek tűnt. Ez a már tankönyvi adatként sem helytálló kép napjainkra jelentősen megváltozott, melyben nagy szerepe volt a réskapcsolat alkotó connexin (Cx) fehérjék felfedezésének (Beyer és mtsai 1990; Kumar és Gilula 1996) és a réskapcsolaton keresztüli diffúzióra képes biotinilált tracer-molekulák alkalmazásának. Mára nyilvánvalóvá vált, hogy elektromos szinapszisok minden idegrendszeri struktúrában jelen vannak, és feltehetően aktívan részt vállalnak a legtöbb idegi folyamatban. Az elektromos szinapszisok tanulmányozására kétségtelenül az egyik legalkalmasabb objektum a gerinces állatok retinája, melyben az öt idegsejtosztály elemei egymással elektromos szinapszisokon keresztül kommunikálnak, azaz GJ-kapcsoltak. Ez a kapcsoltság lehet homológ, amikor egyazon idegsejt-típus (pl. két azonos típusú dúcsejt) sejtjei létesítenek elektromos szinapszist, ill. lehet heterológ, mely kapcsolat esetében eltérő típusú (pl. különböző típusú amakrin sejtek), vagy akár eltérő osztálybeli sejtek (pl. dúc és amakrin sejtek) kommunikálnak egymással (Raviola és Gilula 1973; 1975; Marc és mtsai 1988; Vaney 1991; Mills és Massey 1995; Xin és Bloomfield 1997). A retinális GJ-ok nagy száma, és a diverz connexin expressziós mintázat alapján nyilvánvaló, hogy az elektromos szinapszisok fontos és változatos funkciót töltenek be a látási információ feldolgozásában. A pálcika és csap fotoreceptorok elektromos kapcsoltsága például a konvencionális pálcikacsatorna mellett egy alternatív útvonalat biztosít a pálcikák általi látásérzet továbbításában. Ezzel szemben a csap-csap elektromos szinapszisok a jel-zaj viszony javításában játszanak fontos szerepet (Raviola és Gilula 1973; Nelson 1977; Dacheux és Raviola 1982; Schneeweis és Schnapf 1995; Smith és Vardi 1995; Bloomfield és Völgyi 2004; Völgyi és mtsai 2004). Az elektromos szinapszisok működését eddig legintenzívebben a horizontális sejtek esetében vizsgálták, mely sejtek térben kiterjedt elektromosan kapcsolt szincíciumokat alkotnak. A horizontális sejtek közötti GJ-k relatíve nagy áteresztőképességgel rendelkeznek, és feladatuk az, hogy a szomszédos horizontális sejtek membránpotenciáljait nagyjából egyenlő szinten tartsák mind nyugalomban, mind aktivációkor. Az izopotenciál kialakítása a horizontális sejtek szincíciumában pedig az egységes háttérillumináció esetén biztosítja az erre vonatkozó szignált a bipoláris sejtek számára. A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy az ideghártya elektromosan összekapcsolt idegsejthálózatai legalább annyira összetettek, dinamikusán változók és funkcionálisan diverzek, mint az elsősorban kémiai szinapszisok által felépített retinális neuronhálózatok. Ennek ellenére igen keveset

tudunk az elektromos szinapszisok előfordulásáról, és még kevesebbet arról, hogy ezek milyen szerepet töltenek be a látási információ feldolgozásában és továbbításában. A retina elektromos sejtálóinak feltérképezése munkánk jelentős részét képezi.

A DÚCSEJTEK TRACER-KAPCSOLTSÁGA

A legváltozatosabb elektromosan kapcsolt idegsejthálózat rendszert a belső retinában találjuk. Sejtjelölésre a 90-es évek elejétől kezdődően a gap junction permeábilis biotinilált tracer-molekulák használatosak. Amikor Neurobiotint (vagy más biocitin származékot) alkalmaztak retinális idegsejtek jelölésére, akkor vált egyértelművé, hogy a dúc-, amakrin-, valamint bipoláris sejtek homológ és heterológ elektromos kapcsolatrendszer egyaránt kiépítenek (3. ábra; Vaney 1991; Mills és Massey 1995; Xin és Bloomfield 1997).



3. ábra. A dúcsejtek tracer kapcsoltsága

G1 **(a)** és OFF alfa **(b)** dúcsejtek Neurobiotin tracer-kapcsoltságot mutatnak amakrin (nyíl) és dúcsejtekkel (üres nyíl) az egérretinában. Aránymérték: a, b 100 μ m.

Mindazonáltal macska- és nyúlretinában már a kilencvenes évek eleje óta nyilvánvalóvá vált, hogy néhány kivételtől eltekintve (pl. starburst amakrin sejtek és β -dúcsejtek) majdnem minden retinális amakrin- és dúcsejt tracer-kapcsolt a szomszédos idegsejtekkel (Vaney 1991; 1994; Dacey és Brace 1992; Penn és mtsai 1994; Huxlin és Goodchild 1997; Xin és Bloomfield 1997; Hu és Bloomfield 2003; Hidaka és mtsai

2004). A jelen értekezés egyik fő témája éppen ezeknek az elektromosan kapcsolt retinális dúc-, bipoláris- és amakrin sejt hálózatoknak a bemutatása, így ezekről a hálózatokról az *Eredmények* fejezetben lesz bővebben szó.

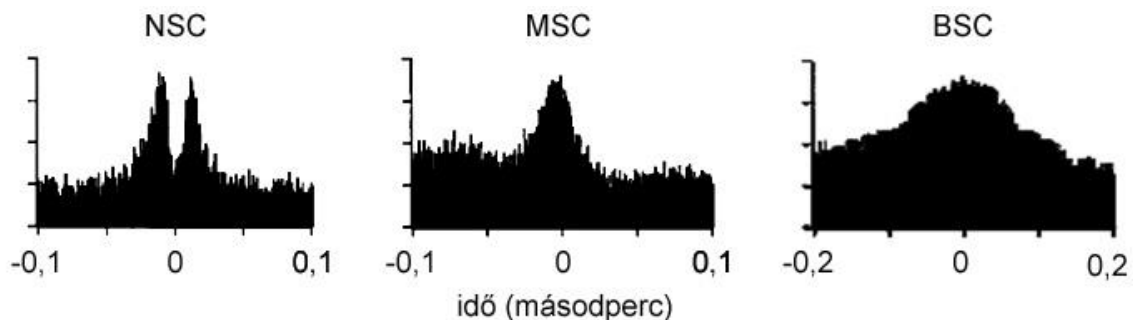
A CONNEXIN FEHÉRJÉK EXPRESSZIÓJA

A gerinces GJ-k mint intercelluláris hidak működnek, és szabad mozgást tesznek lehetővé ionok, ill. kisebb tömegű (<1kD) molekulák számára a kapcsolt sejtek citoplazmái között. A GJ-k két egymással szemben fekvő connexon félcsatornából (hemichannel) épülnek fel, melyek egyenként 6 transzmembrán fehérjéből (connexin – Cx) állnak (2. ábra). Mintegy 20 különböző emlős Cx fehérje vált napjainkig ismerté, melyek közül a Cx26, Cx30.1, Cx36, Cx43, Cx45, Cx50 és Cx57 (a számok a kD-ben kifejezett tömeget jelölik) kimutatható idegsejtekben. A retinában a Cx36 mindkét rostos rétegben (Güldenagel és mtsai 2000), míg a Cx45 (Petrasch-Parwez és mtsai 2004) kifejezetten a belső rostos rétegben, a Cx50 és Cx57 (Massey és mtsai 2003; Hombach és mtsai 2004) pedig a külső rostos rétegben található. Számos retinális neuronhálózat esetében már azonosították a GJ kapcsolatokat Cx fehérjeit. Ismert az, hogy a pálcika-csatornák esetén a pálcika/csap, ill. az All-amakrin/ON bipoláris sejt GJ kapcsolatok Cx36 tartalmúak (Feigenspan és mtsai 2001; 2004; Mills és mtsai 2001; Güldenagel és mtsai 2001; Deans és mtsai 2002; Lee és mtsai 2003; Völgyi és mtsai 2004; Han és Massey 2005). Ez utóbbi kapcsolat némelyikében Cx45, másokban Cx36 található a bipoláris sejtek axonterminálisain, míg az All amakrin sejtek minden esetben Cx36-ot expresszálnak (Lin és mtsai 2005; Maxeiner és mtsai 2005). Ugyancsak tisztázott, hogy az emlős horizontális sejtek kiterjedt szincíciumait létrehozó, nagy áteresztőképességgel bíró axo-axonikus és dendro-dendritikus GJ-k Cx50 és Cx57 fehérje tartalmúak (O'Brien és mtsai 2006; Shelley és mtsai 2006). Ugyanakkor kísérletes munkánk kezdetekor viszonylag keveset tudtunk az emlős retinában megfigyelt számos GC-GC és GC-AC kapcsolatok részkapcsolatainak Cx összetételéről. A jelen disszertációban azokat az eredményeinket mutatom be, amelyekkel a fenti témakör ismereteit sikerült bővíteni.

A DÚCSEJTEK AKCIÓS POTENCIÁL SZINKRONIZÁCIÓJA

Az a tény, hogy a dúcsejtek egymással és amakrin sejtekkel kiterjedt elektromos hálózatokat alkotnak, nehezen magyarázható. Első megközelítésben ugyanis arra enged következtetni, hogy a részkapcsolatok révén a szomszédos dúcsejtek receptív

mezők keverednek és ezáltal a látásélesség romlik. Ugyanakkor az is nyilvánvaló volt a korai tracer-injektálásos kísérletek alapján, hogy a dúcsejtek által létrehozott lokális elektromosan kapcsolt sejtcsoportosulások alapvetően más felépítésűek, mint az akár több száz sejtre is kiterjedő horizontális sejt szincíciumok. A horizontális sejtekkel szemben a dúcsejtek tracer-kapcsoltsága többnyire csak a közvetlen szomszédokra terjed ki. Érdekes az is, hogy a dúcsejt receptív mezők közel azonosak a dendritikus fák méretével, függetlenül az elektromos kapcsoltságtól (Bloomfield és Xin 1997; Völgyi és Bloomfield 2000). Mivel a horizontális sejtek receptív mezeje közel akkora, mint a tracer-kapcsolt szincícium átmérője, ezért valószínű, hogy a dúcsejtek moderált kapcsoltsága nemcsak kinézetében, hanem alapvető működésében is különbözik a horizontális sejtektől. Újabb vizsgálatok arra utalnak, hogy a dúcsejtek elektromos szinapszisei az akciós potenciálok szinkronizációjáért felelnek, vagy azt befolyásolják (Brivanlou és mtsai 1998; Mastronarde 1983a; b; c; DeVries 1999). A szomszédos dúcsejtek spontán generált (fénystimulus nélkül) akciós potenciáljainak (spike) időbeni korreláltsága (szinkronizációja) alapvetően háromféle mintázatot mutathat (4. ábra).



4. ábra. A dúcsejtek akciós potenciáljainak szinkronizációs típusai

BSC – széles akciós potenciál szinkronizáció, MSC – közepes akciós potenciál szinkronizáció, NSC – keskeny akciós potenciál szinkronizáció.

Az ún. széles korrelációs típus (broad spike correlation – BSC) esetén a szomszédos dúcsejtek akciós potenciáljai akár 100 ms-os késéssel is követhetik egymást. A BSC-t mutató dúcsejt-pár kereszt-korrelációs görbéje (cross-correlation function – CCF) egy körülbelül 0 ms-nál tetőző és 50-100 ms széles Gauss-görbével modellezhető. A közepes korrelációval (medium spike correlation – MSC) jellemezhető sejtpárok CCF-je szintén egycsúcsú Gauss-görbe alakú, 0 ms-nál éri el maximumát, de a BSC-vel ellentétben csak 5-40 ms széles. A harmadik korrelációs típus esetén a CCF kétcsúcsú, mely csúcsok egyenként egy-egy Gauss-görbével modellezhetőek. Ez

utóbbi görbék rendkívül keskenyek (1-2 ms) és ellenben az előző két szinkronizációs típussal, nem 0 ms-nál, hanem körülbelül -1,2 és +1,2 ms környékén érik el maximumaikat. Az akciós potenciál szinkronizáció ezen fajtáját keskeny szinkronizációnak (narrow spike correlation – NSC) nevezzük. A BSC lassú kinetikája alapján úgy gondolták, hogy az akciós potenciálok generálásához hozzájáruló ingerület valószínűleg a pálcika fotoreceptorok spontán aktivációjából ered (termális zaj), mely többnyire kémiai szinapszisokon keresztül jut el a dúcsejtekig. Ezzel szemben az MSC és a NSC létrehozásáért felelős neuronhálózat valószínűleg elektromos szinapszisokat is tartalmaz. Az elmélet szerint egyes amakrin sejtek szolgáltatnának szimultán serkentést a velük elektromos kapcsolatban lévő szomszédos dúcsejteknek, melynek során a dúcsejtekből párhuzamosan elvezetett akciós potenciál-sorozat CCF-je a megfigyelt közepes unimodális spike-korrelációt adja. Ugyanakkor a dúcsejtek közötti GJ-k lehetővé teszik, hogy az egyik sejt akciós potenciálja depolarizációt keltsen a szomszéd dúcsejtben, ezzel növelve a recipiens sejt akciós potenciál generálásának esélyét. Mivel az információáramlás rendkívül gyors és kölcsönös, ezért a CCF-nél két egymással átfedő nagyon keskeny Gauss-görbe várható, csakúgy, mint a fentiekben leírt NSC-k esetében. Brivanlou és munkatársai (1998) emellett azt is megfigyelték, hogy mind az MSC és az NSC független a kémiai szinaptikus ingerületátviteltől, mivel a szinaptikus transzmitter felszabadulást blokkoló kadmium klorid (CdCl_2) alkalmatlan volt ezek eltüntetésére. Ezzel szemben a CdCl_2 hatásosan eliminálta a BSC-t. Ezen korai munkák eredményei kiválóan alátámasztják az előbbiekben ismertetett elméletet, ugyanakkor nagy hiányosságuk az, hogy egyetlen esetben sem történt meg az elvezetett sejtek és a velük elektromosan kapcsolt sejtek alaktani azonosítása. Ezért munkánk kezdetekor nem volt bizonyított, hogy a spike-korrelációban részt vevő dúc- és amakrin sejtek azonosak-e az alaktani munkák tracer-kapcsolt neuronjaival. A következőkben ebben a témakörben elért eredményeinkről is részletesen beszámolunk.

4. CÉLKITŰZÉS

A disszertáció témájában végzett kutatásainkat három - megítélésem szerint fontos - téma köré szerkesztettem:

1. Célul tűztük ki az elektromos szinapszisok szerepének tisztázását az információ feldolgozásában és továbbításában az emlős retina párhuzamos pályarendszerein.

A munka során vizsgálni kívántuk a retinális réskapcsolatok szerepét a pálcika információs útvonal működésében; a részt vevő elektromos szinapszisok működésének plasztikusságát és több pálcikapálya alkotó neuron pontos szerepét. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a környezeti tényezők változásai (egyedfejlődés, cirkadián ritmusosság, fényadaptáció) miként befolyásolják az elektromos szinapszisok működését.

2. Meg akartuk ismerni a dúc-dúc, dúc-amakrin és amakrin-amakrin sejtek közti elektromos szinapszisok szerkezetét, eloszlását és azok szerepét a párhuzamos retina-agy csatornák kezdetét jelentő dúcsejt szignál kialakításában.

A vizsgálatok mind modell állatokon, mind posztmortem humán ideghártyán történtek, ami kivételes lehetőséget nyújt azok felépítésének és működésének összehasonlítására.

3. Végül vizsgáltuk a retinális elektromos szinapszisok szerepét a képi információ továbbításban.

Ezekben a kísérletekben bizonyításra került a dúc-dúc és dúc-amakrin sejtek közötti elektromos szinapszisoknak az akciós potenciál szinkronizációban betöltött esszenciális szerepe. Kitérünk a dúcsejt deszinkronizáció irány szelektivitásában betöltött szerepére és a dúcsejt réskapcsolatok környezetfüggő modulálhatósága terén tett megfigyeléseinkre. E mellett a vizsgálat tárgyát képezték a belső retina ún. széles dendritmezejű és poliaxonális amakrin sejtjei, valamint ezen sejtek réskapcsolatai által létrehozott belső retinális hálózatok is.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT ÁLLATOK

Munkánkban olyan kísérleti eredményeket mutatunk be, melyeket nyúl (*Oryctolagus cuniculus*; New Zeland albino és Dutch belted törzsek), patkány (*Rattus norvegicus*; Wistar törzs) és egér (*Mus musculus*) szerepeltek modellekként. Az egerek esetében kifejezett (> 6 hetes) vad típusú (C57BL6 háttér), valamint Cx36 knock-out (KO), és Cx45 KO egyedekkel (C57BL6/129SvEv háttér) végeztük a kísérleteket.

A munka során összehasonlító vizsgálatokat is végeztünk egér (*Mus musculus*, C57BL/6, 10 hím, 3 hónapos), patkány (*Rattus norvegicus*, Wistar, 5 hím, 4-6 hónapos), tengerimalac (*Cavia porcellus*, 5 hím, 10 hónapos), nyúl (*Oryctolagus cuniculus*, NZ white, 2 hím és 1 nőstény, 5 hónapos), aranyhőrcsög (*Mesocricetus auratus*, Charles River Laboratories, 5 hím), bárány (*Ovis aries*, Merino, 2 hím és 1 nőstény, 6 hónapos), macska (*Felis silvestris catus*, 2 hím és 1 nőstény, 10 hónapos), kutya (*Canis lupus familiaris*, beagle, 2 hím és 1 nőstény, 14-20 hónapos), vadászgörény (*Mustela putorius furo*, 2 hím és 1 nőstény, 10 hónapos), mókusmajom (*Saimiri sciureus*, 1 hím, 1 nőstény, 4 és 9 éves), sertés (*Sus scrofa domesticus*, hím, OSSKI) állatok retináin. Minden állat fiatal, ivarérett, egészséges egyed volt, melyek más tanulmányokban kezeletlen negatív kontrollként szerepeltek. A vizsgált emberi (*Homo sapiens sapiens*) retina metszetek a centrális régiótól nazális irányban 2-4 mm-re készültek, 3 órás poszt-mortem, fixált, 27 éves polytraumás férfiből származó anyagon. Az összehasonlító vizsgálatokhoz felhasznált állatok retináit (a patkányon és egéren kívül) továbbá a humán metszeteket Dr. Kántor Orsolya* (Bp., SE-ÁOK) biztosította számunkra. Az állatok altatása intravénás ketamine-xylazine (10 mg/kg-1 mg/kg) injekcióval történt, majd intravénás (kutya, macska, bárány), vagy intrakardiális (egér, patkány, hőrcsög, vadászgörény, nyúl, tengerimalac) T-61 (Bayer Hungária Kft., Budapest, Mo.) adagolással végzett eutanáziára került sor. Western blothoz használt minták esetében egész retinákat használtunk (kivéve a bárány, macska és kutya, ahol centrális és perifériás darabbal dolgoztunk). Ezeket folyékony nitrogénes fagyasztást követően szárazjégen szállítottuk, és -80°C-on tároltuk feldolgozásig. Az immuncitokémiai vizsgálatokra használt minták esetén 4% paraformaldehid (PFA) fixált, krioprotektált (PBS-Szacharóz: 15, 30%,) egész szemserleget kaptunk szárazjégen, beágyazva (Tissue-Tek; Sakura Finetek, USA).

A FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK MINTÁINAK ELŐKÉSZÍTÉSE

Az állatokat intraperitoneális injekcióval (egér és patkány- Nembutal 0,08g/g testsúly; nyúl - 40% etil karbamát, 2.0 gm/kg testsúly) injekcióval altattuk, valamint helyi érzéstelenítésként 2% Lidokaint injektáltunk a szemhéjakba. A fiziológiai kísérletekhez használt szemeket sötétben vörös fény mellett (az egér nem rendelkezik vörös érzékeny csapreceptorral) kiemeltük a szemüregből, majd az ora-serrata mentén kettévágtuk. A szem optikai készülékét (szaruhártya, szemlencse, üvegtest) eltávolítottuk és a fennmaradt szemserlegen radiális vágásokat ejtettünk, ami lehetővé tette a preparátum kiterítését és elvezető kamrába helyezését. Ezt követően a preparátum a kamrával együtt a Faraday-ketrecben található mikroszkóp tárgyasztalára került, ahol folyamatosan oxigenizált 35°C-os Ringer oldattal szuperfuzionáltuk. A Ringert magas rátán 25-30 ml/perc áramoltattuk át a preparátumon, majd egy perisztaltikus pumpával recirkuláltattuk. Az így elkészített *in vitro* eye-cup preparátum több mint hat órán keresztül használható fiziológiai mérésekre anélkül, hogy morfológiai vagy fiziológiai degradáció jelei mutatkoznának. A kísérletek során törekedtünk a kísérleti állatok számára okozott fájdalom és stressz minimalizálására. Kísérleteinket vagy a NIH előírások alapján (az USA-ban végzett kísérletek), vagy a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága (BA02/2000-6/2006) által jóváhagyott, az állatok kezelésére vonatkozó engedély alapján végeztük (Magyarországon végzett kísérletek). Az állatok kezelése minden tekintetben megfelelt az "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" feltételeinek.

Az egyedfejlődéses kísérletek során P0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 napos albínó Wistar patkányokat használtunk, melyeket izoflurán (Forane; Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, UK) inhalációs anesztéziát követően dekapitáltuk (10 napos korig), vagy aortális exsanguinációt alkalmaztunk. A szemeket eltávolítottuk, a retinákat hideg (~4-6 °C) nukleázmentes foszfát pufferessóoldatban (PBS) disszekáltuk és a későbbi PCR- (polimeráz láncreakciós) valamint WB (Western blot) kísérletekig eppendorf csövekben - 80°C-on tároltuk. Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a mintavételi időpontok megegyeztek. A szaruhártya és a lencse eltávolításával a szemekből szemserleget készítettünk, majd ezeket PBS + 4% PFA-ban fixáltuk 4°C-on, 1 órán át.

AZ *IN-VITRO* RETINA PREPARÁTUM FÉNYSTIMULÁCIÓJA

A fénystimulusok egy része homogén, teljes retinát beborító ún. full-field fénystimulus volt, melyet egy zöld ($\lambda=468$ nm) LED-el hoztunk létre. A fény erősségét

egy LED-szabályozó egységgel 6 log széles tartományban lehetett változtatni. Ugyancsak használtunk összetett és természetes fénystimulusokat, melyeket egy arra alkalmas szoftver segítségével számítógépen állítottunk elő, és egy projektorral, valamint üvegszál optikával a mikroszkóp lencserendszerén keresztül a preparátumra vetítettünk. Ez utóbbi technikával megfelelő fényerősség, szín és nagyítási kalibráció után, bármilyen formájú és időben statikus vagy változó stimulus létrehozható.

TÁJÉKOZÓDÁS AZ ÉLŐ RETINÁN

A retina felszínét infravörös fény (> 890 nm filter) segítségével tettük láthatóvá. A fény a mikroszkóp kondenzorán és a preparátumon haladt át először, majd az objektíven keresztül az infravörös érzékeny kamerába jutott. Ezzel a módszerrel a fényérzékeny ideghártya preparátum idegsejtjeit tettük láthatóvá anélkül, hogy a fotoreceptorokat stimuláltuk volna, így megőriztük a retina adaptációs állapotát. A fluoreszkáló markert (pl. GFP) tartalmazó idegsejteket epofluoreszcens fénnel tettük láthatóvá, amelynek spektruma a marker abszorpciós maximumának megfelelő volt (GFP esetén 488 nm). Ugyancsak ezzel a fénnel világítottuk azokat a preparátumokat, ahol Lucifer Yellow tartalmú sejteket tettünk láthatóvá. Esetenként DAPI (340 nm) vagy Alexa568 (568 nm) festékeket használtunk vizualizációra, ilyenkor a gerjesztő fény hullámhosszát ezekhez igazítottuk. A megvilágító fényforrás esetenként vagy egy 100 W-os halogén izzó volt vagy egy Polychrom V monochromator (ez utóbbi egy 150 W-os Xenon lámpával és egy optikai ráccsal volt ellátva). Mindkét esetben a mikroszkópba szerelt filterekkel szűrtük a preparátumról visszavert fényt, így a detektor (CCD kamera) fényérzékeny felületére már csak a kívánt hullámhosszakat tartalmazó fény került. Az így előállított képek detektálására Nikon, Andor 897 vagy Retiga 2000 kamerákat használtunk.

A PREPARÁTUMOKON VÉGZETT NEUROBIOTIN IONTOFORÉZIS ÉS

INTRACELLULÁRIS ELVEZETÉS

Az intracelluláris elvezetések boroszilikát üvegkapillárisból (1,2 mm külső átmérő; 0,6 mm belső átmérő) húzott magas ellenállású (150-300 MΩ) mikroelektrodával történtek. Az elektródák hegyét 4% Neurobiotin / 0.1 M Tris puffer (pH 7.6) oldattal töltöttük fel, majd telített 4 M kálium-klorid (KCl) sóoldattal színültig töltöttük. Fiziológiai méréseket követően a vizsgált sejteket Neurobiotinnal 10 percig

iontoforetizáltuk, mely időtartam elegendő arra, hogy az injektált sejt minden része maradéktalanul jelölődjön a tracer-molekulával (Xin és Bloomfield 1997).

EXTRACELLULÁRIS ELVEZETÉS AZ *IN-VITRO* RETINA PREPARÁTUMON

Az extracelluláris akcióspotenciál-elvezetések egy részéhez $1\text{M}\Omega$ rezisztenciájú wolfram elektródát (MicroProbe Inc.) és ISO80 (World Precision Instruments) A.C. erősítőt használtunk. Az elvezetéseket DigiData 1320 AD konverterrel (Axon Instruments inc.) 20kHz-n digitalizáltuk, majd Axoscope10 akvizíciós szoftverrel elektronikusan rögzítettük. Az adatok analízise, az auto- és krossz-korrelogramok, raszterek és a posztstimulus hisztogramok generálása később történt Off-line Sorter (Plexon Inc.) és Neuroexplorer (Nex Technologies) szoftverekkel. A fizioiógias mérések után egyik vagy mindkét vizsgált sejtet intracelluláris üvegelektroda segítségével Neurobiotinnal töltöttük fel morfológiai identifikáció és analízis céljából. A kísérletek más részében egy ún. "multi electrode array" (MEA, Multi Channels System, Inc.) nevű műszert használtunk, mely 60 vagy 120 elektródán keresztül (rendszeriől függően) szimultán követi a sejtek aktivitását. A mérések rögzítése az elektródarendszer MC_rack nevű programjával történt, az adatok analízise pedig a fent említett Offline sorter és NeuroExplorer programokkal történt. A kísérletek kisebb részét kollaborációban (Dr. Evelyn Sernagor; Necastle UK) végeztük, ahol a kísérletekben 3Brain High-Density (HD) MEA elvezető rendszert alkalmaztunk, melynek segítségével 4096 elektródán lehet regisztrálni sejtaktivitást.

SZÖVETTANI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK

Egy órával az utolsó Neurobiotin injekció után a retinát izoláltuk az eye-cup preparátum többi szövetétől (ínhártya, érhártya, pigment-réteg), majd hideg 4% PFA-ben fixáltuk egy éjszakán át. A paraformaldehidet 0,1 M foszfát pufferben oldottuk (pH 7,3) majd a preparátumot alaposan (5-6 alkalommal) 0,01 M foszfát pufferben (PBS; pH 7,5) átmostuk. Mosás után egy 0,18% H_2O_2 /100% methanol elegyes inkubáció következett (1 h), hogy az endogen peroxidázok közömbösítődjenek. Ezután a retina egy éjszakára 1% Triton-X 100 (10 nM PBS-ben oldva) és peroxidáz reagens (Elite ABC kit, Vector) elegyében került. Ezt egy 3-3' diaminobenzidin (DAB) hisztokémiai jelölés, majd dehidráció és tárgylemezen való Permount-os lefedés követte. Egyes retinákat ettől eltérően kezelünk, rövid (20-30 perces) fixálás és mosás után streptavidin konjugálta FITC vagy Cy3 (1:100) reagenssel inkubáltuk Triton-X 100 (1%)

jelenlétében, majd immunocitokémiai jelölésre készítettük elő a vizsgálati anyagot. A jelölt sejteket egy fénymikroszkópra szerelt CCD digitális fényképezővel (Spot 2, Diagnostic Instruments), és/vagy konfokális mikroszkóp (Zeiss LSM 510 Meta) segítségével vizsgáltuk és archiváltuk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a mintákat 20-30 perces 4% PFA fixálását (0,1 M foszfát pufferben oldva; pH 7,3) és PBS-es mosását követően legalább egy éjszakán át a primér antitest(ek) elegyével, valamint blokkoló elegy (3% normal goat serum - NGS, bovine serum albumin - BSA) keverékében inkubáltuk (1. táblázat). Ezt a minták mosása és FITC, vagy Cy3 konjugált másodlagos antitesttel való inkubálása követte (1. táblázat). Végül a retinát PBS-ben mostuk, majd Vectashield-del lefedtük (Vector Laboratories, Peterborough, Nagy-Britannia).

1. Táblázat. A kísérletekben használt elsődleges és másodlagos antitestek

Rövidítések: Cx36-connexin 36, CaR-calretinin, CaB-calbindin, PV-parvalbumin, Rec-recoverin, PKCa-protein kináz C alfa alegység.

elsődleges antitestek	gyártó	hígítás
egér anti-Cx36	Merck Millipore	1:1000
nyúl anti-CaR	Chemicon/Merck Millipore	1:1000
kecske anti-CaR	Merck Millipore	1:3000
tengerimalac anti-CaR	Synaptic Systems	1:3000
nyúl anti-CaB D28k	SWANT	1:10000
nyúl anti-PV	SWANT	1:10000
nyúl anti-Rec	ajándék Dr. Karl-Wilhelm Koch-tól	1:2000
kecske anti-PV	SWANT	1:2000
egér anti- PKC α	Santa Cruz Biotechnology	1:50000
kecske anti-PKC α	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
nyúl anti-RIBEYE A-domain	Synaptic systems,	1:500
másodlagos antitestek	gyártó	hígítás
anti-egér IgG-Alexa488	Life Technologies/Invitrogen	1:1000
anti-nyúl IgG-Alexa546	Life Technologies/Invitrogen	1:1000
anti-nyúl IgG-FITC	Jackson IR Inc.	1:1000
anti-nyúl IgG-Cy3	Jackson IR Inc.	1:1000
anti-kecske IgG-Alexa 555	Life Technologies/Invitrogen	1:1000
anti-tengerimalac IgG-Rhodamine Red-X	Jackson IR Ltd	1:1000

POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓS VIZSGÁLATOK

A -80°C-on, jelölt eppendorf csövekben tárolt retinákat homogenizáltuk, majd RNazol RT-val (Molecular Research Center, Inc., USA) totál RNS extrakciót végeztünk. A gyártó által leírt protokoll szerint dolgoztunk, de fél mennyiségeket használtunk (mivel a patkányretina nedves súlya kevesebb, kb. 40 mg). A tisztított és szárított RNS-t diszpergáltuk, a total-RNS mennyiségét Eppendorf Biophotometer Plus-val (Eppendorf, Hamburg, Németország) mértük le, majd ezeket -80°C-on tároltuk felhasználásig. A PCR reakciók során használt primereket az adott génekre terveztük meg az NCBI Primer-BLAST segítségével, ezek a 2. táblázatban láthatók.

2. táblázat. A PCR reakció során használt primerek

(IDT, Bio-Science Kft. Budapest, Mo.)

Primer neve	5'→3'szekvencia
Cx36 Fw.	GTGGCAGTGGTGGGAGCA
Cx36 Rv.	TGCTGTGCGCAGCCCAGA
Cx45 Fw.	GGGTCCTTCCTCCCCGCTTT
Cx45 Rv.	GCCAGTCCCCGAGGACCAAA
Cx57 Fw.	GGGTGTCTCCTGCGCACCTA
Cx57 Rv.	GCAAGGGGCTTGTGTGCACT
RPL13a Fw.	CCAGAGGTTTTGGGGTCAGAA
RPL13a Rv.	GCAGTTGCAGACAAACTGGAGG

A primereket validáltuk OneStep RT-PCR-vel (Qiagen Inc.). Először OneStep RT-PCR-vel 50-50 ng totál RNS-ből amplifikáltuk a Cx36, 45 és 57 mRNS szekvenciákat, ezzel tesztelve az RNS minőségét és a primerek hatékonyságát. A terméket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk GeneRuler 100 bp Plus DNS-létra segítségével (Fermentas, Biocenter Kft., Szeged, Mo.). A kvantitatív-PCR (qPCR)-ben használt cDNS-t oligo-dT primerek segítségével állítottuk elő 1-1 µg totál RNS-t és Fermentas RevertAid H- RT enzimet (Fermentas, Biocenter Kft., Szeged, Mo.) használva az átíráshoz. A cDNS-t 25 ng/µl végkoncentrációra hígítottuk, további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A Cx36 posztnatális mintasort Applied Biosystems (Abi) StepOne Plus (LifeTechnologies Mo. Kft., Budapest, Mo.) qPCR-thermocyclerrel amplifikáltuk, a többi mintán a kísérleteket Bio-Rad CFX Connect műszerrel (Bio-Rad

Mo. Kft., Budapest, Mo.) végeztük el. A két mintasor között azonos cDNS hígítási soron optimalizálás történt. A qPCR reakciókhoz 40 ng cDNS-t tettünk well-enként, minden mintát triplikálva. Maxima SYBR-Green-t (Thermo-Scientific, Biocenter Kft., Szeged, Mo.) használtunk minden esetben. Az Abi Thermocycler alkalmazásakor ROX-val a Bio-Rad esetében ROX nélkül (a Bio-Rad CFX Connect gyárilag ROX referenciát nem igényel). Az amplifikáció 45 ciklusos volt, majd minden esetben “melt-curve” analízis következett. A keletkező fluoreszcencia-görbék minőségét a szoftveres ellenőrzést követően mindig manuálisan is validáltuk és szelektáltuk. A triplikátumok közül mindig legalább két mérés került be az expressziós vizsgálatba. Az mRNS-ek endogén kontrollja minden esetben az Rpl13a-volt. Ennek homogenitását mintasorunkra előzetes méréssel igazoltuk. A szoftveres analízist a thermocyclerek saját szoftverjeivel végeztük.

WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK

A retinákat homogenizálásukig -80°C-on tároltuk jelölt Eppendorf csövekben. Hideg (4°C) 300 µl radioimmunoprecipitation assay pufferrel 5 percig, vagy teljes mértékben homogenizáltuk egy pipetta segítségével. Centrifugálást követően a felülúszót tartottuk meg. A fehérje koncentrációját bicinchoninic-acid protein assay kittel (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Life Technologies Magyarország Kft., Budapest, Mo.) határoztuk meg. A további minta előkészítésnél és a blotolásnál a NuPAGE Instruction Manual (Invitrogen, Life Technologies Magyarország Kft., Budapest, Mo.) szerint jártunk el. Futtatásonként 20 vagy 25 µg fehérjét vittünk fel a 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe. Először 100 V-tal, majd a „running” gélbe átlépést követően 150 V-tal futtattuk marker létra jelenlétében. A gélről a fehérjéket félszáraz blotolással polyvinylidene difluoride membránra blotoltuk (130 mAh, 30 perc). 45 perces tejporos, Tween-20-as, Tris-pufferelt sóoldattal (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6, +1% bovine szérum albumin, +5% zsírszegény tejpor) blokkolást követően elsődleges Cx36 nyúl poliklonális (Abcam: ab86408; 2000x híg) és β- tubulin nyúl poliklonális (Sigma: T4026; 10000x híg) antitestekkel jelöltük. Ezt a műveletet egy éjszakán át 4°C-on, horizontális rázón végeztük. Az antitesteket 0,5% BSA-s, 2,5% tejporos tris-pufferelt sóoldattal hígítottuk. A másodlagos anti-nyúl HRP (torma-peroxidáz) konjugált antitestet 10000x-re hígítottuk Tris-pufferelt sóoldattal 3 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk rázaton, majd 4x5 perc mosást követően kemilumineszcenciával detektáltuk (Western Lightning Chemiluminescence Plus

reagens, PerkinElmer) nagyérzékenységű film (Kodak X-OMAT Blue Film XB, Sigma) segítségével. Az expozíciós idők: érintés, 10, 30, 60, 300 mp voltak. Megfelelő jelölés esetén elhagytuk a 60, 300 mp-et. Az előválogatott és optimálisan jelölt filmeket magas minőségben (600 dpi) digitalizáltuk és a jeleket a β -tubulinnal, mint endogén kontrollal normalizálva mértük ImageJ (NIH) denzitometria segítségével. Az adatokat a P0 mérés eredményeihez viszonyítottuk.

MIKROSZKÓPOS VIZSGÁLATOK

Metszeteinket DIC (Differential interference contrast) szűrővel fényképeztük először Nikon FN1 típusú mikroszkóppal, Nikon 63x-os apochromat vízimmerziós objektívet használva. Az immuncitokémiai jelek detektálását LSM 710 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal végeztük; a 488 nm-es argon- és az 543 nm-es Hélium/Neon lézert használva az Alexa488 és Alexa546-val konjugált másodlagos antitestek gerjesztésére. Zeiss Plan Achromat 63x/1.4 olaj-immerziós objektívet használtuk. Az utómunkálatok során a fotók kontrasztjának és fényerejének beállítására az Adobe Photoshop CS3 és ImageJ programokat használtuk és csak globálisan állítottunk a fenti tényezőkön. Ábráink vonalrajzai pedig Adobe Illustrator CS3 programmal készültek.

A Cx36 jel nagyfelbontású detektálására egy Zeiss Elyra Structured Illumination (SIM) típusú szuperrezolúciós mikroszkóp (Carl Zeiss, Jéna, Németország) szolgált. A jelet 488-nm-es lézerrel gerjesztettük, a mintákat Zeiss Plan Achromat $\times 63/1.4$ olaj immerziós objektívvel vizsgáltuk. A fényútba helyezett optikai rácsot 5 különböző rotációs szögbe állítva minden egyes beállításról fényképet készítettünk. Ugyanazon beállítás 5 különböző képe alapján egy algoritmus segítségével a rendszer képes adatot nyerni a preparátum olyan részleteiről, amelyek dimenziói az Abbey-féle elméleti határ közelébe vagy az alá esnek és akár 100–120 nm-es laterális felbontással tud képet alkotni. Zeiss ZEN szoftvert alkalmaztunk a képek előkészítésére, majd ImageJ-t elemzésükre. Ezért kifejezetten alkalmas az általunk vizsgált Cx-ek által alkotott plakkok méretének meghatározására.

DENZITOMETRIA ÉS AZ ADATOK STATISZTIKAI ELEMZÉSE

Az ideghártya központi részéből, tökéletes merőleges metszési síkkal rendelkező metszeteket választottunk ki a denzitometriai analízishez és a plakk statisztika elvégzéséhez. A képek előállításához Z-tengely mentén összegeztük a

képsort az imageJ szoftver „z-projection tool” (maximális intenzitás beállításban, 10 μm -t átfogóan) segítségével. Minden egyes mérés denzitometriai analíziséhez öt (patkány egyedfejlődéses sorozat esetén), ill. három (emlős összehasonlító vizsgálatok esetén) metszetet választottunk, amelyekből egyesével öt, megegyező méretű és alakú (150 μm x 20 μm , négyszög) reprezentatív részt választottunk, melyekből a plot profil analízis funkcióval (Image J) kétdimenziós pozíció/intenzitás görbét készítettünk. A görbék elhelyezkedését calretinin marker segítségével normalizáltuk. SIM technológiával készítettünk képet P10, 15, 20 (n=5, n=5, n=11) korú patkányok retinájáról, majd ezeken a Cx36 jelölt plakkok méretét és azok előfordulási frekvenciáit elemeztük ImageJ szoftver “analyze particles” alkalmazással majd ANOVA szignifikancia teszt és Gabriel és/vagy Bonferroni post-hoc analízis segítségével a különbségeket értékeltük. Az emlős állatok retinájában mért plakkméret eloszlásokat bemutató ábránk eloszlását az ImageJ szoftver „analyse particles” alkalmazásával, állatonként három metszetből átlagolt eredmény alapján készítettük, feltüntetve a szórást. Az eredeti képekből bináris képet készítettünk háromszögelő (triangle) szűréssel. A bináris képen az IPL-t átfogó, ezért változó magasságú, de minden esetben egyenlő horizontális szélességű (134 μm) régióban végeztük el, az ellipszoid alakú (0,4-1-es tűrőhatárral) kijelölések számolását. Ezt exportáltuk és Microsoft Excellel összesítettük.

Az adatok statisztikai analízise vagy Origin 6 (Microcal Origin 6.0; Northhampton, USA) vagy SPSS 19 szoftverrel történt. A szignifikancia szint meghatározására egytényezős ANOVA analízist (SPSS v19; SPSS Inc., IBM), ezen Bonferroni, Gabriel és Tukey post-hoc tesztekkel végeztünk (Field, 2013). Továbbá egyes esetekben Student-féle t-próbát is használtunk.

6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

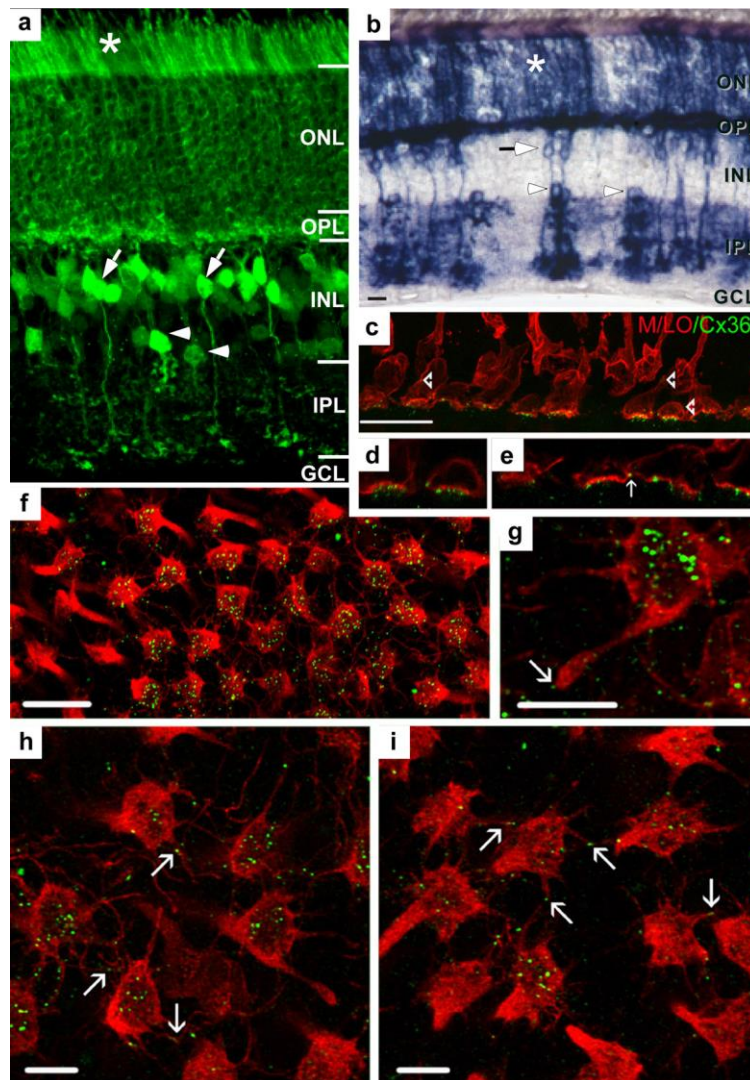
ELEKTROMOS SZINAPSZISOK AZ EMLŐS RETINA PÁRHUZAMOS PÁLYARENDSZEREIBEN

Az emlős retina fotoreceptorai a környezetből a szembe jutott fény fotonjainak energiáját alakítják át elektro-kémiai ingerületté, amely idegsejtről idegsejtre továbbítva végighalad a látórendszer egyes elemein. Az ideghártya első szinaptikus rétegében a fotoreceptorok által kódolt képi információ a másodlagos bipoláris sejtekre jut. Míg fotoreceptoroknak 3 (pálcika, zöld és kék csap – dikromaták), vagy 4 (az előzőek mellett piros csap is van - trikromaták) különböző kromatikus érzékenységgel jellemezhető típusa van, addig a bipoláris sejtek sokfélék (9-12 fajta). Csoportosításuk aszerint történik, hogy mely fotoreceptoroktól kapják bemeneteiket, mekkora területről gyűjtik össze az információt, és milyen posztszinaptikus receptoraik érzékelik a fotoreceptorok által felszabadított glutamátot. A 9-12 fajta bipoláris sejt ugyanennyi párhuzamos intraretinális pálya kiindulópontja is, melyeken a képi információ elemeire bontva (be- és kikapcsolás, szkotopikus akromatikus kontraszt, fotopikus akromatikus kontraszt, piros-zöld kromatikus kontraszt, sárga-kék kromatikus kontraszt stb.), párhuzamosan halad tovább a dúcsejtek felé. A bipoláris sejtek által létesített kontrasztcsatornák a retina kimeneti dúcsejtjeinek szintjén (> 20 típus; Völgyi és mtsai 2009) további információs csatornákká bomlanak. A dúcsejt eredetű információs csatornák egy része egyszerűen a bipoláris sejtektől „örökölt” kontrasztinformációt továbbítja az agyi látóközpontok felé. A dúcsejtek másik csoportja a bemenetek felhasználásával a látott kép egyéb jellemzőinek kódolását végzi, és olyan információs pályák kiindulópontjai, amelyek a mozgás, mozgás iránya, orientáció, háttér/objektum mozgás elkülönítése, sötétedés, objektum közeledés detektálásában fontosak. Ezeken az információs csatornákon az ingerület alapvetően vertikális (fotoreceptor → bipoláris sejt → dúcsejt) irányban halad és kémiai szinapszisokkal jut egyik idegsejtről a másikra. Ugyanakkor az információ továbbítását nagyban befolyásolják a párhuzamos elemek között kialakuló elektromos szinapszisok is.

Réskapcsolatok a csap pályarendszerben

A párhuzamos csap információs elektromos szinapszisok segítségével pályák több szinten is érintkeznek egymással, melynek segítségével oldalirányú információ átadásra, jelszinkronizációra és/vagy szummációra van lehetőség. Az első ilyen kapcsolatot maguk a csapok között kialakuló elektromos szinapszisok hozzák létre, melyek létéről több mint 50 éves szakirodalmi adatok számolnak be (Cohen 1965; Raviola és Gilula 1973; Kolb 1977; Tsukamoto és mtsai 1992; 2001). Kutatásaink bizonyították, hogy az egyik legfontosabb modell állat, az egér retinája hasonló kapcsolatokkal rendelkezik (5. ábra, Deans és mtsai 2002). Ebben a munkában β -galaktozidáz (β -gal), ill. placentális alkalikus phosphatase (PLAP) riporter géneket ültettünk be a Cx36 kódoló szekvencia helyére, és ezzel két riporter egértözsét hoztunk létre. A két törzs heterozigóta egereinek retináján β -gal vagy PLAP enzimhisztokémiai eljárással bizonyítottuk a Cx36 termelését több retinális sejttípusban is, köztük a csap fotoreceptorokban (5. ábra a és b képek). A csap fotoreceptorok mellett csap bipoláris és All amakrin sejtek is bizonyítottan mindkét markerre pozitívak voltak (a Cx36 termelő sejtekről későbbi fejezetekben történik említés). Az enzimhisztokémiai reakciók jelerőssége alapján valószínűsítettük, hogy a csapokon kívül pálcikák is Cx36 pozitívak. Ezt a megfigyelést későbbi vizsgálatok nem támasztották alá, és a pálcikák elektromos szinapszisainak connexin összetétele a mai napig kérdéses.

A fotoreceptorok közötti réskapcsolatokat nemrégiben sikerült elsőként megfigyelnünk immuncitokémiai módszerrel humán fotoreceptorok között is (Kántor és mtsai 2016a), így feltételezhető, hogy ezek jelenléte általános az emlős retinában (5. ábra c-l képek). A csapok közötti elektromos szinaptikus kapcsolatok feltehetően a szomszédos csapok impulzusainak átlagolását, így a jel-zaj viszony javítását szolgálják (Schneeweis és Schnapf 1995). Az is bizonyított, hogy a csap-csap elektromos szinapszisok diszkriminálnak a spektrális érzékenység alapján. Eszerint zöld-zöld, piros-piros és piros-zöld kapcsolatok kialakulnak, de a kék csapok vagy izoláltak csak kék-kék kapcsolatokat létesítenek a modell állatok retináiban (Hornstein és mtsai 2004) és a humán retinában (Kántor és mtsai 2016a). Az emberi mintákon végzett jelöléseink alapján valószínűsítjük, hogy a kék csapok egymással sem létesítenek réskapcsolatokat. Ezt azért feltételezzük, mert a kék csapok ritkák, még a fovea területén is csak elszórtan helyezkednek el, ami nem teszi lehetővé a kék csapok végtalpainak fizikális közelségét és réskapcsolatok kialakítását.



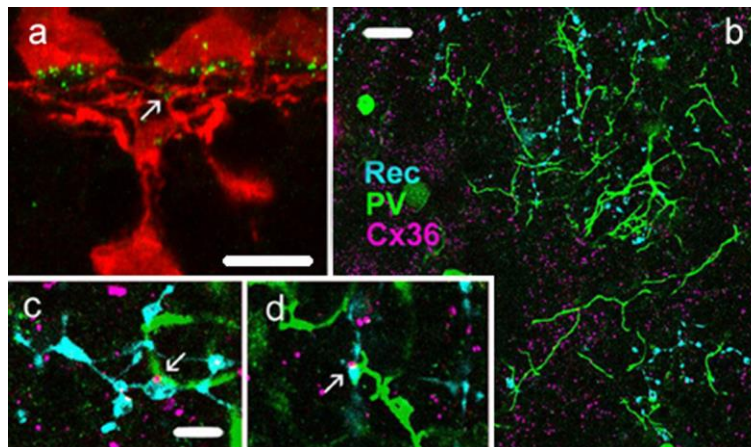
5. ábra. Cx36 expresszió az emlős retina csap receptoraiban

a-b. Egérretina keresztmetszeti képek a riporter β -gal (**a**) és PLAP (**b**) expresszióját fotoreceptorokban és bipoláris sejtekben (a riporter szekvencia a Cx36 kódoló szekvenciához kötött). Cx36 expresszió látható az egér fotoreceptorok (csapok és pálcikák) zömében. **c-e.** A humán retinában megfigyelhetők az L/M opszin termelő csapok (piros) egymással alkotott kapcsolatai és a csap axonterminálisok átfedéseinél megfigyelhető Cx36 immunjelölt plakkok (zöld). **f-i.** Humán whole-mount szöveten megfigyelhető a calbindin termelő csap axonvégek (piros) és a connexin36 plakkok (zöld) egymáshoz viszonyított eloszlása. A Cx36 plakkok többsége ún. szubpedikuláris aggregátumokba tömörül, közvetlenül a csapok axonvégtalpai (pedikulusok) alatt. A csap-csap elektromos szinapszisok jóval ritkábbak, a szomszédos axonterminálisok átfedéseinél találhatóak (nyilak). Aránymérték: a-g 10 μ m, h és i 5 μ m.

Az elektromos szinapszisok jelenlétén kívül a fenti vizsgálatokkal azt is sikerült bizonyítani, hogy az egér és az emberi retina esetében a csap-csap elektromos

szinapszisok alapvetően Cx36 alegységekből állnak (5. ábra, Deans és mtsai 2002; Kántor és mtsai 2016a).

A csap eredetű párhuzamos információs csatornák következő kapcsolódási pontjai szintén a külső retinában találhatók, ahol a bipoláris sejtek dendritikus nyúlványai hoznak létre bipoláris-bipoláris elektromos szinaptikus kapcsolatokat (Feigenspan és mtsai 2004; O'Brien és mtsai 2012). Munkánkban (Kántor és mtsai 2016a) immuncitokémiai jelölésekkel igazoltuk, hogy ezek a kapcsolatok a humán retinában is léteznek (5. ábra c-i képek). Ezen felül specifikus bipoláris és csap receptor markerek segítségével bebizonyítottuk, hogy a bipoláris-bipoláris dendritikus részek kapcsolatoknak két csoportja létezik. Az egyik kapcsolat a csapok alatti bipoláris dendritvégződéseket köti össze és ún. szubpedikuláris Cx36 konglomerátumokat hoz létre. Ezek a konglomerátumok feltételezésünk szerint olyan elektromos szinapszisok, melyek egyazon csap posztszinaptikus bipoláris sejtjeinek dendritvégágai között jönnek létre. A közelben található Cx36 plakkok másik csoportja az aggregátumoktól kissé proximálisabban találhatóak és nagyobb bipoláris dendritágakat kötnek össze (6. ábra a kép, Kántor és mtsai 2016a).



6. ábra. Cx36 expresszió a csap bipoláris sejtekben

a. Kettős jelölés az emberi retinán mutatja a calbindin termelő (piros) csap bipoláris sejtek dendritjeit, a csapok axonterminálisait, valamint a connexin36 plakkok (zöld) elhelyezkedését. A csap talpak alatt látható (szubpedikuláris) aggregátumok plakkjai és az ezektől disztálisabban elhelyezkedő, egyedül álló plakkok között is voltak olyanok, melyek a calbindin jelölt bipoláris sejt dendritjével kolokalizáltak (nyíl). **b-d.** A hármas jelölések az emberi whole-mount mintán recoverin (Rec, világoskék) és parvalbumin (PV, zöld) termelő bipoláris sejtek axonjait mutatja az IPL OFF alrétegében. A minta connexin36 plakkjai (magenta) gyakran megfigyelhetők heterológ bipoláris axon kereszteződésekben (nyílak). Aránymérték: 10 μ m.

Feltételeztük, hogy az előbbi (szubpedikuláris) kapcsolatok egyfajta “reset” funkciót látnak el. Ennek a feladata az volna, hogy az egyazon csap receptor felől, de különböző funkciójú csatornákon az információ szinkronizáltan, egyszerre induljon el. Véleményünk szerint ez azért fontos, mert a látórendszer végső integrátorai (valószínűleg felsőbb kortikális területeken) a látott kép dekódolását és értelmezését akkor végzik el hatékonyan, ha a párhuzamos csatornákon érkező különböző képi elemekről szállított információ elemek meghatározott időrendben (esetleg szinkron) érkeznek. Ez utóbbi elméletünk egyelőre további kísérletes bizonyítékot igényel, az erre a kérdéskörre vonatkozó kísérleteink egyelőre a tervezési fázisban vannak. A nagyobb dendritágakat összekötő elektromos szinapszisokról a szubpedikulárisokkal szemben azt gondoljuk, hogy az azonos információs csatornához tartozó, szomszédos csap bemenetekkel rendelkező bipoláris sejtek működését hangolják össze.

A bipoláris sejtek között létrejövő elektromos szinapszisok azok axonjai és axon-terminálisai között is létrejöhetnek (Raviola és Gilula 1975; Van Haesendonck és Missotten 1983; Marc és mtsai 1988a; Cohen és Sterling 1990; Vaney 1997; Mills 1999; Arai és mtsai 2010). Egyik munkánkban feltártuk ezeknek a kapcsolatoknak a létét emberi retina esetében is (6. ábra b-d képek, Kántor és mtsai 2016b; 2017). Hármass jelölésű immunhisztokémiai kísérleteinkben a recoverin pozitív OFF midget (flat midget bipolar cell – FMB; a midget pályához tartozó bipoláris sejtek egyike) és a parvalbumin termelő nagy kék bipoláris sejt (giant bistratified bipolar cell – GBB; a koniocelluláris pályához tartozó bipoláris sejtek egyike) axonok átfedései esetén találtunk nagy számú Cx36 plakk lokalizációt. Ezekben az esetekben a Cx36 plakkok éppen a két bipoláris axon kereszteződésénél helyezkedett el. Ugyanakkor a calbindin termelő ON bipoláris sejteknek (diffuse bipolar type 3 – DB3) a fenti két másik bipoláris típus (FMB és GBB) axonjaival alkotott axonális átfedéseinél ritkák voltak a Cx36 plakkok (az elforgatásos negatív kontrolloktól nem különböző számú). Ez utóbbi kísérletek rámutattak tehát arra, hogy a bipoláris axonok által kialakított Cx36 elektromos szinapszisok típus specifikusak, a kísérleteink alapján jellemzők voltak a FMB és GBB sejtekre de nem voltak jelen a DB3 sejteken. Ezen túlmenően az is nyilvánvaló volt, hogy a bipoláris axonok elektromos szinapszisaik főleg heterológ bipoláris axon keresztezésekben fordulnak elő, igazolva azt, hogy a párhuzamos retinális pályákon (midget és koniocelluláris) szállított információ egy része már a bipoláris sejtek szintjén a retina hálózatán belül keveredhet. A bipoláris sejtek axonális

elektromos szinapszisainak szerepéről keveset tudunk, de egy új tanulmány szerint ezeknek fontos szerepe van a főemlősök parasol mozgásérzékeny dúcsejtjeinek (parasol sejtek) működésében, a mozgási információ kódolásában (Manookin és mtsai 2018).

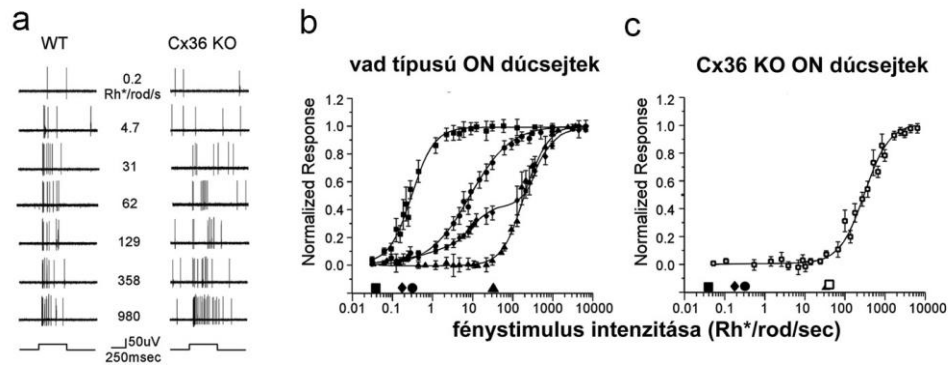
A fenti információs csatornák létrehozásában részt vevő csap bipoláris sejtek differenciálódásához több homeobox gén összehangolt működésére is szükség van. Kíváncsiak voltunk arra, hogy egyes homeobox gének expressziójának zavara hatással lesz-e egyes bipoláris sejt alcsoportok fejlődésére és/vagy működésére, ill. a potenciális működésbeli zavarokhoz hozzárendelhetők-e az elektromos szinapszisok működési elváltozásai. A bipoláris sejtek fejlődését érintő homeobox gének közül a Vsx1 gén esetleges egyedfejlődésbeli és funkcionális hatásaival tudtunk foglalkozni részleteiben egy Vsx1 KO egér modell esetében, melyhez egy kollaborációs munka folytán jutottunk hozzá. A Vsx1 génnek a kiütése esetén azt figyeltük meg, hogy az OFF bipoláris sejtek működése tökéletlen, ami miatt az OFF jel-útvonal teljesítményének csökkenésében nyilvánult meg (Chow és mtsai 2004). Ebben a vizsgálatban a teljesítmény mérőszáma az egy bizonyos erősségű fényimpulzusra adott dúcsejt akciós potenciálok száma volt. Ez a mérőszám az ON polaritású dúcsejteknél nem változott, míg a VSX 1 transzgénikus állatok OFF dúcsejtjeinél szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll állatokéhoz képest. Ezt a változást annak ellenére sikerült megfigyelnünk, hogy a dúcsejtek fénystimulusokkal szembeni érzékenységiében nem vettünk észre változást sem az ON, sem az OFF dúcsejtek esetében. Ugyanakkor az OFF csatorna fentiekben bizonyított alulműködését nem sikerült kapcsolatba hoznunk a bipoláris sejtek elektromos szinapszisaival, azok esetleges hiányos vagy túlzott működésével. Többek között az utóbbi negatív eredmény volt az oka annak, hogy a bipoláris sejtek egyedfejlődésével kapcsolatos kísérletes vonalat nem folytattuk a későbbiekben.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: A fenti kísérletek tehát egyértelműen igazolták, hogy az intraretinális párhuzamos csap információs csatornák több ponton Cx36 részkapcsolatokat tartalmaznak. Ezek jelenlétét egér és humán szövetek neuronjain is bemutattuk, csap-csap és bipoláris-bipoláris sejtkapcsolatokban. Érdekes megfigyelés a különböző típusú bipoláris sejtek közötti kapcsolat, amely arra utal, hogy a párhuzamos csatornákon haladó információ helyenként keveredik.

Réskapcsolatok a pálcika pályarendszerben

A csap pályarendszerrel ellentétben, a pálcikák által felfogott információ csak egyetlen ON polaritású pálcika bipoláris sejtféleséghez jut el (OFF pálcika bipoláris az emlős retinában nincsen). A pálcika bipoláris sejtek a csap bipolárisokkal ellentétben nem szinaptizálnak közvetlenül dúcsejtekkel, hanem serkentő glutamát szinapszisokon keresztül az ún. All amakrin sejtek felé közvetítik az információt. Az All sejtek aztán az ON polaritású csap bipoláris sejtek axonjaival jel-konzerváló elektromos szinapszisokat alkotnak, az OFF polaritású bipoláris sejtek felé pedig jel-fordító glicinerg, inhibítoros szinapszisokat szolgáltatnak. Az ON és OFF csap bipoláris sejtek végül serkentő, glutamát mediálta szinaptikus kapcsolatok révén az ON és OFF dúcsejtek felé továbbítják a pálcikákból származó információt (Bloomfield és Dacheux 2001). Ezt a szignalizációs útvonalat elsődleges pálcikapályának nevezi a szakirodalom.

A másodlagos pálcikapálya esetében a pálcikák aktivitása pálcika-csap elektromos szinapszisokkal jut a csapokra, majd a konvencionális csap pályák (csap-bipoláris-dúcsejt) segítségével eljut a kimeneti dúcsejtekig (Raviola és Gilula 1973). Létezik az ún. harmadlagos pálcikapálya is, melynél egyes pálcikák és az OFF bipoláris sejtek egy bizonyos típusa között létesül konvencionális kémiai szinapszis, így ezen a pályán az OFF dúcsejtek egyes típusai kaphatnak pálcika eredetű információt (Tsukamoto és mtsai 2001). Ebben a témakörben végzett kísérleteinkben vad típusú és Cx36 knock-out (KO) egerek dúcsejtjeiből vezettünk el fénystimulus kiváltotta extracelluláris akciós potenciálokat. A stimulus erősségét (fényerő) fokozatosan növeltük és meghatároztuk a dúcsejtek küszöbválaszait. Az elvezetések először kontroll körülmények között végeztük el, majd megismételtük őket úgy, hogy különböző farmakológiai módszerekkel blokkoltuk egyik vagy másik pályarendszer működését (L-(+)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid – egy mGluR6 agonista, amely az összes ON csapbipolárison és a pálcikabipoláris sejteken történő információszállítást blokkolja; 8-Bromo-cGMP – az All sejtek és ON csap bipolárisok közötti szignalizációt gátolja). A kísérletek eredményei bizonyították azt, hogy a pálcika pályák nem szelektívek a dúcsejt célpontok tekintetében, hanem azokra konvergálnak (kettő, vagy akár mind a három pálcikapálya). Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a különböző típusú dúcsejtek fényválaszainak kialakításában az egyes információs útvonalak különböző mértékben vesznek részt (7. ábra, Völgyi és mtsai 2004).

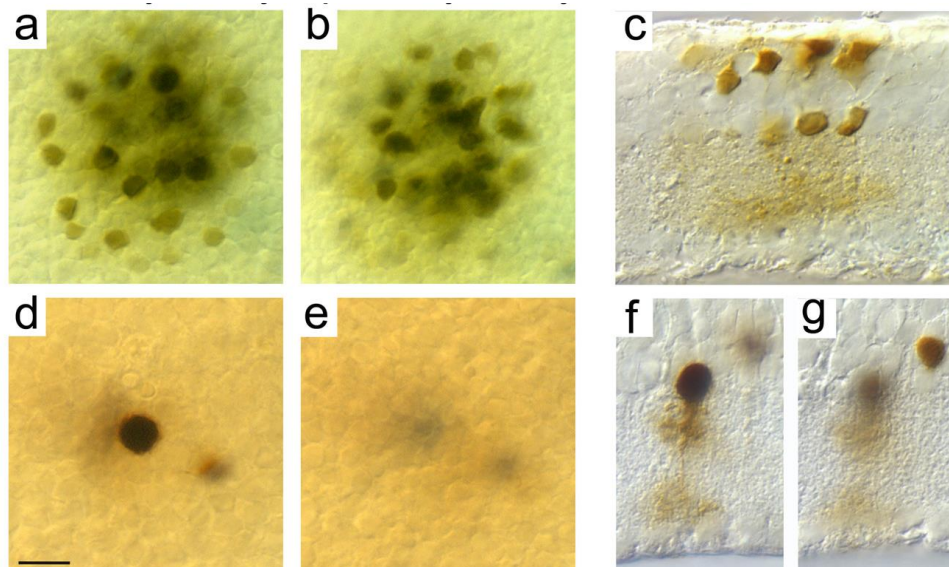


7. ábra. Cx36 expresszió a pálcika pályarendszerben

a. Extracelluláris elvezetések kontroll (WT) és connexin36 knock-out (Cx36KO) egér dúcsejtekből. Az elvezetések közötti oszlop számai a fénystimulus erősségét jelölik ($Rh^*/rod/s$ – az egy másodperc alatt pálcikánként izomerizáló rhodopszin molekulák száma). Az elvezetések alatti TTL szimbólum a full-field fénystimulus be- és kikapcsolását jelzi. **b.** A vad típusú állat retinájában megfigyelt ON polaritású dúcsejtek fényérzékenységi görbéi láthatóak. **c.** A Cx36KO állat ON polaritású dúcsejteinek a fényérzékenységi görbéje van feltüntetve (normalizált válaszerősség a fénystimulus intenzitásának függvényében). A görbék alatt található fekete szimbólumok (négyzet, rombusz, kör és háromszög) az egyes dúcsejt altípusok érzékenységi küszöbeit mutatják (a maximum válasz 5%-a) a vad típusú egérben, az üres négyzet pedig az egyetlen csoport érzékenységi küszöbét jelzi a Cx36KO egérben.

Egyes dúcsejtek már egészen kis intenzitású szkotopikus fénystimulus hatására is kimeneti akciós potenciálokat generálnak, míg mások esetében aktív $GABA_c$ mediálta inhibíció gátolja az alacsony intenzitású stimulus kimeneti jellé alakítását (Völgyi és mtsai 2004; Pan és mtsai 2016). Megfigyeltük azt is, hogy míg a vad típusú egér retinájában az ON polaritású dúcsejteket fényérzékenységük alapján három csoportra lehet osztani, addig a Cx36 KO egér esetén csak egy, kevésbé érzékeny csoport létezik. Bebizonyítottuk, hogy a legérzékenyebb vad típusú és az összes Cx36 KO ON dúcsejt fénystimulusokkal szembeni küszöb értéke (5%-a a maximális fényválasznak) a csap pályarendszer érzékenységevel egyezik meg. Ezzel bizonyítottuk, hogy az elsődleges és másodlagos pálcikapályákon történő információtovábbítás Cx36 elektromos szinapszis függő. Ezek működése esszenciális az információ továbbításában, a dúcsejtek fényérzékenysége a csapreceptorok detektációs küszöbéhez hasonlatos, a Cx36 knock-out egerek sötétben nem látnak (Deans és mtsai 2002; Völgyi és mtsai 2004). Kísérletesen bizonyítottuk, hogy a sötétvákságnak ez a formája az AII sejtek és csap bipolárisok között, valamint a pálcika és csap receptorok végtalpai közötti létrejövő Cx36 tartalmú réskapcsolatok hiánya

miatt alakul ki. Az érintett állatok esetében mind az elsődleges, mind a másodlagos pálcikapályák információ továbbítása gátolt, ezért az ON polaritású dúcsejtek csak csappálya eredetű információt, az OFF polaritásúak csak másodlagos (esetlegesen harmadlagos) pálcika- és csappálya eredetű információt kapnak (8. ábra). Az AII sejtek egymással alkotott elektromos szinapsziszai esetén megfigyeltük, hogy ezek a random zaj kiátlagolásának segítségével a primér pálcikapályán haladó információ jel-zaj viszonyának javítását és ezzel az OFF dúcsejtek ingerküszöbének csökkentését végzik (8. ábra, Bloomfield és Völgyi 2004).



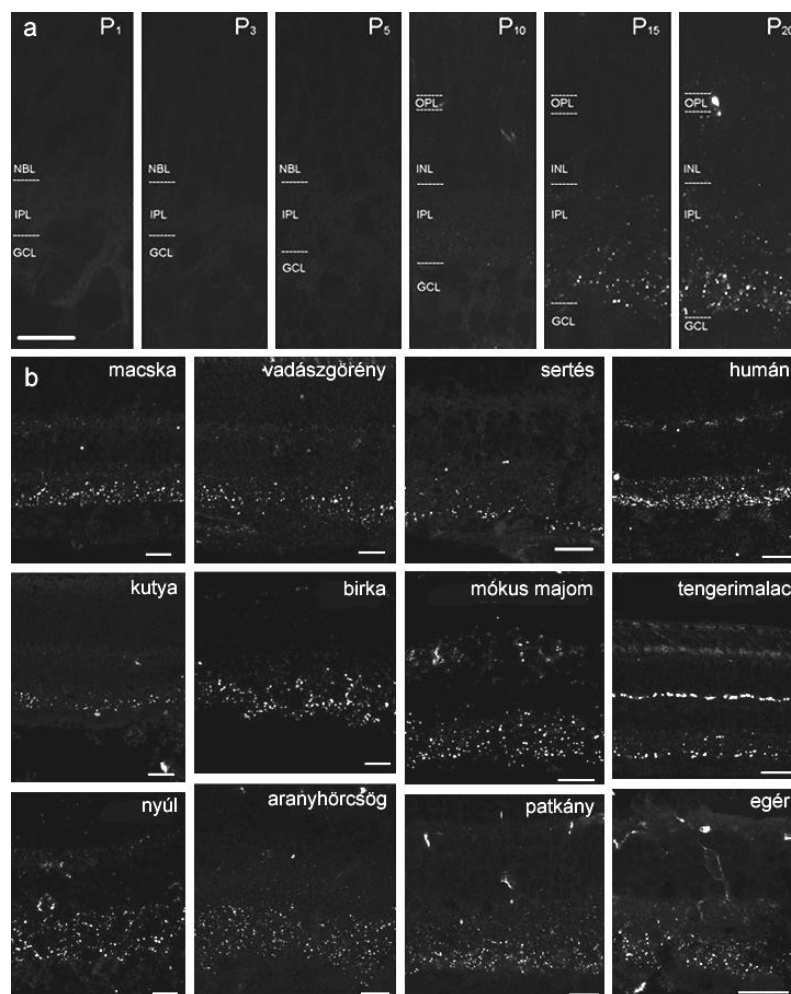
8. ábra. Cx36 expresszió az AII amakrin sejtekben

a-b. Neurobiotin injektált AII amakrin sejt és az injektált sejtrel gap junction kapcsolt AII (**a** kép) és bipoláris (**b** kép) sejtek vad típusú egérből készült egész retina preparátumon. **c.** Ugyanazon retina kriosztáttal készült keresztmetszeti képe. Jól látszanak a Neurobiotin kapcsolt AII amakrin és csap bipoláris sejtek. **d-e.** AII amakrin sejt Neurobiotinnal töltött képe az amakrin sejtek szintjén (**d**) és a bipoláris sejtek szintjén (**e**) a Cx36 KO egér retinában. **f-g.** Kriosztáttal készített metszeten látható, hogy az injektált AII sejt nem volt tracer-kapcsolt más retinális sejtrel (a képeken látható fókuszon kívüli sejt véletlen aspecifikus jelölés eredménye; jól látható, hogy ez utóbbi sejttest nem az AII sejttestek síkjában helyezkedik el). Aránymérték: 10 μ m.

Egér- és nyúlretina esetében az AII sejteken hegyes elektródás intracelluláris elvezetések is végeztünk. Ezek során sikerült bizonyítani az AII sejtek központ-környéki receptív mezjének létét és azt, hogy a környéki gátlást szolgáltató ún. A17 amakrin sejt GABA-erg feed-back bemenetet szolgáltat a pálcika bipoláris végtalpak

felé és ez kevert GABA_A-GABA_C transzmisszió segítségével éri el (Völgyi és mtsai 2002).

A fenti vizsgálatokban a Cx36 tartalmú elektromos szinapszisok szerepét több kapcsolatban is sikerült bizonyítani. Azonban kevés ismeretünk volt arról, hogy a megfigyelések általánosak-e az emlősök körében, vagy csak a kísérleti modellállatokra jellemzőek. Ezt a kérdéskört immuncitokémiai módszerrel közelítettük meg. Sikerült bizonyítanunk, hogy a fenti Cx36 tartalmú elektromos szinapszisok jelenléte és szerepe általános a különböző emlős fajok esetében, beleértve a emberi retinát is (9b. ábra, Kovács-Öller és mtsai 2017).



9. ábra. All sejtek Cx36 expressziójának evolúciós és fejlődéstani változásai

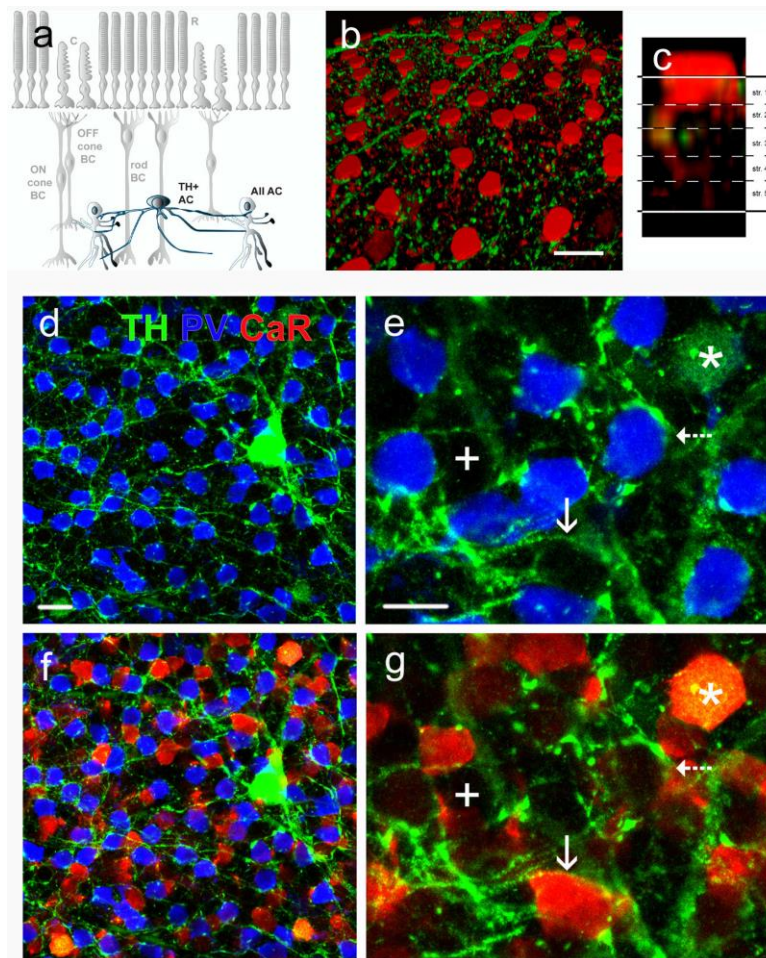
a. A Cx36 plakkok expressziójának mennyiségi és eloszlási változása a patkányretina posztnatális (P₁, P₃, P₅, P₁₀, P₁₅ és P₂₀) fejlődése során. **b.** A Cx36 plakkok eloszlása különböző emlős állatok retinális keresztmetszetén. Aránymérték: 20 µm.

Ezek eloszlásában megfigyelhető apró különbségeket az egyes emlőszállatok életvitelbeli különbségeire vezettük vissza. Így megfigyeltük azt, hogy a ragadozó és rágcsáló fajok retináiban a külső retinális Cx36 plakkok száma relatíve alacsony, valamint azt, hogy a tengerimalac és az emberi retinában a többi fajénál kifejezettebb szubpedikuláris Cx36 aggregátumok kialakulása. Ez utóbbi megfigyelés azt bizonyítja, hogy a Cx36 elektromos szinapszisok kialakulása és fenntartása a változó környezeti tényezőkhez rugalmasan alkalmazkodik.

A patkány esetében egyedfejlődési tanulmányokat is végeztünk a Cx36 összetételű retinális elektromos szinapszisok kialakulásának megismerése érdekében. Immuncitokémiai módszerekkel bizonyítottuk, hogy az AII-AII és AII-ON csap bipoláris gap junction kapcsolatok a patkány esetében a tizedik posztnatális napon (P_{10}) jelennek meg, 5-6 nappal az után, hogy az AII sejtek alaktanilag felismerhetővé válnak (9. ábra, Kovács-Öller és mtsai 2014). Ugyanakkor Western blot és PCR mérések segítségével bizonyítottuk, hogy a Cx36 fehérje és az átírást felelős Cx36 mRNS már a születést követően megfigyelhető a retina szövetében. Valószínűsítjük, hogy a korai (születéstől) Cx36 termelés ellenére a működőképes Cx36 tartalmú gap junction csatornák kialakulása csak a szemek kinyílását követően (P_{10} után), a vizuális tapasztalatszerzéssel indul meg.

Az AII sejtek elektromos szinapszisaikról korábban ismert volt, hogy dopamin mediálta szignalizáció mediálja a fényadaptáció során történő nyitást és zárást (Kothman és mtsai 2009). A dopamin amakrin sejtekből szabadul fel és diffúzióval jut el a retina többi sejtjéhez, melyeken D_1 és D_2 típusú receptorokon keresztül fejt ki hatását. A parakrin mechanizmus ellenére az AII sejteket a dopamin szignalizáció elsődleges targetjeinek szokás tekinteni amiatt, hogy a dopamintermelő amakrin sejtek axonjai gyűrűszerű szöveteket hoznak létre az AII sejtek sejttestjei körül (Contini és Raviola 2003; Witkovsky és mtsai 2005). Immuncitokémiai módszer segítségével bemutattuk, hogy a dopaminerg amakrin sejtek axonjai egy második támadási ponton, az AII sejt transzverzális nyúlványainak eredési pontjánál is beidegzi az AII sejteket (10 ábra, Völgyi és mtsai 2014), ill. a gyűrűszerű dopaminerg beidegzés nemcsak az AII amakrin sejtekre, hanem más amakrin sejtekre is jellemző (Debertin és mtsai 2015a). Ez utóbbi észrevételeink alapján nyilvánvaló, hogy a korábban megfigyelt AII sejttestek körüli gyűrűk nem jelentik az egyetlen dopaminerg bemenetet az AII sejtek számára és ráadásul nem kizárólag AII sejtekre jellemző kapcsolatról van szó. Tehát feltételezhető, hogy a sajátos periszomatikus dopaminerg bemenet révén nemcsak az AII sejtek,

hanem más típusú amakrin sejtek elektromos szinapszisainak kapuzási mechanizmusa is szabályozott. Ezt támogató kísérletsorozatunkban először optikus idegen keresztül neurobiotinos töltést alkalmaztunk, melynek során a jelölő anyag minden retinális dúcsejtbe bekerült. Ezen túlmenően számos, a töltött dúcsejtekkel elektromos szinaptikus kapcsolatban lévő amakrin sejt szómája is láthatóvá vált (az amakrin sejteknek ezzel a módszertannal történő töltése változó eredményességű volt). A sikeresen töltött preparátumokon anti-tirozin hidroxiláz immuncitokémiai reakciót hajtottunk végre. Ezekből a kísérletekből nyilvánvaló volt, hogy a dúcsejtekkel elektromos szinaptikus kapcsolatban lévő (általában WF és PA amakrin sejtek – ld. később) amakrin sejtek sejttestjei körül is találtunk az All-re emlékeztető TH rostokból álló gyűrűket (10. ábra, Debertin és mtsai 2015b). Az All sejtek körüli dopaminerg rostokról már kísérleteink kezdetekor ismert volt, hogy mind dopamin, mind GABA felszabadítási helyként szolgálnak, ugyanis a retinális dopaminerg sejtek GABA-t is termelnek kotranszmitterként (Contini és Raviola 2003; Witkovsky és mtsai 2005). További (közlés alatti és előtti) immuncitokémiai adataink vannak arra vonatkozóan, hogy ezek a periszomatikus dopaminerg gyűrűk valóban tartalmazznak VGAT jelölt plakkokat és némelyikük GABAAR α 1 jelölt posztszinaptikus területtel szemben található. Ugyanakkor morfológiai méréseink azt mutatják, hogy ezek gyakorisága nem haladja meg az egyéb (nem gyűrűt alkotó) dopaminerg rostokét (Debertin és mtsai 2015a; b). Az utóbbi megfigyelés megkérdőjelezi a periszomatikus gyűrűkről alkotott korábbi elképzelést, miszerint ezek speciális GABA/dopamin felszabadítási területek, axoszomatikus szinapszisok helyei. Kísérleteink tehát majdnem minden, korábban erről a kapcsolatról kialakított álláspontot megkérdőjelez, vagyis azt állítjuk, hogy: (1) a periszomatikus gyűrűk nem kizárólagos All támadási pontok, (2) a periszomatikus gyűrűk nem csak All sejtekre jellemzőek, (3) és a gyűrűk területén végzett parakrin transzmitter felszabadítás mértéke valószínűleg nem nagyobb a más TH⁺ rostokétól (10 ábra).



10. ábra. All és nem-All sejtek dopaminerg innervációja

a. Sematikus rajz mutatja, ahogyan az emlős retina dopamin termelő (TH+) amakrin sejtek rostok az IPL stratum 1 területén All amakrin sejtek szómáit közelítik meg. A TH+ rostok az IPL közepén (sztrátum 3) is gyakran kerül fizikai közelségbe az All sejtek rostjaival. **b.** TH (zöld) jelölt dopaminerg és parvalbumin (PV; piros) jelölt All amakrin sejtek ábrája mutatja a nyúlretina dopaminerg sejt rostjainak és az All sejtek sejttestjeinek szoros térbeli közelségét. **c.** A TH/PV kettősjelölt minta egyetlen All amakrin sejtjének digitálisan rekonstruált képe. A TH+ rostok (zöld) főleg az All sejt (piros) sejttestje körül (sztrátum 1) és a transzverzális dendrit eredése körül (sztrátum 3) figyelhetők meg. **d-g.** TH/PV/CaR hármas jelöléses kísérlet a patkányretinában. TH+ rostok (zöld), a PV+ All sejttestek (kék) és a CaR+ nem-All sejttestek (piros). Jól látható, hogy a TH+ rostok All (szaggatott nyíl) és nem-All (nyíl) sejttestek körül egyaránt létrehozzák a periszomatikus gyűrűket, sőt egyes gyűrűk ezen a hármas jelölt preparátumon is üres maradtak (kereszt). A csillag a kettősjelölt TH/CaR sejttesteket jelöli, amelyek feltehetően a 2-es típusú dopaminerg sejtek szómái. Aránymérték: 10 μ m.

***RÉSZÖSSZEFOGLALÓ:** A fenti kísérletekkel bizonyítottuk a Cx36 elektromos szinapszisok jelenlétét csap-pálcika, All-ON csap bipoláris és All-All kapcsolatokban és igazoltuk azok esszenciális szerepét a párhuzamos pálcika csatornák esetében.*

Bebizonyítottuk, hogy a heterológ pálcika-csap és az All-ON csap bipoláris elektromos szinapszisok az információ továbbításáért felelősek, ugyanakkor a homológ All-All elektromos szinapszisok (valószínűleg a pálcika-pálcika és az előző fejezet csap-csap és bipoláris-bipoláris kapcsolatai is) ezzel szemben a pályákon haladó információ jel-zaj viszonyának javítását végzik. Leírtuk a Cx36 réskapcsolat mintázat hasonlóságát több modell állat esetén és vizsgáltuk azok egyedfejlődés során bekövetkező megjelenését, érését. Végül a retinális réskapcsolatok kapuzását kontrolláló dopamint felszabadító amakrin sejtek belső retinális célpontjait új megvilágításba helyeztük.

DÚC- ÉS AMAKRIN SEJT RÉSKAPCSOLATOK

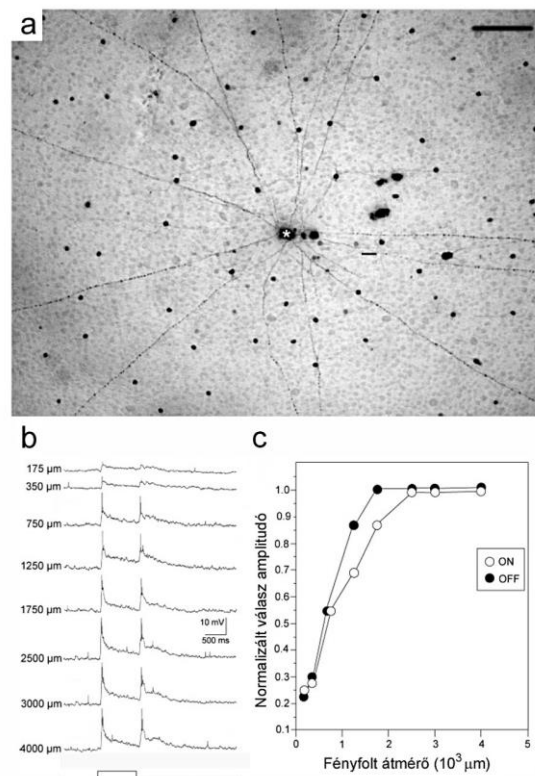
Az előző fejezetben azokat a kísérleteket vázoltuk, amelyek a retinán belüli párhuzamos pályák felépítésében részt vevő elektromos szinapszisok funkcióit vizsgálták. Ugyanakkor a belső retina amakrin és dúcsejtjei számos elektromos szinapszist alkotnak egymással, melyeknek a leírásai munkánk kezdetekor nagyon hiányosak voltak. Ennél is kevesebb ismeretünk volt ezen kapcsolatok funkciójáról; erre vonatkozóan csak elképzelések, elméletek álltak rendelkezésre. Az alábbiakban tehát azokat a vizsgálatokat mutatjuk be, amelyekkel ennek a témakörnek a mai tudásanyagához sikerült érdemben hozzájárulni.

Az amakrin sejtek réskapcsolatai

Az előzőekben bemutatott All elektromos szinapszisokon kívül az emlősök egyéb amakrin sejtípusai is - kevés kivétellel (pl. "starburst" amakrin sejtek) gyakran hoznak létre mind homológ (saját típuson belül) és heterológ (különböző amakrin sejt-típusok közötti) elektromos szinapszisokat (Xin és Bloomfield 1997). Miután az emlős retina 30-40 különböző amakrin sejtípust tartalmaz, kísérleteinket egy-két könnyen vizsgálható célcsoportra összpontosítottuk.

Az egyik ilyen amakrin sejtcsoporthoz az ún. széles dendritmezejű (wide-field, WF) sejteket foglalta magába. A WF amakrin sejtek csoportja nem egységes, minimum 6-8 különböző dendritikus elágazási mintázattal és IPL-beli elágazási szinttel rendelkező sejtípusokat tartalmaz. Közös jellemzőjük, hogy dendritfájuk átmérője a többi retinális sejtfeleséghez képest nagy ($> 300 \mu\text{m}$). A WF amakrin sejtek egy csoportját a nyúlretinában vizsgáltuk intracelluláris elektrofiziológiai, farmakológiai és Neurobiotin feltöltési technikák kombinációjával. Megfigyeltük, hogy a WF sejtek egy csoportja

nagy, koncentrikus dendritfával rendelkezett, melynek átmérője akár a milliméteres nagyságot is elérte (Bloomfield és Völgyi 2007). A dendritek az IPL közepén helyezkedtek el, csak a sejttest közvetlen közelében ágaztak el néhányszor, és hosszú radiális dendritvégágakkal rendelkeztek. A Neurobiotinnal töltött WF amakrin sejtek esetében azt is megfigyeltük, hogy a nyomjelző anyag a szomszédos (a sejttestek hasonló morfológiája miatt azonos típusúnak gondolt) sejtek belsejében is megjelent (11. ábra a kép).



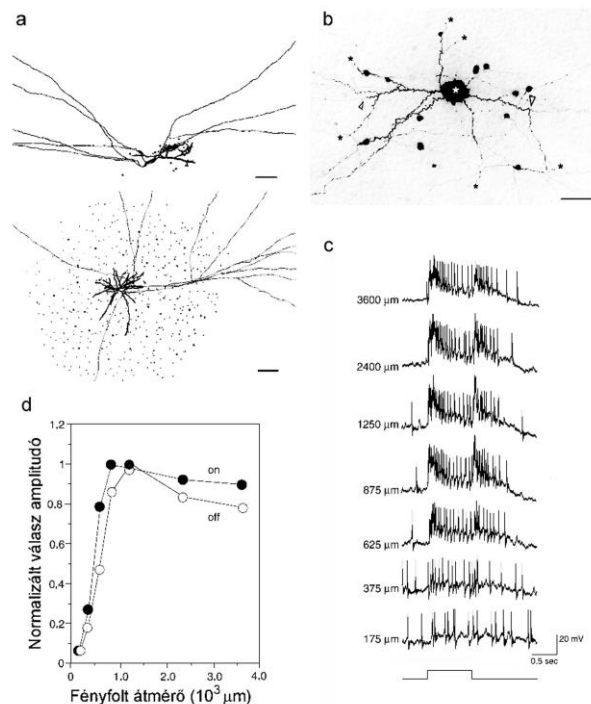
11. ábra. Az emlős retina WF amakrin sejteinek tracer- és elektromos kapcsoltsága

a. A nyúlretina egy Neurobiotin injektált WF amakrin sejtje látható. Ez az amakrin sejt számos, radiálisan haladó, elágazást nem (vagy csak ritkán) mutató dendritet tartalmaz. Jól láthatóak a tracer-kapcsolt amakrin sejtek szómái is, amelyekbe a tracer a homológ réskapcsolatokon keresztül jutott be. **b.** A regisztrátumok (bal oszlop) a WF amakrin sejt fényválaszait mutatják, melyeket egy 0,3 mm széles 6 mm hosszú fénycsík stimulus segítségével váltottunk ki. A fénycsík pozícióját a sejttesttől kiindulva (0 μm) lépésenként a sejtől disztális irányba elmozdítottuk, mellyel feltérképeztük a sejt receptív mezejét. A fénycsík és a sejttestek közötti távolságot a bal oldalon lévő számok jelölik. **c.** A regisztrátumok alapján meghatároztuk az ON és OFF fényválasz komponensek amplitúdóit és ezek normalizált értékeit ábrázoltuk a diagrammon. Az így kapott área-szummációs görbék steady-state értékeiből lehet következtetni arra, hogy mind az ON-, mind az OFF receptív mező nagy, 1-2 mm közé eső érték. Aránymérték: a ábra 100 μm .

A tracer-kapcsolt sejtestek által alkotott, ún. kapcsolt mező mérete több 100 μm átmérőjű volt és alkalmanként elérte, de nem haladta meg a jelölt sejt dendritfájának átmérőjét. Ez utóbbi megfigyelés arra utalt, hogy a szomszédos WF sejtek közötti elektromos szinapszisok nem a dendritok végén, hanem főleg a proximális dendritikus területeken helyezkedtek el. A WF sejtek ON és OFF polaritású fényválaszokat is produkáltak. Az ON és OFF fényválaszok egymástól függetlenek voltak, ugyanis az ON receptív mező átmérője akár 2 mm is lehetett, míg az OFF mezőé ennek tipikusan 75%-át érte csak el. Mind az ON- mind az OFF receptív mezőre érvényes volt a környéki gátló bemenetek hiánya, amelyre az área-szummációs analízis alapján következtettünk (11. ábra b kép). Área-szummáció esetén az egyre nagyobb átmérőjű fénystimulus foltok egyre nagyobb amplitúdójú fényválaszokat eredményeznek. Az amplitúdók akkor kezdenének csak ismét csökkenni, ha a fénystimulus további növelésével a környéki gátló mechanizmusok is aktiválódnának. Mivel az área-szummációs görbék nem mutatták jelét amplitúdó csökkenésnek (a görbék folyamatos platóval rendelkeztek), ezért valószínű, hogy a WF sejtek nem rendelkeznek környéki gátló receptív mezővel. Megfigyeltük továbbá, hogy a nagy ON polaritású receptív mező töredékére csökkent a feszültségfüggő Na^+ csatornák intracelluláris blokkolását követően (QX-314), bizonyítva annak függését az aktívan terjedő akciós potenciáloktól. Véleményünk szerint ugyancsak hozzájárulhatott a receptív mező megnöveléséhez a WF sejtek egymás között létrehozott elektromos szinaptikus kommunikációja is. Ez utóbbi feltételezést bizonyította a WF sejtek intenzív kapcsoltságából adódó és a dendritfa átmérőjénél jóval nagyobb ON polaritású receptív mező léte (11. ábra a kép). Mivel a receptív mező a QX-314 farmakológia során a töredékére csökkent, ezért valószínűsíthető ebből az is, hogy a WF elektromos szinapszisok nemcsak a lassú potenciálok, hanem a Na^+ -függő akciós potenciálok számára is átjárhatóak. A WF amakrin sejteket összekapcsoló homológ elektromos szinapszisok funkciójáról egyelőre csak annyi tudott, hogy a sejtek receptív mezőit megnövelik, az egyéb látásban betöltött funkciójukat egyelőre homály fedi.

Egy másik amakrin sejt csoportot alkotnak az ún. poliaxonális (PA) sejtek. Ellentétben a legtöbb amakrin sejttel a PA sejtek dendritekkel és axonokkal is rendelkeznek (Völgyi és mtsai 2001). A dendritek jól körülhatárolható, relatíve kis (< 200 μm átmérő) dendritmezőt hoznak létre, míg az axonok vékonyak, hosszúak (akár a retina átellenes pólusára is elérnek), és ritkán ágaznak el. A PA sejtek receptív mezői relatíve kicsik, így valószínű, hogy bemeneteket csak a dendritek felől kapnak. Az

axonok feltehetően valódi axonok, és csak kimenetekként szolgálnak. Ezt támasztja alá egy immuncitokémiai megfigyelésünk is, mely alapján a PA sejtek axonjai magasan foszforilált neurofilament-H citoszeletális elemeket tartalmaznak, melyek csak a funkcionális axonokra jellemzőek (Völgyi és Bloomfield 2002). A legtöbb PA sejt intenzív tracer kapcsolságot mutat a Neurobiotin injekciókat követően, ugyanakkor a kapcsolt amakrin sejtek főleg az injektált sejt körül találhatók, ami valószínűsíti az elektromos szinapszisok dendritikus (nem axonális) elhelyezkedését (12. ábra a és b képek).



12. ábra. Az emlős retina PA amakrin sejtjeinek tracer kapcsolsága és annak funkciója

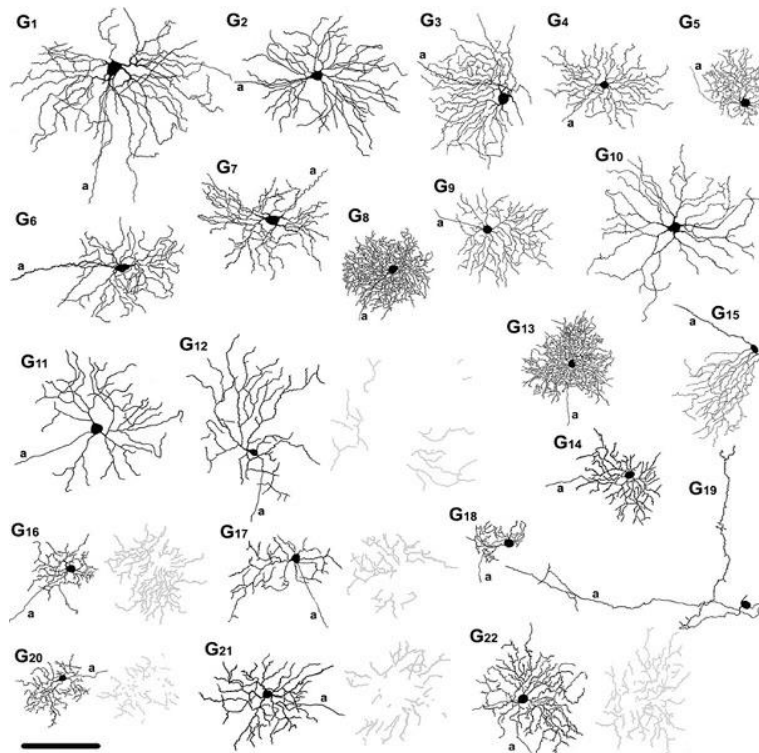
a-b. A nyúlretina három Neurobiotin injektált PA amakrin sejtje látható. A PA sejtek számos rövid dendritikus (input) és hosszú, vékony axonális (output) nyúlvánnyal rendelkeznek. A tracer-kapcsolt amakrin sejtek sejttestjei is, láthatóak, melyekbe a tracer réskapcsolatokon keresztül szivárgott át. **c.** A regisztrátumok az egyik PA amakrin sejt fényválaszait mutatják, melyeket egy 0,3 mm széles 6 mm hosszú fénycsík stimulussal váltottunk ki. A fénycsík pozícióját a sejttesttől kiindulva ($0 \mu\text{m}$) lépésenként disztális irányba elmozdítottuk, mellyel feltérképeztük a sejt receptív mezejét. A fénycsík szómától mért távolságát a bal oldali számok jelölik. **d.** A regisztrátumok alapján meghatároztuk az ON és OFF fényválasz komponensek amplitúdóit, és ezek normalizált értékeit ábrázoltuk a diagrammon. Az így kapott área-szummációs görbék steady-state értékeiből lehet következtetni arra, hogy mind az ON-, mind az OFF receptív mező $606\text{--}700 \mu\text{m}$ közé eső érték, mely a dendritfák méretével összevethető. Aránymérték: $100 \mu\text{m}$ (a), $50 \mu\text{m}$ (b) μm .

A PA sejtek típustól függően ON vagy ON-OFF polaritású fényválaszokat mutattak. A receptív mezők átmérői néhány 100 μm nagyságúak, ami nagyságrendileg megfelel a dendritfák méretének. Ez újabb bizonyítéka volt annak, hogy a PA sejtek bemeneteik zömét a dendriteken kapják, kimeneteik feltehetően pedig az axonokon jutnak el más retinális sejtekhez. A dendritfával összemérhető receptív mező környéki gátlással is rendelkezett, melyet az área-szummációs görbék nagy átmérőjű stimulusok hatására történő amplitúdó csökkenése bizonyított (12. ábra d kép). A Neurobiotin injektált PA sejtek többsége intenzív kapcsoltságot mutatott szomszédos amakrin sejtekkel (feltehetően szintén PA sejtek). Egyes PA sejtekről ismert, hogy funkciójuk a gyors szemmozgások alatti dúcsejtszignál blokkolása (Roska és Werblin 2003), az objektum-háttérmozgás elkülönítése (Oliveczky és mtsai 2003), ill. a képi folytonosság (Roy és mtsai 2017) kódolásában jut szerep. Ugyanakkor nem tisztázott, hogy ezekben a jól körülírható látási funkciókban a PA sejtek homolog elektromos szinapszisainak milyen szerep jut.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: A fenti kísérletekben leírtuk mind a WF és PA sejtek elektromos szinapszisait és az általuk létrehozott kapcsolt amakrin sejt hálózatokat. Megfigyeltük, hogy a homolog amakrin sejtek közötti réskapcsolatok a sejtek receptív mezőit növelik meg, de ezek látásban betöltött szerepe továbbra sem tisztázott.

Az egérretina dúcsejtjeinek kategorizálása és tracer-kapcsoltsága

Ezekben a kísérletekben 210 egérretina dúcsejtet injektáltunk Neurobiotinnal, melyhez összesen 71 WT állat retináját használtuk fel. Az injektált sejtek alaktani csoportosításához a következő anatómiai jegyeket vettük figyelembe: (i) a sejtest alakja; (ii) a sejtest mérete; (iii) a dendritfa átmérője; (iv) a dendritek alaktana beleértve a dendritikus specializációk (dendrit túske, megvastagodás stb.) meglétét, vagy hiányát; (v) dendritek ellágazódási mintázata és; (vi) a dendritfa IPL-ben történő ellágazódásának szintje. Ezek a feltételek alapján sikerült 22 alaktani dúcsejt populációt elkülöníteni (13. ábra; Völgyi és mtsai 2009).



13. ábra. Az egérretina dúcsejtjeinek morfológiai típusai

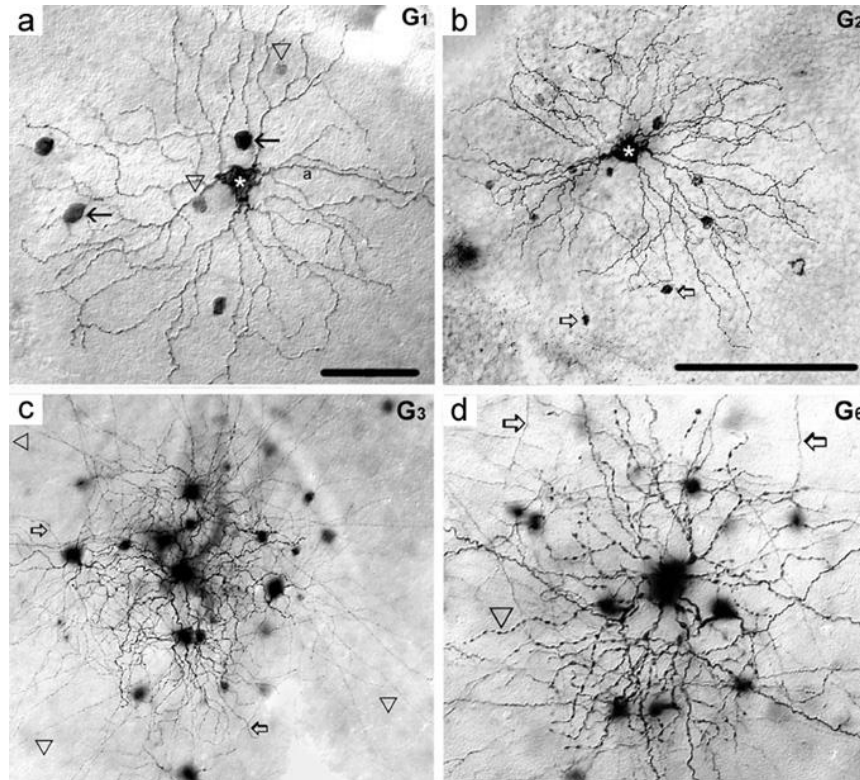
Az ábra a Völgyi és mtsai 2009 közleményéből származik, melyben az egyes sejtípusok a G1 – G22 elnevezéseket kapták. Aránymérték: 100 μ m.

Ezek a dúcsejt populációk jól összeegyeztethetők voltak korábbi leírásokban található egér dúcsejt-típusokkal (Sun és mtsai 2002; Badea és Nathans 2004; Kong és mtsai 2005; Coombs és mtsai 2006). A Sun és munkatársai által leírt 17 egér dúcsejt a saját rendszerünkben a G1 – G17 elnevezéseket kapta. Ezek között vannak a korábbi leírások alapján jól azonosítható G1 (giant), G2 (ON alfa) és G3 (OFF alfa) dúcsejtek is (lásd később a 14. ábrán). Ezeken a sejtípusokon kívül találtunk olyanokat is (G18, G19, G20, G21 és G22), melyek egyik korábbi dúcsejt morfológiai leírásnak sem feleltek meg (ezen dúcsejtek részletes leírása a Völgyi és mtsai 2009 munkájában találhatóak). A fenti dúcsejt populációk többsége a környezetről képi információt szállít az agyi látóközpontok felé, ugyanakkor néhány dúcsejt posztszinaptikus partnerei látási járulékos központokban találhatóak. A dúcsejtek és szinaptikus partnereik kapcsolatainak létrehozásában elengedhetetlenek a sejtadhéziós cadherin fehérjék egyes típusai. Egy kollaborációban végzett munkánkban bizonyítottuk a cadherin 3 és 6 elengedhetetlen szerepét abban, hogy egyes dúcsejt típusok cadherin specifikus módon megtalálják posztszinaptikus partnereiket olyan retinorecipiens agyi

struktúrákban, mint a corpus geniculatum laterale és a praetectum (Osterhout és mtsai 2011).

A sejttípusok alaktani azonosítási eredményeit az alábbiakban röviden összefoglaljuk.

G1 dúcsejtek (n=8). Nagy (21 μm átmérő), "szögletes" nagy sejttesttel, és az egérretinában található legnagyobb dúcsejt dendritfával (245 μm átmérő) rendelkeznek (13. ábra). A három-öt rövid elsődleges dendrit többször (maximum 5) elágazik és az IPL 78% -os magasságában (ON alréteg) végződéseket alkot. Sajátos, hogy még a végelágazások is viszonylag közel találhatóak a sejttesthez, ami hosszú vég-(terminális) dendritek meglétét eredményezi. A G1 sejtek csak heterológ kapcsoltságot mutatnak szomszédos amakrin sejtekkel (14. ábra).



14. ábra. Az egérretina dúcsejtjeinek tracer-kapcsoltsága

A G1 (a), G2 (b), G3 (c) és G6 (d) retinális dúcsejtek tracer-kapcsoltsága látható. A csillagok a Neurobiotinnal injektált sejttesteket, a fekete nyilak a tracer-kapcsolt dúcsejteket, a üres nyilak és nyílhegyek a tracer-kapcsolt amakrin sejteket mutatják. Aránymérték: 100 μm .

A tracer-kapcsolt amakrin sejtek között nagyobbak (maximum 17 db egy injektált G1 sejtnél; 12 μm sejttest átmérő) és kisebbek (maximum 21 db; 8 μm sejttest átmérő) is vannak. A kapcsolt amakrin sejtek sejttestjei kivétel nélkül a GCL-ben találhatóak (displaced-ek). Esetenként a nagyobb kapcsolt amakrin sejt dendritfájának alaktana jól tanulmányozható. Ezek mindegyikének vastagabb dendritikus és vékony axonális nyúlványai is vannak, tehát ezek a PA sejtek egyik csoportjának képviselői (Famiglietti 1992a; b; Stafford és Dacey 1997; Völgyi és mtsai 2001). A tracer-kapcsolt PA sejtek a dendritjei az IPL 72% magasságában az axonok 69%-os magasságban ágaznak el. A PA sejtek a bemeneteiket a rövid nyúlványaik segítségével gyűjtik össze, ennek megfelelően a PA sejtek receptív mezeje viszonylag kicsi (Völgyi és mtsai 2001), ugyanakkor a hosszú axonszerű nyúlványok kimenetekként szolgálnak. Immuncitokémiai módszerekkel korábban kimutattuk, hogy a PA sejtek (így a G1 kapcsolt PA sejtek is) hosszú nyúlványai magas szinten foszforilált neurofilament H-t (NF-H) tartalmaznak, amely csak a neuronális axonokra jellemző (Völgyi és Bloomfield 2002). Ez a vizsgálat a korábbi morfológiai bizonyítékok mellett egy neurokémiai bizonyítékát szolgáltatja annak, hogy a PA sejtek hosszú nyúlványai valódi axonok és főleg az információ továbbadásában fontosak.

G2 dúcsejtek (n=19). Morfológiai jegyeik alapján a különböző emlősfajok retinájában leírt ON alfa sejtekhez hasonlatosak (Boycott és Wässle 1974; Peichl és mtsai 1987; Schubert és mtsai 2005a; Völgyi és mtsai 2005, 2009). Ezek a morfológiai jegyek a következők: nagy (~18 μm átmérő), kerek sejttest és vastag, sima felszínű primer dendritek, melyek karakterisztikusan hegyes szögben ágaznak el úgy, hogy az egyes dendritek szinte sosem fedik át egymást (13. és 14. ábrák). A G2 sejtek viszonylag szimmetrikus és nagy (~200 μm átmérő) dendritfával rendelkeznek, melyek az IPL 73 % -ánál (ON alréteg) ágaznak el. A G2 dúcsejtek tracer-kapcsoltak szomszédos displaced amakrin sejtekkel (maximum 14 db; 14. ábra). Ezek utóbbiak egy kis sejttestű (~7 μm átmérő) és egy nagy sejttestű (~10 μm átmérő) amakrin sejt populációba sorolhatóak, melyek nyúlványrendszerük alapján a PA sejtek közé tartoznak.

G3 dúc sejtek (n=58). Szóma/dendrit morfológiája az emlős retina különböző fajaiban korábban leírt OFF alfa sejtekéhez hasonlatos (Boycott és Wässle 1974; Peichl és mtsai 1987; Schubert és mtsai 2005a; Völgyi és mtsai 2005; 2009). Ezek a tulajdonságok a következők: (i) viszonylag nagy (~18 μm átmérő) és ovális sejttest; (ii) vastag és általában sima primer dendritek (magasabbrendű dendritágak varikózusak

voltak); (iii) a dendritek az OFF alrétegben az IPL 33% -os mélységében (OFF alréteg) ágaztak el; (iv) dendritfa az elágazások relatíve nagy száma miatt sűrű és nagy (~185 μm átmérő; 13. és 14. ábrák). A G3 dúcsejtek homológ dúc-dúc tracer-kapcsoltságot mutatnak szomszédos G3 dúcsejtekkel (14. ábra) és heterológ kapcsoltságot könyékbéli amakrin sejtek két (kis és nagy sejttestű) típusával, melyek sejttestjei az INL-ben helyezkednek el. A kapcsolt amakrin sejtek dendritmorfológiájuk alapján széles dendritmezejű csoportba tartoztak.

G4 dúcsejtek (n=5). Kis (~13 μm átmérő) sejttesttel és „zegzugosan”, de sugárirányban haladó dendritekkel jellemezhetők (13. ábra). A dendritek maximálisan hatszor ágaztak el és relatíve kis (143 μm átmérő) dendritfát hoztak létre. A dendritfa karakterisztikus jegye, hogy egyes terminális dendritek kétszer-háromszor hosszabbak voltak, mint társaik, és messzire kinyúltak a dendritfa területéről. Ugyanakkor mind a rövid, mind a hosszú terminális dendritágak az IPL közepén, ugyanazon a ~46%-os mélységében ágaztak el. A G4 dúc sejtek heterológ tracer-kapcsoltságot mutattak (maximum 30) környező kis (~7 μm átmérő) sejttestű amakrin sejttel, melyek sejttestjei kizárólag az INL-ben helyezkedtek el (a G4 dúcsejtre és minden más dúcsejtre vonatkozóan részletes fotókkal illusztrált leírás található a Völgyi és mtsai 2009 munkájában).

G5 dúcsejtek (n=12). Kis (~11 μm átmérő) sejttesttel és kicsi (~105 μm), de rendkívül sűrű dendritfával rendelkeztek. A dendritek különösen kanyargós lefutásúak és felszínükön számos megvastagodás és apró tüskeszerű elágazódás látható. A nagyszámú elágazódást mutató dendritfa az IPL közepén (50 % mélység) ágazott el (13. ábra). A G5 dúcsejtek nem voltak tracer-kapcsoltak.

G6 dúcsejtek (n=19). Alapvető morfológiai jegyeik alapján a patkány belső rostelágazású delta sejtteivel azonosíthatók (13. ábra; Peichl 1989). A megfigyelt morfológiai jegyek közül a legfontosabbak: (i) kerek vagy elliptikus sejttest (~19 μm átlagos átmérő) (13. ábra); (ii) sugárirányban futó dendritek, melyek hegyes szögben ágaztak el; (iii) a magasabbrendű dendritágak sok megvastagodást és néha átfedést mutattak. A dendritek viszonylag keskeny rétegben az IPL 70% -os mélységében ágaztak el és közepes méretű (~190 μm átmérő) dendritfát alkottak. A G6 dúcsejtek heterológ tracer-kapcsoltságot mutattak displaced amakrin sejtekkel, melyek dendritikus és axonális rostokkal egyaránt rendelkeztek, tehát PA sejtek voltak (14. ábra).

G7 dúcsejtek (n=11). Alaktani ismérveik alapján a patkányretinában leírt külső delta sejtekkel mutattak rokonságot (Peichl 1989), melyek közé a következő tulajdonságok tartoztak: kerek sejttest (~19 μm átmérő), 3-5 vastag elsődleges dendrit, a dendritek 3-4-szeres elágazódása és az IPL 30%-os mélységében történő elágazódása (13. ábra). A dendritek általában sugárirányban futottak, de gyakran kanyarogtak ide-oda mind horizontálisan, mind IPL alrétegek határait is átlépve vertikálisan is (ez utóbbi tulajdonság azonban nem befolyásolta a végelágazódások fent leírt sztratifikációját). A magasabbrendű dendriteken megvastagodások és relatíve hosszú terminális dendritek voltak jellemzőek. A dendritfa jellemzően nagy (~196 μm in átmérő). A G7 dúcsejtek homológ tracer-kapcsoltságot mutattak szomszédos G7 sejtekkel, valamint heterológ kapcsoltságot széles dendritmezejű amakrin sejtek két populációjával. Ez utóbbiak dendritjei ritkán voltak azonosíthatóak, a kevés jelölt nyúlvány alapján valószínűleg ezek is a WF amakrin sejtek közé tartoztak.

G8 dúcsejtek (n=8). Közepes méretű (~15 μm átmérő), kerek sejttesttel és 6-9 viszonylag vékony primer dendritekkel rendelkeztek, melyek gazdag elágazást mutattak. A dendritek lefutása szabálytalan, ezek mind rétegen belül, mind rétegek között zezugosan haladtak és számos elágazódást adtak (13. ábra). Közöttük sok apró oldalelágazódás, dendrittüske és dendritmegvastagodás is volt, melyek miatt a közepes méretű dendritfa (~165 μm átmérő) komplex hatást keltett. A dendritek viszonylag diffúzan az IPL 45-68% magasságában ágaztak el. A G8 dúcsejtek csak heterológ tracer-kapcsolatot mutattak kis (5 μm átmérő) és nagy (~10 μm átmérő) sejttestű displaced és konvencionális helyzetű amakrin sejtekkel. Az amakrin sejtek néha nyúlványrendszerükkel együtt vizsgálhatóak voltak, ezekben az esetekben mindig a WF szerkezetet mutatták.

G9 dúcsejtek (n=8). Közepes méretű (~14 μm átmérő) sejttesttel, 3-5 relatíve vastag primer dendritekkel rendelkeztek (13. ábra). A dendritek többszörösen, jellemzően közel derékszöget bezárva ágaztak el, egyébiránt egyenes lefutásúak és felszínükön megvastagodások láthatók. A terminális dendritek az IPL középvonalához közel, 62% mélységben végződtek. A dendritágak jellemzően nem mutattak semmiféle kereszteződést, vagy átfedést, és közepes méretű (~166 μm átmérőjű) dendritfát alkottak. A G9 dúcsejtek nem mutattak tracer-kapcsoltságot.

G10 dúcsejtek (n=8). A G10 dúcsejtek viszonylag nagy (~18 μm átmérő) sejttesttel és 5-6 karcsúbb primer dendrittel rendelkeztek. A primer dendritek többsége hosszan (akár 25 μm hosszan) futott az IPL-ben mielőtt az első, jellemzően villás

elágazást adta volna (13. ábra). A kevés villás elágazódás miatt a G10 sejtek ritkás dendritfával rendelkeztek, a dendritek maximum negyedrendű elágazást mutattak. Az elágazások néha derékszögűek, és a dendritek csak ritkán keresztezték egymást. Míg az elsődleges-másodlagos dendritek egyenesek, a terminális dendritek gyakran hullámosak, visszakanyarodóak voltak. Többségük az IPL 71% -os mélységében (ON alréteg) végződtek, de néhányuk már a sejtesthez közelebb 84-92% -os mélységben ágazódtak el. A dendritfa egyike volt a mintánkban található legnagyobbaknak (247 μm átlagos átmérő). A G10 dúcsejtek heterológ kapcsolttságot mutattak displaced amakrin sejtek (maximum 20 db) egy csoportjával. A kapcsolt amakrin sejteket kis sejtestű (~7-12 μm a kisebb és a nagyobb átmérő mentén) PA sejtekként azonosítottuk.

G11 dúcsejtek (n=12). Viszonylag nagy (~17 μm átmérő) sejtesttel és dendritfával (~183 μm átmérő) rendelkeztek. A dendritfa sok hasonlatosságot mutatott a G10 sejtekéhez, úgymint a 3-5 keskeny primer dendrit, melyek hegyes szöget bezárva ágaztak el, valamint a visszakanyarodó terminális dendritek jelenléte (13. ábra). Ugyanakkor a G10 sejtekkel ellentétben a G11 sejtek dendritjei hullámos lefutásúak és az IPL 31% -nál az OFF alrétegben végződtek. Érdekes, hogy némi variabilitást mutattak a tracer-kapcsolttság tekintetében, ugyanis legtöbbjük homológ módon kapcsolódott környező G11 sejtekhez (maximum 7 db). A G11 sejtek ugyancsak tracer-kapcsoltak voltak környező kis sejtestű (~6 μm átmérő) amakrin sejtekkel (három G11 sejt csak amakrin sejtekkel tartott kapcsolatot).

G12 dúcsejtek (n=3). Aránylag kisméretű (~14 μm átmérő) szómával és nagy (~200 μm átmérő) dendritfával rendelkeztek (13. ábra). A dendritfa hosszú, keskeny szabálytalanul futó rostokból állt, melyek ritkán ágaztak el és felületükön megvastagodásokat mutattak. A G12 sejtek dendritjei bisztratifikációt mutattak az IPL 33% és 67% -os mélységében és nem voltak tracer-kapcsoltak.

G13 dúcsejtek (n=9). Közepes méretű (~15 μm átmérő) sejtesttel és dendritfával (~160 μm átmérő) voltak jellemezhetőek (13. ábra). A G13 sejteknek 4-7 rövid elsődleges dendritjük volt, melyek gyakran ágaztak el közvetlenül az eredést követően. A dendritek többször egymás után elágaztak és megvastagodásokat, valamint tüskeszerű képleteket, oldalágacskákat képeztek. A nagyobb dendritek mind horizontális, mind vertikális irányban zezugosan haladtak az IPL-ben. A számos dendritikus elágazás a zezugos lefutással kombinálva egy különösen denz megjelenést kölcsönzött a G13 sejtek dendritfájának. A dendritfa terminális ágai diffúzan az IPL 39 - 65% -os mélységében végződtek. A G13 dúcsejtek homológ tracer-

kapcsoltságot mutattak szomszédos G13 sejtekkel (maximum 10 db) és heterológ kapcsoltságot környező kis (~6 μm átmérő) és nagy (~10 μm átmérő) méretű amakrin sejtekkel.

G14 dúcsejtek (n=3). Viszonylag kisméretű (~13 μm átmérő) sejttesttel és dendritfával (~135 μm átmérő) rendelkeztek (13. ábra). Jellemzően 5-7 vékony elsődleges dendritjük proximálisan elágazódásokat hozott létre és jelentős mértékű hullámos lefutást mutatott. A magasabbrendű dendritágak sok megvastagodást és tüskét tartalmaztak. A dendritfa az IPL 51%-os mélységében képezte a terminális végződéseket. A G14 sejtek nem voltak tracer-kapcsoltak.

G15 dúcsejtek (n=3). Viszonylag nagy sejttestűek (~18 μm átmérő) és közepes méretű dendritfával (~153 μm átmérő) rendelkeztek (13. ábra). Dendritjeik karakterisztikusan a sejttest egyik oldalán koncentráálódtak, 3-5 primer dendritje volt, melyek gyakran egy közös csomóból eredtek. A hullámos lefutású dendritek ritkán ágaztak csak el, a dendritvégzódások az IPL 25% -os mélységében (OFF alréteg) voltak megfigyelhetők. A G15 dúcsejtek csak heterológ kapcsoltságot mutattak környező közepes méretű (6-8 μm átmérő) amakrin sejtekkel.

G16 dúcsejtek (n=3). A sejteknek kicsi szómái (~14 μm átmérő) és dendritfái (~123 μm átmérő) voltak (13. ábra). A dendritfa bisztratifikációt (két IPL alrétegbeli elágazódást) mutatott az IPL 30% és 56%-os mélységében, a dendritek pedig nagyon vékonyak, göcsörtösek voltak és többszörösen (maximum 6) elágaztak. A terminális dendritek relatíve hosszúak és jellegzetesen kiálltak a dendritfa állományából. Az a-alrétegben (OFF) található dendritek hullámosabbak és több megvastagodást mutattak, mint amelyek a b-alrétegben (ON) helyezkedtek el. A G16 dúcsejtek tracer-kapcsoltságot mutattak 4-6 szomszédos dúcsejttel.

G17 dúcsejtek (n=16). Az előző típushoz hasonlóan a G17 dúcsejtek is bisztratifikáltak és közepes (~15 μm átmérő) sejttesttel és dendritfával (~160 μm átmérő) rendelkeztek (13. ábra). A G17 dúcsejtek 3-5 vastag primer dendritje gyakran haladt akár 10-15 μm -t, mielőtt elágazott. A magasabbrendű dendritek vékonyak és hullámosak, megvastagodásokat tartalmaztak, az IPL 32%-os és 68%-os mélységében ágaztak el. A G17 sejtek fent leírt morfológiai jegyei alapján az egyéb emlősfajok retinájában leírt ON-OFF irány szelektív (directional selective – DS) dúcsejtjeivel azonosíthatók (Vaney 1991; 1994; Xin és Bloomfield 1997). A G17 dúcsejtek tracer-kapcsoltak a közelükben található szomszédos hasonló típusú sejtekkel.

A fent leírt sejttípusokon kívül találtunk olyanokat is (G18, G19, G20, G21 és G22), melyek egyik dúcsejt morfológiai leírásnak sem feleltek meg. Mintáinkban ezek mindegyikének csak egyetlen képviselője volt a mintánkban, de valószínűleg mégis külön dúcsejt populációkról van szó. Ezek részletes leírásai és a leírásokhoz tartozó fényképes illusztrációk a Völgyi és mtsai (2009) munkánkban találhatók.

Az egér dúcsejtek tracer-kapcsoltsága. Munkánk nem csupán dúcsejt morfológiai leírásokat tartalmazott, hanem elsőként az egérretina összes dúcsejt típusának tracer-kapcsoltságát is részletesen leírta. Nyilvánvalóvá vált, hogy a különféle dúcsejt-típusok egymástól különböző, de típuson belül állandó kapcsoltsági mintázatot mutatnak (14. ábra). Ezért a tracer-kapcsoltság a többi morfológiai jegy mellett szintén felhasználható az egyes dúcsejt-típusok elkülönítésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a leírt 22 típus közül 16 homológ és/vagy heterológ kapcsoltságot mutatott dúc- és amakrin sejt szomszédokkal.

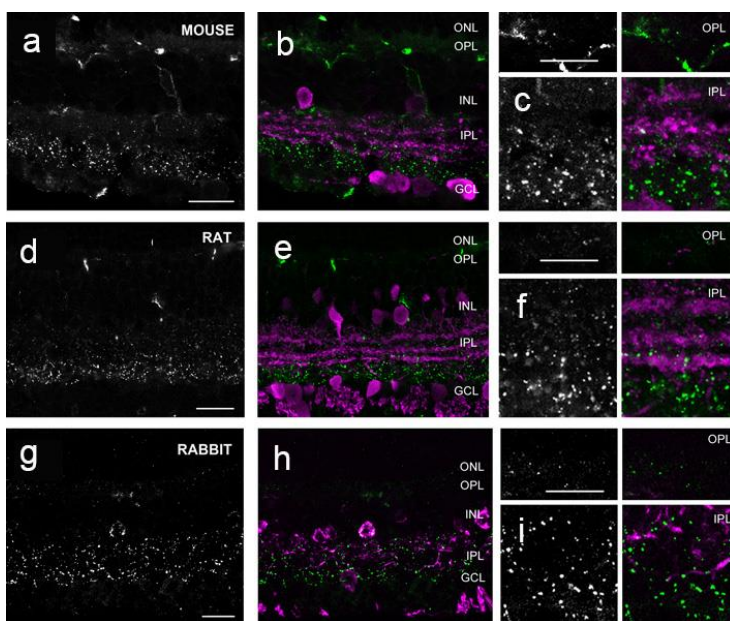
A kapcsoltsági mintázatok változatossága ellenére általános szabályszerűségeket is megfigyeltünk. ON dúcsejtek például mindig displaced amakrin sejtekkel tartottak kapcsoltságot, az OFF dúcsejtek viszont klasszikus elhelyezkedésű amakrin sejtekkel, melyek szómái az INL-ben voltak. Ugyancsak jellemző volt, hogy az ON dúcsejtek főként poliaxonális (PA), az OFF sejtek főleg széles dendritmezejű amakrin sejtekkel tartottak fent tracer-kapcsoltságot (amikor a jelölés erőssége alapján ez megítélhető volt). Végül az is nyilvánvaló, hogy homológ dúc-dúc sejt kapcsoltságot csak OFF és ON-OFF dúcsejtek mutattak. Ez utóbbiak többsége amakrin sejtekkel is kapcsolódott és csak a G16 és G17 sejtek voltak kizárólagosan homológ módon kapcsoltsak (azaz csak dúc-dúc sejt kapcsoltság volt megfigyelhető, dúc-amakrin sejt kapcsoltság nem). Az említett munkában leírt intenzív és általánosnak mondható dúcsejt kapcsoltság egyértelműen arra utal, hogy a sejtek által fenntartott elektromos szinapszisok a gerincesek látásában meghatározó szerephez jutnak. Korábbi fiziológiai mérések a dúcsejtek akciós potenciáljainak szinkronizációjára vonatkozóan három alapvető típust különböztettek meg (Arnett és Spraker 1981; Mastronarde 1983a; b; c; Brivanlou és mtsai 1998; DeVries 1999; Hu és Bloomfield 2003). A munkáinkban leírt számos tracer-kapcsoltsági mintázat tehát bőven szolgáltat lehetőséget a tapasztalt spike-szinkronizációs mintázatok létrehozásához.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: Bizonyítottuk, hogy az emlős retina legtöbb dúcsejtje részkapcsolatokat tart fent szomszéd dúc- és/vagy amakrin sejtekkel. A dúcsejt

részekapcsolatok gyakori előfordulása azt is jelenti, hogy a retinából induló párhuzamos információs pályák majd mindegyikének működésében elengedhetetlen a jelenlétük.

A Cx36 szerepe a retina dúcsejt részekapcsolatok felépítésében

Az egérretina dúcsejt részekapcsolatok Cx36 immunpozitivitása. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a Cx36 alegység a dúcsejt elektromos szinapszisok esetében is esszenciális-e. A patkány-, egér. és nyúlretinákon végzett Cx36 immunjelölés alapján egyöntetű, hogy számos Cx36 plakk található az IPL minden alrétegében (15. ábra).

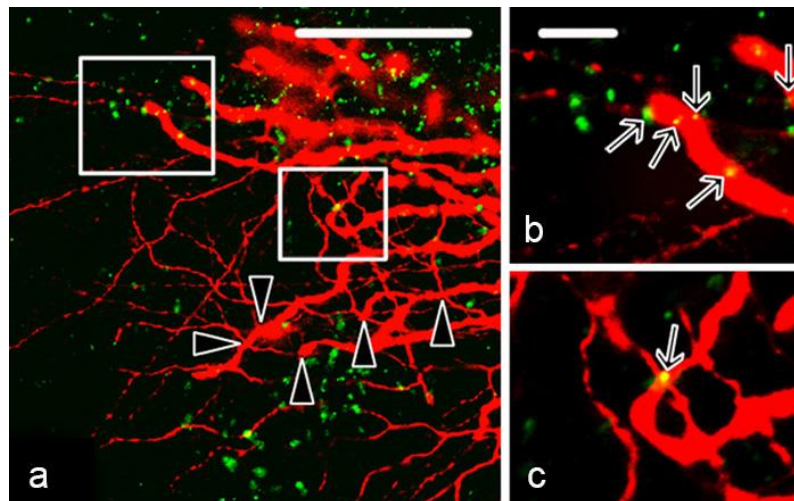


15. ábra. Cx36 immunpozitivitás az emlős retina (nyúl, egér, patkány) IPL-ben

a Az egérretina metszeten Cx36 plakkok láthatók az OPL és az IPL területén. **b.** Az IPL 2., 3. és 4 alrétegeit a calretinin (lila) jelölt amakrin rostok jelölik ki. **c.** A plakkok mind az OPL mind az IPL területén megtalálhatóak. **d, e és f.** A patkányretina keresztmetszet Cx36 jelölt plakkjai az egyes (**d**) és a kettes jelöléses képen megfigyelhetők. Az IPL 2., 3. és 4 alrétegeit a calretinin immunjelölt struktúrák jelölik ki (**e**). A plakkok mind az OPL mind az IPL területén megfigyelhetők (**f**). **g, h és i.** A nyúlretina metszet Cx36 immunjelölt plakkjai az egyes (**g**) és kettes jelöléses képen is megfigyelhetők. A calretinin a diffúz dendritú AII sejtek rostjait jelöli, így a calretinin az IPL alrétegeket nem, de az IPL-INL és IPL-GCL határokat egyértelműen kijelölik. A plakkok mind az OPL mind az IPL területén megfigyelhetők. (**i**). Aránymérték: 100 μ m.

A nagy kiterjedésű és sok Cx36 connexon félcsatornát tartalmazó AII-ON csap bipoláris és AII-AII részekapcsolatok (Fegien span és mtsai 2001; Mills és mtsai 2001;

Deans és mtsai 2002; Bloomfield és Völgyi 2004; Völgyi és mtsai 2004; Kovács-Öller és mtsai 2017) mellett számos kisebb plakkot is megfigyeltünk az IPL egész területén. Valószínűsítettük, hogy a Cx36 alegység az előbb felsorolt (pálcika rendszerhez tartozó) réskapcsolatokon kívül fontos más idegsejt kapcsolatokban, köztük a dúcsejt réskapcsolatok esetében is. Ennek vizsgálatára a fentiekben leírt dúcsejt Neurobiotin töltést követően Cx36 immunjelölést végeztünk. A kísérletekben gyakran megfigyeltük a Cx36 plakkok és a Neurobiotin injektált dúcsejt dendritek kolokalizációját, ami valószínűsítette a Cx36 szerepét a dúcsejt réskapcsolatok felépítésében. Ugyanakkor a Cx36 immunjel gyakorisága miatt a Neurobiotin/Cx36 jelölési egybeesések lehettek véletlenszerűek is. Ennek kizárása érdekében csak olyan preparátumokat vizsgáltunk, ahol mind az injektált dúcsejt, mind a tracer-kapcsolt amakrin- és/vagy dúcsejt nyúlványai jól megfigyelhetők voltak. Ilyenkor az injektált és a tracer-kapcsolt sejtnyúlványok kereszteződéseit vizsgáltuk. Mivel számos esetben megfigyeltünk Cx36 plakkot dendritkereszteződésben, ezért valószínűsítettük, hogy a Cx36 a dúcsejt elektromos szinaptikus kapcsolatokban aktív résztvevő (16. ábra).

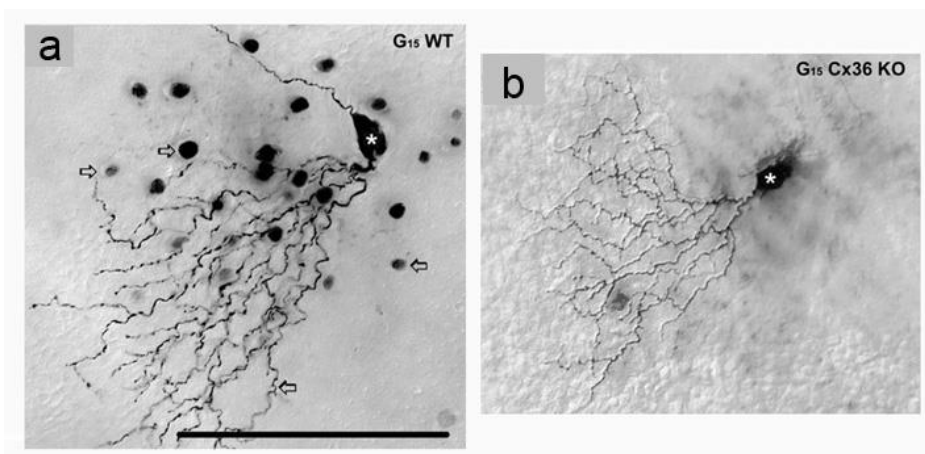


16. ábra. A dúcsejt réskapcsolatokat Cx36 alegységekből álló csatornák alkotják

a. A Cx36 IR plakkok (zöld), Neurobiotin injektált egér dúcsejt (piros) rostok és Neurobiotin pozitív tracer-kapcsolt amakrin és dúcsejt dendritikus rostok láthatóak.
b és c. A Cx36 pozitív plakkok gyakran figyelhetők meg dúc-amakrin sejt dendrit kereszteződésekben (ld. kinagyított ábrák, nyilak), ugyanakkor hiányoznak a dúcsejt-dúcsejt rostkereszteződésekben (nyílhegyek). Aránymérték: a 50 μ m, b és c 5 μ m.

Ahhoz, hogy ennek mértéke nyilvánvalóvá váljon, dúcsejt Neurobiotin injekciókat hajtottunk végre a Cx36 konstitutív KO egerek retináin. Az injektált sejtek tracer-kapcsoltsági mintázatait ezt követően összehasonlítottuk az előző fejezetben bemutatott WT dúcsejtek mintázataival.

A különböző dúcsejt típusok tracer-kapcsoltsága a Cx36 KO egér retinában. A KO retinában 15 különböző dúcsejt-típust különítettünk el, melyeket sikerült a vad típusú egerek vizsgálatakor meghatározott G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G9, G10, G11, G12, G15, G17, G20 és G22 morfológiai kategóriákba sorolni (17. ábra).



17. ábra. A dúcsejt-amakrin sejt részkapcsolatokat Cx36 alegységek építik fel

a és b. Neurobiotin injektált G15 dúcsejt a WT retinában **(a)** tracer-kapcsoltságot mutat szomszédos amakrin sejtekkel, míg a Cx36 KO G15 dúcsejt **(b)** nem kapcsolt. Aránymérték: 100 μ m.

Az egyes dúcsejt-típusok képviselői minden morfológiai paraméter tekintetében hasonlóak voltak a WT és a Cx36 KO retinában (csak inszignifikáns eltéréseket találtunk). Ez arra enged következtetni, hogy a Cx36-nak elenyésző szerepe van (vagy nincs szerepe) az egyes dúcsejtek fejlődésében. A két vad típusú és a KO egértörzs dúcsejt tracer-kapcsoltságának összehasonlítása során tett megfigyeléseket az alábbiakban röviden összegezzük, a részletes leírások pedig a Völgyi és mtsai 2009 és a Pan és mtsai 2010 közleményeiben elérhetők:

(1) *Nem kapcsolt sejtek.* Azok a dúcsejtek, amelyek nem tracer-kapcsoltak a WT egér retinájában (G5, G9, G12 és G22), a Cx36 KO egér esetében is kapcsolat nélküliek. Emiatt ezeket a sejteket a továbbiakban nem részletezzük.

(2) A *G1 sejtek* (n=17) tracer-kapcsoltsága a Cx36 KO ideghártyában teljesen változatlan volt; a WT és a KO állatban is tracer-kapcsolt volt amakrin sejtek két (kis és nagy sejttestű) populációjával. Ez arra utal, hogy Cx36 számottevően nem vesz részt a G1 dúcsejt szomszédos amakrin sejtekkel alkotott elektromos szinapszisainak kialakításában. A későbbiekben de Sevilla-Müller és mtsai (2010) bizonyították, hogy a G1 sejtek elektromos szinapszisait a Cx30.2 fehérje építi fel.

(3) A *G2 sejtek* (n=7) a Cx36 KO retinában egyetlen kis (6-9 μm átmérő) számával rendelkező amakrin sejt populációval szemben mutatott tracer-kapcsoltságot. Ugyanakkor a WT G2 dúcsejtek esetében kis és nagy sejttesttel bíró amakrin sejteket is leírtunk, melyek egyértelműen két különálló populáció képviselői voltak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a G2 dúcsejtekkel tracer-kapcsoltságot mutató amakrin sejt-populációk (típusok) egyike Cx36 függő, a másik Cx36 független részkapcsolaton keresztül kapcsolódik a G2 sejthez. Az utóbbi kis sejttestű amakrin sejt populáció esetében mind a mai napig tisztázatlan, hogy a létesített elektromos szinapszisokat mely Cx alegységek építik fel.

(4) A *G3 dúcsejtek* (n=23) a Cx36 KO retinában csak homológ dúc-dúc sejt tracer-kapcsoltságot mutatott, míg a WT retinában ugyanezek a sejtek dúc-dúc és dúc-amakrin sejt kapcsolatok keverékével rendelkeztek. Ez arra utal, hogy a G3 sejtek dúc-amakrin részkapcsolatai Cx36 függőek, míg a dúc-dúc kapcsolatok Cx36 függetlenek. A G3 sejtek dúc-dúc sejt kapcsolatában részt vevő Cx típusa egyelőre nem tisztázott, de azok biztosan nem Cx36 (Pan és mtsai 2010), Cx45 (Schubert és mtsai 2005b) és Cx30.2 (Müller és mtsai 2010) alegységek építik fel.

(5) A *G4* (n=3), a *G6* (n=9) és a *G10* (n=16), a *G15* (n=3; 17. ábra) és a *G20 dúcsejtek* (n=4) a Cx36 KO egerek retináiban a tracer-kapcsoltság teljes hiányát mutatták. Ez nagymértékű változást jelent ugyanezen dúcsejtek WT egérben talált képviselőinek tracer-kapcsoltsági mintázatától, ahol is ezek mindegyike amakrin sejtek, egy vagy több populációjával tartott fent elektromos szinaptikus kapcsolatot. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a G4, a G6, a G10, a G15 és a G20 dúcsejt-típusok dúc-amakrin gap junction kapcsolatai Cx36 függőek voltak (5. ábra; Pan és mtsai 2010).

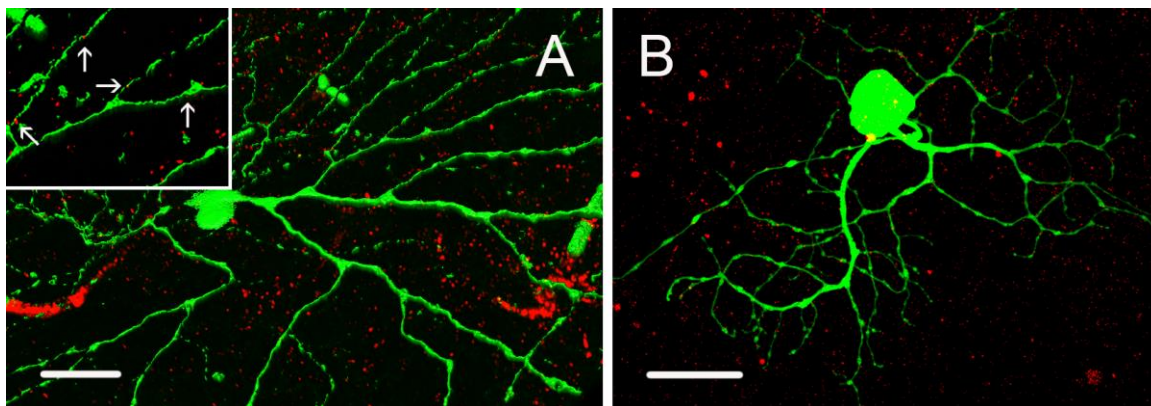
(6) A *G7* (n=11) és a *G11 dúcsejtek* (n=20) a Cx36 KO egér retinájában teljes mértékben elvesztették a homológ dúc-dúc sejt és a heterológ dúc-amakrin sejt tracer-kapcsoltságot, melyek a WT G7 és G11 sejtek esetén jellemzőek voltak. Ez a

megfigyelés arra utal, hogy ezeknek a sejteknek a homológ és heterológ részkapcsolatai is Cx36 függőek.

(7) *G17 dúcsejtek* (n=4) homológ dúc-dúc tracer-kapcsoltságot mutattak a Cx36 KO egérretinában, ami teljes mértékben hasonlatos volt ahhoz, amit a WT G17 sejtek esetében megfigyeltünk. Ebből arra következtetünk, hogy a G17 sejtek dúc-dúc kapcsolatai Cx36 függetlenek, más Cx alegység építi fel őket. Ez a megfigyelés egybevág Schubert és mtsai (2005b) leírásával, mely alapján a G17 sejtek homológ részkapcsolatai Cx45 függőek.

A fenti megfigyelések a következő pontokban foglalható össze: (i) a WT retina kapcsoltságot nem mutató dúcsejtjei a Cx36 KO egérnél is kapcsolat nélküliek; (ii) a WT állatok retináján megfigyelt dúc-dúc tracer-kapcsoltság a Cx36 KO állatok esetén nagyrészt változatlan volt, tehát a Cx36 nem kritikus építőeleme a homológ dúc-dúc részkapcsolatoknak; (iii) a dúc-amakrin tracer-kapcsoltság egyedül a G1 sejt esetében maradt változatlan a Cx36 KO retinában, míg a többi típusnál vagy lecsökkent (G2 sejt), vagy teljesen eltűnt. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a dúc-amakrin részkapcsolatok jó része teljes mértékben vagy döntően Cx36 fehérjeegységekből épül fel.

A dúcsejtek által alkotott elektromos szinapszisok molekuláris összetételével és a szinapszisok dúcsejt dendritfán történő eloszlásával foglalkozó kísérleteink mind a mai napig folynak. Ezirányú morfológiai kutatásaink a dúcsejt részkapcsolatok eloszlását vizsgálják az egyes sejtípusok dendritfáin. A kapott eloszlási mintázatokat (GJ térképek) a későbbiekben fiziológiai eredményeinkkel vetjük majd össze ahhoz, hogy azok működésükre vonatkozóan következtetéseket vonhassunk le. Ennek a munkának két fő irányvonala van. Az egyik kísérletsorozatban transzgénikus (knock-in) egérvonalakat használunk fel ahhoz, hogy genetikai markerrel jelölt (GFP, RFP, tdTomato stb.) dúcsejt-populációk képviselőit célzottan vizsgálhassuk. Az egyik ilyen egértörzs, melyen folyamatosan kísérleteket végzünk a parvalbumin-GFP (PV-GFP) egér, melyek retináiban a PV termelő dúcsejtek (6 sejtípus) dendritfáin található immuncitokémiaileg jelölt Cx36 plakkokat térképezzük fel. A legerősebb GFP jelet az OFF alpha sejtek (a fenti karakterizáció szerint G3) mutatják, így azok relatíve szelektíven tanulmányozhatók (18. ábra).



18. ábra. A Cx36 plakkok eloszlása az egér és a humán retina dúcsejtjeinek dendritfáján

Cx36 plakkok eloszlása a PV-GFP egérretina alpha dúcsejtjeinek dendritjein (A), valamint a Lucifer Yellow (LY) jelölt human dúcsejtek dendritjein (B). A plakkok száma és elhelyezkedése mindkét retina esetében nagyfokú dúcsejt-típus függő változatosságot mutat. Aránymérték: 25 (A) és 20 μm (B).

A G3 sejtek esetében a Cx36 plakkok eloszlásánál azt figyeltük meg, hogy azok relatíve sűrűn helyezkednek el a dendritelágazások közelében (távolság $< 5 \mu\text{m}$). Ezt az eredményt további kísérletekkel kívánjuk megerősíteni és a jelenség funkcióját fiziológiai kísérletekben tervezzük feltárni.

Egy másik kísérletes vonalon a kollaborációs partnereink segítségével szerzett, posztmortem, fixált humán retinák dúcsejtjeit injektáltuk Lucifer Yellow (LY) festékkel, majd ezt követően Cx36 immunhisztokémiai jelöléseket végeztünk. Az injektált dúcsejtek ($n=83$) teljes dendritfáját és az azokon elhelyezkedő Cx36 plakkokat Neurolucida segítségével rekonstruáltuk, majd a minden szempontból megfelelő (tökéletes injekció, erős immunjel, háttérfestés hiánya, ép szövet) sejteket ($n=47$) további analízisre kiválogattuk. A minták vizsgálata során megfigyeltük, hogy hasonlóan az egér (és a többi modell állat) dúcsejtjeihez a legtöbb humán retinális dúcsejt dendritjeinek felszínén számos Cx36 tartalmú elektromos szinapszis található. Ezek elhelyezkedésére vonatkozóan két érdekességre figyeltünk fel; a plakkok relatíve gyakran helyezkednek el dendritikus végágakon, valamint gyakran figyelhetők meg párosával vagy hármasával (távolság $< 5 \mu\text{m}$). A dendritvégeken elhelyezkedő elektromos szinapszisok valószínűleg a homológ dúc-dúc elektromos szinapszisok helyei. Erre vonatkozó megfigyelés patkány retinális alpha dúcsejtek esetén már született (Hidaka és mtsai 2004). Ugyanakkor egyelőre nem világos, hogy a Cx36 plakkok klaszteresedése (párok, tripletek kialakulása) milyen funkcionális jelentőséggel

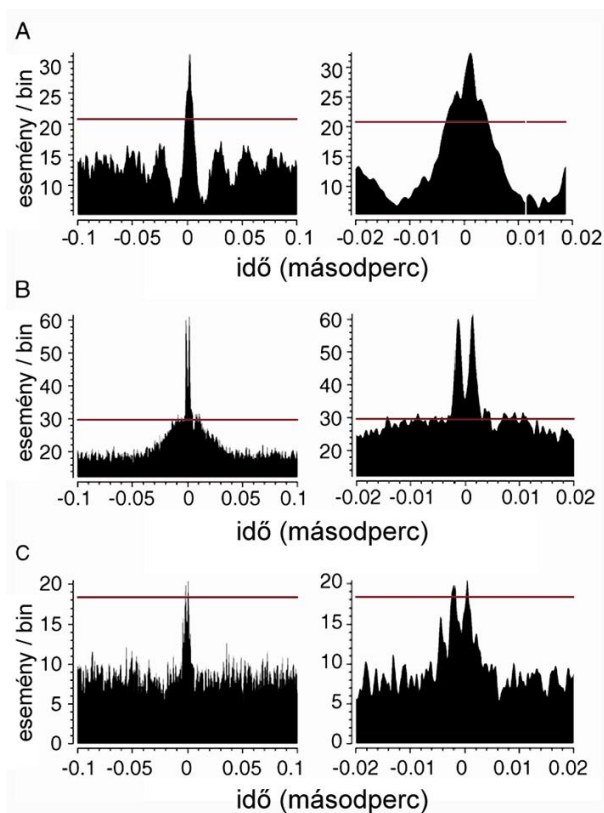
bír. Ennek a kérdésnek a megválaszolása további kísérleteket igényel, melyeket a közeljövőben tervezünk végrehajtani.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: A fenti kísérletek során számos morfológiai bizonyítékát találtuk arra, hogy a dúcsejt elektromos szinapszisok nagy része Cx36 tartalmú. Különösen igaz ez a heterológ dúc-amakrin sejtkapcsolatokra, ugyanakkor a dúc-dúc réskapcsolatok többnyire Cx36 függetlenek. A dúcsejt Cx36 elektromos szinapszisok eloszlására vonatkozó megfigyeléseink alapján kijelenthetjük, hogy gyakoriak a dendrit terminálisokon elhelyezkedő kapcsolatok, illetve gyakran megfigyelhető a Cx36 plakkok klaszteresedése ill. az egérretina OFF alfa sejtei esetén az elágazások közelében való előfordulás. Ezeknek az eloszlási mintázatoknak a funkcióira vonatkozóan egyelőre csak hipotéziseink vannak.

Az egérretina dúcsejtek akciós potenciál szinkronizációs mintázatai

A munka ezen részében a szomszédos dúcsejtek spontán akciós potenciáljainak (spike-jainak) egymáshoz való viszonyára voltunk kíváncsiak (Bloomfield és Völgyi 2009; Völgyi és mtsai 2013a; b). A vizsgálatoknál a szimultán rögzített spike-ok alapján ún. keresztkorrelációs (cross-correlation function) analízis segítségével történt az összehasonlítás. A kapott grafikon azt mutatja, hogy mekkora a valószínűsége annak, hogy egy dúcsejt spike-ja, egy bizonyos időn belül kövesse a szomszéd dúcsejt egy bizonyos spike-ját. A hisztogram lapos, ha a vizsgált sejtek egymástól függetlenül generálnak akciós potenciált, ugyanis minden inter-spike időköznek (ISI) ugyanakkora az esélye. Ha a két dúcsejt egymás működését direkt vagy indirekt módon serkenti vagy gátolja, akkor a grafikonon pozitív (serkentés) vagy negatív (gátlás) csúcs válik láthatóvá. A kölcsönhatás időbeni dimenzióját a csúcs X-tengelyen elfoglalt helye adja meg. A kísérletek során spontán akciós potenciál elvezetést végeztünk dúcsejt párokból vagy két wolfram elektróda segítségével (n=364), vagy egy 60 extracelluláris sokelektrodás rendszerrel (multielectrode array, MEA; n=5108). Míg az egyes elvezetések esetén lehetőség nyílik a regisztrátumokat követően a vizsgált sejtek megjelölésére (Neurobiotinnal töltött üvegkapillárisal) és későbbi morfológiai azonosítására, addig a MEA mérések erre alkalmatlanok, ugyanakkor 'high-throughput' jellegüknél fogva mérésenként nagyon sok adatot eredményeznek. A csúcsokat tartalmazó CCF-ekre Gauss-görbét illesztettünk, hogy

azok amplitúdóját (A), pozícióját (x) és szélességét (W) megállapíthassuk. A kapott CCF csúcsok alapvetően két különböző formát vettek fel (19. ábra).



19. ábra. Az egérretina dúcsejtjeinek szinkronizációs mintázatai

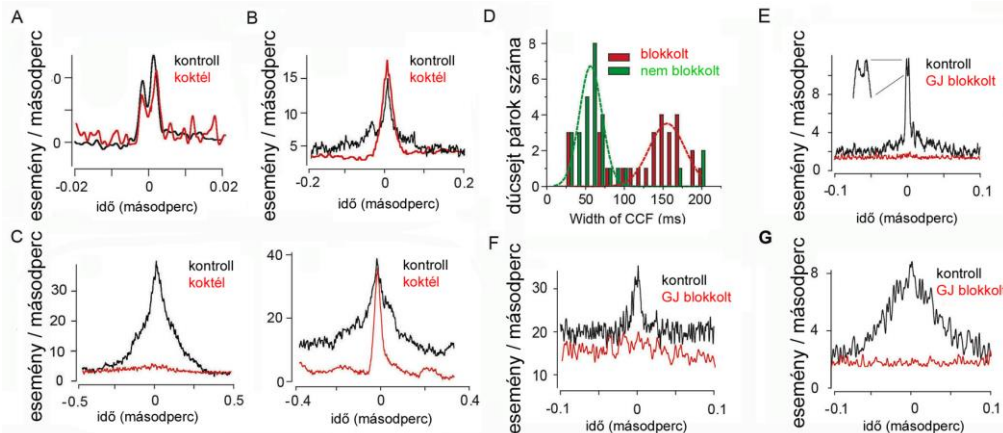
Az ábra bal és jobb oszlopában egy sorban található panelek ugyanazt a CCF-et mutatják különböző időfelbontással. **A.** Reprezentatív CCF, amely egy relatíve keskeny központi csúcsot tartalmaz. Megjegyzendő, hogy ennek a sejt párnak a CCF-je egy karakterisztikus oszcillációt is mutatott, mely nem általánosan jellemző az egycsúcsú görbékre. **B.** Bimodális és egycsúcsú CCF-ek egymásra épülése látható. **C.** Bimodális CCF. A horizontális vonalak a 99%-os konfidencia intervallum határát mutatják.

Az egyik jellemző mintázat esetében a CCF egy bimodális görbe, melynek csúcsai keskenyek ($W = 1.50 \pm 0.19$ ms), az X-tengelyen -1.10 és $+1.10$ ms (± 0.08) értékeknél érik el maximumukat. A bimodális görbe gyakran szélesebb egycsúcsú görbe tetején található és viszonylag ritka ($n=27$ – 4% wolfram elektródás elvezetések, $n=16$ – 0.3% a MEA elvezetések). Jóval gyakrabban fordul elő az a CCF görbe (wolfrám elektróda $n=135$; 37.1%; MEA $n=151$, 3.0%), amely egyetlen, $X=0$ -nál elhelyezkedő csúccsal rendelkezik. Az ilyen unimodális csúcsok igen változatosak voltak időlefutásuk

(4 - 400 ms) és az amplitúdók tekintetében (5 és 50 spikes/s). A változékonyság arra utalt, hogy a dűcsejt spike-korrelációk erőssége és időbeli pontossága tág határok között változik. A spike-korrelációt mutató sejtek szómái mindig <400 μm közelségben voltak és ez a távolság fordított arányosságban volt a korreláció erősségével. Vizsgálataink bizonyították, hogy az egérretina dűcsejtjei a korábban vizsgált fajok (macska, szalamandra, nyúl, majom) dűcsejtjeinek szinkronizációs mintázataihoz nagy mértékben hasonlóak (Mastronarde 1983a; b; c; Brivanlou és mtsai 1998; DeVries 1999; Greschner és mtsai 2011). Így az egereket a továbbiakban alkalmas modell állatnak találtuk a dűcsejt aktivitási szinkronizációs vizsgálatokra.

A szinkronizációban részt vevő retinális hálózatok

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a korrelációs mintázatok (CCF) generálásában kémiai- és/vagy elektromos szinaptikus információáramlás vesz részt. Farmakológiai kísérleteinkben a retinát egy kémiai szinaptikus antagonistákat (AMPA, NMDA, m-GluR, GABA_A, GABA_C, glicin) tartalmazó elegyben inkubáltuk és követtük a kontroll CCF csúcsok paramétereinek változását (20. ábra; Völgyi és mtsai 2013a).



20. ábra. Az egyes GC korrelációs mintázatok farmakológiai érzékenysége

A NSC (A) és MSC (B) csúcsok gyakorlatilag változatlanok voltak a szinaptikus koktéllal való farmakológiai kezelés után. C. A BSC CCF-ek esetén a széles csúcs eltűnt, ami vagy lapos CCF-et eredményezett, vagy egy addig maszkolt MSC csúcsot tett láthatóvá. D. Az unimodális csúcsok szélessége és koktélerzékenysége közötti összefüggés látható a hisztogramon. Egyértelműen csak a BSC ($W > 100$ ms) profilok voltak érzékenyek a kezelésre. E, F és G. Specifikus részkapcsolat blokkoló (18 β -GA) hatására a NSC, a MSC és a BSC csúcsok is érzékenyek voltak.

Ebben a kísérletben a koktél hatása a kémiai szinapszisok jelentőségét bizonyította volna. Ugyanakkor azt figyeltük meg, hogy a koktél nem indukált mérhető változást a bimodális CCF-ek alakjában ($n=10$) és nagyságában, vagyis az a retinális hálózat, ami a bimodális CCF létrehozásához hozzájárul, alapvetően független a kémiai szinapszisok működésétől. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy az unimodális CCF-ek a koktélkezelés hatására eltérő módon viselkedtek. A keskenyebb unimodális CCF-ek esetén ($W < 100$ msec; $n=62$) a koktélkezelés a bimodális csúcsokhoz hasonlóan hatástalan volt, azoknak sem alakja, sem az amplitúdója nem változott számottevően (20. ábra). Ugyanakkor a koktélkezelés teljes mértékben eltüntette a szélesebb unimodális csúcsokat ($W > 100$ msec; $n=23$). Ugyancsak eltérés volt, hogy a távolabb eső (200-400 μm) dúcsejtek között mindig csak a szélesebb unimodális profil volt megfigyelhető (20. ábra). Az eredmények egyöntetűen azt bizonyították, hogy a bimodális és a keskeny unimodális spike-korrelációk létrehozásáért teljes mértékben elektromos szinapszisokon alapuló retinális neuronális hálózat, a széles unimodális spike-korrelációért pedig legalább részben kémiai szinapszisok felelnek. Korábban Brivanlou és munkatársai (1998) hasonló három alaktani és farmakológiai CCF típust különböztetett meg szalamandra retinán. Munkájukban a bimodális CCF-eket keskeny- (narrow spike correlation – NSC), az egycsúcsúakat pedig vagy közepes- (medium spike correlation – MSC) vagy széles akciós potenciál korrelációnak (broad spike correlation - BSC) nevezték el. Mivel az egér retinán kapott eredményeink jól összeegyeztethetőek ezekkel az eredményekkel, ezért átvettük a fenti nevezéktant.

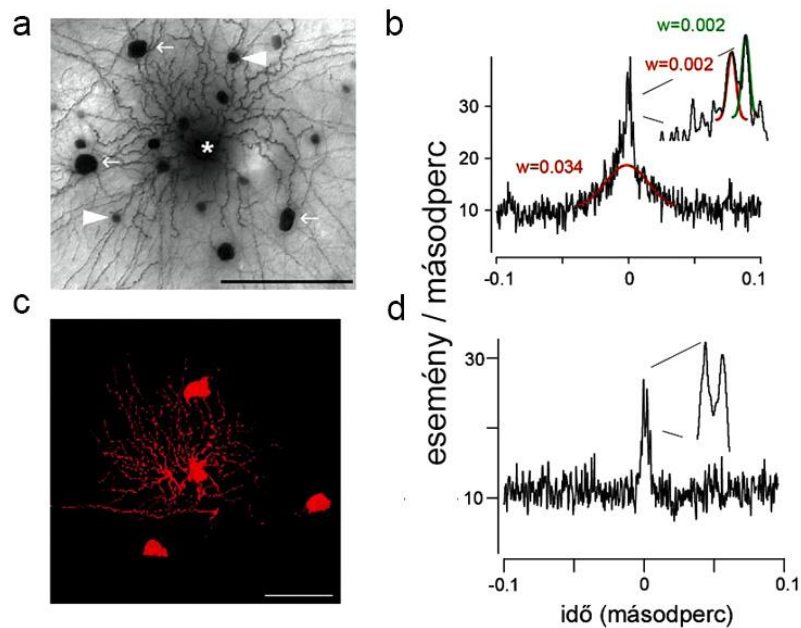
A kísérletek egy másik csoportjánál az NSC, a MSC és/vagy BSC-t mutató dúcsejt párokat réskapcsolat blokkoló szerrel (18-beta-glycyrrhetic acid, vagy röviden 18 β -GA; 25 μM koncentráció) kezeltük, ezzel kívántuk tisztázni a réskapcsolatok szerepét a MSC-k és NSC-k esetén. Az eredeti feltevésről összhangban úgy találtuk, hogy a gap junction gátlás teljes mértékben eliminálta az NSC ($n=8$) és MSC ($n=12$) típusú CCF-eket (20. ábra). Ugyanez a kezelés eliminálta a dúcsejtek Neurobiotin tracer-kapcsoltságát is ugyanakkor nem volt számottevő hatással a dúcsejtek fényválaszaira. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyították, hogy az alkalmazott réskapcsolat blokkoló ágens az adott koncentrációban specifikus, valamint azt, hogy a réskapcsolatok az alappillérei a dúcsejt tracer-kapcsoltság és a NSC és MSC típusú CCF-ek generálásának. Mindezek mellett meglepő eredménnyel szolgáltak azok a kísérletek, amelyekben a BSC típusú CCF-eket kezeltük gap junction blokkoló farmakonnal ($n=4$). A várakozásainkkal ellentétben a drog ezeket is teljesen eliminálta.

Ez utóbbi CCF-ek létrehozásához tehát nem csak kémiai, hanem elektromos szinapszisok is hozzájárulnak, vagyis mindenképpen egy komplex retinális neuronhálózatról van szó.

A kísérletek egy következő csoportjában ugyancsak kettős elvezetéseket végeztünk a Cx36 KO egérretinában. Korábbi vizsgálataink alapján ismert volt (lásd fent), hogy a Cx36 KO egér retinában a dúc-dúc kapcsolatok kevéssé, de a dúc-amakrin sejtkapcsolatok jelentős mértékben károsodtak, számuk a vad típusú állathoz képest rendkívül alacsony. A kettős elvezetési kísérletekben megfigyeltük, hogy a KO állatoknak a retinájában jóval kevesebb dúcsejt spike-korreláció fedezhető fel, mint a WT állatokéban. A spike-korrelációk típusait tekintve a NSC-k szinte ugyanolyan arányban voltak jelen a WT és a Cx36 KO retinában ($n=35$; 0.6% a Cx36 KO retina; 0.4% a WT retina). Ugyanakkor MSC-ből jóval kevesebbet figyeltünk meg a Cx36 KO egerek retinában; az arány kevesebb, mint felére esett a WT mérésekhez képest, és a BSC típusú CCF-ek teljes mértékben eltűntek. A fenti kísérletsorozat tehát bebizonyította, hogy a NSC típusú CCF-ek képzésében főleg nem Cx36 tartalmú réskapcsolatok vesznek részt, míg a MSC típusú CCF-ek létrehozásában a Cx36 tartalmú réskapcsolatoknak döntő szerep jut. Továbbá bizonyítottuk, hogy a BSC típusú CCF-ek létrehozásában mind Cx36 függő réskapcsolatok, mind kémiai szinapszisok részt vesznek. Egy külön munkánk során bizonyítottuk azt is, hogy a BSC típusú CCF-ekhez szükséges információ a külső retinában a pálcika fotoreceptorokban termikus zajként keletkezik.

A fentiekben bizonyítást nyert, hogy a NSC és a MSC típusú CCF-ek generálásában a különböző, dúc-dúc és/vagy dúc-amakrin réskapcsolatoknak esszenciális szerep jut. Ugyanakkor nyitott kérdés maradt, hogy a két fenti réskapcsolat típus melyike járul hozzá az NSC és melyike a MSC CCF-ek létrejöttéhez. Ahhoz, hogy ezekre a kérdésekre választ kapjunk, azonos típusú dúcsejt párokat megcélózva regisztráltunk wolfrám elektródákkal. A technika alkalmas volt arra, hogy a retina felszínét láthatóvá tegyük és célzottan csak a kívánt dúcsejtekből regisztráljunk mind a WT, mind a Cx36 KO egér retinájából. A kísérletek első szakaszában OFF alfa dúcsejt szomszédokat céloztunk meg ($n=27$; ezeknek a sejteknek a szómái jellegzetes alakkal rendelkeznek, melyek a jelöletlen retinán is könnyűszerrel felismerhetők DIC megvilágításban), és ezek spontán akciós potenciál sorozatait rögzítettük. Ezekben a kísérletekben megfigyeltük, hogy az alfa dúcsejt párok a WT egér retinájában komplex

CCF mintázatot mutattak, melyek minden esetben egy NSC és egy MSC egymásra épülésével jött létre (21. ábra).



21. ábra. Dúc-amakrin sejt réskapcsolatok felelősek a MSC keresztkorrelációs szinkronizációs mintázat kialakulásáért

A WT retina esetében (a) az OFF alfa dúcsejtek dúc-dúc (nyíl) és dúc-amakrin (nyílhegy) tracer kapcsoltsága összetett NSC és MSC CCF-ek (b) kialakulását eredményezi (csillag – NB injektált sejttest). A Cx36 KO OFF alfa GC-k (c) csak dúc-dúc kapcsoltságot mutatnak (bal) és csak NSC CCF csúccsal (d) rendelkeznek. Aránymérték – 100 μm .

Az OFF alfa dúcsejtekről a tracer injekciós kísérleteink alapján ismert volt, hogy a tracer-kapcsoltsági mintázatuk is komplex, vagyis mind dúc-dúc, mind dúc-amakrin kapcsoltsággal rendelkeznek. Így kézenfekvőnek tűnt azon hipotézis felállítása, mely szerint a dúc-dúc réskapcsolat felelős a NSC, és a dúc-amakrin kapcsolat a MSC spike-korrelációk kialakításáért. Ahhoz, hogy a feltevésünket bebizonyítsuk, a következő kísérletekben OFF alfa dúcsejt párokat vizsgáltunk a Cx36 KO egérretinában, ahol az alfa dúcsejtek kizárólag dúc-dúc sejt kapcsolatokat alkotnak, a dúc-amakrin sejt kapcsolatok teljesen hiányoznak (a KO miatt). Megfigyeltük, hogy az OFF alfa dúcsejt párok a Cx36 KO egér retinájában ($n=22$) kizárólag NSC CCF-ekkel rendelkeztek és a WT párokra jellemző MSC-k teljesen hiányoztak (21. ábra). Ez alapján arra következtethetünk, hogy az OFF alfa sejtek esetében a NSC-t a dúc-dúc, míg a MSC-t a dúc-amakrin réskapcsolatok hozzák létre. A kísérletsorozat utolsó

szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy a fenti OFF alfa dúcsejtekre vonatkozó törvényszerűség általánosságban érvényes-e a retina összes dúcsejtjére. Ennek igazolására kettős extracelluláris elvezetéseket végeztünk más, nem alfa dúcsejt párokból is. A fiziológiai méréseket követően vizsgált sejteket Neurobiotinnal feltöltöttük, hogy morfológiailag azonosíthassuk őket és az általuk fenntartott tracer-kapcsoltsági mintázatot. A vizsgálatok során úgy találtuk, hogy a csak dúc-dúc kapcsolatot fenntartó G17 párok (n=3) csak NSC típusú CCF-el rendelkeztek, míg a csak dúc-amakrin kapcsolatos G1 (n=2) és G6 (n=3) dúcsejt pároknak csak MSC típusú CCF-jük volt (3. táblázat).

3. táblázat. Az egerretina dúcsejtek tracer-kapcsoltságának és spike szinkronizációjának összefüggése

A WT retina dúcsejt párpai sötétszürkével, a Cx36 KO esetében világosszürkével jelöltek.

Dúc sejt típus	Kapcsoltság	CCF típusa
G ₃ (n=8); WT	GC; AC	NSC, MSC
G ₇ (n=1); WT	GC; AC	NSC, MSC
G ₆ (n=3); WT	AC	MSC
G ₁ (n=1); WT	AC	MSC
G ₂ (n=5); Cx36 KO	AC	MSC
G ₁₇ (n=4); Cx36 KO	GC	NSC
G ₃ (n=9); Cx36 KO	GC	NSC
G ₆ (n=1); Cx36 KO	Nincs kapcsolat	Nincs CCF csúcs
G ₂₁ (n=1); Cx36 KO	Nincs kapcsolat	Nincs CCF csúcs
G ₇ (n=2); Cx36 KO	Nincs kapcsolat	Nincs CCF csúcs

Ez az utóbbi kísérletsorozat tehát bebizonyította, hogy az alfa dúcsejtek esetében megfigyelt törvényszerűség általánosan érvényes minden dúcsejt-típusra az egerretinában. Ez a törvényszerűség pedig azt mondja ki, hogy a direkt dúc-dúc részekapcsolatok a precíz NSC spike-korreláció létrehozásáért felelnek, míg a dúc-amakrin részekapcsolatok a MSC spike-korrelációk alapvető effektorai. Ez utóbbi esetben

a közös preszinaptikus amakrin sejt spontán akciós potenciáljai jutnak a posztszinaptikus dúcsejt szomszédokra a dúc-amakrin kapcsolatokon keresztül. A szignál ezen típusú terjedése nyilván korrelál, így a két posztszinaptikus sejtben közel egyszerre hoz létre aktivációt és generál akciós potenciált. A direkt dúc-dúc réskapcsolatok esetében az egyik dúcsejt spontán akciós potenciálja terjed át a másikra kis késéssel (1-2 msec – azonos a bimodális csúcsok X-koordinátájával). Ez a hatás a kapcsolat esetében mindkét irányban működik, vagyis reciprok, ami miatt a CCF kettős csúccsal rendelkezik. A két gap junction populáció ezen funkcióbeli megosztását korábbi vizsgálatok (Mastronarde 1983c; Brivanlou és mtsai 1998; DeVries 1999) már valószínűsítették, de a munkánk volt az első, amely kombinált morfológiai-funkcionális vizsgálatokkal ezt az elméletet egyértelműen be is bizonyította.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: A fenti komplex strukturális-funkcionális kísérletek során bizonyítottuk, hogy a szomszédos dúcsejtek aktivitásának összehangolásában a dúcsejt elektromos szinapszisoknak elengedhetetlen szerep jut. Ezen túlmenően bizonyítottuk azt is, hogy a dúcsejt gap junction kapcsolatok különböző fajtái (dúc-dúc és dúc-amakrin) más-más akciós potenciál szinkronizációért felelős.

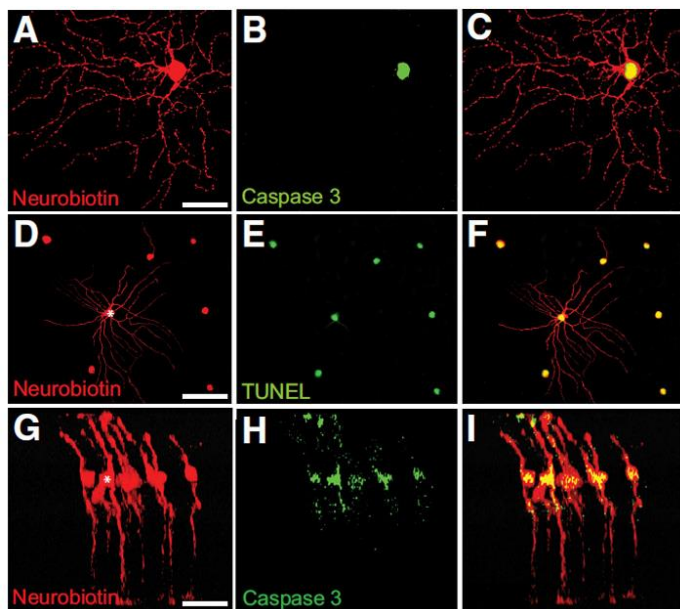
A RETINÁLIS ELEKTROMOS SZINAPSZISOK KÉPI INFORMÁCIÓ

FELDOLGOZÁSÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPE

Az elektromos szinapszisok és a halálszignál terjedése

A másodlagos sejthalál jelentős szerepet tölt be abban, hogy egy primér sérülést követően annak hatása másodlagosan a környező területeteket is érintse, azaz a degenerálódó terület térben többszörösére kiterjed (Andrade-Rozental és mtsai 2000; Decrock és mtsai 2009). A halálszignál terjedésére vonatkozóan több elmélet is létezik, ezek egyike értelmében a szignál réskapcsolatok segítségével terjedhet sejtről sejtire. Egyik munkánkban (Akopian és mtsai 2014) azt vizsgáltuk, hogy a retina neuronjai között létesített réskapcsolatok hogyan járulnak hozzá a degeneráció terjedéséhez azzal, hogy az (egyelőre ismeretlen eredetű) "halálszignál" molekula sejtről sejtire történő terjedését biztosítsák. A kísérletsorozatban intracelluláris citokróm C (CytC) injekciót alkalmaztunk egy-egy retinális neuron vagy Müller gliasejt esetén. Az injektáló elektróda a CytC mellett a gap junction permeábilis Neurobiotint is tartalmazta, melynek segítségével azonosíthatóak voltak az elektromosan kapcsolt idegsejtek is. Az injekció

eredménye nemcsak az injektált sejt pusztulását eredményezte, hanem egy feltételezett “halálszignál” molekula gap junction mediálta terjedésénél fogva az elektromos szinaptikusan kapcsolt sejtekét is (22. ábra). Az injekciót követően mind az injektált, mind a kapcsolt sejtek pusztulását TUNEL teszttel bizonyítottuk.

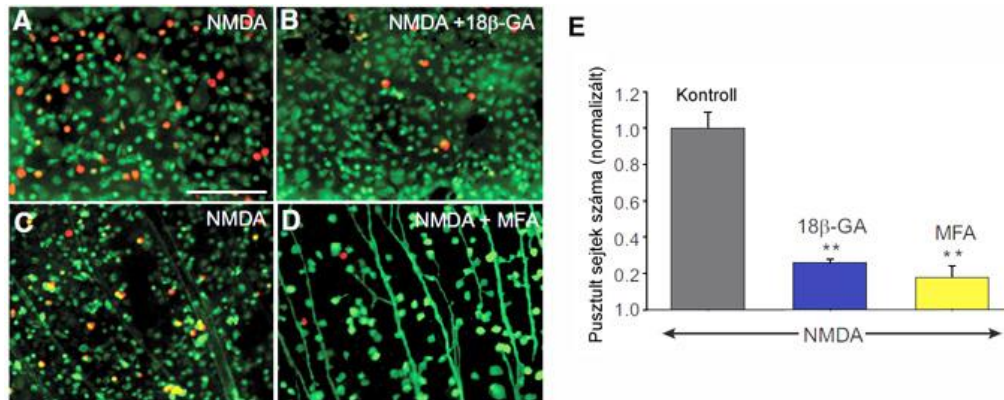


22. ábra. Retinális elektromos szinapszisok szerepe a másodlagos sejthalál folyamatában

Az ábra fotói a CytC indukálta sejthalál részkapcsolat mediálta terjedését mutatják be. Az injektáló elektróda CytC-t és NB-t tartalmazott. Elektromos szinapszisokat nem létesítő (A-C) illetve elektromos szinapszisokat létesítő (csillag) dúcsejt (D-F) képei felülnézetben. Az utóbbi sejt esetében a gap junction kapcsolt sejtek sejtestjei szintén NB jelöltek. Injektált (csillag) és elektromosan kapcsolt Müller gliasejtek egy csoportja (I) metszeten. Mindhárom képsorozaton látható, hogy a sejthalál markerek (Caspase 3, vagy TUNEL) csak az injektált és az elektromos szinaptikus kapcsolatban lévő sejtekben detektálhatóak, tehát az injektált CytC csak ezekben indukált sejthalált. Aránymérték: A-C, G-I, 20 μm ; D-F, 50 μm .

Egy kísérletsorozatban Neurobiotin töltést végeztünk az optikus idegen keresztül, melynek segítségével a dúcsejtek és az elektromosan kapcsolt amakrin sejtek láthatóvá váltak. Az *in vitro* retinák egy részén ezután részkapcsolat inaktiválást (zárás) végeztünk farmakológiai módszerekkel (30 perces 25 μM 18 beta glycirrhetinic acid - 18bGA, vagy 50 μM meclofenamic acid – MFA), míg a kontroll retinákat továbbra is Ringerben tartottuk. Ezután a kontroll és a kísérleti mintákon is NMDA (300 μM) indukálta excitotoxikus sejthalált váltottunk ki. A kísérlet végén a TUNEL pozitív amakrin sejtek számait számoltuk össze mind a kísérleti, mind a kontroll (n=5) mintákon. Azt tapasztaltuk, hogy a gap junction blokkolás nagy mértékben

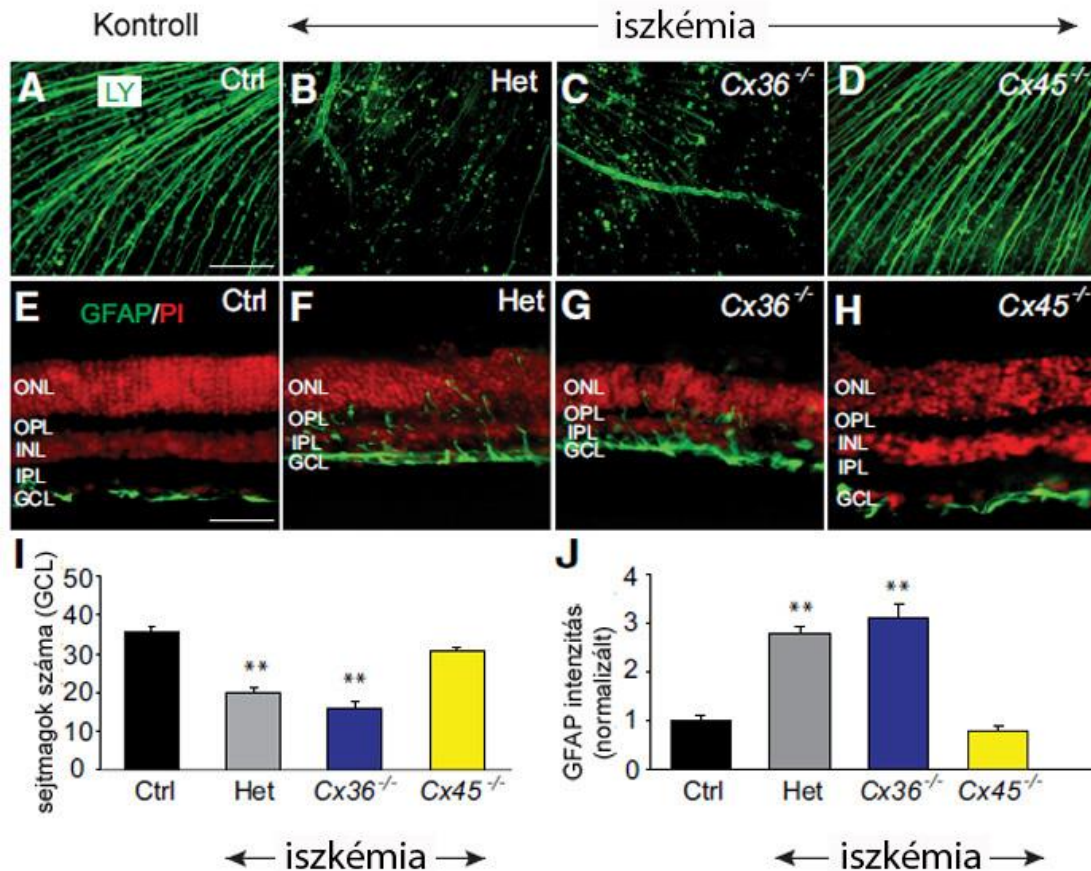
visszaszorította (20% alá) a TUNEL pozitív amakrin sejtek számát ($n=3$ – 18bGA; $n=5$ – MFA), míg a kontroll mintákon ezek számottevően többen voltak ($p < 0.001$; 23. ábra). Ennek értelmében tehát a dúcsejt elektromos szinapszisok nagymértékben hozzájárultak az idegszövetet érő inzultust követő másodlagos sejthalálhoz.



23. ábra. Retinális elektromos szinapszisok szerepe NMDA indukálta sejthalál terjedésében

NMDA indukálta pusztuló dúcsejtek a kontroll (A és C) és a gap junction blokkolószerekkel (25 μ M 18 β -GA, vagy 50 μ M MFA) inkubált retinán (B és D). Az élő sejtek calcein-AM (zöld), a pusztuló sejtek ethidium homodimer (piros) markerekkel jelöltek. Az E ábrán a hisztogram a pusztuló sejtek számának GJ blokkolást követő csökkenését mutatja. ** $p < 0.001$. Aránymérték: A-D 100 μ m.

A következő kísérletsorozatban retinális iszkémia segítségével (33 gauge tűt szúrtunk az elülső szemcsarnokba, amely 0,9% sóoldatot tartalmazó edény segítségével tartósan 120 Hgmm feletti intraokuláris nyomást alakított ki) indukáltuk a retinális sejtek pusztulását. A kísérletet elvégeztük vad típusú, heterozigóta Cx36-/+ , homozigóta Cx36 -/- Cx36 KO és Cx45 KO egereken. A hetero- és homozigóta Cx36 KO retinák esetében a vad típusú iszkémiás állathoz hasonló számú elpusztult sejtet számoltunk, míg a Cx45 KO retinák ezek száma jelentős mértékben visszaesett (24. ábra). Ez alapján feltételeztük, hogy a gap junction indukálta másodlagos sejthalál a retinában elsősorban a Cx45 által formált elektromos szinapszisokon keresztül valósul meg.



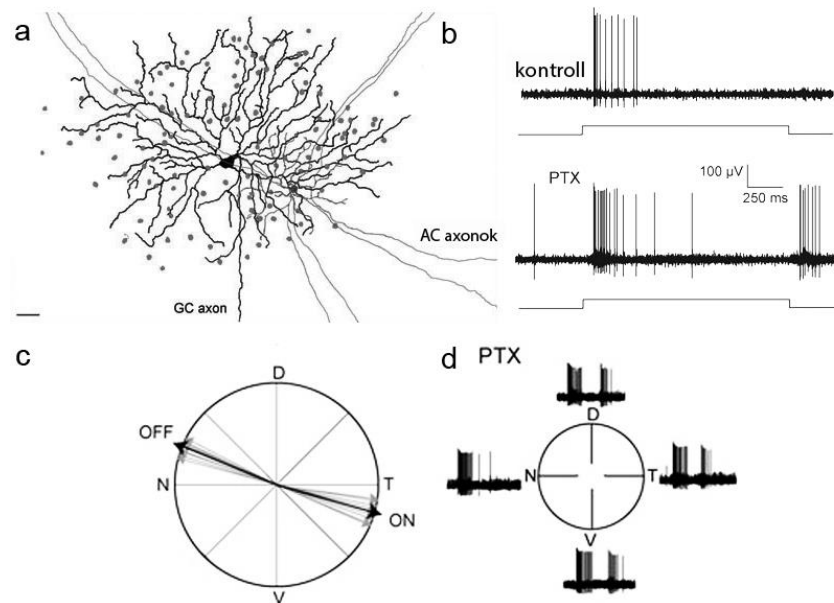
24. ábra. Cx36 és Cx45 GJ-k szerepe az iszkémia indukálta sejtpusztulás folyamatában

A-D. egész retina preparátumokat mutatnak a GCL szintjén kontroll, Cx36 heterozigóta (+/-), Cx36 KO (-/-) és Cx45 KO (-/-) egerek esetén. A dúcsejteket előzőleg Lucifer yellow (zöld) retrográd jelölőanyaggal töltöttük fel, a Cx36+/-, Cx36-/- és Cx45-/- minták esetén az állatokat előzőleg iszkémia kezelésnek vetettük alá. A kezelés hatása a Cx36+/- és Cx36-/- állatok retináján jól látható, míg a Cx45-/- állat retinája nagyban hasonlít a kontroll állatéhoz. **E-H.** GFAP immuncitokémia ugyanezen állatok retináján Müller glia aktivációt mutat a Cx36+/- és Cx36-/- iszkémia kezelt retinákon, de a kontrollhoz hasonló GFAP alapaktivitást (csak a sejtek talpaiban) mutat a Cx45-/- állatok esetén. **I-J.** A hisztogramok a mintákon végzett sejtszámolások és intenzitás mérések eredményeit mutatják. Egyértelmű, hogy a Cx45 GJ-ok zárása esetén az iszkémia előkezelés hatása elhanyagolható. **p<0.001 vs. kontroll. Aránymérték: **A-D** 200µm, **E-H** 100µm.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: A fenti kísérletsorozat bizonyította, hogy retinális degeneratív elváltozások esetén a dúcsejt réskapcsolatok döntő szerepet játszanak a halálszignál másodlagos tovaterjedésében. Ez az eredmény hozzájárulhat egyes gap junction-blokkoló hatással bíró készítmények terápiás felhasználásához, különös tekintettel progresszív retinális degenerációs elváltozások esetén.

A dúcsejt réskapcsolatok szerepe a retinális kód kialakításában

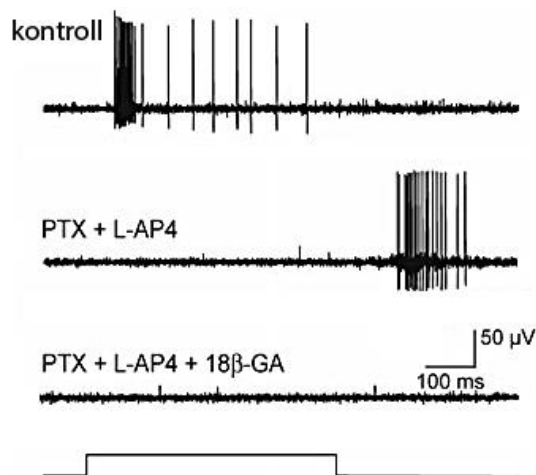
Eredményeink tehát egyértelművé tették, hogy a dúcsejt réskapcsolatok a sejtek aktivitását szinkronizálják, ugyanakkor keveset tudtunk szinkronizáció látásban betöltött szerepéről. Ennek vizsgálatára többféle kísérleti paradigmát is kidolgoztunk. Ezek egyike volt az, amelyben ON polaritású irány szelektív (ON direction selective – ON DS) dúcsejteket vizsgáltunk (Ackert és mtsai 2009). Ezek a sejtek akkor mutatják a maximális aktivitást (legmagasabb spike frekvencia), amikor a receptív mezijükön áthaladó stimulus a preferált irányt követve (jobbra, balra, fel vagy le) halad keresztül. A preferált irányra 180° -os szöget bezáró irány a nem-preferált, ha a stimulus (objektum) ebben az irányban mozog, akkor az ON DS sejt inaktív. Kísérleteinkben ONDS sejtek ($n=58$) aktivitását extracelluláris elektródákkal regisztráltuk. Megfigyeltük, hogy az egyébként ON polaritású dúcsejtek GABA_A receptor blokkolás hatására (PTX 100 μ M) OFF válaszkomponenseket is produkáltak (25. ábra).



25. ábra. Az ON DS dúcsejtek ON és maszkolt OFF válaszainak irány szelektivitása

a. Az ON DS sejtek Neurobiotin injekciót követően tracer kapcsoltaknak bizonyultak; a kapcsolt sejtek poliaxonális amakrin sejtek (az ábrán a kapcsolt amakrin sejtek szómái és egyik sejt dendro-axonális nyúlványrendszere látható). **b.** Az ON DS sejtek kontroll körülmények között csak a fény bekapcsolásakor aktívak (generálnak akciós potenciálokat), míg a GABA transzmisszió farmakológiai blokkolását követően (50 μ M PTX) egy OFF fényválasz komponens is megjelenik (jobbra fent). **c és d.** A fényválasz komponensek irány szelektívek, de azok polaritása ellenkező irányú (alsó panelek). Aránymérték: **a-d** 20 μ m.

Érdekes, hogy a rejtett (maszkolt) OFF válaszkomponens, a klasszikus ON válaszhoz hasonlóan irány szelektív, de polaritása azzal ellentétes. Az OFF válaszok irány szelektivitása (ellenben az ON válasszal) érzékeny volt a kolinerg receptor antagonistákkal (hexamethonium $50\ \mu\text{M}$, $n=8$) és koleszterinészteráz inhibitorral való kezelésre (neostigmin $5\ \mu\text{M}$, $n=9$). Ez arra utalt, hogy az OFF válasz irány szelektivitásáért felelős hálózatban az acetilkolintermelő amakrin sejteknek (a retina egyetlen acetilkolintermelő sejtje az ún. starburst sejt) fontos szerep jut. Megfigyeltük azt is, hogy a réskapcsolatok blokkolását követően (18β -glycyrrhetinic acid - 18β -GA, $25\ \mu\text{M}$) nemcsak a tracer-kapcsolt amakrin sejtek tűnnek el, hanem a GABA inhibíció által maszkolt OFF válasz is (26. ábra).



26. ábra. Az ON DS dűcsejtek maszkolt OFF polaritású válasza

Az ON DS sejtek kontroll körűlmények között ON fényválasszal rendelkeznek, míg a GABA inhibíció feloldásakor (PTX $50\ \mu\text{M}$) egy OFF válaszkomponens is megjelenik (az L-AP4 a mGluR6-n keresztül ON komponenseket blokkolja). Ha az inkubáló elegyhez GJ blokkoló szert is adtunk (18β -GA, $25\ \mu\text{M}$) akkor az OFF válaszkomponens eltűnik (alsó panel).

Hisztológiai módszerek (a méréseket követő Neurobiotin intracelluláris injekció) segítségével ugyancsak bizonyítottuk, hogy a gap junction kapcsolt poliaxonális amakrin sejtek egyes dendritágai az OFF alrétegben találhatók (az ONDS sejtekkel GJ alkotó egyéb dendritágak pedig az ON alrétegben) és vegyes, ON-OFF fényválaszt produkálnak. Ezek az eredmények egyértelműen arra utaltak, hogy a normális körűlmények között maszkolt, irány szelektív OFF válaszkomponens az elektromosan kapcsolt ON-OFF poliaxonális amakrin sejtektől származott. Ez a válaszkomponens a

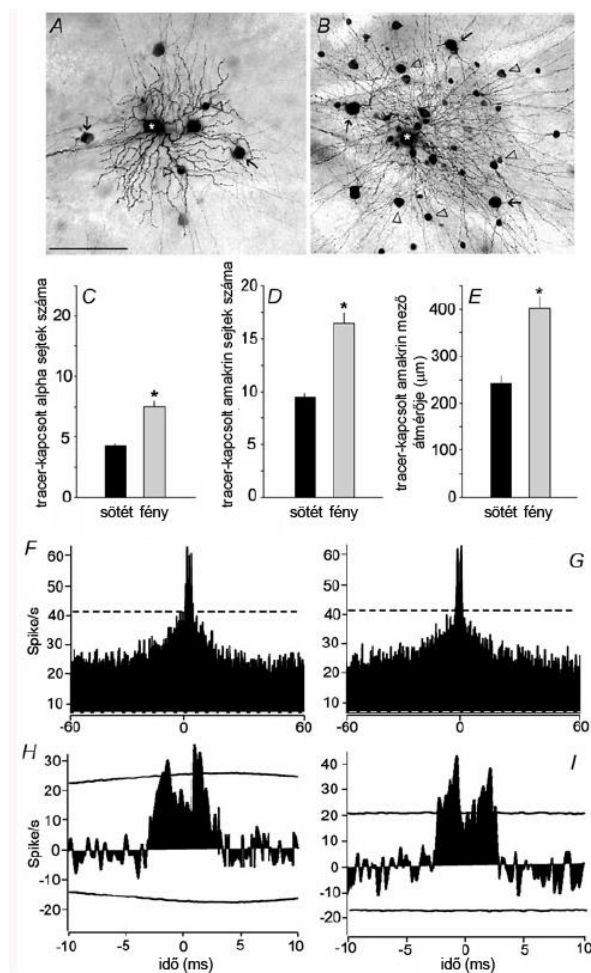
kísérleti paradigmánk esetén csak a GABA gátlás farmakológiai feloldása következtében volt megfigyelhető, azonban valószínűnek tartjuk, hogy létezik olyan fénystimulálási paradigma, amely fiziológiás körülmények között ennek a válaszkomponensnek az aktivációjával kódolja egyes objektumok (vagy háttér) mozgásának irányát.

A következő kísérletsorozatban megfigyeltük, hogy a GABA inhibíció (GABA_a és GABA_c) farmakológiai blokkolásakor (PTX $50\mu\text{M}$) a nyúlretina OFF alfa dúcsejtjei a klasszikus OFF fényválasz mellett egy ON komponenst is mutattak ($n=92$; Farajian és mtsai 2011). Ez azért érdekes, mert ezek a sejtek serkentő bemeneteiket az OFF alrétegben elágazó OFF bipoláris sejtektől kapják, melyek ON polaritású serkentést nem közvetítenek. Az OFF alfa sejtekről is ismert, hogy réskapcsolatokat tartanak fent széles dendritmezejű amakrin sejtekkel, melyek nyúlványai az ON és az OFF alrétegben is elágaznak. Ezeknek a réskapcsolatoknak a gátlása segítségével sikerült a fenti ON válaszkomponenst teljesen eliminálni. Ez arra utalt, hogy a válaszkomponens a kapcsolt amakrin sejtekből származott és a réskapcsolatokon keresztül jutott az OFF alfa sejtekhez. A vizsgálatokat extracelluláris elektródákkal végeztük, mely lehetővé tette a méréseket követő tracer injekciót majd a morfológiai azonosítást is. A MEA extracelluláris elvezetések során megfigyeltük, hogy a GABA inhibíció feloldása az egér dúcsejt-populáció mintegy harmadában hasonló, ellenkező polaritású válaszkomponenseket jelenít meg (OFF sejtek 19%/-a, ON sejtek 44%-a). Ez arra utal, hogy az általunk keresztirányú (cross-over) serkentésnek elnevezett jelenség általános mindkét modell állatunk (egér és nyúl) retináján. A fenti kísérletekben bizonyítottuk, hogy a dúcsejt réskapcsolatok - különösen a dúcsejt-amakrin kapcsolatok - részt vesznek az információs csatornákon haladó jel integrálásában és bizonyos képi aspektus (látott tárgyak v. háttér mozgása) kódolásában.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: Kísérleteinkben az ON DS és az OFF alfa sejtek esetén olyan válasz komponenseket figyeltünk meg, melyek klasszikus full-field stimuláció hatására GABA blokádnál állt. Bizonyítottuk, hogy ezek ionáramai szomszédos amakrin sejtekből származnak és réskapcsolatok segítségével jutnak a dúcsejtekre. Az ON DS sejt esetében az amakrin sejt eredetű válaszkomponens irány szelektív. Az OFF alfa sejt esetében a válaszkomponens funkciója egyelőre nem ismert, de feltételezzük, hogy ezek a képi környezet valamely aspektusának kódolásáért felelnek.

A dúcsejt réskapcsolatok szerepe a retinális adaptációban

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a fényadaptáció hogyan változtatja a nyúl- és egérretina OFF alfa dúcsejt réskapcsolatok áteresztőképességét (Hu és mtsai 2010). OFF alfa dúcsejteket Neurobiotinnal jelöltünk sötét- (nyúl $n=169$; egér $n=54$) és fényadaptált (nyúl $n=30$; egér $n=12$) retinákon. Az injektált és tracer-kapcsolt sejtek láthatóvá tétele után összehasonlítottuk a mintasorok kapcsoltságának mértékét. Megfigyeltük, hogy a fényadaptáció hatására az OFF alfa dúcsejtek tracer-kapcsoltsága jelentősen megnövekszik. Ez utóbbi jelenség a kapcsolt sejtek jelölési intenzitásában és azok számában is jelentkezik (27. ábra).

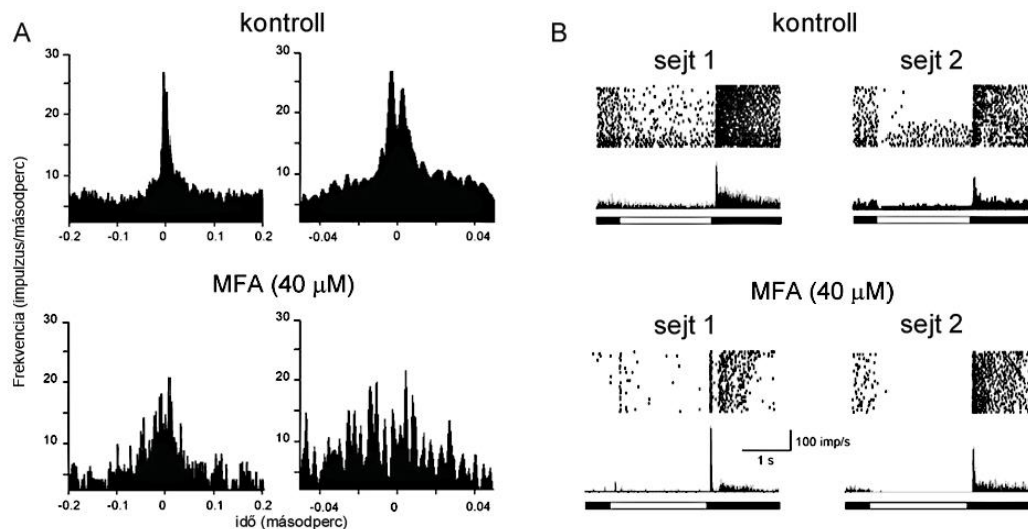


27. ábra. A fényadaptáció hatása az OFF alfa dúcsejtek tracer-kapcsoltságára

A Neurobiotin injekciót követő szövettani vizsgálatok (A-B) és a morfológiai analízis hisztogramjai (C-E) azt mutatják, hogy fényadaptáció hatására mind a tracer-kapcsolt dúcsejtek (C), mind a kapcsolt amakrin sejtek (D) száma megnőtt, valamint a kapcsolt amakrin sejtek által elfoglalt retinális terület kiterjedt (E). (* jelöli a $p<0.001$ változásokat). Aránymérték: A-B 10 μm .

A morfológiai megfigyeléseket funkcionális vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Szomszédos OFF alfa dúcsejtek spike-aktivitását regisztráltuk szimultán és az elvezetésekben kereszt-korrelációs analízist végeztünk nyúl- és egérretinán. Mindkét állat esetében a regisztrálást (spontán aktivitás és fény kiváltotta válaszok külön-külön regisztrálva) először sötétadaptált állapotban végeztük el, majd a retinákat fotopikus háttérvilágítással ($I = 0.27 \text{ mW cm}^{-2}$) fényadaptáltuk egy órán át, és a regisztrálást megismételtük (egér $n=12$; nyúl $n=56$). A kísérletekben mindkét állatmodellnél megfigyeltük a fényadaptáció hatására bekövetkező CCF csúcsok erősödését, azaz a sejtek közötti korrelációs aktivitás megnövekedését (27. ábra). A nyúlretina esetében ezen kívül azt is sikerült megfigyelni, hogy a korrelált aktivitás a fényadaptáció hatására második szomszéd sejtekre (nem közvetlen szomszédok) is áttért. További farmakológiai méréseinkkel azt is meghatároztuk, hogy a gap junction áteresztőképességének növekedését a fény hatására felszabaduló dopamin indukálja (Id. Hu és mtsai 2010). A dopamin pedig főként D_1 receptorokon és cAMP mediálta intracelluláris mechanizmuson keresztül fejti ki hatását az OFF alfa sejtekre.

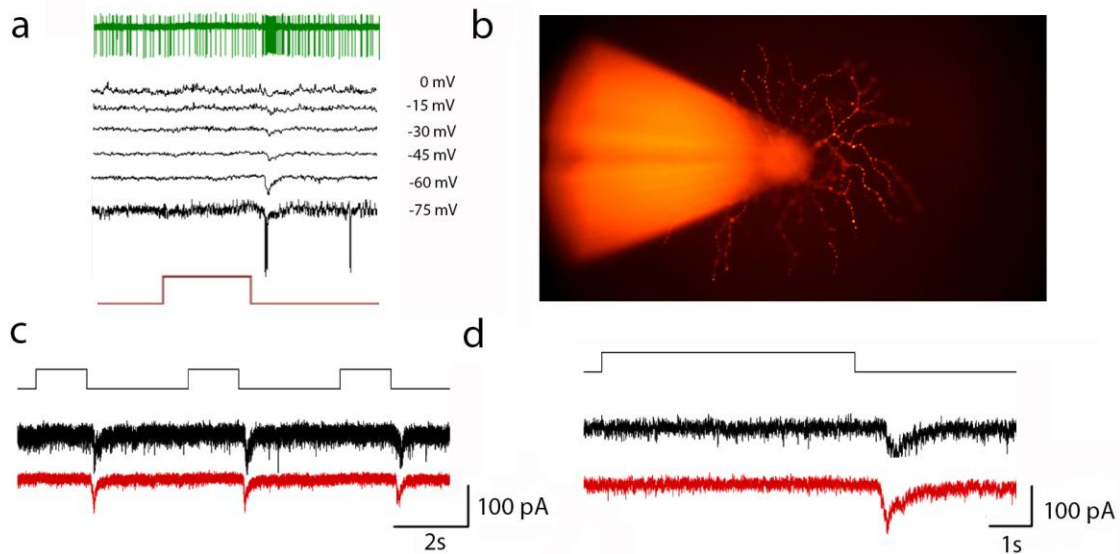
Ebben a témakörben a legújabb vizsgálataink a dúcsejt réskapcsolatok farmakológiai zárásakor (a fentiek alapján ez a sötétadaptáció hatásával analóg) történő jelkódolási változásokat vizsgálták (Balogh és mtsai 2017). Ezek a kísérletek mutattak rá arra, hogy az OFF alfa dúcsejt réskapcsolatok farmakológiai zárása ($40 \mu\text{M}$ MFA) nem pusztán a dúcsejt párok akciós potenciál szinkronizációját szünteti meg, hanem az egyes dúcsejtek spontán aktivitását is csökkenti. Ugyanakkor azt az érdekes megfigyelést tettük, hogy a gap junction blokkolás hatására a stimulus kiváltotta dúcsejt fényválaszok kifejezettebbekké, robusztusabbakká váltak (28. ábra). A réskapcsolatok zárásakor bekövetkező csökkenő spontán aktivitás és megnövekedett fényválasz amplitúdó tehát egyértelműen a jel/zaj viszony (S/N) markáns javulását eredményezte.



28. ábra. A dúcsejt GJ-k farmakológiai zárása a szinkron spike aktivitás csökkenésével egyidejűleg a fényválasz erősödését idézi elő

A. A bal oldali ábrán egy OFF alfa dúcsejt pár kereszt-korrelációs görbéje látható kontroll (fent) és gap junction blokkolt (lent) körülmények között (kétféle időskálán). Egyértelmű, hogy a blokkolás hatására a két csúcsú spike korreláció eltűnt. A jobb oldali ábrán ugyanezen dúcsejtek fényválaszai (raszterek és PSTH-k) láthatók kontroll (fent) és gap junction blokkolt (lent) körülmények között. A fényválaszok jel/zaj viszonya egyértelműen javult a GJ blokkolás hatására.

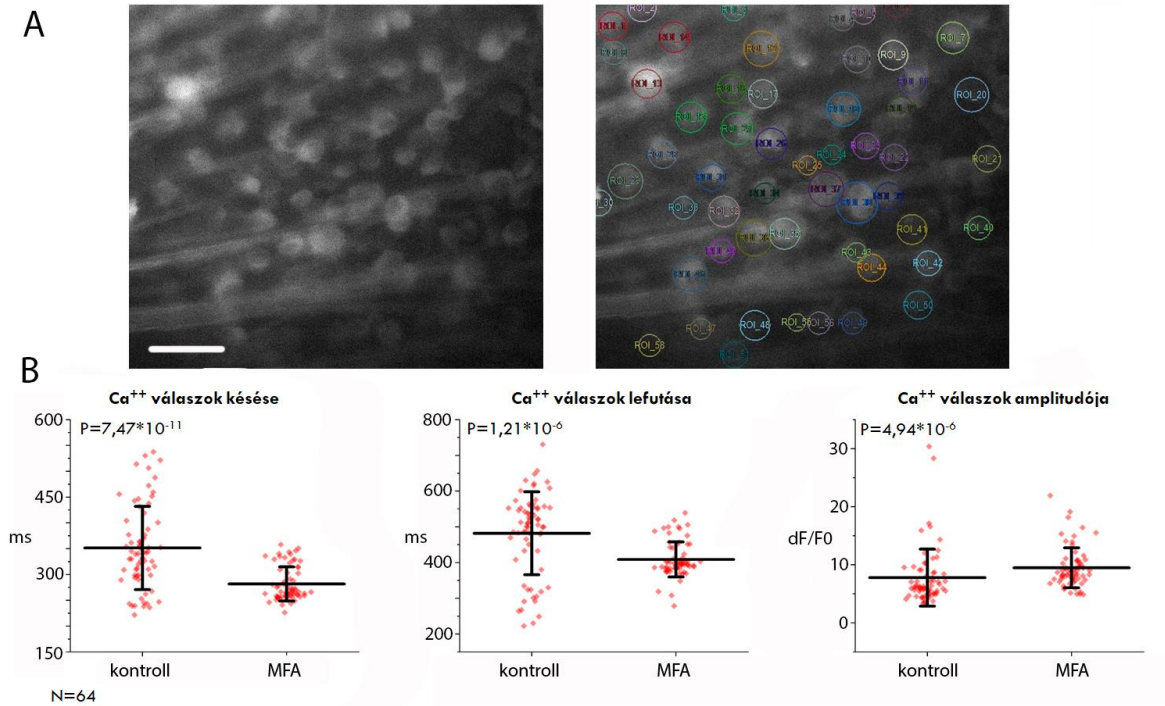
A S/N és az akciós potenciál korreláció mértéke tehát az OFF alfa dúcsejtek esetében fordított arányosságot mutat. Ez azt jelenti, hogy az OFF alfa sejtek egyedi fényválaszai a réskapcsolatok záródásával javulnak, míg a szomszédokkal mutatott akciós potenciál szinkronizáció mértéke éppen ellenkezőleg, a réskapcsolatok nyitásakor számottevő. A fényválaszok S/N értékének javulását MEA extracelluláris, patch-clamp és Ca^{++} -képzőképzési mérésekkel is bizonyítottuk (29. és 30. ábrák). Az utóbbi két technika segítségével tehát az is bizonyítást nyert, hogy a jelenség nemcsak a kimeneti akciós potenciálok szintjén, hanem az EPSP-k és Ca^{++} -tranzienst események szintjén is megfigyelhető. Ez utóbbi vizsgálatok alapján egy hipotézist állítottunk fel, mely szerint az OFF alfa dúcsejtek két alapvető állapotban működhetnek, amely két különböző kódolási mechanizmust feltételez. Az egyik mechanizmus fényszegény környezetben kerül előtérbe, amikor a réskapcsolatok áteresztőképessége alacsony. Ebben az állapotban a preszinaptikus bipoláris sejtek által kiváltott EPSC nagy része a posztzinaptikus dúcsejt akciós potenciál generálásához járul hozzá, kisebb része szivárog a szomszéd sejtekbe a réskapcsolatokon keresztül.



29. ábra. A réskapcsolatok farmakológiai zárása növelte a dúcsejt EPSC-k amplitúdóját

A. Patch-clamp elvezetés egy retinális dúcsejtből. A legfelső regisztrátum cell-attached üzemmódban a spike aktivitást mutatja, az alatta található elvezetések whole-cell üzemmódban történtek és ugyanannak a sejtnak a fényválaszait mutatják különböző V_h értékeken. Legalul a fény ki- és bekapcsolását jelképező jel látható. **B.** Ezen a képen az előző elvezetés után az elektródán keresztül Alexa456 festékkel feltöltött retinális dúcsejt látható. **C.** Elvezetések whole-cell üzemmódban a dúcsejt EPSC-it mutatják kontroll (fekete) és gap junction blokkolt (MFA; piros) állapotban. **D.** Egy kinagyított részlet látható az előző regisztrátumból.

Ellenben a fényadaptált retina esetében a dúcsejt réskapcsolatok áteresztőképessége megnő, a fénystimulus kiváltotta EPSP-k jelentősebb része a réskapcsolatokon keresztül a kapcsolt sejtekbe elszivárog. Ebben az esetben ugyan a S/N romlik, ugyanakkor a kapcsolt dúc- és amakrin sejtekkel történő kommunikáció javul, lehetőség nyílik az akciós potenciál korreláció által egyes képi aspektusok populációs kódolására. A hipotézis alapján az is feltételezhető, hogy az OFF alfa sejtek a képi környezet két egymástól különböző aspektusát képesek kódolni a megvilágítás függvényében, az egyik aspektust (pl. kontraszt) egysejt működési módban, a másikat (pl. mozgás; Münch és mtsai 2009) populációs üzemmódban. Ennek a hipotézisnek az igazolásán és a jelenségnek az emlős látórendszer működésében betöltött szerepén jelenleg is dolgozunk.



30. ábra. A dúcsejt részekapcsolatok zárása növelte a fénystimulus kiváltotta Ca⁺⁺-hullámok amplitúdóját

A. A képeken a Thy1-GCaMP egér retinális dúcsejtjeinek sejtestjei láthatóak egy Ca⁺⁺-képkalkotási kísérletben a mérési pontok nélkül és a pontokkal (region of interest – ROI) ábrázolva. **B.** A fénystimulus kiváltotta Ca⁺⁺-tranzienst események alapvető paraméterei gap junction blokkolás (MFA) hatására szignifikánsan változnak; a válaszok latenciája csökken (bal oldal), a lefutási idő csökken (középen) és az amplitúdó nő (jobb oldal). Aránymérték: **A** 50 μ m.

RÉSZÖSSZEFOGLALÓ: A fenti kísérletek igazolják, hogy a dúcsejt elektromos szinapszisok nyitottsági állapota a megvilágítás szintje által erősen szabályozott folyamat. Tartós megvilágítás hatására a retina dopaminerg amakrin sejtjei dopamint szabadítanak fel, mely D₁ receptorok aktiválása folytán a dúcsejt elektromos szinapszisok nyitását idézi elő. Megfigyeltük, hogy a fény kiváltotta gap junction nyitás hatására a dúcsejtek egysejt aktivitásának rovására a populációs aktivitás javul. Feltételezzük, hogy a dúcsejtek (legalább egy része) egysejt- és populációs üzemmódban is képesek a képi környezet különböző aspektusait kódolni.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A disszertáció témájában végzett kutatásaink legfontosabb eredményei a következők:

1. A csaprendszer elektromos szinapszisei.

Cx36 alegység építi fel a csap-csap réskapcsolatokat az egér- és az emberi retinában is. Az emberi csap-bipoláris sejtek legalább két dendritikus és egy axonális réskapcsolat-típust létesítenek egymással.

2. A pálcika rendszer elektromos szinapszisei.

A pálcika információs csatornák esetén a Cx36 réskapcsolatok jelen vannak az AII-CB és az AII-AII kapcsolatokban és a jeltovábbításban, és a S/N javítását végzik.

3. A Cx36 réskapcsolatok eloszlásának vizsgálata az emlős retinában.

A különböző emlősfajok Cx36 réskapcsolatai hasonló retinális eloszlást mutatnak, fajspecifikus jellegzetességekkel. A Cx36 réskapcsolatok a posztembrionális fejlődés viszonylag késői szakaszában alakulnak ki, és a szem kinyílásával válnak éretté.

4. Az emlős belső retina neuronjainak kapcsoltsága.

A WF és PA amakrin sejtek gap junction kapcsoltak, mely a receptív mezőket növeli. Morfológiai alapon karakterizáltunk 22 egér dúcsejt-típust. Ezek többsége (16/22 típus) gap junction kapcsolt, tehát a dúcsejt réskapcsolatok esszenciálisak a látás szempontjából. A Cx36 esszenciális építőköve a dúc-amakrin sejtkapcsolatoknak.

5. Az egérretina dúcsejt akciós potenciál szinkronizációs mintázatai.

A dúc-dúc és a dúc-amakrin sejt réskapcsolatok különböző spike szinkronizációs típusok alapjai. A pálcikák termikus zaja Cx36 réskapcsolatokat és kémiai szinapsziseket tartalmazó primer/szekunder pálcika csatornákon keresztül jut a belső retina dúcsejtekig és specifikus spike-korrelációt generál.

6. A dúcsejt spike-szinkronizáció látásban betöltött szerepe.

A fény hatására felszabaduló dopamin a dúcsejt réskapcsolatok áteresztőképességét és ez által gap junction kapcsoltságát növeli. A fényadaptáció során a dúcsejt szinkron aktivitás növekszik, amelynek során dúcsejtek az egysejt kódolás populációs kódolási mechanizmusra váltanak.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Ackert JM, Farajian R, **Völgyi B**, Bloomfield SA (2009) GABA blockade unmasks an OFF response in ON direction selective ganglion cells in the mammalian retina. *Journal of Physiology - London* 587(Pt 18):4481-4495.
- Akopian A, Atlasz T, Pan F, Wong S, Zhang Y, **Völgyi B**, Paul D, Bloomfield SA (2014) Gap junction-mediated death of retinal neurons is connexin and insult specific: a potential target for neuroprotection. *Journal of Neuroscience* 34(32):10582-10591.
- Ammermüller J, Kolb H (1995) The organization of the turtle inner retina. I. ON- and OFF-center pathways. *Journal of Comparative Neurology* 358:1-34.
- Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, Wu JK, Vrionis FD, SprayDC (2000) Gapjunctions: the “kiss of death”and the “kiss of life.” *Brain Research Reviews* 32:308-315.
- Arnett D, Spraker TE (1981) Cross-correlation analysis of the maintained discharge of rabbit retinal ganglion cells. *Journal of Physiology* 317:29-47.
- Arai I, Tanaka M, Tachibana M (2010) Active roles of electrically coupled bipolar cell network in the adult retina. *Journal of Neuroscience* 30(27):9260-9270.
- Badea TC, Nathans J (2004) Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *Journal of Comparative Neurology* 480(4):331-351.
- Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, Euler T (2016) The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature* 529(7586):345-350.
- Balogh M, Hilgen G, Sernagor E, **Völgyi B** (2017) Ganglion cell electrical synapses may serve as switches between independent and population coding operation modes in the mammalian retina. *European Retina Meeting 2017* October 5-7, Paris, France.

- Barlow HB (1953) Summation and inhibition in the frog's retina. *Journal of Physiology - London* 119:69-88.
- Beyer BC, Paul DL, Goodenough DA (1990) Connexin family of gap junction proteins. *Journal of Membrane Biology* 116:187-194.
- Bloomfield SA, Dacheux R (2001) Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Progress in Retina and Eye Research* 20(3):351-384.
- Bloomfield SA, **Völgyi B** (2004) Function and plasticity of homologous coupling between All amacrine cells. *Vision Research* 44:3297-3306.
- Bloomfield SA, **Völgyi B** (2007) Response properties of a unique subtype of wide-field amacrine cell in the rabbit retina. *Visual Neuroscience* 24(4):459-469.
- Bloomfield SA, **Völgyi B** (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nature Reviews Neuroscience* 10(7):459-506.
- Bloomfield SA, Xin D (1997) A comparison of receptive-field and tracer-coupling size of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. *Visual Neuroscience* 14:1153-1165.
- Boycott BB, Wässle H (1974) The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *Journal of Physiology - London* 240:397-419.
- Boycott BB, Wässle H (1999) Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 40:1313-1327.
- Brivanlou IH, Warland DK, Meister M (1998) Mechanisms of concerted firing among retinal ganglion cells. *Neuron* 20:527-539.
- Caldwell JH, Daw NW (1978) New properties of rabbit retinal ganglion cells. *Journal of Physiology - London* 276:277-298.
- Chow RL, **Völgyi B**, Szilard RK, Ng D, McKerlie C, Bloomfield SA, Birch DG, McInnes RR (2004) Control of late off-center cone bipolar cell differentiation and visual signaling by the homeobox gene *Vsx1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(6):1754-1759.

- Cohen AI (1965) Some electron microscopic observations on inter-receptor contacts in the human and macaque retinae. *Journal of Anatomy* 99:595–610.
- Cohen E, Sterling P (1990) Demonstration of cell types among cone bipolar neurons of cat retina. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*. 330(1258):305-321.
- Contini M, Raviola E (2003) GABAergic synapses made by a retinal dopaminergic neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(3):1358-1363.
- Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM (2006) Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience* 140:123-136.
- Dacey DM, Brace S (1992) A coupled network for parasol but not midget ganglion cells in the primate retina. *Visual Neuroscience* 9:279-290.
- Dacheux RF, Raviola E (1982) Horizontal cells in the retina of the rabbit. *Journal of Neuroscience* 2:1486-1493.
- Dacheux RF, Raviola E (1986) The rod pathway in the rabbit retina: A depolarizing bipolar and amacrine cell. *Journal of Neuroscience* 6:331-345.
- Dartnall HJA, Bowmaker JK, Mollon JD (1983) Human visual pigments: Microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proceedings of the Royal Society of London B* 220:115-130.
- Deans MR, Gibson JR, Sellitto C, Connors BW, Paul DL (2001) Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron* 31(3):477-485.
- Deans MR, **Völgyi B**, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL (2002) Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* 36:703-712.

- Debertin G, Kántor O, Kovács-Öller T, Balogh L, Szabó-Meleg E, Orbán J, Nyitrai M, **Völgyi B** (2015a) Tyrosine hydroxylase positive perisomatic rings are formed around various amacrine cell types in the mammalian retina. *Journal of Neurochemistry* 134(3):416-428.
- Debertin G, Kántor O, Kovács-Öller T, Balogh L, Szabó-Meleg E, Orbán J, Nyitrai M, **Völgyi B** (2015b) Tyrosine hydroxylase positive perisomatic rings are action sites for both dopamine and gaba to target a mixed population of amacrine cells. *European Retina Meeting 2015 Brighton*.
- Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, Vandenabeele P, Rogiers V, Leybaert L (2009) Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell Death & Differentiation* 16:524 –536.
- DeVRies SH (1999) Correlated firing in rabbit retinal ganglion cells. *Journal of Neurophysiology* 81:908-920.
- Dowling JE, Ripps H (1970) Visual adaptation in the retina of skate. *Journal of General Physiology* 56:491-520.
- Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T (2014) Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nature Reviews Neuroscience* 15(8):507-519.
- Fain GL, Dowling JE (1973) Intracellular recordings from single rods and cones in the mudpuppy retina. *Science* 180:1178-1181.
- Famiglietti EV (1992a) Polyaxonal amacrine cells of rabbit retina: morphology and stratification of PA1 cells. *Journal of Comparative Neurology* 316:391-405.
- Famiglietti EV (1992b) Polyaxonal amacrine cells of rabbit retina: size and distribution of PA1 cells. *Journal of Comparative Neurology* 316:406-421.
- Farajian R, Pan F, Akopian A, **Völgyi B**, Bloomfield SA (2011) Masked excitatory crosstalk between the ON and OFF visual pathways in the mammalian retina. *Journal of Physiology – London* 589:1-17.

- Farrow K, Masland RH (2011) Physiological clustering of visual channels in the mouse retina. *Journal of Neurophysiology* 105:1516-3150.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R (2001) Expression of neuronal connexin36 in All amacrine cells of the mammalian retina. *Journal of Neuroscience* 21:230-239.
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, Ammermüller J, Weiler R (2004) Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *Journal of Neuroscience* 24:3325-3334.
- Gallego A (1971) Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision Research* 3, S33-50.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H (2004) Types of bipolar cells in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 469:70-82.
- Goodenough DA, Revel JP (1970) A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *Journal of Cell Biology* 45:272-290.
- Greschner M, Shlens J, Bakolitsa C, Field GD, Gauthier JL, Jepson LH, Sher A, Litke AM, Chichilnisky EJ (2011) Correlated firing among major ganglion cell types in primate retina. *Journal of Physiology* 589:75-86.
- Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K (2000) Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 425:193-201.
- Güldenagel M, Ammermüller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Söhl G, Willecke K, Weiler R (2001) Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *Journal of Neuroscience* 21:6036-6044.
- Han Y, Massey SC (2005) Electrical synapses in retinal ON cone bipolar cells: subtype-specific expression of connexins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:13313-13318.

- Hartline HK (1938) The response of the single optic fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *American Journal of Physiology* 121:400-415.
- Haverkamp S, Haeseleer F, Hendrickson A (2003) A comparison of immunocytochemical markers to identify bipolar cell types in human and monkey retina. *Visual Neuroscience* 20:589-600.
- Hecht S, Schlaer S, Pirenne MH (1942) Energy, quanta, and vision. *Journal of General Physiology* 25:819-840.
- Hicks D, Curtois Y (1992) Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation *in vitro*. *Journal of Neuroscience* 12:2022-2033.
- Hidaka S, Akahori Y, Kurosawa Y (2004) Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience* 24:10553-10567.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K (2004) Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *European Journal of Neuroscience* 19:2633-2640.
- Horton JC, Sherk H (1984) Receptive field properties in the cat's lateral geniculate nucleus in the absence of ON-center retinal input. *Journal of Neuroscience* 4:374-380.
- Hornstein EP, Verweij J, Schnapf JL (2004) Electrical coupling between red and green cones in primate retina. *Nature Neuroscience* 7:745–750.
- Hu EH, Bloomfield SA (2003) Gap junctional coupling underlies the short-latency spike synchrony of retinal alpha ganglion cells. *Journal of Neuroscience* 23:6768-6777.
- Hu HE, Pan F, **Völgyi B**, Bloomfield SA (2010) Light increases the gap junctional coupling of retinal ganglion cells. *Journal of Physiology - London* 588:4145-4163.
- Huxlin KR, Goodchild AK (1997) Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification. *Journal of Comparative Neurology* 385:309-323.

- Kántor O, Benkő Z, Énzsöly A, Dávid C, Naumann A, Nitschke R, Szabó A, Pálfi E, Orbán J, Nyitrai M, Németh J, Szél Á, Lukáts Á, **Völgyi B** (2016a) Characterization of connexin36 gap junctions in the human outer retina. *Brain Structure and Function* 221(6):2963–2984.
- Kántor O, Mezey S, Adeghate J, Naumann A, Nitschke R, Énzsöly A, Szabó A, Lukáts Á, Németh J, Somogyvári Z, Völgyi B (2016b) Calcium buffer proteins are specific markers of human retinal neurons. *Cell Tissue Research* 365(1):29-50.
- Kántor O, Varga A, Nitschke R, Naumann A, Énzsöly A, Lukáts Á, Szabó A, Németh J, **Völgyi B** (2017) Bipolar cell gap junctions serve major signaling pathways in the human retina. *Brain Structure and Function* 222(6):2603-2624.
- Kolb H (1970) Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: Electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 258:261-283.
- Kolb H (1974) The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: Electron microscopy of Golgi preparations. *Journal of Comparative Neurology* 155:1-14.
- Kolb, H. (1977) The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *Journal of Neurocytology* 6:131–153.
- Kolb H, Famiglietti EV (1974) Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science* 186:47-49.
- Kolb H, Famiglietti EV (1976) Rod and cone pathways in the retina of the cat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 15:935-946.
- Kolb H, Mariani A, Gallego A (1980) A second type of horizontal cell in the primate retina. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological* 255:177-184.
- Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH (2005) Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *Journal of Comparative Neurology* 489:293-310.

- Kothmann WW, Massey SC, O'Brien J (2009) Dopamine-stimulated dephosphorylation of connexin36 mediates All amacrine cell uncoupling. *J Neuroscience* 29(47):14903-14911.
- Kovács-Öller T, Raics K, Orbán J, Nyitrai M, **Völgyi B** (2014) Developmental changes in the expression level of connexin36 in the rat retina. *Cell & Tissue Research* 358(2):289-302.
- Kovács-Öller T, Debertin G, Balogh M, Ganczer A, Orbán J, Nyitrai M, Balogh L, Kántor O, **Völgyi B** (2017) connexin36 expression in the mammalian retina: a multiple-species comparison. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:65.
- Kuffler SW (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of Neurophysiology* 16:37-68.
- Kumar NM, Gilula NM (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.
- Lee EJ, Han JW, Kim HJ, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH (2003) The immunocytochemical localization of connexin 36 at rod and cone gap junctions in the guinea pig retina. *European Journal of Neuroscience* 18:2925-2934.
- Lettvin JY, Maturana HR, Pitts WH, McCulloch WS (1961) Two Remarks On The Visual System Of The Frog. In: Rosenblith WA. (ed) *Sensory Communication*. John Wiley, New York, pp: 757-776.
- Leznik E, Llinas R (2005) Role of gap junctions in synchronized neuronal oscillations in the inferior olive. *Journal of Neurophysiology* 94:2447-2456.
- Lin B, Jakobs TC, Masland RH (2005) Different functional types of bipolar cells use different gap-junctional proteins. *Journal of Neuroscience* 25:6696-6701.
- Manookin MB, Patterson SS, Linehan CM (2018) Neural mechanisms mediating motion sensitivity in parasol ganglion cells of the primate retina. *Neuron* 97(6):1327-1340.

- Marc RE, Liu WL, Muller JF (1988) Gap junctions in the inner plexiform layer of the goldfish retina. *Vision Research* 28:9-24.
- Massey SC, O'Brien JJ, Trexler EB, Li W, Keung JW, Mills SL, O'Brien J (2003) Multiple neuronal connexins in the mammalian retina. *Cell Communication & Adhesion* 10:425-430.
- Mastronarde DN (1983a) Correlated firing of cat retinal ganglion cells. I. Spontaneously active inputs to X- and Y-cells. *Journal of Neurophysiology* 49:303-324.
- Mastronarde DN (1983b) Correlated firing of cat retinal ganglion cells. II. Responses of X- and Y-cells to single quantal events. *Journal of Neurophysiology* 49:325-349.
- Mastronarde DN (1983c). Interactions between ganglion cells in cat retina. *Journal of Neurophysiology* 49:350-365.
- Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermüller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Krüger O, Willecke K, Weiler R (2005) Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between All amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *Journal of Neuroscience* 25:566-576.
- Meister M (1996) Multineuronal codes in retinal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:609-614.
- Mills SL (1999) Unusual coupling patterns of a cone bipolar cell in the rabbit retina. *Visual Neuroscience* 16(6):1029-1035.
- Mills SL, Massey SC (1995) Differential properties of two gap junctional pathways made by All amacrine cells. *Nature* 377:734-737.
- Mills SL, O'Brien JJ, Li W, O'Brien J, Massey SC (2001) Rod pathways in the mammalian retina use connexin 36. *Journal of Comparative Neurology* 436:336-350.

- Müller LP, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Meyer A, Kreuzberg MM, Lorenz S, Willecke K, Weiler R (2010) Expression and modulation of connexin 30.2, a novel gap junction protein in the mouse retina. *Visual Neuroscience* 27(3-4):91-101.
- Münch TA, da Silveira RA, Siegert S, Viney TJ, Awatramani GB, Roska B (2009) Approach sensitivity in the retina processed by a multifunctional neural circuit. *Nature Neuroscience* 12(10):1308-1316.
- Nawy S, Jahr CE (1990) Time-dependent reduction of glutamate current in the retinal bipolar cells. *Neuroscience Letters* 108:279-283.
- Nelson R (1977) Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 172:109-135.
- Nelson R, Kolb H, Famiglietti EV, Gouras P (1976) Neural responses in the rod and cone systems of the cat retina: Intracellular recordings and Porcion stains. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 15:946-953.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225(4667):1174-1175.
- O'Brien JJ, Li W, Pan F, Keung J, O'Brien J, Massey SC (2006) Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina. *Journal of Neuroscience* 26:11624-11636.
- O'Brien JJ, Chen X, Macleish PR, O'Brien J, Massey SC (2012) Photoreceptor coupling mediated by connexin36 in the primate retina. *Journal of Neuroscience* 32(13):4675-87.
- Olveczky BP, Baccus SA, Meister M (2003) Segregation of object and background motion in the retina. *Nature* 423(6938):401-408.
- Osterhout JA, Josten N, Yamada J, Pan F, Wu S, Nguyen PL, Panagiotakos G, Inoue YU, Egusa SF, **Völgyi B**, Inoue T, Bloomfield SA, Barres BA, Berson DM, Feldheim

- DA, Huberman AD (2011) Cadherin-6 mediates axon-target matching in a non-image-forming visual circuit. *Neuron* 71:632–639.
- Pan F, Paul DL, Bloomfield SA, **Völgyi B** (2010) Connexin36 is required for gap junctional coupling of most ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 518:911-927.
- Pan F, Toychiev A, Zhang Y, Atlasz T, Ramakrishnan H, Roy K, **Völgyi B**, Akopian A, Bloomfield SA (2016) Inhibitory masking controls the threshold sensitivity of retinal ganglion cells. *Journal of Physiology – London* 594(22):6679-6699.
- Peichl L (1989) Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *Journal of Comparative Neurology* 286:120-139.
- Peichl L, González-Soriano J (1994) Morphological types of horizontal cell in rodent retinæ: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Visual Neuroscience* 11:501-517.
- Peichl L, Ott H, Boycott BB (1987) Alpha ganglion cells in mammalian retinæ. *Proceedings of the Royal Society of London B* 231:169-197.
- Penn AA, Wong RO, Shatz CJ (1994) Neuronal coupling in the developing mammalian retina. *Journal of Neuroscience* 14:3805-3815.
- Perlman AL, Daw NW (1970) Opponent color cells in the cat laterale geniculate nucleus. *Science* 167:84-86.
- Petrasch-Parwez E, Habbes HW, Weickert S, Löbbecke-Schumacher M, Striedinger K, Wiczorek S, Dermietzel R, Epplen JT (2004) Fine-structural analysis and connexin expression in the retina of a transgenic model of Huntington's disease. *Journal of Comparative Neurology* 479:181-197.
- Polyak SL (1941) *The Retina*. University of Chicago Press, Chicago.
- Ramon y Cajal S (1893) La rétine des vertébrés. *Cellule* 9:17-257.

- Raviola E, Gilula NB (1973) Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 70:1677-1681.
- Raviola E, Gilula NB (1975) Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *Journal of Cell Biology* 65:192-222.
- Rodieck RW (1988) The primate retina. *Comparative Primate Biology* 4:203-278.
- Roska B, Werblin F (2003) Rapid global shifts in natural scenes block spiking in specific ganglion cell types. *Nature Neuroscience* 6(6):600-608.
- Roy K, Kumar S, Bloomfield SA (2017) Gap junctional coupling between retinal amacrine and ganglion cells underlies coherent activity integral to global object perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 114(48):10484-E10493.
- Sanes JR, Masland RH (2015) The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annual Reviews of Neuroscience* 38:221-246.
- Schiller PH (1992) The ON and OFF channels of the visual system. *Trends in Neuroscience* 15:86-92.
- Schneeweis DM, Schnapf JL (1995) Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science* 268:1053-1056.
- Schubert T, Degen J, Willecke K, Hormuzdi SG, Monyer H, Weiler R (2005a) Connexin36 mediates gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 485:191-201.
- Schubert T, Maxeiner S, Kruger O, Willecke K, Weiler R (2005b) Connexin45 mediates gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 490:29-39.

- Schultze M (1866) Zur Anatomie und Physiologie der Retina. Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik 2:165-286.
- Seabrook TA, Burbridge TJ, Crair MC, Huberman AD (2017) Architecture, function, and assembly of the mouse visual system. Annual Reviews of Neuroscience 40:499-538.
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R (2006) Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. European Journal of Neuroscience 23:3176-3186.
- Shkolnik-Yarros EG, Podugolnikova TA (1977) Bipolar cells of the frog retina: A Golgi study. Vision Research 18:301-310.
- Slaughter MM, Miller RF (1981) 2-amino-4-phosphobutyric acid: A new pharmacological tool for the retina research. Science 211:182-185.
- Smith RG, Vardi N (1995) Simulation of the AII amacrine cell of mammalian retina: functional consequences of electrical coupling and regenerative membrane properties. Visual Neuroscience 12:851-860.
- Stafford DK, Dacey DM (1997) Physiology of the A1 amacrine: a spiking, axon-bearing interneuron of the macaque monkey retina. Visual Neuroscience 14:507-522.
- Stell WK (1965) Discussion. In The Structure of the Eye, Vol. 2: Symposium. J. W. Rohen (ed.), Schattauer-Verlag, Stuttgart. pp27-28.
- Stell WK (1967) The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. American Journal of Anatomy 121, 401-433.
- Stell WK, Ishida AT, Lightfoot DO (1977) Structural basis for on- and off-center response in the retinal bipolar cells. Science 198:1269-1271.
- Sun W, Li N, He S (2002) Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. Journal of Comparative Neurology 451:115-126.

- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311:233-235.
- Tsukamoto Y, Masarachia P, Schein SJ, Sterling P (1992). Gap junctions between the pedicles of macaque foveal cones. *Vision Research* 32:1809–1815.
- Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P (2001) Microcircuits for the night vision in mouse retina. *Journal of Neuroscience* 21:8616–8623.
- Vaney DI (1991) Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin. *Neuroscience Letters* 125:187-190.
- Vaney DI (1994) Territorial organization of direction-selective ganglion cells in rabbit retina. *Journal of Neuroscience* 14:6301-6316.
- Vaney DI (1997) Neuronal coupling in rod-signal pathways of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38(2):267-273.
- Van Haesendonck E, Missotten L (1983) Interbipolar contacts in the dorsal inner plexiform layer in the retina of *Callionymus lyra* L. *Journal of Ultrastructure Research* 83(3):303-311.
- Völgyi B**, Bloomfield S (2000) Effects of GABA-blockers on the response properties of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Neuroscience* 41(Suppl.):3286.
- Völgyi B**, Xin D, Amarillo Y, Bloomfield SA (2001) Morphology and physiology of the polyaxonal amacrine cells in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 440:109-125.
- Völgyi B**, Bloomfield SA (2002) Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 453(3):269-279.
- Völgyi B**, Deans MR, Paul DL, Bloomfield SA (2004) Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *Journal of Neuroscience* 24:11182-11192.

- Völgyi B**, Abrams J, Paul DL, Bloomfield SA (2005) Morphology and tracer coupling pattern of alpha ganglion cells in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 492:66-77.
- Völgyi B**, Chheda S, Bloomfield SA (2009) Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 512:664-687.
- Völgyi B**, Pan F, Paul DL, Wang JT, Huberman AD, Bloomfield SA. (2013a) Gap junctions are essential for generating the correlated spike activity of neighboring retinal ganglion cells. *PLOS ONE*. 8(7):e69426.
- Völgyi B**, Kovács-Öller T, Atlasz T, Wilhelm M, Gábel R. (2013b) Gap junctional coupling in the vertebrate retina: Variations on one theme? *Progress In Retina And Eye Research* 34:1-18.
- Völgyi B**, Debertin G, Balogh M, Popovich E, Kovács-Öller T (2014) Compartment-specific tyrosine hydroxylase-positive innervation to All amacrine cells in the rabbit retina. *Neuroscience* 270:88-97.
- Walls G.L. (1942) *The Vertebrate Eye and its Radaptive Radiation*. Hafner, New York.
- Walter AE, Shuster TA, Farber DB (1986) Light-induced phosphorylation of proteins from the all-cone retina of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 27:1609-1614.
- Wässle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews* 71:447-480.
- Werblin FS, Dowling JE (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recordings. *Journal of Neurophysiology* 32:339-355.
- Witkovsky P, Zhang J, Blam O (1994) Dopaminergic neurons in the retina of *Xenopus laevis*: Amacrine vs. interplexiform subtypes and relation to bipolar cells. *Cell and Tissue Research* 278:45-46.

Witkovsky P, Arango-Gonzalez B, Haycock JW, Kohler K (2005) Rat retinal dopaminergic neurons: differential maturation of somatodendritic and axonal compartments. *Journal of Comparative Neurology* 481(4):352-362.

Xin D, Bloomfield SA (1997) Tracer coupling pattern of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 383:512-528.

Zhang AJ, Wu SM (2009) Receptive fields of retinal bipolar cells are mediated by heterogeneous synaptic circuitry. *Journal of Neuroscience* 29:789-797.

9. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Ackert JM, Farajian R, **Völgyi B**, Bloomfield SA (2009) GABA blockade unmasks an OFF response in ON direction selective ganglion cells in the mammalian retina. *Journal of Physiology - London* 587:(Pt 18) pp. 4481-4495.

Akopian A, Atlasz T, Pan F, Wong S, Zhang Y, **Völgyi B**, Paul D, Bloomfield SA. (2014) Gap junction-mediated death of retinal neurons is connexin and insult specific: a potential target for neuroprotection. *Journal of Neuroscience* 34(32):10582-10591.

Bloomfield SA, **Völgyi B** (2004) Function and plasticity of homologous coupling between All amacrine cells. *Vision Research* 44:3297-3306.

Bloomfield SA, **Völgyi B** (2007) Response properties of a unique subtype of wide-field amacrine cell in the rabbit retina. *Visual Neuroscience* 24(4):459-469.

Bloomfield SA, **Völgyi B** (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nature Reviews Neuroscience* 10:(7) pp. 459-506.

Chow RL, **Völgyi B**, Szilard RK, Ng D, McKerlie C, Bloomfield SA, Birch DG, McInnes RR (2004) Control of late off-center cone bipolar cell differentiation and visual signaling by the homeobox gene *Vsx1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(6):1754-1759.

Deans MR, **Völgyi B**, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL (2002) Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* 36:703-712.

Debertin G, Kántor O, Kovács-Öller T, Balogh L, Szabó-Meleg E, Orbán J, Nyitrai M, **Völgyi B**. (2015) Tyrosine hydroxylase positive perisomatic rings are formed around various amacrine cell types in the mammalian retina. *Journal of Neurochemistry* 134 (3):416-428.

- Farajian R, Pan F, Akopian A, **Völgyi B**, Bloomfield SA (2011) Masked excitatory crosstalk between the ON and OFF visual pathways in the mammalian retina. *Journal of Physiology – London* 589:1–17.
- Hu HE, Pan F, **Völgyi B**, Bloomfield SA (2010) Light increases the gap junctional coupling of retinal ganglion cells. *Journal of Physiology - London* 588:4145-4163.
- Kántor O, Benkő Z, Énzsöly A, Dávid C, Naumann A, Nitschke R, Szabó A, Pálfi E, Orbán J, Nyitrai M, Németh J, Szél Á, Lukáts Á, **Völgyi B** (2016a) Characterization of connexin36 gap junctions in the human outer retina. *Brain Structure and Function* 221(6):2963–2984.
- Kántor O, Mezey S, Adeghate J, Naumann A, Nitschke R, Énzsöly A, Szabó A, Lukáts Á, Németh J, Somogyvári Z, **Völgyi B** (2016b) Calcium buffer proteins are specific markers of human retinal neurons. *Cell & Tissue Research* 365(1):29-50.
- Kántor O, Varga A, Nitschke R, Naumann A, Énzsöly A, Lukáts Á, Szabó A, Németh J, **Völgyi B** (2017) Bipolar cell gap junctions serve major signaling pathways in the human retina. *Brain Structure and Function* 222(6):2603-2624.
- Kovács-Öller T, Raics K, Orbán J, Nyitrai M, **Völgyi B** (2014) Developmental changes in the expression level of connexin36 in the rat retina. *Cell & Tissue Research* 358(2):289-302.
- Kovács-Öller T, Debertin G, Balogh M, Ganczer A, Orbán J, Nyitrai M, Balogh L, Kántor O, **Völgyi B** (2017) Connexin36 expression in the mammalian retina: a multiple-species comparison. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:65.
- Osterhout JA, Josten N, Yamada J, Pan F, Wu S, Nguyen PL, Panagiotakos G, Inoue YU, Egusa SF, **Völgyi B**, Inoue T, Bloomfield SA, Barres BA, Berson DM, Feldheim DA, Huberman AD (2011) Cadherin-6 Mediates Axon-Target Matching in a Non-Image-Forming Visual Circuit. *Neuron* 71:632–639.
- Pan F, Paul DL, Bloomfield SA, **Völgyi B** (2010) Connexin36 is required for gap junctional coupling of most ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 518:911-927.

- Pan F, Toychiev A, Zhang Y, Atlasz T, Ramakrishnan H, Roy K, **Völgyi B**, Akopian A, Bloomfield SA. (2016) Inhibitory masking controls the threshold sensitivity of retinal ganglion cells. *Journal of Physiology – London* 594(22):6679-6699.
- Völgyi B**, Bloomfield S (2000) Effects of GABA-blockers on the response properties of amacrine and ganglion cells in the rabbit retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Neuroscience* 41(Suppl.):3286.
- Völgyi B**, Bloomfield SA (2002) Axonal neurofilament-H immunolabeling in the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 453(3):269-279.
- Völgyi B**, Xin D, Amarillo Y, Bloomfield SA (2001) Morphology and physiology of the polyaxonal amacrine cells in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 440:109-125.
- Völgyi B**, Xin D, Bloomfield SA. (2002) Feedback inhibition in the inner plexiform layer underlies the surround-mediated responses of All amacrine cells in the mammalian retina. *Journal of Physiology - London* 539:(Pt. 2) pp. 603-614.
- Völgyi B**, Deans MR, Paul DL, Bloomfield SA (2004) Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *Journal of Neuroscience* 24:11182-11192.
- Völgyi B**, Abrams J, Paul DL, Bloomfield SA (2005) Morphology and tracer coupling pattern of alpha ganglion cells in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 492:66-77.
- Völgyi B**, Chheda S, Bloomfield SA (2009) Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 512:664-687.
- Völgyi B**, Pan F, Paul DL, Wang JT, Huberman AD, Bloomfield SA (2013a) Gap junctions are essential for generating the correlated spike activity of neighboring retinal ganglion cells. *PLOS ONE.* 8(7):e69426.

Völgyi B, Kovács-Öller T, Atlasz T, Wilhelm M, Gábrriel R. (2013b) Gap junctional coupling in the vertebrate retina: Variations on one theme? Progress In Retina And Eye Research 34:1-18.

Völgyi B, Debertin G, Balogh M, Popovich E, Kovács-Öller (2014) Compartment-specific tyrosine hydroxylase-positive innervation to All amacrine cells in the rabbit retina. Neuroscience 270:88-97.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

E doktori mű mintegy 25 év szakmai munkájának eredményeit foglalja magába. Ez idő alatt munkámat sokan segítették, elsősorban nekik szeretném megköszönni azt, hogy lehetővé tették ennek az értekezésnek a létrejöttét.

Köszönöm Dr. Toldi József egyetemi tanárnak (SZTE, Szeged), hogy TDK hallgatóként kutatói pályámon elindított és a későbbiekben is számos esetben segítségemre volt.

Hálás vagyok Dr. Gábrriel Róbert egyetemi tanárnak (Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola vezetője; PTE, Pécs), hogy 1995 és 1999 között PhD témavezetőként segített szakmai előremenetelemben. Megismerttetett azzal a témakörrel, amely mai napig fő kutatási területem, külföldi kapcsolatai révén segített posztdoktori pozícióba kerülőm a téma egyik vezető laboratóriumában, végül pedig lehetővé tette hazatelepülésemet és a külföldi szakmai tapasztalatok itthoni kamatoztatását.

Köszönöm Dr. Stewart Bloomfield professzornak (korábban New York University New York; most City University of New York, Optometry, New York), hogy témavezetőként megtanított az önálló kísérletes munkára és tudományos gondolkodásra. Későbbiekben Dr. Bloomfield segítségével meghatározó volt abban is, hogy mint fiatal kutató megszervezhessem és elindíthassam önálló laboratóriumomat.

Köszönet illeti Dr. Rodolfo Llinas professzort (NYU, New York), amiért a posztdoktori éveket követő fiatal kutatói időszakban tanszékén helyet biztosított laboratóriumom számára és szakmai tanácsaival segítette munkámat.

Köszönöm a PTE Biológiai Intézet és a Szentágothai Kutató Központ munkatársainak mind a szakmai, mind az adminisztratív munkában nyújtott segítségüket.

Munkatársaim közül külön köszönettel tartozom Dr. Csoknya Mária egyetemi tanárnak, „Tanárnőnek”, hogy pályám során a nagy erőpróbák idején folyamatosan lelket öntött belém, és hogy a jelen értekezéshez – csakúgy, mint a korábbi habilitációs és PhD dolgozat születésekor – elengedhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Atlasz Tamás docensnek, Dr. Kántor Orsolya adjunktusnak, Dr. Fang Pan, Dr. Yee Zhang, Dr. Kovács-Öller Tamás és Dr. Debertain Gábor posztdoktori munkatársaknak, Ganczer

Alma és Tengölics Ádám PhD hallgatóknak, Balogh Márton, Albert László és Szarka Gergely TDK hallgatóknak állhatatos és precíz munkájukért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni feleségemnek, Ildikónak, hogy végtelen türelmével, figyelmességével és odaadásával lehetővé tette számomra az elmúlt évek folyamatos kutató munkáját és disszertációm létrejöttét.