

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

**Dr. Völgyi Béla PhD.**

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

PÉCS, 2018

## BEVEZETÉS

A látás a legfontosabb szenzoros folyamatunk, melynek során a retina segítségével a külvilág ingereinek 85%-át érzékeljük. Hasonlóan a fényképezőgépek CCD vagy CMOS chip-jeihez az emberi retina 130 millió fotoreceptora a tér egy-egy részletének fényváltozásait érzékeli. A nyers formátumú pixel-regisztrált adatok hatalmas adattömegének hatékony továbbítása érdekében annak töredékére való tömörítésére van szükség. A fotoreceptorok mintegy 130 megapixelnyi információját az alig 3 mm átmérőjű látóidegen keresztül kell időben folyamatosan továbbítani az agy felé. Az adattömeg ilyen mértékű csökkentésének kiemelten fontos feladata az ideghártya interneuronjaira (a horizontális-, bipoláris- és amakrin sejtekre) hárul. Ezek közreműködésével a kimeneti dúcsejtek már nem a pixelinformációt, hanem komplex mintázatinformációt (luminancia- vagy szín-kontraszt, orientáció, mozgás, mozgás iránya, sötétedés stb.) küldenek az agy felé, így a dúcsejtek egyben a látórendszer párhuzamos információs csatornáinak kiindulási pontjai is. A neurobiológia alapvető feladata, hogy feltárja a rendkívüli mértékű tömörítési mechanizmusban részt vevő retinális interneuron-hálózatokat. Adattömörítésre ad lehetőséget a dúcsejtek multiplex üzemmódja, melynek segítségével egyazon sejt a látott kép egyes aspektusait egymástól függetlenül (aszinkron), másokat pedig a szomszédos dúcsejtek között szinkronizált akciós potenciálok formájában kódolják. Az utóbbi szinkronizációs mechanizmusok sarokkövei a dúcsejtek által létesített elektromos szinapszisok (réskapcsolatok), amelyek a jelen disszertáció vizsgálati objektumai.

## CÉLKITŰZÉS

1. Elektromos szinapszisok szerepének bemutatása az információ feldolgozásában és továbbításában az emlős retina párhuzamos pályarendszerein.
2. A dúc-dúc, dúc-amakrin és amakrin-amakrin sejtek közti elektromos szinapszisok szerkezetének és eloszlásának vizsgálata, valamint a párhuzamos retina-agy csatornák kezdetét jelentő dúcsejt-szignál kialakításában betöltött szerepük meghatározása.
3. A retinális elektromos szinapszisoknak a képi információ továbbításában betöltött szerepének vizsgálata.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**A KÍSÉRLETEKHEZ HASZNÁLT ÁLLATOK:** A kísérleti állatok többségében nyúl, patkány és egér voltak. Az altatást IP Nembutal vagy etil karbamát injekcióval végeztük. Kísérleteinket vagy az NIH előírások vagy pedig a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága (BA02/2000-6/2006) által jóváhagyott, az állatok kezelésére vonatkozó engedély alapján végeztük. A kezelések minden tekintetben megfeleltek az "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" feltételeinek. Az izolált szemekből *in-vitro* retina preparátumot készítettünk, melyet egy fiziológias kamrával együtt a Faraday-ketrecben található mikroszkóp tárgyasztalára helyeztünk. A

preparátumot folyamatosan oxigenizált 35°C-os Ringer oldattal áramoltattuk. Az összehasonlító vizsgálatokhoz tengerimalac, aranyhórcsög, birka, macska, kutya, vadászgörény, mókusmajom, sertés, valamint humán szövetet használtunk. Az utóbbi szöveteket Dr. Kántor Orsolya (Bp., SE-ÁOK) biztosította.

**AZ IN-VITRO RETINA PREPARÁTUM FÉNYSTIMULÁCIÓJA:** A fénystimulusok homogén, zöld ( $\lambda=468$  nm) LED vagy természetes fénystimulusok (szoftver segítségével számítógépen előállított és a preparátumra vetített kép) voltak.

**A PREPARÁTUMOKON VÉGZETT NEUROBIOTIN IONTOFORÉZIS ÉS INTRACELLULÁRIS ELVEZETÉS:** Az intracelluláris elvezetések boroszilikát üvegkapillárisból húzott magas ellenállású mikroelektrodával történtek. Az elektrodákat Neurobiotinnal és 4 M KCl sóoldattal töltöttük fel. Fiziológiai méréseket követően a vizsgált sejteket Neurobiotinnal 10 percig iontoforetizáltuk.

**EXTRACELLULÁRIS ELVEZETÉS AZ IN-VITRO RETINA PREPARÁTUMON:** Az extracelluláris akciós potenciál elvezetések egy részét wolfram elektrodával, más részét sokelektrodás 'multi electrode array' (MEA és HD-MEA) rendszerekkel végeztük, melyek 60, 120 és 4096 csatornán történő akciós potenciál sorozatok elvezetését tették lehetővé.

**SZÖVETTANI ÉS IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK:** A retinákat hideg 4% paraformaldehidben fixáltuk. Mosás után vagy DAB/peroxidáz- vagy Streptavidin konjugálta FITC vagy Cy3 kezelés történt. Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz egy éjszakán át a primér antitest(ek) elegyével, majd mosást követően FITC, Cy3 vagy Alexa konjugátumot tartalmazó másodlagos antitestekkel inkubáltunk, végül a retinákat Vectashield-del lefedtük.

**POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓS VIZSGÁLATOK:** A -80°C-on tárolt mintákat homogenizáltuk, majd totál RNS extrakciót végeztünk. A primereket az adott génekre terveztük és OneStep RT-PCR-vel validáltuk. A qPCR mérésekhez cDNS-t állítottunk elő, a reakciókban minden mintát triplikáltunk, az amplifikáció 45 ciklusos volt Rpl13a endogén kontrollal.

**WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK:** A retinákat hideg RIPA pufferrel homogenizáltuk. A fehérje koncentrációját bicinchoninic-acid protein assay kittel határoztuk meg, poliakrilamid gélen futtattuk, félszáraz PVDF membránra blottoltuk, majd tejporos blokkolást követően elsődleges antitest(ek)el jelöltük. A mintákat HRP konjugált antitestet tartalmazó eleggyel inkubáltunk, majd kemilumineszcenciával detektáltuk, 600 dpi felbontásban digitalizáltuk és az endogén kontroll  $\beta$ -tubulinnal hasonlítottuk össze.

**MIKROSKÓPIOS VIZSGÁLATOK:** Az immuncitokémiai jelek regisztrálását LSM 510, LSM 710 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal, valamint Zeiss Elyra Structured Illumination (SIM) típusú szuperrezolúciós mikroszkóppal végeztük.

**STATISZTIKAI ANALÍZIS:** Az adatok statisztikai analízisét vagy Origin 6 vagy SPSS 19 szoftverrel végeztük, a szignifikancia szintek meghatározására egytényezős ANOVA analízist vagy Student-féle t-próbát használtunk.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

### ELEKTROMOS SZINAPSZISOK AZ EMLŐS RETINA PÁRHUZAMOS PÁLYARENDSZEREIBEN

#### ***Réskapcsolatok a csap pályarendszerben***

Kísérleti eredményeink segítségével bemutattuk, hogy a párhuzamos csap információs pályák több szinten is érintkeznek egymással elektromos szinapszisokon keresztül. Ezek egyike a csapok között kialakuló elektromos szinapszis, melyről riporter gént hordozó egerek segítségével kimutattuk, hogy Cx36 alegységekből épül fel. A csap fotoreceptorok mellett csap bipoláris és All amakrin sejtek is bizonyítottan pozitívak voltak a marker génre. A csapok közötti elektromos szinaptikus kapcsolatok feltehetően a szomszédos csapok impulzusainak átlagolását, ezzel a jel-zaj viszony javítását szolgálják. A humán mintákon végzett immunhisztokémiai jelöléseink alapján a kék csapok egymással nem képeznek elektromos szinapszisokat, de a zöld és piros csapok igen. Egy másik kísérletsorozattal bizonyítottuk a Cx36 jelenlétét a humán retina csap-csap elektromos szinapszisaiban is. Megfigyeltük azt is, hogy a csap-bipoláris sejtek dendritikus nyúlványai a bipoláris-bipoláris elektromos szinaptikus kapcsolatok két típusát hozzák létre. Az egyik a csapok talpai alatti eltérő típusú bipoláris dendrit végződéseket köti össze, melyekről feltételezzük, hogy a közös csap receptor felől induló különböző funkciójú csatornák információját szinkronizálja. A másik bipoláris réskapcsolatok hasonló típusú bipoláris sejtek nagyobb dendritágait kötik össze és feltételezzük, hogy ezek az azonos információs csatornához tartozó, de szomszédos csap bipoláris sejteket hangolják össze. A bipoláris sejtek az elektromos szinapszisok egy harmadik csoportját is fenntartják, melyek axon-terminálisaik között jönnek létre. Bemutattuk, hogy az emberi "OFF midget" és "giant bistratified" bipoláris sejtek között ezek a kapcsolatok gyakoriak, igazolva azt a feltevésünket, hogy a párhuzamos pályákon szállított információ már a bipoláris sejtek szintjén keveredhet. Ezek funkciójáról keveset tudunk, de egy új tanulmány szerint fontos a szerepük a főemlős parasol dúcsejtek mozgásérzékenységének kialakításában.

#### ***Réskapcsolatok a pálcika pályarendszerben***

A pálcikák által felfogott információ egyetlen ON polaritású pálcika bipoláris sejtítípushoz jut el. A pálcika bipoláris sejtek nem szinaptizálnak közvetlenül dúcsejtekkel, hanem az ún. All amakrin sejtek felé közvetítik az információt. Ezek azután az ON csap bipolárisok axonjaival elektromos szinapszist, az OFF bipoláris sejtek felé pedig glicinerg inhibíciót szolgáltatnak. Az ON és OFF csap bipoláris sejtek végül az ON és OFF dúcsejtek felé továbbítják a pálcikákból származó információt. Ezt a szignálútvonal az elsődleges pálcika receptor eredetű pálya. A másodlagos pálcikapálya esetén a pálcikák aktivitása pálcika-csap réskapcsolatokon át jut a csapokra, majd a konvencionális csappályák segítségével eljut a kimeneti dúcsejtekig. A harmadlagos pálcikapálya esetén egyes pálcika receptorok és bizonyos OFF bipoláris sejtek között jön létre kémiai szinapszis, mely az OFF dúcsejtek egyes típusai számára szintén pálcika információt szállít. Kísérleteinkben vad típusú (WT) és Cx36 knock-out (KO) egerek dúcsejtjeiből regisztráltunk fénystimulus kiváltotta akciós

potenciálokat. A fényerőt fokozatosan növeltük, és meghatároztuk a dúcsejtek küszöbválaszait kontroll körülmények között úgy, hogy különböző farmakológiai módszerekkel blokkoltuk egyik vagy másik pálya működését. Bizonyítottuk, hogy a pálcikapályák nem szelektívek a dúcsejt célpontok tekintetében, hanem azokra konvergálnak és a különböző típusú dúcsejtek fényválaszainak kialakításában ezek különböző mértékben vesznek részt.

Megfigyeltük, hogy míg a vad típusú egér retinájában fényérzékenység alapján három, addig a Cx36 KO egérnél csak egy ON polaritású dúcsejt csoport létezik. Bizonyítottuk, hogy a legérzékletlenebb vad és az összes Cx36 KO ON dúcsejt fénystimulusokkal szembeni küszöb értéke a csappályák érzékenységével egyezik. Tehát az elsődleges és másodlagos pálcikapályák Cx36 függőek, a Cx36 knock-out egerek sötétben nem látnak. Bizonyítottuk azt is, hogy a sötétvakságnak ez a formája az All amakrin sejtek és csap bipolárisok között, valamint a pálcika és csap receptorok végtalpai közötti létrejövő Cx36 tartalmú gap junctionok hiánya miatt alakul ki. Az All sejtek egymással alkotott elektromos szinapszisei esetén megfigyeltük, hogy azok a primér pálcikapálya jel-zaj viszonyát javítják, az OFF dúcsejtek ingerküszöbét csökkentik.

Bizonyítottuk, hogy a fenti Cx36 tartalmú réskapcsolatok jelenléte általános a különböző emlős fajok esetében, beleértve a humán retinát is. Ezek eloszlásában megfigyelhető apró különbségeket az egyes emlős állatok életvitelbeli különbségeire vezettük vissza. Ilyen különbségek voltak a ragadozó és rágcsáló fajok retináiban megfigyelt külső retinális Cx36 plakkok alacsony száma, valamint a tengerimalac és az emlős retina esetén a többi fajénál erőteljesebb szubpedikuláris Cx36 aggregátumok jelenléte.

Patkány retináján végzett egyedfejlődési vizsgálatok során megfigyeltük, hogy az All-All és All-ON csap bipoláris réskapcsolatok a tizedik posztnatális napon jelennek meg. Ugyanakkor a Cx36 fehérje (WB) és az átírásért felelős Cx36 mRNS (qPCR) már a születést követően megfigyelhető a retinában. Valószínű, hogy a korai Cx36 termelés ellenére a működőképes réskapcsolatok kialakítása csak a szemek kinyílását követően indul meg.

Az All amakrin sejtek réskapcsolatainak nyitását a dopamin mediálja, mely a fényadaptáció során szabadul fel a dopaminerg amakrin sejtekből és diffúzióval jut el a többi idegsejthez. A parakrin mechanizmus ellenére az All sejteket elsődleges dopamin célpontnak tekintik, mert a dopamintermelő sejtek axonjai gyűrűszerű szövedéket képeznek az All amakrin sejtek körül. Bizonyítottuk, hogy a dopaminerg sejtek axonjai az All amakrin sejteken egy második támadási ponttal is rendelkeznek a transzverzális nyúlványok eredési pontjánál, ill. a gyűrűszerű beidegzés más amakrin sejtekre is jellemző. Bizonyítottuk, hogy a periszomatikus dopaminerg bemenet révén nemcsak az All-, hanem más típusú amakrin (dúcsejt kapcsolt széles dendritmezejű amakrin sejtek) sejtek réskapcsolatainak kapuzása is szabályozott.

Megfigyeltük, hogy a periszomatikus dopaminerg gyűrűk tartalmaznak VGAT jelölt plakkokat és ezek néha GABAARa1 jelölt posztszinaptikus területtel szemben

helyezkedik el. Ezek gyakorisága nem haladja meg a negatív kontroll mérésekét, ami megkérdőjelezi a periszomatikus gyűrűkről alkotott korábbi elképzelést, miszerint ezek speciális GABA/dopamin felszabadítási területek, axo-szomatikus szinapszisok helyei.

## **A DÚC- ÉS AMAKRIN SEJT RÉSKAPCSOLATOK**

### ***Az amakrin sejtek réskapcsolatai***

Az emlős retina 30-40 különböző amakrin sejt típusa közül a legtöbb réskapcsolatot tart fenn. Kísérleteinkben a széles dendritmezejű és a poliaxonális amakrin sejteket vizsgáltuk. Azt láttuk, hogy a széles dendritmezejű amakrin sejtek körkörös dendritfával rendelkeznek, átmérőik akár a milliméteres nagyságot is elérik, szomszédaikkal réskapcsolatokon keresztül tart kapcsolatot. Leírtuk, hogy a szomszédos sejtek közötti elektromos szinapszisok nem a dendritek végén, hanem főleg a proximális dendriteken helyezkedtek el. Ezek az amakrin sejtek ON és OFF polaritású fényválaszokat is produkáltak, melyek egymástól függetlenek. A széles dendritmezejű amakrin sejteket összekapcsoló homológ elektromos szinapszisokkal kapcsolatban sikerült bizonyítanunk, hogy ezek a sejtek receptív mezőit megnövelik, de egyéb, látásban betöltött funkciójukat egyelőre homály fedi.

A poliaxonális sejtek, ellenben a többi amakrin sejtrel, dendritekkel és axonális nyúlványokkal is rendelkeznek. A poliaxonális sejtek receptív mezői relatíve kicsik voltak. Ezért valószínűsítjük, hogy bemeneteiket csak a dendritek felől kapják, míg az axonális nyúlványok kimenetekként szolgálnak. Ez utóbbi feltevést bizonyítottuk az axonokra jellemző magasan foszforilált neurofilament-H citoskeletális elemek meglétével a poliaxonális sejtek axonjaiban. A poliaxonális sejtek réskapcsolatokat hoznak létre szomszédaikkal, mely kapcsolatok a dendriteken találhatóak. Egyes sejtekről ismert, hogy funkciójuk a gyors szemmozgások alatti dúcsejtszignál blokkolása, az objektum-háttérmozgás elkülönítése ill. a képi folytonosság kódolása. Ugyanakkor nem tisztázott, hogy ezekben a jól körülírható látási funkciókban a sejtek homológ elektromos szinapszisainak milyen szerep jut.

### ***Az egérretina dúcsejtjeinek kategorizálása és tracer-kapcsoltsága***

Kísérleteinkben egérretinában található dúcsejteket töltöttünk fel Neurobiotinnal, majd azokon részletes morfológiai és tracer-kapcsoltsági vizsgálatokat végeztünk. Morfológiai jegyeik alapján sikerült 22 dúcsejt-populációt elkülöníteni, melyek jól összeegyeztethetők voltak korábbi leírásokban található típusokkal. Elsőként jellemeztük ezeket a dúcsejteket réskapcsolataik (megfigyelt tracer-kapcsoltság) alapján. Nyilvánvalóvá vált, hogy a különféle dúcsejt-típusok egymástól különböző, de típuson belül állandó kapcsoltsági mintázatot mutatnak. A leírt 22 dúcsejt-típus közül 16 homológ és/vagy heterológ kapcsoltságot mutatott környező dúc- és amakrin sejt szomszédokkal. A kapcsoltsági mintázatok változatossága ellenére általános szabályszerűségeket is megfigyeltünk: (1) az ON dúcsejtek mindig displaced amakrin sejtekkel tartottak kapcsoltságot; (2) az OFF dúcsejtek klasszikus elhelyezkedésű amakrin sejtekkel kapcsolódtak, melyek sejttestjei az INL-ben voltak; (3) az ON dúcsejtek főként poliaxonális, az OFF dúcsejtek sejtek széles dendritmezejű amakrin

sejtekkel tartottak fent tracer-kapcsoltságot; (4) homológ dúc-dúc kapcsoltságot csak OFF és ON-OFF dúcsejtek mutattak. Az intenzív és általánosnak mondható dúcsejt kapcsoltságot arra utal, hogy a dúcsejt réskapcsolatok a gerincesek látásában meghatározó szerepet látnak el.

### ***A Cx36 szerepe a dúcsejt réskapcsolatok felépítésében***

Kísérleteinkben Cx36 immunjelöléssel bizonyítottuk, hogy a patkány-, egér- és nyúlretinákban az IPL minden alrétege számos Cx36 immunjelölt plakkot tartalmaz. Annak vizsgálatára, hogy ezek között dúcsejt réskapcsolatok is találhatóak-e, dúcsejt Neurobiotin injekciót követő Cx36 immunjelölést alkalmaztunk. Megfigyeltük a Cx36 immunjelölt plakkok és a Neurobiotin injektált dúcsejt dendritek gyakori kolokalizációját, ami valószínűsítette a Cx36 szerepét a dúcsejt réskapcsolatok felépítésében. Megfigyeltük, hogy az injektált dúcsejt és a tracer-kapcsolt amakrin és/vagy dúcsejt nyúlványainak kereszteződéseiben is Cx36 plakk található. Ez bizonyította, hogy a Cx36 alegység több dúcsejt elektromos szinaptikus kapcsolatban aktív résztvevő.

Cx36 KO egér retinán is Neurobiotin injekciókat hajtottunk végre és morfológiai jegyek alapján itt is sikeresen elkülönítettük a WT retinán korábban leírt típusokat. A KO retinában tehát a dúcsejtek morfológiája nem, de tracer-kapcsoltsága jelentősen megváltozott. Ezek a változások a következők voltak: (1) a WT retina kapcsoltságot nem mutató dúcsejtjei a Cx36 KO egér retinában is kapcsolat nélküliek maradtak; (2) a dúc-dúc tracer-kapcsoltságot a Cx36 KO retinában nagyrészt változatlan és (3) a dúc-amakrin tracer-kapcsoltságot csak egy dúcsejt típus esetében maradt változatlan, míg a többi típusnál a kapcsoltságot az amakrin sejtekkel megszűnt. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a dúc-amakrin réskapcsolatok jó része Cx36 fehérje egységekből épül fel.

Megvizsgáltuk a dúcsejt réskapcsolatok eloszlását a dúcsejtek dendritfáin. Egyes kísérleteinkben transzgenikus parvalbumin-GFP (PV-GFP) egereket használtunk, ahol a legerősebb GFP jelet az OFF alpha sejtek mutatták. Ezek dendritjein a Cx36 plakkok relatíve gyakran megfigyelhetők dendritelágazások közelében. A human retinán Lucifer Yellow (LY) festékkel injektált dúcsejtek esetében a dendritek szintén számos Cx36 réskapcsolattal rendelkeztek, azok gyakran dendritikus végágakon helyezkedtek el, és sok esetben párosával vagy hármával voltak megfigyelhetők. A dendritvégeken elhelyezkedő elektromos szinapszisok valószínűleg a homológ dúc-dúc elektromos szinapszisok helyei, de egyelőre nem világos, hogy a Cx36 plakkok csoportosulása milyen funkcionális jelentőséggel bír.

### ***Az egérretina dúcsejtek akciós potenciál szinkronizációs mintázatai***

Szomszédos dúcsejtek spontán akciós potenciáljainak egymáshoz való viszonyát vizsgáltuk extracelluláris elvezetések alapuló keresztkorrelációs analízis segítségével. Megfigyeltünk egy- és kétszűcsű keresztkorrelációs görbéket. Az egyszűcsű görbék a csúcs amplitúdók és a szélesség tekintetében is változatosak voltak. A korrelációt mutató dúcsejtek sejttestjei minden esetben < 400  $\mu\text{m}$  közelségben

voltak és az interszomatikus távolság fordított arányosságot mutatott a korreláció erősségével.

### ***A szinkronizációban részt vevő retinális hálózatok***

Farmakológiai kezelések során a retinákat egy kémiai szinaptikus antagonistákat tartalmazó koktéllal inkubáltuk, és azt vizsgáltuk, hogy a kontroll elvezetéseknel észlelt keresztkorrelációs csúcsok mérete hogyan változik. Megfigyeltük, hogy a koktélkezelés hatására a bimodális csúcsok alakja és nagysága nem változott, ami arra utal, hogy létrehozásuk a kémiai szinaptikus ingerületátviteltől független. Az unimodális keresztkorrelációs csúcsok koktélkezelés hatására eltérő módon viselkedtek. A keskenyebbek a bimodális csúcsokhoz hasonlóan érzéketlenek voltak. Ugyanakkor a koktélkezelés teljes mértékben eltüntette a szélesebb unimodális csúcsokat. Ezek a megfigyelések bizonyították, hogy a bimodális és a keskeny unimodális aktivitási korrelációk létrehozásáért a réskapcsolatok felelnek, míg a széles unimodális korrelációs csúcsok keletkezésében a kémiai szinapszisok is szerepet játszanak.

További kísérleteinkben bimodális és keskeny unimodális keresztkorrelációs csúcsokkal rendelkező dúcsejt párokat réskapcsolatot gátló szerrel kezeltünk. Ennek hatására mindkét korrelációs mintázat eltűnt, ami egyöntetűen tisztázta a réskapcsolatok szerepét ezen csúcsok keletkezési mechanizmusában. Ugyanez a farmakológiai kezelés eliminálta a dúcsejtek tracer-kapcsoltságát is, bizonyítva azt, hogy a bimodális és keskeny unimodális korrelációs mintázatok mellett a réskapcsolatok szerepe elengedhetetlen a dúcsejt tracer-kapcsoltság szempontjából is.

Kettős elvezetéseket a Cx36 KO egér retinán is végrehajtottunk. Megfigyeltük, hogy a dúc-dúc sejtkapcsolatok nem, de a dúc-amakrin sejtkapcsolatok jelentős mértékben károsodtak a KO állatok retináin. A KO állatoknak a retináiban a dúcsejt akciós potenciál mértéke jóval alacsonyabb volt a WT állathoz képest. Különösen a keskeny unimodális keresztkorrelációs csúcsok száma csökkent, míg a bimodális csúcsok aránya nagyjából hasonló volt a WT egerekben megfigyeltekkel.

További kísérleteinkben OFF alfa dúcsejtek akciós potenciáljait rögzítettük szimultán módon. Megfigyeltük, hogy a WT egerek retináiban az alfa dúcsejt párok a komplex keresztkorrelációs mintázatot mutatnak, keskeny unimodális és bimodális csúcsokkal is rendelkeznek. A WT OFF alfa dúcsejtek réskapcsolat permeábilis festékkel történő feltöltést követően összetett kapcsoltsági mintázatot is mutattak, mind dúc- mind amakrin sejtekkel kapcsolódtak réskapcsolataikon keresztül. A Cx36 KO egér retinájában ugyanakkor az OFF alfa dúcsejtek kizárólag dúc-dúc sejtkapcsolatokat alkottak (dúc-amakrin kapcsolatok hiányoznak) és a sejtpárok csak bimodális keresztkorrelációs csúccsal rendelkeztek. Ez alapján nyilvánvaló volt, hogy az OFF alfa sejtek esetében a bimodális csúcsok létrehozásáért a dúc-dúc, a keskeny unimodális csúcsért pedig a dúc-amakrin sejt réskapcsolatok felelnek. Bebizonyítottuk, hogy ez a megfigyelés általános, igaz a többi (nem OFF alfa) retinális dúcsejt kapcsoltsági viszonyaira is.



## **A RETINÁLIS ELEKTROMOS SZINAPSZISOK KÉPI INFORMÁCIÓ FELDOLGOZÁSÁBAN BETÖLTÖTT SZEREPE**

### ***Az elektromos szinapszisok és a halálszignál terjedése***

Kísérleteinkben intracelluláris cytochrome C (CytC) injektálás végeztünk retinális neuronokon és Müller glia sejteken. A kísérletben nemcsak az injektált sejt pusztult el, hanem azok a sejtek is, melyek az injektált sejttel gap junction kapcsolatban voltak.

NMDA indukálta sejtpusztulást követően TUNEL pozitív sejtyszámolást végeztünk kontroll és réskapcsolat blokkolt retinákon. Megállapítottuk, hogy a réskapcsolat blokkolt minták esetében szignifikánsan alacsonyabb volt az elpusztult amakrin sejtek száma.

Indukált retinális iszkémia esetén megszámloltuk a pusztuló sejteket vad típusú, Cx36 +/-, homozigóta Cx36 -/- Cx36 KO és Cx45 KO egereken. A vad típusú iszkémiás állathoz hasonló számú elpusztult sejt volt a hetero- és homozigóta Cx36 KO retinák esetében, míg a Cx45 KO retinákon a szám jelentősen visszaesett. A réskapcsolat mediálta másodlagos sejthalál tehát a retinában a Cx45 réskapcsolatokon keresztül valósul meg.

### ***A dúcsejt elektromos szinapszisok szerepe a retinális kód kialakításában***

Az egyik kísérletben ON irány szelektív dúcsejteket vizsgáltunk és megfigyeltük, hogy GABA<sub>A</sub> receptor blokkolás hatására ezek a sejtek OFF válaszkomponenssel is rendelkeznek. Ennek a maszkolt OFF válaszkomponensnek az irány szelektivitása ellentétes volt a klasszikus ON válaszéhoz képest és kialakításában kimutattuk az acetilkolin-termelő starburst amakrin sejtek szerepét. Megfigyeltük, hogy a réskapcsolatok farmakológiai blokkolását követően a tracer-kapcsolt poliaxonális amakrin sejtek és maszkolt OFF válasz is eltűnik, tehát az OFF válaszáért felelős ionáram az elektromosan kapcsolt ON-OFF poliaxonális amakrin sejtektől származott. Valószínűnek tartjuk, hogy létezik olyan fénystimulálási paradigma, amely fiziológias körülmények között ennek a válaszkomponensnek az aktivációjával kódolja egyes objektumok (vagy háttér) mozgásának irányát.

A GABA inhibíció farmakológiai blokkolása a nyúlretina OFF alfa dúcsejtjei esetében a klasszikus OFF polaritású fényválasz mellett egy ON válaszkomponenst fedett fel. Kísérleteinkben bebizonyítottuk, hogy ennek a válaszkomponensnek a kialakításáért felelős ionáramok réskapcsolatokon keresztül jutnak az OFF alfa dúcsejtekre széles dendritmezejű ON-OFF amakrin sejtek felől. Sokelektrodás elvezetésekkel igazoltuk azt is, hogy a GABA inhibíció feloldása nem csak az OFF alfa sejteknél, hanem a dúcsejt-populáció mintegy harmadában hasonló, ellenkező polaritású fényválasz komponenseket jelenít meg. Ez arra utal, hogy e fenti általunk cross-over serkentésnek elnevezett jelenség általános mindkét (egér és nyúl) modell állatunk retináin.

### ***A dúcsejt elektromos szinapszisok szerepe a retinális adaptációban***

Kísérleteinkben azt is vizsgáltuk, hogy a fényadaptáció hogyan változtatja a nyúl- és egérretina OFF alfa dúcsejtek által létesített gap junctionok áteresztőképességét. OFF alfa dúcsejteket injektáltunk Neurobiotinnal sötét- és adaptált fényadaptált retinákra. Megfigyeltük, hogy a fényadaptáció hatására az OFF alfa dúcsejtek tracer-kapcsoltsága jelentősen megnövekszik mind a kapcsolt sejtek jelölési intenzitásának, mind a kapcsolt sejtek számának tekintetében.

Szomszédos OFF alfa dúcsejtek sötét- és fényadaptált regisztrátumain keresztkorrelációs analízist végeztünk. Állatmodelleinkben (nyúl, egér) megfigyeltük a fényadaptáció hatására a korrelációs csúcsok erősödését, azaz a sejtek közötti korrelált aktivitás növekedését, ami a második szomszéd sejtekre is áterjedt. Azt is kimutattuk, hogy a réskapcsolatok áteresztőképességének ezt a növekedését a fény hatására felszabaduló dopamin indukálja.

Legújabb vizsgálatainkban a dúcsejt réskapcsolatok farmakológiai zárásakor történő kódolási változásokat tanulmányoztuk. Megfigyeltük, hogy az OFF alfa dúcsejt réskapcsolatok farmakológiai zárása mellett, hogy megszünteti a szomszédos dúcsejtek aktivitási szinkronizációját, azok spontán aktivitását is csökkenti, a fényválaszok amplitudóját növeli, ezzel a jel-zaj viszonyt javítja. Tehát az OFF alfa sejtek egyedi fényválaszai a réskapcsolatok záródásával javulnak, míg a szomszédokkal mutatott akciós potenciál szinkronizáció mértéke éppen ellenkezőleg a réskapcsolatok nyitásakor jelentős.

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 kódolási mechanizmus fényszegény környezetben kerül előtérbe, amikor a réskapcsolatok áteresztőképessége alacsony. Ilyenkor a bipoláris sejtek által kiváltott EPSC nagyobb része konvertálódik akciós potenciál sorozattá, kisebb része szivárog a szomszéd sejtekbe a réskapcsolatokon keresztül. A fényadaptált retina esetében viszont a dúcsejt réskapcsolatok áteresztőképessége megnő, a fénystimulus kiváltotta EPSC-k jelentősebb része a réskapcsolatokon keresztül a kapcsolt sejtek felé elszivárog. Ebben az esetben a jel-zaj viszony ugyan romlik, de 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 OFF alfa sejtek a képi környezet két egymástól különböző aspektusát képesek kódolni a megvilágítás függvényében (pl. kontraszt és mozgás). Ennek a hipotézisnek az igazolásán és a jelenségnek az emlős látórendszer működésében betöltött szerepén jelenleg is dolgozunk.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A disszertáció témájában végzett kutatásaink legfontosabb eredményei a következők:

1. **A csaprendszer elektromos szinapsziszai.** Csappályák esetén az egér- és a humán retinában a Cx36 réskapcsoltok jelen vannak a csap-csap kapcsolatokban. A humán csap bipoláris sejtek legalább két dendritikus és egy axonális elektromos szinaptikus típusú kapcsolatot létesítenek egymással.
2. **A pálcika rendszer elektromos szinapsziszai.** A pálcika információs csatornák esetén a Cx36 gap junctionok jelen vannak az egér All-CB és az All-All kapcsolataiban, és azok a jel továbbítását és a szignál jel-zaj viszonyának javítását végzik.
3. **A Cx36 réskapcsolatok eloszlásának vizsgálata az emlős retinában.** A különböző emlős fajok retináinak Cx36 réskapcsolatai hasonló 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 belső retina széles dendritmezejű és poliaxonális amakrin sejtjei réskapcsolatokon keresztül történő kapcsoltságot mutatnak, és ezek a kapcsoltságok az amakrin sejtek receptív mezőit megnövelik. Leírásra került 22 egér dúcsejt-típust teljes morfológiai jellemzéssel és típus-specifikus tracer-kezeléssel. A dúcsejtek többsége réskapcsolatokon keresztül kapcsolt, tehát a dúcsejt elektromos szinapsziszok esszenciálisak a látás szempontjából. A Cx36 esszenciális építőköve a dúc-amakrin sejtkezeléseknek.
5. **Az egérretina dúcsejt akciós potenciál szinkronizációs mintázatai.** A nem-Cx36 dúc-dúc és a Cx36 tartalmú dúc-amakrin sejt réskapcsolatok különböző akciós potenciál szinkronizációs típusok alapjai. A pálcikák termikus zaja Cx36 réskapcsolatokat és kémiai szinapsziszokat tartalmazó primer/szekunder pálcika csatornákon keresztül jut a belső retina dúcsejtjeihez és specifikus akciós potenciál korrelációt generál.
6. **A dúcsejt spike-szinkronizáció látásban betöltött szerepe.** A fény hatására felszabaduló dopamin a dúcsejt réskapcsolatok áteresztőképességét, és ezáltal a sejtek egymáshoz kapcsoltságát növeli. A fényadaptáció során a dúcsejt szinkron aktivitás növekszik, amelynek során dúcsejtek az egysejt kódolási mechanizmusról a populációs kódolási mechanizmusra váltanak.

## 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, Adegate 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, Debertain 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.