

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A retina réskapcsolatait alkotó connexin fehérjék
expresszióját befolyásoló tényezők gerinces állatokban**

PhD értekezés

Kovács-Öller Tamás

PÉCS, 2015

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola
Szabályozásbiológia Program

A retina réskapcsolatait alkotó connexin fehérjék expresszióját befolyásoló tényezők gerinces állatokban

PhD értekezés

Kovács-Öller Tamás

Témavezető:

Dr. Völgyi Béla
habil. egyetemi docens

.....
Dr. Völgyi Béla,
habil. egyetemi docens,
témavezető

.....
Dr. Gábel Róbert,
habil. egyetemi tanár,
PTE-BDI iskolavezető

PÉCS, 2015

TARTALOM

1. BEVEZETÉS.....	1
2. RÖVIDÍTÉSEK	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1. A RETINA	4
3.2. A RÉSKAPCSOLATOK	7
3.3. A CONNEXIN FEHÉRJÉK SZERKEZETE.....	8
3.4. RÉSKAPCSOLATOK A RETINÁBAN.....	10
3.5. AZ EMLŐS RETINA PRE- ÉS POSZTNATÁLIS FEJLŐDÉSE	12
3.6. AZ AII-ES AMAKRIN SEJTEK.....	13
3.7. A DOLGOZATBAN VIZSGÁLT EMLŐSÖK LÁTÁSA ÉS ÉLETMÓDJA	15
4. CÉLKITŰZÉS	17
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	18
5.1. ÁLLATOK ÉS MINTAELŐKÉSZÍTÉS.....	18
5.1.1. A különböző emlősállatok retináján végzett vizsgálatok mintavétele	18
5.1.2. Egyedfejlődéses vizsgálatok mintavétele	19
5.2. CONNEXIN DENDROGRAMMOK.....	19
5.3. A POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)	20
5.4. WESTERN BLOT.....	23
5.5. IMMUNOCITOKÉMIA	24
5.6. MIKROSKÓPIA	24
5.6.1. Mikroszkópia	24
5.6.2. Szuperrezolúciós mikroszkópia	25
5.6.3. Denzitometria és Cx36 plakk statisztika.....	25
5.7. STATISZTIKAI ANALÍZIS	26
6. EREDMÉNYEK	27
6.1. NEURONÁLIS CONNEXINEK HOMOLÓGIA VIZSGÁLATA BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREKKEL	27
6.2. A KÜLÖNBÖZŐ EMLŐS FAJOK CX36 FEHÉJÉINEK SZERKEZETI HASONLÓSÁGAI	31
6.3. A CX36 FEHÉRJE EXPRESSZIÓJA EMLŐS ÁLLATMODELLEK RETINÁIBAN	33
6.3.1. Cx36 fehérje expresszió modell emlős fajok retináiban	33
6.3.2. A CaR háttérjelölés karakterizálása emlős fajok retináin.....	34
6.3.3. A Cx36 GJ-k eloszlása és a Cx36 termelő idegelemek meghatározása.....	38
6.3.4 A Cx36 tartalmú plakkok méretbeli és eloszlásbeli változásai az IPL-ben.....	45
6.4. VÁLTOZÁSOK AZ EGYEDFEJŐDÉS SORÁN	47
6.4.1. A Cx36 mRNS szintjének változása a fejlődő patkány retinában	47
6.4.2. Cx36 fehérje expressziójának változása a fejlődő patkány retinában.....	48
6.4.3. Cx36 gap junction plakkok eloszlásának változása a fejlődő patkány retinában.....	49

6.4.4. Változások a Cx36 plakkok méretében és eloszlásában	52
6.4.5. AII sejt elektromos szinapszisok egyedfejlődés során megfigyelt változásai	53
6.4.6. Cx45 és Cx57 expresszió posztnatális változásai	56
7. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	58
7.1. NEURONÁLIS CONNEXINEK HOMOLÓGIAIVIZSGÁLATA BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREKKEL.....	58
7.2. A Cx36 FEHÉRJE EXPRESSZIÓJÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA KÜLÖNBÖZŐ EMLŐS FAJOK RETINÁIBAN	60
7.3. Cx36 MRNS ÉS FEHÉRJE EXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK AZ EGYEDFEJŐDÉS SORÁN	63
7.4. Cx45 ÉS Cx57 MRNS EXPRESSZIÓ POSZTNATÁLIS VÁLTOZÁSAI.....	66
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	68
9. SUMMARY	69
10. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	70
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK	80
12.1. MTMT KÖZLEMÉNY ÉS IDÉZŐ ÖSSZEFOGLALÓ TÁBLÁZAT.....	80
12.2. DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK	82
12.3. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK.....	82
12.3. EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	82
12.4. EGYÉB KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK.....	83

*„Az idő és a töprengés...
lassan megváltoztatja a látást,
és végül eljön a megértés is.”*

PAUL CÉZANNE

1. BEVEZETÉS

Golgi és Ramón y Cajal örök vitája, mely szerint az idegrendszer elemei egy egymással összefüggő hálózatot alkotnak, vagy sem, korunk neurobiológiai kutatásai számára továbbra is érdekes kérdéseket vet fel. Golgi elképzelése az volt, hogy az idegsejtek citoplazmája folyamatos kapcsolatban áll, mely által egy funkcionális szincícium jön létre (kontinuitás elmélet; Golgi, 1906). Ramon y Cajal ugyanakkor úgy gondolta, hogy a szomszédos idegi elemek rendelkeznek ugyan kölcsönös kapcsolatokkal, de nem létezik citoplazmatikus folytonosság, a sejteket membrán határolja el egymástól (kontiguitás elmélet). A kontiguitás elméletnek Cajal egész életében elkötelezett követője volt és Nobel-díjának átadóján is ezt bizonyította (Ramón y Cajal, 1906). A szincícium elmélet, a kémiai szinapszisok felfedezésével (Loewi, 1936) megdőlt, azonban a direkt citoplazmatikus összeköttetést szolgáló réskapcsolatokkal (elektromos szinapszis v. gap junction: GJ) foglalkozó újabb eredmények a felülvizsgálat igényét vonták maguk után. Az elmúlt évtizedek neurobiológiai kutatásai újabb és újabb bizonyítékot találnak a gerincesek szervezetben mindenütt megtalálható elektromos szinapszisok szerepének fontosságáról az idegrendszer fejlődésében, működésében és az információ feldolgozásában.

A gerinces állatok retinája ideális kutatási objektum, amelyben kiválóan tanulmányozható az elektromos szinapszisok előfordulása és működése. Az elmúlt több mint száz évben a gerinces retina morfológiáját, sejtípusait és az információfeldolgozás mechanizmusait részleteiben vizsgálták és feltárták, de a GJ kapcsolatok és azok fontosságának mintegy „újralfedezése” további megoldásra váró kérdéseket tartogat a jelenkor kutatói számára. Nem ismert például, hogy a különböző GJ alkotó fehérjék, a connexinek előfordulása milyen különbségeket mutat az egyes emlős fajok retináiban, hogyan változik expressziójuk a posztnatális fejlődés során, illetve milyen mennyiségi és eloszlásbeli változásokat mutatnak egyes környezeti feltételek változásának hatására? Munkánk során e változók figyelembevételével tanulmányoztuk a gerinces állatok retinájában a neuronális connexinek eloszlását.

2. RÖVIDÍTÉSEK

- ACh** *acetylcholine*, acetilkolin
- AII** amakrin sejttípus
- AS** amakrin sejt
- BS** bipoláris sejt
- BSA** *bovine serum albumin*
- cAMP** ciklikus adenzin-monofoszfát
- CaR** calretinin
- CGL** *corpus geniculatum laterale*, oldalsó térdes test
- cGMP** ciklikus guanozin monofoszfát
- Cx** connexin
- DAB** diamino-benzidin
- DEPC** dietilpirokarbonát
- EDTA** etilén-diamin-tetraecetsav
- GABA** *γ-aminobutyric acid*, γ -amino-vajsav
- GCL** *ganglion cell layer*, ganglion sejtek rétege
- GJ** *gap junction*, réskapcsolat v. elektromos szinapszis
- GS** ganglionsejt, más néven dúcsejt
- HRP** *horse radish peroxidase*, torma-peroxidáz
- HS** horizontális sejt
- IC** immuncitokémia
- INL** *inner nuclear layer*, belső sejtes réteg
- IPL** *inner plexiform layer*, belső rostos réteg
- NB** neuroblaszt
- NFL** *neurofibrillar layer*
- NJ** *neighbor-joining*
- NPY** *neuropeptide Y*
- ONL** *outer nuclear layer*, külső magvas réteg
- OPL** *outer plexiform layer*, külső rostos réteg
- PBS** *phosphate buffered saline*, foszfát pufferelt sóoldat
- PBST** PBS, Tween-20-val
- PCR** polimeráz láncreakció
- PFA** paraformaldehid

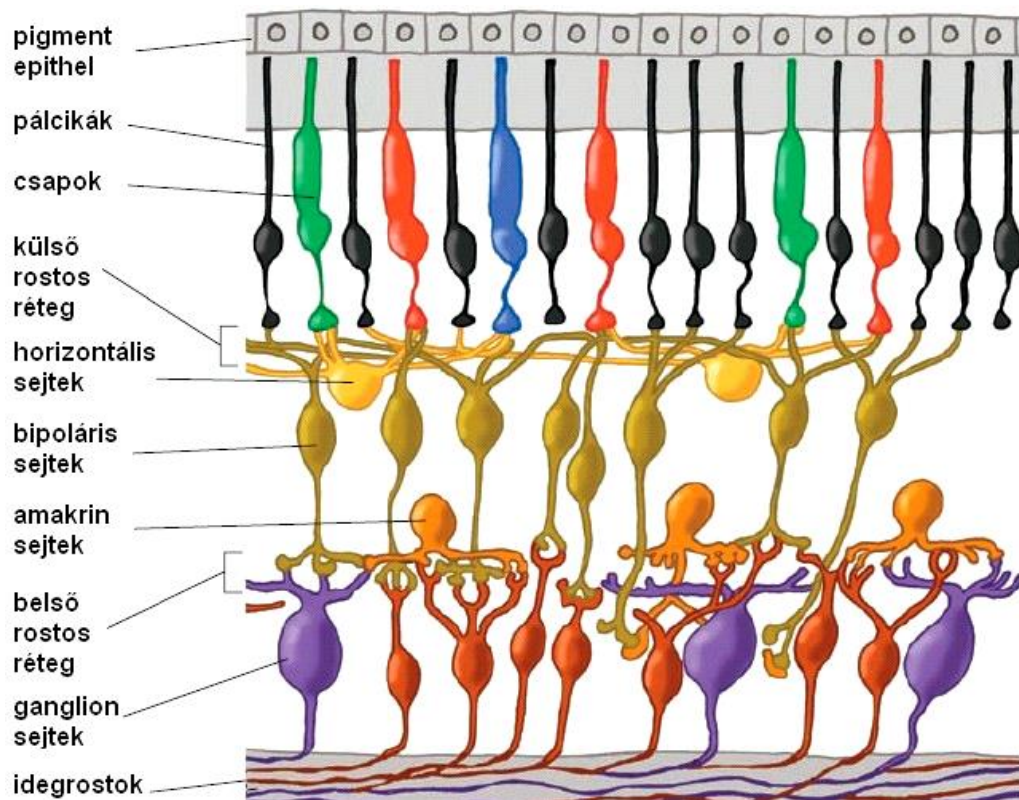
PR fotoreceptor sejt
PV parvalbumin
PVDF *polyvinylidene difluoride*
qPCR kvantitatív *real-time* polimeráz láncreakció
RIPA *radioimmunoprecipitation assay* puffer
ROX *5-carboxy-X-rhodamine*, qPCR festék
Rpl13a 60S riboszomális fehérje L13a alegység
SIM *structured illumination microscopy*
SP *substance P*
TBST tris-pufferelt sóoldat Tween-20-val
VIP *vasoactive intestinal peptide*
WB *western blot*
W-S2/3 *wide-field* amakrin sejtípus

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A látás az emberek számára a legfontosabb szenzoros percepció, melynek segítségével a külvilágból származó információ több mint 75%-át felfogjuk és megtapasztaljuk.

„A látás egy dinamikus folyamat, amely folyton mozgó világot érzékel. A látórendszer pedig szinte kizárólagosan e változásokat és mozgásokat detektálja” (H. Keffer Hartline - Visual receptors and retinal interaction; Nobel-díj ea., 1967).

3.1. A RETINA



1. ábra. A retina rétegei és sejtípusai

A fotonok az üvegtest felől érkeznek, a retina összes rétegén áthaladnak mielőtt a fototranszdukcióna a retina legdisztálisabban elhelyezkedő fotoreceptorai szintjén sor kerülne. A fotonok szóródásának csökkentését a pigmenthám segíti elő. A gerinces állatok retinájában legalább kétféle fotoreceptort, csapokat és pálcikákat különböztethetünk meg (Kolb és mtsai., 1995). Az emberi retinában a csapok száma átlagosan 6,4 millió, a pálcikáké átlagosan 110-125 millió (Osterberg, 1935), mely egyben a legnagyobb receptor denzitást jelenti a gerinces állatok érzékszerveiben. A főemlős állatok retinájában a fotoreceptorok száma az éleslátás helyén, a foveában a legnagyobb, ahol csak csapokat találhatunk (Curcio és mtsai., 1987).

A retina az agykéreghez hasonlóan rétegekből épül fel, de szerkezete annál egyszerűbb és az idegsejtek kapcsolatai jelentős mértékben ismertek. E miatt és a könnyű hozzáférhetőségnek köszönhetően (a koponyán kívül helyezkedik el) ideális vizsgálati objektum az idegtudományban. Kutatócsoportunk számára a retina jól leírt szerkezete kiemelten alkalmas olyan kérdések megválaszolására, amelyek még fejtörést okoznak a jelen és a jövő kutatóinak, ezek nevezetesen az elektromos szinapszisok. Ezek működésének megértéséhez azonban meg kell ismernünk a retina felépítését.

A retina rétegei jól elkülöníthetők, belülről az üvegtest kívülről pigmenthám határolja. Az emlős retinában öt alapvető idegsejt osztályt különíthetünk el: fotoreceptor (PR), bipoláris (BS), amakrin (AS), horizontális (HS) és ganglion sejt (GS). Míg a fotoreceptor a képi információ detektálásában fontos, addig a ganglion (vagy dúc) sejtek az információ végső retinális integrációjában és az agy felé küldésében játszanak szerepet. A bipoláris sejtek serkentő, míg a horizontális- és amakrin sejtek gátló retinális interneuronok. Ezek a sejtípusok és nyúlványaik rétegekbe rendeződnek (1. ábra; Kolb és Mtsai., 1995).

A **fotoreceptorok** nyúlványai a bipoláris sejtek és a horizontális sejtek nyúlványaival alkotnak szinapszisokat. Ezen utóbbi rostok és szinapszisaik alkotják a **külső rostos réteget** (outer plexiform layer: OPL). A fotoreceptorok neurotranszmittere a glutamát, melynek felszabadulása sötétben folyamatos és fototranszdukció esetén csökken vagy szünetel.

A fototranszdukció során a fotonok a receptorokban elektromos jel kialakulását indukálják. A 11-cisz retinal kromofort tartalmazó, G-fehérje kapcsolt receptorok (opszinok) indítják el a jelátvitelt, amikor egy foton elnyelődését követően a 11-cisz retinal all-transz retinal-lá alakul a fotoizomerizáció során. A folyamat eredményeképpen a cGMP (ciklikus guanozin monofoszfát) kapcsolt nátrium csatornák bezáródnak és megszűnik az úgynevezett sötét áram (amely kb. -40 mV-os depolarizált állapotban tartja a sejtet) ezzel a fotoreceptor hiperpolarizálódik.

A **bipoláris sejtek** (BS) az OPL területén kapják bemeneteiket a fotoreceptoroktól. A bipoláris sejtek egyik csoportjának dendritjén ionotrop glutamát receptorok vannak, így ezeket a sötétben folyamatosan felszabaduló fotoreceptor eredetű glutamát aktívan tartja. Ezek az úgynevezett OFF-típusú bipoláris sejtek felelősek többek között a világos háttéren megjelenő sötét formák érzékeléséért.

Ugyanakkor az ON bipolaris sejtek metabotrop glutamát receptorokkal rendelkeznek, így számukra a fény detektálásakor megszakadó (vagy lecsökkenő) glutamát felszabadulás lesz az adekvát inger (sötét háttéren világos alakzat). A bipolaris sejtek receptor-szelektívek, azaz a csap-bipolaris sejtek csapokkal, míg a pálcika-bipolaris sejtek kizárólag pálcikákkal tartanak kapcsolatot. A bipolaris sejtek antagonisztikus központ-környéki receptív mezővel rendelkeznek és alapvetően kontraszt detektorokként működnek (Kolb és mtsai., 1995). Ezen túlmenően egyes bipolaris sejtek a vizuális jel lassabb, még mások a gyorsabb fluktuációira érzékenyek, így gyorsabban, vagy lassabban válaszolnak azonos intenzitású stimulus esetén.

A kis receptív mezejű bipolaris sejtekkel szemben a **horizontális sejtek** (HS) receptív mezeje nagy, minden horizontális sejt sok fotoreceptortól kap bemenetet az OPL területén. Kimeneteikkel visszacsatolnak (feed-back) a fotoreceptorok végtalpaira és azokat GABA-erg szinapszisaik segítségével gátolják. Ez a feed-back mechanizmus az, melynek segítségével a horizontális sejtek a bipolaris sejtek központ-környéki receptív mezejét kialakítják (Cook és Becker, 1995; Kolb és mtsai., 1995).

A bipolaris-, horizontális- és amakrin sejtek sejttestjei a belső sejtes rétegben (inner nuclear layer: INL) helyezkednek el. Míg fotoreceptorokból a legtöbb emlős fajban 3 féle (kivéve a trikromát látású főemlősöket ahol 4), bipolaris sejtből 8-10 alak- és működéstani altípus különíthető el, addig több mint 30 morfológiailag jól elkülöníthető **amakrin sejt** (AS) ismert. Funkciójuk és molekuláris markerrendszerük, csakúgy, mint a morfológiájuk rendkívül sokféle. Az elektromos szinapszisok előfordulása szempontjából fontos típusaira a későbbiekben térek ki.

A belső rostos, vagy plexiform réteget (inner plexiform layer: IPL) bipolaris- és amakrin sejtek nyúlványai, illetve a ganglion sejtek dendritjei alkotják. A belső rostos rétegben a bipolaris sejtek továbbítják a fotoreceptorok felől szállított látási információt a dúc- és amakrin sejtek felé. A bipolaris sejtek glutamátot, míg az amakrin sejtek GABA-t vagy glicin-t termelnek transzmitterként. A GABA-erg amakrin sejtek között több, második transzmittert (ACh: acetilkolin) vagy modulátor természetű anyagot, peptidet (pl.: VIP, SP, NPY) is termel. Szerepük sokrétű. Egyesek a direkt információ átadásban, mások a laterális gátlás kialakításában, mozgás irányának érzékelésében, vagy az objektum/háttér mozgás elkülönítésében vesznek részt.

A ganglion sejtek rétegében (ganglion cell layer: GCL) található a **dúcsejtek** [ganglion sejt (GS)] és az úgynevezett „displaced” amakrin sejtek szómái. A dúcsejtek

feladata a bipoláris- és amakrin sejtek felől érkező információ összegyűjtése, integrációja, analizálása, digitalizálása és továbbadása az agy felé. A különböző típusokba sorolható dúcsejtek receptív mezőiknek megfelelően szelektíven gyűjtik az információt és a szín, kontraszt, látótér rész, méret, mozgás, irány, fényváltozás detektálására specializálódtak (Barlow és mtsai., 1964; Nelson és mtsai., 1978, 1993).

3.2. A RÉSKAPCSOLATOK

A kémiai szinapszis az idegi információátvitel elsődleges formája, de az idegsejtek közötti információcserében fontos szerepe van a réskapcsolatoknak, más néven gap junctionoknak (GJ-k) is, amelyek a sejtek között elektromos és molekuláris átjáróként szolgálnak. A GJ-k szinte mindenhol megtalálhatóak a gerinces szervezetben. A szívizomban például a sejtek általuk valósítják meg az elektromos potenciál terjedését. Hasonló nagyfokú elektromos kapcsoltságot a központi idegrendszer réskapcsolatai és a retinális neuronok közötti GJ-k is megvalósítanak, ezáltal a jelfeldolgozás alapvető elemeiként működnek (Völgyi és mtsai., 2013).

A réskapcsolatokat elektronmikroszkópos módszerek felhasználásával, mintegy ötven éve írták le először (Farquhar és Palade, 1965; Rosenbluth, 1965; Brightman és Reese, 1969) a szomszédos sejtek membránjainak szoros összefekvésénél. Mivel elektronmikroszkópos felvételeken ritkán figyelték meg őket, ezért szerepük rendkívül alulértékelt volt (Furshpan és Potter, 1957; Watanabe, 1958). Ezeknél a kapcsolatoknál a szinaptikus rés igen szűk, mindössze 1-2 nm. Ez a rendkívül intim membránkapcsolat volt az alapja a „gap junction” (GJ) elnevezésnek (Goodenough és Revel, 1970). A réskapcsolatok mentén, amelyek általában csoportokban fordulnak elő, a plazmamembránokat a zonula okkludensek rögzítik a sejtek vázát alkotó citoskeletonhoz (Li és mtsai., 2004, 2008; Rash és mtsai., 2004; Ciolofan és mtsai., 2007). A réskapcsolatok a membrán-összefekvéseknél összekötik a két kapcsolt sejtet. A két membrán félnél két connexin (Cx) alegységekből álló félcsatorna (hemichannel v. connexon) rendeződik párba és hozza létre a réskapcsolatot a 2. ábrán szemléltetett módon (Yeager és Harris, 2007).

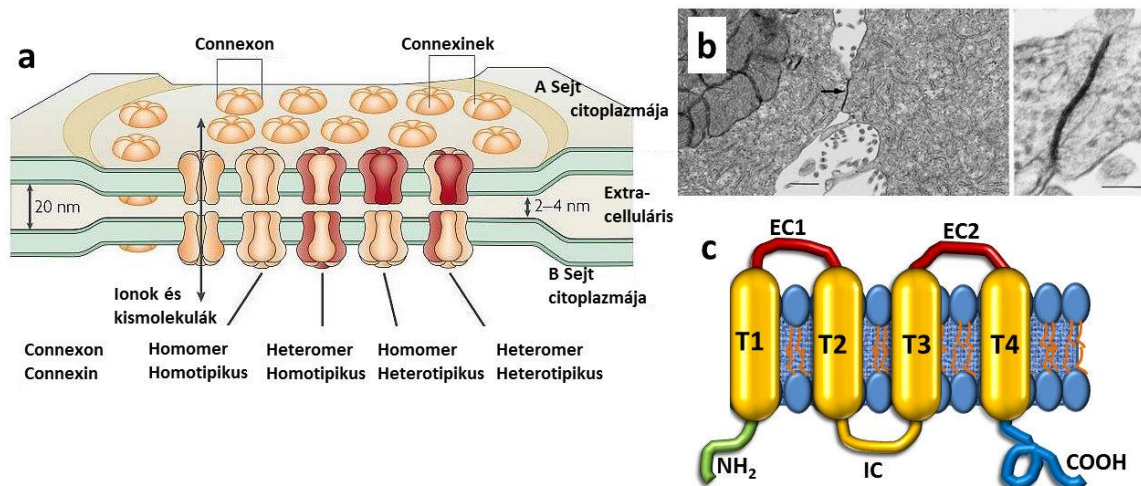
A „hemichannel” vagy connexon felépülhet azonos, vagy különböző connexinekből, amely alapján homo-, vagy heteromernek szokták nevezni. A connexonok összekapcsolódása során létrejött réskapcsolat lehet homo-, vagy heterotipikus, aszerint, hogy az összekapcsolódás során a két hemichannel egyezik, vagy

különbözik (2a. ábra, Bloomfield és Völgyi 2009). Ezek az eltérő összetételű és szerkezetű réskapcsolatok mind felépítésben mind működésben különböznek. Az őket felépítő connexinek határozzák meg ugyanis a csatorna-tulajdonságukat és az áthaladó ionokkal szembeni ellenállásukat. Ezért alapvető fontosságú, hogy a vizsgált idegszövetek connexin összetételét, ennek változásait és a működésben betöltött szerepüket leírjuk.

A molekuláris technikák és immunológiai jelölések fejlődése, transzgenikus állatok használata nagyban hozzájárult jelentőségük felismeréséhez és felértékeléséhez. Ma már tudjuk, hogy a réskapcsolatok nélkül nem jöhetnek létre összetett szervezetek, nincs egyedfejlődés és nincs összehangolt idegi működés, ezért is kaptak központi szerepet kutatócsoportunk munkájában (Cruciani és Mikalsen, 2006).

3.3. A CONNEXIN FEHÉRJÉK SZERKEZETE

Gerinctelen állatokban is megtalálhatóak a connexinekhez hasonló funkciójú, de azokkal szekvenciahomológiát nem mutató innexin és pannexin fehérjék (Yen és Saier, 2007), ám a connexinek csak a gerinces állatokra jellemző transzmembrán fehérjék és egyben a fentiekben tárgyalt réskapcsolatok építőkövei. Az emlősállatok mintegy 20 Cx génnel rendelkeznek, amelyeket szekvenálási adatokból állapítottak meg (Söhl és Willecke, 2003). A teljes Cx gén 1-3 exonból és egy, vagy két intronból áll aszerint, hogy létezik-e splice variánsa az adott Cx-nek. Itt eltérő promóterekről eltérő transzkript íródik át a különböző szövetekben. Ha van splice-variáns, több exon íródik át azonos promóterről és ezután történik ezek splicing-ja. Egyes esetekben (mint a Cx36 esetén is) a kódoló régió két exonra tagolódik (Bosco és mtsai., 2011). Minden Cx két extracelluláris és egy intracelluláris hurkot tartalmaz, ezek kötik össze a transzmembrán régiókat és szerkezetük rendkívül konzervált. A fehérje N és C terminálisa a sejtplazmába nyúlik, ez utóbbi rendkívüli változékonyságot mutat, transzmissziós-elektronmikorszkópos képen pedig a sejtek közötti szalagszerű denzitásnak láthatjuk (2b. és c.ábra).



2. ábra. A réskapcsolatok és connexinek szerkezete

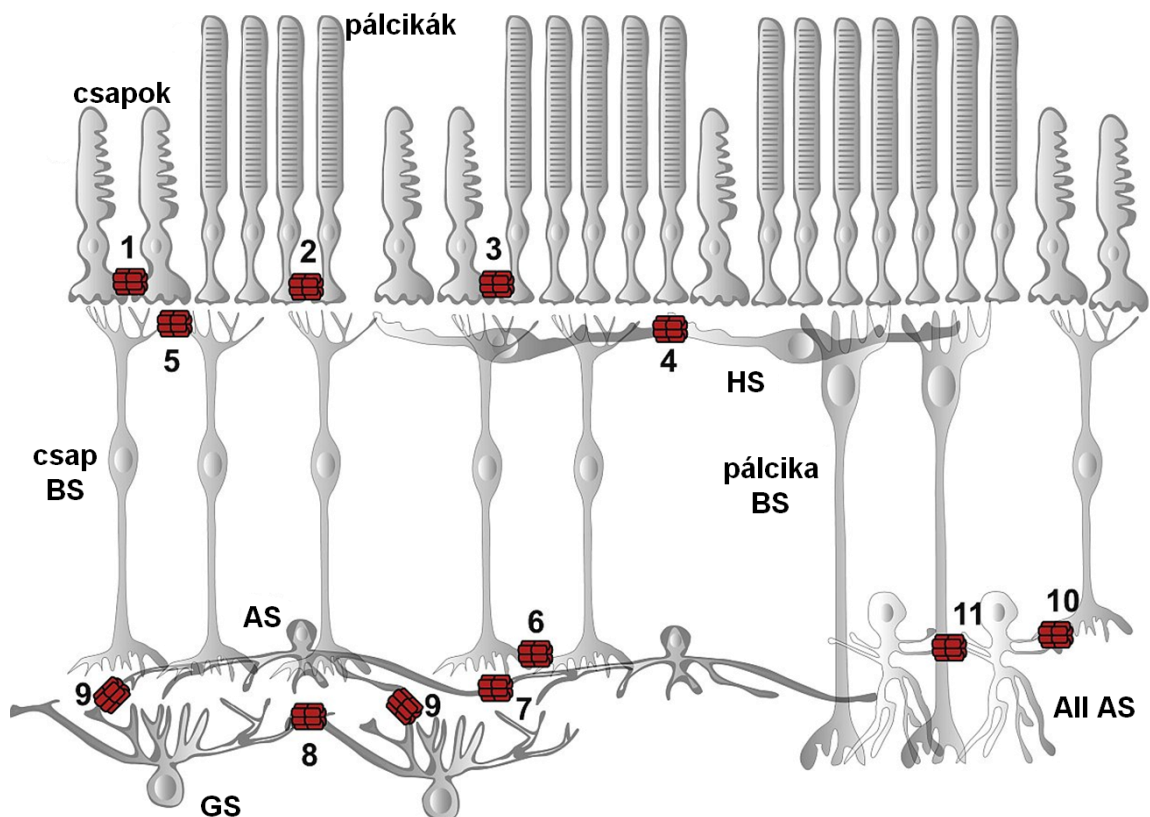
a) A réskapcsolatok felépítése és összekapcsolódásának lehetőségei (Bloomfield és Völgyi 2009 után). **b)** Fotoreceptorok közötti réskapcsolatok transzmissziós elektronmikroszkópos képe (nyíllal jelölve; aránymértékek a bal és jobb oldalon: 0,5, ill. 0,1 μm ; Krizaj és mtsai., 1998 után). **c)** Connexin fehérjék N- és C- terminálisa (NH₂, COOH) az intracelluláris oldal felé néz, a transzmembrán domaineiket (T1-T4) főleg α -hélix struktúrák alkotják. Ezeket az extracelluláris (EC1, EC2) és intracelluláris (IC) hurkok kötik össze.

A különböző Cx-eket kDa-ban mért súlyuk alapján nevezték el, de a csoportosításuk alapja a szekvencia és a funkcionális homológia. Az α -connexinek (vagy II. csoport: Cx38, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50) hosszabb, míg a β -connexinek (vagy I. csoport: Cx26, Cx30.2, Cx31, Cx32) egészen rövid intracelluláris C-terminális szekvenciával rendelkeznek (Cruciani és Mikalsen, 2006). A γ -connexinek (III. csoport: pl. Cx35, Cx36) mind molekuláris struktúrájukat, mind működésüket tekintve egy átmeneti formát jelentenek az α - és a β -connexinek között. Az α - vagy β -Cx-ek által képzett réskapcsolatokkal ellentétben, a γ -Cx-ek nem képesek heterológ csatornák létrehozására és jóval alacsonyabb a feszültség és pH érzékenységük is (Söhl és Willecke, 2003, 2004; Cruciani és Mikalsen, 2006; Berthoud és Beyer, 2009). A Cx gének elnevezése a gap junction rövidítéséből: Gj-vel (emberi génnél: GJ-vel) kezdődik és az expresszált α -, β - és γ -connexin fehérjék szerint Gja, Gjb és Gjc csoportnevekkel látták el őket.

A szekvenciahomológiák további analízise folytán, a γ - és az α -connexinek csoportját egyes kutatások, további alcsoportokra (IIIa, IIIb illetve IIa, IIb) bontják. (Cruciani és Mikalsen, 2006).

3.4. RÉSKAPCSOLATOK A RETINÁBAN

Közel negyven éve Raviola és Gilula (1973) írtak le először retinális réskapcsolatokat, melyeket a retina fotoreceptorain és interneuronjain figyeltek meg. Ezen első leírások óta a GJ permeábilis neurobiotinnal végzett „tracing” kísérletek megmutatták, hogy a retina idegsejtjei között általános a réskapcsolatok megléte (3. ábra) (Vaney, 1991) és szerepük bizonyítottan sokrétű (Roerig és Feller, 2000; Söhl és mtsai., 2000; Vaney és Weiler, 2000; Cook és Becker, 2009; Demb és Pugh, 2002; Bloomfield és Völgyi, 2009; Völgyi és mtsai.; 2013).



3. ábra. Az elektromos szinapszisok által alkotott kapcsolatok a retinában

(1) Csap – csap; (2) Pálcika – pálcika; (3) Csap-pálcika; (4) Horizontális sejtek; (5) Bipoláris sejtek dendritjei; (6) Bipoláris sejtek axonjai; (7) Amakrin – amakrin sejtek; (8) Dúcsejtek dendritjei; (9) Amakrin – dúcsejt, (Völgyi és mtsai., 2013 után).

Fotoreceptorok által alkotott réskapcsolatok: A fotoreceptorok homotipikus csap-csap, pálcika-pálcika és heterotipikus csap-pálcika GJ-ket hoznak létre. A homotipikus kapcsolatok szerepe a jelátlagolás, azaz alacsony fényviszonyok mellett növelik a jel-zaj viszonyt. A heterológ csap-pálcika kapcsolat viszont az úgynevezett másodlagos pálcikapálya része, ahol a csapok közvetlen jelet kapnak a pálcikáktól,

mesopicus (közepes, átmeneti) fényviszonyok mellett (Smith és mtsai, 1986; Cook és Becker, 1995). Ugyanakkor erős megvilágítás esetén a csap-pálcika GJ-ken keresztül megvalósuló jelátvitel a kontrasztérzékenység csökkenéséhez vezetne, ezért fényadaptált retina esetén ezek a GJ-k ideiglenesen bezáródnak (Tsukamoto és mtsai., 1992).

Horizontális sejtek gap junctionjai: A horizontális sejtek egymással alkotnak réskapcsolatokat, melyeknek nagy szerepe van abban, hogy az azonos megvilágítottságú retinális területekre eső fotoreceptorok nagyjából hasonló mértékű feed-back gátlást kapjanak. Egérben Cx36-ot nem expresszálnak (Deans és Paul, 2001), csak Cx57-et (Hombach és mtsai., 2004).

Bipoláris sejtek réskapcsolatai: Az OPL-ben a bipoláris sejtek dendritjei, míg az IPL-en a bipoláris sejtek axonjai között találunk GJ-eket. Funkciójuk nem tisztázott, valószínűleg a fotoreceptorokéhoz hasonló jel-zaj viszonyt javító kapcsolatokról van szó. Specifikus esetet, az ON típusú csap-bipoláris sejtek és az úgynevezett AII amakrin sejtek által alkotott GJ, melynek elengedhetetlen szerepe van a szkotopikus körülmények között aktív, elsődleges pálcikacsatorna működésében (Deans és mtsai., 2002; Völgyi és mtsai., 2004).

Amakrin sejtek réskapcsolatai: Mivel az amakrin sejtek igen sokfélék, kapcsolataik a szomszédos sejtekkel és a kapcsolatok funkciója is rendkívül sokrétű, így nem általánosítható az amakrin sejt GJ-k szerepe sem. Jól ismert képviselőik az AII-AII amakrin sejtek között fennálló dendro-dendritikus elektromos szinapszisok, melyek a jel-zaj viszony javításával növelik az elsődleges pálcika pálya érzékenységét (Bloomfield és Völgyi, 2004; Völgyi és mtsai., 2004; Söhl és mtsai., 2005; 2010;). Különösen sok réskapcsolat található az úgynevezett wide-field (magyarul széles-dendritmezejű) amakrin sejtek között (Bloomfield és Völgyi, 2007), melyek szerepe mind ez idáig tisztázatlan.

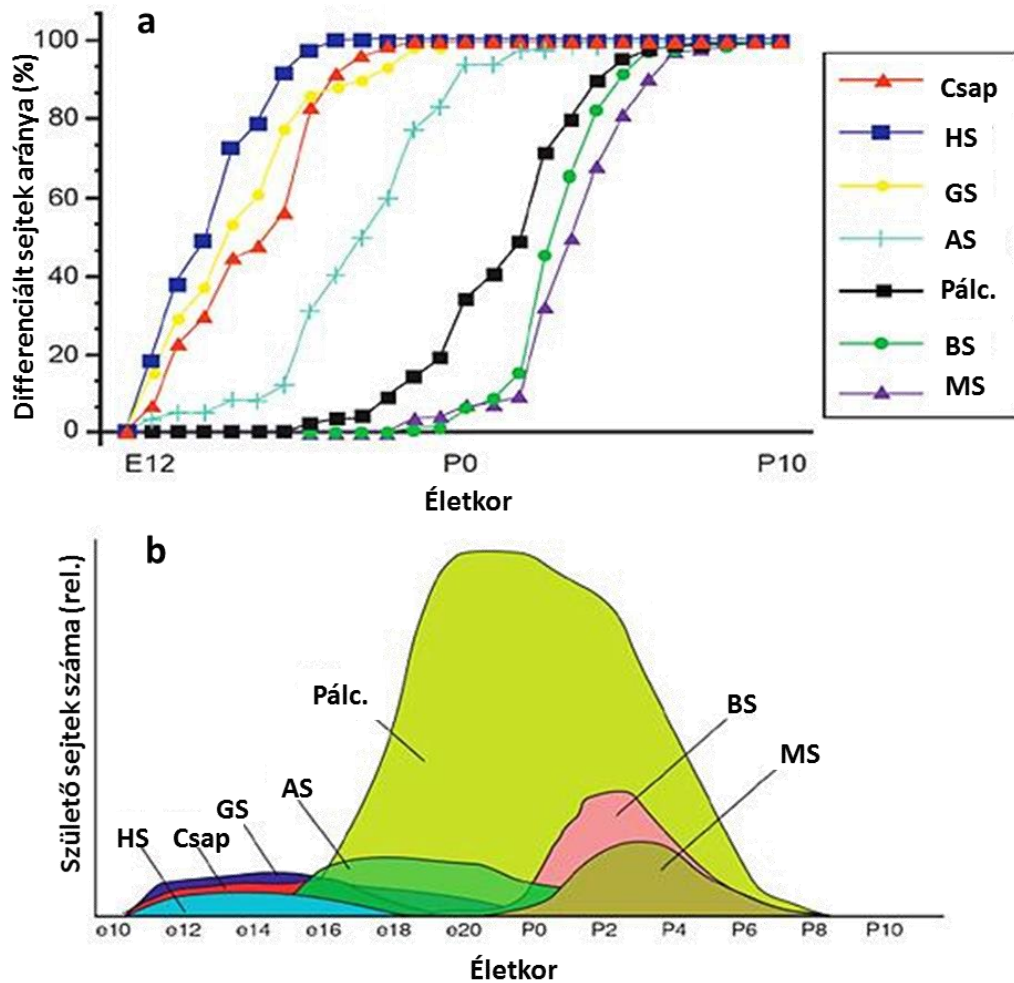
Ganglion sejtek réskapcsolatai: A dúcsejtek egymással homológ GJ-t, egyes amakrin sejtekkel heterológ GJ-t alakítanak ki (Schubert és mtsai., 2005a; 2005b; Söhl és mtsai., 2005, 2010; Völgyi és mtsai., 2005; 2009; 2013; Pan és mtsai., 2010). Ezen elektromos szinapszisoknak feltételezhetően fontos szerepe van a dúcsejtek akcióspotenciál szinkronizációjában (Mastrorade, 1983a; 1983b; 1983c; Brivanlou és mtsai., 1998; DeVries, 1999; Hu és Bloomfield, 2003; Ackert és mtsai., 2009; Hu és mtsai., 2010; Völgyi és mtsai., 2013).

3.5. AZ EMLŐS RETINA PRE- ÉS POSZTNATÁLIS FEJLŐDÉSE

A retina fejlődése komplex folyamat, melynek során a növekedés, osztódás, kapcsolatok kiépülése és programozott sejthalál meghatározott egymásutániségben, ugyanakkor egymással párhuzamosan zajlanak le. A retina egyedfejlődése több lépcsőben történik. Elsőként, embrionális korban a retinális progenitor sejtek mitózisokon esnek át, a külső határoló membrán közelében, mely után a sejtek a végső helyükre vándorolva differenciálódnak. Érdekes, hogy a horizontális sejtek prekursorai a ganglion sejtek rétegéig vándorolnak, majd innen visszafordulnak és a késői embrionális és neonatális korban érik el végső helyüket a külső sejtes rétegben (Poché és Reese, 2009). Sorrendben, a horizontális, a ganglion és a csap sejtek differenciálódnak először embrionális korban a progenitorokból. Az amakrin sejtek ezekhez képest kissé késve szintén az embrionális fejlődés alatt, míg a pálcikák és a bipoláris sejtek posztnatális korban differenciálódnak (4a. ábra). A 4b. ábrán a születő sejtek viszonylagos számát láthatjuk, ezek közül kiemelendők a pálcikák, melyek óriási számban differenciálódnak.

Érdekes, hogy az egyedfejlődés során már korán kialakul egy-egy, az információátvitelben fontos sejtípus (csap: receptor; horizontális sejt: interneuron; dúcsejt: kimeneti sejt), majd a későbbi fejlődési szakaszban újabb receptor és interneuron típusok jönnek létre (4. ábra).

Korábbi tanulmányok már rávilágítottak arra, hogy molekuláris markerek alapján a retina neurontípusok fejlődése két főágra bontható. Az egyik ágon közös progenitorsejtekből fejlődnek a fotoreceptorok, míg progenitorok egy másik csoportjából jönnek létre a ganglion, az amakrin és a horizontális sejtek. A bipoláris sejtek eredete e markerek alapján kérdéses volt (Arendt, 2003). Azonban ennek a funkcionális nézetnek ellentmond az a tény, hogy a retinális progenitor sejtek gyakorlatilag bármely sejtípusá átalakulhatnak (Kolb és Mtsai., 1995).



4. ábra. A retina sejtípusainak fejlődése

A A retinális sejtek embrionális (E12-P0) és posztnatális (P0-) differenciálódása.

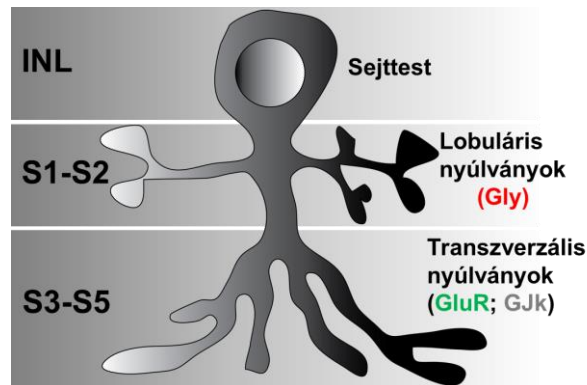
B A sejtek számának viszonylagos alakulása embrionális (o10-P0) és posztnatális korban (P0-). HS: horizontális sejtek; GS: ganglion sejtek; AS: amakrin sejtek; Pálc.: pálcika sejtek; BS: bipoláris sejtek; MS: müller sejtek (Kolb és mtsai., 1995).

3.6. AZ AII-ES AMAKRIN SEJTEK

Dolgozatomban az AII-es amakrin sejtek, retinális információátvitelben betöltött központi szerepük és réskapcsolataik miatt kiemelt fontossággal bírnak. Az AII-es amakrin sejteket elsőként Kolb és Famiglietti (1974) írták le. A gerinces retinában a legbehatóbban tanulmányozott amakrin sejtcsoport, amely kiemelt szerepet tölt be a retina információ-feldolgozásában. Az AII sejtek szűk dendritmezejűek, a dendritok az IPL-ben két elágazásrendszerrel alkotnak (bistratified).

Az IPL S1-2 alrétegébe (OFF szublamina) küldött dendritok rövidek és lobuláris fejűek rendelkeznek, melyek egy központi elsődleges dendritból ágaznak el. A transzverzális nyúlványok szintén diagonálisan ágaznak el a fő primér dendritágból

(dendritic stalk), többször elágaznak és az S3-5 alrétegek területén (ON szublamina) alkotnak végágakat és szinapszisokat (Kolb és mtsai., 1995).



5. ábra. Az AII-es amakrin sejtek vázlatos morfológiája patkányban

A lobuláris nyúlványok az IPL 1.-2. szublamínájában találhatóak (S1-S2), míg a transzverzális nyúlványok a 3.-5. szublamínában (S3-S5). Előbbiek glicint (piros Gly) termelnek, míg utóbbiak glutamát receptorokkal és Cx36 tartalmú réskapcsolatokkal rendelkeznek.

Az AII amakrin sejteket gyakran hívták pácika amakrin sejteknek (Nelson, 1982; Bloomfield és Dacheux, 2001). Erős központ-környéki antagonizmust mutató ON-center amakrin sejtek (Dacheux és Raviola, 1986; Xin és Bloomfield, 1999), melyek transzverzális nyúlványaikon direkt glutamaterg bemenetet kapnak a pácika bipoláris sejtektől az IPL legdisztálisabb alrétegében (S5). A transzverzális nyúlványok proximális részén (főleg S3-4) ON-csap bipolárisokkal alkotott GJ-k, míg a disztális transzverzális nyúlványokon (főképpen S4-5) szomszédos AII-esekkel alkotott réskapcsolataik találhatóak meg. A lobuláris nyúlványaik az OFF-csap bipolárisok felé közvetítenek glicinerg gátlást (5. ábra).

A glicin immunoreaktivitáson túl az AII sejtek kalcium-kötő fehérjékkel, mint parvalbumin, calbindin és calretinin antitestekkel is jelölhetőek (Kolb és mtsai., 1995), azonban ez állatfajonként változó. Az általunk vizsgált állatok esetében erről a későbbiekben még lesz szó.

Az AII-es sejtek fő szerepe a pácikáktól származó jel továbbítása a dúcsejtek felé. A pácikák ugyanis nem rendelkeznek direkt bipoláris-dúcsejt kapcsolatokkal, hanem szkotopikus körülmények között a pácika bipoláris sejtek által továbbított információ elsődlegesen az AII-es sejtekre, onnan a csap bipoláris sejtekre, majd a dúcsejtek felé továbbítódik. Az OFF bipoláris sejtek felé az információ átadása glicinerg

gátló (polaritás fordító) szinapszisok által, míg az ON bipolárisok felé réskapcsolatok segítségével történik (polaritás tartó; Völgyi és mtsai., 2013; 5. ábra). Az AII-es sejtek ON csap bipolárisokkal és szomszédos AII sejtekkel alkotott elektromos szinapszisai Cx36 tartalmúak.

3.7. A DOLGOZATBAN VIZSGÁLT EMLŐSÖK LÁTÁSA ÉS ÉLETMÓDJA

Az emlősök látása nagyon hasonló elrendezésű idegsejt hálózatra épül, azonban a hálózatot felépítő idegsejtek és kapcsolataik számában eltérések fedezhetők fel. A különbségek vagy az állatok genetikai távolságával, vagy életmódbeli hasonlóságokkal és különbségekkel magyarázhatóak. Ezeknek a különbségeknek a GJ-ra vonatkoztatott aspektusát kívántuk vizsgálni. Molekuláris evolúciótani kutatások korábban főleg az emlősök színlátásában fontos fotoreceptor opszinok esetében történtek (Jacobs, 2009; Nilsson, 2013). Sok a párhuzam az opszinok és a Cx-ek evolúciója között, ugyanis egy az opszinokéhoz hasonló evolúciós redukció történt a Cx gének esetében is (lásd később az eredmények részt).

Kutatásaink során olyan különböző emlős fajok retináin végeztünk összehasonlító vizsgálatokat melyeknek életmódja és cirkadián ritmusa eltérő. A vizsgált fajok a következők voltak: egér, patkány, tengerimalac, nyúl, aranyhörcsög, birka, macska, kutya, vadászgörény, mókusmajom, sertés. Ezekre az állatokra a miatt esett a választás, mert idegrendszeri és gyógyszerkutatási munkák kedvelt kísérleti modelljeiként is szerepelnek. A fenti állatokhoz az összehasonlítás teljessége érdekében hozzávettük még az emberi retinát is. Aktív periódusukat tekintve ezek között négy fő csoportot különíthetünk el:

A diurnális állatok, nappal aktívak a nokturnálisak éjszaka aktívak, a krepuszkulárisak félhomályban aktívak. Sok állatfaj diurnális, köztük az ember is, illetve a rovarok jó része és kevés kivételtől eltekintve a hüllők és a madarak. Az utóbbiak közül a hüllők, főképpen a hőreguláció hiánya miatt diurnálisak (Csányi, 2002). A házasított állatok gyakran vad elődeiktől eltérő cirkadián aktivitással rendelkeznek, hiszen a házasítás az emberéhez hasonlóvá formálta ezen állatok ritmusát, ezért ezek egy negyedik csoportját képezik a vizsgált állatoknak.

Az 1. táblázatban összefoglaltam a vizsgált állatokat rendszerezés, életmód és táplálkozás szerint. Az életmódbeli besorolás fő szempontjai az aktív és pihenő periódusok váltakozása, testhőmérséklet ingadozása, melatonin szintézis és a

táplálkozás voltak. Ahol nem szerepel a táblázatban szakirodalmi hivatkozás ott Ronald M. Nowak: Walker's Mammals of the World című könyvében szereplő információkra hagyatkoztam. A retina általános szerkezetéről elmondható, hogy a nokturnális állatok retinájában az alacsonyabb intenzitású fény érzékelésére alkalmas pálcikasejtek nagyobb arányban fordulnak elő, mint a nappal aktív (diurnális) állatok esetében. A nokturnális állatok retinája mögött egy fényvisszaverő réteg (tapetum lucidum) található, ami a hasznosítatlan fotonokat veri vissza a fotoreceptorok felé. Az 1. táblázatban megjelöltem, hogy az adott állat rendelkezik-e tapetummal (Ollivier, 2004), illetve, hogy a domesztikáció milyen irányba tolja el az adott állat életmódját. Érdekes, hogy a fogságban szelektált hörcsögök éjszakai életmódra térnek át, az emberkerülés miatt (Gattermann és mtsai., 2008). A vizsgált fajok egyedi retinális sajátosságairól az eredmények és eredmények értékelése résznél térek majd ki részletesebben.

1. táblázat. Az általunk vizsgált állatok életmódja

Név (latin név)	Rendszer-tan (rend)	Életmód (aktívitás)	Táplál-kozás	Tapetum lucidum	Hivatkozás
Birka (Ovis aries)	Artiodactyla	diurnális	Növényevő	+	Maloney és mtsai., 2013
Egér (Mus musculus)	Rodentia	nokturnális	Rágcsáló	+	Buhr és Takahashi, 2013
Ember (Homo sapiens s.)	Primates	diurnális	Mindenevő		Bollinger és Schibler, 2014
Hörcsög (Mesocricetus auratus)	Rodentia	krepuszkuláris nokturnális*	Rágcsáló	+	Gattermann és mtsai., 2008
Kutya (Canis lupus fam.)	Carnivora	nokturnális, diurnális*	Ragadozó	+	Ollivier, 2004
Macska (Felis silvestris catus)	Carnivora	nokturnális, diurnális*	Ragadozó	+	Ollivier, 2004
Mókusmajom (Saimiri sciureus)	Primates	diurnális	Növényevő		Ollivier, 2004
Nyúl (Oryctolagus cuniculus)	Lagomorpha	nokturnális, diurnális*	Növényevő		Jilge, 1991
Patkány (Rattus norvegicus)	Rodentia	nokturnális	Rágcsáló		Eastman és mtsai., 1984
Sertés (Sus scrofa dom.)	Artiodactyla	diurnális	Mindenevő		Ollivier, 2004
Tengerimalac (Cavia porcellus)	Rodentia	diurnális	Rágcsáló	+	Ollivier, 2004
Vadászgörény (Mustela putorius furo)	Carnivora	nokturnális, diurnális*	Ragadozó	+	Ollivier, 2004

*Domesztikációs hatás

4. CÉLKITŰZÉS

A neuronokat összekötő réskapcsolatok nem statikus csatornák, hanem dinamikusan változó információs útvonalak. Átjárhatóságuk az egyedfejlődés, illetve a külső- és a belső környezeti tényezők dinamikájához alkalmazkodva változik. Vizsgálataink célja az volt, hogy ezeket a változásokat részleteiben feltárjuk.

Meg akartuk ismerni:

1. A Cx expresszió alkalmazkodását az evolúciós trendekhez

Ennek érdekében:

(1) Összegyűjteni a gerinces állatok retinális connexinjeinek aminosav- és nukleotid-szekvenciáit, majd olyan filogenetikai fát létrehozni, amellyel a Cx ortho- és paralógok elkülöníthetők.

(2) Létrehozni egy Cx36 filogenetikai fát az emlős modellek Cx36 molekuláinak szerkezeti (és potenciálisan funkcionális) hasonlóságának alátámasztására.

(3) Emlős állatmodelljeink retináin Cx36 immunreakciót végezni, hogy a GJ eloszlások alapján evolúciós trendeket fedezhessünk fel.

2. Az egyedfejlődés során bekövetkező Cx expressziós változásokat

A retinában, az egyedfejlődés során, számos neuronhálózat szintű változás történik. Amiben a GJ-k aktívan részt vesznek. Ezért tervezzük:

(1) Megvizsgálni a Cx36, 45, és 57 mRNS-expresszió változásait a fejlődő retinában.

(2) Leírni a Cx36 fehérje expresszió változását a patkány korai posztnatális fejlődésének során.

(3) Karakterizálni a neuronális kapcsolatokat, amelyek kialakulása a Cx36 expressziós szintjével korreláltatható.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. ÁLLATOK ÉS MINTAELŐKÉSZÍTÉS

5.1.1. A különböző emlősállatok retináján végzett vizsgálatok mintavétele

A kísérletek során törekedtünk a kísérleti állatok számára okozott fájdalom és stressz minimalizálására. Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága (BA02/2000-6/2006) hagyta jóvá és az állatok kezelése megfelelt az “ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research” feltételeinek. Az összehasonlító vizsgálatokat a következőkben felsorolt fajokban végeztük: 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), aranyhórcsög (*Mesocricetus auratus*, Charles River Laboratories, 5 hím), birka (*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). Minden állat fiatal, ivarérett, egészséges egyed volt, melyek más tanulmányokban kezeletlen negatív kontrollként vettek részt. A vizsgált emberi (*Homo sapiens sapiens*) retinametszetek a centrális régiótól nazális irányban 2-4 mm-re készültek, 3 órás poszt-mortem, fixált, 27 éves polytraumás férfiből származó anyagon. A vizsgált állatok retináit a patkányon és egéren kívül, továbbá a humán metszeteket Dr. Kántor Orsolya (Bp., SE-ÁOK) biztosította számunkra. Az állatok altatása intravénás ketamine-xylozine (10 mg/kg-1 mg/kg) injekcióval történt, majd intravénás (kutya, macska, birka), vagy intrakardiális (egér, patkány, hórcsög, vadászgörény, nyúl, tengerimalac) T-61 (Bayer Hungária Kft., Budapest, Mo.) adagolással végzett eutanáziára került sor. Western blotban használt minták esetében egész retinákat használtunk (kivéve a birka, macska és kutya, ahol centrális és perifériás darabbal dolgoztunk) ezeket folyékony nitrogénes fagyasztást követően szárazjégen szállítottuk és a feldolgozásig -80°C-on tároltuk. Az immuncitokémiai vizsgálatokra használt minták esetén 4% PFA (paraformaldehid) fixált, krioprotektált (PBS-Szacharóz: 15, 30%,) egész szemserleget kaptunk szárazjégen, beágyazva (Tissue-Tek; Sakura Finetek, USA).

5.1.2. Egyedfejlődéses vizsgálatok mintavétele

A Cx expresszió egyedfejlődés során bekövetkező változásainak vizsgálatára P0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 napos albínó Wistar patkányokat használtunk. Ezeket isoflurane (Forane; Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, UK) inhalációs anesztéziát követően dekapitáltuk (10 napos korig), vagy aortális exsanguinációt alkalmaztunk. Ezt követően a szemeket eltávolítottuk és a retinákat hideg (~4-6 °C) nukleázmentes PBS-ben disszekáltuk, és a későbbi PCR (polimeráz láncreakciós) és WB (Western blot) kísérletekig eppendorf csövekben -80°C-on tároltuk. Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a mintavételi időpontok megegyeztek, de P0 időpontot elhagytuk, mivel ebben a mintában sem a vizsgált Cx mRNS-ek, sem a fehérjék expressziós szintje sem különbözött a P1 állatokétól. A szaruhártya és a lencse eltávolításával a szemekből szemserleget készítettünk, majd ezeket PBS + 4% PFA oldatban fixáltuk 4°C-on, 1 órát.

5.2 CONNEXIN DENDROGRAMMOK

A gerinces állatok retináiban előforduló Cx génszakaszok szekvenciáit összegyűjtöttük (az NCBI Nucleotide adatbázisból nyert mRNS szekvenciák alapján), majd ezekből szekvenciahomológián alapuló dendrogrammokat készítettünk. Két külön alignmentet készítettünk. Az elsőben (7. ábra) az egyes gerinces fajok retinális Cx-einek szekvenciáit hasonlítottuk egymáshoz. (Gének: *Rattus norvegicus* Cx43-NM_012567, Cx30-NM_053388, Cx36-NM_019281, Cx45-NM_001085381; *Mus musculus* Cx43-NM_010288, Cx36-NM_010290, Cx30.2-AJ414561, Cx57-NM_010289, Cx45-NM_008122, Cx37-NM_008120; *Homo sapiens* Cx43-NM_000165, Cx26-BC017048, Cx36-BC148788, Cx62-NM_032602, Cx59-NM_030772; *Oryctolagus cuniculus* Cx43-NM_001198948, Cx36-XM_002718001, Cx57-XM_002714475, Cx50-XM_002715651; *Gallus gallus* Cx43-NM_204586, Cx30-NM_204931, Cx32-NM_204371, Cx36-NM_204582, Cx45-NM_205503, Cx50-NM_204997; *Anolis carolinensis* Cx43-XM_003215563, Cx30-XM_003219246, Cx32-XM_003228190, Cx35/36-XM_003214476, Cx57-XM_003215542, Cx50-XM_003219087; *Cavia porcellus* Cx26-NM_001172823; *Danio rerio* Cx27.5-BC056546, Cx35-BC162925, Cx55.5-NM_131812, Cx52.6-NM_212819, Cx43-AF035481, Cx44.1-BC095304; *Morone americana* Cx34.7-AF059184, Cx35-AF059183; *Raja* sp. Cx35-RSU43290; *Cynops pyrogaster* Cx35-AB078502, Cx43-

AB078503; *Xenopus laevis* Cx43-NM_001085660; *Trachemys dorbigni* Cx43-JQ356532; *Cyprinus carpio* Cx43-AZ008286).

A második összehasonlításban az emlős modellállataink retináinak Cx36 mRNS szekvenciáit hasonlítottuk az emberi retina Cx szekvenciáihoz (emberi Cx43: NM_000165; emberi Cx45: NM_005497; emberi Cx59: NM_030772; emberi Cx62: NM_032602; emberi Cx36: BC143788; egér Cx36: NM_010290; vadászgörény Cx36: XM_004796539; patkány Cx36: NM_019281; nyúl Cx36: XM_002718001; kutya Cx36: XM_544602; macska Cx36: XM_003987299; tengerimalac Cx36: XM_003475663; hörcsög Cx36 XM_005087948), valamint az ezüst sügér (*Morone americana*) Cx35/36 szekvenciához (Cx35 White perch AF059183). Ez utóbbi szekvenciát azért hasonlítottuk össze az emlős Cx36 génekkel, mert az általunk immuncitokémiai jelölésekhez használt antitest, anti-egér Cx35/36 G immunglobulin (a.ms.-Cx35/36 IgG) termeltetésénél az ezüst sügér Cx36 fehérjét használták immunogén molekulaként. Az összehasonlítás célja a Cx36 szekvencia konzervatív jellegének és az antitest széleskörű használhatóságának bizonyítása (emlős fajokon is specifikus) volt. Az alignmenthez és az azt követő neighbor-joining (1000x bootstrap) elemzés elvégzéséhez a CLC Main Workbench 6.5 szoftvert (CLC Bio; Aarhus, Dánia) használtunk a következő paraméterekkel: gap open cost=20,0; gap extension cost =2,0.

5.3. A POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR)

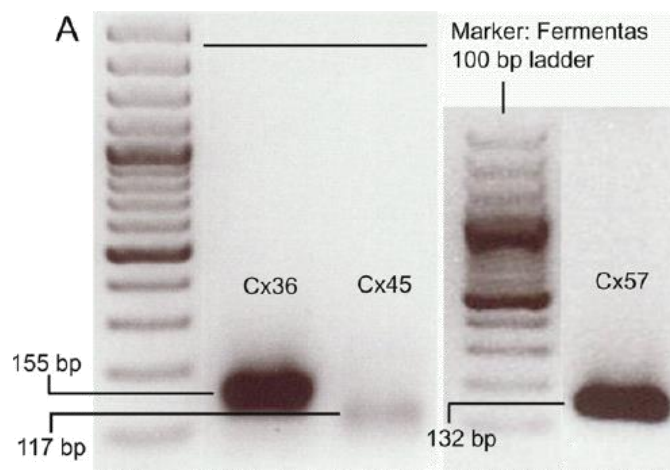
A -80°C-on, jelölt eppendorf csövekben tárolt retinákat a homogenizáltuk, majd RNazol RT-val (Molecular Research Center, Inc., USA) totál RNS extrakciót végeztünk. A gyártó által leírt protokoll szerint dolgoztunk, de fél mennyiségeket használtunk (mivel a patkány retina nedves súlya kevesebb, kb. 40 mg). A tisztított és szárított RNS-t 50-50 µl DEPC-kezelt dH₂O-ban diszpergáltam, a totálRNS-ek mennyiségét Eppendorf Biophotometer Plus-val (Eppendorf, Hamburg, Németország) mértem le, majd ezeket -80°C-on tároltam felhasználásig. A PCR reakciók során használt primereket az adott génekre terveztük meg az NCBI Primer-BLAST segítségével, ezek a 2. táblázatban láthatók. A primereket validáltuk OneStep RT-PCR-rel (Qiagen Inc.) (6. ábra).

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

Először OneStep RT-PCR-vel 50-50 ng totál RNS-ből amplifikáltam a Cx36, 45 és 57 mRNS szekvenciákat, ezzel tesztelve az RNS minőségét és a primerek hatékonyságát. A terméket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam (lásd: 6. ábra) GeneRuler 100 bp Plus DNS-létra segítségével (Fermentas, Biocenter Kft., Szeged Mo.).



6.ábra. A Cx36, 45, 57 primerekkel készült RT-PCR Elektroforézis eredménye 2,5%-os agaróz gélen, megjelölve az ampliconok méretét.

A kvantitatív-PCR (qPCR)-ben használt cDNS-t oligo-dT primerek segítségével állítottam elő 1-1 µg totál RNS-t és Fermentas RevertAid H- RT enzimet (Fermentas, Biocenter Kft., Szeged, Mo.) használva az átíráshoz. Az RT reakció programját lásd a 3. táblázatban.

3.táblázat. A reverztranszkripció programja

Hőmérséklet (°C)	55	25	42	80
Időtartam (perc)	5	10	50	5

A cDNS-t 25 ng/µl végkoncentrációra hígítottam, majd további felhasználásig - 20°C-on tároltam. A Cx36 posztnatális mintasort Applied Biosystems (Abi) StepOne Plus (LifeTechnologies Mo. Kft., Budapest, Mo.) qPCR-thermocyclerrel amplifikáltuk, a többi mintát Bio-Rad CFX Connect-tel (Bio-Rad Mo. Kft., Budapest, Mo.). A két mintasor között azonos cDNS hígítási soron optimalizálást végeztünk. 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 esetében ROX-val a Bio-Rad esetében ROX nélkül (a Bio-Rad CFX Connect gyárilag ROX referenciát nem igényel). Az amplifikáció 45 ciklusos volt, majd “melt-curve” analízis következett minden esetben (lásd részletesen a 4. táblázatban).

4. táblázat. A Cx mRNS mérésekhez használt qPCR program lépései

Hőmérséklet (°C)	95	92	55	72*	50-93
Időtartam	4 p	10 mp	10 mp	20 mp	Melt Curve
Ciklusok száma	1	45			1

*fluorescens kiolvasás

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. A vizsgált mRNS-ek endogén kontrolja minden esetben az Rpl13a-volt. Ennek homogenitását mintasorunkra előzetes méréssel igazoltuk. A szoftveres analízist a thermocyclerek saját szoftverjeivel végeztük, innen exportáltuk az adatokat Microsoft Excel-be (Microsoft Office 2010, Microsoft Ltd., USA), ahol normalizáltuk és összegeztük őket. Az ábrák előállításához Origin-t használtunk.

5.4. WESTERN BLOT

A retinákat -80°C -on tároltuk homogenizálásukig jelölt eppendorf csövekben. Hideg (4°C) $300\ \mu\text{l}$ radioimmunoprecipitation assay pufferrel (RIPA: $10\ \text{mM}$ foszfát puffer pH 7,2, 1% NP-40, 1% nátrium-deoxikolat, $0,1\%$ SDS, $0,15\ \text{M}$ NaCl, $2\ \text{mM}$ EDTA, $2\ \mu\text{g/ml}$ aprotinin, $0,5\ \mu\text{g/ml}$ leupeptin, $2\ \text{mM}$ nátrium-vanadát, $20\ \text{mM}$ nátrium-fluorid, $0,5\ \text{mM}$ dithiothreitol, $10\ \text{mM}$ phenylmethylsulfonyl fluorid) 5 percig vagy teljes homogenitásig homogenizáltuk a retinákat 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 $25\ \mu\text{g}$ fehérjét vittünk fel a 10% -os poliakrilamid gél zsebeibe. 100 , majd a „running” gélbe átlépést követően $150\ \text{V}$ -tal futtattuk marker létra jelenlétében. A gélről a fehérjéket félszáraz blotolással polyvinylidene difluoride (PVDF) membránra blotoltuk ($130\ \text{mA}$, 30 perc). 45 perces tejporos, Tween-20-as, tris-pufferelt sóoldattal (TBST+tp.: $50\ \text{mM}$ Tris, $250\ \text{mM}$ NaCl, $0,1\%$ Tween-20, pH 7,6, $+1\%$ bovine szérum albumin, $+5\%$ zsírszegény tejpor). Blokkolást követően elsődleges Cx36 nyúl poliklonális (Abcam: ab86408; $2000\times$ híg) és β - tubulin nyúl poliklonális (Sigma: T4026; $10000\times$ híg) antitestekkel jelöltük. Ezt a műveletet egy éjszakán át 4°C -on, horizontális rázón végeztük. Az antitesteket $0,5\%$ BSA-s, $2,5\%$ tejporos TBST-vel hígítottuk. A másodlagos anti-nyúl HRP (torma-peroxidáz) konjugált antitestet $10000\times$ hígítottuk TBST-vel és 3 óráig inkubáltuk rázaton, szobahőmérsékleten, majd 4×5 perc TBST-s 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 ($600\ \text{dpi}$) digitalizáltuk és a jeleket a β -tubulinnal, mint endogén kontrollal normalizálva mértük ImageJ (NIH) denzitometria segítségével. Az adatokat a P0-hoz igazítottuk.

5.5. IMMUNOCITOKÉMIA

A szemeket (n=5: P1-P5 és n=8: P10-P20) eltávolítottuk és a szemserlegeket 1 óráig szobahőn fixáltuk 4% paraformaldehiddel (0,1 M; pH 7,4). PBS-es (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄*7H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mosást követően 10%, 20%, 30%-os szacharóz soral krioprotektáltuk, majd beágyasztuk Tissue-Tek O.C.T-vel. 12 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket zselatinizált tárgylemezekre gyűjtöttünk, szárítottunk és felhasználásig -20°C-on tároltunk. A kiolvasztott metszeteket elsődleges antitesttel kezeltük (1000x egér anti-Cx36, MAB3045 – Merck Millipore; 10000x nyúl anti-CaR, AB-5054 – Chemicon/Merck Millipore; 10000x nyúl anti-PV, AB-5054 – Chemicon, Merck Millipore) és egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Az antitestek PBST+BSA pufferben oldottuk fel (PBS, 0,5% TritonX-100, 1% BSA). Hatszor 10 perc PBST-s mosást követően másodlagos antitestekkel jelöltük őket, ezek: 10000x anti-egér IgG-Alexa488 (A11001; 495/519 nm – Life Technologies/Invitrogen) és anti-nyúl IgG-Alexa546 (A10040; 561/572 nm – Life Technologies/Invitrogen) PBST-vel hígítva. Négyyszer 5 perc PBST és egyszer 5 perc PBS mosást követően Vectashield beágyazó médiummal (Vector Laboratories, Peterborough, Nagy-Britannia) lefedtünk.

5.6. MIKROSZKÓPIA

5.6.1. Mikroszkópia

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 lézert és az 543 nm-es Hélium/Neon lézert használva az Alexa488 és Alexa546-val konjugált másodlagos antitestek gerjesztésére. Zeiss Plan Apochromat 63x/1.4 olaj-immerziós objektívet használtuk. Az utómunkálatok során a fotók kontrasztjának és fényerejének beállítására az Adobe Photoshop CS3 és ImageJ programokat alkalmaztunk és csak globálisan állítottunk a fenti tényezőkön. Ábráink vonalrajzai pedig Adobe Illustrator CS3 programmal készültek.

5.6.2. Szuperrezolúciós mikroszkópia

A Cx36 jel nagyfelbontású detektálására Egy Zeiss Elyra Structured Illumination (SIM) típusú szuperrezolúciós mikroszkópot (Carl Zeiss, Jéna, Németország) használtunk. A msCx36/gt-anti-ms-Alexa488 jelet 488-nm-es lézerrel gerjesztettük. Zeiss Plan Achromat $\times 63/1.4$ olaj immerziós objektívet használtunk. A fényútba helyezett optikai rácst, 5 különböző rotációs szögbe állítva fényképeket készítettünk minden egyes beállításról. 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 is tud képet alkotni. Zeiss ZEN szoftert alkalmaztunk a képek előkészítésére, majd ImageJ-t elemzésükre. Ezért kifejezetten alkalmas az általunk vizsgált Cx-ek által alkotott plakkok méretének meghatározására.

5.6.3. Denzitometria és Cx36 plakk statisztika

A retina 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 intenziás beállításban, 10 μm -t átfogóan) segítségével. Minden egyes mérés denzitometriai analíziséhez öt (patkány egyedfejlődéses sorozat esetén), illetve három (emlős összehasonlító vizsgálatok esetén) metszetet választottunk, amelyekből egyesével öt, megegyező méretű és alakú (150 μm x 20 μm , négyzet) reprezentatív részt választottunk, melyekből a plot profil analízis funkció (Image J) segítségével kétdimenziós pozíció/intenzitás görbéket állítottunk elő. 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 “analyse 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 (12. ábra) eloszlását az ImageJ szoftver „Analyse particles” alkalmazásával, állatonként három metszetből, átlagolt eredmény alapján készítettük, feltüntetve a szórást. Az eredeti képekből bináris képet konvertáltunk háromszögelő (triangle) szűrővel. A bináris képen az IPL-t átfogó, ezért változó magasságú, de minden esetben egyenlő horizontális szélességű (134 μm) régióban végeztük el, az

elipszoid alakú (0,4-1-es tőrésarárral) kijelölések számolását. Ezt exportáltuk és Microsoft Excellel összesítettük.

5.7. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatok statisztikai analízisét vagy Origin 6 (Microcal Origin 6.0; Northhampton, USA) vagy SPSS 19 szoftverrel végeztük. A szignifikancia szint meghatározására egytényezős ANOVA analízis (SPSS v19; SPSS Inc., IBM), ezen Bonferroni, Gabriel és Tukey post-hoc tesztekét végeztünk (Field, 2013). Továbbá Student-féle t-próbát használtunk egyes esetekben (az ábrák feliratában jelölve).

6. EREDMÉNYEK

6.1. NEURONÁLIS CONNEXINEK HOMOLÓGIA VIZSGÁLATA BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREKKEL

Vizsgálataink céljai között szerepelt, a retinális Cx fehérjék expressziójának különbségei illetve hasonlóságai alapján, a gerincesek törzsfajlásán végigvonuló evolúciós trendek nyomait feltárni. Ennek első lépéseként összegyűjtöttük a gerincesek retináiban termelt valamennyi Cx molekula adatait (aminosav és nukleotid sorrend), melyeket a könnyebb áttekinthetőség kedvéért táblázatos formába foglaltuk (5. táblázat) és az egyes gerinces osztályok szerint csoportosítottuk. A kétéltű és hüllő fajokra vonatkozó adatmennyiség sajnos kevés. A madarak és hüllők osztályait is pusztán egy-egy faj (házityúk, teknős) képviseli. Ugyanakkor a kedvelt állatmodell emlősfajokra (egér, patkány, nyúl), valamint a könnyen hozzáférhető és kezelhető halfajokra vonatkozóan lényegesen több az elérhető adat. A táblázat ezen sajnálatos hiányossága a kutatási trendeket tükrözi.

Az 5. táblázat alapján jól látszik, hogy vannak olyan retinális Cx típusok, melyek nemcsak egy-egy gerinces osztály több faja esetén, hanem több gerinces osztály képviselőinél is megfigyelhetők a retinában. A szakirodalmi nevezéktan paralógoknak nevezi az egy adott fajban megtalálható Cx-eket, míg ortológoknak a különböző fajokban található, azonos génhez (ill. termékéhez) tartozó Cx-eket. Azt azonban, hogy az azonos névvel ellátott Cx molekulák valóban szerkezeti homológok, vagyis ortológok-e, csak részletes molekuláris elemzéssel lehet ellenőrizni. Ennek érdekében egy DNS nukleotid szekvencia alapú filogenetikai fát hoztunk létre (7. ábra). A Cx család elkészítéséhez először felkutattuk az 5. táblázatban található gerinces Cx fehérjékre vonatkozó irodalmi adatokat és összegyűjtöttük az ezek kifejeződésért felelős DNS szekvenciákat.

5. táblázat. Connexin altípusok előfordulása a gerinces retinában

Cx-típus	Halak	Kételtűek	Hüllők	Madarak	Emlősök
Cx26			Teknős ^a	Csirke ^b	
Cx27.5	Zebradánió ^c				
Cx30					Patkány ^d
Cx30.2					Egér ^e
Cx32				Csirke ^b	
Cx34.7	Sügér ^f				
Cx35/36	Rája ⁿ Zebradánió ^o Sügér ^f	Szalamandra ^p		Csirke ^q	Egér ^{g,h,i,j,k,l,m} Nyúl ^r Patkány ^s Tengerimalac ^t Ember ^u Majom ^{a,v}
Cx37					Egér ^l
Cx43	Ponty, Zebradánió ^w	Göte ^x	Teknős ^w	Csirke ^{b,x}	Egér ^{l,y} Nyúl ^{z,aa} Patkány ^d Ember ^{ab}
Cx44.1	Zebradánió ^c				
Cx45				Csirke ^x	Egér ^{b,ac,l,y,ad} Patkány ^d
Cx50				Csirke ^x	Nyúl ^{ae,af}
Cx52.6	Zebradánió ^{ag,ah}				
Cx55.5	Zebradánió ^c				
Cx56				Csirke ^x	
Cx57					Egér ^{l,ai,aj} Nyúl ^{ae}
Cx59					Ember ^{aa}
Cx62					Ember ^{aa}

a Pottek és mtsai. (2003). **b** Becker és mtsai. (2002). **c** Dermietzel és mtsai. (2000). **d** Zahs és mtsai. (2003). **e** Müller és mtsai. (2010). **f** O'Brien és mtsai. (2004). **g** Deans és mtsai. (2002). **h** Han és Massey (2005). **i** Hansen és mtsai. (2005). **j** Lin és mtsai. (2005). **k** Schubert és mtsai. (2005a). **l** Kihara és mtsai. (2006a). **m** Pan és mtsai. (2010). **n** O'Brien és mtsai. (1996). **o** Liu és mtsai. (2009). **p** Zhang és Wu (2004). **q** Kihara és mtsai. (2009). **r** Kothmann és mtsai. (2009). **s** Hidaka és mtsai. (2002). **t** Lee és mtsai. (2003). **u** Söhl és mtsai. (2010). **v** O'Brien és mtsai. (2012). **w** Janssen-Bienhold és mtsai. (1998). **x** Kihara és mtsai. (2008). **y** Kihara és mtsai. (2006b). **z** Johansson és mtsai. (1999). **aa** Zahs és Ceelen, 2006. **ab** Kerr és mtsai. (2010). **ac** Schubert és mtsai. (2005b). **ad** Hilgen és mtsai. (2011). **ae** Huang és mtsai. (2005). **af** O'Brien és mtsai. (2006). **ag** Zoidl és mtsai. (2004). **ah** Shields és mtsai. (2007). **ai** Janssen-Bienhold és mtsai. (2009). **aj** Palacios-Prado és mtsai. (2009). (táblázat és hivatkozásai: Völgyi és mtsai. 2013 után).

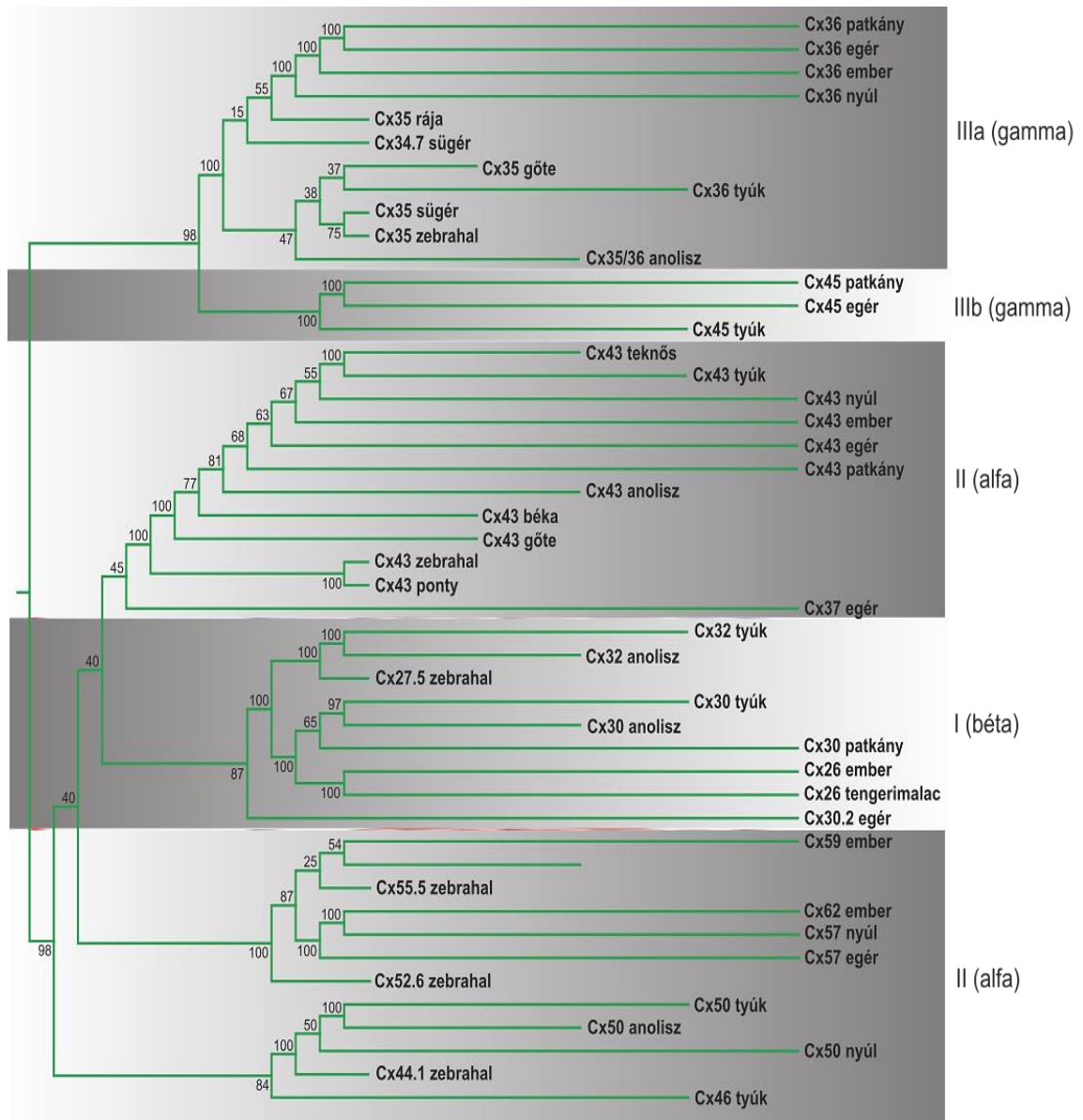
Az összegyűjtött szekvenciák variábilis N- és C-terminálisait elhagytuk, majd a konzervatív szekvenciákat tartalmazó (főleg transzmembrán és loop) régióon végeztünk „alignment”-et. Ezt követően NJ (neighbor-joining) metodikával (CLC, neighbour-joining, Bootstrap analízis) készítettük el a dendrogrammot (7. ábra, Völgyi és mtsai. 2013 után). A kapott Cx családfán jól látszik, hogy a hasonló névvel ellátott (azaz hasonló molekulatömegű) Cx molekulák ágai egymáshoz viszonylag közel helyezkednek el, ami az alacsony relatív genetikai távolságokra, azaz ortológiára utal. Ezen kívül a Cx családfánkon jól elkülönülnek a Cruciani és Mikalsen (2006, 2007) által meghatározott szerkezeti Cx csoportok: α , vagyis a II; β , vagy I; γ , vagy IIIa és IIIb csoport (sötétebb háttérrel elválasztva).

Az I-es csoport (β -Cx-ek) tagjai a különböző gerinces fajokhoz tartozó Cx26, Cx27.5, Cx30, Cx30.5 és Cx32 molekulák. A zebra hal Cx27.5 valamint a hüllő és madár Cx32 ortológiája egyértelműen látszik, hogy ezek szekvenciáinak egymáshoz viszonyított variabilitása minimális. A Cx30-okat és Cx26-okat ugyan a NJ analízis egy szubkládba sorolja, ám ezek ortológiája nem egyértelmű, sőt az analízis alapján külön kládba kerülnek. Az egér Cx30.2 szintén ebbe a Cx csoportba sorolható, ám némileg elkülönül a csoport többi tagjától.

A II-es csoport (α -connexinek) tagjai két nagyobb alcsoportot alkotnak, melyek közül az egyik a különböző állatok Cx43 molekuláit tartalmazza. A másik ág nagy molekulatömegű Cx-eket tartalmaz és újból kettéágazik. Az ágak közül az egyik a különböző fajok legnagyobb molekulásúlyú Cx-eit tartalmazza (pl. emberi Cx59 és Cx62, teknős, nyúl és egér Cx57, hal Cx55.5). A zebradánió Cx52.6 a II-es csoport egyik szubkládjába sem sorolható egyértelműen, valószínűleg a Cx55.5 egy paralógjáról van szó. A nagy molekulatömegű Cx-ek másik csoportját alkotják a Cx50 molekulák és ezek ortológjai (hal Cx44.1 és csirke Cx46).

A IIIa-csoport (γ -connexinek) munkám szempontjából a legnagyobb fontossággal bír, hiszen az általunk kiemelten vizsgált Cx36 is ennek a csoportnak a tagja. A Cx35/36 ortológok egytől-egyig ugyanabban a kládban találhatóak. Az emlős Cx36 szekvenciák egymáshoz nagyon hasonlatosak, míg az egyéb gerinces ortológok ezektől valamelyest nagyobb genetikai távolságra helyezkednek el. E miatt az emlős Cx36 molekulák ugyanabban a szubkládban foglalnak helyet, míg a kétélű, hüllő és madár csoportokhoz tartozó Cx36 ortológok külön szubkládot alkotnak. Érdekes, hogy a halak osztálya esetében található Cx35/36 ortológ mindkét szubkládban.

A IIIb (γ -connexinek) csoportja a Cx45 ortológjaiból áll, melyek kizárólagosan alkotják ezt a csoportot.



7. ábra. Connexinek filogenetikai családfája

Az ábra az 5. táblázatban található Cx fehérjék expressziójáért felelős DNS szakaszok szekvencia homológia alapú dendrogrammját mutatja. A Cx családfán az egymás alatti vízszintesen kapcsolt kládok a nagy szekvenciahomológiával rendelkező Cx-eket tartalmazza (az ágakon látható számok a relatív genetikai távolságot jelképezik). Az egyes sorok elemei úgy kerültek elrendezésre, hogy függőleges oszlopokat alkossanak a nekik megfelelő gerinces osztály piktogramjai alatt. A szürke sávozás a szerkezeti és funkcionális szempontból egymástól elkülönített csoportokat (ezek nevei a sávozástól jobbra találhatóak) jelölik. (Völgyi és mtsai., 2013 után).

A Cx ortológok csoportosulása mellett szembeűnő az, hogy a paralóg Cx molekulák viszont esetenként igen távoli genetikai kapcsolattal rendelkeznek (pl. hal Cx35 és Cx55.5 molekulák). Nagyon jól látszik a Cx családfa alapján, hogy a Cx ortológok még igen távoli rokonságot mutató gerinces fajok esetében is jóval közelebb találhatók meg egymáshoz képest, mint az egy osztályba (vagy akár egy fajba) tartozó paralóg szekvenciák. A 7. ábra alapján tehát elmondható, hogy a vizsgált szekvenciák alapvetően konzervatívák, kicsi a variabilitásuk.

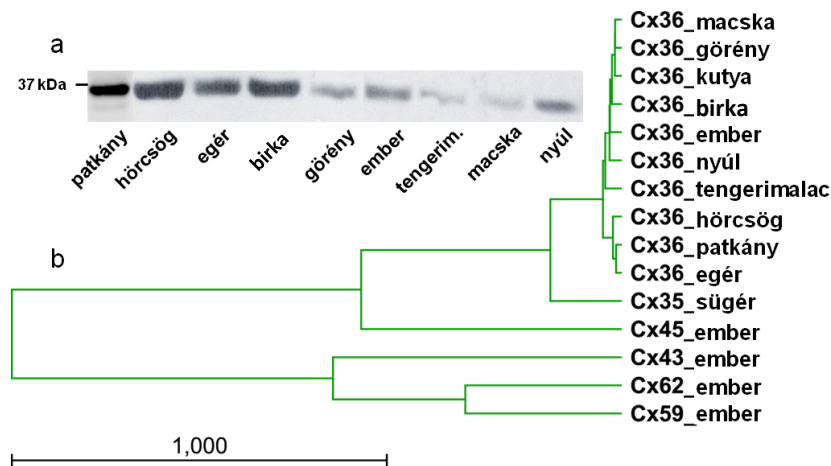
6.2. A KÜLÖNBÖZŐ EMLŐS FAJOK CX36 FEHÉJÉINEK SZERKEZETI HASONLÓSÁGAI

Második vizsgálatsorozatunkban a Cx36 fehérje, mint legáltalánosabb neuronális Cx, expressziós mintázatának hasonlóságaira és eltéréseire voltunk kíváncsiak az emlős retinában. Mivel ezt a kérdéskört elsősorban immuncitokémiai módszerrel közelítettük meg, ezért fontosnak tartottuk, hogy első lépésben az alkalmazni kívánt anti-Cx36 antitest specifikusát bizonyítsuk. Ezt részben a klasszikus primer antitest, vagy szekunder antitest kihagyásos kontroll kísérletekkel végeztük, melyek minden egyes esetben negatív eredményt szolgáltatottak. Ezzel megerősítést nyert az a tény, hogy a használt antitestek specifikus Cx plakk jelölést és nem szöveti háttérjelölést eredményeztek (lásd később az immuncitokémiai kísérleteknél). Ezen kívül további bizonyítékot kerestünk arra vonatkozóan, hogy az általunk használt Cx36 antitest valóban csak a szöveti Cx36 fehérjét és nem más (pl. Cx45, Cx57) Cx molekulát azonosít. Ennek bizonyítására emlős állatmodelljeink retináin WB jelölést hajtottunk végre. A vizsgált állatok esetében a jelölt csíkok minden esetben a kívánt 36 kDa körüli értéket mutatták (8a. ábra). A WB kísérletek esetén az immuncitokémiai kísérletekben használt antitest sajnos nem működött. Ezzel a problémával kapcsolatban levelezést folytattunk Dr. John O'Brien-nel (University of Houston) aki a retinális Cx fehérjék vizsgálatának egyik elismert szakértője. E kommunikáció alapján vált nyilvánvalóvá, hogy az immuncitokémiai és WB vizsgálatokhoz ugyanazt az antitestet nem tudjuk használni. E miatt a Cx36 WB kísérleteket egy másik, a Cx35 C-terminális epitópra fejlesztett poliklonális RbCx35/36 antitesttel végeztük.

A 8a. ábrán bemutatott WB eredmények tehát igazolták, hogy modell állataink retinái tartalmaznak Cx36 fehérjét. Ugyanakkor a megjegyzésben megfogalmazott probléma miatt nem igazolta az immuncitokémiai vizsgálatainkhoz használt antitest

specifitását. Úgy gondoltuk, hogy ezt a hiányosságot részben kiválthatjuk egy Cx családfa vizsgálattal, ahol a különböző emlős fajok Cx36 molekuláinak nagyfokú szerkezeti hasonlóságát mutatjuk be. Ebben a vizsgálatban emlős modelljeink Cx36 aminosav-szekvenciáit vetettük össze a sügér Cx35 molekuláéval. Mivel ez utóbbi faj fehérjéje szolgált antigénként az általunk immuncitokémiai jelölésekhez alkalmazott antitest előállításakor, ezért fontosnak tartottuk ennek szerepeltetését az összehasonlításban. Ezen túlmenően az összehasonlítást kiegészítettük egy humán Cx sorozattal is (Cx43, Cx45, Cx59, Cx62), mellyel kettős célunk volt: (i) felsorakoztatni nem Cx36 fehérjéket a vizsgálatban (ezzel a Cx36 specifitást teszteltük); (ii) a humán Cx molekulákat összehasonlítani egymással, mely eredményeink a későbbikben potenciális klinikai relevanciával bírnak majd.

A vizsgálat eredményeként előállított családfa a 8b. ábrán látható. Ezen egyértelműen látszik, hogy az összes vizsgált faj Cx36 molekulája (ortológok) egyetlen kládban tömörül, ami a Cx36 molekulák nagyfokú szerkezeti hasonlóságára és egyben a Cx36 fehérje konzervatív evolúciójára utal. A Cx36 ortológok szerkezeti hasonlósága még szembetűnőbb, ha összehasonlítjuk azt a humán Cx58 és Cx62 (szintén ortológ) molekulák közötti genetikai távolsággal. Ez utóbbi két molekula nem csak ortológ (Söhl és mtsai., 2010), hanem ugyanabban a fajban is termelődnek, tehát paralógok is. Ennek ellenére a humán Cx58 és Cx62 szekvenciák között nagyobb a relatív genetikai távolság, mint a különböző emlős fajok Cx36 ortológjai között. Jól látható, hogy a sügér Cx35 molekula szerkezete az emlős Cx36 molekulákkal ugyancsak nagy homológiát mutat, ám viszonylag távol esik az egyéb nem-Cx36 emlős molekuláktól. Itt fontos megemlíteni azt, hogy a sügér Cx35 és az emlős Cx36 molekulák szerkezetei között kisebb a genetikai távolság, mint a Cx36-al rokon Cx45 (mindkettő a γ -connexin csoportba tartozik) és a sügér Cx35 között, vagy akár a humán paralóg Cx36 és Cx45 páros szekvenciái között. Ez utóbbi megfigyelés azért fontos, mert a Cx45 molekula az, amelyikkel a legnagyobb a keresztreakció esélye egy Cx36 immunjelölés esetén.



8. ábra. Az emlős modellállatok retinájából készült Cx36 WB és Cx36 filogenetikai családfa

a) Cx36 WB, balra a marker látható **b)** Cx36 fehérje filogenetikai analízise, ahol az emberi neuronális, retinális Cx-eket is feltüntettük (CLC Bio 6 NJ., 100x bootstrap-vel, a hossz mérték gen. táv. Debertin és Kovács-Öller és mtsai., publikáció folyamatban).

6.3. A CX36 FEHÉRJE EXPRESSZIÓJA EMLŐS ÁLLATMODELLEK RETINÁIBAN

A bioinformatikai és Cx családfa vizsgálatok alapján a fentiekben megbizonyosodtunk arról, hogy a sügér Cx36 szekvencia több homológiát mutat az emlős Cx36 fehérjékkel, mint más emlős Cx aminosav szekvenciákkal (8b. ábra). Ez ugyan nem elégséges, de szükséges feltétele az immunitokémiai vizsgálatainkban használni kívánt antitest specificitásának. Arról is információt nyertünk, hogy a különböző emlős fajokhoz tartozó Cx36 fehérjék aminosav szekvenciái kifejezetten magas homológiát mutatnak. A homológia magas foka konzervatív Cx36 evolúcióra utal, illetve valószínűsíti annak esélyét, hogy az egyes emlős fajok Cx36 fehérjei ugyanazokat a neuronális kapcsolatokat létrehozó GJ-k elemeiként szerepelnek. Ha ez valóban így van, akkor a Cx36 fehérjék eloszlási különbségei és hasonlóságai az egyes emlős fajok retináinak funkcionális különbségeit és hasonlóságait is feltárja. Ennek a kérdéskörnek a vizsgálatához emlős modell állataink retináin Cx36 immunreakciókat hajtottunk végre.

6.3.1. Cx36 fehérje expresszió modell emlős fajok retináiban

Az első kísérletsorozatban retinális keresztmetszeteken végeztünk Cx36 immunreakciót. A vizsgálat eredménye (9, 10 és 11. ábrák első oszlopai), hogy az általunk alkalmazott antitest minden vizsgált faj retinális keresztmetszetén a várt plakkszerű Cx36 jelet adott a külső és belső rostos rétegekben.

6.3.2. A CaR háttérjelölés karakterizálása emlős fajok retináin

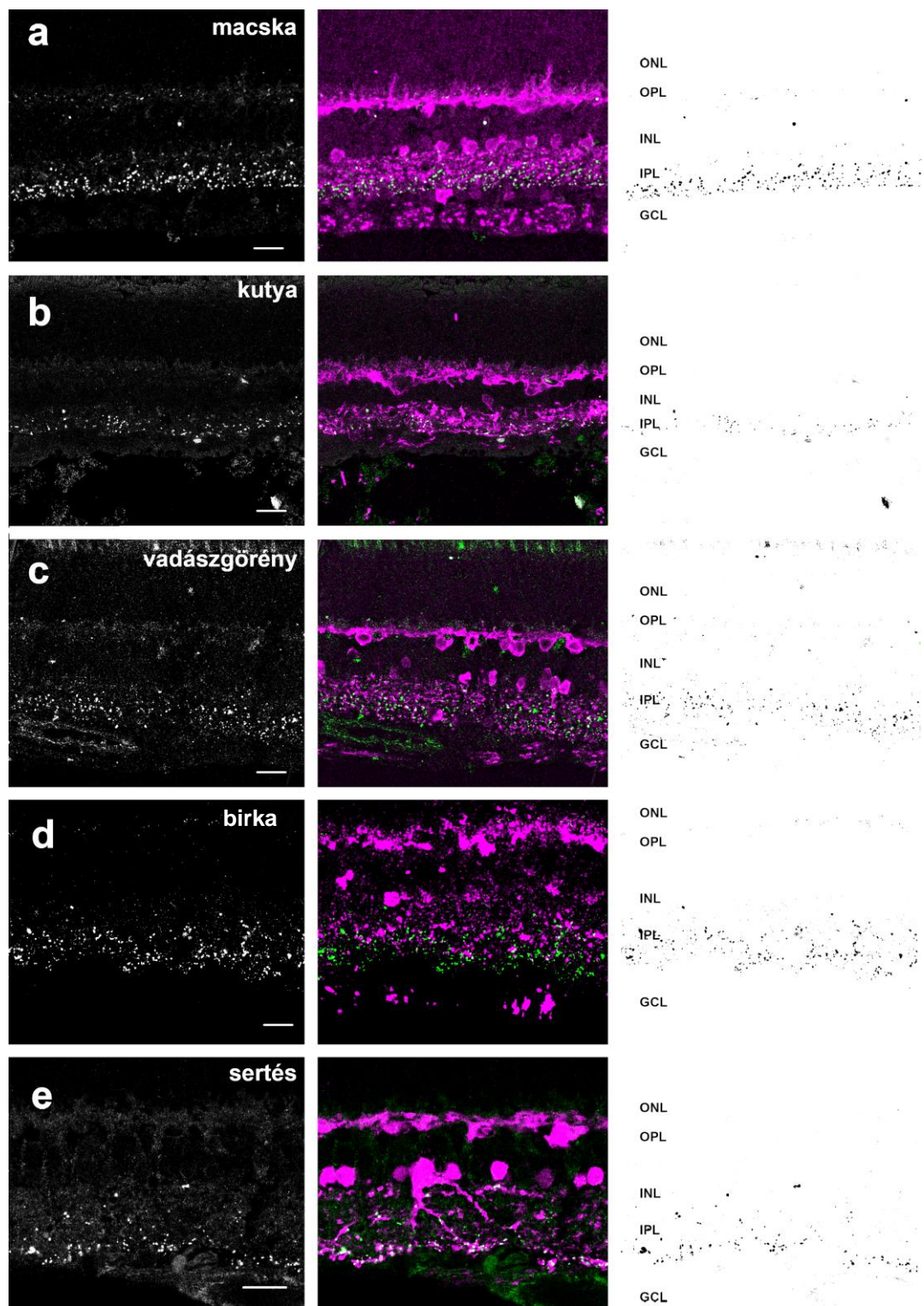
Ahhoz, hogy a fent bemutatott Cx36 immunjelölés pontos helyét lokalizáljuk és a jelölést pontosabban jellemezzük egy második neuronális marker, a 29 kDa molekulatömegű calretinin (CaR) ellen termelt antitesttel háttér immunjelölést végeztünk. A CaR köztudottan neuronális idegelemekben különböző agyi struktúrákban termelődik. Az emlősállatok retináiban különféle neuronok termelik a CaR-t. A mi elvárásunk a CaR háttérjelöléssel szemben az volt, hogy egyértelműen kijelölje modell emlős fajaink retináin a rostos és sejtes rétegek határait ahhoz, hogy a Cx36/CaR kettősjelöléses kísérletekben a Cx36 plakkjelölés pontos helyét meghatározhassuk. A CaR jel a különböző emlős retinák esetében három jól elkülöníthető altípust eredményezett (9-11. ábra).

Az első altípusba a macska, a kutya és a vadászgörény, a birka és a sertés retinái sorolhatók (9. ábra). Ezeknek az állatoknak a retináiban CaR termelést figyeltünk meg a külső retinában, mind az OPL mentén futó vastag dendritikus rostokban, mind az INL disztális területén megfigyelhető nagyméretű sejttestekben, amely jelölés egyértelműen a horizontális sejtek CaR termelésére utal. Ugyancsak erős CaR immunjel figyelhető meg a belső retina egyes amakrin sejtjeiben, melyek sejttestjei az INL proximális részén (esetleg a GCL-ben displaced amakrin sejtjeként) tájálhatóak. Ugyanezen amakrin sejtek dendritikus nyúlványai az IPL állományában sűrű rostos szöveteket alkotnak.

A második altípusba az emberi, a nyúl, a tengerimalac és a mókusmajom retina tartozott (10. ábra). Ezekben a fajokban külső retinális CaR jel nem figyelhető meg. Ugyanakkor a belső retinában (GCL, IPL, INL) CaR pozitív amakrin sejtek találhatóak az INL-ben, valamint displaced amakrin sejtek és dúcsejtek találhatóak a GCL-ben. Ezen belső retinális idegi elemek dendritikus nyúlványai ugyancsak CaR pozitívan jelölődtek és sűrű hálózatot alkottak az IPL állományában. A nyúl retina esetén a CaR amakrin sejtek egy része irodalmi leírások alapján (Völgyi és mtsai., 1997) azonosíthatóan a keskeny dendritmezű AII amakrin sejtek közé tartoznak. Ezen amakrin sejtek relatíve nagy szómái az INL legproximálisabb részében helyezkednek el, gyakran az IPL állományába is benyúlnak, a sejttest alajából pedig egy- vagy két vastag dendritikus gyökér (stalk) ered. Ezekből a közel vertikálisan futó gyökérszerű fődendritekből az OPL disztális (OFF sublamina) területén ered az AII sejtek egyik nyúlványrendszere, mely rövid, kisebb bunkókban (lobula) végződő dendritekből áll. Ugyancsak a fődendritekből ered az AII sejtek második dendritikus állománya, melyek

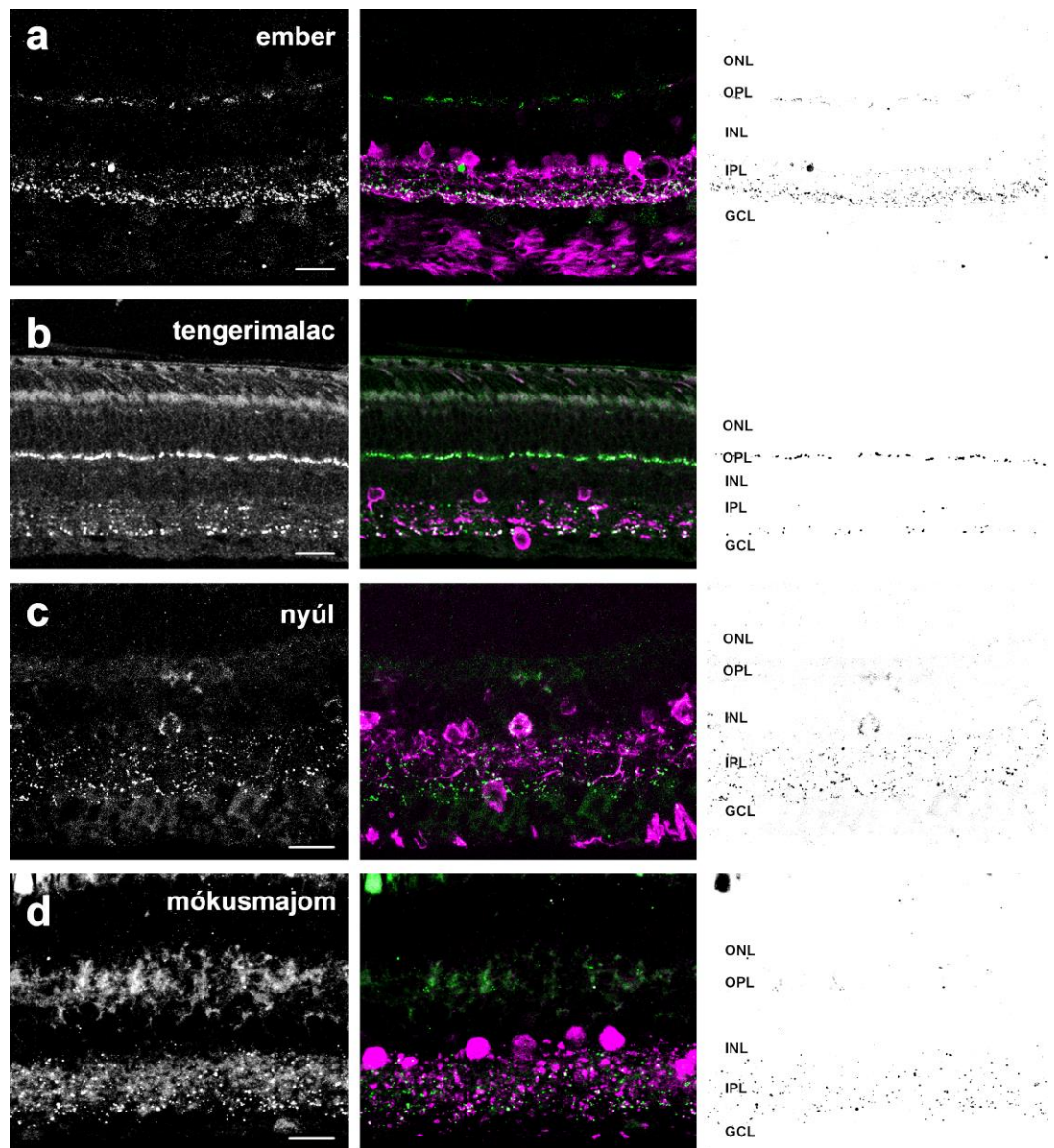
transzverzálisan vagy ferdén futnak egészen az IPL legproximálisabb részéig és ott alkotnak elágazásrendszert (transzverzális dendrit ágak). A nyúl retinában ezek az AII sejtek egyértelműen felismerhetők voltak a CaR pozitív idegsejtek között. Megfigyelhető, hogy a második altípust alkotó többi retina (ember, birka, tengerimalac, mókusmajom), sőt az első altípus (macska, kutya, vadászgörény, birka, sertés) retinái is rendelkeztek hasonló AII szerű CaR termelő idegsejtekkel. Bár további kísérletek nem folytatunk ezeknek a sejteknek az egyértelmű azonosítására, de a későbbiekben az egyszerűség kedvéért ezeket az idegelemeket AII sejteknek nevezzük. A második altípus retináiban a CaR az AII sejtek mellett egyéb amakrin sejtekben is termelődött. Ezeken túl a GCL-ben nagy sejttestű dúcsejtek is CaR pozitivitást mutattak.

A harmadik altípus CaR jele, amely az egér, a patkány és a hörcsög retinára volt jellemző, mindkét fenti altípustól eltérő mintázatot mutatott. Ezekben a retinákban CaR pozitív elemek csak a belső retinában fordultak elő. Ugyanakkor a belső retina CaR pozitív elemei közül az előbbieken karakterizált tipikus AII morfológiájú sejtek hiányoztak. Megfigyeltük a CaR pozitív sejttesteket mind az INL-ben mind a GCL-ben. Ezeknek a sejteknek a rostjai, ellenben az első és második altípussal, azonban nem denz IPL hálózatot, hanem szabályos IPL rétegeket kijelölve (ezeket stratumnak nevezzük) ágaztak el. A stratum 2 és 4 rostelemekhez tartozó idegelemeket a patkány és az egér retinákban korábban a tükörszimmetrikus starburst sejtek két (klasszikus és displaced) amakrin sejt populációjaként azonosították (Gábrriel és Witkovsky, 1998; Haverkamp és Wässle, 2000). A harmadik sejtpopuláció, melynek rostjai az IPL közepén (stratum 2-3) találhatóak, az ún. WA-S2/3 amakrin sejttel azonos (Knop és mtsai., 2014). A harmadik altípus retinái esetén az amakrin sejteken kívül a GCL nagy, CaR pozitív dúcsejteket is tartalmazott.



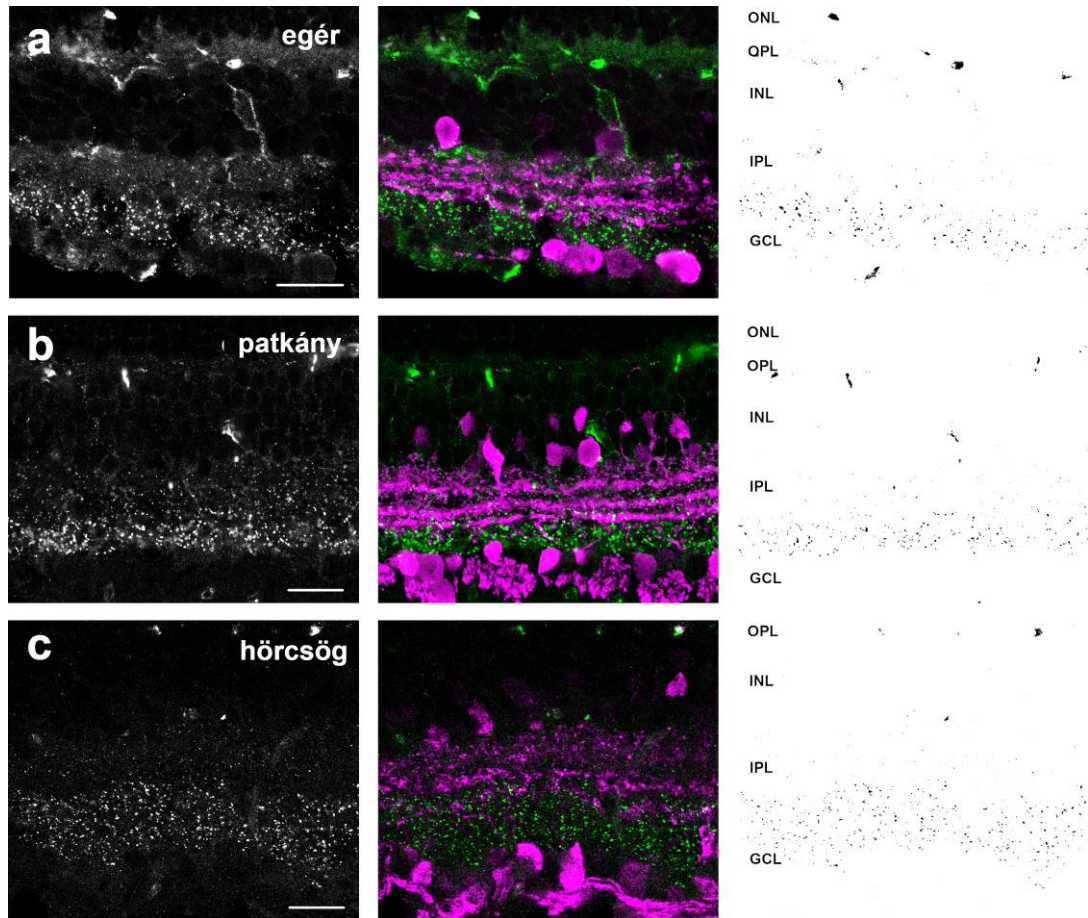
9. ábra. Cx36 immuncitokémiai jelölés emlős modelljeink (a-e) retináiban

Az ábra első oszlopában csak a Cx36 jelet láthatjuk, majd a Cx36 (zöld) és CaR (magenta) kettős jelölt retinákat. A harmadik oszlopban a Cx36 jel inverze látható. Aránymérték: 20 μ m.



10. ábra. Cx36 immuncitokémiai jelölés emlős modelljeink (a-c) retináiban

Az ábra első oszlopában csak a Cx36 jelet láthatjuk, majd a Cx36 (zöld) és CaR (magenta) kettős jelölt retinákat. A harmadik oszlopban a Cx36 jel inverze látható. Aránymérték: 20 μ m.



11. ábra. Cx36 immuncitokémiai jelölés emlős modelljeink (a-c) retináiban

Az ábra első oszlopában csak a Cx36 jelet láthatjuk, majd a Cx36 (zöld) és CaR (magenta) kettős jelölt retinákat. A harmadik oszlopban a Cx36 jel inverze látható. Aránymérték: 20 μ m.

6.3.3. A Cx36 GJ-k eloszlása és a Cx36 termelő idegelemek meghatározása

Az alábbi összehasonlításban a humán retinán kívül további 11 emlős faj retináit hasonlítottuk össze a Cx36 fehérje termelése szempontjából. Ezeket az eredményeinket a 9-11. ábrák foglalják össze. Az összehasonlításban támpontot adtak az előző fejezetben jellemzett CaR termelő idegelemek sejtteste és rostjai, melyek a sejtes és rostos rétegek határait és esetenként a rostos rétegek alrétegeit is kijelölték. Az alábbi emlős fajonkénti Cx36 leírásokban tehát ezen CaR háttérjelölést fogjuk alapul venni.

A **kutya** (*Canis lupus familiaris*, beagle) retinában a külső retina horizontális sejtjei erős CaR⁺ immunjelölést mutattak mind a szómákban, mind pedig nyúlványaikban. Mivel a horizontális sejtek nyúlványai a fotoreceptorokból kapják

bemeneteiket, ezért ezek elhelyezkedése egyértelműen kijelölte a külső rostos réteg (OPL) területét. Ez alapján megfigyeltük, hogy Cx36 plakkok, ugyan kis számban, de egyértelműen megfigyelhetők az OPL területén. A Cx36 plakkok a kutya OPL-ben elszórtan találhatóak meg és a CaR/Cx36 kolokalizációra kifejezetten ritkán láttunk példát. Ezzel szemben a kutya belső retinában a CaR amakrin sejtekben és a GCL területén található dúc- és/vagy displaced amakrin sejtekben megfigyelhető CaR-Cx36 kolokalizáció. Ezeknek a neuronális elemeknek a nyúlványai az IPL területén gazdag hálózatot alkottak, amely megnehezítette az egyes CaR termelő idegelemek azonosítását. Ugyan döntő bizonyítékunk nincs rá, de az INL-ben elhelyezkedő amakrin sejtek egy része AII sejtekre emlékeztető morfológiát mutatott: (i) nagy sejttest, (ii) az IPL-be benyúló sejttest és/vagy primer dendritcsomó, (iii) a primer dendritből induló 2-3 transzverzálisan vagy átlóban futó, relatíve vastag dendritágak melyek az IPL/GCL határig nyúlnak és (iv) az INL/IPL határhoz közelebb elhelyezkedő horizontális irányban haladó rövid nyúlványok, melyek más emlős fajok AII sejtjeinek lobuláris dendritjeire emlékeztetnek. Az AII-szerű sejtek mellett megfigyeltünk egy másik, szintén nagy sejttesttel rendelkező amakrin sejtet. Ez utóbbi sejt típus diagonális irányú, vastag és hosszú dendritágakkal rendelkezett. Egy harmadik CaR termelő csoportot alkottak azok az idegsejtek, melyeknek sejttestjei a GCL-ben voltak, de nyúlványaikat az IPL gazdag CaR jelölt rosthálózata miatt nem tudtuk követni. Ezek a sejtek lehetnek dúc sejtek és displaced amakrin sejtek. Attól függetlenül, hogy a CaR termelő belső retinális idegsejtek, mely populációhoz tartoztak, sejttestjeik egyértelműen kijelölték az INL/IPL és az IPL/GCL határokat. Ennek segítségével emondhatjuk, hogy Cx36 jelölt plakkok az IPL egész területén megfigyelhetők. Ugyanakkor a Cx36 plakkok gyakorisága az IPL proximális (ON alréteg: 3-5 stratumok) részében szemmel láthatóan magasabb volt és a plakkok mérete is ezen az IPL területen tűnt nagyobbak. Különösen gyakoriak a Cx36 plakkok az IPL legproximálisabb részén, az IPL/GCL határhoz közel. CaR/Cx36 kolokalizáció nagy számban volt megfigyelhető és különösen jellemző volt az AII-szerű sejtek transzverzálisan haladó, ON alrétegben levő nyúlványain. Ezek mellett láthatóak voltak szép számban olyan CaR/Cx36 kettősjelölések, amelyek valószínűleg nem az AII sejtek nyúlványaihoz, hanem a másik két populáció sejtjeinek rostjaihoz tartoztak. Cx36 plakkot megfigyeltünk CaR-CaR rostkereszteződések esetében is, amely valószínűleg nem más, mint két CaR termelő sejt (esetleg két AII sejt) Cx36 GJ-jának helye.

A **macska** (*Felis silvestris catus*) retinája sok tekintetben hasonlított a kutyáéhoz. A CaR termelő sejtek között megfigyelhetőek voltak a külső retina horizontális sejtjei, valamint a belső retina amakrin- és dúcsejtjei. Ez utóbbiak között, a kutyához hasonlóan, megfigyeltünk AII sejteket (Kolb és mtsai., 1995) és nagy sejttesttel rendelkező, diagonális dendritú egyéb amakrin sejteket. Ugyancsak láthatóak voltak CaR pozitív sejtek a GCL-ben, de a kutyával ellentétben, a macska retinában sok CaR jelölt dúcsejt axon is látható volt. Ezen axonok jelenléte egyértelműen arra utalt, hogy a GCL sejtek között CaR termelő dúcsejtek is vannak. A CaR háttérjel mellett a macska retina hasonlított a kutyára a Cx36 jelölés tekintetében is. A CaR jelölt horizontális sejtek segítségével egyértelmű, hogy a macska retina is tartalmaz, ugyan kis számban, Cx36 jelölt plakkokat az OPL területén. Ezek a külső retinális plakkok szétszórtak voltak és többnyire a CaR postokkal nem kolokalizáltak voltak megfigyelhetőek. A macska belső retinában szintén minden alréttegben megfigyeltük a Cx36 plakkok jelenlétét. Ugyanakkor a Cx36 plakkok ON alréttegbeli dominanciája valamivel kifejezettebb volt a kutyáénál. A macska retina esetében is megfigyeltünk számtalan CaR/Cx36 kettősjelölést, melyek közül számos, CaR-CaR rostkereszteződésekkel esett egybe. Ez utóbbi kettősjelölések, a kutya retinához hasonlóan az AII sejtek esetében volt gyakori, de CaR/Cx36 kolokalizációt megfigyeltünk nem AII sejthez tartozó rost esetében is.

A **vadászgörény** (*Mustela putorius furo*) retinájában a CaR jelölés alapvetően az előző két faj retinájáéhoz volt hasonló, a külső retinában a horizontális sejtek, a belső retinában pedig amakrin- és dúcsejtek egy csoportja volt CaR jelölt. Ebben a fajban is megfigyelhetőek voltak az AII-szerű és a nagy sejttestű, diagonális rostokkal rendelkező amakrinsejtek. Míg ez utóbbiak sejttestjeit az INL-ben figyeltük meg, ritkábban displaced amakrin és/vagy dúcsejtek sejttestjei is láthatóak voltak a GCL-ben. Mivel a CaR jelölt optikus rostok jelenléte nem volt nyilvánvaló ezért a GCL sejtek további azonosítására nem volt lehetőség. Ugyanakkor a CaR jelölt horizontális és amakrin sejtek sejttestjei és rostjai egyértelműen kijelölték a retinális rostos és sejttes rétegek határait. Ezek alapján nyilvánvaló volt a vadászgörény retinájának nagymértékű hasonlósága a macska és a kutya retinával. A külső retinában Cx36 jelölt plakkokat találtunk elszórtan az OPL területén, melyek nem kolokalizáltak a CaR jelölt horizontális sejt rostokkal. A belső retinában megfigyeltünk, hasonlóan a kutya és macska retinához, Cx36 jelölt plakkokat az IPL teljes vastagságában. Szintén hasonlóan

az előző két fajhoz, a Cx36 plakkok ON alrétegbeli dominanciával rendelkeztek mind a plakkok számát, mind a nagyságát illetően. Ugyan kisebb számban, de az OFF alrétegben is megfigyelhetőek voltak a nagyobb méretű plakkok is. Hasonlóan nagyméretű plakkok a macska és kutya retinában csak az ON alrétegben fordultak elő. CaR/Cx36 kolokalizáció szintén megfigyelhető volt a vadászgörény retinában, különösen az ON alrétegben.

A **birka** (*Ovis aries*) retina mind a CaR mind pedig a Cx36 mintázat alapján hasonlatos volt az előző fajok retináihoz. CaR termelő horizontális sejteket figyeltünk meg a külső retinában, míg a belső retinában CaR termelő amakrinsejtek, displaced amakrin és dúcsejtek voltak láthatóak. Az utóbbi neuronok CaR pozitív rostjai gazdag CaR jelölt hálózatot alkottak az IPL-ben. Ennél fogva a birka retinában a CaR jelölt elemek egyértelműen kijelölték az OPL és az IPL határait. Az OPL területén gyenge és elszórt Cx36 plakk jelölést figyeltünk meg. A belső retinában a CaR pozitív sejtestek által határolt keskeny IPL réteg minden alrétegében megfigyelhetőek voltak Cx36 plakkok, némi ON alréteg dominanciával. Gyakran megfigyelhető kolokalizáció a CaR és a Cx36 jelölés között.

A **sertés** (*Sus scrofa domestica*) retinájában CaR jelölt sejtek találhatóak mind az INL-ben, mind az ONL-ben. Ezzel hasonló képet mutat a 8. ábrán bemutatott többi állathoz (kutya, macska, vadászgörény, birka). A külső retinában CaR jelölt horizontális sejtek, a belső retinában CaR pozitív amakrin és displaced amakrin sejtek voltak láthatóak. Az amakrin sejtek között voltak nagyméretű sejtesttel rendelkező erősen CaR jelölt sejtek, melyek nyúlványai bisztratifikált jelleggel mind az ON, mind az OFF alrétegekben végződtek. Kisebb sejtesttel rendelkező bisztratifikált nyúlványú CaR jelölt sejtek is láthatóak voltak, melyek morfológiája az AII-es sejtekéhez hasonlatos. A Cx36+ plakkok közepes és nagyobb méretűek, ritkábban fordulnak elő, mint a többi vizsgált állatnál. Előfordulásuk főleg az IPL ON alrétegében erőteljes és gyakran az amakrin sejtek nyúlványain látható. Az OPL-ben kis számban szintén megfigyelhetőek Cx36 plakkok.

Az **emberi** (*Homo sapiens sapiens*) retina mind a CaR háttérjelölés, mind a Cx36 expressziós mintázat tekintetében eltért az előbb tárgyalt állatok retináitól. A legszembetűnőbb különbség az volt, hogy CaR termelő neuronális elemet a külső retinában nem figyeltünk meg. A belső retina CaR pozitív neuronjai ugyanakkor hasonlóak voltak a korábbi fajokban. Egyértelműen megfigyelhetőek voltak a CaR

pozitív AII sejtek és a nagy sejttesttel rendelkező diagonális dendritú amakrin sejtek is. A GCL területén kevés, nagy sejttesttel rendelkező halványan CaR jelölt sejtet figyeltünk meg. Ezeknek legalább egy része dúcsejt volt, ugyanis a NFL-ben találtunk CaR jelölt optikus rostokat is. A külső retinában, CaR jelölés hiányában az OPL területét nehezebb volt meghatározni, mint az előző fajokban. Ugyanakkor az OPL-nek megfelelő területen gazdag Cx36 jelölést figyeltünk meg. A Cx36 jel alapvetően a plakkok két populációjából állt. Az egyik populáció tagjai, az előző fajok retináihoz hasonlóan, elszórt Cx36 plakkokból állt. Ugyanakkor, a plakkok zöme az OPL-ben egy második populációt alkotott, melyek nem elszórtan, hanem keskeny horizontálisan húzódo telepekbe rendezetten helyezkedtek el. Az OPL-el ellentétben az IPL mindkét határát a CaR jelölt neuronális elemek sejttestjei és rostjai egyértelműen kijelölték. Ez alapján egyértelmű volt, hogy a Cx36 immunjelölt plakkok az IPL egész területén megfigyelhetők. Az IPL-en belül az ON alrétegbeli Cx36 dominancia az emberi retina esetén is érzékelhető volt. E mellett az OFF alréteg legdisztálisabb területén egy második Cx36 plakkokban bővelkedő sáv is látható. Ez utóbbi Cx36 plakkok jó része és az ON alréteg Cx36 plakkjainak nagy része a CaR jelölt amakrin sejt rostokkal kolokalizált. A Cx36 jelöléssel kolokalizáló rostok közül nem egyről egyértelmű volt, hogy AII sejthez, esetleg AII sejtek dendritikus kereszteződéséhez tartozott.

A **tengerimalac** (*Cavia porcellus*) retina CaR jelölt neuronjai a humán retinához hasonlóan csak a belső retinában voltak találhatóak. Itt CaR jelölt sejttesteket mind az INL-ben mind pedig a GCL-ben megfigyeltünk, amelyek amakrin sejtek és feltehetően dúcsejtek voltak. Ez utóbbi feltevés mellett szóltak a NFL területén látható CaR jelölt dúcsejt axonok kötegei is. A humán retinához hasonlóan a tengerimalac külső retina gazdag Cx36 telepeket tartalmazott az OPL területén. Ezek a Cx36 plakk-telepek a plakkokat keskeny, nagyrészt horizontális irányultságú szalagok formájába tömörülve tartalmazta. A telepek mellett elszórtan is megfigyelhetők voltak Cx36 plakkok. A belső retinában a Cx36 plakkok a többi állat retinájához hasonlóan bármely alrétegben előfordulhattak. Ugyanakkor szembeűnő volt a Cx36 plakkok ON alrétegbeli dominanciája, mely a stratum 5 területén volt a legkifejezettebb, ahol kolokalizációt is megfigyeltünk a CaR és a Cx36 jel között.

A **nyúl** (*Oryctolagus cuniculus*) retina a CaR immunjelölés tekintetében hasonló képet mutatott az emberi és a tengerimalac retinához, CaR jelölt elem a külső retinában nem volt, de a belső retinában CaR jelölt amakrin, displaced amakrin- és dúcsejtek

voltak megfigyelhetőek. Az INL CaR jelölt amakrin sejtjei között megfigyelhetőek voltak az AII sejtje is, melyeket korábban ebben a fajban többen is leírtak (Völgyi és mtsai. 1997, Massey és Mills 1999a, 1999b). Az amakrin- és dúcsejt dendritjei az IPL egész területét gazdagon behálózták CaR jelölt rostokkal és a dúcsejt jelölt axonjai is jól láthatóak voltak a NFL (Neurofibrilláris réteg)-ben. Cx36 plakkokat ritkán, elszórta figyeltünk meg a nyúl OPL területén. A humán és a tengerimalac retinára jellemző szalagszerű Cx36 tömörüléseknek nyomát nem láttuk. A belső retinában a fenti fajokhoz hasonlóan Cx36 plakkok az IPL egész területén láthatóak, ON alréteg dominanciával. Különösen az ON alrétegben figyeltünk meg a CaR rostok és a Cx36 plakkok kolokalizációját. Egyes esetekben Cx36 plakkok egyértelműen AII sejt dendritjével, vagy dendritek kereszteződésénél kolokalizáltak (Mills és mtsai., 2001).

A **mókusmajom** (*Saimiri sciureus*) retina CaR eloszlása is nagyon hasonló az emberi retinához. CaR pozitív neuronokat a külső retinában nem találtunk, de CaR pozitív AII sejtet és nagy sejttesttel rendelkező diagonális dendritű amakrin sejtet találtunk a belső retinában. A GCL területén kevés, nagy, halványan CaR jelölt sejtet figyeltünk meg. Ezeknek legalább egy része dúcsejt volt, ugyanis az NFL-ben találtunk CaR jelölt optikus rostokat is. Annak ellenére, hogy a vizsgált fajok közül a mókusmajom áll a legközelebbi rokonságban az emberrel, retinájának Cx36 mintázata több szempontból is eltér attól. Egyrészt a Cx36 expresszió sokkal homogénebb eloszlást mutat az IPL területén ennél a fajnál, másrészt az OPL-ben nem figyeltünk meg a Cx36 pozitív plakk konglomerátumokat.

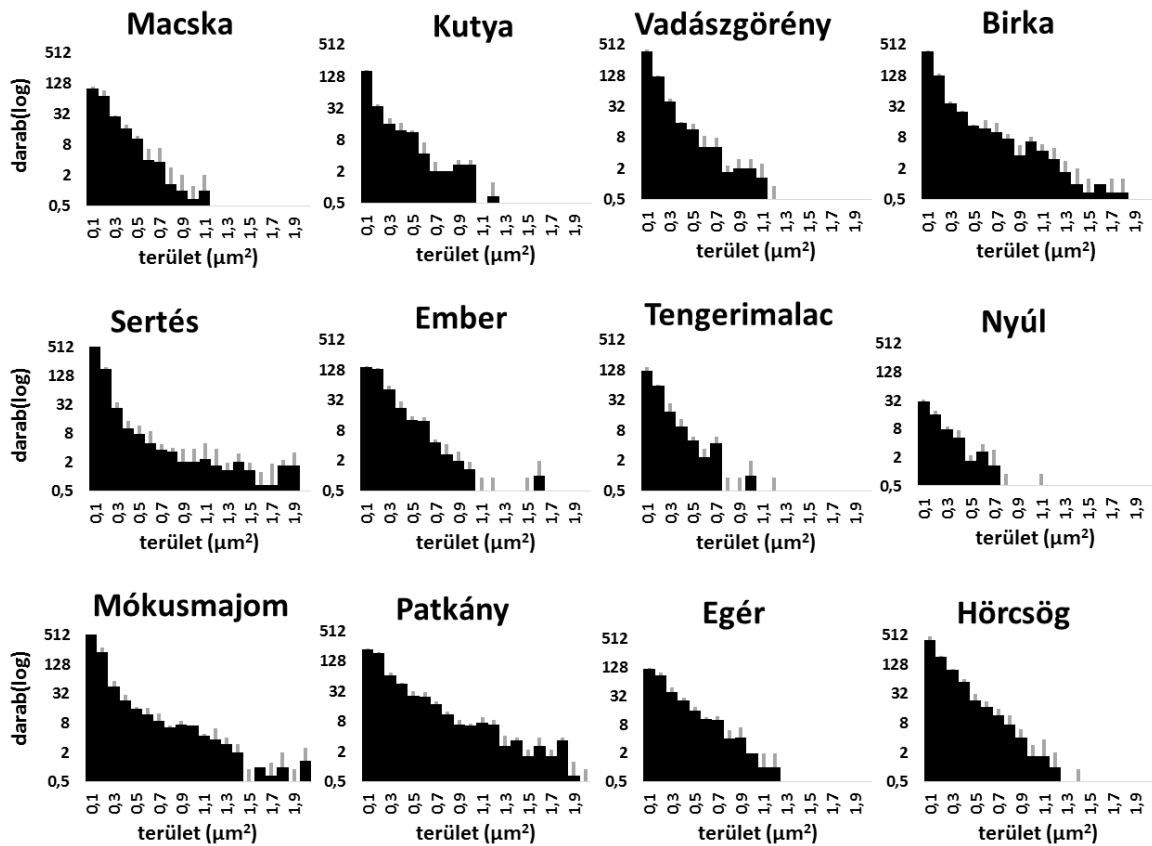
Az **egér** (*Mus musculus*) retina CaR immunjelölés tekintetében eltért az eddig tárgyalt emlős fajoktól. Ugyan az OPL területén megfigyelhető CaR negativitás hasonló az előbb tárgyalt négy faj (ember, tengerimalac, nyúl és mókusmajom) retinájához, ugyanakkor a belső retinában található CaR amakrin sejtje nem az AII morfológiát mutatják. Az egér retina CaR termelő amakrin sejtjeit korábbi publikációk ON és OFF startburst sejtneként és W-2 típusú széles dendritmezejű amakrin sejtneként (type W-2) azonosították (Knop és mtsai., 2014). Az ON startburst és a W-2 típusú amakrin sejt sejttestjei az INL-ben, míg az OFF startburst amakrin sejtjei a GCL-ben találhatóak meg. A három sejt típus dendritjei az IPL területén keskeny rétegeket alkotnak a stratum 2, a stratum 3 és a stratum 4 területén. A jelölt amakrin sejtjeiken kívül CaR pozitív dúcsejtje és ezek axonjai is megfigyelhetőek a GCL-ben és az NFL-ben. Cx36 plakkok az OPL-ben kis számban, elszórta voltak megfigyelhetőek, a humán és

tengerimalac retina Cx36 szalagjai egyáltalán nem voltak jelen. Cx36 plakkok az IPL egész területén megfigyelhetőek voltak, de az ON alrétegbeli Cx36 dominancia az egér retinára is jellemző volt. Az ON alréteg Cx36 plakkjainak nagy része a proximális CaR pozitív rostréteg és a GCL-ben található sejttetek között fordultak elő. A CaR pozitív rostok és Cx36 plakkok közötti kolokalizáció esetenként észlelhető, de ezek alacsony száma alapján valószínűleg csak a két immunjel véletlen egybeeséséről van szó.

A **patkány** (*Rattus norvegicus*) retina nagyon hasonló CaR immunjelölést mutatott az egér retinához. A külső retinában CaR pozitív idegi elemet nem találtunk, a belső retinában pedig a két starburst amakrin sejt populációt. Az egér type W-2 amakrin sejthez hasonló amakrin sejt és dúc sejtek egy populációja volt CaR pozitív. Ugyancsak jól látható volt a belső retina előbbi három amakrin sejtcsoport rostjai által kijelölt CaR pozitív IPL réteg a stratum 2, 3 és 4 területén. Ez utóbbiak, illetve a CaR pozitív sejttetek az INL-ben és a GCL-ben pontosan meghatározták az IPL határait és alrétegeit. Az egér retinához hasonlóan a patkány OPL-ben gyenge Cx36 immunjelölést figyeltünk meg elszórt kisméretű plakkokkal. Az IPL-nek azonban minden rétege sok Cx36 plakkot tartalmazott, melyek közül az ON alréteg területe volt a domináns. Szintén hasonlatos az egér retinához az a megfigyelés, hogy a proximális CaR pozitív réteg és a CaR pozitív GCL sejtek közötti IPL területe az ahol a legtöbb és legnagyobb méretű Cx36 plakkok figyelhetőek meg. Kolokalizációt a CaR pozitív idegelemek és a Cx36 plakkok között ritkán figyeltünk meg és valószínűsítjük, hogy az egybeesés véletlen.

A **hörcsög** (*Mesocricetus auratus*) retina nagyon hasonló CaR immunjelölést mutatott az egér és patkány retinához. A külső retinában CaR pozitív idegi elemek nem voltak. A belső retinában megtaláltuk a két starburst amakrin sejt populációt és vélhetően az egér type W-2 amakrin sejtek hörcsög megfelelőit. Ezekon kívül dúcsejtek egy populációja volt CaR pozitív, melyeket a CaR jelölt optikus rostok alapján azonosítottunk. Ugyancsak jól megfigyeltük a belső retina előbbi három CaR pozitív IPL rétegét a stratum 2, 3 és 4 területén, melyeket a fenti három sejtpopuláció dendritjei alkottak. Az egér és patkány retinához hasonlóan a hörcsög OPL-ben csak elszórt és kisméretű Cx36 plakkok voltak. Az IPL-nek minden rétege tartalmazott Cx36 plakkot, ezek közül is a proximális CaR pozitív réteg és a GCL sejtek közötti ON alrétegi terület volt domináns. Kolokalizációt a CaR pozitív idegelemek és a Cx36 plakkok között ritkán figyeltünk meg és feltételezük, hogy véletlen egybeesés.

6.3.4 A Cx36 tartalmú plakkok méretbeli és eloszlásbeli változásai az IPL-ben

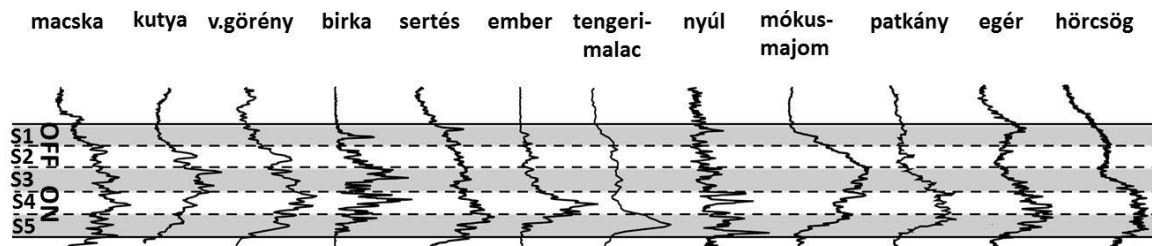


12. ábra. Cx36 plakkok méret-eloszlása állatmodelljeink retináinak belső rostos rétegében

A hisztogramok Y-tengelye az adott mérettartományba eső plakkok átlagos gyakoriságát mutatja logaritmikus (\log_{10}) skálán. Az ábra X-tengelye a mérettartományokat mutatja μm^2 -ben. A mintavétel minimuma $0,04 \mu\text{m}^2$ volt, amelyet 200 nm-es feloldási határ alapján határoztunk meg, így a $0,1 \mu\text{m}^2$ -es oszlop a $0,04$ - $0,1 \mu\text{m}^2$ méretű plakkokat mutatja, kizárva ezzel a termikus zajból eredő pixeleket. $n=3$ mérés alapján. A hisztogramm oszlopain megfigyelhető függőleges vonalak az metszetenkénti variációt mutatja.

Az eredmények alapján (12. ábra), az IPL immunreaktív plakkjainak maximális mérete $2 \mu\text{m}^2$. A mérettartomány alsó felét nem tudtuk meghatározni, hiszen a konfokális mikroszkópia feloldási határa ezt nem teszi lehetővé. Ez alapján nyilvánvaló, hogy konfokális mikroszkópos vizsgálatainkban csak a jéghegy csúcsát látjuk, hiszen csak a nagyobb plakkok észlelhetőek jól. Szembetűnő azonban, hogy a nagyobb plakkoknál is léteznek kisebb méret-eloszlásbeli különbségek az egyes állatok retinájában, az IPL-ben. Ezek közül érdekes, hogy a vadászgörény, kutya, birka,

patkány, majom, sertés (és kisebb mértékben más állatoknál is megfigyelhető) hisztogramjai $0,8-1 \mu\text{m}^2$ tartományban egy-egy helyi maximumot mutatnak, tehát a plakkok száma ebben a tartományban relative magas. A birka, sertés, mókusmajom és patkány esetében a hisztogramok elnyújtottabb alakúak, több nagyobb méretű plakkot találunk a retina belső rostos rétegében. Alapvetően azonban a hisztogramok alapján nyilvánvaló az, hogy a plakkok méreteloszlása ezekben a fajokban nagyon hasonló.



13. ábra A Cx36 plakkok térbeli eloszlása az emlős retina belső rostos rétegében
A hisztogramm az ábra tetején felsorolt emlősállatok retinájában található Cx36 tartalmú plakkok relatív eloszlását mutatja az IPL alrétegeire lebontva (S1-S2: OFF; S3-S5: ON), amelyet a CaR+ rostok alapján határoztunk meg. n=3 mérés alapján.

A 13. ábra a Cx36 plakkok térbeli eloszlását mutatja a 12 vizsgált emlősállatban. A hisztogramok csúcsai alapján jól látható, hogy mely állatok retinájában fedezhető fel Cx36 IPL ON dominancia. A vadászgörény, birka, sertés, ember, tengerimalac, nyúl, patkány, egér, hörcsög retinái (12 vizsgált állatból 9) mutatnak egyértelmű ON dominanciát, míg a ragadozó fajok (macska, kutya, vadászgörény) retináinak belső rostos rétegében a plakkok eloszlása homogénebb eloszlást mutat. A birka esetében az S1, S3, S4 alrétegekben kifejezett csúcsokat láthatunk a hisztogrammon. Figyelemreméltó az, hogy a humán és a tengerimalac retinák IPL-ben látható Cx36 eloszlása rendkívül hasonló képet mutat. Ez utóbbi megfigyelés azért is érdekes, mert már a külső retina Cx36 plakkjainak eloszlási mintázata esetén is éppen a tengerimalac retinája hasonlított leginkább a humán retinára.

Összevetve a méretbeli és térbeli eloszlásokat, kijelenthetjük, hogy az emlősök retinájában a Cx36 plakkok kifejeződése mindkét vizsgálati szempont esetén mutat eltéréseket, amelyek karakterisztikusak az adott állatra. A rokonsági viszonyok, kisebb befolyással vannak az állatok belső rostos rétegében található Cx36 jelölt plakkok eloszlására. Az emberi retina Cx36 eloszlási mintázata nagyon hasonlatos a tengerimalac retinához, továbbá kisebb hasonlatosságokat mutat a sertés, patkány

valamint az egér retinával. Mivel ezek az emlős fajok genetikai távolsága viszonylag nagy, ezért feltételezzük, hogy az életmód és ezzel összefüggésben a környezeti tényezők meghatározóbb szerepet játszanak a Cx36 eloszlásbeli viszonyok alakításában. Ennek az állításnak az alátámasztására nyilvánvalóan további méréseket kell végeznünk.

6.4. VÁLTOZÁSOK AZ EGYEDFEJŐDÉS SORÁN

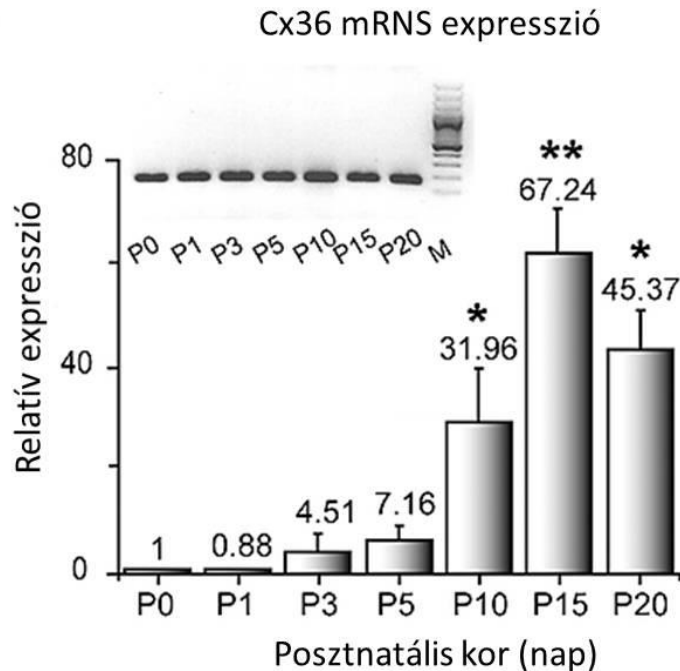
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a connexin fehérjék expressziója milyen irányú és mértékű változást mutat a patkány retina egyedfejlődése során. Azt is vizsgálni kívántuk, hogy az általunk fontosnak talált Cx36, Cx45 és Cx57 esetében a változási mintázat hasonló, vagy connexin specifikusan eltérést mutat. A vizsgálatokhoz qPCR, WB és IC kísérleteket végeztünk korai posztnatális (P0-P20) korban a fejlődő patkány retinában. Ezeknek a technikáknak a kombinációival teljes körű leírást adunk a Cx36 retinális változásairól a posztnatális fejlődés során. Ezen kívül két további fontos neuronális Cx a 45 és 57 expressziójának változását hasonlítjuk a Cx36-hoz qPCR-rel.

6.4.1. A Cx36 mRNS szintjének változása a fejlődő patkány retinában

Az első kísérletsorozatunkban a fejlődő patkány retina Cx36 mRNS transzkript mennyiségi változásait vizsgáltuk. Első megközelítésben arra kívántunk feleletet kapni, hogy Cx36 transzkript megfigyelhető-e minden posztnatális mintavételi időpontban. Ennek megválaszolására totál mRNS kivonaton végeztünk OneStep RT-PCR (Qiagen Inc.) méréseket minden posztnatális mintánkon (P0-P20). Az eredmények alapján egyértelmű volt, hogy az összes posztnatális mintánk tartalmaz Cx36 mRNS transzkriptet (14. ábra, fent). Továbbá a gélelektroforetikus reaktív sávok intenzitás különbségei arra engedtek következtetni, hogy az egyes mintavételi időpontokban a Cx36 mRNS mennyisége nem egyforma, hanem a születés után fokozatosan növekvő tendenciát mutat.

Annak érdekében, hogy pontosabb mennyiségi változásokat kimutathassunk a fejlődő patkány retina Cx36 mRNS termelésére vonatkozóan, a következő kísérletsorozatban qPCR méréseket hajtottunk végre minden posztnatális mintán. A qPCR mérések egyöntetűen megerősítették a OneStep RT-PCR eredményeket. Azt találtuk, hogy a Cx36 mRNS mennyisége folyamatosan növekedik P0 és P15 időszakban, ahol a Cx36 mennyisége mintegy 67-szeres emelkedést mutat P0-hoz képest (14. ábra). Érdekes módon a Cx36 mRNS mennyiség a P20* (kifejlett) állatnál

valamelyest visszaesett a P15 állathoz képest és ez a visszaesés szignifikáns mértékű volt (-31%; one-way ANOVA, $p=0,025$, Bonferroni, és $p=0,022$, Gabriel post hoc analízissel is; 14. ábra).



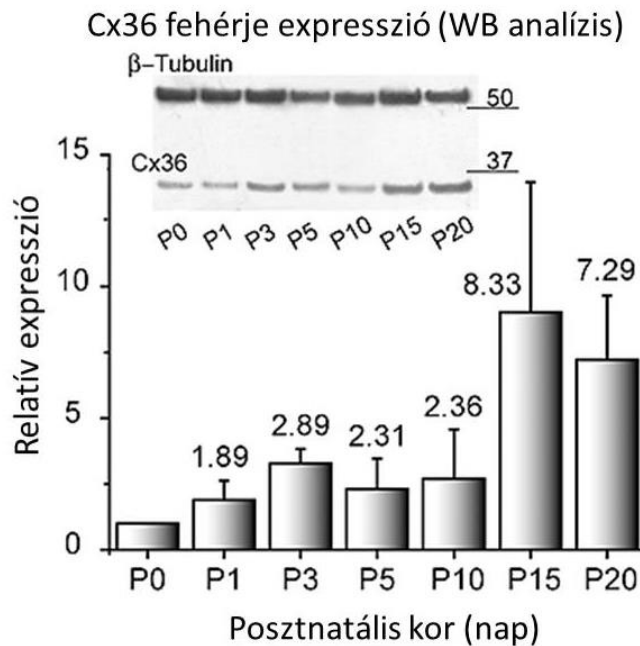
14. ábra. Cx36 mRNS expresszió változásai fejlődő (P₀–P₂₀) patkány retinában

Agaróz gélektroforézis azonos mennyiségű templáttal végzett OneStep RT-PCR-t követően egyértelmű Cx36 expressziót mutat az összes mintában. Az amplicon 155 bp méretű, a Marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) jobbra látható. A hisztogram a Cx36 mRNS qPCR-vel mért kifejeződését mutatja (n=4: P₀–P₁₅, n=3: P₂₀), ahol 67,24x -es legnagyobb eltérése van a Cx36 mRNS szintjének. (*szignifikáns P₁, P₃, P₅ and P₁₅-vel hasonlítva, **szignifikáns bármely másikkal hasonlítva; a hibasávok a SEM értékek, Kovács-Öller és mtsai., 2014 után).

6.4.2. Cx36 fehérje expressziójának változása a fejlődő patkány retinában

A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy a Cx36 mRNS expressziós változást hogyan követte a Cx36 fehérje termelődése a patkány retina egyedfejlődése során. Ezt WB kísérletekkel vizsgáltuk mintáinkon (β -tubulint használtunk kontrollként, ennek expressziója állandó szintet mutat a posztnatális retinában). Hasonlóan a Cx36 mRNS vizsgálatokhoz, azt találtuk, hogy Cx36 fehérje minden posztnatális mintánkban előfordul. E mellett, a Cx36 mRNS szintjére jellemző monoton növekedést a Cx36 fehérje szintben is megfigyeltük (15. ábra). Ugyan a Cx36 fehérje expressziós szint növekedése elmarad a mRNS-étől, de így is mintegy 8,33-szoros Cx36 fehérje mennyiséget mértünk a P15 retinában az újszülött vagy a P1 retinához képest.

A Cx36 fehérje szintbeli növekedése eleinte lassú, majd a P15 korú állatoknál, a szemek kinyílását követően erősen megemelkedik, P20 napra pedig némileg visszaesik.

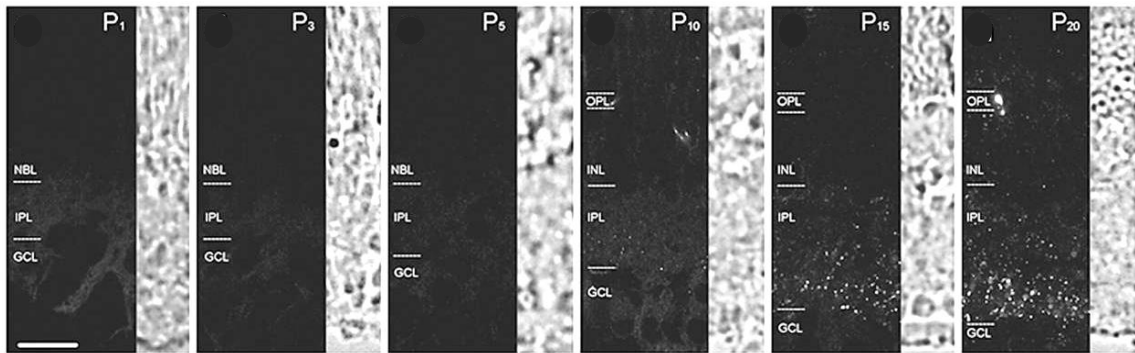


15. ábra. Cx36 fehérje expresszió változása fejlődő (P0–P20) patkány retinában

WB P0–P20 retinákból származó 15-15 µg totál fehérjekivonaton (lásd Anyag és módszer), alatta a 4 db fejlődési sorból előállított fehérje- expressziós diagramja látható, ahol a P0 minden esetben 5 db állat mintájából származó fehérje-keveréket vittük fel a mintasorok közötti normalizálásra. A β-tubulint alkalmaztuk referenciagénként. (Kovács-Öller és mtsai., 2014 után).

6.4.3. Cx36 gap junction plakkok eloszlásának változása a fejlődő patkány retinában

Egy következő kísérletsorozatban Cx36 immuncitokémiai jelölést hajtottunk végre minden posztnatális mintánkon annak érdekében, hogy a GJ plakkokat alkotó Cx36 fehérje retinális eloszlását megfigyelhessük. A 16. ábrason jól megfigyelhető, hogy a Cx36 immunjelölt plakkok megjelenése összhangban van a Cx36 mRNS (14. ábra) és fehérje (15. ábra) expressziós megfigyelésekkel, azaz a posztnatális kor előrehaladtával a fokozatosan növekvő plakkszám és Cx36 jelintenzitás a jellemző. A konfokális felbontási technika segítségével is csak a P10 minta esetében sikerült egyértelműen a kiformalódott plakkok jelenlétét megfigyelni.



16. ábra. Cx36 plakkok eloszlásának változásai fejlődő (P0–P20) patkány retinában

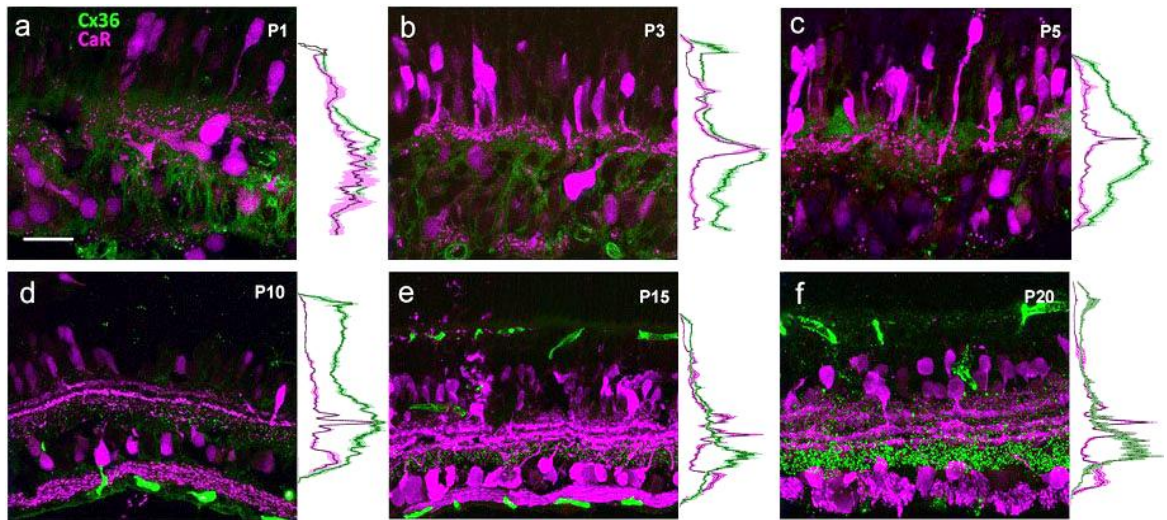
A Cx36 immunjelölés P₁–P₂₀ patkány retinális metszeteken (12µm) folyamatos Cx36 jelerősödést mutat mindkét plexiform rétegben (OPL, IPL). A plakkok először a P₁₀ retinán figyelhetők meg egyértelműen, majd a P₁₅ és P₂₀ retinákon mind a plakkszám, mind a Cx36 immunjel erősödést mutat. Minden fluoreszcens kép mellett a jobb oldalon, ugyanabból a retinából származó DIC (differential interference contrast) kép segíti a tájékozódást. GCL ganglion sejtek rétege, IPL belső rostos réteg, INL belső sejtes réteg, OPL külső rostos réteg, NBL neuroblast réteg. Aránymérték: 25 µm (Kovács-Öller és mtsai., 2014 után).

A P₁, P₃ és P₅ mintákban a Cx36 immuncitokémia csak egy gyenge háttérfestést mutatott. A P₁₀-es retinális metszeten egyértelműen megfigyelhetők voltak elszórt, plakkszerű immunjelölt képletek az IPL-ben. Az OPL területén ebben az egyedfejlődési stádiumban nem láttunk Cx36 plakkokat, viszont az aspecifikusan jelölt erek ebben az életkorban már tipikusan az OPL részét képezték. A P₁₅-ös mintában figyeltük meg először Cx36 immunjelölt plakkok jelenlétét az OPL-ben. Ugyanebben a fejlődési stádiumban határozottan megnövekedett plakkszám és jelölési-intenzitás növekedés volt jellemző az IPL-ben.

A plakkok száma egyenetlenül oszlott el, ugyanis az ON alrétegben az intenzitásnövekedés sokkal intenzívebb volt. A P₂₀-as (fiatal felnőtt) minta Cx36 eloszlása nagyban hasonlított a P₁₅-re, de mind az OPL, mind az IPL területén további jelintenzitás és plakkszám növekedés volt megfigyelhető. A kifejlett állat retinájában a Cx36 plakkok asszimmetrikus IPL-beli eloszlása még inkább kifejezett volt.

A Cx36 plakk eloszlás posztnatális változásainak pontos leírásához kettős immunjelölésekre volt szükség. Korábbi irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a calretinin (CaR), egy 29 kDa-os kalciumkötő pufferfehérje a rágcsáló retinában (egér, patkány) három amakrin sejt populáció sejtjei által termelt (két starburst populáció és type WA-S2/3) és ezek rostjai az IPL 2, 3 és 4 alrétegeit pontosan kijelölik (Gábrriel és Witkovsky, 1998; Knop és mtsai. 2014). Korai posztnatális mintáinkon a disztálisan

elhelyezkedő neuroblaszt (NB) rétegen kívül, proximális helyzetű, CaR immunoreaktív belső retinális sejtek is megjelentek mind a GCL, mind az INL területén (17. ábra).



17. ábra. Posztnatális változások a Cx36 eloszlási mintázatban

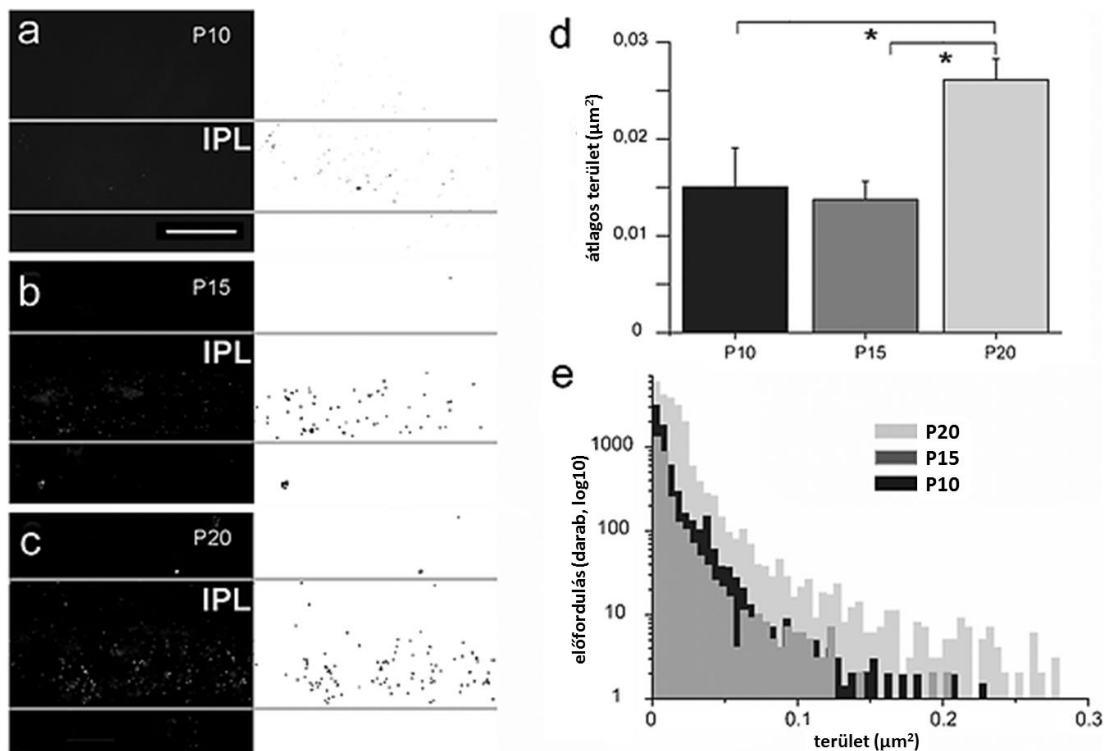
(a–f) A fotókon Cx36 (zöld) és calretinin (CaR; magenta) kettős jelölt P₁–P₂₀ patkány retina keresztmetszetek láthatóak (minden panel 14 db, 0.5- μ m vastag rétegből z-stack-simítással készült kompozit). Minden panel mellett a jobb oldalon denzitometriai görbék láthatóak, melyek a CaR (magenta) és Cx36 (zöld) immunjel normalizált erősségét reprezentálja. A fotósorozat alapján egyértelmű, hogy a Cx36 plakkok a P10 retinában válnak először láthatóvá az egész IPL területén. A későbbi stádiumokban a Cx36 plakkformáció még kifejezettebb az IPL minden rétegében. Ugyanakkor megjelenik egy ON alrétegbeli dominancia, amely mind a plakkok nagyobb számában, mind a látszólagos méretében megnyilvánul. Aránymérték: 25 μ m.

A CaR immunoreaktív belső retinális sejtek rostjai a P1, P3 és P5 korú állatok retinájában még a formálódó IPL közepén voltak megfigyelhetőek és csak a P10, P15 és P20 mintákon vált nyilvánvalóvá az IPL-ben történő hármasszintűségük. A fenti egyes jelöléses kísérlethez hasonlóan a Cx36 plakkképződést először a P10 retina esetén figyeltük meg az IPL-ben. Ebben a stádiumban az IPL állománya még relatíve keskeny és a Cx36 plakkok az IPL egész területén nagyjából hasonló arányban találhatóak meg. Ugyanakkor a P15 retina esetében a Cx36 plakkok egyértelműen a 3 CaR pozitív rétegtől proximális helyzetben (a GCL-hez közelebb), a stratum 5 területén voltak legnagyobb számban jelen (17. ábra). Ez a Cx36 eloszlási aszimmetria a kifejlett patkány retinában még kifejezettebb volt.

6.4.4. Változások a Cx36 plakkok méretében és eloszlásában

Nagyfelbontású strukturált illuminációs mikroszkópiás (SIM) technikával vizsgáltuk a Cx36 plakkok méretét és eloszlását P10-15-20 korú állatokban, mely pontosabb képet ad a plakkok méretbeli változásairól. Azonban, fiatalabb retinák esetében a Cx36 plakkok hiánya és a magas háttérfestés miatt SIM felvételek készítésére nem volt lehetőség. A SIM technika a szuperrezolúciós fénymikroszkópos technikák egyike, mely lehetővé teszi az Abbe-féle felbontási határon túli vizsgálatokat. A SIM vizsgálatok segítségével behatároltuk a plakkok mérettartományát.

Eredményeink szerint (18. ábra) átlagos méretük a P10 és P15 minták esetében $0,015 \mu\text{m}^2$ (P10; SEM=0,002; n=2935 plakk) és $0,013 \mu\text{m}^2$ (P15; SEM=0,004; n=6868 plakk). A két minta értékei közötti különbség nem volt szignifikáns. Ugyanakkor a P20 retina esetében a Cx36 plakkok átlagos mérete $0,026 \mu\text{m}^2$ (SEM=0.002; n=15094 plakk) volt és ez a méretnövekedés statisztikailag szignifikáns változás volt (p=0,012). A Cx36 plakkok méretének növekedése mellett ugyancsak jelentősen nőtt a plakkok száma a kifejtett retinában (18. ábra).

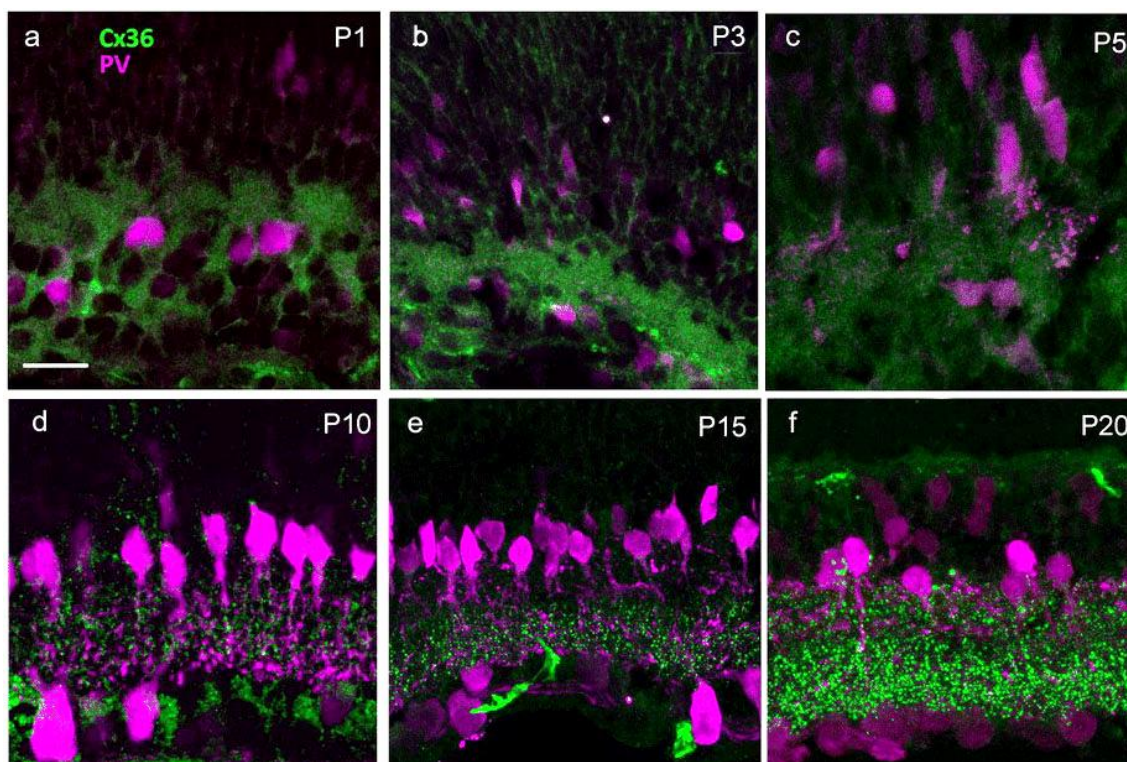


18. ábra. Posztnatális változások a Cx36 plakkok eloszlásában és méretében fejlődő patkány retinában

A patkány retináról készült SIM képek (a-c) alapján az ImageJ *analyse particles* alkalmazása segítségével készült hisztogramok (e) a Cx36 jelölt plakkok méretének eloszlását mutatják P10, 15, 20 posztnatális korban. A plakkok méretének átlaga (d) P10-P20-ig növekedést mutat. A csillagok szignifikáns növekedést mutatnak (páros t-póba: $p < 0,05$). Aránymérték: 25 μm.

6.4.5. AII sejt elektromos szinapszisok egyedfejlődés során megfigyelt változásai

A fenti eredmények alapján a patkány IPL Cx36 plakkjai egy karakterisztikus asszimmetrikus eloszlási mintázatot mutattak, mely szerint a stratum 5 területén található a legtöbb és legnagyobb plakk. A stratum 5 az emlős IPL-nek az a része, amelyben a pálcika pálya elemei (pálcika bipoláris, AII sejt és ON csap-bipoláris terminális) hoznak létre egymással kémiai és elektromos szinapszisokat. Mivel több emlős fajban bizonyított az, hogy az AII sejtek réskapcsolatai Cx36 tartalmúak ezért a következő kísérletsorozatban az AII sejtek és a Cx36 plakkok egyedfejlődése közötti párhuzamot vizsgáltuk. Mivel az AII sejtek a patkány retinában szelektíven jelölhetők anti-parvalbumin (PV) antitestekkel, ezért PV/Cx36 kettős immuncitokémiai festést hajtottunk végre (19. ábra).

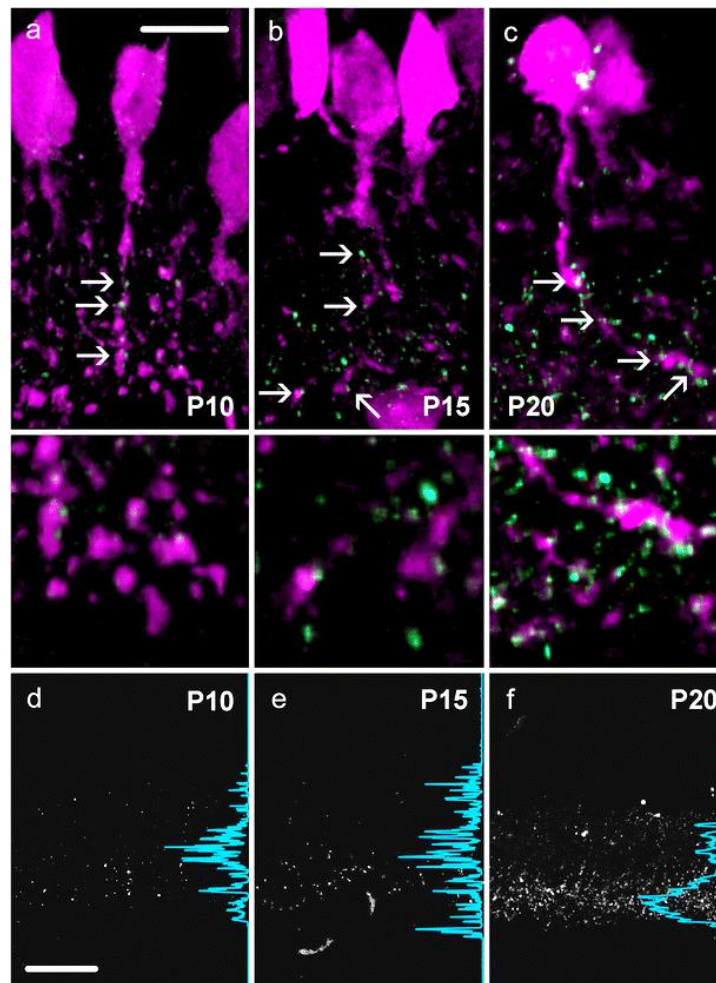


19. ábra. Összefüggés a Cx36 plakkok és az AII sejt dendritek egyedfejlődése fejlődése között

(a–f) P1–P20 patkány retinák Cx36 (zöld) és parvalbumin (PV; magenta) kettős jelölt IC képeken. Minden panel 14 db, egyenként 0,5 μ m vastag metszet egyesítve Z-tengely mentén. Aránymérték: 25 μ m.

A kísérlet során a Cx36 plakkok megjelenéséről és eloszlásáról elmondható, hogy a P10-es mintában jelentek meg először és számuk valamint méretük a P15 és P20 mintákban jelentősen megnőtt. A PV antitest, az elvárásainknak megfelelően amakrin és dúcsejtek egy csoportját specifikusan jelölte. A PV pozitív amakrin sejtek morfológiája a P1, P3 és P5 mintákon még nem ismerhető fel, azonban a P10-nél idősebb állatok retináin ezek egyértelműen AII szerű morfológiát mutatnak. A jelölt amakrin sejtek relatíve nagy sejttesttel, egy fő dendrittel és két, rövid dendritágot tartalmazó elágazásrendszerrel (egy az OFF rétegben és egy az ON rétegben) rendelkeznek (19. ábra). Ezt a morfológiát az AII sejtek a P10 fejlődési stádiumtól kezdődően mutatták, ami egybeesik a Cx36 plakkok megjelenésével. A kísérletsorozat alapján tehát egyértelmű, hogy a Cx36 plakkok és az AII sejtek egyedfejlődése korrelál egymással és feltételezhetően egymással kapcsolatosak is.

A P10, P15 és P20 korú patkányok retina felvételeit nagyobb nagyításon vizsgálva (20. ábra) láthatóvá válik, hogy a plakkok már a megjelenésüktől kezdve (P10) az AII dendriteken fordulnak elő legnagyobb számban. Ezek a PV/Cx36 kettős jelölések kezdetben (P10) az IPL közepén található dendritágakon foglalnak főleg helyet, majd a P15 fejlődési állapot után az ON alrétegbeli AII rostokon voltak jellemzőek. Ezt a megfigyelést a kettős-jelölt plakkok denzitometriai mérései is igazolták.

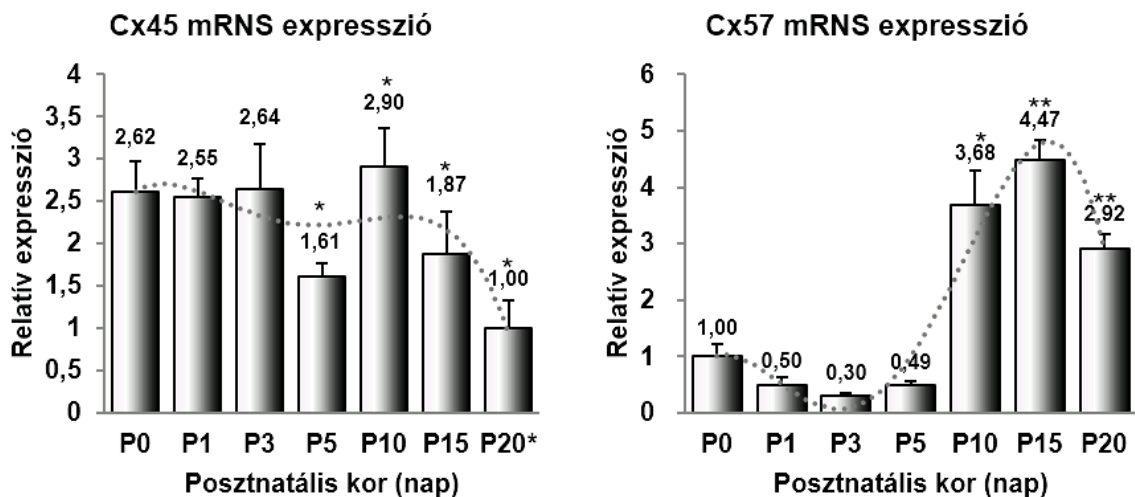


20. ábra. Posztnatális változások (P10-15-20) a patkány retina AII-es amakrin sejtjei által létrehozott Cx36 jelölt elektromos szinapszisok eloszlásában

A PV jelölt AII-es amakrin sejtek konfokális képei. Az **a**, **b**, **c** ábrákon látható PV⁺ sejtek kolokalizációt mutatnak Cx36 immunjelölt plakkokkal (fehér nyilak). Az ábrák alatt kinagyított részletek a kolokalizáló területről. Denzitometriai mérések a P10 **d**), P15 **e**) és P20 **f**) retinán az AII sejtek dendritjein kolokalizáló Cx36 plakkok eloszlását mutatja (mindhárom denzitometriai görbe normalizált, ezért egymás közötti intenzitáskülönbségek összehasonlítására nem alkalmasak). Aránymérték (a–c) 10 µm, (kiemelések) 5 µm; (d–f) 25µm.

6.4.6. Cx45 és Cx57 expresszió posztnatális változásai

A fenti vizsgálatsorozat alapján nyilvánvaló volt, hogy a Cx36 mRNS és fehérje expresszió, valamint a Cx36 plakkképződés a patkány retinában egy progresszívan növekvő változás, ami egészen a kifejlett retinális neuronális hálózatok megjelenéséig tart. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az egyéb, retinális szempontból fontos connexin molekulák, úgymint a Cx45 és a Cx57 hasonló mennyiségi változásokon megy-e keresztül a korai posztnatális fejlődés során (indikációinkat a Kihara és mtsai. 2006b publikáció ihlette). Ennek a kérdésnek a megválaszolására a P0-P20 posztnatális mintáinkon qPCR vizsgálatokat végeztünk mind a Cx45, mind a Cx57 transzkriptekre vonatkozóan.



21. ábra. A Cx45 és Cx57 mRNS relatív expressziója a patkány retinában

Az expressziós analízis azonos módon és azonos cDNS mintasorból történt, mint azt a Cx36-nál leírtuk. Az expressziót Cx45 esetében a legkisebb értékhez (P20) normalizáltuk, Cx57 esetében P0-hoz. A statisztikai analízis: ANOVA (Tukey, Bonferroni, Gabriel post-hoc tesztekkel); * $p \leq 0,05$ az előző időponthoz viszonyítva; ** $p \leq 0,05$ P5 és korábbi időpontokkal. $n_{Cx45}=3$, $n_{Cx57}=4$ időpontonként. A szürke pontozott trendvonalak polinomiálisak.

A Cx45 esetében azt találtuk, hogy a mRNS expressziója csökkenő tendenciát mutat (P0-P20) a vizsgált posztnatális időszakban. A teljes vizsgálati időszakra vetíthető trend általánosságban csökkenő és minimumát a fiatal felnőtt (P20) állatban éri el (21. ábra). Érdekes azonban, hogy a Cx45 mRNS expresszió nem monoton változás, mint a Cx36 esetében, hanem a negatív trend mellett egy lokális minimum is megfigyelhető a P5 fejlődési stádiumban, amelyet egy másodlagos mennyiségi csúcs követ a P10

stádiumnál, majd a Cx45 mRNA mennyisége a P15 és P20 mintáknál ismét csökken. Ezek a változások az általunk végrehajtott statisztikai teszteken szignifikánsak voltak (ANOVA, Tukey, Bonferroni, Gabriel post-hoc teszt).

A Cx57 mRNA expresszió változásának profilja nagyban hasonlít a Cx36 mRNA esetében megfigyelt változásokhoz (21. ábra). Ez azt jelenti, hogy a Cx57 transzkript esetében is egy születés utáni növekvő tendenciát figyeltünk meg. A Cx57 mennyisége P15 stádiumnál lokális maximumot mutatott és a kifejlett állat esetében némileg visszaesett. A fő különbség a Cx36 expressziós vizsgálattal szemben az, hogy a Cx57 növekedése egy stagnálás után emelkedik csak P5 és P10 napok között és ez az emelkedés a töredéke (egy nagyságrenddel kisebb) a Cx36 esetén megfigyelt emelkedésnek.

7. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

7.1. NEURONÁLIS CONNEXINEK HOMOLÓGIAIVIZSGÁLATA BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREKKEL

A számos Cx ortológ és paralóg megléte miatt kialakult egy olyan elképzelés, miszerint az egyes gerinces osztályok fajai saját Cx készlettel rendelkeznek és az ortológok szekvenciájában fellelhető hasonlóságok főleg evolúciós konvergencia miatt jöttek létre (de Boer és van der Heyden, 2005). Cruciani és Mikalsen 2006-os munkájában a Cx-ek fejlődésére egy alternatív hipotézist ajánl. Eszerint a paralógok kialakulása az evolúció korai szakaszában génduplikációval, majd ezt követő sorozatos mutációkkal történhetett (Bennett és mtsai., 1991; Cruciani és Mikalsen, 2006; Eastman és mtsai., 2006). Ennek az evolúciós fejlődésnek az eredménye az emlős genomban fellelhető több mint 20 Cx szekvencia (Söhl és Willecke, 2003), illetve a megannyi ortológ Cx szekvenciát tartalmazó hal genom (Cruciani és Mikalsen, 2006). A zebradánió genomja például az emlősökénél kétszer több Cx gént tartalmaz, ugyanakkor nincsen minden emlős Cx-nek hal ortológja (Eastman és mtsai., 2006), tehát a létező hal Cx-ek egyszerre több ortológgal is rendelkeznek.

A Cx-ek fenti filogenetikai dilemmájának eldöntéséhez szeretttünk volna hozzájárulni filogenetikai törzsfánk eredményeivel. Előjáróban fontos megemlíteni, hogy a Cx fehérjék immunitokémiai kimutatása alapvetően a C-terminális domain ellen termeltetett antitestekkel történik, mivel ez eléggé specifikus az adott Cx molekulára és hozzáférhető az antitest számára a fixált retinális szöveten. Ugyanakkor a dendrogram készítésekor az N- és C-terminális variábilis régiókat le kellett vágnunk, mert az alignmentet követő neighbor-joining analízis jellegéből adódóan a variábilis régiók indokolatlan genetikai távolság-növekedést eredményeztek a korábban készített családfáinkban.

Már az 5. táblázat adatai alapján jól látszik, hogy mindegyik gerinces osztály fajai rendelkeznek az alapvető α -, β - és γ -Cx szekvenciákkal, illetve ezek alcsoportjaival. Ez alól vannak kivételek is, mint például a kétéltűek esetén hiányzó β -Cx szekvenciák, melyek viszont mind a halak, mind a filogenetikailag fiatalabb hüllők, madarak (összefoglaló néven Sauropsida) és emlősök esetén megfigyelhetők. Ennek a megfigyelésnek alapvetően háromféle magyarázata lehetséges:

(1.) a β -Cx szekvenciák egymástól függetlenül jöttek létre a halak és a Sauropsida csoport esetében, viszont a kétéltűeknél nem alakultak ki.

(2.) A β -Cx-ek szekvenciáit a mai gerinces osztályok fajai a közös ősnél tekinthető Osteichthyes csoporttól örökölték és a β -Cx-ek a kétéltűek esetén másodlagosan eltűntek.

(3.) A β -Cx szekvenciák az ősi Osteichthyes csoporttól öröklődtek tovább minden gerinces csoport rendelkezik velük és csak a kutatási eredményeink hiányosak a kétéltű β -Cx-eket illetően. Bár a dendrogramunk (7. ábra) csak azokat a Cx szekvenciákat dolgozta fel amelyek retinális előfordulását az adott állatcsoportnál bizonyították, mi úgy gondoljuk, hogy ez a legutolsó hipotézis a legvalószínűbb és a kutatások hiányosságait tartjuk felelősnek minden további, a dendrogramról hiányzó alapvető Cx szekvencia esetében is. Az adatokból arra lehet következtetni, hogy már az evolúció korai szakaszában a ma élő gerinces osztályok ősei (Osteichthyes) egy paralóg Cx génekből álló szekvenciakészlettel rendelkeztek. Ez a szekvenciakészlet valószínűleg nem csak az ősi α -, β - és γ -Cx szekvenciákat, hanem már ezek alcsoportjait (I, II alcsoportjai, IIIa, és IIIb, lásd 7. ábra) is tartalmazhatta. Ezeknek az ősi Cx szekvenciáknak aztán az egyes gerinces osztályok divergens evolúciója során különböző ortológ változatai jelenhettek meg. A divergens evolúció ellenére az ortológ szekvenciák homológiája az általunk vizsgált konzervatív szakaszokon (transzmembrán régió, loop) mégis fennmaradt, így a molekulatömegük alapján hasonlóan gondolt (és hasonlóan elnevezett) szekvenciák a dendrogramon valóban közeli csoportokba kerültek. Eredményeink és következtetéseink nagyon hasonlóak a korábbi bioinformatikai vizsgálatokéhoz, ami analízisünk helyességét bizonyítja. Azonban, a számunkra referenciaként használt törzsfáktól (Cruciani és Mikalsen, 2005, 2006, 2007) néhány ponton eltérést tapasztaltunk. A legszembetűnőbb ezek közül, hogy az α -Cx-ek (II-es csoport) két alcsoportja (Cx43 és Cx57 vonal) közé ékelődnek a β -Cx-ek (I-es csoport; 7. ábra). Ez a megfigyelés felveti annak szükségességét, hogy a két α -Cx vonalat legalább alcsoportként (pl. α_1 és α_2 , vagy IIa és IIb) a jövőben elkülönítsük.

A fenti megfigyeléseken túl a konzervatív Cx evolúció továbbá arra is utal, hogy a connexinek esetében olyan, az élőlények számára fontos molekulákról van szó, melyek a több mint ötszáz millió éves evolúciós nyomás hatására sem változtak meg lényegesen. Valószínűsíthető az is, hogy az ortológ Cx szekvenciáknak nemcsak a

szerkezete konzervatív, hanem azok funkciói is, amelyet a különböző filogenetikai csoportokba tartozó állatok esetén ellátnak.

7.2. A Cx36 FEHÉRJE EXPRESSZIÓJÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA KÜLÖNBÖZŐ EMLŐS FAJOK RETINÁIBAN

Az emlős vizsgálati alanyaink retináin végrehajtott WB analízis bebizonyította, hogy minden vizsgált emlős faj retinájában a Cx36 fehérje nagy mennyiségben termelődik. Mivel a vizsgált fajok különböző emlős rendekből származnak, ezért valószínűnek tartjuk, hogy a Cx36 retinális termelődése általános jellemzője az emlősök osztályának. A bioinformatikai alapon konstruált dendrogram bizonyítja nemcsak a különböző emlős fajok Cx36 szekvenciáinak nagyfokú hasonlóságát egymással, hanem a sügér Cx35 fehérjével is. Ez utóbbi megfigyelés azért fontos, mert a sügér Cx35 fehérje szolgált antigénként ahhoz az antitest előállításához, amelyet mi is felhasználtunk immuncitokémiai vizsgálatainkhoz. Ugyanakkor a sügér Cx35 szekvencia a vizsgált nem-Cx36 (emberi Cx43, Cx45, Cx62 és Cx69) fehérjéktől szerkezetileg relatíve messze helyezkedett el. Ugyanez mondható el az összes többi faj Cx36 fehérjéjéről is. Különösen értékesnek tartjuk azt az információt, hogy a paralóg humán Cx36 és Cx45 molekulák kisebb szerkezeti hasonlóságot mutatnak, mint az ortológ humán Cx36 és sügér Cx35. Ez azért fontos, mert a Cx36 és a Cx45 fehérjék előfordulási mintázata nagymértékben átfed mind a belső, mind a külső retinában (Schubert és mtsai., 2005a; b; Dedek és mtsai., 2006; Hilgen és mtsai., 2011), ami az immuncitokémiai vizsgálataink értelmezésekor hibára adna lehetőséget. A bioinformatikai elemzés tehát egyértelműen azt mutatja, hogy a sügér Cx35 ellen termeltetett monoklonális antitest nagy biztonsággal alkalmazható emlős modellállataink retináin a Cx36 fehérje felismerésére és azoknak a többi Cx fehérjétől való elkülönítésére.

Az általunk vizsgált emlősök (kutya, macska, vadászgörény, birka, sertés, ember, tengerimalac, nyúl, mókusmajom, egér, patkány, hörcsög) retináiban a Cx36 eloszlás összehasonlítását egy másodlagos CaR jelölés segítségével végeztük. A CaR közismerten a korábban vizsgált emlős fajok retináiban számos idegelemben termelődik (Völgyi és mtsai., 1997; Gábrriel és Witkovsky, 1998; Jeon és mtsai., 1998, 2001; Gábrriel és mtsai., 1999; Massey és Mills, 1999a; Nag és Wadhwa, 1999; Lee és mtsai., 2010; Kwon és mtsai., 2014), ezért úgy gondoltuk, hogy a mi modellállataink esetében

az esetleges CaR háttér jelölés képes kijelölni a rostos rétegek határait, ezzel segítve a Cx36 immunjelölés pontos leírását és annak értékelését.

A CaR jelölés alapján 3 mintázati típust sikerült elkülönítenünk. A részletes leírás az „Eredmények” fejezetben található. Megfigyeltük, hogy az IPL külső (INL-IPL) és belső (IPL-GCL) határait mindhárom CaR mintázati típust sikerül pontosan elkülöníteni. Ugyanakkor külső retinális CaR pozitív elem csak az első mintázati típus esetében található, ezért a CaR jel csak ebben az esetben határozza meg az OPL határait. A CaR háttérjelölést tehát többnyire hasznosnak találtuk és a Cx36 jelölés értékelésénél ezeket használtuk fel.

Az általunk vizsgált emlős fajok esetében megfigyelhető volt Cx36 plakkok jelenléte az OPL területén. A plakkok mennyisége azonban fajonként nagyon eltérő volt. A rágcsáló fajok (egér, patkány, hörcsög), a nyúl, kutya, a görény, a mókusmajom és a sertés esetében csak néhány elszórt Cx36 plakk volt megfigyelhető, melyek elsősorban az OPL disztálisabb területein helyezkedtek el. A disztális plakk pozíció csak azokban fajokban volt egyértelmű, amelyekben a CaR háttérjel kijelölte az OPL területét (első állatcsoport). Valamivel gyakoribb, de hasonló disztális dominanciájú Cx36 plakk eloszlás volt megfigyelhető a macska és a birka OPL esetében. A fenti állatoknál a Cx36 plakkok elszórt jellege és disztális dominanciája (ahol ez vizsgálható volt) arra utalt, hogy ezek főleg a fotoreceptorok közötti réskapcsolatokat felépítő plakkok. Ezek a kapcsolatok lehetnek csap-pálcika-, csap-csap- és pálcika-pálcika kapcsolatok. A mi jelöléseink alapján nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy ezek közül melyik populációhoz tartozó plakkokat jelöltük sikeresen. Ettől a fenti mintázattól nagyban eltért a humán és a tengerimalac retina, melyeknél az elszórt Cx36 plakkok mellett a többségük horizontális csíkokba rendezetten helyezkedett el. Ezen Cx36 plakkok által formált horizontális konglomerátumok egyértelműen azokhoz a szubpedikuláris struktúrákhoz tartoznak, amelyek a bipoláris sejtek dendritikus végződése közötti GJ-ket alkotják (Feigenspan és mtsai., 2004; O'Brien és mtsai., 2012; Kántor és mtsai., 2015). Ezen kapcsolatok közül, csak az emberi és a tengerimalac retinában voltak szembetűnőek. Ugyanakkor nagyon valószínű, hogy bipoláris GJ kapcsolatok minden emlős faj retinájában megtalálhatóak, csak a horizontális összerendezettség a szubpedikuláris régióban a többi faj esetén kevésbé kifejezett (Feigenspan és mtsai., 2004).

A belső retinában Cx36 plakkok minden alrétegben megtalálhatóak az összes általunk vizsgált emlős faj esetében. Hasonlatos a Cx36 plakk eloszlás ON alrétegbeli dominanciája az emlősök retináiban, ugyanakkor a dominancia mértéke eltérhet az egyes fajoknál. A nyúl és mókusmajom esetében a dominancia nem kifejezett és a Cx36 plakk eloszlás az IPL területén csaknem homogén. Ezeknél a fajoknál talán csak a Cx36 plakkok mérete nagyobb az ON alrétegben, de számuk látszólag hasonló az OFF rétegbeliekéhez. A macska, a görény, a birka és az emberi retina esetében az ON alrétegbeli Cx36 plakk dominancia már kifejezett, de az OFF alrétegben is találhatóak szép számban plakkok, sőt akár második dominanciaréteget is alkothatnak (ember). A rágcsálók (egér, patkány és hörcsög) retináiban az OFF alréteg plakkjai ritkák és kicsik, így az előbb említett ON dominancia ezeknél az állatoknál még kifejezettebb. A rágcsálók esetén az ON dominancia azért is szembetűnő, mert a Cx36 plakkok nagy része a CaR jelölt staburst amakrin sejtek belső rostrétege alatt helyezkedik el. Végül a kutya, a sertés és a tengerimalac esetében a legkifejezettebb az ON dominancia, ugyanis ezeknél az állatoknál a plakkok többsége az ON alréteg legdisztálisabb részében, az IPL-GCL határvonalhoz közel helyezkedik el.

Az egér, a nyúl, és a majom esetében tisztázott, hogy az ON alrétegbeli Cx36 plakkok nagy része az elsődleges pácika csatorna elemei (ON csap-bipoláris- és AII sejt) által létrehozott elektromos szinapszisok felépítésében vesznek részt (Feigenspan és mtsai., 2001; Mills és mtsai., 2001; Deans és mtsai., 2002). Ezekben az állatokban egyértelmű, hogy a Cx36 plakkok ON alrétegbeli dominanciája az elsődleges pácika csatorna GJ-jaihoz kötött. Fentiek alapján úgy gondoljuk, hogy ez általánosítható a legtöbb emlős fajra is. Ezt egyrészt a Cx36 plakkok ON alrétegbeli dominanciája miatt feltételezzük, másrészt a fajok egy részében (macska, vadászgörény, sertés, ember, tengerimalac, nyúl, mókusmajom) a CaR jelölt AII, vagy AII-re hasonlító morfológiával rendelkező sejteket láttunk, melyek rostjai Cx36 plakkokkal kolokalizálnak. Ez a fajta AII-Cx36 kolokalizáció egyes fajokban (disznó, ember, tengerimalac) nem csak esetleges, hanem nagyon szembetűnő és gyakran megfigyelhető jelenség. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a Cx36 plakkok ON alrétegbeli dominanciája nem csak az általunk vizsgált, hanem a legtöbb emlős fajra jellemző tulajdonság, amely a 13. ábrán látható hisztogramokon is jól megfigyelhető. A 12. ábrán látható plakkméret eloszlásból az is kitűnik, hogy a nagyobb méretű plakkok szintén az IPL ON-alrétegében figyelhetőek meg a legtöbb fajban. Ezen túlmenően valószínűsítjük, hogy a megfigyelt Cx36 ON

dominancia egyes fajok esetén a vizsgált retinális excentritástól is függ, ugyanis a tipikusan Cx36 termelő elsődleges pálcika csatorna elemek (elsősorban az AII sejtek és az ON csap bipolárisok) gyakorisága retinán belül is változhat (pl. főemlősök). A Cx36 plakkok ON dominanciája korrelál a vizsgált faj életmódjával, azaz az éjszakai életmódot folytató állatok esetén a dominancia kiterjedtebb (mind a három, S3-5 alrétegben megfigyelhető), mint a nappali állatoknál.

Az ON alrétegbeli dominancia mellett, minden vizsgált fajban megfigyelhetőek Cx36 plakkok az OFF alrétegben is. Ezek egy része valószínűleg ugyancsak az előbb említett AII sejtekhez köthető, melyeknek az OFF alrétegbeli lobuláris dendritnyúlványai is létrehozhatnak (ugyan lényegesen ritkábban) AII-AII gap junctionokat. Ugyanakkor az egér retina esetében tudott, hogy a legtöbb ganglion-amakrin sejt GJ kapcsolata is Cx36 alegységekből épül fel (Völgyi és mtsai., 2009; Pan és mtsai. 2010). Ezek a ganglion-amakrin sejt réskapcsolatok mind az ON, mind az OFF alrétegben megtalálhatók és gyakoriak az egér retinában. Feltételezzük, bár a vizsgálataink alapján ez nem bizonyított, hogy a legtöbb vizsgált faj esetén az OFF alrétegbeli Cx36 plakkok nagy része és az ON alrétegbeli plakkok kisebb hányada ezekből a dúcsejt-amakrin sejt kapcsolatokból származik.

7.3. Cx36 MRNS ÉS FEHÉRJE EXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK AZ EGYEDFEJŐDÉS SORÁN

További kísérleteinkben a Cx transzkriptek és fehérjék expressziójának a korai posztnatális egyedfejlődés során bekövetkező változásait vizsgáltuk patkány retinán. A Cx36 az egyik legfontosabb GJ fehérje alegység, amely a retina különféle idegsejtjei közötti homo- és heterotipikus kapcsolatok létesítéséért felelős. A Cx36 transzkript szintje a fejlődő patkány retinában P1 és P15 napok között folyamatosan nőtt, majd a fiatal felnőtt állatban (P20) valamelyest visszaesett. A Cx36 fehérje termelése ehhez hasonló, folyamatosan növekvő mintázatot mutatott; a WB analízis majdnem hétszeres Cx36 fehérje szintnövekedést mutatott ki a kifejlett és az újszülött retinák között. Ezek az eredmények nagyon jól összeegyeztethetőek az egér retina hasonló Cx36 expressziós váltoásaival (Kihara és mtsai., 2006b; 2010), ahol mind a transzkript, mind a fehérje mennyisége folyamatosan növekszik a korai posztembrionális korban, majd egy maximumot elérve stagnál. Kihara és munkatársainak munkájában a P15 és P20 napok közötti transzkript termelődés visszaesése nem figyelhető meg, de ez valószínűleg nem

a vizsgálati állatmodellek (egér, patkány) különbségeinek, hanem Kihara és munkatársai munkájában megfigyelhető ritkább mintavételezési időpontoknak köszönhető.

Megfigyeléseink szerint, a Cx36 mRNS és fehérje már a korai (P0-P5) fejlődési stádiumokban is jelen van, ám immuncitokémiai módszerrel a fehérje jelenléte ekkor még nem nyilvánvaló. Ez arra enged következtetni, hogy a Cx36 prekursor és fehérje kifejeződése már korán megindul, ám a plakkok mérete a fénymikroszkópos (és szuperrezolúciós) detektálási határ alatt marad. Ez összhangban van Marc és munkatársai (2013) megfigyelésével, mely szerint a legtöbb csap bipoláris sejt 200 nm-nél kisebb GJ-vel kapcsolódik egymáshoz, amely hagyományos fénymikroszkópiával detektálhatatlan tartományba esik és még az általunk használt SIM technológiával is a feloldási határ közelében van.

Kísérleteinkben monoton növekedő Cx36 mRNS szintet mértünk a P3-P15 napok között, ugyanakkor a Cx36 fehérje mennyisége nem változik számottevően a P3-P10 időszakban egészen a P15 napot követő visszaesésig. Az mRNS és fehérje expressziós szintváltozás között tapasztalt eltérések részben mérési pontatlanságból származhatnak (a WB esetén denzitometriai alapú szemi-kvantitatív mérésekről van szó). Azonban az is elképzelhető, hogy a Cx36 mRNS prekursorból sokkal többet szintetizál a retina, ezzel előkészülve a megnövekedett igényekre, amelynek csúcsa a szem kinyílásakor bekövetkező szinaptikus újrarendeződés időszakára (P12) tehető. Eddig az időpontig a neuronok Cx36 fehérje expresszióját másodlagos szabályozási folyamatok (pl. mikro-RNS-ek) tartják alacsonyabb szinten. A pályák pályá elemeinek (pálcika, pálcika bipoláris, AII amakrin sejt) késői érése valószínűleg szintén közrejátszik a növekvő Cx36 igényben, A P15 stádiumot követő jelentős 30%-os mRNS szint visszaesés valószínűsíthetően a lecsengő szinaptikus újrarendeződést követő konszolidáció miatt tapasztalható. A Cx36 mRNS expresszió ilyen visszaesését eddig még nem mutatták ki más tanulmányok, bár nem vizsgálták hasonló felbontásban a kérdéses időszakot. Feltételezhetően a visszaesés az érett retina működéséhez szükséges Cx36 mRNS-szintre történő összehangolás eredménye, ahol a fehérje igény és az mRNS szintje kerül egyensúlyba az érett idegi hálózat kialakításakor.

A fejlődő retinában megfigyelt növekvő Cx36 szint alátámasztja azt az elképzelést miszerint a GJ-k molekuláris átrendeződésen mennek keresztül, minek következtében megnő a GJ-k Cx36 aránya. A progenitorokból érett sejtekké válás során a sejtek GJ-i megváltozott feladatokat látnak el, és emiatt szükséges a GJ-k

összetételének megváltoztatása. Ezt a hipotézist az is alátámasztja, hogy a Cx45 mRNS expressziója a Cx36-al ellentétes változáson megy keresztül, miszerint embrionális és újszülött korú állatok retinájában magas mennyiségben kifejeződik, majd az ezt követő posztnatális fejlődés során szintje folyamatosan csökken (Kihara és mtsai., 2006b; 2010; 21. ábra). A Cx45 a késői posztnatális korban is megtalálható a retinális progenitor sejtek közötti GJ kapcsolatokban, melyek a szomszédok közötti kommunikáció által a sejtek osztódási képességének fenntartását szolgálják (Cai és mtsai., 2004; Cheng és mtsai., 2004; Kihara és mtsai., 2006b). Az általunk is bemutatott nagymértékű szekvencia hasonlóság a Cx36 és Cx45 esetében efféle molekuláris kicserélődést lehetővé tehet, sőt a heterotipikus (Dedek és mtsai., 2006) és bihomotipikus (Li és mtsai., 2008) GJ kapcsolatok léte korábban már bebizonyosodott. Ezeknél közvetlenebb bizonyíték az a megfigyelés, mely szerint genetikailag módosított egerekben a Cx36 fehérje Cx45-re cserélődik (Frank és mtsai., 2010). Ezek az eredmények tehát mind azt támasztják alá, hogy a retinális fejlődés során a progenitorok és fiatal neuronok GJ-i esetén a Cx36 alegységek fokozatosan felváltják a Cx45 alegységeket.

A Cx36 kicserélődéses folyamaton túlmenően ugyanakkor valószínűnek tartjuk, hogy a Cx36 expresszió posztnatális növekedéséhez új Cx36 tartalmú elektromos szinapszisok születése is hozzájárul. Egy korábbi megfigyelés szerint ugyanis a funkcionális (neurobiotin permeábilis) réskapcsolatok száma a vadászgörény retinájában a születést követő harmadik posztnatális hétig folyamatosan növekszik (Penn és mtsai., 1994). Mivel a legtöbb retinális ganglionsejt Cx36 alegységeket tartalmazó GJ kapcsolatokon keresztül kommunikál szomszédos ganglion- és amakrin sejtekkel (Völgyi és mtsai., 2009; Pan és mtsai., 2010), valószínűsítjük, hogy a ganglion sejt GJ-k számának emelkedése nagyban hozzájárul a fejlődés során bekövetkező Cx36 mennyiségi változáshoz. Ennek a hipotézisnek némileg ellentmond Xu és munkatársai eredménye (2013), mely szerint az irány szelektív ganglion sejtek folyamatosan csökkenő kapcsoltágot mutatnak a fejlődő egér retinában. Ezt a látszólagos ellentmondást feloldja az a tény, hogy ezek a dúcsejtek Cx45 alegységet és nem Cx36-ot (Schubert és mtsai., 2005b) használnak kapcsolataikban, melyről viszont tudjuk, hogy mennyisége csökken a posztnatális fejlődés során (Kihara és mtsai. 2006b).

Bár a Cx36 tartalmú ganglion sejt GJ-k már a korai posztnatális korban működnek, ezek valószínűleg mégsem egyedül felelősek a P0-P10 intervallumban

észlelt exponenciális Cx36-szint emelkedésért. Az emlős retinában a legismertebb Cx36 tartalmú GJ-k az elsődleges pálcika-útvonal neuronjai közötti GJ kapcsolatokban figyelhetők meg (Feigenspan és mtsai., 2001; Güldenagel és mtsai., 2001; Mills és mtsai., 2001; Deans és mtsai., 2002; Völgyi és mtsai., 2004). Ezek a neuronok (pálcika-, pálcika-bipoláris-, AII amakrin sejtek) relatíve későn jelennek meg a retinális neuronhálózatban (Carter-Dawson és LaVail, 1979; Young, 1985; Cherry és mtsai., 2009), amely egybevág az általunk megfigyelt késői (P10) Cx36 mRNS-, fehérje szint, valamint a Cx36 pozitív plakk méret és szám robbanásszerű emelkedésével. Ezt a hipotézist az is alátámasztja, hogy a P10 után megfigyelt robbanásszerű Cx36 expresszió növekedés centruma az ON alréteg, amely az AII-AII és AII-ON csap-bipoláris GJ kapcsolatok helye is. Direkt bizonyítékunk erre a fenti hipotézisre az volt, hogy P10 után az újonnan képződő Cx36 plakkok gyakran kolokalizáltak PV jelölt AII sejtek dendritjeivel. Elmondhatjuk, hogy a Cx36 mRNS és fehérje szintjének mennyiségi növekedéséért elsősorban a P10 után megjelenő primer pálcikacsatorna sejtek (főként az AII) és ezek GJ kapcsolatai a felelősek. A Cx36 szint növekedéséért kisebb mértékben az új dúcsejt GJ-k keletkezése és a már meglévő dúcsejt és amakrin sejt réskapcsolatok molekuláris átrendeződése tehető felelőssé. Ezen felül megfigyelhető, hogy az AII sejtek dendritjein kolokalizáló Cx36 plakkok a P20 mintában a korábbi plakkoktól szignifikánsan nagyobbak és többségében a disztális transzverzális dendritágakon helyezkednek el. A fiatalabb AII sejtek dendritjein ezzel szemben kisebb, homogénebb eloszlású plakkok láthatók. Ismert, hogy az AII-ON csap-bipoláris GJ-k a transzverzális nyúlványok egész hosszában (S3-5 alréteg), míg az AII-AII GJ-k főleg a disztálisabb részekén (S4-5 alréteg) helyezkednek el. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy az AII-ON csap-bipoláris réskapcsolatok időben előbb (P15) érnek és az AII-AII kapcsolatok, csak napokkal később érik el a kifejlett állapotot.

7.4. CX45 ÉS CX57 MRNS EXPRESSZIÓ POSZTNATÁLIS VÁLTOZÁSAI

qPCR méréseink igazolták, hogy az egerhez hasonlóan (Kihara és mtsai., 2006b) a korai posztnatális patkány retinájában a Cx45 expresszió folyamatosan csökken, majd a kifejlett állatra jellemző értéket elérve állandósul (21. ábra). Érdekes azonban, hogy a P5 napos állatok Cx45 szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint az előtte (P3) és utána (P10) következő mintáinkban. Ennek egyik magyarázata, hogy a P5 mintáink némiképpen degradálódtak a mérési procedúra során. Ugyanakkor reális feltételezés az is, hogy a P5 napon megfigyelt Cx45 mRNS termelés lokális minimumának

funkcionális magyarázata van. Elképzelhető ugyanis, hogy a P3-5 napos csökkenés annak köszönhető, hogy a Cx45 GJ-n keresztül kommunikáló progenitor sejtek száma ekkor jelentősen csökken, illetve a már elkötelezett idegsejtek esetén a Cx45 alegységek más Cx egységekre (pl. Cx36-ra) cserélődnek. Ugyanakkor a P10 időszakban megfigyelt, átmenetileg megemelkedett Cx45 mRNS szint az újonnan létesített GJ kapcsolatoknak köszönhető, melyek egy része Cx45 tartalmú [ON-OFF irány szelektív dúcsejt (Schubert és mtsai., 2005b); ON csap-bipoláris sejtek (Lin és mtsai., 2005; Han és Massey., 2005; Maxeiner és mtsai., 2005); OFF csap-bipoláris sejt (Hilgen és mtsai., 2011); interplexiform amakrin sejt (Dedek és mtsai., 2009)]. Az átmeneti Cx45 szintnövekedésnek a szem kinyílását követő (P12) sejtpusztulás vet véget, illetve csökkenti alacsonyabb szintre, mint a P15, P20 napos állatok esetén.

A Cx57 mRNS expresszió változása esetén a horizontális sejtek fejlődését kell szem előtt tartanunk, ugyanis a rágcsáló retinában kizárólag ezek a sejtek expresszálnak Cx57-et (Hombach és mtsai., 2004). Az egér és patkány retina B-típusú horizontális sejtjei dendro-dendritikus Cx57 tartalmú GJ-eket hoznak létre. Egerek esetében megfigyelték azt, hogy a Cx57 mennyisége a fényadaptáció során emelkedik (Janssen-Bienhold és mtsai., 2009) ami a Cx57 fehérje mennyiségének dinamikus szabályozására utal. Ugyancsak ismert, hogy a fejlődő egér retinában a Cx57 szint folyamatosan növekszik és a kifejlett állat esetén éri el a maximumot (Kihara és mtsai., 2010). Ezzel a megfigyeléssel teljes mértékben konzisztensek a mi eredményeink is a patkány retinában, melyek alapján a korai posztnatális korban a Cx57 mRNS szint perzisztál, majd a P10 és P15 stádiumban hirtelen megnő (21. ábra). Ennek a megnövekedett Cx57 szintnek az lehet oka, hogy ebben a stádiumban alakul ki a horizontális sejtek közötti szerteágazó elektromos szinaptikus rendszer (Johnson és mtsai., 2000).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A neuronális elektromos szinapszisokat alkotó Cx-k expressziója meghatározó mind a fejlődő, mind a kifejlett retinában. Munkánkban főképpen a connexin36 (Cx36) és egyéb retinális Cx-ek expressziós változásainak széles körű leírása, illetve ezen változások mozgatórugóinak felismerése volt a cél evolúciós és egyedfejlődési léptékben.

Vizsgálataink során a következő fontos eredményeket állapíthattuk meg:

- 1.) A Cx-ek az evolúció során igen korán kialakulhattak és a mai gerinces osztályok képviselői már egy paralóg Cx készletet örököltek a közös ős Osteichthyes állatoktól. Az orthológok szekvenciáinak nagyfokú hasonlósága a Cx-ek és a réskapcsolatok fontosságát bizonyítja.
- 2.) A Cx36 minden vizsgált emlős faj retinájában előfordul, expressziója nagyfokú hasonlóságot mutat. Ez arra utal, hogy a Cx36 tartalmú elektromos szinapszisok funkciói is konzerválódtak az emlős evolúció során.
- 3.) A Cx36 plakkok lokalizációjában és méretében megfigyelt különbségek és hasonlóságok valószínűleg az egyes állatok életmódjával korrelálnak, és nem a vizsgált emlősök genetikai rokonságával.
- 4.) A Cx36 mRNS és fehérje kifejeződése a posztnatális fejlődés során emelkedik és P15 nap körül egy csúcsot ír le, amely a szem kinyílását követő neuronális átrendeződéshez és a pálcika rendszer elemeinek megjelenéséhez szorosan köthető.
- 5.) A Cx45 és Cx57 transzkriptek is jellemző mennyiségi változásokon mennek keresztül a korai posztnatális fejlődés során, mely egyértelműen az általuk formált GJ-k és a kapcsolatos idegelemek megjelenésével, érésével korrelál.

A fenti eredmények bemutatják, hogy a retinális réskapcsolatok olyan alapvető funkciókat látnak el, melyek még evolúciós léptékben is csak igen konzervatív változást engednek meg. Ugyanakkor ezek dinamikusan működő, állandóan újraszerveződő kapcsolatok, melyek mennyisége, molekuláris összetétele és konduktanciája az élőlények változó környezetéhez messzemenőig alkalmazkodik. Ezen dinamikát figyeltük meg környezeti változás, illetve relative lassú egyedfejlődést követő változás esetében is.

9. SUMMARY

The expression of neuronal gap junction (GJ) forming connexins is crucial for both the developing and the mature retina. Our main goal was to study the expressional changes of connexin36 (Cx36) and other retinal Cx-s as well as to determine the factors behind the Cx expressional changes throughout the evolution and the postnatal development.

Our studies resulted in the following main findings:

- 1.) The Cx-s developed early on in the evolution and the animals in each vertebrate class inherited a set of paralog Cx-s from the common ancestor Osteichthyes animals. The conserved sequences of ortholog Cx-s attest the high importance of GJ-s in the retinal circuitry.
- 2.) The Cx36 could be found in the retinas of all examined mammalian species and their expression pattern showed high similarity. This indicates that the functions of Cx36 GJ-s are conserved as well.
- 3.) The observed differences and similarities in the Cx36 plaque distribution and size correlated with life-style rather than the genetic relationship of the animals.
- 4.) The Cx36 mRNA expression level is increasing during the postnatal development until it reaches a peak at P15, which is highly related to the neuronal reorganization around eye opening and the formation of the rod signaling system.
- 5.) The Cx45 and Cx57 transcripts also display characteristic expressional changes during the early postnatal development, which clearly correlates with the formation and maturation of the GJ-s they comprise.

Our findings show evidence that retinal GJ-s serve fundamental functions that allows for only slow conservative changes in the Cx sequences throughout the evolution. On the other hand, retinal GJ-s are dynamic, reconfigurable inter-neuronal connections, whose quantity, molecular makeup and conductance adapts to the ever-changing environment. To pinpoint this latter statement this study presented faster and slower, developmental changes in the Cx36 expression level.

10. FELHASZNÁLT IRODALOM

- 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. *J Physiol.*, 587(Pt 18):4481-95.
- Arendt D (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol.*, 47(7-8):563-71.
- Barlow HB, Hill RM, Levick WR. (1964) Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit retina. *J Physiol.*, 173:377-407.
- Battelle BA, Kempler KE, Parker AK, Gaddie CD. (2013) Opsin1-2, G(q) α and arrestin levels at Limulus rhabdoms are controlled by diurnal light and a circadian clock. *J Exp Biol.*, 216(Pt 10):1837-49.
- Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC. (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron.*, 6(3):305-20.
- Berthoud VM, Beyer EC. (2009) Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal.*, 11(2):339-53.
- Berthoud VM, Peter J Minogue, James G Laing, Eric C Beyer. (2004) Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *J CardioRes.*, 021 256-267.
- Bloomfield SA, Dacheux RF. (. 2001) Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 20(3):351-84.
- Bloomfield SA, Völgyi B, (2004) Function and plasticity of homologous coupling between AII amacrine cells. *Vision Res.*, 44(28):3297-306.
- Bloomfield SA, Völgyi B (2007) Response properties of a unique subtype of wide-field amacrine cell in the rabbit retina. *Vis Neurosci.*, 24(4):459-69.
- Bloomfield SA, Völgyi B (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci.*, 10(7):495-506.
- Bollinger T, Schibler U (2014) Circadian rhythms – from genes to physiology and disease. *Swiss Med Wkly.*, 144:w13984.
- Bosco D, Haefliger JA, Meda P. (2011) Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev.*, 91(4):1393-445.
- Brightman MW, Reese TS (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.*, 40(3):648-77.
- Brivanlou IH, Warland DK, Meister M. (1998) Mechanisms of concerted firing among retinal ganglion cells. *Neuron.*, 20(3):527-39.
- Buhr ED, Takahashi JS. (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handbook of experimental pharmacology.* (217):3-27.
- Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS, Furukawa K. (2004) Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem.*, 88(1):212-26.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM. (1979) Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol.*, 188(2):263-72.

- Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP. (2004) Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev Biol.*, 272(1):203-16.
- Cherry TJ, Trimarchi JM, Stadler MB, Cepko CL. (2009) Development and diversification of retinal amacrine interneurons at single cell resolution. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 106(23):9495-500.
- Ciolofan C, Lynn BD, Wellershaus K, Willecke K, Nagy JI. (2007) Spatial relationships of connexin36, connexin57 and zonula occludens-1 in the outer plexiform layer of mouse retina. *Neuroscience.*, 148(2):473-88.
- Cook JE, Becker DL. (1995) Gap junctions in the vertebrate retina. *Microsc Res Tech.*, 31(5):408-19.
- Cook JE, Becker DL. (2009) Gap-junction proteins in retinal development: new roles for the "nexus". *Physiology (Bethesda).*, 24:219-30.
- Cruciani V, Mikalsen SO. (2005) The connexin gene family in mammals. *Biol Chem.*, 386(4):325-32.
- Cruciani V, Mikalsen SO. (2006) The vertebrate connexin family. *Cell Mol Life Sci.*, 63(10):1125-40.
- Cruciani V, Mikalsen SO. (2007) Evolutionary selection pressure and family relationships among connexin genes. *Biol Chem.*, 388(3):253-64.
- Csányi V: Etológia, Nemzeti Tankönyvkiadó Zrt. 2002. ISBN 9789631932300.
- Curcio CA, Sloan KR Jr, Packer O, Hendrickson AE, Kalina RE. (1987) Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. *Science.*, 236(4801):579-82.
- de Boer TP, van der Heyden MA. (2005) *Xenopus* connexins: how frogs bridge the gap. *Differentiation.*, 73(7):330-40.
- Dacheux RF, Raviola E. (1986) The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci.* 6(2):331-45.
- Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL. (2002) Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron.*, 36(4):703-12.
- Deans MR, Paul DL. (2001) Mouse horizontal cells do not express connexin26 or connexin36. *Cell Commun Adhes.*, 8(4-6):361-6.
- Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. (2006) Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci.*, 24(6):1675-86.
- Dedek K, Breuninger T, de Sevilla Müller LP, Maxeiner S, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Willecke K, Euler T, Weiler R. (2009) A novel type of interplexiform amacrine cell in the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 30(2):217-28.
- Demb JB, Pugh EN. (2002) Connexin36 forms synapses essential for night vision. *Neuron.*, 36(4):551-3.
- DeVries SH. (1999) Correlated firing in rabbit retinal ganglion cells. *J Neurophysiol.*, 81(2):908-20.

- Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A. (1984) Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav.*, 32(3):357-68.
- Eastman SD, Chen TH, Falk MM, Mendelson TC, Iovine MK. (2006) Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics.*, 87(2):265-74.
- Farquhar MG, Palade GE. (1965) Cell junctions in amphibian skin. *J Cell Biol.*, 26(1):263-91.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R. (2001) Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci.*, 21(1):230-9.
- 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. *J Neurosci.*, 24(13):3325-34.
- Field A. (2013) *Discovering statistics using IBM SPSS statistics.* 978-1446249185.
- Fonyó A. (2006) *Az orvosi élettan tankönyve.* 9632428455.
- Frank M, Eiberger B, Janssen-Bienhold U, de Sevilla Müller LP, Tjarks A, Kim JS, Maschke S, Dobrowolski R, Sasse P, Weiler R, Fleischmann BK, Willecke K. (2010) Neuronal connexin-36 can functionally replace connexin-45 in mouse retina but not in the developing heart. *J Cell Sci.*, 123(Pt 20):3605-15.
- Furshpan EJ, Potter DD. (1957) Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature.*, 180(4581):342-3.
- Gábel R, Witkovsky P. (1998) Cholinergic, but not the rod pathway-related glycinergic (AII), amacrine cells contain calretinin in the rat retina. *Neurosci Lett.*, 247(2-3):179-82.
- Gábel R, Völgyi B, Pollák E. (1999) Most calretinin-containing amacrine cells in the rabbit retina co-localize glycine. *Vis Neurosci.*, 16(6):983-90.
- Gábel R, Lesauter J, Bánvölgyi T, Petrovics G, Silver R, Witkovsky P. (2004) AII amacrine neurons of the rat retina show diurnal and circadian rhythms of parvalbumin immunoreactivity. *Cell Tissue Res.*;315(2):181-6.
- Gattermann R, Johnston RE, Yigit N, Fritzsche P, Larimer S, Özkurt S, Neumann K, Song Z, Colak E, Johnston J és McPhee ME. (2008) Golden hamsters are nocturnal in captivity but diurnal in nature. *Biol. Lett.* 4, 253–255.
- Golgi, Camillo. (1906) *The neuron doctrine - theory and facts;* Nobel ea.
- Goodenough DA, Revel JP. (1970) A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J Cell Biol.*, 45(2):272-90.
- Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, Acosta-Rodriguez VA, de Zavalía N, Rosenstein RE. (2010) Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Prog Neurobiol.*, 92(4):484-504.
- 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. *J Neurosci.*, 21(16):6036-44.

- Han Y, Massey SC. (2005) Electrical synapses in retinal ON cone bipolar cells: subtype-specific expression of connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(37):13313-8.
- Hartline, H. Keffer, (1967) Visual receptors and retinal interaction, Nobel ea.
- Haverkamp S, Wässle H. (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol.*, 424(1):1-23.
- Herrman ER. (2008) Estrous cyclicity modulates circadian rhythms in female Styrian hamsters. MSc thesis, Kent State University, UK.
- Hilgen G, von Maltzahn J, Willecke K, Weiler R, Dedek K. (2011) Subcellular distribution of connexin45 in OFF bipolar cells of the mouse retina. *J Comp Neurol.*, 519(3):433-50.
- 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. *Eur J Neurosci.*, 19(10):2633-40.
- Hu EH, Pan F, Völgyi B, Bloomfield SA. (2010) Light increases the gap junctional coupling of retinal ganglion cells. *J Physiol.*, 588(Pt 21):4145-63.
- Hu EH, Bloomfield SA. (2003) Gap junctional coupling underlies the short-latency spike synchrony of retinal alpha ganglion cells. *J Neurosci.*, 23(17):6768-77.
- Jacobs GH. (2009) Evolution of colour vision in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Oct 12; 364 (1531):2957-67. doi: 10.1098/rstb.2009.0039.
- Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, Müller LP, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. (2009) Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. *J Comp Neurol.*, 513(4):363-74.
- Jeon MH, Jeon CJ. (1998) Immunocytochemical localization of calretinin containing neurons in retina from rabbit, cat, and dog. *Neurosci Res.*, 32(1):75-84.
- Jeon YK, Kim SY, Jeon CJ. (2001) Morphology of calretinin and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the pig retina. *Mol Cells.*, 11(2):250-6.
- Jilge B. (1991) The rabbit: a diurnal or a nocturnal animal? *J Exp Anim Sci.* 34(5-6):170-83.
- Johnson DA, Mills SL, Haberecht MF, Massey SC. (2000) Dye coupling in horizontal cells of developing rabbit retina. *Vis Neurosci.*, 17(2):255-62.
- Katti C, Butler R, Sekaran S. (2013) Diurnal and circadian regulation of connexin 36 transcript and protein in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 54(1):821-9.
- 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. (2015) Characterization of connexin36 gap junctions in the human outer retina. *Brain Struct Funct.* Jul 15., PubMed PMID: 26173976.
- Kihara AH, de Castro LM, Moriscot AS, Hamassaki DE. (2006a) Prolonged dark adaptation changes connexin expression in the mouse retina. *J Neurosci Res.*, 83(7):1331-41.

- Kihara AH, Mantovani de Castro L, Belmonte MA, Yan CY, Moriscot AS, Hamassaki DE. (2006b) Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. *J Neurobiol.*, 66(13):1397-410.
- Kihara AH, Santos TO, Osuna-Melo EJ, Paschon V, Vidal KS, Akamine PS, Castro LM, Resende RR, Hamassaki DE, Britto LR. (2010) Connexin-mediated communication controls cell proliferation and is essential in retinal histogenesis. *Int J Dev Neurosci.*, 28(1):39-52.
- Knop GC, Pottel M, Monyer H, Weiler R, Dedek K. (2014) Morphological and physiological properties of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-expressing wide-field amacrine cells in the ChAT EGFP mouse line. *Eur J Neurosci.*, 39(5):800-10.
- Kolb H, Famiglietti EV. (1974) Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science*.186(4158):47-9.
- Kolb H, Fernandez E, Nelson R. (1995) *Webvision -The Organization of the Retina and Visual System*, Salt Lake City, USA: University of Utah Health Sciences Center.
- Kothmann WW, Li X, Burr GS, O'Brien J. (2007) Connexin 35/36 is phosphorylated at regulatory sites in the retina. *Vis Neurosci.*, 24:363–375.
- Krizaj D, Gábel R, Owen GW, Witkovsky P. (1998) Dopamine D2 receptor-mediated modulation of rod-cone coupling in the *Xenopus* retina. *J. Comp. Neurol.* 398, 529-538.
- Kwon OJ, Lee ES, Jeon CJ. (2014) Density and types of calretinin-containing retinal ganglion cells in rabbit. *Neuroscience*. 278:343-53.
- Lee ES, Lee JY, Jeon CJ. (2010) Types and density of calretinin-containing retinal ganglion cells in mouse. *Neurosci Res.*, 66(2):141-50.
- Li H, Chuang AZ, O'Brien J. (2009) Photoreceptor coupling is controlled by connexin 35 phosphorylation in zebrafish retina. *J Neurosci.*, 29:15178–15186.
- Li X, Olson C, Lu S, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI. (2004) Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. *Eur J Neurosci.*, 19(8):2132-46.
- Li X, Kamasawa N, Ciolofan C, Olson CO, Lu S, Davidson KG, Yasumura T, Shigemoto R, Rash JE, Nagy JI. (2008) Connexin45-containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bihomotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. *J Neurosci.*, 28(39):9769-89.
- Lin B, Jakobs TC, Masland RH. (2005) Different functional types of bipolar cells use different gap-junctional proteins. *J Neurosci.*, 25(28):6696-701.
- Liu X, Zhang Z, Ribelayga CP. (2012) Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS One.*, 7(11):e50602.
- Loewi, Otto. (1936) *The Chemical Transmission of Nerve Action*, Nobel ea.
- Maloney SK, Meyer LC, Blache D, Fuller A. (2013) Energy intake and the circadian rhythm of core body temperature in sheep. *Physiol Rep.*,1(5):e00118.
- Massey SC, Mills SL. (1999a) Antibody to calretinin stains AII amacrine cells in the rabbit retina: double-label and confocal analyses. *J Comp Neurol.*, 411(1):3-18.

- Massey SC, Mills SL. (1999b) Gap junctions between AII amacrine cells and calbindin-positive bipolar cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci.*, 16(6):1181-9.
- Mastrorade DN. (1983a) Correlated firing of cat retinal ganglion cells. I. Spontaneously active inputs to X- and Y-cells. *J Neurophysiol.*, 49(2):303-24.
- Mastrorade DN. (1983b) Correlated firing of cat retinal ganglion cells. II. Responses of X- and Y-cells to single quantal events. *J Neurophysiol.*, 49(2):325-49.
- Mastrorade DN. (1983c) Interactions between ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol.* 1983 Feb;49(2):350-65.
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Anderson JR, Sigulinsky C, Lauritzen S. (2013) Retinal connectomics: towards complete, accurate networks. *Prog Retin Eye Res.*, 37:141-62.
- 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 AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci.*, 25(3):566-76.
- McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. (2014) Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res.*, 39:58-76.
- Mills SL, O'Brien JJ, Li W, O'Brien J, Massey SC. (2001) Rod pathways in the mammalian retina use connexin 36. *J Comp Neurol.*, 436(3):336-50.
- Nag TC, Wadhwa S. (1999) Developmental expression of calretinin immunoreactivity in the human retina and a comparison with two other EF-hand calcium binding proteins. *Neuroscience.*;91(1):41-50.
- Nelson R, Famiglietti EV Jr, Kolb H. (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol.*, 41(2):472-83.
- Nelson R. (1982) AII amacrine cells quicken time course of rod signals in the cat retina. *J Neurophysiol.* 47(5):928-47.
- Nelson R, Kolb H, Freed MA. (1993) OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina. I: Intracellular electrophysiology and HRP stains. *J Comp Neurol.*, 329(1):68-84.
- Nilsson DE. (2013) Eye evolution and its functional basis. *Vis Neurosci.* 30(1-2):5-20
- Nowak RM. (1999) *Walker's Mammals of the World.* ISBN: 978080185789.
- O'Brien J, Nguyen HB, Mills SL. (2004) Cone photoreceptors in bass retina use two connexins to mediate electrical coupling. *J Neurosci.*, 24:5632–5642.
- O'Brien JJ, Chen X, Macleish PR, O'Brien J, Massey SC. (2012) Photoreceptor coupling mediated by connexin36 in the primate retina. *J Neurosci.*, 32(13):4675-87.
- Ollivier FJ, Samuelson DA, Brooks DE, Lewis PA, Kallberg ME, Komáromy AM. (2004) Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Vet Ophthalmol* 7 (1): 11–22.
- Osterberg, G. (1935) Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta ophthalmol., Suppl.*, 6, 1–102.

- 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. *J Comp Neurol.*, 518(6):911-27.
- Penn AA, Wong RO, Shatz CJ. (1994) Neuronal coupling in the developing mammalian retina. *J Neurosci.*, 14(6):3805-15.
- Poché RA, Reese BE (2009) Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology. *Development* 136:2141-2151.
- Ramón y Cajal, Santiago. (1906) The structure and connexions of neurons, Nobel ea.
- Rash JE, Pereda A, Kamasawa N, Furman CS, Yasumura T, Davidson KG, Dudek FE, Olson C, Li X, Nagy JJ. (2004) High-resolution proteomic mapping in the vertebrate central nervous system: close proximity of connexin35 to NMDA glutamate receptor clusters and co-localization of connexin36 with immunoreactivity for zonula occludens protein-1 (ZO-1). *J Neurocytol.*, 33(1):131-51.
- Raviola E, Gilula NB. (1973) Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 70(6):1677-81.
- Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. (2008) The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron.*, 59(5):790-801.
- Richter CP. (1978) "Dark-active" rat transformed into "light-active" rat by destruction of 24-hr clock: function of 24-hr clock and synchronizers. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 75(12):6276-80.
- Roerig B, Feller MB. (2000) Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Brain Res Rev.*, 32(1):86-114.
- Rosenbluth J. (1965) Ultrastructure of somatic muscle cells in *Ascaris lumbricoides*. II. Intermuscular junctions, neuromuscular junctions, and glycogen stores. *J Cell Biol.*, 26(2):579-91.
- Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. (2006) Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(25):9703-8.
- Ruan GX, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG. (2008) An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol.*, 6(10):e249.
- 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. *J Comp Neurol.*, 485(3):191-201.
- Schubert T, Maxeiner S, Krüger O, Willecke K, Weiler R. (2005b) Connexin45 mediates gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.*, 490(1):29-39.
- Smith RG, Freed MA, Sterling P. (1986) Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. *J Neurosci.*, 6(12):3505-17.
- Söhl G, Güldenagel M, Traub O, Willecke K. (2000) Connexin expression in the retina. *Brain Res Brain Res Rev.*, 32(1):138-45.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. (2005) Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci.*, 6(3):191-200.

- Söhl G, Jousen A, Kociok N, Willecke K. (2010) Expression of connexin genes in the human retina. *BMC Ophthalmol.*, 10:27.
- Söhl G, Willecke K. (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.*, 10(4-6):173-80.
- Söhl G, Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.*, 62(2):228-32.
- Tosini G, Menaker M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 272(5260):419-21.
- Tsukamoto Y, Masarachia P, Schein SJ, Sterling P. (1992) Gap junctions between the pedicles of macaque foveal cones. *Vision Res.*, 32(10):1809-15.
- Vaney DI. (1991) Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin. *Neurosci Lett.*, 125(2):187-90.
- Vaney DI, Weiler R. (2000) Gap junctions in the eye: evidence for heteromeric, heterotypic and mixed-homotypic interactions. *Brain Res Brain Res Rev.*, 32(1):115-20.
- Veruki ML, Hartveit E. (2002) AII (Rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron*. 14;33(6):935-46.
- Völgyi B, Pollak E, Buzás P, Gábrriel R. (1997) Calretinin in neurochemically well-defined cell populations of rabbit retina. *Brain Res.*, 763(1):79-86.
- Völgyi B, Deans MR, Paul DL, Bloomfield SA. (2004) Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *J Neurosci.*, 24(49):11182-92.
- Völgyi B, Abrams J, Paul DL, Bloomfield SA. (2005) Morphology and tracer coupling pattern of alpha ganglion cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.*, 492(1):66-77.
- Völgyi B, Chheda S, Bloomfield SA. (2009) Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol.*, 512(5):664-87.
- Völgyi B, Kovács-Oller T, Atlasz T, Wilhelm M, Gábrriel R. (2013) Gap junctional coupling in the vertebrate retina: variations on one theme? *Prog Retin Eye Res.*, 34:1-18.
- Watanabe A. (1958) The interaction of electrical activity among neurons of lobster cardiac ganglion. *Jpn J Physiol.*, 8(4):305-18.
- Yan Y, Salazar TE, Dominguez JM 2nd, Nguyen DV, Li Calzi S, Bhatwadekar AD, Qi X, Busik JV, Boulton ME, Grant MB. (2013) Dicer expression exhibits a tissue-specific diurnal pattern that is lost during aging and in diabetes. *PLoS One*. 8(11):e80029.
- Xin D, Bloomfield SA. (1999) Comparison of the responses of AII amacrine cells in the dark- and light-adapted rabbit retina. *Vis Neurosci*. 16(4):653-65.
- Xu Z, Zeng Q, Shi X, He S. (2013) Changing coupling pattern of The ON-OFF direction-selective ganglion cells in early postnatal mouse retina. *Neuroscience*. 250:798-808.
- Yeager M, Harris AL. (2007) Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin Cell Biol.*, 19(5):521-8.

- Yen MR, Saier MH Jr. (2007) Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol.*, 94(1-2):5-14.
- Young RW.(1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec.*, 212(2):199-205.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Gábrriel Róbert habil. egyetemi tanárnak a PTE-TTK, BDI vezetőjének támogatását.

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Völgyi Bélának (habil. egyetemi docens), hogy mindvégig támogatott, utat mutatott és megbízott bennem.

Köszönet illeti Dr. Dénes Viktóriát (habil. egyetemi adjunktus) és Dr. Lakk Mónikát (tud. munkatárs) a munkám során nyújtott önzetlen segítségükért.

Köszönöm, Dr. Csoknya Mária egyetemi tanárnak a dolgozatomban nyújtott segítségét és építő intelmeit.

Külön köszönöm Debertin Gábornak (PhD hallg.), Balogh Mártonnak (BSc. hallg.) és a Retinális elektromos szinapszisok kutatócsoport tagjainak segítségüket és, hogy egy csodás csapat részese lehettem, lehetek.

Köszönet illeti a PTE-TTK, Biológiai Intézet és a Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék összes dolgozóját munkájukért.

Munkám Dr. Kántor Orsolya (egyetemi adjunktus, SOTE, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) és kollégái, valamint Prof. Dr. Nyitrai Miklós (egyetemi tanár, DSc., PTE ÁOK Biofizikai Int.), Raics Katalin és Dr. Orbán József (egyetemi adjunktus) közreműködése nélkül nem jöhetett volna létre.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm szüleimnek és feleségemnek, hogy támogattak és hittek bennem.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

12.1. MTMT KÖZLEMÉNY ÉS IDÉZŐ ÖSSZEFOGLALÓ TÁBLÁZAT

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat

Kovács-Öller Tamás adatai (2015.12.07.)

Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások ¹	
	Teljes tudományos közlemények ²	Összesen	Részletezve	Független
I. Tudományos folyóiratcikk	7	---	---	---
nemzetközi szakfolyóiratban	---	7	19	27
hazai kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	0	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Könyv, szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
b) Könyv, szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	³ ---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény folyóiratban vagy konferenciakötetben	4	---	---	---
Idégen nyelvű	---	4	0	0
Magyar nyelvű	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)	11	---	19	27
További tudományos művek⁴	---	3	0	0

Idézetek száma⁵	---	---	19	27
Hirsch index⁵	3	---	---	---

Oktatási művek				
Felsőoktatási tankönyv	0	---	---	---
Idégen nyelvű	---	0	0	0
Magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része idegen nyelven	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része magyar nyelven	---	0	0	0
További oktatási művek	0	---	0	0

Olthalmi formák	0	---	0	0
------------------------	---	-----	---	---

Alkotás	0	---	0	0
----------------	---	-----	---	---

Ismeretterjesztő művek				
Könyvek	0	---	0	0
További művek	0	---	0	0

Közérdekű és nem besorolt művek	0	---	0	0
--	---	-----	---	---

Absztrakt	7	---	0	0
------------------	---	-----	---	---

Egyéb szerzőség	0	---	0	0
Idézők szerkesztett művekben	---	---	0	0
Idézők disszertációban, egyéb típusban	0	---	0	0
Idézők összesen, minden típus, minden jelleg	---	---	19	27

Megjegyzések:

A táblázat számai hivatkozások is. A számra kattintva a program listázza azokat a műveket, amelyeket a cellában összeszámlált.

--- : Nem kitölthető cella

¹ A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A disszertáció és egyéb típusú idézők összesítve a táblázat végén található.

² Teljes tudományos közlemény ebben az adatbázisban:

- Folyóiratcikk : szakcikk/tanulmány, összefoglaló cikk, rövid közlemény, sokszerzős vagy csoportos szerzőségű közlemény, forráskiadás, recenzió/kritika, műkritika, esszé

- Könyv: szakkönyv, monográfia, kézikönyv, tanulmánykötet, forráskiadás, kritikai kiadás, műhelytanulmány, atlasz

- Könyvrészlet: szaktanulmány, fejezet, esszé, forráskiadás, recenzió/kritika, műkritika, műtárgyleírás, térkép, műhelytanulmány része

- Konferenciaközlemény: folyóiratban, könyvben, egyéb konferenciakötetben megjelent legalább 3 oldal terjedelemben

- Oltalmi formák: szabadalmak, mintaoltalmak (részletek)

³ Szerkesztőként nem részesedik a könyv idézéséből

⁴ Ide értve a teljes közlemények listájában nem szereplő publikációkat, a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent műveket és minden olyan tudományos művet, ami a I.-IV. sorokban nem került összeszámlálásra.

⁵ A disszertációk és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A sor értéke a "Tudományos közlemények összesen (I.-IV.)", a "További tudományos művek" és az "Absztrakt" sorok idézettség értékeit összegzi.

Összesített Impakt Faktor: 30,93

Idézők: 27

Ebből független idézet: 19

12.2. DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

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 Res.*, 358(2):289-302. *IF 3,33*

Völgyi B, Kovács-Öller T, Atlasz T, Wilhelm M, Gábrriel R. (2013) Gap junctional coupling in the vertebrate retina: variations on one theme?. *Prog Retin Eye Res.* 34:1-18. *IF 9,90*

12.3. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK

Debartin G and Kovács-Öller T, Balogh M, Popovich E, Orbán J, Lukáts Á, Énzsöly A, Balogh L, Kántor O, Völgyi B. (2014) Multiple species comparison of the gap junction forming Connexin36 in the mammalian retina. 1st Innovation in Science 2014, Doctoral Student Conference, Szeged, Magyarország

Kovács-Öller T, Balogh M, Raics K, Nyitrai M, Völgyi B. (2013) Developmental changes in the gap-junction forming connexin36 expression levels in the rat retina. European Retina Meeting 2013, Alicante, Spanyolország

Kovács-Öller T, Balogh M, Péntes M, Orbán J, Lukáts Á, Énzsöly A, Balogh L, Kántor O, Völgyi B. (2013) Dispersion of retinal Connexin36 in mammalian carnivores. II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, Magyarország

Balogh M, Péntes M, Kovács-Öller T, Lukáts Á, Énzsöly A, Balogh L, Kántor O, Völgyi B. (2013) Distribution of connexin36 in the retina of various vertebrate species. János Szentágothai Memorial Conference and Student Competition, Pécs, Magyarország

Kovács-Öller T, Völgyi B. (2013) Developmental changes in the gap-junction forming connexin36 expression levels in rat retina. MITT 2013, Budapest, Magyarország

Kovács-Öller T, Popovich E, Völgyi B. (2012) Genetic relations of vertebrate retinal connexins. János Szentágothai Memorial Conference and Student Competition, Pécs, Magyarország

12.3. EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Debartin 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. *J Neurochem.*, 134(3):416-28.

Kántor O, Varga A, Tóth R, Énzsöly A, Pálfi E. (2015) Stratified organization and disorganization of inner plexiform layer revealed by TNAP activity in healthy and diabetic rat retina. *Cell Tissue Res.*, 359(2):409-21.

Kántor O, Varga A, Kovács-Öller T, Énzsöly A, Balogh L. (2014) TNAP activity is localized at critical sites of retinal neurotransmission across various vertebrate species. *Cell Tissue Res.*, 358(1):85-98.

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

Jakab F, Sebok J, Szántó Z, Hang D, Imre M. (2011) Dobrava-Belgrade hantavirus infection mimics acute appendicitis. *J Clin Virol.*,50(2):164-6.

12.4. EGYÉB KONFERENCIA KÖZLEMÉNYEK

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 action sites for both dopamine and GABA to target mixed population of amacrine cells. ERM 2015, Brighton, Nagy-Britannia

Debertin G, Kovács-Öller T, Popovich E, Orbán J, Nyitrai M, Völgyi B. (2014) Dopaminergic amacrine cell dendrites form presynaptic rings around somata of various inner retinal interneurons in the mammalian retina. III. Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, Magyarország

Balogh M, Kovács-Öller T, Debertin G, Völgyi B. (2014) Observation of the correlated ganglion cell activity in the mouse retina by using Ca⁺⁺-imaging. IBRO Workshop 2014 (P105.), Debrecen, Magyarország

Kovács-Öller T. (2014) A retina egy neurobiológus szemén keresztül. Kutatók éjszakája PTE-SZKK, Pécs, Magyarország

Kántor O, Varga A, Kovács-Öller T, Énzsöly A, Balogh L, Négyessy L, Völgyi B, Lukáts Á. (2014) TNAP activity is localized in critical sites of retinal neurotransmission across various vertebrate species. IBRO Workshop, Debrecen, Magyarország; P38.

Balogh M, Kovács-Öller T, Debertin G, Völgyi B. (2013) Detection of correlated ganglion cell activity in the mammalian retina by using Ca⁺⁺-imaging technique, 10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Magyarország

Knapp L, Kocsis K, Kovács-Öller T, Gellert L, Varga D, Ozsvár A, Kis Z, Völgyi B, Toldi J and Farkas T. (2013) Mechanisms involved in kainic acid-induced postconditioning after global ischemia in the rat hippocampus. 7th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, Kassa, Szlovákia

Kocsis K, Knapp L, Kovács-Öller T, Gellert L, Olah G, Heredi J, Menyhart A, Kis Zs, Völgyi B, Toldi J, Farkas T. (2013) Combination of oxaloacetate and acetyl-L-carnitine posttreatment prevents functional impairment in the hippocampus after global hypoperfusion.(SNN-6). 7th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, Kassa, Szlovákia

Kocsis K, Knapp L, Kovács-Öller T, Berkó A, Pósa A, Kis Zs, Varga Cs, Völgyi B, Farkas T, Toldi J. (2013) Mechanisms involved in kainate-induced postconditioning in ischemic hippocampus. MITT 2013, Budapest, Magyarország

- Németh V, Madai M, Maráczai A, Bérczi B, Horváth Gy, Oldal M, Kovács T, Bányai K, Jakab F. (2011) Dobrava-Belgrade hantavírusok gyakoriságának vizsgálata rágcsálókban magyarországi és észak-horvátországi területeken. PTE Innovációs Nap 2011, Pécs, Magyarország
- Németh V, Madai M, Maráczai A, Bérczi B, Horváth Gy, Oldal M, Kovács T, Bányai K, Jakab F. (2011) Seroprevalence and genetic characterization of Dobrava and Saaremaa hantaviruses among rodents (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*) in Hungary and Northern Croatia. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED) 2011, Vienna, Austria
- Németh V, Madai M, Bérczi B, Maráczai A, Horváth G, Oldal M, Kovács T, Jakab F. (2010) Seroprevalence and genetic characterization of Dobrava and Saaremaa hantaviruses among rodents (*Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*) in Hungary and Northern Croatia. 20th ECCMID Vienna, Austria, p.137: P1396.
- Németh V, Madai M, Maráczai A, Bérczi B, Horváth Gy, Oldal M, Kovács T, Bányai K, Jakab F. (2010) Prevalence of Dobrava-Belgrade and Saaremaa Hantaviruses among *Apodemus* mice in Hungary and Northern Croatia. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése, Keszthely, Magyarország. p. 35.;VE-20.

Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott,

Név: **Kovács-Öller Tamás**

Születési név: Kovács Tamás

Anyja neve: Kulima Erzsébet

Születési hely, idő: Budapest, 1985.11.21.

A retina réskapcsolatait alkotó connexin fehérjék expresszióját befolyásoló tényezők gerinces állatokban

című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a(z)

PTE- TTK, Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola –ban.

Témavezető neve: Dr. Völgyi Béla

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolában (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljeseek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: Pécs, 2015.....

.....
doktorjelölt aláírása