

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

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

PhD értekezés

Kovács-Öller Tamás

Témavezető:

Dr. Völgyi Béla

habil. egyetemi docens

PÉCS, 2015

1. BEVEZETÉS

A látás az emberek számára a legfontosabb szenzoros percepció, melynek segítségével a külvilágból származó információ több mint 75%-át felfogjuk és megtapasztaljuk. A látórendszer kiindulópontja a szem ennek idegszövege a retina. A retina rétegei jól elkülöníthetőek belső és külső rostos és sejtes rétegekre, melyeket belülről az üvegtest, kívülről a pigmenthám határolja.

Az emlősállatok retinájában öt alapvető idegsejt osztályt különíthetünk el: fotoreceptor, bipoláris, amakrin, horizontális és ganglion sejt (vagy dúcsejt). Míg a fotoreceptorok a képi információ detektálásában fontosak, addig a dúcsejtek az információ végső retinális integrációjában, illetve az agy felé küldésében játszanak szerepet. A bipoláris sejtek serkentő, míg a horizontális- és amakrin sejtek gátló retinális interneuronok. Ezek a sejtípusok és nyúlványaik rendeződnek rétegekbe. A sejtek közötti hálózatok kialakításában és fenntartásában elengedhetetlenek a réskapcsolatok (Kolb és mtsai., 1995).

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.

Nem ismert, hogy a különböző réskapcsolat alkotó fehérjék, a connexinek (Cx) 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.

A különböző Cx-eket kDa-ban mért súlyuk alapján nevezték el, de a csoportosításuk alapja a szekvencia és a funkcionális homológia (Cruciani és Mikalsen, 2006).

A retina belső rostos rétegében az AII-es amakrin sejtek, retinális információátvitelben betöltött központi szerepük és réskapcsolataik miatt kiemelt fontossággal bírnak. A gerinces retinában a legbehatóbban tanulmányozott amakrin sejtcsoport (Kolb és Famiglietti, 1974), amely kiemelt szerepet tölt be a retina információ-feldolgozásában.

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.

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. Ezen felül a nokturnális állatok retinája mögött egy fényvisszaverő réteg (tapetum lucidum) található (Ollivier, 2004).

Az egyedfejlődés során a retinában történő dinamikus változásokban részt vesznek a Cx36-45-57 tartalmú réskapcsolatok is (Kihara és mtsai., 2006), így expressziós változásaik vizsgálata kiindulópont a retina fejlődésének és az érett neuronhálózat működésének megértésében.

2. 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 korreláltható.

3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Állatok és mintaelőkészítés

Összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a következőkben felsorolt fajokban: egér (*Mus musculus*), patkány (*Rattus norvegicus*), tengerimalac (*Cavia porcellus*), nyúl (*Oryctolagus cuniculus*), aranyhörcsög (*Mesocricetus auratus*), birka (*Ovis aries*), macska (*Felis silvestris catus*), kutya (*Canis lupus fam.*), vadászgörény (*Mustela putorius furo*), mókusmajom (*Saimiri sciureus*), sertés (*Sus scrofa dom.*) és ember (*Homo sapiens sapiens*). A retina metszetek a centrális régiótól nazális irányban 2-4 mm-re készültek, 3 órás poszt-mortem anyagon. A Cx expresszió egyedfejlődés során bekövetkező változásainak vizsgálatára P0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 napos albínó Wistar patkányokat használtunk. A retinákat -80°C-on tároltuk. Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz PBS + 4% PFA oldatban fixáltunk 4°C-on, 1 órán át.

Connexin dendrogrammok

A gerinces állatok retináiban előforduló Cx génszakaszok szekvenciáit összegyűjtöttük, majd ezekből szekvenciahomológián alapuló dendrogrammokat készítettünk CLC Main Workbench 6.5 szoftvert használatával.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A -80°C-on tárolt retinákból RNazol RT-val RNS extrakciót végeztünk. A PCR reakciók során használt primereket az adott génekre terveztük és NCBI Primer-BLAST-tal ellenőriztük. Előtesztelésként OneStep RT-PCR-vel totál RNS-ből amplifikáltam a Cx36, 45 és 57 mRNS szekvenciákat. A qPCR-ben használt cDNS-t oligo-dT primerek segítségével állítottam elő, Fermentas RevertAid H- RT enzimet és protokollt használva. A Cx36 posztnazális mintasort Abi StepOne Plus qPCR-thermocyclerrel amplifikáltam, a többi mintát Bio-Rad CFX Connect-tel. A reakcióhoz Maxima SYBR-Green-t használtunk. A vizsgált mRNS-ek endogén kontrolja az Rpl13a-volt. A szoftveres analízist a thermocyclerek saját szoftverjeivel végeztük, innen exportáltuk az adatokat Microsoft Excel-be, ahol normalizáltuk és összegeztük őket. Az ábrák előállításához Origin 6-t használtunk.

Western blot

Hideg, proteináz inhibitoros RIPA pufferben homogenizáltuk a retinákat. A fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Kit-tel határoztuk meg. A további minták előkészítésénél és a blotolásnál a NuPAGE Instruction Manual szerint jártunk el. Futtatásonként 20 vagy 25 µg fehérjét vittünk fel a 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe. A gélről a fehérjéket félszáraz blotolással PVDF membránra blotoltuk. Blokkolást követően ezt Cx36 nyúl poliklonális

és β - tubulin nyúl poliklonális antitestekkel jelöltük. Az antitest másodlagos anti-nyúl HRP konjugált volt. Mosást követően ECL kemiluminescens jelet detektáltuk film segítségével. Az expozíciós idők: érintés, 10, 30, 60, 300 mp voltak. A filmeket digitalizáltuk és a jeleket a β -tubulinnal normalizálva mértük ImageJ (NIH) denzitometria segítségével. Az adatokat a P0-hoz igazítottuk.

Immunocitokémia

A szemserleget 4% paraformaldehidben fixáltuk. Mosást követően krioprotektáltuk, majd beágyaztuk. 12 μ m vastag metszeteket készítettünk, melyeket zselatinizált tárgylemezre gyűjtöttünk. A kiolvasztott metszeteket elsődleges antitesttel kezeltük (egér anti-Cx36, nyúl anti-CaR, vagy nyúl anti-PV) és egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Mosást követően másodlagos antitestekkel jelöltük őket, majd beágyazó médiummal lefedtünk.

Mikroszkópia

Metszeteinket 63-szoros nagyításban DIC szűrővel fényképeztük, Nikon FN1 típusú mikroszkóppal. Az immunjelet LSM 710 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal fényképeztük. Az utómunkálatok Adobe Photoshop CS3, ImageJ és Adobe Illustrator CS3 programmal készültek. Zeiss Elyra Structured Illumination (SIM) típusú szuperrezolúciós mikroszkópot használtunk a Cx jel nagyfelbontású detektálására. Zeiss ZEN szoftert alkalmaztunk a képek előkészítésére, majd ImageJ-t elemzésükre.

A retina központi részéből, merőleges metszési síkkal rendelkező metszeteket választottunk ki a denzitometriai analízishez és a plakksztatika elvégzéséhez. A plakkméret eloszlásokat ImageJ szoftver „Analyse particles” alkalmazásával mértük. A statisztikai analízist Origin 6 vagy SPSS 19 szoftverrel végeztük és Excellel interpretáltuk. A szignifikancia szint meghatározására egytényezős ANOVA analízist, vagy Student-féle t-próbát használtunk.

4. EREDMÉNYEK

A neuronális elektromos szinapszisokat alkotó connexinek (Cx-ek) 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 e változások mozgatórugóinak felismerése volt a cél evolúciós és egyedfejlődési léptékben.

Vizsgálataink során a következő fontos eredményeket állapíthattuk meg:

- 1.) Kiterjedt filogenetikai vizsgálataink eredményeképpen kijelenthetjük, hogy a Cx-ek az evolúció során igen korán kialakulhattak és a mai gerinces osztályok képviselői már egy paralóg Cx készletet örököltek a közös őstől, Osteichthyes állatoktól. Az orthológok szekvenciáinak nagyfokú hasonlósága a Cx-ek és a réskapcsolatok fontosságát bizonyítja. Ennek alátámasztására kiterjedt beható és connexin filogenetikai munkát végeztünk.
- 2.) Fehérje alapú (WB és IC) vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy 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, jellemzőek voltak a vizsgált állatfajra és valószínűleg az egyes állatok életmódjával korrelálnak, és nem a vizsgált emlősök genetikai rokonságával.
- 4.) A legfontosabb neuronális réskapcsolatokat alkotó 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 (AII-es amakrin sejtek kapcsolati rendszerének éréséhez) szorosan köthető.
- 5.) A Cx45 és Cx57 transzkriptek is jellemző mennyiségi változásokon mennek keresztül a korai posztnatális fejlődés során, melyek egyértelműen az általuk formált GJ-k és a kapcsolatos idegelemek megjelenésével, érésével korrelálnak.

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.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A 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*

AZ ELJÁRÁS TÉMAKÖRÉBEN KÉSZÜLT NEM REFERÁLT KONFERENCIA

ABSZTRAKTOK

Debertin G and Kovács-Öller T, Balogh M, Popovich E, Orbán J, Lukáts Á, Énzöly 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, Énzöly 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, Énzöly 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

AZ ELJÁRÁS TÉMAKÖRÉN KÍVÜL KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK

Debertin G, Kántor O, Kovács-Öller T, Balogh L, Szabó-Meleg E. (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, Énzöly 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, Énzöly 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.

AZ ELJÁRÁS TÉMAKÖRÉN KÍVÜL KÉSZÜLT, NEM REFERÁLT KONFERENCIA

ABSZTRAKTOK

- 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 Szentágotthai Transdisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Magyarország
- Knapp L, Kocsis K, Kovács-Öller T, Gellért 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 északhorvátországi 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.

ÖSSZESÍTETT IMPAKT FAKTOR: 30,93

IDÉZŐK: 27

EBBŐL FÜGGETLEN IDÉZET: 19