

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola Szabályozásbiológia Program

**A dopaminerg szignalizáció vizsgálata az emlős belső retinában; a specifikusnak gondolt  
DA1-AII sejtkapcsolat általánosítása**

PhD értekezés

**Debertin Gábor**

Témavezető:

**Dr. Völgyi Béla**

**habil. egyetemi docens**

PÉCS, 2018

## Bevezető

Az emlősök a külvilágból származó információ zömét látórendszerük segítségével érzékelik, így nem csoda, hogy a vizuális információ feldolgozásában vesz részt a legnagyobb kiterjedésű agyi terület (Gábriel 2012). A szembe érkező fény érzékelése és a képi információ elsődleges feldolgozása a retinában történik (Wassle és Boycott 1991). A többi szenzoros rendszer perifériás struktúráival ellentétben, a retina a fényinger kódolása mellett fontos és meglehetősen bonyolult információ feldolgozó folyamatokat is végez, melyet a retina bonyolult neuronális hálózata tesz lehetővé. A retina a fényfelfogó fotoreceptorokon és az kimeneti rostokat szolgáltató dúcsejteken (ganglionsejtek) kívül háromféle interneuront tartalmaz: a bipoláris, a horizontális és az amakrin sejteket. A fenti öt sejtsztyály neuronjai minden gerinces retinában megtalálhatók, melyek sejtestjei, rostjai és az azok által kialakított szinapszisok jól elkülöníthető rétegeket alkotnak (Rodieck 1988). A retina neuronjai által létrehozott szinaptikus kapcsolatok túlnyomó része a két rostos rétegben (OPL és IPL) található. A szinaptikus kapcsolatok többsége az alábbiakban jellemzésre kerülő négy szinapszis típus valamelyikébe sorolható. Mindkét rostos réteg bemeneti sejtjei (OPL-ben a receptorok, IPL-ben a bipoláris sejtek) létrehozhatják a retinára igen jellemző, a preszinaptikus oldalon központi szalaggal (ribbon), valamint az e köré rendeződött vezikulákkal, rendelkező szalagszinapszist. A külső rostos rétegben a szalagszinapszis a receptorsejtek terminálisának egy betűrődésében (invagináció) foglal helyet, viszont a bipoláris sejtek végződéseinél invaginációk nincsenek. A két réteg ribbon szinapszisei a posztzinaptikus struktúrák számában is különböznek. Az emlősök retinájában a fotoreceptorok három (triád), a bipolárisok két (diád) nyúlvánnyal tartanak kapcsolatot (Dowling és Boycott 1966). Az emlős retinában a dopaminerg neuronok (DA<sup>+</sup>;TH<sup>+</sup>) sejtestjei az amakrin sejtek rétegében, a belső rostos réteg (IPL) és a belső sejtes réteg (INL) határán találhatóak (3. ábra). A dopamintermelő amakrinsejtek sűrűsége a gerincesek retinájában ugyan alacsony (10-100/mm<sup>2</sup>) de nyúlványrendszerük rendkívül kiterjedt, nyúlványaik az IPL-ben sűrű rosthálózatot alkotnak, bizonyos fajokban (azokban az állatokban ahol a retina vastagsága miatt a dopamin diffúziója nem elegendő a külső retina dopaminellátásához; Dowling 1987) interplexiform nyúlvánnyal is rendelkeznek. A dopaminerg amakrinsejtek kétféle nyúlvánnyal rendelkeznek: (1) relatíve vastag és rövid dendritek, melyek arborizációja kb. 0,5 mm átmérőjű és az INL/IPL határán helyezkednek el; (2) számos finom axon melyek varikozitásokat viselnek és akár mm-ekkel a sejtesttől is szállíthatnak információt, az IPL minden rétegében előfordulnak, de leggyakrabban a stratum 3-ban és 5-ben figyelhetők meg. Mind a dopamin, mind a szintézisének fő enzime a tirozin-hidroxiláz (TH<sup>+</sup>) megtalálható (kimutatható) a sejtestekben, az axonokban, a dendritekben és a terminálisokban is (Dacey 1990). A dopaminerg neuronok feltehetőleg többféle bipoláris sejttől is kapnak bemenetet és jól körülírt szinapszisokat adnak az AII-es és az A17-es amakrinsejtek felé melyek mind a pácika útvonalhoz tartoznak (Witkovsky 2004; Famiglietti és Kolb 1975; Bloomfield és Dacheux 2001). A TH<sup>+</sup> dendritek melyek az AII-es sejteket innerválják gyűrűszerű struktúrákat hoznak létre az AII-es sejtestek körül az IPL 1. rétegében patkány (5. ábra), macska és nyúl retinában (Mariani és Hokoc 1988; Dacey 1989; Tauchi et al. 1990; Wang et al. 1990; Casini és Breca 1992 a,b; Famiglietti 1992 a,b,c; Crooks és Kolb 1992, Kolb 1990; Völgyi és mtsai 2001; Völgyi és Bloomfield 2002; Zhang és mtsai 2004). Bebizonyosodott az is, hogy noha a gyűrűket formáló rostok egy része dendrit, axonok is részt vesznek azok kialakításában (Witkovsky 2004; Witkovsky et al. 2005). Mivel a fent említett két DAerg neuron populáció a retina kizárólagos dopamin forrásának tekinthető igen fontos ezen sejtek be- és kimeneteinek feltérképezése. Ez segítheti a dopaminnal összefüggésbe hozható retinális adaptációs és patológiás folyamatok pontosabb megértését.

## Célkitűzés

A bevezetőben foglaltak alapján látható, hogy a dopamin igen sokrétű szabályozó szerepet tölt be a központi idegrendszerben. A retinában volumen transzmisszióval szabadul fel és diffúzióval jut el a célsejtekhez, ennek megfelelően hatása elsősorban nem struktúra, hanem receptor specifikus. Munkámban a korábban leírt AII specifikus dopaminerg kapcsolatrendszer további vizsgálatát tartottuk szükségesnek az alábbi célkitűzésekkel:

1. Annak vizsgálata, hogy a TH<sup>+</sup> rostgyűrűk mennyire specifikus kapcsolati felszínek az AII-es amakrinsejtek esetében? Találhatók-e az AII sejteken más (nem szomatikus) támadási pontja is a TH<sup>+</sup> rostoknak?
2. Annak vizsgálata, hogy a TH<sup>+</sup> rostgyűrűk valóban specifikusan a belső retina AII populációját célozzák-e meg?
3. Annak vizsgálata, hogy a rostgyűrűk valóban specializált szinaptikus felszínekként szerepelnek-e?

## **Anyagok és módszerek**

### ***Állatok és preparálás***

Kísérleteinkben felnőtt albinó New Zealand nyulakat (*Oryctolagus cuniculus*, n=6), Wistar patkányokat (*Rattus norvegicus*, n=14) és C57BL6 egereket (*Mus musculus*, n=30) használtunk fel. A kísérletek során törekedtünk az állatok számára okozott fájdalom és stressz minimalizálására. A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága (BA02/2000-6/2006) hagyta jóvá, az állatok tartása és kezelése megfelelt az "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" feltételeinek. A nyulak és patkányok az Országos Radiobiológiai és Radiohigiéniai Intézetből származtak, az egerek részben ugyancsak innen, részben pedig a PTE Szentágotthai Kutatóközpont állatházából. Az állatok egészségesek voltak, korábbi kísérletekben nem használták őket (Etikai engedélyszám:PEI/001/2073-6/2014). Az állatok altatása intravénás ketamine-xylozine (10 mg/kg-1 mg/kg) injekcióval történt, majd intrakardiális T-61 (Bayer Hungária Kft., Budapest, Mo.) adagolással végzett eutanáziára került sor. Az eutanáziát követően az állatok szemeit eltávolítottuk és 25°C-os oxigenizált PBS-be helyeztük. A sclerat az ora serrata mentén körbevágtuk majd a szemlecsét és az üvegtestet óvatosan eltávolítottuk. Ezután a szemszerleget 1 vagy 2 óráig szobahőmérsékleten fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel (0,1 M foszfát-pufferben oldva; pH 7,4).

### ***Neurobiotin feltöltés***

A Neurobiotin (NB) feltöltéshez az egereken a fent leírt módon végrehajtott eutanázia után a teljes szemet eltávolítottuk úgy, hogy a látóideg egy rövid (2-3 mm) darabkája épen maradjon. A látóidegcsonk végéből a roncsolódott részt (ha volt ilyen) levágtuk, majd a szemet egy 10 µL 4%-os NB-t (0,1 M PBS-ben oldva) tartalmazó edénybe helyeztük úgy, hogy a látóidegcsonk a NB cseppbe érjen. Az egész edényt ezután oxigenizált és párasított kamrába helyeztük 15 percre. Ezután a szemekből a retinákat eltávolítottuk és 1 órát oxigenizált Ringer oldatban regeneráltattuk. Ezt követően az immunhisztokémiánál leírt protokoll szerint fixáltuk a mintákat majd primer anti-TH antitesttel (anti-TH, 1:1000; egér monoklonális, MAB318; Merck Millipore Kft. Budapest) jelöltük, valamint a NB jelölés feltárására Streptavidin-Cy3-t (Life Technologies Kft. Budapest) használtunk. A preparátumokat ezután fent leírt módon fedtük és tároltuk.

### ***Immunhisztokémia***

A fixálást és a PBS-es (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) mosást követően a retinákat a szemszerlegekből eltávolítottuk és 15%-os majd 30%-os szacharóz oldattal gátoltuk a kristályképződést (krioprotektáltuk), egy éjszakán át (overnight; ON). Ezt követően folyékony nitrogénben 3 fagyasztás-olvasztás ciklust alkalmaztunk, majd a retinákat PBST-BSA (PBS+0,5% Triton-X [Sigma]+0,5% BSA [Sigma]) oldatban blokkoltuk 2 órán át. Ezután a primer antitestekkel 0,5% Triton-X és 0,5% BSA tartalmú oldatban 72 órán át 4°C-fokon inkubáltuk. A felhasznált primer antitestek a következők voltak: anti-TH (1:1000; egér monoklonális, MAB318; Merck Millipore Kft. Budapest), anti-calretinin (CaR) (1:2000, PA5-34688, nyúl poliklonális, Life Technologies Kft. Budapest), parvalbumin (PV)(1:1000, kecske poliklonális, PVG 213; SWANT, Bellizona Svájc), anti-vGAT (1:1000, tengerimalac poliklonális, Synaptic Systems, Németország), anti-GABAAR $\alpha$ 1 (1:1000, ab33299, AbcamCambri9dge, Egyesült Királyság). Ezt követően a mintákat 0,5% Triton-X tartalmú PBS-ben (PBST) egy napon át intenzíven mostuk, majd a primer antitestekhez hasonlóan a

szekunder antitestekkel ON inkubáltuk. A felhasznált szekunder antitestek a következők voltak: Alexa-488-cal konjugált szamár anti-egér IgG (1:1000, Life Technologies Kft. Budapest), Cy5-val konjugált szamár anti-nyúl IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Egyesült Királyság), Alexa-555-tel konjugált szamár anti-kecske IgG (1:1000, Life Technologies Kft. Budapest), Alexa-647-tel konjugált anti-tengerimalac IgG (1:1000, Life Technologies Kft. Budapest) Alexa-488-cal konjugált kecske anti-nyúl IgG (1:1000, Life Technologies Kft. Budapest), Alexa-568-cal konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000, Life Technologies Kft. Budapest) Alexa-594-gyel konjugált kecske anti-egér IgG (1:1000, Life Technologies Kft. Budapest). Az inkubálás után a mintákat PBST-ben egy napig mostuk, majd tárgylemezre húztuk és AquaPolymount (Polysciences Europe, Eppelheim, Németország) fedőanyaggal lefedtük.

### ***PI jelölés***

A retinákat az immunhisztokémiai jelöléseket követően propidium-jodiddal (PI; 2 $\mu$ L/mL PBS-ben oldva; Sigma-Aldrich, Budapest) kezeltük 1 órán át sejttest jelölés céljából, majd PBS+0,5% Triton-X mostuk 2 órán át. A mintákat ezt követően a fent leírtak szerint fedtük.

### ***Mikroszkópia és képfeldolgozás***

Az immunhisztokémiai jelek detektálását LSM 710 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Németország) végeztük; a szekunder antitestek gerjesztésére 488 nm-es argon lézert és az 594 nm-es és 633 nm-es Hélium/Neon, lézert használtunk. A gerjesztéshez és detektáláshoz a szoftverben (ZEN, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Németország) gyárilag beállított hullámhossz tartományokat használtuk. A felvételeknél Zeiss Plan Achromat 63x/1.4 olaj-immersiós objektívet használtunk. Az utómunkálatok során a fotók kontrasztjának és fényerejének beállítására az Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc. San Diego, CA, USA) és ImageJ (NIH) programokat alkalmaztuk és csak globálisan állítottunk a fenti tényezőkön. Ábráink vonalrajzai Adobe Illustrator CS3 programmal készültek. A 3D rekonstrukciós képek elkészítéséhez Imaris 8 szoftvercsomagot (Bitplane, Oxford Instruments Company, Zürich, Svájc) használtunk. Ezeknek a képeknek a készítésekor a z-stackeket az Imaris „Spots, Segmentation and Interaction” alkalmazásának segítségével dolgoztuk fel, detektáltuk a jelölt amakrinsejt testeket majd ezeket gömbökké transzformáltuk. Következő lépésben a „Surfaces, Segmentation and Interaction” funkciót használva detektáltuk és jelenítettük meg a szoftverrel a TH+ amakrinsejtek teljes szomato-dendritikus architektúráját a megfelelő tartományban.

### ***Statisztikai analízis***

A morfometriai méréseket és a kvalitatív vizsgálatokhoz szükséges számolásokat a NIH Image J szoftverben végeztük. Az adatok statisztikai analíziséhez vagy Origin 6 (Microcal Origin 6.0; Northhampton, USA) vagy SPSS 19 szoftvereket használtunk. A szignifikancia szintek meghatározására egytényezős ANOVA analízist (SPSS v19; SPSS Inc., IBM), ezen Bonferroni, Gabriel és Tukey post-hoc tesztekkel végeztünk (Field, 2013), néhány esetben Student-féle t-próbát használtunk (az ábrák feliratában jelölve). A statisztikai eredmények diagramjait ugyancsak az Origin 6 szoftverrel készítettük.

## Eredmények

A dopamin igen sokrétű szabályozó szerepet tölt be a központi idegrendszerben. Általában volumen transzmisszióval szabadul fel és diffúzióval jut el a célsejteken található receptoraihoz. Ennek megfelelően az emlős retina esetében korábban leírt és általánosan elfogadott speciális kapcsolat a dopaminerg és az AII amakrin sejtek között különlegesnek számított. Emiatt ennek a kapcsolatrendszernek a felülvizsgálatát szükségesnek tartottuk.

Vizsgálataink során az alábbi főbb megfigyeléseket tettük:

1. Az AII-es amakrinsejtek TH+ innervációja erősen kompartment specifikus.
2. Az TH+ rostok eddig ismert támadási pontján (IPL 1. alréteg) kívül még egy főbb támadási pontot azonosítottunk az IPL 3. alrétegében.
3. Igazoltuk TH+ rostgyűrűk jelenlétét nem-AII-es amakrinsejtek sejttestjei körül is patkány illetve egér retinában.
4. A TH+ gyűrűkön végzett morfológiai analízissel megmutattuk, hogy a TH+ rostgyűrűk amakrinsejtek heterogén csoportjai körül figyelhetőek meg.
5. Igazoltuk, hogy a TH+ rostgyűrűk szinte valamennyi olyan sejttest körül kialakulnak az egér retinában, melyeknek a bazális része az IPL állományába nyúlik.
6. Bizonyítottuk, hogy a TH+ gyűrűk területén a dopaminerg amakrin sejtek feltehetőleg nem alakítanak ki fiziológiai szempontból jelentős számú GABAerg szinapszist nem-AII sejttestekkel.

A fentiek alapján elmondható, hogy a korábban sokat vizsgált dopaminerg amakrin sejt/AII amakrinsejt axoszomatikus kapcsolat specifikitása több szempontból is kérdéses: (i) hasonló axo-szomatikus TH+ rostgyűrűk kialakulnak más, nem-AII amakrin sejtek sejttestjei körül is, (ii) a rostgyűrűk területe valószínűleg nem különbözik az egyéb TH+ rostfelületektől GABA felszabadítás tekintetében, tehát nem specifikus kapcsolati struktúrák helyei és (iii) még az AII sejtek esetében sem speciális a kapcsolat, mivel a TH+ rostok egy második AII támadási ponttal is rendelkeznek az IPL 3 alrétegben. Összefoglalásként feltételezzük, hogy a vizsgált kapcsolatrendszer jelentős mértékben megfelel a dopaminerg szignalizáció esetén az idegrendszer más területeinél megfigyelt általános, generális szignalizációs mechanizmusnak.

## Publikációs jegyzék

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

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

IF:3,842

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

IF: 3.327

Az értekezéshez kapcsolódó konferencia közlemények:

Debertain G, Kántor O, Kovács-Öller T, Balogh L, Szabó-Meleg E, Orbán J, Nyitrai M, Völgyi B. Three Main Strategies Utilized by Tyrosine Hydroxylase Positive Amacrine Cells to Target Postsynaptic Neuronal Partner in the Mammalian Retina. FENS Regional Meeting, September 20-23, 2017, Pécs, Hungary

Debertain Gábor, Dopamintermelő amakrin sejtek az emlős retinában. IX. International and XV: National Grastyán and Szentágothai Conference 2016 October 27-28. Pécs, Hungary

Debertain Gábor, Kántor Orsolya, Kovács-Öller Tamás, Balogh Lajos, Szabó-Meleg Edina, Nyitrai Miklós, Völgyi Béla. Three main strategies utilized by tyrosine hydroxylase positive amacrine cells to target postsynaptic neuronal partners in the mammalian retina. IBRO Workshop January 21-22, 2016, Budapest, Hungary

Debertain Gábor, Kántor Orsolya, Balogh Lajos, Szabó-Meleg Edina, Nyitrai Miklós, Völgyi Béla (2015) Tyrosine hydroxylase positive perisomatic rings are action sites for both dopamine and GABA target mixed population of amacrine cells. European Retina Meeting. October 1-3 2015, Brighton, UK.

Deberin G. Nem klasszikus dopaminerg dendritikus gyűrűk az emlős retinában. PTE Idegtudományi Centrum és Szentágothai János Phd és TDK Konferencia 2014 nov. 13-14. Pécs.

Debertain G, Kovács-Öller T, Popovich E, Orbán J, Nyitrai M, Völgyi B. Dopaminergic amacrine cell dendrites form presynaptic rings around somata of various inner retinal interneurons in the mammalian retina. III. Interdiszciplináris Doktorand Konferencia 2014. April 15-17, Pécs, Hungary.

Egyéb tudományos közlemények:

Kovács-Öller T, Debertain G, Balogh M, Ganczer A, Orbán J, Nyitrai M, Balogh L, Kántor O, Völgyi B. (2017) Connexin36 Expression in the Mammalian Retina: A Multiple-Species Comparison. *Front. Cell. Neurosci.* 11:65, IF:4,555\*\*

Ganczer A, Balogh M, Albert L, Debertain G, Kovács-Öller T, Völgyi B. (2017) Transiency of retinal ganglion cell action potential responses determined by PSTH time constant. *Plos One* 12;12(9)

IF:2,806\*\*

Egyéb konferencia közlemények:

Gábor Debertain, Orsolya Kántor, György Sétáló Jr., Edina Szabó-Meleg, Miklós Nyitrai, Gábor Szabó, Ferenc Erdélyi, Béla Völgyi, Parvalbumin-GFP Mice Can Be Utilized to Perform Type Specific Connexin36 Dendritic Arbor Mapping of Large Field Ganglion Cells. European Retina Meeting, October 5-7, 2017, Paris, France

Debertin G, Kovács-Öller T, Balogh M, Popovich E, Orbán J, Lukáts Á, Énzsöly A, Balogh L, Kántor O, Völgyi B. Multiple species comparison of the gap junction forming Connexin36 in the mammalian retina. 1st Innovation in Science – Doctoral Student Conference. 2014 May 2-3, Szeged, Hungary.

Balogh M, Kovács-Öller T, Debertin G, Völgyi B (2014): Observation of the correlated ganglion cell activity in the mouse retina by using Ca<sup>++</sup> imaging. IBRO Workshop 2014 and XV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society. January 16-17 2014, Debrecen, Hungary; P105 (2014).

Atlasz T, Balogh M, Werling D, Zhang Y, Reglődi D, Bloomfield SA, Debertin G, Völgyi B (2014) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Prevents Monosodium Glutamate (MSG) Induced Functional Disturbances in the Mouse Retina. IBRO Workshop 2014 and XV. Conference of the Hungarian Neuroscience Society. January 16-17 2014, Debrecen, Hungary; P149 (2014).

Márton Balogh, Tamás Kovács-Öller, Gábor Debertin, Béla Völgyi (2013): Detection of correlated ganglion cell activity in the mammalian retina by using

Ca<sup>2+</sup>- imaging techniques. . Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia Pécs 2013. nov. 4-5. (poster)

Steib A., Somogyi I., Molnár L., Pollák E., Gunszt D., Horváth B., Rumpler É., Debertin G. (2013): PACAP-szerű fehérjék hatása az Eisenia fetida agyregenerációjára. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia Pécs 2013. máj. 18-21.

Gunszt Dóra, Somogyi Ildikó, Joó Tamás, Vecsei Máté János, Debertin Gábor, Pollák Edit, Molnár László (2010): Normal and pathological regeneration of the ventral nerve cord ganglia in the earthworm Eisenia fetida. Magyar Mikroszkópos Konferencia, Siófok, Magyarország

Tudomány-metria adatok

Összesített impakt faktor: 14,53

Idézők:17

Ebből független:14