

Dr. Lukáts Ákos OTKA zárójelentés

Emlősökben a csap opszinok eltérő aminosav összetétele alapján három csaptípust különböztetünk meg, amelyek a szindiszkriminációban játszanak szerepet. A rövidhullám érzékeny, ún. S-csapok elnyelési maximuma a kék (néhány esetben az UV) tartományba esik; a közepes hullámhosszra érzékeny M-csapokat a zöld, míg a hosszúhullámú fényre érzékeny L-csapokat a vörös fény ingerli leginkább.

A retinák többségét a pálcikák dominálják, a csapok mindössze 1-14 százalékban mutathatók ki. A kutatások kiderítették azt is, hogy csak néhány főemlősre jellemző mindhárom csapféleség jelenléte, a trikromatikus színlátás. Az emlősök többségénél csak kétféle csapot találunk (dikromácia), amelyek közül az egyik a rövid hullámhosszakra (S-csap), míg a másik általában zöld, vagy néhány esetben a vörös fényre érzékeny. Ezt a második csappopulációt szokás M/L-csapnak is nevezni. Bár számos, az általános sémától eltérő retinális receptoreloszlást sikerült azonosítani, a legtöbb fajban minden csap csak egyféle fotopigmentet tartalmaz, és a különböző csaptípusok eloszlásában jellegzetes térbeli elrendeződés nem figyelhető meg. Ez azt jelenti, hogy nincsen olyan terület, ahonnan az egyik típus hiányozna, és a két altípus egymáshoz viszonyított aránya is relatíve állandó: kb. tízszer annyi M/L-, mint S-csapot találunk. (Összefoglalók a retinális csapok eloszlásáról: *Jacobs, 1993; Szél és mtsai., 2000; Lukáts és mtsai., 2005*)

Az elmúlt években az érdeklődés egyre inkább a retinális eloszlások vizsgálatáról a fejlődéstani folyamatok feltérképezése felé tolódott el. Hogyan differenciálódnak a fotoreceptorsejtek, milyen szabályozó faktorok vesznek részt a különböző csapmintázatok kialakításában? Ennek a pályázatnak a keretében megvalósuló kutatásokban is ezekre a kérdésekre próbáltunk választ kapni.

Régóta ismert, hogy néhány fajban (pl.: patkány, mókuscickány, ember), koexpressziót mutató csapok jelenhetnek meg a fejlődés folyamán (*átmeneti fotopigment koexpresszió- Szél és mtsai., 1994*). Ezek a duális csapok valószínűleg az M/L-csapok differenciálódásának egy átmeneti állapotát reprezentálják. Az ún. transzdzifferenciációs elmélet szerint minden csap először a kékérzékeny pigmentet kezdi termelni, és néhányan a felnőttkorig csak ennek a szintézisére képesek (10% patkányban), ezek alkotják a definitív kékérzékeny csapok populációját. A csapok többségében azonban beindul az M/L-pigment termelése is - ezeket látjuk kettősen jelölt elemekként -, majd az S-pigment termelése fokozatosan leáll. Az M/L-csapok tehát az S-csapokból fejlődnek ki, transzdzifferenciálódással. Felnőttkorban, amikor a csap opszinválasztás befejeződött, a retina egyetlen duális csapot sem tartalmaz. Ha feltételezzük, hogy minden M/L-csap transzdzifferenciációval fejlődik, valószínűleg léteznek olyan faktorok is, amelyek ezt a pigmentváltást szabályozzák. A nemzetközi irodalom, és saját kutatásaink nagyon sok ilyen faktor szerepét felvetik. Az M/L-csapok fejlődésében szerepe lehet a pajzsmirigyhormonoknak (*Ng és mtsai., 2001*), a retinolsavnak (*McCaffery és mtsai., 1993, 1999*), növekedési faktoroknak és receptorainak (*TrkB - Szabó és mtsai., 2004*), kevés esetben sikerült azonban szerepüket biztosan meghatározni, illetve bizonyítani.

Kutatásainkban ezért azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy szisztematikusan megvizsgáljuk a bizonyított, vagy feltételezett szabályozó mechanizmusokat. Különös tekintettel egyes hormonok és növekedési faktorok szerepét tanulmányoztuk. Mely faktorok, a fejlődés melyik fázisában hatva vesznek részt a színspecifikus csapok fejlődésében? Milyen receptorokon keresztül, direkt vagy áttételes hatásmechanizmussal fejtik-e ki hatásaikat. Meddig tart a csapfejlődés? Lehet-e felnőtt állatfajok retinájából is differenciálódásra képes sejteket izolálni?

A legtöbb, vizsgálni kívánt faktor szerepe *in vivo* retinafejlődés tanulmányozása során vetődött fel (a TrkB expressziója például az M/L-opzsin megjelenésével egyszerre detektálható), ez a módszer a hatásmechanizmus meghatározására azonban nem megfelelő.

Kétféle megközelítés tűnik hasznosnak a csapfejlődés regulációjának vizsgálatában: a transzgenikus állatok, illetve a retinális szövettenyésztés. A knock out technológiával különböző géneket lehet szelektíven blokkolni, így hatásaik vizsgálhatóak. Az eddigi egyetlen, az M/L-csapok fejlődésében biztosan szerepet játszó faktort, a pajzsmirigyhormont, pontosabban annak $\beta 2$ receptorát is ezzel a módszerrel azonosították. (A receptor hiányában az M/L-pigment termelése nem indul be, az összes csap megreked korábbi, csak S-pigmentet tartalmazó stádiumban.- *Ng és mtsai., 2001*). A

technika vitathatatlan előnyei mellett komoly problémát jelentenek a költségek, az esetleges extraretinális hatások és a kísérleti állatok faja. Az egér retinájának fotoreceptoreloszlása ugyanis jellegzetes dorso-ventralis osztottságot mutat, a csapok többsége mindkét pigmentet egyszerre termeli, különböző retinális pozíciókban az egyik, illetve a másik opszin expressziója dominál, ami hihetetlenül megnehezítheti az eredmények értékelését (*Röhlich és mtsai., 1994; Applebury és mtsai., 2000*).

Kutatásainkban ezért mi egy organotipikus retinakultúrán alapuló modellt fejlesztettünk tovább, és adaptáltuk több eltérő retinális csapeloszlással rendelkező rágsálófajra. A módszer már a nyolcvanas évek óta ismert, de használatát sokáig korlátozta a tápoldatok nem megfelelő összetétele. A rágsálókból az első néhány postnatalis napon sterilen kiemelt, és membránra kiültetett retina túlél ugyan, növekedésnek is indult, de az M/L-csapok ebben a rendszerben nem fejlődtek ki (*Söderpalm és mtsai., 1994; Wikler és mtsai., 1996*). A tápoldat összetételének folyamatos fejlesztésével azonban néhány év óta már mód van arra is, hogy a tenyészeteket akár két-négy héten át is életben tartsuk, és a fotoreceptorok teljes differenciálódása végbe menjen (*Pinzón-Duarte és mtsai., 2000, Szabó és mtsai., 2003*). A legtöbbször, munkacsoportunk is, a kereskedelmi forgalomban kapható mediumokat (pl.: DMEM/F12; 1:1) különböző recept alapján szérummal (FCS), aminosavakkal, fehérjékkel, cukrokkal, vitaminokkal és hormonokkal egészítik ki.

A membran culture eljárás során általában a teljes retina kerül kiültetésre egy szemiporozus membránra. A membránon fekvő szövet a tápoldat-levegő határfelületen helyezkedik el, a membrán szintje alatt a tápoldat, felette levegő található. A rendszer előnye, hogy mind a táplálás, mind az oxigenizálás folyamatos. A retina kiültethető a fotoreceptorokat borító pigmenthámmal együtt, vagy nélküle is. Egy korábbi tanulmány szerint a pigment epithelium hiánya nem befolyásolja sem a sejtdifferenciációt (opszin expresszió), sem a szinaptogenezist, sem pedig a retina belső rétegződését, hiányában azonban a fotoreceptorok külső szegmentumai nem fejlődnek ki és a membrana limitans externa fejlődése is zavart szenved (*Pinzón-Duarte és mtsai., 2000*). Bár technikailag nehezebb a retinát a pigmenthámmal együtt kiperparálni, morfológiailag sokkal jobb eredmények érhetők el ezzel a módszerrel (valódi kultag fejlődik ki, sokkal kevesebb degenerálódó, rozettás terület), ezért tenyésztéseink nagy részében a kiültetést pigmenthámmal együtt végeztük.

A technikát már évekkel ezelőtt sikerült meghonosítani, mikoris bebizonyosodott, hogy az első néhány postnatalis napban kiemelt patkány retina jól fejlődik az általunk használt médiumban, a kísérleti felállás tehát használható a fotoreceptorok fejlődésének vizsgálatában. A módszer legfontosabb előnye, a mesterséges környezet teljes kontrolljának lehetősége. A szérum nélkül tenyésztett retinában a használt médium összetevői jól ismertek, koncentrációjuk tetszés szerint, akár naponta, ha szükséges még gyakrabban változtatható, tehát elméletben a vizsgált faktorok szerepe, a hatástartam ideje pontosan meghatározható. Szérummal végzett tenyésztés esetén a médium összetétele teljes pontossággal már nem határozható meg, de ez a közeg a retinafejlődés és életben tartás számára jobb feltételeket biztosít, ezért mindkét módszert alkalmaztuk, törekedve arra, hogy a szérumot, kiváltsuk.

A tenyésztés másik nagy előnye a transzgenikus állatokkal szemben, hogy a faktorok esetleges extraretinális hatásai ebben a rendszerben biztosan nem befolyásolják a fotoreceptorok fejlődését. Komplexebb rendszerben, különösen az olyan több ponton ható hormonnál, mint a pajzsmirigyhormon, a metabolikus és a központi idegrendszeri hatások is befolyásolhatják az eredményeket.

Kísérleteinket eredetileg pigmentált Brown Norway patkányokon folytattuk, majd később kiterjesztettük a könnyebben hozzáférhető albínó Sprague-Dawley patkányokra illetve két olyan új fajra is (szíriai aranyhőrcsög és szibériai törpehőrcsög), amelyek fotoreceptoreloszlásuk alapján alkalmasabb modellnek tűnnek az M/L-csapok fejlődésének vizsgálatában. Mindkét általunk vizsgált hőrcsögfaj retinája különleges csapelrendeződést mutat. Mindössze egy csappopulációt lehet azonosítani, amely felnőtt szíriai hőrcsögben csak a zöld- (*Calderone és Jacobs, 1999*), szibériai törpehőrcsögben viszont egyszerre mind a zöld- mind a kékérzékeny pigmentet termeli (*Lukáts és mtsai., 2002*), így mintegy megrekedni látszik az M/L-csapok differenciálódásának korai stádiumában. Miután a definitív kékérzékeny csapok egyik fajban sincsenek jelen, ezekben a homológ csappopulációjú retinákban (anatómiailag izolált M/L-csapok) sokkal egyszerűbb a feltételezett szabályozó anyagok pontos hatását azonosítani.

A különböző módosított médiumokban tenyésztett retinákat a második hét végén fixáltuk, majd teljes retinán, illetve fagyasztott és félvékony metszeteken morfológiai és immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk, amivel a fotopigmenteket, a fotoreceptorsejteket, egyes esetekben más sejtípusokat, a apoptotikus és a proliferáló sejteket is azonosítottuk. Kontrollként azonos korú in vivo fejlődő-, vagy kontroll (teljes differenciálódást biztosító) médiumban tenyésztett retinákat használunk. Az immuncitokémiai módszerek mellett az in vivo illetve in vitro fejlődött retinákon RT-PCR módszerrel is azonosítottuk a megfelelő pigment fehérjék mRNS-ét. Kifejlesztettünk egy in situ hibridizáción alapuló detektálási eljárást is, mind patkányban mind szíriai aranyhörcsögben.

Fontosabb eredményeink.

A vizsgált fajok in vivo retinafejlődése

Mindkét hörcsögfaj in vivo fotoreceptorfejlődését már megvizsgáltuk. Előzetes feltevéseink alapján azt vártuk, hogy mindkét fajban a kékérzékeny pigment expressziója indul be először, ezt követné a zöldérzékeny pigment termelése. Szibériai hörcsögben azután mindkét pigment expresszálódna tovább felnőtt egyedekben is, szíriai hörcsögben ellenben a kékérzékeny pigment termelése leállna a fejlődés későbbi stádiumaiban. Amikor immuncitokémiai módszerekkel próbáltuk ellenőrizni ezt az elméletet a szibériai hörcsögben a pigment altípusok megjelenése mindenben követte a felvázolt sémát, ugyanakkor szíriai aranyhörcsögben egyetlen korban sem sikerült a kékérzékeny pigment expresszióját kimutatni (*Halász és mtasi.,2004; Halász és mtasi., előkészületben*).

RT-PCR primerek és in situ hibridizációs próbák készítése.

Fejlődéstani vizsgálatoknál mindig különlegesen fontos a vizsgált elemek minél korábbi biztos azonosítása. Eddig laborunkban a fotoreceptorsejtek azonosítására csak immuncitokémiai módszerek álltak rendelkezésre. A pályázat során az egyik legfontosabb megoldandó technikai feladat a jól működő PCR primerek és in situ próbák kifejlesztése volt. Hatféle RT-PCR primerpárt terveztünk. Az M/L-opszin azonosítására alkalmas primerek közül az egyik szíriai aranyhörcsögben, a másik patkányban, a harmadik mindkét vizsgált fajban működik. A primereket leteszteltük, specifitásukat bizonyítottuk. S-opszin specifikus primert szintén háromfélet készítettünk. Egy patkányban, egy szíriai aranyhörcsögben, egy pedig mindkét fajban működik, specifikusan.

Patkányban az S-opszin mRNS már embrionális korban is kimutatható, míg az M/L-opszin termelése legkorábban a 4. posztnatális napon volt detektálható, messze megelőzve az immuncitokémiai kimutathatóságot (7-10. nap). Tehát az M/L-csapok elköteleződése már a 4. nap előtt végbemegy.

Szíriai aranyhörcsögben mindkét opszin termelése hamarabb indul be mint patkányban. Az S-opszin mRNS itt is embrionális kortól, míg az M/L-opszin esetében már újszülött kortól kimutatható. Az S-opszint detektáló primerek tervezésénél, és az eredmények értékelésénél figyelembe kellett venni, hogy a szíriai hörcsögben az opszin génjében található deletio miatt a keletkezett mRNS rövidebb, és irodalmi adatok szerint a rendkívül gyorsan degradálódik, a produktum, a pigment nem is készül el kimutatható mennyiségben (*Glössmann, személyes közlés, Williams és Jacobs, 2008*). Az irodalmi adtok birtokában terveztük meg a primert az mRNS azonosítására, amely a fejlődés során, sőt, felnőtt állatban is mindvégig pozitív jelet adott. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a két hörcsögfaj a pigment mRNS termelés tekintetében identikusnak tekinthető. Mindkettőben életük végéig átíródik mind az M/L- mind az S-opszin mRNS, de az S-pigment maga, csak a szibériai hörcsögben mutatható ki immuncitokémiai módszerekkel.

In situ hibridizációs próbákat is készítettünk mindkét fent említett fajban (patkány és aranyhörcsög) mind a kétféle opszintermelés kimutatására.

Szíriai törpehörcsögben, megfelelő irodalmi adatok hiányában, nem tudtunk sem primereket, sem in situ próbákat készíteni.

Az in vitro organotipikus retinatenyésztés mindhárom vizsgált faj esetében használható.

Ha az 1-4. napon kiültetett retinákat az eredeti kontrol tápoldatban tenyésztettük, szérum hozzáadása mellett (10% FCS), mindhárom vizsgált faj retinafejlődése az in vivo állapothoz hasonlóan ment végbe. A 14. postnatalis napon fixált tenyészetekben megjelent az M/L-opszin expressziója, amelyet mind poly-, mind monoklonális ellenanyaggal és az aranyhörcsög illetve a patkány esetében PCR reakcióval is bizonyítottunk. A tenyészetek rétegzettsége megtartott volt, és bár a retina vastagsága (különösen a belső magvas- és a ganglionsejtréteg vastagsága) csökkent, a vizsgált, nem fotoreceptor típusú sejtek arányában és morfológiájában nem mutatkozott jelentős eltérést az in vivo retinákhoz viszonyítva. A retina fejlődése tehát mind morfológiailag mind immuncitokémiailag végbement, tehát az általunk meghonosított rendszer alkalmas a fejlődésre ható faktorok tesztelésére.

Az M/L-csapok elköteleződése a 4. postnatalis nap előtt végbemegy.

Amennyiben a retinákat a 4. nap után ültettük ki, akkor a tápoldat összetételétől függetlenül végbement az M/L-csapok teljes kifejlődése. A különböző médiumok között csak mennyiségi, és nem minőségi jellegű különbségeket detektálhattunk. Minél közelebb állt a táp a kontrol oldathoz, illetve minél később történt a kiültetés, annál szebb volt a tenyészetek morfológiája, és annál több M/L-csap volt megfigyelhető. Tehát az M/L-opszin gén „bekapcsolása” már a 4. nap előtt megtörténik. Ezt támasztják alá PCR eredményeink is, mely szerint patkányban először a 4. napon detektálható M/L-opszin mRNS. Érdekes módon szíriai aranyhörcsögben a géntermék sokkal hamarabb, már a születéskor kimutatható, ennek ellenére itt is csak a 3-4. naptól független a tenyésztés eredménye a használt tápoldattól. Ez utóbbi adat pontos magyarázata még várat magára.

A szérum egyedül tartalmazza az M/L-csapok kialakulásához szükséges összes komponenst.

Ha az 0-3. napon kiültetett tenyészeteket 10% szérumot (FCS) tartalmazó tápban neveltük, akkor az M/L-opszin expressziója mindenképpen megjelent, függetlenül a táp más általunk vizsgált összetevőitől. Ezek szerint tehát a szérum minden olyan komponenst tartalmazott elegendő mennyiségben, amely a csapok fejlődéséhez szükséges. HPLC vizsgálatokkal ellenőriztük, hogy a szérum biztosan tartalmazza mind az általunk vizsgált pajzsmirigyhormont, mind az E-vitamint, de feltételezhetően sok más, egyelőre azonosíthatatlan összetevőt is (növekedési faktorok, hormonok?). Ahhoz hogy a táp összetételét, és koncentrációjukat pontosan ismerjük, a szérumot tehát ki kell hagynunk a médiumból.

A pajzsmirigyhormon szükséges és elégséges feltétele az M/L-opszin expresszió bekapcsolásának patkányban.

Irodalmi adatokból ismert a pajzsmirigyhormonok szerepe az M/L-csapok fejlődésében – egérben - elsősorban $\beta 2$ receptorának közvetítésével. Knock out egereken végzett vizsgálatok alapján az első néhány postnatalis napban az RXR γ retinolsav receptorral dimert alkotva elnyomja az S-opszin termelését, az 5-7. nap környékén $\beta 2/\beta 2$ dimerként pedig beindítja az M/L opszin szintézisét. Az egér retina fotoreceptor eloszlása azonban meglehetősen eltér a többi emlőstől, jellegzetes dorso-ventralis osztottságot mutat. A csapok többsége mindkét pigmentet egyszerre termeli, különböző retinális pozíciókban az egyik, illetve a másik opszin expressziója dominál, ami hihetetlenül megnehezítheti az eredmények értékelését (Röhlich és mtsai., 1994; Applebury és mtsai., 2000). Az is kérdéses, hogy egy ilyen speciális fajon tett megfigyelés mennyire általánosítható, vonatkozik-e ez a többi emlősre is. Ennek vizsgálatára 0-4. napos korban kiültetett patkány retinákat vizsgáltunk, amelyeket pajzsmirigyhormon tartalmú, illetve mentes tápoldatban tenyésztettünk. Ha az oldat tartalmazott pajzsmirigyhormont, az M/L-opszin expresszió kimutatható volt, ha nem, elmaradt. Az oldat többi vizsgált komponensének nem volt számottevő hatása a csapfejlődésre. A táp átlagos T3 koncentrációja 2ng/ml volt. Valószínűleg ennél a mennyiségnél jóval kevesebb is hatásos, hiszen a csak szérumot, de külön hozzáadott pajzsmirigyhormont nem tartalmazó tápban, ahol a koncentráció az átlagos T3 koncentráció mindössze 10 %-a (HPLC), is kifejlődtek az M/L-csapok. Használtunk az átlagosnál sokkal töményebb (max 18x) koncentrációkat is, ennek azonban nem volt számottevő pozitív hatása, sőt, magas koncentrációknál toxicitásra utaló morfológiai jelek voltak megfigyelhetők. A hormon szerepe nem volt kimutatható a 4. nap után végzett kiültetések esetében. Eredményeink tehát

bizonyítják, hogy patkányban, csakúgy, mint egérben, a pajzsmirigyhormon szükséges és elégséges az M/L-opszin expressziójának beindításához.

A pajzsmirigyhormon szükséges, de nem elégséges az M/L-opszin expresszió bekapcsolásához aranyhörcsögben – E-vitamin hozzáadása elengedhetetlen.

Amennyiben szíriai aranyhörcsög retináit ültettük ki az első négy postnatalis napon, és azokat szérumentes környezetben tenyésztettük, M/L-opszin expresszió csak akkor volt megfigyelhető, ha a táp nemcsak pajzsmirigyhormont, hanem E-vitamint is tartalmazott megfelelő koncentrációban. A csak hormont tartalmazó tápban tartott retinákon mindössze egy-két M/L-csapot sikerült azonosítanunk, míg a hormont és vitamint tartalmazó oldatban növesztett retinákon nagy számban jelentek meg ezek az elemek. A csak E-vitamint tartalmazó táp nem volt elégséges: az ilyen oldatban tartott retinákról az M/L-csapok teljesen hiányoztak. Az E-vitamin hatása specifikusnak tűnik a csappopulációra. Hiánya esetén a retina morfológiája érdemben nem változik, csak az M/L-opszin expresszió hiányzik, és ezt a hatást nem lehet, még többszörös koncentrációban adott pajzsmirigyhormonnal sem, ellensúlyozni.

Bár az E-vitamin hatása aranyhörcsögben bizonyítottan tűnik, semmilyen hasonló szerepét sem sikerült kimutatnunk patkányban, az általunk vizsgált 0-4 napos időablakban. Mivel az aranyhörcsögben az opszin gének aktiválódása korábban megy végbe, mind patkányban, ezért valószínűtlen, de nem kizárható, hogy korábbi, esetleg embrionális korban végzett kiültetésekkel megfigyelhetünk majd valamilyen szabályozó szerepet a patkány csapjainak fejlődésében is.

Egyelőre nem sikerült megfejtenünk az E-vitamin hatásmechanizmusát sem. Bár több, elsősorban gyermekkori retinabetegségben rutinszerűen adják a betegeknek, pontos hatása azonban ismeretlen. Elsősorban, mint antioxidáns jöhet szóba, és ilyen szerepe lehet az általunk vizsgált in vitro rendszerekben is. Például feltételezhető, hogy a tenyészetekhez hozzáadott retinol / retinyl-acetát rendszerben a komponensek egymáshoz viszonyított arányát képes befolyásolni. Az sem kizárt azonban, hogy specifikus receptorhoz kötődve, - és nem mint antioxidáns - vesz részt az M/L-csapok fejlődésében.

Az itt felvetett kérdések megválaszolása mindenképpen további vizsgálatokat igényel.

Elsősorban beszerzési nehézségek miatt szibériai törpehörcsögön viszonylag kevés tenyésztést végeztünk szérumentes közegben, amelyek biztos következtetések levonására egyelőre nem alkalmasak. Miután, hasonlóan a szíriai aranyhörcsöghöz, ez a faj is élete végéig termeli minden csapjában mindkét opszim mRNS-ét, várhatóan csapfejlődésük is nagyon hasonlóan megy végbe.

Az erythropoietin és receptora szerepet játszhat a retina és a csapok fejlődésében.

Ma már általánosan elfogadott, hogy az erythropoietin nemcsak a vérképzésben fontos, hanem a központi idegrendszer több pontján, így a retinában is neuroprotectív és neurotrophicus szereppel bír. Szintén leírták, hogy mind a hormon, mind receptora megtalálható a felnőtt retinában. Nem találtunk azonban adatot a hormon retinafejlődés alatt betöltött szerepére, valamint termelésének szabályozására vonatkozóan – alább leírt kísérleteinkben ezeket vizsgáltuk. Amíg felnőttben a beltágok, a belső magvas-, a ganglionsejt, és mindkét plexiform rétegben kimutatható, addig fejlődés alatt expressziója jellegzetesen változik. Születés után először a ganglionsejtekben és a neuroblast réteg két szélén találtunk erősebb jelölést. A későbbi korokban kettős jelölésekkel világossá válik, hogy a jelölt sejtek a ganglion-, amakrín- és horizontális sejtek populációjába tartoznak. A fotoreceptorok is erősen jelölődtek. A morfológiai alapján feltételezzük, hogy a hormont lokálisan a ganglionsejtek termelik (cytoplasmaticus jelölés), célsejtjeik pedig a fotoreceptorok, horizontális- és amakrín sejtek lehetnek (membránjelölés, receptor ellenes ellenanyaggal pozitívak). Miután a hormon expressziója egybeesik a fejlődés alatti fő apoptotikus hullámmal, joggal merül fel az, hogy lokális neuroprotectív szerepe lehet. Bar kísérleteink főleg in vivo folytak, retinatenyésztéseket is végeztünk, különböző koncentrációban hozzáadott erythropoietinnel, ahol a minták feldolgozásánál tunel reakcióval az apoptotikus sejtek számát, és elhelyezkedését vizsgáltuk. Az eredmények kiértékelése jelenleg is folyamatban van.

A kísérlet arra is rávilágít, hogy a retinatenyésztés szintén hasznos lehet a potenciálisan neuroprotektív anyagok hatásainak tesztelésére is, ezért a jövőben több vizsgálatot tervezünk elvégezni ezen, a jövőbeli klinikai hasznosítással is kecsegtető vonalon is.

Néhány, viszonylag kisszámú kísérletet végtünk a TrkB iv vitro hatásának vizsgálatára is, ezek azonban pontos következtetések levonására egyelőre nem alkalmasak.

Felnőttkori fotoreceptor regeneráció?

Szintén érdekes kérdés, hogy e feltételezett faktorok meddig fejthetik ki hatásait, mikor fejeződik be a csapfejlődés. Az elmúlt években beszámoltunk arról, hogy egy általunk vizsgált nappal aktív rágszáló, az *Otomys unisulcatus* felnőtt egyedének perifériás retináján a csapsejtek eloszlása eltér az általános sémától. A kékérzekeken csapok száma, illetve aránya is jóval meghaladja a centralis retinárészeket észleltet, és a csapok kb. 5%-a mind a kék-, mind a zöld pigmentet egyszerre termeli (fotopigment koexpresszió). Ez a terület a mind morfológiailag mind immuncitokémiailag nagyon hasonlít a fejlődő retinában megfigyelt jelenségekre, felmerült tehát a lehetőség, hogy a retina e jól körülhatárolt területén differenciálódni képes helyezkedjen el, amelyek állandóan osztódva új fotoreceptorokat termelnek, ezek pedig beilleszkednek a retinális mozaikba. Feltevésünket alátámasztja, hogy ezen a területen a sejtek egy része felnőttkorban is ciklusban van, osztódásra képes. Ezeket a sejteket immuncitokémiai módszerekkel anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigene) ellenanyaggal azonosítottuk. (*Berta és mtsai., 2004; Lukáts és mtsai., 2005; Lukáts és mtsai., submitted for publication*). Egyelőre még nem tudjuk bizonyítani, hogy ezek a sejtek fotoreceptorokká (is?) differenciálódnak, bár adatainkból ez a logikus következtetés adódik. Ha pedig ez a terület a fejlődő retinához hasonlóan viselkedik, akkor várhatóan ugyanazok, de legalábbis hasonló szabályozó mechanizmusok irányíthatják a fejlődést ezen a területen is.

A feltételezett felnőttkori csapfejlődés (regeneráció?) vizsgálatához is a tenyésztési módszereket szerettük volna igénybe venni. Sajnos, mind a mai napig csak ebben az egy fajban sikerült erre utaló bizonyítékokat szereznünk, ez azonban dél-afrikai élettere miatt Magyarországon nem beszerezhető. Alternatív modellállatként megvizsgáltuk az általunk használt fajokat, hátha itt is ki lehet-e mutatni hasonló területet? Sajnos mindkét vizsgált hörcsögfaj zsákutcának bizonyult. Patkányban bár nagyon hasonló, fejletlennek tűnő terület fiatal korban még megfigyelhető, körben az ora serrata mentén, ez a 3. hónap végére eltűnik, és előtte sem lehet PCNA jelöléssel pozitív sejteket azonosítani. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy éjszaka aktív fajokban a csapok újratemelésére egyszerűen nincs szükség, és a mechanizmus nem aktiválódik, vagy idő előtt kikapcsol. Nappal aktív fajok vizsgálata alternatívát jelentene, de ez jelenleg nem megoldható, a publikációt tenyésztési adatok nélkül tervezzük. Próbálkoztunk fény kiváltotta degenerációval regenerációt kiváltani patkányban, az eredmények feldolgozása jelenleg folyamatban van.

Bár csak áttételesen kapcsolódik a témához, de érdekes kérdés a kültagfejlődés vizsgálata is. Munkacsoportunk néhány éve kezdett el ezzel a kérdéssel is behatóbban foglalkozni. Megállapítottuk, hogy a kaveolák jelen vannak a retinában is, ahol feltehetően fontos szerepet játszhatnak kültagok organizált struktúrájának kialakításában. Tenyésztésben, ha a kiültetést pigmenthám nélkül végezzük el, akkor valódi, kültag ki sem fejlődik, és ez feltehetően hatással lesz a kaveolák elrendeződésére is. A különböző módszerekkel tenyésztett retinák kaveolin eloszlásának vizsgálata sokat segíthet szerepének megértésében. A tenyésztetek elkészültek, az eredmények feldolgozása fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémiai módszerekkel jelenleg is folyik.

Tervezett és folyamatban lévő publikációk.

Eredményeink jelentős részét ez idáig csak absztrakt és konferencia kiadványok formájában publikáltuk. Egy cikk van elküldött, négy „in preparation” állapotban. Ezért szeretnék élni azzal a lehetőséggel, hogy pályázatom végső értékelését e cikkek megjelenése után kapjam meg.

Lukáts Á, Berta ÁI, Földesi D, Hajós A, Cooper HM, Benett NC, Szabó A, Röhlich P, Szél Á:
Dual cones in the peripheral retina of diurnal rodents: a possible site for photoreceptor regeneration.
Submitted for publication

Halász et al: In vivo and iv vitro development of the retina of an all dual cone mammal. *In preparation.*

Lukáts et al: Thyroid hormone is essential for in vivo development of M/L-cones in the rat.. *In preparation.*

Lukáts et al: The effect of thyroid hormone and vitamine E substitution on M/L-cone development in vitro. *In preparation.*

Szabó et al: The expression of erythropoietin and its regulation during the postnatal development of the rat retina. *In preparation.*

Teljes publikációs lista

Magyarországi konferenciák:

Berta ÁI, Szabó A, Lukáts Á, Halász G, Magyar A, Röhlich P, L. Kiss A, Szél Á: A fototranszdukcióban résztvevő molekulák elrendeződésének változása a fejlődő hörcsög retinában. *Ph.D. Tudományos Napok, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2007.*

Berta ÁI, Szabó A, Lukáts Á, Halász G, Magyar A, Röhlich P, Szél Á, L. Kiss A: A fototranszdukcióban résztvevő molekulák elrendeződésének változása fejlődő hörcsög retinában. *XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.*

Doma V, Halász G, Szabó A, Berta ÁI, Szél Á, Lukáts Á: A pajzsmirigyhormon szubsztitúció hatása az M/L-csapok fejlődésére in vitro organitipikus retinakultúrában. *XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.*

Végvári D, Szabó A, Deák G, Lukáts Á, Berta ÁI, Szél Á: Erythropoietin és erythropoietin receptor expresszió fejlődő patkány retinában. *XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.*

Doma V, Halász G, Szabó A, Berta ÁI, Végvári Gy, Magyar A, Röhlich P, Szél Á, Lukáts Á: Az M/L-csapok fejlődésére ható faktorok vizsgálata in vitro organotipikus retinakultúrákban. *XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009. április 17-19.*

Szabó A, Végvári D, Magyar A, Berta ÁI, Lukáts Á, Szél Á: Erythropoietin expresszió fejlődő patkány retinában. *XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009. április 17-19.*

Halász G, Doma V, Lukáts Á, Szabó A, Magyar A, Szél Á: In vitro organatipikus retina modell az M csapok fejlődésének vizsgálatára hörcsögben. *XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009. április 17-19.*

Doma V, Halász G, Szabó A, Berta ÁI, Végvári Gy, Magyar A, Röhlich P, Szél Á, Lukáts Á: a pajzsmirigyhormon és az E-vitamin hatása az M/L-csapok fejlődésére in vitro organatipikus retinakultúrákban. A Magyar Anatómus társaság XV. Kongresszusa, Budapest, 2009, június 11-13.

Szabó A, Végvári D, Magyar A, Deák G, Berta ÁI, Lukáts Á, Szél Á: Erythropoietin expresszió és szabályozása fejlődő patkány retinában. A Magyar Anatómus társaság XV. Kongresszusa, Budapest, 2009, június 11-13.

Nemzetközi konferenciák

Lukáts Á, Szabó A, Halász G, Berta ÁI, Röhlich P, Doma V, Végyári D, Szél Á: Photopigment coexpression in the mammalian retina. XIX. *International Symposium of Morphological sciences, Budapest, Hungary, 2007. August 19-24.*
(Abstr) *Acta Biol. Segediensis, 51 (suppl) 2007, 26*

Doma V, Halász G, Szabó A, Berta ÁI, Végyári D, Röhlich P, Szél Á, Lukáts Á: The effect of thyroid hormone substitution on M/L-cone development in in vitro organotypic retinal culture. XIX. *International Symposium of Morphological sciences, Budapest, Hungary, 2007. August 19-24.*
(Abstr) *Acta Biol. Segediensis, 51 (suppl) 2007, 10*

Halász G, Lukáts Á, Szabó A, Szél Á: Online teaching by an anatomy web atlas. XIX. *International Symposium of Morphological sciences, Budapest, Hungary, 2007. August 19-24.*
(Abstr) *Acta Biol. Segediensis, 51 (suppl) 2007, 13*

Végyári D, Szabó A, Deák G, Lukáts Á, Berta ÁI, Szél Á: The expression of erythropoietin and its receptor in the developing rat retina. XIX. *International Symposium of Morphological sciences, Budapest, Hungary, 2007. August 19-24.*
(Abstr) *Acta Biol. Segediensis, 51 (suppl) 2007, 52*

Berta ÁI, Lukáts Á, Szabó A, Halász G, Magyar A, Röhlich P, Kiss AL, Szél Á: Developmental redistribution of phototransduction proteins and modulating molecules in the hamster retina. XIX. *International Symposium of Morphological sciences, Budapest, Hungary, 2007. August 19-24.*
(Abstr) *Acta Biol. Segediensis, 51 (suppl) 2007, 3*

Szél Á, Röhlich P, Halász G, Berta ÁI, Szabó A, Lukáts Á: Morphological approaches in colour vision studies. XIX. *International Symposium of Morphological sciences, Budapest, Hungary, 2007. August 19-24.*
(Abstr) *Acta Biol. Segediensis, 51 (suppl) 2007, 48*

Lukáts Á, Halász G, Doma V, Szabó A, Berta ÁI, Röhlich P, Szél Á: The effect of thyroid hormone substitution on M/L-cone development in in vitro organotypic retinal culture. *European Retina Meeting, Frankfurt, Germany, 2007. October 4-6*

Szabó A, Végyári D, Deák G, Lukáts Á, Berta ÁI, Szél Á: The expression of erythropoietin and its receptor in the developing rat retina. *European Retina Meeting, Frankfurt, Germany, 2007. October 4-6*

Berta ÁI, Szabó A, Lukáts Á, Halász G, Müllner N, Röhlich P, Szél Á, L Kiss A. Redistribution of Phototransduction Proteins and Modulating Molecules in the Developing Retina. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2008 Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2008. April 27-May 1*
(Abstr) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2008, E-1270.*

Szabó A, Végyári D, Deák G, Lukáts Á, Berta ÁI, Szél Á.: The expression of erythropoietin and its receptor in the developing rat retina. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2008 Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, 2008. April 27-May 1*
(Abstr) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2008, E-5896.*

Lukáts Á, Doma V, Halász G, Szabó A, Berta ÁI, Végyári G, Szél Á.: The effect of thyroid hormone and serum substitution on M/L-cone development in in vitro organotypic retinal culture. *6th Forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, 2008. July 12-16*

Szabó A, Végyári D, Deák G, Lukáts Á, Berta ÁI, Szél Á.: The expression of erythropoietin and its receptor in the developing rat retina. *6th Forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, 2008. July 12-16*

Szabó A, Végvári D, Deák G, Lukáts Á, Berta ÁI, Szél Á.: The expression of erythropoietin and its receptor in the developing rat retina. *XVIII. International Congress for Eye Research, Beijing, China, 2008. September 24-29*

Rendes közlemények

(csak áttételesen kapcsolódnak a pályázat témájához)

Berta ÁI, L Kiss A, Kemény-Beke Á, Lukáts Á, Szabó A, Szél Á: Different caveolin isoforms in the retina of melanoma malignum affected human eye. *Mol. Vision (2007) 13, 881-886*
IF: 2,377

Berta ÁI, L Kiss A, Lukáts Á, Szabó A, Szél Á: Distribution of caveolin isoforms in the lemur retina. *J. Vet Sci (2007) 8, 295-297*
IF:0

Referenciák:

Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, et al: The murine cone photoreceptor: A single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron*. 2000;27:513-523

Berta AI, Földesi D, Hajós A, Lukáts Á, Röhlich P, Szél Á: Az *Otomys irroratus* retinájának dorsalis perifériája: összejték a felnőtt emlős retinában? XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004.

Calderone JB, Jacobs GH. Cone receptor variations and their functional consequences in two species of hamster. *Vis Neurosci*. 1999;16:53-63

Halász G, Lukáts Á, Szabó A, Röhlich P, Szél Á. Fotoreceptorok posztnatális fejlődésének vizsgálata szíriai aranyhörsögben és szibériai törpehörsögben. XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004.

Jacobs GH. The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol Rev*. 1993;68:413-471

Lukáts Á, Dkhissi-Benyahya O, Szepessy Zs, Röhlich P, Vígh B, Bennett NC, Cooper HM, Szél Á. Visual pigment coexpression in all cones of two rodents, the Siberian hamster and the pouched mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (2002) 43, 2468-2473.

Lukáts Á, Szabó A, Röhlich P, Vígh B, Szél Á: Photopigment coexpression in mammals: comparative and developmental aspects. *Histol Histopathol*.(2005) 20, 551-557

McCaffery P, Posch KC, Napoli L, Gudas L, Dräger UC: Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina. *Dev Biol*. 1993;158:390-399

McCaffery P, Wagner E, O'Neil J, Petkovich M, Dräger UC: Dorsal and ventral retinal territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mech Dev*. 1999;85:203-214

Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Salto C, Vennstrom B, Reh TA, Forrest D. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet*. 2001;27:94-98.

Pinzón-Duarte G, Kohler K, Arango-González B, Guenther E: Cell differentiation, synaptogenesis, and influence of the retinal pigment epithelium in a rat neonatal organotypic retina culture. *Vision res*. 2000;40:3455-3465

Röhlich P, van Veen T, Szél Á. Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron*. 1994;13:1159-1166

Söderpalm A, Szél Á, Caffé AR, van Veen T: Selective development of one cone photoreceptor type in retinal organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;37:363-376

Szél Á, Röhlich P, Caffé AR, Juliusson B, Aguirre GD, van Veen T. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 1992;325:327-342

Szél Á, van Veen T, Röhlich P: Retinal cone differentiation. *Nature*. 1994;370:336

Szél Á, Lukáts Á, Fekete T, Szepessy Zs, Röhlich P: Photoreceptor distribution in the retinas of subprimate mammals. *J Opt Soc Am A*. (2000) 17, 568-579

Szabó A, Pinzón-Duarte G, Lukáts Á, Farkas Á, Kohler K, Szél Á: Organ culture of neonatal rat retina: a reliable method for developmental investigations. *XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2003.*

Szabó A, Lukáts Á, Röhlich P, Szél Á. TrkB receptor és opsin koexpresszió fejlődő patkány retinában. *XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004.*

Wikler KC, Szél Á, Jacobsen L: Positional information and opsin identity in retinal cones. *J Comp Neurol. 1996;374:96-107*

Williams GA, Jacobs GH: Absence of functional short-wavelength sensitive cone pigments in hamsters (*Mesocricetus*). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2008 May;194(5):429-39.