

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Anatómiai és Szövetteni Tanszék

# A retinális ribbon szinapszisok

Szinaptikus ribbonok a retina patológiás folyamatainak hátterében

**Készítette:** Stefanov Antónia, Biológia BSc III.

**Témavezető:** Dr. Jancsik Veronika, tudományos főmunkatárs

SZIE-ÁOTK, Anatómiai és Szövetteni Tanszék

Budapest

2013

# Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés	
	1. Kérdéskör, jelentőség.....	3
	2. Anyag és módszer.....	3
	3. Általános.....	4
II.	Mikroszkopikus szerkezet.....	7
III.	Molekuláris struktúra – szerkezeti fehérjék	
	1. RIBEYE és CtBP.....	9
	2. GCAP és CaBP.....	12
	3. KIF3A.....	15
	4. CAZ (Cytomatrix at the Active Zone).....	17
	5. Bassoon és Piccolo.....	17
	6. CAST, ELKS, RIM, Munc13-1.....	21
IV.	Funkció	
	1. Általános.....	25
	2. Exocitotikus proteinek.....	26
	3. Kalcium csatornák.....	28
	4. Vezikulum fúzió, fúziós modellek.....	29
	5. Exocitózis.....	32
	6. Endocitózis.....	33
V.	Patológia.....	37
VI.	Diszkusszió.....	40
VII.	Összefoglalás.....	43
VIII.	Summary.....	45
IX.	Köszönetnyilvánítás.....	47
X.	Hivatkozások.....	48

# **Bevezetés**

## **Kérdéskör, jelentőség**

Jelen irodalmi áttekintés a retinális ribbon, vagy szalag szinapszisokról meglévő tudásunkat hivatott összefoglalni. Feladatomnak érzem ezért egy minél átfogóbb kép elkészítését ezen organellumok felépítéséről, működéséről.

A szemlecikk kérdésköre tehát ezeknek a speciális szinapszisoknak a mikroszkopikus és molekuláris struktúrája, funkciója és elváltozásainak hatása a retina működésére.

Hogyan is néznek ki ezek a szalag szinapszisok és milyen méretadatok jellemzik őket? Milyen fehérjék vesznek részt a felépítésükben és működtetésükben? Milyen szerepük van a neurotranszmisszió szabályozásában, hogyan működnek, mi a pontos feladatuk? A ribbon szinapszisok építőköveinek elváltozásai, hiánya vagy diszfunkciója milyen retinális károsodás(oka)t von maga után és hogyan fejeződik ez ki a látás minőségében?

A kérdések megválaszolásának érdekében kitérek a későbbiekben a ribbon szinapszisok méret adatainak, valamint sejtje jellemző számosságának ismertetésére, majd összefoglalom a szinaptikus szalagok és az aktív zóna citomátrixának felépítésében és működtetésében részt vevő fehérjékről rendelkezésre álló információkat. Ezek után ismertetem a szinaptikus szalagok funkciójáról felállított modellek és hipotézisek részleteit. A patológia megértéséhez fontos a fiziológia ismerete, ezért a szakdolgozat végén foglalom össze a ribbon szinapszisokhoz köthető rendellenességeket, a strukturális, funkcionális fehérjék eltávolításával, kiütésével vagy mutációjával végzett kísérletek eredményeit.

A látás pontos mechanizmusáról, a neurotranszmisszió molekuláris szintű szabályozásáról meglévő tudásunk igen mozaikos, ezért a fenti kérdések megválaszolása, a ribbon szinapszisok szerepkörének megértése hozzáadhat egy darabot ehhez a mozaikhoz, teljesebbé téve tudásunkat a látáskémiai folyamatokról. A kérdéskör aktualitása abban rejlik, hogy a szinaptikus ribbonok felépítésének és funkciójának felderítésével egy olyan 'fegyvert' kaphat kezébe az emberiség, amelyet felhasználhat az orvostudomány a retina degeneratív betegségei ellen folytatott 'harcában'.

## **Anyag és módszer**

A szemlecikk összeállításához felhasznált szakirodalmat az alábbi adatbázisokból gyűjtöttem össze: PubMed, IOVS (Investigative Ophthalmology & Visual Science), NIH (National Institute of Health) Public Access, Science Direct; az alábbi kulcsszavak felhasználásával: retina, ribbon synapses, photoreceptor, bipolar cells, CAZ, structure, architecture, function, role, pathology, disorder.

## Általános

Mi is a látás? A fotoreceptorokban lejátszódó látáskémiai folyamat jól ismert.

A fotoreceptorsejtek a retina felszínére merőlegesen álló, több rétegen átívelő, megnyúlt érzékhámsejtek, melyek fényérzékeny nyúlványai, a csapok és pálcikák képezik a fotoreceptor-réteget. A receptorokon két rész különíthető el, a külső és a belső szegmens. A beltágban foglalnak helyet a szokványos sejtorganellek és itt termelődnek a fotopigmentek, valamint a transzdukciós lánc fehérjéi is. A kültág ezzel szemben egy felületsokszorozó membránrendszerből áll, amely a fotopigmenteket hordozza.

A kültágmembrán lipid kettősrétegében felhalmozott fotopigment integrális membránfehérjéből (opsin) és fényérzékeny prosztetikus csoportból (11-cisz-retinál) áll. A foton abszorpciójára a retinál megváltoztatja az alakját (cisz-transz izomerizáció), ami az opsin konformációváltozásával jár. Az így aktivált opsin jelátviteli láncot indít el. Először a transzducin (G-protein), majd a foszfodiészteráz aktiválódik, aminek hatására csökken a sejtmembrán Na-csatornáit nyitva tartó cGMP szintje, és a fényexpozíció a Na-csatornák bezáródása révén a depolarizáció csökkenését, esetleg hiperpolarizációt okoz. Sötétben, ezzel szemben, a nyitott Na-csatornák depolarizációt tartanak fenn, amely a glutamát neurotranszmitter folyamatos leadását teszi lehetővé. A fotoreceptor sejtek tehát sötétben aktívak és fény hatására gátlódnak. A fény által beindított szignál transzdukciós kaszkád egy membránpotenciál-változást is eredményez, ami átadódik a fotoreceptorok belső szegmenseibe, a szinaptikus terminálok membrán-potenciál változásait indukálva. E potenciálváltozások által történik meg a fotoreceptorok transzmitterének, a glutamát leadásának szabályozása (*Röhlich P., Szövevény I-II.*).

A fotoreceptorok neurotranszmitter leadása hagyományos abban az értelemben, hogy a kalcium bejutásától függ, melynek szintje a depolarizáció következtében növekszik. Nem szokványos azonban, hogy jel hiányában depolarizált a sejtmembrán, majd a beérkező jel hatására hiperpolarizáció következik be. Azaz sötétben a fotoreceptorok glutamát leadása egyenletes, melynek szintje a beeső fény intenzitásától függő módon csökken.

A pálcák már egyetlen foton elnyelésének következtében is mérhető jeleket adnak le, azonban nem képesek a fény intenzitásbeli változásait jelezni  $\sim 10^5$  darab foton felett (*Matthews és Fuchs, 2010*). A csapoknak azonban alacsonyabb az érzékenysége: nagyobb mennyiség (db foton) elnyelése változtatja meg észlelhető szinten a glutamát leadásának szintjét. Ezen szenzitivitás különbségek ellenére, mindkét fotoreceptor típus azonos szinaptikus készüléket, az ún. szinaptikus ribbonokat használja a neurotranszmisszió kivitelezésére. A retinában azonban nem csak a fotoreceptorok rendelkeznek ribbon szinapszissokkal. Az általuk leadott szignált interneuronok közvetítik, melyek közül a bipoláris

idegsejtek hasonló szinaptikus apparátussal rendelkeznek, mint a fotoreceptorok. Az említett retinális neuronok (fotoreceptorok és bipolárisok) különleges szinapszisai ugyanis gyorsan, nagy mennyiségű neurotranszmitter leadására képesek hosszan tartó periódusokon keresztül (*Morgans, 2000*). Kifejezetten a gerincesekre jellemző specializációnak számítanak. De vajon a ribbonok mely tulajdonságai jelentenek adaptív előnyt a retina fotoreceptorai és bipoláris neuronjai számára?

A szinaptikus ribbonok egyedi funkcióinak magyarázataként felállított modellek csupán hipotetikusak, közvetett módon azonban egyes eredmények ezeket a feltevéseket igazolják, így kizárni egyiket sem lehet.

### 1. 'Conveyor-belt' hipotézis:

Parsons és Sterling (2003) eredeti elgondolása szerint, a ribbon szinapszisok valamiféle „szállító szalagok” lehetnek, hiszen tartalmaznak egy kinezin-típusú motorproteint. Az elgondolás logikus, azonban ennek a fehérjének a működése a szinaptikus ribbonokban még ma sem tisztázott. Az azonban bizonyos, hogy a konvencionális motoros funkció ellátásához mikrotubulusok jelenléte és ATP hidrolízis szükséges. A mikrotubulusok hiánya önmagában nem zárna ki a fehérje működését, hiszen a ribbon felületén vannak bizonyos fehérje természetű 'rögök', melyek a mikrotubulusokat helyettesítő 'kapaszkodó helyek' lehetnek.

Így a speciális 'fej és nyak' funkciós egységei révén a fehérje könnyedén lépkedne kapaszkodóról kapaszkodóra a ribbon felszínén, hasonlóképpen szállítva a szinaptikus vezikulumokat, mintha egy mászófalon hátizsákkal mozognánk. Mivel azonban az ATP hidrolízis ehhez is elengedhetetlen tényező és ennek lehetősége sem áll rendelkezésre a ribbon szinapszisoknál, a futószalag-hipotézis érvényessége igen kétséges.

Valószínű tehát, hogy a vezikulumok nem mozognak a ribbon 'gerincén' le-föl, ezért léteznie kell egy más mechanizmusnak, ami lehetővé teszi az egyenletes, intenzív és hosszan tartó neurotranszmissziót.

### 2. 'Safety-belt' hipotézis:

A megfigyelések azt az elképzelést támasztják alá, hogy a ribbonok felelősek a vezikulumok összegyűjtéséért, mintegy 'befogó készülékként' funkcionálva. A szilárdan megkötött vezikulumok aztán úgy sorakoznak fel a ribbon felületén, hogy a beérkező jel hatására membránjaik egymással összeolvadhatnak. Ez a jelenség egyedülálló, csak a ribbon szinapszisok működésében jellemző. A létrejövő fúziós kaszkád magyarázhatja a szalag szinapszisok speciális transzmitter leadásának mechanizmusát, hiszen az összeolvadó vezikulumoknak köszönhetően gyorsan, nagy mennyiségű transzmitter szabadulhat fel (*Parsons és Sterling, 2003; LoGiudice és Matthews, 2009*).

### 3. Neurotranszmisszó szabályozása:

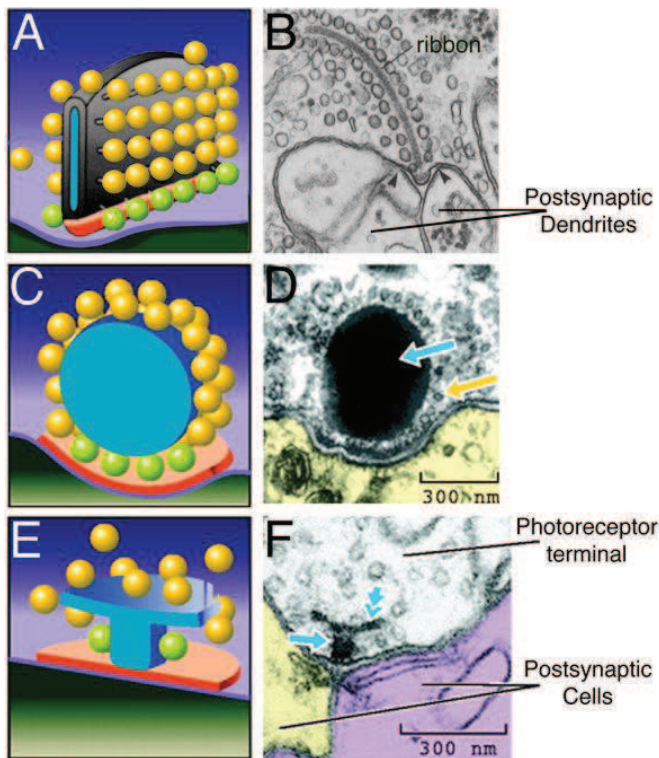
A szinaptikus szalagok azonban nem csak a vezikulumok rögzítéséért, tehát az exocitózis előkészítéséért, hanem annak pontos kivitelezéséért, irányításáért is felelősek. Ha pedig megtörtént a glutamát leadása, a vezikulumoknak vissza is kell tölteniük. Látszólag, mind az őket kialakító membrán reorganizációjában, mind pedig a transzmitterrel történő feltöltésükben fontos szerepet töltenek be a szinaptikus ribbonok. Ez azt jelenti, hogy nem csak az exocitózis, de az azt követő endocitózis irányítása is hozzátartozik szerepkörükhöz (*Zanazzi és Matthews, 2009*).

A következőkben áttekintem ezen funkciók molekuláris hátterét, de előbb lássunk néhány adatot a ribbon szinapszisok morfológiájáról!

## Mikroszkopikus szerkezet

A szinaptikus ribbonok elektronmikroszkópos képeken jól látható, elektrondenz, osmiophil (specifikusan reagál az osmium-tetroxiddal) fehérje képződmények, melyeket szinaptikus vezikulumok vesznek körül. Ezek a heterogén organelumok aktivitástól, illetve a sejt típusától (a belső fül szőrsejtjei és a pinealociták is tartalmaznak ribbon szinapszist) függően változnak számban, méretben, alakban és a kapcsolódó vezikulumok számában. Alakbéli változatosságukat alább, az 1. ábra szemlélteti.

1. ábra. Ribbon szinapszisok alakbéli változatossága (LoGiudice és Matthews, 2009):



A B kép elektronmikroszkópos felvételén látható ribbon szinapszis egy szalamandra pálcika fotoreceptorának preszinaptikus termináljában található, térbeli szerkezetét az A kép modellezi, melyen jól látszik a jelegzetes lemez/szalag-forma. A C és D képek egy béka belső fülének sacculusában található, gömb alakú szinaptikus testet ábrázolnak, míg az E és F képek a *Drosophila* fotoreceptor terminálisában található kezdetleges, ribbonhoz hasonló T-alakú struktúrát mutatnak be. A zöld gömbök a preszinaptikus membránhoz kötött, exocitózisra előkészített ún. 'docked' vezikulumokat szemléltetik.

A vezikulumok vékony, ismeretlen felépítésű fonállal kapcsolódnak a ribbon 'gerincéhez', annak teljes hosszában és minden dimenziójában, kivéve az alapi régiót (arciform density), mely fehérje összetételének köszönhetően horgonyzóhelyként funkcionál a fotoreceptorok szinaptikus szalagjai számára. Az egy felületen rögzített fehérje szalagok ezáltal mintegy

lebegnek a citoplazmában átlagosan 20nm-rel a preszinaptikus membrán fölött. Meglepő azonban, hogy a bipoláris sejtekből a kihorgonyzásért felelős fehérje hiányzik.

A fotoreceptorok szinaptikus szalagjai jellemzően lemez alakúak, ~30nm vastagságúak és maximum 200nm mélységig nyúlnak a citoplazmába a sejt belseje felé, merőlegesen a preszinaptikus membránra, de hosszban, azaz párhuzamosan a preszinaptikus membránnal, változhatnak körülbelül 200-1000nm között. Összehasonlítva a fotoreceptor ribbon szinapszisokat a bipoláris sejtek szinaptikus szalagjaival a legszembetűnőbb különbség, hogy a bipoláris neuronok ribbonjai jelentősen kisebb méretűek, ugyanakkor nagyobb számban vannak jelen a szinaptikus terminálokban. Egy pálcikasejt preszinaptikus elemében, a spherulumban jellemzően egy darab ribbon található, míg a csapok preszinaptikus elemében, a pediculusban ez a szám átlagosan 10-12 közé tehető, egy átlagos emlős bipoláris idegsejtben azonban 30-40 darab is előfordulhat.

A ribbonok felszíne kinézetre olyan, mintha apró (~5nm átmérőjű) fehérje szemcsékkel lenne telehintve, ezekhez kapcsolódnak hozzá a szinaptikus vezikulumok nagyon finom szálú, átlagosan 5nm vastag és 40nm hosszú fehérje filamentumaikkal. A vezikulumok sűrűn, egymáshoz közel helyezkednek el a szalag szinapszisok felületén, de egymással nem érintkeznek. Azok a vezikulumok, amelyek a ribbon alapi zónájánál sorakoznak, közvetlen kapcsolatban állnak a preszinaptikus membránnal, készek az exocitózisra. Ezeket a vezikulumokat nevezik az angol szakirodalomban 'docked' vezikulumoknak. A ribbon szinapszisok geometriájaja alapján felállítható egy fix arány a felszínhez kötött és 'docked' vezikulumok száma között, mely a lemez alakú ribbonok esetében 5:1, a gömbded szinapszisok esetében viszont 10:1. Egy tipikus emlős csap output termináljának ribbon szinapszisa közel 3000 vezikulumot kötnek meg a felszínükön, míg ~600 vezikulum 'docked' állapotban van a plazma membránnál. Az emlősök pálcika fotoreceptor ribbon szinapszisa félhold alakú lemezek és átlagosan 130 vezikulumot 'dokkolnak' a ~640 darab megkötött vezikulum mellett. A fotoreceptorok szalag szinapszisa a kutatások alapján nagyobbak bizonyultak a bipoláris neuronokban talált ribbonokhoz képest, melyekből azonban sokkal több van egy preszinaptikus terminálban és általában gömbded, vagy laposított ellipsoid formájukból kiindulva ~110 vezikulum megkötésére képesek (*Sterling és Matthews, 2005; Zanazzi és Matthews, 2009*).

Milyen fehérjék felelősek tehát ennek az egyedi morfológiának a kialakításáért és milyen feladatokkal rendelkeznek ezeknek a specializált szinapszisoknak a működtetéséért?



## Molekuláris struktúra – szerkezeti fehérjék

### RIBEYE és CtBP

Schmitz és munkatársai azonosították elsőként a szinaptikus szalagok fő alkotóelemét, a RIBEYE nevű fehérjét, melynek elnevezése utal specifikus előfordulási helyére, a ribbonra, valamint a szemre, melyből izolálták. A RIBEYE egy 120kDa-os komplex fehérje, mely egyedülálló a ribbon szinapszisok szerkezetében, más organelumok felépítésében nem vesz részt. Ez a protein adja a ribbonok fő tömegét, ezért számos RIBEYE molekula szükséges egy ilyen szinaptikus apparátus felépítéséhez (*Heidelberger, Thoreson és Witkovsky, 2005*). Zenisek kutatócsoportjának 2004-es mérései szerint egy bipoláris sejt egyetlen szinaptikus ribbonja legalább 4000 RIBEYE molekulát tartalmaz, mely hozzávetőlegesen a ribbon térfogatának 67%-át teszi ki.

A RIBEYE funkcionális egységei egy szerin és prolin-gazdag amino-terminális, az ún. A domén, valamint egy karboxi-terminális, a B domén. Az A domén csak a RIBEYE szerkezetére jellemző, más fehérjékkel összevetve nem találtak identikus struktúrát az adatbázisokban, a B domén viszont közel identikus egy ismert transzkripciós represszorral, a karboxi-terminális-kötő fehérje 2, azaz CtBP2-vel.

A CtBP2 egy sejtmagi fehérje, ami a CtBP1-gyel közösen alkotja a transzkripciós represszorok egy családját. A CtBP1-et egy adenovírus eredetű protein vizsgálata közben azonosították s csak ezt követően figyelték meg a CtBP2-t is, mint a CtBP1 strukturális és funkcionális homológját.

A CtBP2-vel szekvenciálisan nagyrészt azonos B domén egy rövid szakaszban különbözik a CtBP2 N terminálisának végétől. Schmitz és munkatársai szerint ez a tény arra enged következtetni, hogy mindkét fehérje azonos génről expresszálódik, de a transzkripció szabályozásáért eltérő promóterek felelősek. A RIBEYE felépítése és az azt kódoló gén jellemzői ugyanis azt sejtetik, hogy a fehérje evolúciója során a szerkezetében megjelent egy újszerű N terminális, melyhez kapcsolódott egy előzőleg már létező protein, a CtBP2, ez később módosult, de a fúzió eredményeként kialakult egy új funkciókkal rendelkező komplex fehérje, a RIBEYE (*Schmitz et al., 2000; Almers et al., 2005*).

Mivel a CtBP1 és a CtBP2 heterodimereket formálnak transzkripciós komplexekben, a CtBP1 úgy kerülhetett a ribbonok szerkezetébe, hogy interakcióba lépett a RIBEYE B domain-jével, ami, mint tudjuk közel identikus a CtBP2-vel. A RIBEYE-jal ellentétben azonban ez az alkotóelem más szinapszisok felépítésében is jellemző. Amellett, hogy transzkripciós ko-represszorként funkcionál a CtBP1 szerepet játszik az intracelluláris

membrán-szállításban, a membránok feldarabolásában, valamint a citoszkéletális mikrotubulusok organizációjának szabályozásában (Zanazzi és Matthews, 2009).

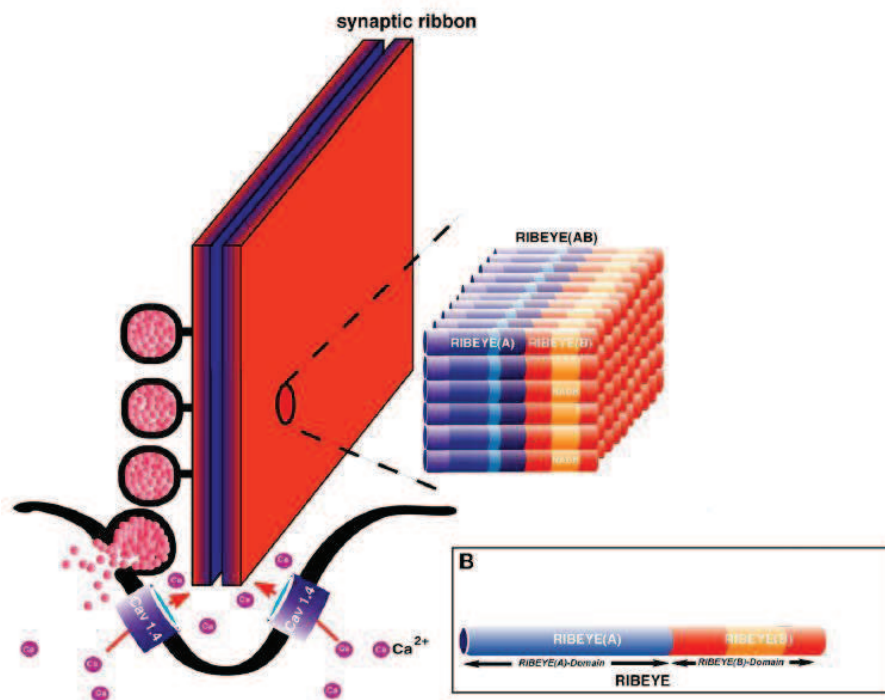
Mi lehet tehát a RIBEYE doménjeinek funkciója? Ismert, hogy mindkét domén képes RIBEYE-RIBEYE interakciók kialakítására (Matthews és LoGiudice, 2009), három RIBEYE kötőhely található az A és kettő a B doménon (Magupalli et. al., 2008). Ezek homo- és heterotípusos kapcsolatok is lehetnek attól függően, hogy azonos vagy különböző domének reagálnak egymással a szomszédos RIBEYE molekulákon (Mercer és Thoreson, 2011), így hozva létre a ribbon szinapszisok strukturális gerincét.

Alább a 2. ábra mutatja be sematikus a RIBEYE molekulák tömött, hipotetikus elrendeződését a szinaptikus ribbonok felépítésében.

Az ábra hipotetikus modellje szerint a RIBEYE molekulák úgy rendeződnek a ribbonok szerkezetében, hogy az A domének a ribbonok belseje felé fordulva alkotják a ribbon szilárd vázát, míg a B domének kifelé fordulva számos molekulával képesek interakcióba kerülni a ribbon felületén.

Magupalli és munkatársai 2008-ban bizonyosságot találtak arra is, hogy a RIBEYE önmagában képes lehet ribbon-szerű struktúrák kialakítására, mert a RIBEYE transzfektált retinális prekursor sejtekben történt exogén expressziója során olyan protein aggregátumok képződtek, melyek a legtöbb esetben vezikulumokkal voltak körülvéve.

2.ábra. RIBEYE molekulák elrendeződése a ribbonokban (Frank Schmitz et. al., 2012):



Schmitz kutatócsoportjának további munkája újabb evidenciákkal szolgált arra a feltevésre, hogy a RIBEYE A doménje valószínűleg aggregátum képző sajátosságánál fogva a ribbon szilárd, strukturált felépítéséért felelős, míg a B domén minden bizonnyal a ribbon felületén helyezkedik el és  $\text{NAD}^+$  megkötésére képes (*Schmitz et. al., 2000*). Ezt jelzi az a tény is, hogy a CtBP1 és 2 hasonlóak a  $\text{NAD}^+$ -függő 2-hidroxisav dehidrogenázokhoz. A mechanizmus analógiaként említik meg, hogy a CtBP-k kötések kialakításáért felelős szekvenciái a target proteinjeiken megosztoznak egy megegyező szekvencián, amit PXDLS (Pro-X-Asp-Leu-Ser) motívumként írtak le. A PXDLS motívumok számos transzkripciós faktorban és gén-repressziós effektorban fordulnak elő, mint például bizonyos hiszton-deacetilázok (*Quinlan et. al., 2006*). Ebből kiindulva a RIBEYE B doménje interakciókba léphet olyan szekvenciákkal, amelyek tartalmazzák a CtBP-k konszenzus szekvenciáját, a PXDLS motívumot. Amennyiben ez teljesül, arra következtethetünk, hogy a célszekvencia feltehetően a szinaptikus vezikulumok membránját alkotó, egy vagy több proteinjében van. Ennek alapján ez az interakció lehet felelős a vezikulumok megkötéséért és/vagy áthelyezéséért a szinaptikus szalagok felületén (*Schmitz et. al., 2000*). A szinaptikus vezikulumok membránjában található fehérjékben előforduló esetleges PXDLS motívumokat azonban még nem derítették fel, így az ilyen irányú kutatómunka közelebb vihetne minket a vezikulumok ribbonokkal történő asszociációjának pontos mechanizmusát magyarázó részletek megértéséhez.

Fontos tény ezen kívül, hogy a ribbonok felépítése mellett a RIBEYE kulcsfontosságú a szalag szinapszisok aktív zónához (itt történik az exocitózis) rögzítésének mechanizmusában is, hiszen reakcióba lépve az aktív zóna citomátrixának fehérjéivel hozzájárul a ribbon sejtmembránhoz történő kihorgonyzásához (*Dieck et. al., 2005*).

Napjaink eredménye, hogy a RIBEYE fontos szerepet játszik a belső fül szőrsejtjeiben a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák jellemző elrendeződésének kialakításában is (*Sheets et. al., 2011*).

Végül, de nem utolsó sorban megemlítem, hogy a szinaptikus ribbonok dinamikus képződmények, melyek kalcium-mediált átrendeződése aktivitás (éjjeli vagy nappali) függő. Nappali fény hatására a kihorgonyzó fehérjék konformáció változásainak következtében a szinaptikus ribbon ledisszociál a plazmamembránról és szabadon lebeg a citoplazmában, éjjel azonban visszakapcsolódik az aktív zónához és folytatódhat a neurotranszmisszió.

A B domén interakciója egy ún. GCAP molekulával felelős lehet a szinaptikus szalagok  $\text{Ca}^{2+}$ -függő át- és visszarendeződéséért (*Schmitz et. al., 2012*), ennek mechanizmusát azonban alább, a GCAP protein ismertetésénél taglalom majd részletesebben.

Megjegyzendő, hogy gerinctelenek, mint például a *Drosophila* és a *C. elegans* genomvizsgálata során találtak ugyan CtBP2 vagy B domén homológot kódoló gént, azonban a RIBEYE A doménjét, vagy homológját kódoló szekvenciát nem, azaz minden jel arra mutat,

hogyan a RIBEYE és ezzel együtt a retinális szinaptikus ribbonok a gerincesek evolúciós vívmányai (*Schmitz et al., 2000*). Bizonyíték után kutatva ennek a feltevésnek az alátámasztásáért, rákerestem a RIBEYE complete cds-eire (coding sequence) az NCBI honlapján és nagy meglepetésemre csupán négy faj RIBEYE mRNS-ének teljes szekvenciája állt rendelkezésre. Véleményem szerint a jövőben ez szintén érdekes kutatási téma lehetne. Ezek a fajok a *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Mus musculus* és *Danio rerio* voltak, mind gerinces, azaz a hipotézis továbbra is megállta a helyét, ugyanakkor a végső konzekvencia levonásához túl kevés volt az adat. Az ember RIBEYE mRNS nukleotid sorrendjét választva referencia szekvenciának az alábbi honlapon: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start> kerestem egyezéseket a teljes, megszekvenált genommal rendelkező élőlények génkészletében erre a szekvenciára és azt találtam, hogy komoly egybecsengések (50% felett, az ember 3686 bázispárjához képest 1843 feletti azonos bázispár) valóban csak a gerincesek esetében vannak. Tehát mindamelllett, hogy kijelenthetjük: a ribbon szinapszisok a gerincesekre jellemző képződmények, megjegyzendő, hogy ribbon-szerű struktúrákat a gerinctelenek, például a *Drosophila* fotoreceptor terminálásában is találtak (1. ábra), ám itt nagy a molekuláris eltérés a klasszikus szinaptikus ribbonoktól.

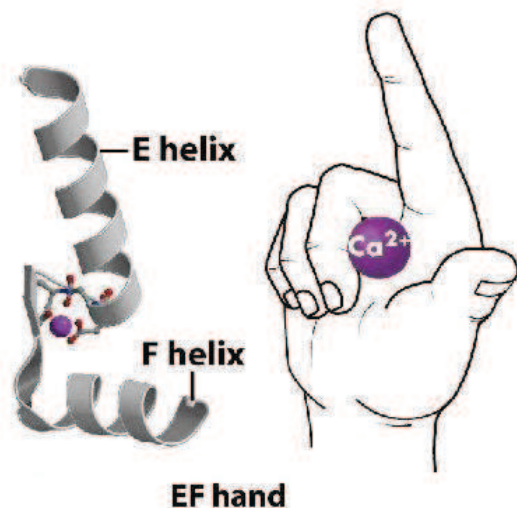
## GCAP és CaBP

A  $\text{Ca}^{2+}$  az élettani folyamatok egyik legfontosabb ionja, mely a csontok mineralizációjától elkezdve, az izomkontrakciók szabályozásán át a sejtek információközléséig számos műveletet irányít és befolyásol. Közben rengeteg fehérjével kerül kapcsolatba, melyeken speciális kalcium-kötő motívumok találhatóak. Ezek közül az egyik leggyakoribb az 'EF-hand' motívum.

A motívum elnevezése utal a  $\text{Ca}^{2+}$  megkötésének mechanizmusára. A motívum strukturális szerveződésének (helix-loop-helix) bemutatására elkészített modell ötletesen szemlélteti annak a  $\text{Ca}^{2+}$  megkötésénél létrejövő konformációváltozását is (3. ábra). Az F-helix képes elmozdulni az E-helix felé, ezzel közrefogva a kalcium iont, mint egy hüvelyk és egy mutató ujj (*Lewit-Bentley és Réty, 2000*).

Az 'EF-hand' doménnal rendelkező kalcium-kötő proteinek jellegzetessége, hogy magas affinitással kötik meg a  $\text{Ca}^{2+}$  ion(ok)-at. Az 'EF-hand' motívum helix-loop-helix szerkezetében helyet foglaló 'loop' régió túlnyomórészt savas tulajdonságú aminosavakból tevődik össze, melyek kelátokat képeznek a  $\text{Ca}^{2+}$ -nal (vagy magnéziummal).

(<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Proteins8.html>):



Az 'EF-hand' motívumot hordozó fehérjéknek két csoportja van jelen a retinális ribbon szinapszisok közelében: a neuronális kalcium szenzor (NCS) proteinek családja, mely magában foglalja a guanilát-cikláz aktiváló proteineket (GCAPs of ~24kDa) és a kalcium-kötő fehérjék családjának (CaBPs) tagjai. Megjegyzendő, hogy a szinaptikus ribbonoknál működő, L-típusú, feszültség-függő kalcium csatornák  $\alpha 1$  alegysége ( $Ca_v1.4$ ) szintén tartalmaz 'EF-hand' domént.

Napjaink kutatási eredményei azt sejtetik, hogy a fotoreceptor ribbon szinapszisok aktivitás-függő strukturális változásaiért a GCAP proteinek lehetnek a felelősek. A fotoreceptorok szinaptikus szalagjai ugyanis aktivitásuktól függően ledisszociálnak az aktív zóna területéről (nappal) s a citoplazmában lebegve szüneteltetik funkciójukat, majd a megfelelő impulzus hatására (éjjel) visszarendeződnek és újra hozzákötődnek a plazmamembránhoz. Ez a dinamikus át- és visszarendeződés függ a  $Ca^{2+}$ -tól és a cGMP-től (Schmitz *et al.*, 2012).

A GCAP proteinek négy 'EF-hand' motívumot tartalmaznak. Az emlős retinában három izoformájuk van jelen, a GCAP1, 2 és 3, melyek előfordulása fajfüggő. Venkatesan kutatócsoportja egereken végzett kísérleteiben kimutatta 2010-ben, hogy a GCAP2 karboxi-terminális régiója képes interakcióba lépni a RIBEYE B-doménjével NAD(H)-dependens módon. A GCAP2 túlexpresszáltatása a fotoreceptorok preszinaptikus termináljaiban szignifikánsan csökkentette a kihorgonyozott ribbon szinapszisok számát az aktív zónában. A folyamat pontos molekuláris háttere azonban még nem ismert (Schmitz *et al.*, 2012).

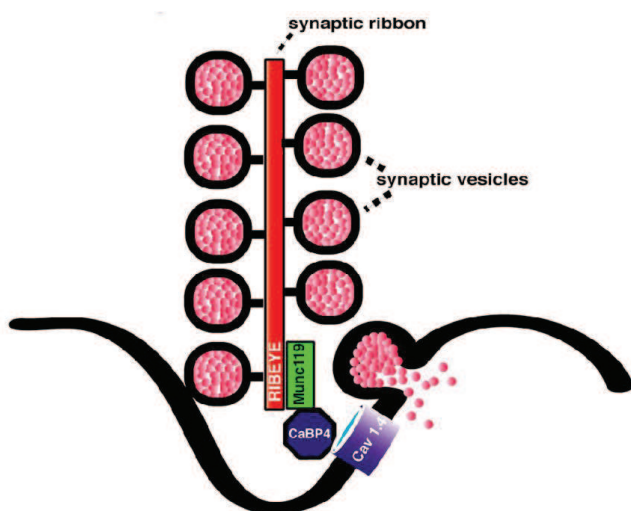
A CaBP-k közül a 2-es, 4-es és 5-ös izotípusok retina specifikus kalcium-kötő fehérjék, melyek eloszlása szintén fajspecifikus. Tadao Maeda kutatócsoportja egereken (CaBP4) végzett kísérleteket 2005-ben, hogy ezeknek a proteineknek a funkcióját feltérképezzék a fotoreceptorokban. Eredményeik afelé mutatnak, hogy a CaBP4 esszenciális a fotoreceptor

ribbon szinapszisok kifejlődéséhez és fenntartásához, minden bizonnyal a kalcium csatornák és így a neurotranszmisszió funkcionális modulációja által. A CaBP4 deficienciában szenvedő egerek fotoreceptor ribbon szinapszisaik ugyanis komoly károsodásokat szenvedtek s így funkcióik ellátására alkalmatlanokká váltak. A neurotranszmisszió kivitelezésének egy kulcsfontosságú proteinje tehát a CaBP4 a fotoreceptorok ribbon szinapszisaiban. Szerepe a ribbon kalcium csatornához való kötése (Maeda et al., 2005). A CaBP4 tehát képes közvetetten interakcióba lépni a RIBEYE-jal, így teremtve fizikai kapcsolatot a szinapszis és a kalcium csatornák között egy másik, az ún. Munc119 fehérje közreműködésével.

A Munc119 a *C. elegans*-ban előforduló Unc119 protein funkcionális ortológja és nélkülözhetetlen a ribbonokkal rendelkező sejtek szinaptikus jelátvitelének lebonyolításában. Ez a fehérje NAD(H)-independens módon közvetlen kapcsolatban van a szinaptikus ribbonok fő alkotóelemével, a RIBEYE-jal (Alpadi et al., 2008) és rendelkezik egy CaBP4-kötő hellyel is.

A 4. ábra sematikus ábrázolja, hogy elméletben hogyan alakulhatnak ezek az interakciók, az azonban még nem tisztázott, hogy vajon ezek a kapcsolatok a fehérjék között létrejöhetnek-e egy időben.

4. ábra. RIBEYE kapcsolata a Ca-csatornákkal (Schmitz et al., 2012, átalakított ábra):



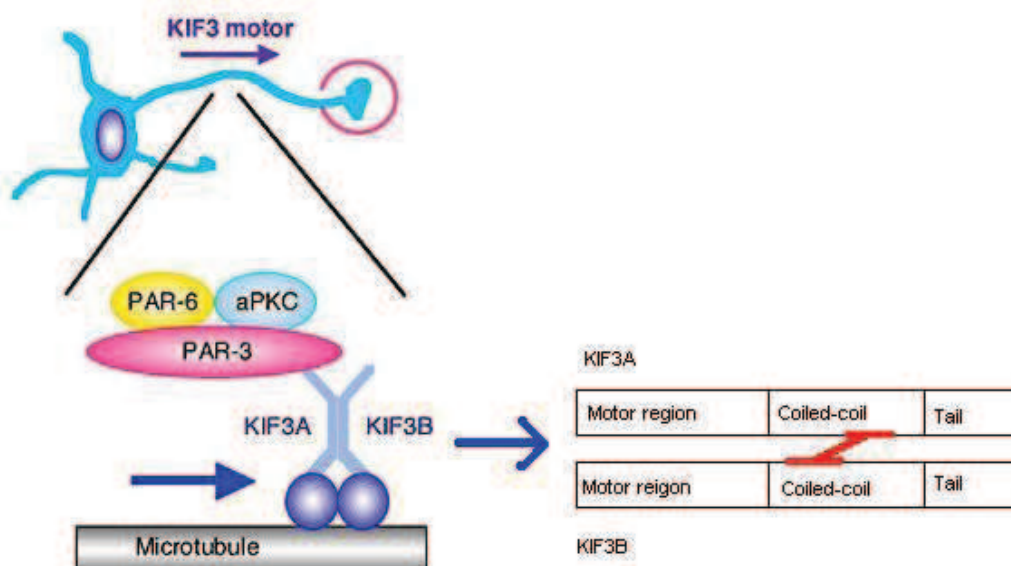
A GCAP, CaBP és Munc119 fehérjék kapcsolatainak pontos molekuláris háttere és az interakciók egyidejű létrejöttének lehetősége még nincs felderítve, ezek vizsgálata a jövőben hozzájárulna a szinaptikus ribbonok aktivitás-függő dinamizmusának átfogóbb megismeréséhez.

## KIF3A

Muresan és kutatócsoportja 1999-es cikkében arról számol be, hogy a KIF3A jelen van a gerincesek retinájában a fotoreceptorok szinaptikus ribbonszövetében, valamint a belső rostos réteg (IPL) szinaptikus ribbonszövetében is nemcsak a ribbonszövet mátrixában, de a megkötött és a ribbonszövet közelében lévő vezikulumok többségének membránjában is.

A kinezin-szuperfamilia tagjaként számon tartott KIF3 motorfehérjét elsőként Yamazaki és munkatársai klónozták és azonosították az 1990-es évek elején. 1995-ben megjelent cikkükben ismertetik a fehérjék sajátosságait, miszerint aminosav szekvenciájukban 47%-os egyezést mutatnak és képesek egymással illetve még három ~100kDa-os KAP3 molekulával (kinesin-superfamily associated protein) kapcsolatot létesíteni. KAP3 hiányában a KIF3A közvetlenül is tud a KIF3B-vel komplexet alkotni, s ebben a heterodimer formában az esetek nagy többségében membránborítású organellekhez asszociált állapotban fordulnak elő. A KIF3A/B komplex szerkezetét az jellemzi, hogy az egyik végén két, a másik végén pedig egy globuláris elemet tartalmaz, azaz két 'feji' és egy 'farki' részt hordoz. A 5. ábra szemlélteti szematikusan ezt az elrendeződést. Az ábrán feltüntetett további molekulák a mi áttekintésünk szempontjából lényegtelenek, ugyanis ezek a retinális ribbonszövet környezetében nem fordulnak elő, az agyi axonális transzportfolyamatokban játszanak szerepet.

5. ábra. A KIF3A szerkezete (Kaibuchi K. et al. átalakított ábrája):



E két protein 'feji' része egyenként is képes motoros aktivitásra. In vitro, izolált axonokban kimutatták, hogy lehetővé teszik membrán jellegű organellek mikrotubulusok mentén történő anterográd, azaz pozitív vég felé irányuló transzportfolyamatait.

A KIF3A jelenléte tehát egy, a ribbonokra jellemző motoros funkció lehetőségét veti fel, kiváltképp azért, mert a konvencionális szinapszisok szerkezetéből látszólag hiányzik ez a protein.

Felvetődik tehát a kérdés: mi is lehet ez a funkció? A megkötött vezikulumoknak az exocitózis színtere felé, azaz az aktív zóna felé történő szállításában betöltött szerepet kizárhatjuk, hiszen a ribbon szinapszisok szerkezetében illetve közvetlen közelében, konkrétan maga a ribbon-gerinc és az aktív zóna közti térben nincsenek mikrotubulusok és nem történik ATP hidrolízis, valamint a kinezin II holoenzim többi komponense is hiányzik. Egy hipotézis szerint, a KIF3A talán a ribbon szinapszisok saját, önfenntartó anyagainak transzportfolyamatait látja el (*Muresan et al., 1999*).

További kutatások is azt igazolják, hogy a szinaptikus ribbonokra jellemző exocitózis, azaz gyorsan nagy mennyiségű neurotranszmitter felszabadítása nem magyarázható a KIF3A tevékenységével, a szinaptikus vezikulumok gyors ribbon-menti, aktív-zóna felé történő transzlokációjával, ezért a ribbonok szerepéről felállított 'futószalag-teóriát' elvetették (*Parsons és Sterling, 2003*).

Más kutatók alternatív mechanizmust kerestek, ami mégis lehetővé teszi a vezikulumok szállítását a ribbon gerince mentén. Mivel a ribbon szerkezetében nincs mikrotubulus, se miozin, se aktin, talán a KIF3A képes önmagában „lépegetni” a ribbon felületi fehérje-rögjein, mégpedig úgy, hogy a vezikulumok membránjában jelen lévő molekulák (KIF3B vagy C) interakcióba lépnek a ribbon-mátrix KIF3A molekuláival, s így zajlik a vezikuláris transzport az aktív zóna felé (*Zanazzi és Matthews, 2009*).

Elképzelésem szerint az is lehetséges, hogy a szinaptikus ribbon felületén lévő KIF3A molekulák egymás mellett sorakozva homo- illetve heterodimereket alkossanak a szinaptikus vezikulumok membránjában található KIF3A vagy KIF3B ill. C molekulákkal és mintegy adogatva egymásnak a vezikulumokat, molekuláról molekulára is történhetne a vezikuláris transzport.

A KIF3A pontos szerepköre a szinaptikus szalagok szerkezetében rejtély, ennek felderítése fontos lenne a szinapszis élettani folyamatainak értelmezéséhez.



## CAZ (Cytomatrix at the Active Zone)

A konvencionális és ribbon szinapszisokban egyaránt az aktív zónánál történik meg a neurotranszmitterek  $\text{Ca}^{2+}$ - dependens exocitózisának regulációja. A szinaptikus vezikulumok itt kötődnek meg és fuzionálnak a plazma membránnal, így adva le az általuk tartalmazott transzmittert a szinaptikus részbe. Bár számos fehérje került azonosításra a vezikulum-fúzió organizációjának szerepkörében, a szinaptikus hólyagok aktív zónához irányításának, ezen a helyen történő megkötésének és exocitózisra való előkészítésének pontos molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert. Az aktív zóna területén a citomátrix számos fehérjéje vesz részt a jelátvitel szabályozásában egyedülálló funkcionális egységet kialakítva. Ez a CAZ (cytomatrix at the active zone), vagyis az aktív zóna citomátrixa. A CAZ fehérjéi feltehetőleg nagy jelentőséggel bírnak e funkciók kivitelezésében, ezért rendkívüli fontosságú felépítésük és működésük megértése (*Ohtsuka et al., 2002; Murthy és DeCamilli, 2003; Dieck et al., 2010; Gundelfinger et al., 2012*).

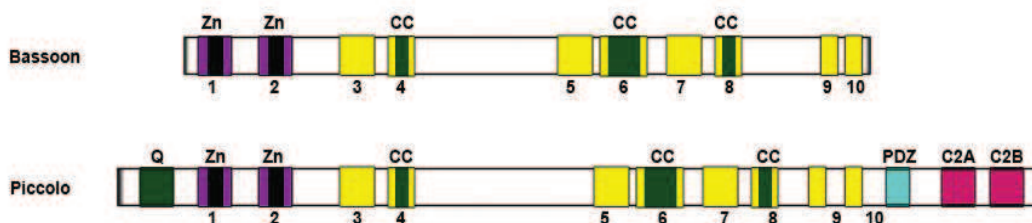
A továbbiakban e fehérjék ismertetésére helyezem a hangsúlyt.

### Bassoon és Piccolo

A CAZ-proteinek közül néhány szoros és közvetlen asszociációban létezik és működik a szinaptikus ribbonokkal, ilyen például a Bassoon és a Piccolo is (*Dieck et al., 1998*). Ezek közül a Bassoon csak fotoreceptorokban figyelhető meg, míg a Piccolo bipoláris neuronokban is jelen van (*Dick et al., 2001*). Ugyancsak említésre méltó, hogy a Bassoon a szinaptikus ribbonok alapi régiójának felépítésében, míg a Piccolo az aktív zónától távolabb, a ribbon szómális területein fordul elő nagy számban (*Dieck et al., 2001*).

A következőkben a 6. ábra alapján ismertetem a Bassoon szerkezetét.

6. ábra. A Bassoon és a Piccolo szerkezeti egységei (*Craig et al., 2000, átalakított ábra*):



Egy 1998-as vizsgálat alapján, a Bassoon (~420 kDa) tartalmaz két 'cink-csipesz' szerkezeti egységet (az ábrán 1-es és 2-es) az amino-terminálisánál, mely felelős lehet a vezikulum asszociált protein-protein interakciókért, így szabályozva a neurotranszmissziót. Található a szerkezetében három 'csavart-csavar' (coiled-coil) domén (ábrán 4-es, 6-os és 8-as), melyek lehetővé teszik a Bassoon interakcióját más preszinaptikus proteinekkel. A molekulán belüli előfordulásukban fajspecifikus számbeli eltéréseket mutató, ún. 'heptad' ismétlődéseket tartalmazó szekvenciák (K-A-S-P-Q-A/T-X) felelősek lehetnek a prolin-direktált protein kinázok foszforilációs helyeinek kialakításáért, számos celluláris szubsztrát regulációján keresztül adva le extracelluláris szignálokat (az ábrán 3 van feltüntetve, ez jellemző a patkányra: 3-as, 5-ös és 7-es). A karboxi terminális közelében, valószínűsíthetően található egy, vagy több, 24 tagú poliglutamin-szakasz is (9-es és 10-es) (*Dieck et al., 1998*).

A C1, vagy 'zinc-csipesz' domének, melyeket elsőkét a protein-kináz C funkcionális csoportjaiként azonosítottak, összetett funkcionális egységei az olyan aminosavaknak illetve fehérjéknek is, melyek működésük érdekében két cink iont kötnek stabilan az N-terminálisuk közelében. Tulajdonképpen, a C1 megjelölés minden olyan doménre vonatkozik, mely homológiát mutat a protein-kináz C egy cisztein gazdag ismétlődő szakaszának szekvenciájával, két cink iont képes megkötni és ezáltal aktiválni a protein-kinázt, mely tulajdonsága utal a C1 domén másik elnevezésére, a bizonyos 'cink-ujjacska' vagy 'cink-csipesz' (zinc finger) utalásra (*Hurley et al., 1997; Wang et al., 2009*).

Egerekben a Bassoon kódoló gén kiütésével az is kiderült, hogy a Bassoon esszenciális a fotoreceptorok szalag-szinapszisainak kialakításában, hiszen hiányában a ribbon ki sem fejlődik vagy szabadon úszik a citoplazmában s ledisszociálva a plazmamembránról, ezáltal eltávolodva az aktív zónától elveszíti funkcióját, ezzel is jelezve ennek a fehérjének a jelentőségét a szinapszis kihorgonyzásában s ezzel működésének fenntartásában (*Dick et al., 2003; Takao-Rikitsu et al., 2004*).

Mi lehet akkor a magyarázata annak, hogy ez a protein a bipolárisok ribbonjainak szerkezetéből hiányzik? Említésre méltó ugyanis az a tény, hogy a Bassoon 'knock-out' semmilyen hatással nem volt a bipolárisok ribbonjainak kialakulására illetve működésére (*Dick et al., 2003*).

Milyen más mechanizmus létezik tehát a Bassoon szerepének helyettesítésére és jár-e ez valamilyen működésbeli eltéréssel a bipolárisokban a fotoreceptor ribbon szinapszisokhoz képest? E kérdések megválaszolása közelebb vihet minket a bipoláris neuronok és fotoreceptor sejtek szinaptikus termináljainak működésében fellelhető eltérések megértéséhez.

A Piccolo (>420 kDa) szintén egy multidomén, N terminálisánál 'cink-ujjacska' tartalmazó protein, benne is megtalálhatók az ún. 'csavart-csavar' szekvenciák, valamint az aminosav

szekvenciája miatt is rokonítható a Bassoonnal (6. ábrán a számmal jelölt szakaszok és a 'Q', mely a glutamin-gazdag 'heptad' ismétlődéseket tartalmazó szekvenciát reprezentálja). Korábbi tanulmányok szerint, patkány agyi régiókban, a Piccolo 'cink-csipesze' megköti a synaptobrevinII excitotikus protein PRA1 nevű receptorát a glutamáterg és GABAerg szinapszisok aktív zónájánál, (Fenster *et al.*, 2000) ezért minden bizonnyal a Bassoonnal kölcsönhatásban képes modulálni a szinaptikus vezikulumok excitotikus ciklusát (Bucci *et al.*, 1999).

A Piccolo felépítésében a Bassoontól eltérő funkcionális egységeket is találunk, ilyenek a PDZ és C2 domének a karboxi terminális közelében (6. ábra).

A PDZ domének (6. ábrán világoskék) felelősek az aktív zóna multidomén fehérjéinek a felhasználás helyszínére szállításáért, valamint ezen fehérjék között protein-protein interakciók kialakításáért s így ezek csoportosításáért a sejtnek ezen a specifikus területén. A PDZ domének tehát kulcsfontosságúak a CAZ fehérjéinek organizációjában, azok funkció-célzott komplexeinek kialakításában (Kim és Sheng, 2004).

A C2 domén (6. ábrán lila) a  $Ca^{2+}$  kötő képességéről ismert aktív szakasz, melyet eredetileg a kalcium-dependens protein-kináz C egy izoformájaként azonosítottak. Ezek a domének általában az eukarióta sejtek olyan szignál-proteinjének funkciós csoportjai, melyek interakcióba léphetnek a sejtmembránnal és számos intracelluláris folyamat irányításában, közvetítésében játszanak szerepet. Ilyen például a membrán-transzport, GTP-ázok aktivációja és a protein foszforiláció kontrollálása. A C2 domének változatos csoportot alkotnak, melyek számos ligand és szubsztrát megkötésére képesek. Ilyenek a kalcium-ion mellett a foszfolipidek, inositol polifoszfátok és intracelluláris, például CAZ proteinek (Nalefski és Falke, 1996).

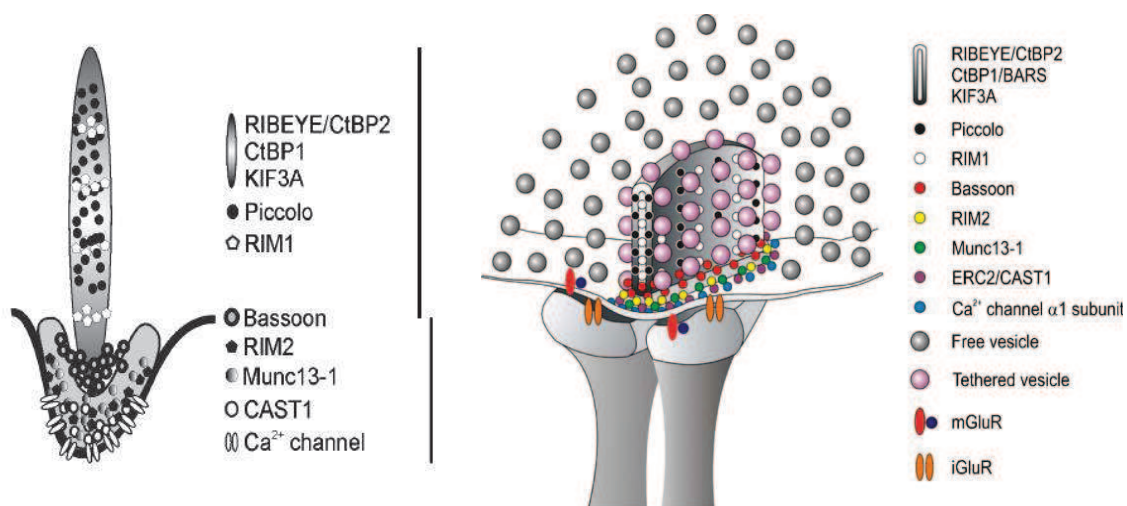
A Piccolo C2 doménje különleges szerkezettel rendelkezik, ugyanis tartalmaz bizonyos aszpartát oldalláncokat, melyek bizonyítottan a  $Ca^{2+}$  megkötéséért felelősek, ebből kifolyólag a Piccolonak fontos szerepe lehet a kalciumszint és ez által a neurotranszmisszió szabályozásában (Fenster *et al.*, 2000).

A Bassoon és a Piccolo molekuláris struktúrájában talált nagyfokú egyezés arra utal, hogy ez a két protein hasonló funkciót láthat el egymástól különböző szinapszisokban, vagy pedig eltérő feladatoknak tesz eleget azonos szinapszisokban. Fenster adataiból levonható az a következtetés, hogy az említett fehérjék egymást funkcionálisan kiegészítő, együttesen jelenlévő alkotóelemei a serkentő és gátló, agyi, glutamáterg és GABAerg szinapszisoknak (Fenster *et al.*, 2000).

Susanne tom Dieck és munkatársai kezdték el vizsgálni elsőként a Bassoon és a ribbon-specifikus RIBEYE fehérje esetleges kolokalizációját. Vizsgálatuk lényege a Bassoon

interakciós partnereinek felderítése volt, mégpedig a protein centrális régiójára specifikusan, amelyet mutáns egerekből eltávolítottak. Eredményeik szerint a Bassoon közvetlen interakcióba tud lépni a RIBEYE B-doménjével valamint a CtBP1 fehérjével is, még hozzá a fotoreceptor ribbon alapi régiójánál. Dieck és munkatársai kutatásaikra támaszkodva a ribbon szinapszisokat két, funkcionálisan eltérő részre osztották fel, melyek különböznek molekuláris felépítésükben is; ezt mutatja be a 7. ábra Dieck és mtsai. 2005-ös és 2006-os cikkéből.

7. ábra. A szinaptikus ribbonok funkcionális egységeinek felépítése:



Az említett egységek tehát a CAZ ribbon-asszociált és membrán (arciform density) - asszociált komplexéből állnak, előbbi, kialakítva a ribbon strukturális egységét tartalmazza a RIBEYE/CtBP2-t, CtBP1-et, KIF3A-t, Piccolo-t és RIM1-et, utóbbi pedig maga az aktív zóna, melynek építőelemei a Bassoon, RIM2, Munc13-1, CAST1, valamint a kalcium csatornák. A kísérletek alapján pedig kijelenthető, hogy a Bassoon e két funkcionális egység összekötő-eleme a fotoreceptor ribbon szinapszisokban (Dieck *et al.*, 2005; Dieck and Brandstätter, 2006).

Frank és mtsai 2010-es tanulmányából arra is fény derült, hogy a Bassoon és ezzel a szinaptikus ribbon felelős a kalcium csatornák és szinaptikus vezikulumok organizációjáért és ezen keresztül a neurotranszmitter kibocsátás helyszínének kialakításáért, valamint az exocitotikus készlet, azaz a szinaptikus vezikulumok visszatöltődésének biztosításáért, felgyorsításáért (Frank *et al.*, 2010). Frank és munkatársai 'Bassoon-kiütött', mutáns egerekkel dolgoztak, amelyeken megfigyelték, hogy a belső fül szőrsejtseiben lévő szinaptikus ribbonok nagy része ledisszociált az aktív zóna területéről és ezeknél jellemzően alacsonyabb volt a membránközeli vezikulumok száma.

Ebből arra következtettek, hogy Bassoon hiányában a ledisszociált vagy csak gyengén kötött ribbonok nem tudtak kellőképpen hozzájárulni a vezikulumok aktív zóna-közeli membránhoz kapcsolásához. A mutáns fenotípus tipikusan kevesebb kalcium csatornát is tartalmazott,

melyek ráadásul abnormális elrendeződésű csoportokban jelentek meg. Következésképpen a gyors és egyenletesen hosszantartó excitáció is redukálódott, in vitro kísérleti eredmények pedig azt mutatták, hogy a szinaptikus vezikulum-visszatöltődés is kárt szenvedett (*Mukherjee et al., 2009; Frank et al., 2010; Hallermann et al., 2010; Zenisek et al., 2010*).

Összefoglalva tehát a Bassoon (és a ribbon) a kalcium csatornák és a vezikulumok organizációjával nagyszámú kibocsátó helyet alkot meg s ezen felül szerepe van a szinaptikus vezikulumok visszatöltődésében is.

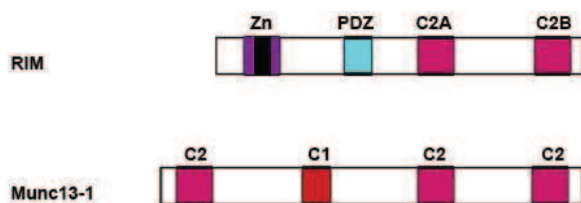
### **CAST, ELKS, RIM, Munc13-1**

A CAZ (Cytomatrix at the Active Zone) proteinek népes családjának - felsorolásunk szempontjából - utolsó tagjai, melyek a szinaptikus ribbonok szerkezetében is fellelhetőek s így felelősek lehetnek a fotoreceptorok és bipoláris neuronok neurotranszmissziójának szabályozásáért, valamint az ún. szinaptikus vezikulum-ciklus irányításáért, azok a CAST, RIM és Munc13-1 nevű fehérjék.

- 2002-ben fedezték fel a **CAST** (CAZ-associated structural protein) proteint, mely egy körülbelül 120 kDa-os, elsőként patkány agyból izolált, alkotó eleme a citomátrix aktív zónájának. Nincs transzmembrán szegmense, ugyanakkor tartalmaz négy 'csavart-csavar' domént, valamint található a szerkezetében egy funkcionálisan a karboxi-terminálisnak megfeleltethető ún. IWA (izoleucin-triptofán-alanin) motívum, mely specializáltan a PDZ domének felismerésére és a hozzájuk való kapcsolódásra alkalmas. Patkány agyban a CAST közvetlenül képes kapcsolódni a RIM1 molekulához, ezáltal fontos szerepet töltve be annak lokalizációjában és közvetlen kapcsolatban áll a Munc13-1-gyel, valószínűleg a RIM1-gyel létesített kapcsolaton keresztül, így alkotva egy speciális hármas komplexet. Említésre méltó még e ponton a Bassoon is, ami mint tudjuk ugyancsak egy CAZ fehérje és szintén szoros asszociációban létezik az előbb említett hármas-komplexszel a CAST megkötésén keresztül (*Ohtsuka et al., 2002; Siksou et al., 2007; Inoue et al., 2006*).
- Létezik egy, a CAST fehérjével nagyfokú strukturális rokonságot mutató protein, az ún. **ELKS**, mely szintén kapcsolódik a retina szinaptikus ribbonjaival. Tawarada és mtsai 2006-ban végeztek kutatásokat ennek a fehérjének a retinán belüli eloszlását illetően összevetve már beazonosított, aktív zónában működő proteinekkel, mint például a Bassoonnal és a RIM-mel. Csak úgy, mint a CAST, az ELKS is előfordult a retina IPL és OPL, azaz belső és külső szinaptikus rétegében, valamint teljes kolokalizáció volt kimutatható a Bassoonnal és RIM-mel is, úgy, mint a CAST esetében. Ezekhez a proteinekhez hasonlóan az ELKS is kimutatható volt a ribbon

szinapszisok preszinaptikus zónájában, de a másik három fehérjével ellentétben, melyek előfordulására a szinaptikus szalagok bazális területe volt jellemző, az ELKS inkább a ribbonok körül volt megtalálható (*Deguchi-Tawarada et al., 2006*).

8. ábra. RIM és Munc13-1 sematikus szerkezete (*Craig et al., 2000, átalakított ábra*):



A RIM és Munc13-1 fehérjék azonosítása már a CAST felfedezése előtt megtörtént.

- A **RIM1** egy körülbelül 180 kDa-os fehérje, mely bizonyítottan aktiválja a Rab3A molekulát, egy kis mértű G-proteint a szinaptikus vezikulumok membránján; szerkezetében hordoz két amino-terminális 'cink-csipeszt' (ábrán lila/Zn), egy PDZ (világoskék) és két C2 domént (sötét rózsaszín). Feltehetőleg a vezikulum készlet feltöltéséért (vesicle replenishment) felelős, de a CAZ szerkezetének organizációjában nincs szerepe, hiszen a RIM1-kiütött egerek aktív zónája intakt maradt. Egy 2002-es kutatás szerint a szinaptikus proteineken kívül kötődik a kalcium csatornákhöz is, ám ezen interakciók pontos molekuláris háttere, mechanizmusa és funkciója még kevésbé ismert. A RIM1 és a Munc13-1 a neurotranszmitterek  $Ca^{2+}$ - dependens exocitózisának beállításáért felelős proteinek (*Ohtsuka et al., 2002*). Ohtsuka kutatócsoportja 2004-ben bizonyítékot szolgáltatott arról is, hogy patkány agyban a CAST nemcsak a RIM1-et és Bassoon-t köti, hanem direkt kapcsolatban áll a Piccolo fehérjével is, így meghatározó szerepe lehet a neurotranszmitter kibocsátás folyamatában (*Fukuda, 2003; Ohtsuka et al., 2004*).
- A RIM proteinek családjának egy másik tagja is megtalálható a szalag-szinapszisok szerkezetében, ez a **RIM2**, mely nagyfokú szerkezeti homológiát mutat az előbb ismertetett fehérjével, de elhelyezkedése a ribbonon némiképp eltér a RIM1-étől (7. ábra). Susanne tom Dieck kutatásai azt igazolják, hogy nagy az eltérés a CAZ fehérjéknek organizációjában, ha összehasonlítjuk az agy és a retina szinapszisainak aktív zónáját. Vizsgálataikban ezeknek a proteineknek a kolokalizációját figyelték meg a RIBEYE-jal. Kiderült, hogy a szinaptikus ribbonok szerkezetében is

megtalálhatóak a RIM fehérjék (1 és 2), a CAST1 és a Munc13-1, azaz kolokalizációt mutattak a RIBEYE-jal. Bassoon-kiütött egerekben azonban, ha a ribbon szabadon úszott a citoplazmában, csak a RIM1 és a Piccolo kolokalizált a ribbon specifikus fehérjével, a RIM2, CAST1, Munc13-1 (és a  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna  $\alpha 1$  alegysége) ebből kifolyólag az aktív zóna organizációjáért felelős (Dieck et al., 2005).

- A **Munc13-1** tartalmaz egy C1 (ábrán narancssárga) és három C2 domént (sötét rózsaszín), melyek mediálják a forbol-észterhez és a diacil-glicerolhoz történő kapcsolódást, valamint a foszfolipid dependens  $\text{Ca}^{2+}$  megkötést (Ohtsuka et al., 2002). Az N-terminális közeli C2 domén (ábrán az első) lehetővé teszi ennek a fehérjének a kapcsolódását a RIM, CAST és Bassoon molekulákkal (Wang et al., 2009).

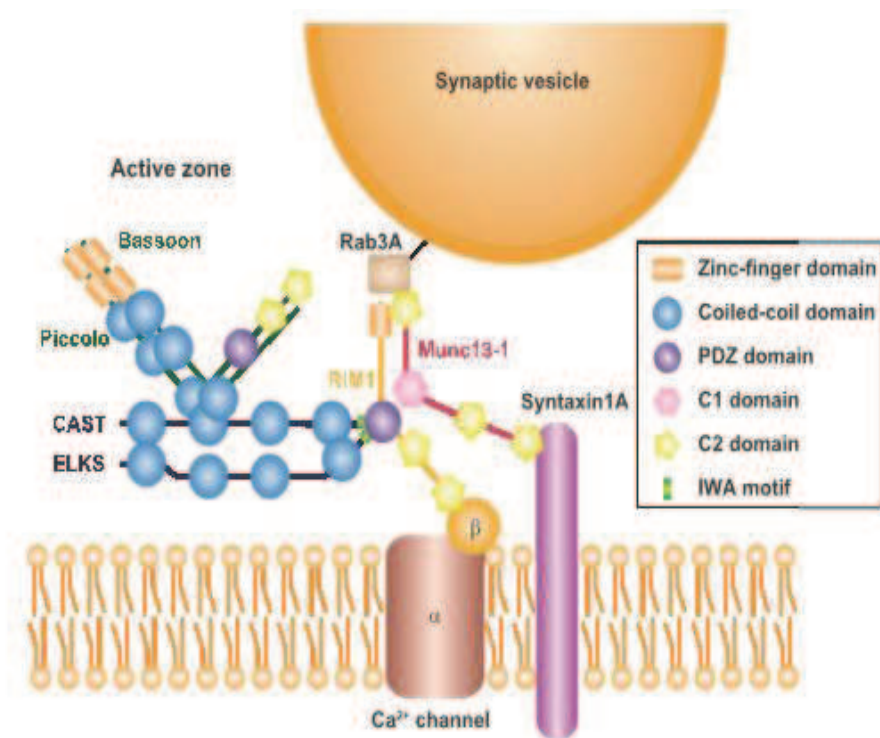
A Munc13-1 a vezikulumok összegyűjtésének és az aktív zóna membránján történő rögzítésének a szabályozásában vesz részt így készítve elő a transzmitter leadását. Az eddigi kutatási eredmények arra utalnak, hogy ennek a funkciónak az ellátásához szükség van a Munc13-1 interakciójára a Syntaxin1 nevű szinaptikus proteinnel, máskülönben nem történik meg a vezikulumok fúzió-kompetenssé válása. Megjegyzendő, hogy a Munc13-1 kiütött mutánsokban az exocitózishoz előkészített vezikulumok készletének újrafeltöltése és a  $\text{Ca}^{2+}$  dependens fúzió, azaz a transzmitter ürítés nem szenvedett károsodást a már előkészített, fúzió-kompetens vezikulumoknál (Stevens et al., 2005).

Új eredmény, hogy a Munc13-1 izotípusa, az ún. **ubMunc13-2** az egyetlen Munc13 fehérje, ami jelen van a fotoreceptor ribbon szinapszisok aktív zónájában körülbelül 250 nm távolságra a CAZ-tól. Funkcióját ubMunc13-2- kiütött mutáns egerek retinájának vizsgálatával mérték fel. Az adatok szerint az elektroretinogram b-hulláma, mely a fotoreceptorok ON-bipolárisok felé történő transzmissziójának fiziológiájára utal, csekély mértékű, de szignifikáns redukción szenvedett (Cooper et al., 2012).

Végezetül és összefoglalás képpen, a **9. ábra** jól szemlélteti az aktív zóna protein-protein interakcióinak bonyolult hálózatát. Megjegyzendő, hogy így csak hozzávetőleges betekintést nyerhetünk az interakciók alakulásáról illetően, hiszen az ábra, nem a retina ribbon szinapszisainak aktív zónáját szemlélteti, valamint ezeknek a hálózatoknak a pontos működése kevésbé ismert és az összes fehérje kapcsolat minden bizonnyal még nincs feltárva.

Mint látható, a CAST és ELKS képesek egymással homo- és hetero-oligomerek kialakítására, sőt az ELKS/CAST oligomer második 'csavart-csavar' doménje kapcsolódik a Bassoon/Piccolo-komplex harmadik 'csavart-csavar' doménjéhez. A CAST és ELKS karboxi-terminálisánál található IWA motívum pedig szükséges a RIM1 PDZ doménjének megkötéséhez. A RIM1 a C1 doménje által kapcsolódik a Munc13-1-hez, mégpedig annak C2 doménjén keresztül (Hida és Ohtsuka, 2010).

9. ábra. Az aktív zóna protein interakciói (Hida és Ohtsuka, 2010):





# Funkció

## Általános

A pinealocytákban, a cochlea szőrsejtjeiben és a retinában a fotoreceptorokban és bipoláris neuronokban működő szinaptikus ribbonokról sokáig úgy vélték, hogy mintegy 'futószalag'-ként továbbítja a szinaptikus vezikulumokat az aktív zóna felé, így szabályozva az exocitózis mértékét. Ma a kutatási eredmények azt támasztják alá, hogy a ribbonok sokkal inkább speciális 'biztonsági övekként' funkcionálnak, stabilan rögzítve a vezikulumokat a preszinaptikus membrán közelében, előkészítve őket az érkező jelnek megfelelő összetett, a vezikulumok fúziója által megelőzött, tehát egyszerre több vezikulum transzmitterének leadását lehetővé tevő exocitózissra. Ez a 2003-ban felállított hipotézis elsősorban Parsons és Sterling nevéhez fűződik.

Az exocitózist különböző, a szinaptikus vezikulumok tartalmának leadását lehetővé tevő, előkészítő folyamatok előzik meg. A különböző szinapszisoknál ezek a folyamatok meghatározott egymásutániségben követik egymást. Első lépcsőként a vezikulumok a szintézis helyétől (ER) a citoplazmán át a szinaptikus terminálisig átesnek egy transzport folyamaton, ez a 'vesicle trafficking'. Az aktív zóna területén a vezikulumok koncentrálnak, szinaptikus apparátusokhoz (ribbon) kötődnek, ez a 'vesicle tethering'. A vezikulumok ezt követően a plazmamembránhoz kötődnek, ez a 'docking'. A 'priming' azoknak a procedúráknak a gyűjtő fogalma, amelyek a vezikulum membránjának ATP-függő protein és lipid átrendeződései által a vezikulumok fúzió-kompatibilitását kialakítják. Ezt követően a kalcium ionok megfelelő koncentrációja marad az egyetlen hiányzó stimulus a vezikulumok fúziója előtt. A 'priming' után tehát a megfelelő ionáram képes beindítani az exocitózist, megkezdődhet a vezikulumok összeolvadása a plazmamembránnal.

Parsons és Sterling 2003-as cikkükben állást foglalnak egy feltevés mellett, miszerint a ribbon szinapszisokon megkötött vezikulumok száma talán megfeleltethető az exocitózishoz előkészített, transzmitter leadásra készen álló vezikulumok ('readily releasable pool') számának. Mi több, ezek a vezikulumok valószínűleg már átestek a 'priming' procedúráján is, hiszen a transzmitter leadáshoz nem igényelnek ATP hidrolízist. A szinaptikus ribbonoknál ez azért egyedi, mert a 'priming'-ot nem feltétlenül előzi meg a 'docking', a vezikulumok a ribbonhoz kötve a plazmamembránnal való találkozás előtt már fúzió-kompetensek lehetnek.

Az exocitózis valójában két komponensből áll; elektroretinogrammal (ERG) megfigyelhető, hogy egy gyors és egy lassú fázisa van. A ribbon szinapszisokon ez valószínűleg úgy tevődik össze, hogy a gyors komponensért ('ultrafast') azok a vezikulumok felelősek, amelyek a ribbonok alapi részénél, a legközelebb helyezkednek el a preszinaptikus membránhoz/aktív

zónához, a lassabb komponenst pedig valószínűleg a ribbonon megkötött összes többi leadásra előkészített ('readily releasable') vezikulum szolgáltatja. Ez felvetette a kérdést, hogy vajon a vezikulumok ribbon-menti mozgása teszi lehetővé a nagy mennyiségű, gyors transzmitter leadást?

A Muresan és munkatársai által 1999-ben felfedezett KIF3A motorprotein jelenléte ellenére – melynek működését egy ismert mechanizmus sem teszi lehetővé a ribbonok szerkezetében – semmilyen ismert elv alapján nem mozoghatnak olyan gyorsan a szinaptikus vezikulumok a ribbon szinapszisok gerince mentén, hogy az az exocitózis gyors komponensének sebességére magyarázattal szolgálhasson.

Ezért Parsons és Sterling más megoldás után kutatva feltételezték, hogy a vezikulumok talán nem is mozognak a szinaptikus szalagok felszínén, hanem egy összetett fúziós kaszkád ('compound fusion') segítségével a vezikulumok egymás után egybeolvadnak a növekvő intracelluláris kalcium koncentráció miatt és így egyszerre adhatják le a neurotranszmitter nagy mennyiségét hihetetlenül rövid idő alatt. Habár 2003-ig, amikor Parsons és Sterling kidolgozták elképzelésüket, idegsejteknél nem talált hasonló jelenségre példát senki, ez a 'módszer' bizonyított és jól működik számos sejt, például a vér granulocitáinak összetett exocitózisában is.

A vezikulumok fúziójának pontos mechanizmusa a ribbon típusú szinapszisoknál a mai napig vitatott, ezért a következőkben lépcsőről-lépcsőre áttekintem mindazokat a folyamatokat, amelyek a neurotranszmitter felszabadítását idézik elő az exocitotikus proteinek interakciójától és a  $Ca^{2+}$  csatornák funkciójától kezdve egészen a vezikulumok fúziós masinériájának működéséről felállított hipotézisek, valamint az exocitózis és az endocitózis egzakt lefolyásának részletezéséig.

## **Exocitotikus proteinek**

Aaron J. Mercer és Wallace B. Thoreson 2011-ben elsőként foglalta össze a megszerzett evidenciákat a szinaptikus ribbonok közelében működő exocitotikus fehérjék jelenlétéről és funkciójáról.

Az idegsejtekben azonosított és jól ismert, a membránfúzió irányításáért felelős SNARE fehérje (SNAP – Soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive factor] Attachment Protein - REceptor) komplexek hiánya a belső fül szőrsejtjeinek ribbon szinapszisaiban már igazolt. Mindazonáltal, a retinális idegsejtek szinaptikus szalagjai mellett működik néhány SNARE protein a vezikulumok preszinaptikus membránhoz fuzionáltatásának kivitelezéséhez, ilyen

például a synaptobrevin, mely ez esetben a v-SNARE (vezikuláris SNARE), a SNAP-25 (synaptosomal-associated protein – 25kDa) és a syntaxin, valamint a complexin pedig a t-SNARE (target SNARE), de néhányuk v-SNARE-ként is funkcionálhat.

Ezek a proteinek egymáshoz kapcsolódva kialakítják a membránfúzióhoz szükséges ('minimal core fusion complex') komplex(ek)et s így létrejöhet az exocitózis.

A synaptobrevin kizárólag a vezikulumok membránjában van jelen - erre utal másik elnevezése is: vesicle-associated membrane protein (VAMP) -, immunológiailag jelölt és elektronmikroszkóppal megvizsgált minták alapján feltételezhető ezzel szemben, hogy a SNAP-25 és a syntaxin nem csak a ribbonon sorakozó vezikulumok membránjában, de a preszinaptikus membránban is megtalálható.

A vezikuláris SNAP-25 felelős lehet a 'priming' és a 'compound fusion' kivitelezéséért még az exocitózis előtt.

A synaptobrevin 2-es izoformája (VAMP2) eddigi tudásunk alapján jelen van mind a konvencionális, mind pedig a ribbon szinapszisokban, de a VAMP1 látszólag csak fotoreceptorokban fordul elő, bipoláris neuronokból hiányzik.

A ribbon szinapszisok szerkezetében megtalálható az ún. Munc-18 protein is, amely hozzájárul a SNARE komplexek csoportosításáért és feltételezhetően a SNAP-25 funkciójának kiegészítése által a vezikulum 'priming' elősegítéséért.

Eltérően más idegsejtektől, a fotoreceptorok szalag szinapszisaiban a syntaxin1 helyett a syntaxin3 expressziója figyelhető meg s a retinális ribbon szinapszisokra általánosíthatóan a syntaxin3 és 4 izoformái helyettesítik a syntaxin1 és 2 fehérjéket. A syntaxin3 aktivitásának feleltethető meg a synaptobrevin, SNAP-25 és complexin molekulákból álló exocitotikus komplexum létrejötte.

Hasonló eltérés figyelhető meg a retinális ribbon szinapszisoknál működő complexin (cytoplasmic synapse-associated protein) molekulákban is, hiszen a legtöbb konvencionális szinapszis preszinaptikus termináljában jelen lévő complexin1 és 2 helyett itt is a 3-as és 4-es izoformák figyelhetőek meg. A complexin molekulák szinaptikus aktivitásban betöltött szabályozó funkcióját igazolja, hogy a complexin3/4 kiütött mutáns egerekben a retina preszinaptikus termináljainak 25%-ánál volt megfigyelhető, hogy a szinaptikus ribbonok egy része leválik az aktív zónáról, szabadon, funkció nélkül lebeg a citoplazmában (*Kerstin Reim et al., 2005*).

A kalcium szenzor molekulák működése, melyek az exocitózis szabályozásáért felelősek a fotoreceptor sejtekben, még nem ismert minden részletében. A gerinctelenek csap és pálcika receptorainak vizsgálata során fény derült a szenzorok extrém magas kalcium szenzitivitására; itt 2db  $Ca^{2+}$  ion is elegendő a működésbe lépésükhöz, míg a synaptotagmin1 szenzorral

működő szinaptikus terminálok számára 5db  $\text{Ca}^{2+}$  ion szükséges hasonló hatás eléréséhez. A szalamandra pálcika terminálisait jól jelölik a synaptotagmin1 kalcium szenzorra specifikus antitestek, míg más fotoreceptor terminálisokat sem a szalamandra, sem az aranyhal retinájában nem jelölték. Ennek ellenére az emlős és csirke retina fotoreceptorainak ribbon szinapszisait szépen jelölték a synaptotagmin1-re készített antitestek az OPL-ben. Egy másik ismert kalcium szenzor, a synaptotagmin2 antitestjei azonban nem jelölték a fotoreceptor terminálisokat a csirke, egér, szalamandra vagy aranyhal retinában, eltérően a rája retinájának fotoreceptor terminálisaitól. A synaptotagmin3 fajok közti eloszlása is kérdéseket vet fel, hiszen aranyhalban a pálcikák ON bipoláris neuronjai tartalmazzák, de például rágcsálók ugyanezen sejtjei nem. Más vizsgálatok alapján, melyek szerint az otoferlin és a synaptotagmin4 a cochlea szőrsejtjeiben a kalcium szenzor, felvetődött ezen szenzorok lehetséges jelenléte a retinában is. Az otoferlin kimutathatóan hiányzik, a synaptotagmin4 retinális eloszlását pedig még nem vizsgálták (*Lenzi és Gersdorff, 2001; Berntson és Morgans, 2003; Heidelberg és Thoreson, 2005; Mercer és Thoreson, 2011*).

A faji különbségek okai tehát tisztázatlanok, melyeknek felderítése nagyban hozzájárulna a neurotranszmisszió szabályozásának pontosabb megértéséhez.

### **Kalcium csatornák**

A membránpotenciál-függő kalcium csatornák (voltage-gated calcium channels,  $\text{Ca}_V$ ), melyek a neurotransmitter felszabadítást szabályozzák a ribbonok 'alatt', a preszinaptikus membránba ágyazottan helyezkednek el. Fagyasztva-töréses technológiával, elektron mikroszkóppal megvizsgált csap és pálcika terminálisoknál megfigyelték, hogy az aktív zóna közelében hexagonális 'testecskék' sorakoznak, melyek minden bizonnyal a kalcium csatornákra utaltak (1982). Egy a pálcika fotoreceptorok kipreparált mintáin végzett kísérletben eltávolították a szinaptikus terminálisokat s ez 95%-kal csökkentette a kalcium beáramlását, jelezve, hogy a kalcium csatornák domináns tömege tényleg a fotoreceptor terminálisoknál helyezkedik el, mely tény immunhisztokémiai vizsgálatokkal is alátámasztották (*Mercer és Thoreson, 2011*).

A konvencionális szinapszisokkal szemben a szinaptikus ribbonokkal rendelkező sejtek aktív zónái L-típusú kalcium csatornákkal rendelkeznek, azon belül a  $\text{Ca}_V1.3$  vagy  $\text{Ca}_V1.4$  izoformák jellemzőek rájuk sejtípustól függően.

Ezek a csatornák negatív feszültségnél aktiválódnak; az inaktiválódás lassú, így relatíve hosszú ideig biztosított a  $\text{Ca}^{2+}$  -ion beáramlás, amely a preszinaptikus membrán elnyújtott

depolarizációját eredményezi, mintegy pozitív visszacsatolásként hosszabbítva meg a csatornák aktivitását. A tény, hogy a csatornák térben nagyon közel helyezkednek el a membránhoz legközelebb megkötött, exocitózishoz előkészített, 'docked' vezikulumokhoz azt sugallja, hogy a csatornák megnyílása azonnali transzmitter leadást válthat ki ezeknél a vezikulumoknál.

Fontosságukat mutatja, hogy a csatornák működésének csökkenése vagy hiánya fotoreceptor diszfunkciót és ezzel együtt a látás károsodását vonja maga után egérben és emberben egyaránt (*Gary Matthews és Paul Fuchs, 2010*). Immunhisztokémiai vizsgálatok is alátámasztják, hogy a pálcika fotoreceptorok kalcium csatornáinak fő képviselője a  $Ca_v1.4$ -es izotípus, melynek mutációi jelentősen csökkentik az elektroretinogram (ERG) b-hullámain, fejlődésben lévő szervezetekben deformálódott ribbon szinapszisokat eredményeznek és a szürkületi vakság egy formáját (X-linked congenital stationary night blindness – CSNB) vonják maguk után az embereknél. A  $Ca_v1.3$  csatornák kiütése nem változtatja meg szignifikáns mértékben az ERG b-hullámok frekvenciáját; immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeivel összevetve a jelenség feltételezett magyarázata az, hogy ezek az izotípusok csak a csap fotoreceptorok egy szubpopulációjában vannak jelen (*Ball et al, 2002; Thoreson, 2007; Neher és Sakaba, 2008; Thoreson et al., 2009; Mercer és Thoreson, 2011*).

### **Vezikulum fúzió, fúziós modellek**

A szinaptikus ribbonokon megkötött vezikulumok eljutása az aktív zónáig még tisztázatlan. A bipoláris neuronok ribbonjain lévő, a preszinaptikus membrántól legtávolabb eső vezikulumok mintegy  $\sim 0.15 \mu\text{m}$  távolságban helyezkednek el a plazma membrántól; fotoreceptoroknál ez az érték még nagyobb, tekintve, hogy a szinaptikus ribbonok átlagos méretei is nagyobbak, a legtávolabbi vezikulum akár  $1 \mu\text{m}$  messze is lehet az aktív zónától. Hogyan küszöbölhető ki egy ilyen távolság az exocitózis kivitelezéséért?

Egy klasszikus hipotézis szerint, mely feltételezi, hogy a szalag szinapszisok speciális 'szállító szalagokként' (conveyor belt hypothesis) funkcionálnak, ez lehetséges volna valamilyen aktív transzport mechanizmussal, protein-protein interakciókon keresztül, ám ez a teória a legtöbb szempontból támadható, hiszen a szinaptikus ribbon motorproteinje, a KIF3A működéséhez mai tudásunk szerint nélkülözhetetlen az ATP hidrolízis, ilyen folyamatot azonban még nem detektáltak a ribbonokat hordozó terminálisok területén.

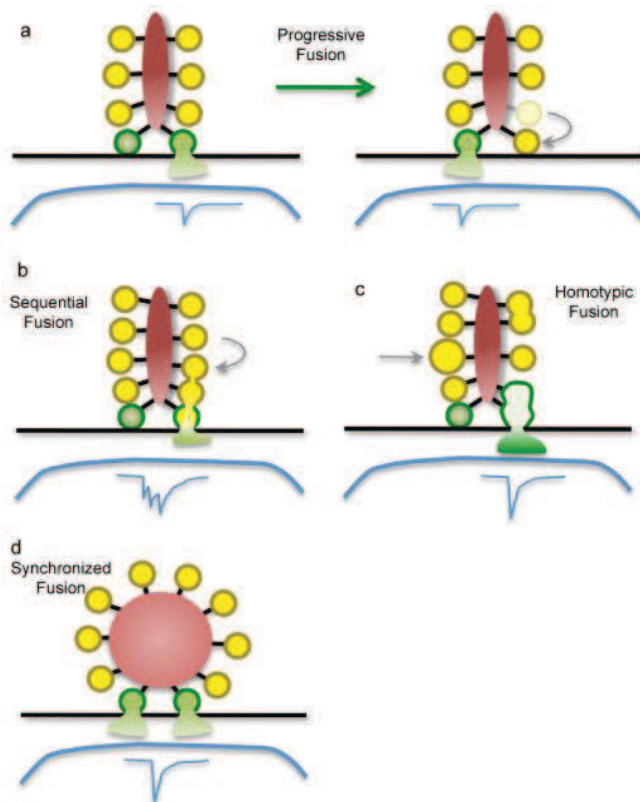
Egy másik lehetséges mechanizmus, hogy a szinaptikus vezikulumok valamilyen kalcium-függő módon ledisszociálnak a ribbon szinapszisok 'tartó filamentumairól' és diffúzió révén

jutnak el az aktív zóna plazmamembránjához. Ez az eshetőség is rengeteg kérdést vet fel azonban, kezdve azzal, hogy nem tudjuk, milyen mechanizmus irányíthatja a vezikulumokat a plazmamembránhoz a citoplazmán keresztül, figyelembe véve relatíve nagy (akár 1  $\mu\text{m}$ -es) távolságokat is.

A harmadik lehetséges és egyben legvalószínűbb magyarázat a vezikulumok fúziós kaszkádja (compound fusion), melyre több logikus modell is rendelkezésre áll. Az a feltevés mindegyikben közös, hogy csak az aktív zónához legközelebbi, a ribbon szinapszis alapi zónájánál megkötött vezikulumok fuzionálnak közvetlenül a plazmamembránnal, míg a többi, egymás után következő vezikulum egymással összeolvadva egyesíti neurotranszmitter tartalmát. A modellek mindegyikére találtak már evidenciákat, de ezek sejtspecifikus vizsgálata, a kérdések megválaszolása még rengeteg kutatómunkát igényel. A 10. ábra szemlélteti a modellek lényegi, logikai feltevéseit.

A zöld karikák reprezentálják a preszinaptikus membránhoz (fekete vonal) kötött vezikulumokat (docked vesicles), a kék görbék pedig a posztzinaptikus feszültséget.

10. ábra. Fúziós modellek (Heidelberger et al., 2005):



**a:** Progresszív fúziós modell, melyben a szinaptikus vezikulumok egymás után, egyenként kerülnek kapcsolatba a plazmamembránnal (docking), ezt követően megtörténik az exocitózis, bekövetkezik a depolarizáció, amely minden vezikulum után egy-egy egyedi, azaz egy csúcsú görbével jellemezhető feszültségváltozást hoz létre.

**b:** A 'compound fusion' egy formája az ún. 'sequential fusion', melynél a vezikulumok egymás után fuzionálnak, egyesülnek a ribbon gerince mentén, kezdve a 'docked' vezikulummal. Ez a modell az egybeolvadt vezikulumok számának megfelelő csúccsal rendelkező feszültségváltozási görbét eredményez, melynél a kiugró értékek gyors egymásutániságban következnek és egy-egy vezikulum transzmitterének leadását szemléltetik. A modell megfelelő magyarázattal szolgálna az ERG készülékeken is megfigyelhető gyors és lassú hullámnak, mely a ribbon szinapszisok exocitózisát jellemzi, hiszen a 'docked' vezikulumok kalcium hatására azonnal le tudják adni a transzmitterüket, amit a ribbon gerincén feljebb elhelyezkedő vezikulumok fúziója és egymás utáni transzmitterleadása követhet, hasonlóképpen az exocitózis gyors és lassú komponenséhez.

**c:** A 'homotypic fusion' modell lényege - melyben az előzőtől különbözik - , hogy a vezikulumok egymásba olvadása itt az exocitózis előtt következik be s így a teljes neurotranszmitter mennyiség egyszerre kerül leadásra, egy nagyobb csúccsal rendelkező feszültségi görbét produkálva.

**d:** A szinkronizált fúziós modell a 'docked' vezikulumok szabályozott, egyidejű exocitózisát feltételezi, mely az előbbihez hasonló, nagyobb csúcserővel rendelkező, egy csúcsú görbét hoz létre. A szinapszis gömb alakja arra utal, hogy valószínűleg a belső fül egy szinaptikus ribbonját használták szemléltető-eszközként (1.ábra). (Matthews, Sterling et al., 1996; Singer et al., 2004; Heidelberger et al., 2005; Matthews és Fuchs, 2010; Zampighi et al., 2011)

E modellek egy olyan kirakós játék mozaikjait jelképezik, melyek a meglévő építőkövekből, tehát a vezikulum fúzióról eddig megszerzett információink alapján a lehetséges működési elveket figyelembe véve álltak össze. Egyik sem bizonyított tény, hanem egy-egy sejtípus exocitotikus apparátusának működési elvein alapszik.

Lehetséges lenne, hogy a szinaptikus ribbonok vezikulumainak exocitotikus ciklusából hiányzik a 'docking'? Ha ez fennáll, mikor és hol, pontosan milyen módon játszódik le a 'priming'? Bizonytalan az is, hogy a beérkező kalcium egészen pontosan hogyan is irányítja a vezikulumok fúzióját. Az egész folyamatot szabályozzák-e a fényviszonyok?

A felvetődő kérdések megválaszolásával komplexebb képet kaphatunk a szinaptikus szalagokat hordozó preszinaptikus terminálisok működéséről.

## Excitózis

Anatómiai és fiziológiai adatok szerint a ribbon szinapszissal rendelkező exocitotikus terminálok legalább háromféle vezikulum populációval (vesicle pool) rendelkeznek: létezik ugyanis egy citoplazmatikus, egy ribbonhoz kötött és egy aktív zónához/plazmamembránhoz kötött (docked) vezikulum készlet. A citoplazmatikus vezikulumok elérkeznek a ribbonokhoz (diffúzióval vagy valamilyen aktív transzport mechanizmussal), hozzákapcsolódnak a szinaptikus szalagok vezikulum kötő filamentumaihoz, majd pedig valamilyen kalcium-függő módon eléri az aktív zónát és kihorgonyzódnak a plazmamembránhoz.

A rendelkezésünkre álló adatok szerint a citoplazmában a vezikulumok már glutamáttal legalább részlegesen feltöltött állapotban vannak és tartalmazzák membránjukban azokat a fehérjéket melyek a 'docking' és 'priming' procedúrájának kivitelezéséért felelősek (Heidelberger et al., 2005).

Fagyasztva töréses és TEM technológiák összevetett eredményei szerint sok fajban csupán a ribbon alapi részéhez kötött, az aktív zónához legközelebb lévő, hozzávetőlegesen 20-25 darab vezikulum áll direkt kapcsolatban a plazmamembránnal, tehát van 'docked' stádiumban (Sterling és Matthews, 2005).

A konvencionális szinapszisok esetében az excitózis előkészítése a vezikulumok aktív zónához érkezése, plazmamembránhoz kapcsolása (docking) és fúzióra történő felkészítése (priming) által történik meg (vesicle trafficking-tethering-docking-priming).

A ribbon szinapszisoknál ezzel szemben a ribbonhoz kötött vezikulumok mindegyike fúzió kompetens, tehát már átesett a 'priming' folyamatán függetlenül az aktív zónától való távolságától, ami azt jelenti, hogy egy kalcium impulzus hatására azonnal megtörténhet a vezikulumok fúziója a preszinaptikus membránnal, vagy egy másik vezikulummal, amennyiben 'compound fusion'-ról beszélünk. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a szinaptikus ribbonoknál a 'priming' talán megelőzi a 'docking' folyamatát, ám ennek pontos háttere molekuláris szinten még kevésbé ismert.

Az intracelluláris kalcium-ion koncentráció emelkedésének hatására a vezikulum(ok) membránja fuzionál a preszinaptikus membránnal és neurotranszmitterét, a glutamátot a szinaptikus részbe üríti. Ez a folyamat történhet egy apró póruson keresztül, amelyet a szakemberek 'kiss-and-run' excitóziként szoktak emlegetni. Ennek elvén a szinaptikus vezikulumok preszinaptikus membránnal történő ideiglenes fúziója során képződik egy fúziós pórus, ezen keresztül történik meg a glutamát leadása, ezt követően pedig a vezikulumok membránja nem olvad bele a plazmamembránba, hanem visszatér a preszinaptikus térbe. Mai tudásunk szerint ez a mechanizmus azonban nem jellemző sem a fotoreceptorokra sem pedig a bipoláris idegsejtekre. Sokkal valószínűbb a 'full fusion' elmélet, mely szerint a



vezikulumok membránja teljesen beleolvad a plazmamembránba, nem hagyva pórust maga után (Heidelberger *et al.*, 2005; Zanazzi és Matthews, 2009; Brandstätter *et al.*, 2011).

Annak ellenére, hogy az exocitózis pontos lefolyása, a vezikulumok exocitotikus ciklusának minden lépcsőfoka még nem ismert, azt tudjuk, hogy a ribbonhoz kötött vezikulumok szolgáltatják a neurotranszmitter felszabadításra készen álló készletet (readily releasable pool of vesicles), mely megmagyarázza, hogy hogyan teszik lehetővé ezek a specializált szerkezetű és funkciójú szinaptikus szalagok az extrém gyors neurotranszmitter felszabadítást.

## **Endocitózis**

Csakúgy, mint az exocitózis, az endocitózis is két kinetikailag elkülöníthető komponensből épül fel; egy gyors és egy lassú összetevőből áll. Rövidebb stimulus hatására bekövetkezik az endocitózis gyors fázisa, melyet elnyújtott ingerközlés hatására követ a lassabb. A gyors és lassú komponens azonban Zanazzi és Matthews (2009) szerint egymástól elkülönülten szabályozott, ezért felvetődik az az eshetőség, hogy eltérő molekuláris és celluláris mechanizmusok felelősek az előidézésükért, habár ezek működési elve még nem tisztázott. A legtöbb megfigyelés szerint az endocitotikus struktúrák túlnyomórészt az aktív zónához képest laterálisan helyezkednek el a fotoreceptorokban és a bipoláris idegsejtekben is.

Babai, Bartoletti és Thoreson 2010-ben megvizsgálta, hogy mi szabályozza a csap fotoreceptorok vezikulum készletének visszatöltődését (vesicle replenishment). Mint tudjuk, a fotoreceptorok glutamát leadása folyamatos sötétben s a fényerősség képes ennek az arányát szabályozni. Mivel a transzmitter kibocsátás a vezikulum készlet visszatöltődésének sebességétől is függ, Babai kutatócsoportja kíváncsi lett, vajon a membrán potenciál-változás miként hat a vezikulumok endocitózisára. A vezikulum készlet visszatöltődési sebességének megmérése az exocitózis és endocitózis közötti egyensúlyi állapot elérése után vált lehetővé, melyet teszt impulzusok alkalmazásával értek el.

A kalcium ionáram ( $I_{Ca}$ ) megnövelése a teszt impulzus által, melyet -30-ról -10mV-ra változtattak serkentette a vezikulum visszatöltődést, míg a +30mV-os teszt impulzus hatására lelassuló  $Ca^{2+}$  beáramlás a vezikulum készlet visszatöltődését is csökkentette. A kalcium pufferek alkalmazása során fény derült az exo- és endocitózis kalcium-függő tulajdonsága mellett arra is, hogy az exocitózis aktív zónán belüli helyszínei (release sites) <200nm távolságban helyezkednek el a  $Ca^{2+}$  csatornáktól, míg a visszatöltődési pontok >200nm távolságban helyezkednek el tőlük. Az tehát nagyon valószínű, hogy a kalcium ionok

felelősek a transzmitter leadás és a vezikulum visszatöltődés szabályozásáért is (*Babai, Bartoletti és Thoreson, 2010*).

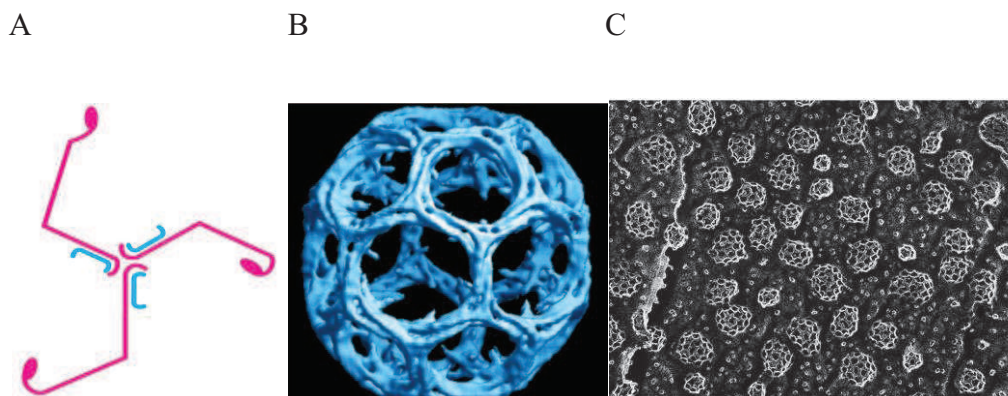
Az endocitózis egzakt lefolyásának lehetőségeit sok modellben boncolgatják. Egy lehetséges mechanizmus az endocitózis gyors komponensének kivitelezésére az exocitózisnál már ismertetett 'kiss-and-run' elmélet. Ellentmond a modell érvényességének az a tény, hogy nem tudtak megfigyelni hasonló folyamatot a bipoláris neuronokban sem teljes belső visszaverődésű fluorescens mikroszkópiával (total internal reflection fluorescent microscopy – TIRFM), sem pedig a fény interferenciáját kihasználó mikroszkóppal (interference reflection microscopy – IRF) (*Zanazzi és Matthews, 2009*).

A másik eshetőség a gyors fázisú endocitózis kivitelezésére a 'bulk' endocitózis, melynél nagyméretű, burokkal nem rendelkező invaginációk képződnek a plazmamembránon egy erős stimulus hatására, melyek aztán leszakadnak. Konvencionális szinapszisok esetében a stimulust követően 1-2 secundum múlva jelennek meg tömegesen ezek az endoszómák. Régóta ismert, hogy az anasztomizáló tubulusok és nagyméretű endoszómák fontos endocitotikus struktúrák cochleáris szőrsejtekben és bipoláris neuronokban is. Jelentőségük megállapításához a ribbon szinapszisoknál fontos tényező lenne a stimulustól a képződésükig eltelt idő pontos meghatározása annak eldöntése érdekében, hogy vajon az endocitózis gyors komponensével azonosíthatóak-e. Jelen tudásunk szerint sokkal valószínűbbnek látszik ezen képződmények egy, az endocitózis korai vagy intermedier szakaszában betöltött szerepe. Ezt bizonyítja a vezikulumok preszinaptikus térbe történő visszatérésének mechanizmusa, mely szerint a vezikulumok a plazmamembrán betüremkedő felületeiről sarjadzó endoszómákként jelennek meg újra a preszinaptikus tér citoplazmájában.

A szinaptikus ribbonokat hordozó preszinaptikus terminálok egy harmadik lehetséges módszere a vezikulumok visszanyerésére a clathrin-mediált endocitózis (CME). A clathrin nevű burokképző fehérjekomplex hármas szimmetriájú egységei, az ún. triszkelionok (*11. ábra*) formálnak az éppen invaginálódó membrán-rész köré egy burkolt öblöt, melybe összegyűjti a specifikus fehérjéket és mellyel kialakítja a vezikulumok geometriáját, hogy az véglegesen lefűződhessen a plazmamembránról a dynamin nevű endocitotikus fehérje GTP-áz aktivitása nyomán ebbe a clathrin burokba csomagolva.

A vezikulumok kicsomagolása egyéb fehérjék mellett a synaptojanin enzimatis aktivitása által történik. Az imént felsorolt fehérjék mindegyike megtalálható a fotoreceptorok és a bipoláris idegsejtek ribbonokat hordozó szinaptikus termináljaiban.

11.ábra. Clathrin triszkelion és burok: (A: rózsaszín: nehéz láncok, kék: könnyű láncok; B: spontán 3D szerveződés, C: clathrinnal burkolt 'tüskés' vezikulumok; <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Toran/clathrinbunch.jpg>; [http://www.rcsb.org/pdb/education\\_discussion/molecule\\_of\\_the\\_month/images/88\\_1xi4.jpg](http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/images/88_1xi4.jpg) )

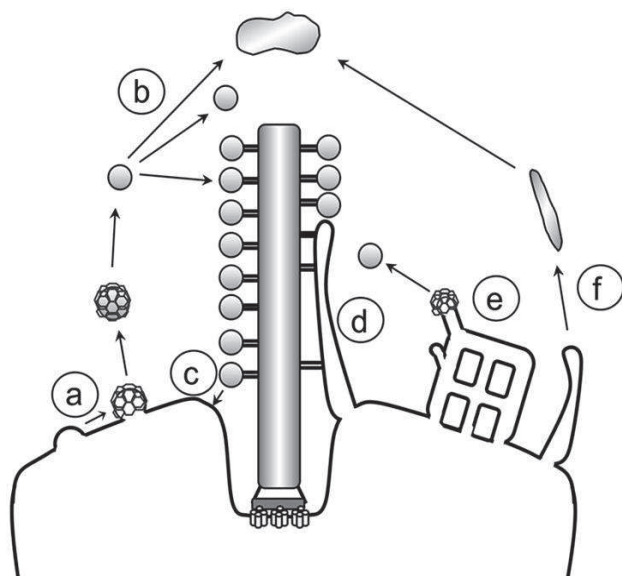


A 12. ábra összefoglalja a ribbon szinapszisokkal rendelkező szinaptikus terminálisok endocitotikus modelljeinek és vezikulum ciklusainak feltételes viszonyát.

Ábramagyarázat: (A) clathrin-mediált endocitózis, melyben a vezikulumok egyesülhetnek egy preszinaptikus ciszternává (B felső nyíl) vagy hozzácsatolódnak a tartalék (középső nyíl) vagy a kibocsátásra előkészített (alsó nyíl) vezikulum készlethez. Egyetlen (C) vagy akár egyszerre több ribbon-asszociált vezikulum (D) 'compound' fúziója a palzmembránnal laterálisan az L-típusú feszültség függő kalcium csatornáktól. A vezikulumok készleteinek 'visszatöltése' történhet esetlegesen nagy méretű anasztomizáló tubulusokon (E) keresztül vagy direkt módon a plazmamembrán betűrődései, azaz endoszómák (F) által.

Kérdéses azonban, hogy a vezikulumok hogyan szállítódnak a citoplazmában a szinaptikus szalagokhoz?

12. ábra. Endocitotikus események a ribbon szinapszisoknál (Zanazzi és Matthews, 2009):



A clathrin-mediált endocitózis vezikulum ciklusban betöltött fontosságát támasztják alá a zebradániókon végzett kísérletek eredményei, melyekben a synaptojanin csonkításos mutációja a látás károsodását és abnormális ERG hullámokat eredményezett. A mutánsokból izolált csap fotoreceptorok (a bipoláris neuronok nem) speciális defekteket hordoztak: a szinaptikus terminálisok szinaptikus vezikulumainak száma 50%-kal csökkent, a lehorgonyzott szinaptikus ribbonok száma 57%-kal csökkent, az endoszómák területe pedig 10-szeresére növekedett. A synaptojanin ilyen fokú jelentősége a clathrin-útvonal működésének valószínűségére utal egyes ribbont tartalmazó sejtekben (*Zanazzi és Matthews, 2009*). Fevetődik tehát a kérdés, hogy a clathrin-mediált endocitózis vajon a lassú vagy a gyors komponens lefolyásáért felelős?

A legtöbb eredmény szerint a clathrin komplex fő komponenseinek mutációjával a lassú endocitotikus fázis szenvedett károsodásokat (abnormális ERG hullámok) (*Zanazzi és Matthews, 2009*). Minden jel arra utal tehát, hogy a clathrin fehérjekomplex és adaptor proteinjei felelnek az endocitózis lassú fázisának lebonyolításáért.

Fennáll viszont a kérdés, hogy vajon milyen molekuláris mechanizmus irányíthatja a gyors fázist?

Artur Llobet kutatócsoportja 2011-ben előállt a lehetséges válasszal. Az endophilin A1 nevű szinaptikusan feldúsult fehérje endocitózisban betöltött szerepének vizsgálata közben fény derült annak döntően fontos szerepére a bipoláris neuronok ribbon szinapszisainak vezikulum készletének gyors visszatöltésében. Az eredetileg a clathrin-mediált endocitózis egy effektorának tekintett endophilinról kiderült, hogy a clathrin útvonaltól függetlenül, egy másik teljesen önálló endocitotikus útvonal meghatározó proteinje.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az endocitózis gyors fázisában kisméretű vezikulumok töltődnek vissza az esetek túlnyomó többségében. Az endophilin valamely doménjének (pl. Src homolgy 3 – SH3 domén), vagy az endophilint kötő endocitotikus fehérjék valamelyikének eltávolítása Llobeték kísérleteiben a gyors fázis gátlását eredményezte, miközben a lassú fázis zavartalanul folytatódott tovább (*Artur Llobet et al., 2011*). Igen valószínű tehát, hogy az endophilin A1 az endocitózis gyors fázisának legfőbb effektora a ribbon szinapszisokkal rendelkező bipoláris interneuronokban.

## Patológia

A szinaptikus ribbonok funkciójának felderítésére leggyakrabban használt módszerek egyike a ribbon felépítésében és működésében részt vevő fehérjék funkcióvesztéses mutációjának vizsgálata modell állatokon (általában egereken). Hiszen mi igazolhatná egy fehérje feltételezett szerepét egy funkció ellátásában annál jobban, minthogy a fehérje kiiktatásával a vizsgált funkció is megszűnik? Az ilyen funkcióvesztéses mutációk azonban nem csak labori körülmények között állíthatóak elő, hanem természetesen, betegségek formájában is megjelenhetnek, ezért az ilyen kísérletek nagy jelentőséggel bírnak a retina neurodegeneratív elváltozásainak visszafordításáért, megelőzéséért folyó kutatásokban.

- 1998-ban két tanulmány is igazolta (*Dieck és Brandstätter, 2006 via. Bech- Hansen et al. 1998; Strom et al. 1998*), hogy a fotoreceptor ribbon szinapszis egy preszinaptikus fehérjéjének funkcióvesztéses mutációja okozta a szürkületi vakság egy formáját, az ún. X-linked congenital stationary night blindness (CSNB). A CSNB egy klinikai tüneteiben és genetikai kiváltó okaiban is heterogén, egész életen át tartó látáskárosodás, mely szürkületi vakságot és különböző látászavarokat okoz nappali fénynél is. A leggyakoribb genetikai hibát, mely bizonyítottan CSNB-t okoz, a *CACNA1F* gén szerkezetében találták, amely a fotoreceptor ribbon szinapszisok aktív zónájánál található, membránpotenciál-függő, L-típusú kalcium csatornák ( $Ca_v1.4$ )  $\alpha_{1F}$ - alegységeit kódolja (*Dieck és Brandstätter, 2006*).
- 2002-ben indult kísérlet egy ezidáig ismeretlen, autoszómális, recesszív csap-pálcika diszfunkció hátterének felderítéséért. Az említett, spontán mutáció okozta retinopátiát hordozó egér vonalban (C57BL/10 egerek) kimutatták a szinaptikus ribbonok károsodását is.

A mutáció eredményeként az egerek filogenezise során szignifikánsan kevesebb pálcika fotoreceptor alakult ki, míg a csapok számára a betegség nem volt befolyással az egerek 6 hetes koráig. Elektroretinogrammal is igazolták a pálcikák redukálódott funkcióját, míg a csapok ERG hullámai nem is voltak detektálhatók.

Az elváltozásért felelős ún. *Cacna2d4* gén (6. kromoszómán) mutációja az L-típusú kalcium csatornák  $\alpha_{4\delta}$ -alegységét rongálta meg. A *Cacna2d4* gén mutációja miatt kialakult csap-pálcika diszfunkció kórképének sajátosságai alapján ez a gén egy új célpont lehet a humán látászavarok, mint például a szürkületi vakság, retinitis pigmentosa és a csap-pálcika disztrófiák kialakulási hátterének felderítéséhez (*Wycisk et al., 2006*).

- A Bassoon a szinaptikus ribbonok aktív zónához horgonyzásáért felelős fehérje. Bassoon génkiütött, mutáns egerek fotoreceptorjaiban a szinaptikus ribbonok szabadon, funkció nélkül lebegtek a citoplazmában, ledisszociálva az aktív zóna membránjáról, vagy eleve ki

sem fejlődtek a szinaptogenezis során. A funkcióvesztést, tehát a neurotranszmisszió hiányát a fotoreceptorok és bipoláris neuronok között, az elektroretinogram b-hullámának szignifikánsan redukálódott amplitúdója is kimutatta (*Dieck et al., 2003; Rikitsu et al., 2004*).

- A CaBP4 egy fotoreceptor specifikus kalcium-kötő fehérje az egerek retinájában. Esszenciális a fotoreceptor ribbon szinapszisok kifejlődéséhez és fenntartásához, minden bizonnyal a kalcium csatornák és így a neurotranszmisszió funkcionális modulációja által, mely látszólag a ribbon kalcium csatornához kötésében nyilvánul meg. A CaBP4 deficienciában szenvedő egerek fotoreceptor ribbon szinapsziszai komoly károsodásokat szenvedtek (nem kötődtek a  $Ca_v$ -csatornához) s így funkcióik ellátására alkalmatlanokká váltak. Az ERG b-hullámok amplitúdójának csökkenése is kimutatható volt, valamint a retina OPL rétegének keskenyedése, kevesebb fotoreceptor terminális és szinaptikus ribbon is jellemzi a CaBP4 hiány tüneteit (*Maeda et al., 2005; Dieck et al., 2006*).

- A szakirodalomban *nrc*-mutánsokként (no optokinetic response c) feljegyzett zebradániók vakok, a csap fotoreceptorok ribbon szinapsziszai struktúrális és funkcionális defekteket mutatnak és redukált a visszaérkező (endocitózis) vezikulumok és endoszómák száma a preszinaptikus terminálisokban. Meglepő módon a mutációért felelős gén csak nemrégiben lett azonosítva, s mint kiderült, a synaptojanin1 kódolásáért felelős.

A clathrin-mediált endocitózis - melynek jelenléte a ribbonokkal rendelkező szinaptikus terminálisokban egyre megalapozottabb - egy fontos résztvevője a synaptojanin. A clathrin-burokkal rendelkező vezikulumok kicsomagolása egyéb fehérjék mellett a synaptojanin (polyphosphoinozitid-phosphatáz) enzimatis aktivitásának köszönhető.

Zebradániókban a synaptojanin csonkításos mutációja hasonló fenotípusú retinát eredményez, mint a Bassoon kiütött egerekben: redukálódott ERG b-hullám, kevesebb kihorgonyzott ribbon. (*Dieck és Brandstätter, 2006; Zanazzi és Matthews, 2009*).

- Az exocitózis folyamatában részt vevő complexin, melynek a ribbon szinapszisokra jellemző izoformái a complexin3 és 4, a konvencionális szinapszisoknál a SNARE-mediált vezikulum fúzió sebességét és  $Ca^{2+}$  szenzitivitását állítja be. Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a complexin3 és 4 dupla-kock-out mutáns egerek retinájának plexiform rétege rendezetlen és a rendellenes, tehát gömbded, citoplazmában szabadon, funkció nélkül lebegő ribbon szinapszisokkal rendelkező fotoreceptor terminálisok száma is szignifikánsan megemelkedett. A neurotranszmisszió redukciója az előbbiekből kiindulva evidens, a vakság fennállására pedig a mutáns egerek szokványostól eltérő viselkedés-mintázata alapján vontak le egyértelmű következtetéseket (*Reim et al., 2005, 2009*).

- Végül, de nem utolsó sorban említést érdemel a glaukóma kutatás is ezen a téren. A glaukóma, vagy zöldhályog tüneteiben eltérő, de hasonló kórlefolyasú betegségek összefoglaló neve. A betegség legáltalánosabb tünete a szemnyomás drasztikus emelkedése, mely a csarnokvíz folyamatos termelődésével magyarázható. A folyamatos magas nyomás a retina, leginkább a ganglionsejtek és a látóideg súlyos károsodásához és ezzel a látás elvesztéséhez vezethet.

A betegség lefolyásának vizsgálatához leggyakrabban alkalmazott modell állat az egér, melynek a mesterségesen indukált mutációkkal kialakított ún. DBA/2J tenyészcsoportja hordozza a glaukóma tüneteit.

A másodlagos, zárt zugú glaukómára jellemző, korfüggő elváltozások között újonnan felfedezett tünet a pálcika fotoreceptor ribbon szinapszisok deformitása.

2-10 hónapos DBA/2J egerek retináján végzett elektronmikroszkópos megfigyelések alapján elkülönítettek három karakterisztikus fenotípust: pálca (fiziológiás), buzogány alakú és gömbded (mindkettő kóros) szinaptikus ribbonokat. Az első két forma kihorgonyozott, a harmadik fenotípus szabadon lebeg a citoplazmában.

A kontrol csoportban a 10 hónapos mintákban megvizsgált 671 pálcika fotoreceptor terminális közel 90%-ban tartalmazott fiziológiás ribbon szinapszisokat, míg a DBA/2J egerek mintáiban megvizsgált 700 db fotoreceptor terminális 10 hónapos állatokban már csak 50.3%-ban hordozott fiziológiás ribbonokat. Megjegyzendő, hogy a csap fotoreceptor ribbon szinapszisokra nem volt jellemző a strukturális deformitás (*Fuchs et al., 2012*). A leírt adatok szignifikáns eredményt szolgáltatnak a glaukóma szalag szinapszisokra kifejtett hatásairól ám az elváltozások molekuláris háttere még ismeretlen. Ha kiderülne, milyen mechanizmus felel a csap fotoreceptor ribbon szinapszisok 'védelméért', valamint, hogy a pálcikák szinaptikus szalagjainak elváltozása mögött milyen molekuláris folyamat áll, közelebbi képet kaphatnánk a betegség lefolyásáról is.

A szinaptikus ribbonok tehát komoly figyelmet érdemelnek a vizuális defektusok retinális tünetegyütteseinek vizsgálatakor, hiszen számos, a neurotranszmisszió fiziológiás lefolyását gátló kórkép hátterében jelen lehetnek.

## Diszkusszió

A retinális szinaptikus ribbonok felépítése és működése koránt sem egy felderített terület. Számos kérdés és paradoxon áll megválaszolatlanul, várja, hogy megfejtsék. Jelen szakdolgozat célja a meglévő eredmények alapján olyan következtetések levonása, amik további kérdéseket vehetnek fel a témakörben, valamint olyan javaslatok megtétele, melyek az esetleges kérdések megválaszolásának lehetőségeit világítják meg.

Mint tudjuk, a retinális ribbon szinapszisok szalag, vagy lemez alakú fehérje képződmények, melyeket szinaptikus vezikulumok vesznek körül. Számuk és méretük sejtspecifikus: a fotoreceptorokban jellemzően nagyobbak, de kevesebb van belőlük, mint a bipoláris neuronokban, ahol jóval kisebbek, viszont sokkal több ribbon foglal helyet egy szinaptikus terminálisban. Vajon van valamilyen jellemző, számbeli eloszlás a bipoláris idegsejtek szinaptikus terminálisaiban található ribbonok számában attól függően, hogy a bipoláris neuron a retina perifériás területein vagy centrális (éleslátás helye) régiójában helyezkedik el? Az előző szakdolgozati témából kiindulva, melyben a ló retina ribbon szinapszisainak eloszlását vizsgáltam volna a periférián, illetve a látósávban, az merült fel bennem, hogy lehet a két dolog között összefüggés.

Juhok látósávjában ugyanis, ahol például az ember látófeltjától eltérően nem csökken a fotoreceptorok száma, a ganglionok száma szignifikánsan nagyobb, mint a periférián (*Turbók Janka, 2011*). Ez magyarázná a bipoláris sejtek ribbon szinapszisainak emelkedő számát a periféria felől a látósáv, vagy éleslátás területe felé haladva.

Javaslom ezért egy olyan elektronmikroszkópos vizsgálat elvégzését, melyben felméri a retina perifériás és centrális régióiban található bipoláris sejtek ribbon szinapszisainak eloszlását, ez ugyanis közelebb vihetne a retina adaptációira (ember, patás) vonatkozó részletek megértéséhez.

A retina életmódok szerinti adaptációinak gondolatánál maradva egy újabb megközelítést szeretnék megvilágítani e különbségek pontos oktatának felderítésére. A szinaptikus ribbonok mérete/alaktana ugyanis nem csak sejt, de fajspecifikus is. Abból a gondolatból kiindulva, hogy a ribbonok a gerincesek evolúciós vívmányai (*Schmitz et al., 2000*), szerettem volna egy olyan törzsfát készíteni, amely a gerincesek szinaptikus ribbonjaiban fellelhető hasonlóságok és különbségek alapján felállított rokoni viszonyokat tükrözné. Ehhez a RIBEYE fehérjéből indultam ki, ami bizonyítottan csak a ribbonok szerkezetében található meg (*Schmitz et al., 2000*). Teljes kódoló szekvenciák után kutatva csak RIBEYE mRNS-t találtam, azt is csak négy fajnál. A genom programok azonban már rengeteg faj teljes genomszekvenciáját megfejtették, ezért érdekes kutatási témát szolgáltatna a RIBEYE génje



alapján az említett törzsfa elkészítése. Talán olyan új, retina-alapú rokoni viszonyokra derülne fény, amely alapján újra átgondolhatnánk a különböző állatfajok látásáról alkotott nézeteinket.

A fotoreceptorok szinaptikus ribbonjai nem állandó képződmények, aktivitás-függő dinamizmus jellemzi őket. Nappali fénynél ledisszociálnak az aktív zóna membránjáról és funkciójukat szüneteltetve lebegnek a citoplazmában, sötétben azonban a megemelkedő  $Ca^{2+}$  szint hatására újra kihorgonyozódnak. Ennek a folyamatnak a végrehajtásában valószínűsíthetően a GCAP molekulának van szerepe, mely  $Ca^{2+}$  és cGMP-függő módon hozzákötődik a RIBEYE B doménjéhez és valamilyen, molekuláris szinten ismeretlen mechanizmus által, feloldja a ribbon és az aktív zóna kapcsolatát, hogy a szalag ledisszociálhasson a plazmamembránról (*Schmitz et al., 2012*). Mi állhat tulajdonképpen ennek a háttérében? Képes lenne a GCAP valahogyan hozzákötődni a Bassoon molekulákhoz, amelyek, mint tudjuk a ribbon kihorgonyozásáért felelős fehérjék (*Dieck et al., 2001*), és indukálva azok konformáció változását, megszüntetni a Bassoon-RIBEYE interakciókat? A GCAP működési mechanizmusának további kutatása fontos lenne a ribbon-fehérjék interakcióinak feltérképezéséért és a ribbon dinamikus ciklusának pontosabb értelmezéséért.

A bipoláris neuronok ribbon szinapszisaiban nem mutatták ki a Bassoon jelenlétét. A Bassoon génkiütött, mutáns egerek bipoláris sejtjeinek neurotranszmissziója nem szenvedett károkat (*Dieck et al., 2003*). Milyen más mechanizmus felelős tehát a ribbonok rögzítéséért az aktív zónában? Létezik a fotoreceptor ribbonokhoz hasonló aktivitás-függő dinamizmus a bipoláris neuronokban is? Jelen van a GCAP a bipoláris sejtek preszinaptikus termináljaiban is? Ezek kimutatása elengedhetetlen a fotoreceptorok és bipoláris neuronok szinaptikus ribbonjainak működésében fellelhető különbségek megértéséhez.

Létezik a szinaptikus szalagok szerkezetében egy olyan fehérje, melynek jelenléte nem igazolja a működéséről meglévő tudásunkat. Ez a KIF3A, mely a kinezin-típusú motorproteinek családjába tartozik. Jelenlegi tudásunk szerint működéséhez szükséges lehet (de nem elengedhetetlen) a mikrotubulusok jelenléte és egy másik, nélkülözhetetlen tényező: az ATP-hidrolízis (*Muresan et al., 1999*). Mivel a szinaptikus szalagok közelében egyik tényező sem adott, fenn marad a kérdés: mi a KIF3A szerepe a ribbonok szerkezetében? Felmerült bennem annak a lehetősége, hogy a KIF3A molekulák talán nem mozdulnak el a ribbon mentén, hanem farki régiójukkal rögzülve a ribbon gerincén a motoros régió konformáció változásai által (fej-nyak régió hasonló az miozinéhoz: vajon a Ca elég-e a konformáció változáshoz?) adogatják egymásnak a szinaptikus vezikulumokat. Ehhez szükséges lenne megvizsgálni, hogy a vezikulumok membránjának külső felszínén jelen vannak-e olyan fehérje-motívumok, amelyekhez a kinezin motoros régiója kapcsolódni tud,

illetve, hogy a farki régió képes-e a ribbon gerincéhez kötődni. Az a kérdés persze továbbra is fennáll, hogy mi szolgáltatja az energiát ehhez a folyamathoz.

Nem zárható ki azonban az a feltevés sem, hogy a KIF3A nem is játszik szerepet a vezikulum-transzportban (vitatott ilyen folyamat jelenléte a ribbon szinapszisokon), hanem a ribbon saját, önfenntartó, élettani transzportfolyamatait látja el a citoplazma és a szinaptikus apparátus között (*Muresan et al., 1999*).

A szinaptikus ribbonok funkciójukat tekintve speciális, exocitotikus nanogépezetek (*Lenzi és Gersdorff, 2001*). Szerepük van a vezikulumok aktív zóna közeli organizációjában, exocitózisra való előkészítésében és a neurotranszmisszió szabályozásában (*Singer et al., 2004*). Érdekes kérdéseket vet fel a ribbonokra jellemző, ún. multivezikuláris exocitózis, amely a megfigyelések alapján több, ribbonhoz kötött vezikulum egyidejű fúziója által történik meg (*Heidelberger et al., 2005*). Ez azt feltételezi, hogy a ribbonhoz kötött szinaptikus vezikulumok már átestek a 'priming' procedúráján, vagyis fúzió-kompetensek. Vajon van-e egyáltalán a szinaptikus ribbonoknál vezikulum 'docking'? Lehetséges-e, hogy a 'docking' két vezikulum membránja között menjen végbe, és ha igen, milyen molekuláris folyamatok állnak e mögött? Ha ez lehetséges, mikor és hol, pontosan milyen módon játszódik le a 'priming'? Bizonytalan az is, hogy a beérkező kalcium egészen pontosan hogyan irányítja a vezikulumok fúzióját. Az egész folyamatot szabályozzák-e a fényviszonyok?

A felvetődő kérdések megválaszolásával komplexebb képet kaphatunk a szinaptikus szalagokat hordozó preszinaptikus terminálisok működéséről.

Természetesen számos kérdés és tisztázatlan tényező merül fel a témakörben még ezeken kívül is, de én most csak ezt a néhányat emeltem ki, jelezve, hogy a kutatás az élet sok más kérdése mellett, ezen a téren is szinte kimeríthetetlen.

## Összefoglalás

A sok éves kutatómunka adatait összefoglalva kijelenthető, hogy a retinális szinaptikus ribbonok EM képeken jól látható, elektrondenz, osmiophil, lemez vagy szalag alakú fehérje képződmények, melyeket szinaptikus vezikulumok vesznek körül. Ezek a speciális szinaptikus apparátusok a cochlea szőrsejtjeiben, a pinealocitákban és a retinális fotoreceptorokban, illetve bipoláris idegsejtben a preszinaptikus terminálisok jellemző képződményei. Ezekben a sejtekben ugyanis nagyon fontos a neurotranszmitter nagy mennyiségének precízen szabályozott, gyors és hosszú ideig tartó leadása.

Heterogén organellumok, melyek aktivitástól, illetve a sejt típusától függően változnak számban, méretben és a kapcsolódó vezikulumok számában.

A vezikulumok vékony, ismeretlen felépítésű fonállal kapcsolódnak a ribbon gerincéhez, annak teljes hosszában és minden dimenziójában, kivéve az alapi régiót (arciform density), mely mintegy kihorgonyozza a szinapszist az aktív zóna membránjához.

Kifejezetten a gerincesekre jellemző specializációnak számítanak és számos feladatot látnak el. Felelősek többek között a vezikulumok aktív zónához irányításáért, az ottani organizációjuk kialakításáért és exocitózisra való előkészítésükért (docking, priming, compound fusion), valamint az exo- és endocitózis lefolyásának szabályozásáért.

A fotoreceptorok ribbon szinapszisait aktivitás-függő dinámia jellemzi: sötétben a kation csatornák nyitott állapota folyamatos membrán-depolaritást tart fenn, melynek köszönhetően a ribbon elláthatja a rá jellemző, folyamatos, nagy mennyiségű glutamát leadásában kimerülő neurotranszmissziót, nappali fénynél azonban specifikus fehérje interakcióknak köszönhetően a ribbon ledisszociál az aktív zóna membránjáról és a citoplazmában lebegve szünetelteti funkcióját.

Számos fehérje vesz részt a szalag szinapszisok felépítésében. A RIBEYE a ribbonok fő tömegét adó, 120kDa-os komplex fehérje, mely egyedülálló a ribbon szinapszisok szerkezetében, más organellumok felépítésében nem vesz részt. Az aktív zónában hozzá kötődő Bassoon felelős a szinapszis kihorgonyzásáért, a GCAP pedig minden bizonnyal az onnan történő ledisszociáltatásáért. A Munc119 fehérje is rajta és a CaBP-n keresztül kapcsolja a ribbont a  $Ca_v$ -csatornákhöz.

Egy másik szerkezeti fehérje a kinezin-típusú motorproteinek családjába tartozó KIF3A, melynek motoros funkcióját semmilyen ma ismert mechanizmus nem igazolja a szinaptikus ribbonok közelében.

Az aktív zóna citomátrixának (CAZ) is számos proteinje felelős a ribbonok specifikus funkcióinak finom összehangolásáért, mint pl. a Piccolo, RIM, Munc13-1 és CAST.

A szinaptikus ribbonok funkcióvesztése számos betegség tünet-együttesének tagja lehet, ilyen pl. a szürkületi vakság (CSNB), fotoreceptor disztrófiák és a glaukóma, ezért kiemelt figyelmet érdemelnek az orvostudományban is.

Sok azonban a megválaszolatlan kérdés, a bizonyítást még nem nyert elmélet, mely a ribbon szinapszisok felépítésére és működésére vonatkozik. Nem tisztázott többek között a KIF3A szerepe a ribbonok szerkezetében és nem ismerjük az exo- és endocitózis lefolyásának minden kérdésre választ szolgáltató részleteit sem. A ribbon szinapszisok felépítéséről és funkciójáról felmerülő kérdésekkel és problémákkal a 'Diskusszió' fejezetben foglalkoztam részletesebben.

## Summary

From the collected data of many years of research it is already known that retinal synaptic ribbons look like electron dense, osmiphilic, plate-like proteinaceous bodies on EM pictures that are surrounded by synaptic vesicles. These specialised synaptic machines are characteristic for the presynaptic terminals of cochlear hair cells, pinealocytes and the retinal photoreceptors and bipolar neurons. The output synapses of these sensory neurons must provide fast signaling to follow rapidly changing stimuli, while also transmitting graded information covering a wide range of stimulus intensity and sustained for long time periods. Ribbons are heterogeneous organelles that vary in size, number and in the number of tethered vesicles depending on activity and celltype. Vesicles are tethered to the ribbon by fine filaments of unknown structure along every dimensions and the whole length of the ribbon except for the basal region called arciform density which anchors the synapse to the active zone membrane.

Ribbon synapses very probably occur in vertebrates alone and are responsible for various tasks in the retina. Among others they are suggested to direct synaptic vesicles to the active zone, to organize them for priming and compound fusion and to synchronize exo- and endocytosis through regulating neurotransmission.

Photoreceptor ribbons maintain activity-dependent dynamics. In darkness, due to depolarization induced by open cation channels, they can release neurotransmitter (glutamate) continuously at high rates but in light due to special protein interactions they dissociate from the active zone and float freely in the cytoplasm without functioning.

Panoply of proteins participates in the organization of these specialised synapses.

RIBEYE is a ~120kDa complex protein giving the majority of the ribbon's mass and is unique in its structure, specific for this organelle. By interacting with RIBEYE, Bassoon is responsible for the anchoring of ribbons at the active zone. Similar interactions with GCAP, on the other hand, result in the dissociation of ribbons from the active zone. RIBEYE is attached to the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels as well, probably through Munc119 and CaBP.

A member of the kinesin-type motorproteins, KIF3A is also found in synaptic ribbons however its function cannot be explained by any known mechanisms.

Several proteins in the cytomatrix of the active zone (CAZ) help in the fine synchronization of the ribbon's specific function, like Piccolo, RIM, Munc13-1 and CAST.

Loss of the synaptic ribbon's function has been found underlying the symptoms of many diseases, like the X-linked congenital night blindness (CSNB), rod-cone dystrophies or glaucoma, that's why special attention should be paid to these structures in the medical research as well.

However there are several unanswered questions and unproved theories concerning the structure and function of synaptic ribbons. Just to cite two examples, we don't know the exact function of KIF3A in the structure of ribbons and the information available on exo- and endocytosis is not sufficient to explain every detail of these processes. Questions and problems arising about the architecture and function of retinal ribbon synapses are overviewed in chapter: 'Discussion'.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani Dr. Jancsik Veronikának odaadó, témavezetői munkájáért és segítőkészségéért. Köszönöm Pető Klárának, hogy időt és energiát nem kímélve megtanított az elektronmikroszkópos technika alapjaira. Végezetül pedig köszönöm Czimmermann Tamásnak az ábrák átalakításában nyújtott segítségét.

## Hivatkozások

1. **Thoreson, W. B. et al.** (2004)

A Highly Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Pool of Vesicles Contributes to Linearity at the Rod Photoreceptor Ribbon Synapse, *Neuron*; 42(4): 595–605.

2. **Bartoletti, T. M. et al.** (2012)

Acute destruction of the synaptic ribbon reveals a role for the ribbon in vesicle priming, *Nat Neurosci.* ; 14(9): 1135–1141. doi:10.1038/nn.2870.

3. **Dieck et al.** (1998)

Bassoon, a Novel Zinc-finger CAG/Glutamine-repeat Protein Selectively Localized at the Active Zone of Presynaptic Nerve Terminals, *The Journal of Cell Biology*, Volume 142, 499–509

4. **Dieck et al.** (2003)

The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina, *Neuron*, Vol. 37, 775–786.

5. **Dieck et al.** (2005)

Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 168, No. 5, 825–836

6. **Hurley, J. H. et al.** (1997)

Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains, *Protein Science* 6477480. Cambridge University Press.

7. **Nalefski, E. A. and Falke, J. J.** (1996)

The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity, *Protein Science* 5:2375-2390. Cambridge University Press.

8. **Hida, Y. and Ohtsuka, T.** (2010)

CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone, *J. Biochem*;148(2):131–137 doi:10.1093/jb/mvq065

9. **Ohtsuka, T. et al.** (2002)

CAST: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and Munc13-1, *The Journal of Cell Biology*, Volume 158, 577–590

10. **Yamazaki, H. et al.** (1996)

Cloning and characterization of KAP3: A novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 8443-8448, *Cell Biology*

11. **Yamazaki, H. et al.** (1995)

KIF3A/B: A heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport, *The Journal of Cell Biology*, Volume 130, 1387-1399

12. **Muresan, V. et al.** (1999)

The Kinesin Motor KIF3A Is a Component of the Presynaptic Ribbon in Vertebrate Photoreceptors, *The Journal of Neuroscience*, 19(3):1027–1037



13. **Stevens, D. R. et al.** (2005)  
Identification of the Minimal Protein Domain Required for Priming Activity of Munc13-1, *Current Biology*, Vol. 15, 2243–2248
14. **Cooper, B. et al.** (2012)  
Munc13-Independent Vesicle Priming at Mouse Photoreceptor Ribbon Synapses, *The Journal of Neuroscience* • 32(23):8040–8052
15. **Kim, E. and Sheng, M.** (2004)  
PDZ domain proteins of synapses, *Nature Reviews, Neuroscience*, Vol. 5, 771-781
16. **Fenster, S. D. et al.** (2000)  
Piccolo, a Presynaptic Zinc Finger Protein Structurally Related to Bassoon, *Neuron*, Vol. 25, 203–214
17. **Quinlan, K. G. R. et al.** (2006)  
Role of the C-Terminal Binding Protein Repression Interactions and Transcriptional PxDLS Motif Binding Cleft in Protein, *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26(21):8202.  
DOI:10.1128/MCB.00445-06
18. **Zenisek, D. et al.** (2004)  
Visualizing Synaptic Ribbons in the Living Cell, *The Journal of Neuroscience*. 24:9752–9759
19. **Parsons, T.D. and Sterling, P.** (2003)  
Synaptic Ribbon: Conveyor Belt or Safety Belt?, *Neuron*. 37: 379–382
20. **Schmitz, F. et al.** (2000)  
RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon Function, *Neuron*, Vol. 28, 857–872
21. **Magupalli, V. G. and Schmitz, F. et al.** (2008)  
Multiple RIBEYE–RIBEYE Interactions Create a Dynamic Scaffold for the Formation of Synaptic Ribbons, *The Journal of Neuroscience* • 28(32):7954 –7967
22. **Sheets, L. et al.** (2011)  
Ribeye is required for presynaptic CaV1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells, *Development* 138, 1309-1319 (2011) doi:10.1242/dev.
23. **Schmitz, F. et al.** (2012)  
EF hand-mediated Ca<sup>2+</sup> and cGMP-signaling in photoreceptor synaptic terminals, doi:10.3389 / fn mol.2012. 00026
24. **Takao-Rikitsu, E. et al.** (2004)  
Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release, *The Journal of Cell Biology*, Volume 164, 301–311
25. **Sterling, P. and Matthews, G.** (2005)  
Structure and function of ribbon synapses, *TRENDS in Neurosciences* Vol.28 No.1, doi:10.1016/j.tins.2004.11.009

26. **Heidelberger, R. et al.** (2005)  
Synaptic transmission at retinal ribbon synapses, Published in final edited form as: *Prog Retin Eye Res*; 24(6): 682–720.
27. **Matthews, G. and Fuchs, P.** (2010)  
The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission, Published in final edited form as: *Nat Rev Neurosci*; 11(12): 812–822. doi:10.1038/nrn2924.
28. **Mercer, A. J. and Thoreson, W. B.** (2011)  
The dynamic architecture of photoreceptor ribbon synapses: Cytoskeletal, extracellular matrix, and intramembrane proteins, Published in final edited form as: *Vis Neurosci*; 28(6): 453–471. doi:10.1017/S0952523811000356.
29. **Zanazzi, G. and Matthews, G.** (2009)  
The molecular architecture of ribbon presynaptic terminals, Published in final edited form as: *Mol Neurobiol*; 39(2): 130–148. doi:10.1007/s12035-009-8058-z.
30. **LoGiudice, L. and Matthews, G.** (2009)  
The Role of Ribbons at Sensory Synapses, Published in final edited form as: *Neuroscientist*; 15(4): 380–391. doi:10.1177/1073858408331373.
31. **Reim, K. et al.** (2005)  
Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 169, No. 4, pgs. 669–680
32. **Garner, C. C. et al.** (2000)  
Molecular determinants of presynaptic active zones, *Current Opinion in Neurobiology*, 10:321–327, Elsevier Science Ltd. All rights reserved
33. **Babai, N. et al.** (2010)  
Ca regulates vesicle replenishment at the cone ribbon synapse, *The Journal of Neuroscience*, 30(47):15866–15877
34. **Llobet, A. et al.** (2011)  
Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse, *The Journal of Neuroscience* • 31(23):8512–8519
35. **Lewit-Benley, A. and Réty, S.** (2000)  
EF-hand calcium-binding proteins, *Current Opinion in Structural Biology*, 10:637–643
36. **Maeda, T. et al.** (2005)  
A critical role of CaBP4 in the cone synapse, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 46, No. 11
37. **Alpadi, K. et al.** (2008)  
RIBEYE Recruits Munc119, a Mammalian Ortholog of the *Caenorhabditis elegans* Protein unc119, to Synaptic Ribbons of Photoreceptor Synapses, *J Biol Chem*; 283(39): 26461–26467.
38. **Hallermann, S. et al.** (2010)  
Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse, *Neuron*; 68(4):710–23. doi:10.1016/j.neuron.2010.10.026.

39. **Mukherjee, K. et al.** (2010)  
Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis, 6504–6509 PNAS, vol. 107 no. 14
40. **Frank, T. et al.** (2010)  
Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca<sup>2+</sup> channels and vesicles to add release sites and promote refilling, *Neuron*; 68(4): 724–738. doi:10.1016/j.neuron.2010.10.027.
41. **Joselevitch, C. and Zenisek, D.** (2010)  
The Cytomatrix Protein Bassoon Contributes to Fast Transmission at Conventional and Ribbon Synapses, *Neuron* 68(4):604-6. doi: 10.1016/j.neuron.
42. **Siksou, L. et al.** (2007)  
Three-Dimensional Architecture of Presynaptic Terminal Cytomatrix, *The Journal of Neuroscience* • 27(26):6868–6877
43. **Inoue, E. et al.** (2006)  
ELKS, a protein structurally related to the active zone protein CAST, is involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis from PC12 cells, *Genes to Cells*, Vol. 11, 659–672
44. **Gundelfinger, E. G. and Fejtova, A.** (2012)  
Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone, *Current Opinion in Neurobiology*, 22:423–430
45. **Regus-Leidig, H. and Brandstätter, J. H.** (2011)  
Structure and function of a complex sensory synapse, *Scandinavian Physiological Society*, doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02355.x
46. **Zampighi, G. A. et al.** (2011)  
Conical Tomography of a Ribbon Synapse: Structural Evidence for Vesicle Fusion, *PLoS ONE* 6(3): e16944. doi:10.1371/journal.pone.0016944
47. **Singer, J. H. et al.** (2004)  
Coordinated multivesicular release at a mammalian ribbon synapse, *Nature Neuroscience*, Volume 7., Number 8.
48. **Wang, X. et al.** (2009)  
A Protein Interaction Node at the Neurotransmitter Release Site: Domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and Rim Converge on the N-Terminal Domain of Munc13-1, *The Journal of Neuroscience* • 29(40):12584 –12596
49. **Thoreson, W. B.** (2007)  
Kinetics of Synaptic Transmission at Ribbon Synapses of Rods and Cones, *Mol Neurobiol*; 36(3): 205–223.
50. **Morgans, C. W.** (2000)  
Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina, *immunology and Cell Biology*, 78(4): 442–446
51. **Murthy, V. N. and De Camilli, P.** (2003)  
Cell biology of the presynaptic terminal, *Annu. Rev. Neurosci.* 26:701–28  
doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131445

52. **Matthews, G. et al.** (1996)  
Evidence That Vesicles on the Synaptic Ribbon of Retinal Bipolar Neurons Can Be Rapidly Released, *Neuron*, Vol. 16, 1221–1227
53. **tom Dieck, S. and Brandstätter, J. H.** (2006)  
Ribbon synapses of the retina, *Cell Tissue Res*, 326:339–346,  
DOI 10.1007/s00441-006-0234-0
54. **Lenzi, D. and von Gersdorff, H.** (2001)  
Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines, *BioEssays* 23:831±840, **2001** John Wiley & Sons, Inc.
55. **Fukuda, M.** (2003)  
Distinct Rab Binding Specificity of Rim1, Rim2, Rabphilin, and Noc2, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 278, No. 17, pp. 15373–15380
56. **Ball, S. L. et al.** (2002)  
Role of the 2 Subunit of Voltage-Dependent Calcium Channels in the Retinal Outer Plexiform Layer, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 43, No. 5
57. **Neher, E. and Sakaba, T.** (2008)  
Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release, *Neuron*, Vol. 59, Issue 6, Pages 861-872
58. **Thoreson, W. B. et al.** (2009)  
Role of the synaptic ribbon in transmitting the cone light response, *Nat Neurosci*; 12(3): 303–310. doi:10.1038/nn.2267.
59. **Regus-Leidig, H. et al.** (2010)  
Stability of active zone components at the photoreceptor ribbon complex, *Molecular Vision*; 16:2690-2700
60. **Berntson, A. K. and Morgans, C. W.** (2003)  
Distribution of the presynaptic calcium sensors, synaptotagmin I/II and synaptotagmin III, in the goldfish and rodent retinas, *Journal of Vision*, Vol. 3, 274-280
61. **Wan, L. et al.** (2005)  
Two *ribeye* Genes in Teleosts: The Role of Ribeye in Ribbon Formation and Bipolar Cell Development, *The Journal of Neuroscience* • 25(4):941–949
62. **Röhlich Pál:** Szövevény I-II.
63. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>
64. <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Proteins8.html>
65.  
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Toran/clathrinbunch.jpg>
66.  
[http://www.rcsb.org/pdb/education\\_discussion/molecule\\_of\\_the\\_month/images/88\\_1xi4.jpg](http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/images/88_1xi4.jpg)

67. **Wycisk, K. A. et al.** (2006)  
Structural and Functional Abnormalities of Retinal Ribbon Synapses due to Cacna2d4 Mutation, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 47, No. 8
68. **Reim, K. et al.** (2009)  
Aberrant function and structure of retinal ribbon synapses in the absence of complexin 3 and complexin 4, *Journal of Cell Science* 122, 1352-1361, doi:10.1242/jcs.045401
69. **Fuchs, M. et al.** (2012)  
Rod Photoreceptor Ribbon Synapses in DBA/2J Mice Show Progressive Age-Related Structural Changes, *PLOS ONE*, [www.plosone.org](http://www.plosone.org), Volume 7, Issue 9, e44645
70. **Turbók Janka** (2011) - szakdolgozat  
A ganglionsejtek morfológiájának és eloszlásának vizsgálata juhok retinájában

# HuVetA - SZIA

## ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: .....

Elérhetőség (e-mail cím):.....

A feltöltendő mű címe:.....

.....

A mű megjelenési adatai:.....

Az átadott fájlok száma: .....

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, ill. a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtől PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által feltöltött dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a feltöltött dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),
- nem engedélyezi a feltöltött dokumentum(ok) elérését és a dokumentum bibliográfiai adatainak nyilvánossá tételét a HuVetA-ban/SZIA-ban.

\* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

- Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, ill. a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2013. év .....hó .....nap

aláírás

Szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
  - *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
  - *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
  - *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
  - *a nyílt hozzáférés támogatása.*
- *SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.*