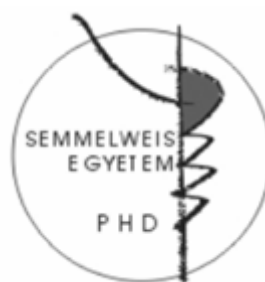


# Új aspektusok a fotoreceptorok differenciálódásában és fejlődésében normál és kóros állapotokban

Doktori tézisek

**Dr. Berta Ágnes Ida**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szél Ágoston, egyetemi tanár,  
az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Gábrriel Róbert, egyetemi tanár  
Dr. Somfai Gábor, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, egyetemi tanár,  
az orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gerber Gábor, egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Szepessy Zsuzsanna, egyetemi  
tanársegéd, Ph.D.

Budapest, 2013

## Bevezetés

A fejlett országokban a vakság vezető okai olyan betegségek, amelyekben a retinális fotoreceptorok kórosan működnek vagy progresszív módon elpusztulnak. Ismert, hogy ezek a betegségek genetikailag igen heterogének, megelőzve e téren más hasonló betegséget (Hartong és mts., 2006). Az öröklődő retinális fotoreceptor degenerációk gyakori okai a látáscsökkenésnek és döntő többségük monogénes módon öröklődik, prevalenciájuk kb. 1:3000 (Pacione és mts., 2003; Rattner és mts. 1999) A leggyakoribb forma a retinitis pigmentosa, ami a felnőtt populációban (20-64 éves kor) a vakság két vezető oka közül az egyik (Buch és mts., 2004). Általában a retinitis pigmentosa a pálcikák elsődleges defektusaira vezethető vissza, de később másodlagosan a csapokat is érinti. Ezért csoportosítható a pálcika-csap degenerációk közé és klinikailag elkülöníthető a makula-, a csap- és a csap-pálcika degenerációktól. (Wright és mts., 2010).

A gerincesek retinája hat alapvető sejttípusból épül fel: fotoreceptorok (csapok és pálcikák), horizontális-, bipoláris-, amakrin- és ganglion sejtek. A látás folyamata a fotoreceptorokban kezdődik, amelyek tulajdonképpen a fény érzékelésére specializálódott érző neuronok. Az itt elkezdődött kémiai folyamatok aztán interneuronokban folytatódnak (bipoláris-, horizontális- and amakrin sejtek) és végül a ganglion sejteken keresztül jutnak el az agyba. A csapok csak nagyobb fényerősségre reagálnak és nagy felbontású képek érzékelését teszik lehetővé ("éleslátás"), míg a pálcikák alacsonyabb fényerősségnél működnek. A pálcikák annyira érzékenyek, hogy elegendő egyetlen foton az aktiválásukhoz (Masland, 2001; Swaroop és mts., 2010). A retinában a pálcikák és a különböző csaptípusok mindig egy adott elrendezésben vannak jelen és különböző fajokban különböző mintázatokat hozhatnak létre. Az egérben és az emberben a fotoreceptorok teszik ki a retina sejtjeinek több mint 70%-át, de az egérben a pálcikák csapokhoz viszonyított aránya 30:1, míg az emberben 18–20:1 (Carter-Dawson és LaVail, 1979; Roorda és Williams, 1999). Az emlősök retinájában csak egyféle pálcika pigment található, a rodopszin, amelynek az spektrális érzékenysége kb. 500 nm-nél a legmagasabb. A legtöbb emlősben, így az egérben is, kétféle csapopszin található, melyek az ún. dikromatikus látást teszik lehetővé. Az egyik az S opszin (kék érzékeny opszin), amely leginkább a kis hullámhosszúságú (ultraviola

és kék) fénysugarakra érzékeny, míg az M opszin (zöld érzékeny opszin), ami pedig a közepes-nagyobb hullámhosszúságú (zöld) fénysugarakra érzékeny leginkább (Swaroop és mts., 2010). Az emberben és nappal aktív főemlősökben még egy harmadik csap opszin, az L opszin (vörös érzékeny opszin) van jelen, ami a nagy hullámhosszúságú (vörös) fénysugarakat érzékeli (Deeb, 2006; Nathans és mts. 1986). Igen érdekes, hogy az egerek retinájában az S- és az M opszin expressziója a retina alsó ill. felső részén, ellentétes irányban, fokozatosan csökken a retina közepe felé haladva (Szel et al., 1993).

A kültag, ahol a fotorecepció első mozzanatai zajlanak, tulajdonképpen egy specializálódott elsődleges cílium (Davenport és Yoder, 2005), amely lapos membrán korongokból és az ezeket borító plazmamembránból épül fel. Több mint 500 intramembrán proteint azonosítottak eddig a kültagban és fototranszdukció bizonyos fontos lépései is ezen membránokhoz kötöttek (Khorana, 1992). A gerincesek retinája felépítésében és működésében is rendkívüli, kifejezetten arra specializálódott, hogy befogja és feldolgozza a beérkező fényingereket. Ugyanakkor pont emiatt finom, sérülékeny felépítése miatt lépnek fel igen gyakran a működési zavarai is (Masland, 2001). Azon mutációk száma, amelyek fotoreceptor-specifikusak (pl. azok, amelyek a fotorecepció folyamatait érintik), csak alig haladja meg az általános funkciókat (pl. a proteinek térszerkezetének kialakulása, a lipid metabolizmus vagy az extracelluláris mátrix) érintő mutációk számát. Az expressziós mintázat pedig a legtöbb mutáció esetében inkább széleskörű, mintsem fotoreceptor-specifikus. Még nincs egyértelmű magyarázat arra, hogy miért okoz ilyen sokféle gén mutációja fotoreceptor degenerációt (lásd. Wright és mts. összefoglaló cikkét). A kutya mint modellállat már kb. 15 éve foglalkoztatja a kutatókat, mivel a kutyában számos öröklődő betegség szoros homológiét mutat az emberben fellépő hasonló betegségekkel, ugyanakkor az ember és kutya retinája felépítésében sok szempontból különbözik is. Az ún. korai retinadegeneráció (early retinal degeneration, *erd*) egy autoszómális recesszív módon öröklődő, fiatal korban jelentkező retinadegeneráció kutyákban, amely a fotoreceptorok kóros funkcionális és szerkezeti fejlődésével jár együtt. Jellemzően elsősorban a kül- és beltágok ill. a fotoreceptorok szinapszisai érintettek leginkább. Ezt a kóros fejlődési szakaszt aztán egy gyors degenerációs fázis követi. Az ebben a betegségben szenvedő kutyák születésüktől fogva farkasvakságban szenvednek és 48-72 hetes korukra teljesen megvakulnak (Acland és Aguirre, 1987).

Emlősökben a fotoreceptorok kialakulása viszonylag hosszú ideig tart, fajtól függően eltarthat hetekig vagy akár hónapokig és történhet a születés előtt és után (Carter-Dawson és LaVail, 1979; Morrow és mts., 1998; Rapaport és mts., 1998; Young, 1985). Az emberben a fotoreceptorok már a születés előtt kifejlődnek (Cornish és mts., 2004; Hendrickson és mts., 2008). Ezzel szemben az egérben születéskor a fotoreceptorok még jóval fejletlenebbek. Az újszülött egerek szeme még majdnem két hétig csukva marad. A csapok fejlődése a 11. embrionális napon kezdődik és a születésre a csapok döntő többsége kifejlődik, míg a pálcikák kialakulása az első pár posztnatális napra tehető. Az S opszin expressziója már a késői embrionális korban elkezdődik, míg a rodopszin expressziója csak a születés után mutatható ki (Carter-Dawson és LaVail, 1979; Young, 1985).

Az elmúlt időszakban új irodalmi adatok jelentek meg azzal kapcsolatban, hogy a caveolinok fontos szerepet játszanak a gerincesek korai fejlődésében, különösen fontosnak tűnik a szerepük idegrendszeri struktúrák, a notochord és a neuromast kialakulásában (Fang és mts., 2006; Nixon és mts., 2007). A caveolinok olyan integráns membránfehérjék, amelyek az omega alakú membránkitüremkedések, a caveolák speciális alkotórészei. A caveolák kialakulásához elengedhetetlen a koleszterin jelenléte, ui. egyrészt képes a caveolinok megkötésére ill. a caveolinok transzkripciójára is hatással van (Fielding és mts., 1997; Murata és mts., 1995). A caveolákat először endothel sejtekben mutatták ki kb. 50 évvel ezelőtt és csak később derült ki, hogy tulajdonképpen a lipid raftok közé sorolhatóak a lipid összetételük alapján. Viszont annak ellenére, hogy biokémiai összetételükben a lipid raftok és a caveolák hasonlóak, a morfológiájuk jelentősen különbözik. A caveolák, omega alakjuknak köszönhetően azonosíthatóak elektron mikroszkóppal, míg a lipid raftok nem. Ez a nagy szerkezeti különbségük azt sugallja, hogy más-más funkcióval rendelkeznek (Head és Insel, 2007).

Ma már ismert tény, hogy a fotoreceptor kültagok membránja síkban nem homogén, hanem kis szigetszerű struktúrák, mikrodomének találhatóak benne, amelyek ellenállnak a nem ionos detergenseknek. Ezeket a struktúrákat lipid raftoknak, azaz lipid tutajoknak is nevezik (Martin és mts., 2005).

Ezen membrán doménekben számos sejtben két jellemző fehérje, a caveolin-1 és c-src található (Pike, 2003). Biokémiai vizsgálatok már azt is kimutatták, hogy más sejtek mellett a fotoreceptorok lipid raftjaiban is megtalálhatóak e fehérjék (Ghalayini

és mts., 2002; Martin és mts., 2005). Egészen eddig az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a fotoreceptorok kültagjaiban nem vagy csak minimális mennyiségben mutatható ki a caveolin-1 immuncitokémia segítségével (Kim és mts., 2006). Eredetileg a caveolin fehérjét transzformált csirke fibroblasztokban mutatták ki, mint az src enzim tirozinszofosforilált szubsztrátját (Glennay, 1989; Murata és mts.; 1995). Azóta a caveolinnak számos különböző izoformáját azonosították: caveolin-1- $\alpha$ , caveolin-1- $\beta$ , caveolin-2, és caveolin-3. Úgy tartják, hogy a caveolin fehérjecsalád tagjai "scaffolding" proteinekként funkcionálnak és képesek arra, hogy nemcsak összegyűjtsenek, hanem, hogy organizáljanak specifikus lipideket (koleszterint és glykosphingolipideket), szignáltranszdukciós fehérjéket és G proteineket a caveolákon belül. Bizonyos enzimek megkötése csökkenti vagy gátolja azok aktivitását a "scaffolding" doménon keresztül. Ez a domén minden caveolin fehérjében megtalálható (Schlegel és mts., 1998; Swaney és mts., 2006).

Eddig csak néhány közlemény jelent meg a caveolinok jelenlétéről és eloszlásáról a retinában. Az egér retinában a caveolin-1-et a külső plexiform rétegben, a fotoreceptor szinapszisok végződéseiben mutatták ki (Kachi és mts., 2001). A patkány retina számos rétegében volt kimutatható a caveolin-1, a belső plexiform réteg és a külső limitáns membrán között, ami a szerzők szerint arra utal, hogy a caveolin-1 döntően a Müller sejtekben fejeződik ki, ezt Müller sejtekre specifikus ellenanyagokkal alá is támasztották (Ueda, 2002). Egy másik munkacsoport laser scannig konfokális mikroszkóp segítségével a pigment epithel sejtek apikális és bazális felszínén lokalizálta a caveolin-1-et (Bridges és mts., 2001). Néhány évvel később egy részletesebb szövettani közleményben arról számoltak be, hogy a caveolin-1 a patkány retina legtöbb rétegében megtalálható (Kim és mts., 2006). Ezek az első közlemények nem voltak túl részletesek és nem adtak átfogó képet a különböző caveolin izoformák expressziójáról az emlős retinában.

## Célkitűzés

- 1. A caveolin-1 és a c-src lokalizációjának és expressziójának kimutatása a fejlődő retinában,** ugyanis ezáltal bizonyítható az esetleges szerepük a retina fejlődésében. Ezen proteinek expresszióját össze akartuk hasonlítani két jól ismert fehérjé, a rodopszin és a rodopszin kináz kifejeződésével. Ezenkívül vizsgálni akartuk a caveolint foszforiláló enzim, a c-src és az így létrejött termék, a foszfo-caveolin-1 kifejeződési mintázatát is. Az esetleges kolokalizáció ill. koexpresszió kimutatására kettősen jelölt immuncitokémiát és koimmunprecipitációt használtunk.
- 2. A caveolin izoformák expressziójának és elrendeződésének vizsgálata különböző fajokban,** különös figyelmet fordítva az emberi retinára, ahol ezzel kapcsolatban még nem volt irodalmi adat. Továbbá kimutatni ezen fehérjék kifejeződését a kutya retinában, összehasonlítva annak degeneratív állapotaival, hogy leírassuk esetleges szerepüket ezen betegségek kialakulásában. A kutya retinája és annak örökletes degeneratív elfajulásai különösen érdekesek, ui. szoros homológiát mutatnak az ember hasonló betegségeivel.
- 3. A korai retinadegeneráció retinal degeneration (*erd*) részletes morfológiai és biokémiai leírása,** ami egy olyan retinadegeneráció kutyákban, amely a fotoreceptorok kóros fejlődésével majd gyors degenerációjával jellemezhető. Annak ellenére, hogy számos retinadegeneráció kutyákban már részletesen ismert, ebben a betegségben a fotoreceptor degenerációs mechanizmus eddig még nem volt ismert. Mivel az *erd* retinában egy speciális elnyújtott időszakban jelentkezett nagyszámú sejthalál és ezzel párhuzamosan nem csökkent a fotoreceptorok száma, ki akartuk mutatni, hogy nem történik-e sejtosztódás ez idő alatt, amely kiegyensúlyozná az elpusztult sejtek számát. Számos specifikus ellenanyag használatát terveztük annak kimutatására, hogy pontosan milyen sejtek osztódnak.
- 4. Az *erd* retina összehasonlítása más retinadegenerációkkal kutyában,** annak bizonyítására, hogy az *erd* retinában a külső magvas rétegben megfigyelhető sejtosztódás vajon egyedi jelenség-e vagy sem.

## Módszer

A kísérletekben felhasznált állatok és humán minták:

- Szíriai aranyhőrcsögök a posztnatális fejlődés különböző fázisaiban. Retinamintákat vettünk a következő posztnatális napokon: 1, 5, 10, 15 (P1, P5, P10 és P15). A 18 napnál idősebb állatokat felnőttnek tekintettük.
- Egy kifejlett *Xenopus laevis* retináit is felhasználtuk.
- Egy örvös makimajom (*Varecia variegata*) retinamintái. Ez az állat fogságban élt és pusztult el 11 éves korában, ismert betegségei nem voltak. A retinamintákat posztmortem gyűjtöttük.
- Három páciens, két férfi (50 és 57 éves) és egy nő (50 éves) retinamintáit is felhasználtuk. A betegeket posterior melanoma malignum choroideae miatt operálták 2005-ben a Debreceni Egyetem Szemklinikáján. Az enukleált szemekből gyűjtöttünk retinamintákat.
- *Erd* kutya retinák. A kutyákat a Retinal Disease Studies (RDS) facility (Kennett Square, PA) területén tartották. Ezeket a kutyákat mesterségesen a *erd* betegség hordozására tenyésztették ki. 70 kutyát használtunk fel vizsgálatainkhoz, ebből 44 hordozta a kóros *erd* gént (4.3-165 hetes kor között) és 26 kontrollállat volt köztük (4.7–25.7 hetes kor között).

Laboratóriumi módszerek:

- Toluidinkék festés és elektronmikroszkóp
- Immuncitokémia specifikus ellenanyagok használatával
- Kettősen jelölt immuncitokémia és konfokális mikroszkóp
- Retinalizátumok immunoblot analízise és kültag frakció izolálása, vizsgálata
- Immunprecipitáció and Western Blot
- Immunoblot denzitometriával
- A kültag megújulásának és az opszin bioszintézisének izotópos vizsgálata
- Génexpresszió vizsgálata kvantitatív real time-PCR (qRT-PCR) segítségével.

## Eredmények

### 1. Raft proteinek expressziója a fotoreceptorok fejlődése közben

Vizsgálatainkban a caveolin-1 lokalizációjának változását hasonlítottuk össze két jól ismert ill. a retinában nagy mennyiségben előforduló fehérje, a rodopszin és a rodopszin kináz expressziós mintázatával a fejlődő fotoreceptorokban. Továbbá követtük a caveolin-1-et foszforiláló enzimnek, a c-src-nek és a létrejött terméknek, a foszfo-caveolin-1-nek a kifejeződési mintázatát is. Érdekes módon a rodopszin, a rodopszin kináz, a caveolin-1 és a c-src elrendeződése igen hasonlóknak tűnt a fejlődő külső magvas rétegben. Diffúz pozitív reakciót azonosítottunk a külső magvas rétegben és a jelek szemcsés ill. pontozott formában jelentkeztek. A fejlődés alatt jelentkező protein expresszió mértékét Western blot segítségével is vizsgáltuk. A rodopszin, a rodopszin kináz, a caveolin-1 és a foszfo-caveolin-1 nem volt kimutatható 1 napos korban, míg az expressziójuk fokozatosan nőtt az 5. és 15. nap között, maximumát elérve a felnőtt állatok retinájában. Ezzel szemben a c-src expressziója állandó maradt a fejlődés alatt. Mivel rodopszin, a rodopszin kináz, a caveolin-1 és a c-src elrendeződése annyira hasonlított 10 és 15 napos kor között, felmerült annak a lehetősége, hogy ezen proteinek talán ugyanazon kompartmentben helyezkednek el. Kettősen jelölt immuncitokémia segítségével vizsgáltuk, hogy vajon kolokalizálnak-e egymással. Mivel az elrendeződésük 10 napos korba tűnt a leghasonlóbbnak, ezt az időpontot választottuk ki a kolokalizáció vizsgálatára. Sikerült egymástól jól elkülönülő pontszerű struktúrákat kimutatnunk a külső limitáns membrán és a belső plexiform réteg között, amelyek mind rodopszin-, mind caveolin-1 ellenes antitesttel jelölődtek. Ezek a kettősen jelölt struktúrák a képeken sárga színben jelentkeztek. A kül- és beltág területén annyi rodopszin volt található, hogy itt sajnos összefolytak a jelek és így kolokalizáló struktúrák azonosítására nem volt lehetőség. Hasonló megfigyeléseket tettünk a rodopszin és c-src kettős jelölése esetében. Az immuncitokémiai kolokalizáció megerősítésére immunprecipitációt használtunk, mivel feltételeztük, hogy a rodopszin a raft proteinnel egyfajta komplexet alkot. Ezen kívül kontrollként két másik fehérjét is vizsgáltunk ebben a kísérletben, a ROM-1-et és a RDS-t, mivel közülük a ROM-1-et kimutatták pálcika kültagok lipid raft frakciójában, míg az RDS-t nem (Boesze-



Battaglia és mts., 2002). A retinalizátumokat a rodopszin ellenes anti-opszin ellenanyaggal immunprecipitáltuk, majd az immunprecipitációs komplexeket izoláltuk. A komplexek fehérjetartalmát Western blot segítségével határoztuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy a rodopszin koimmunprecipitál a caveolin-1-el, a c-src-vel és a ROM-1-el, míg az RDS-el nem.

## 2. Raft proteinek lokalizációja a kifejlett retinában

A pálcikák azonosítására kísérleteinkben rodopszin és rodopszin kináz ellenes antitesteket használtunk. A rodopszin jelölődés csaknem kizárólag a kütagokra korlátozódott, míg a rodopszin kináz megtalálható volt a kül- és beltágokban, valamint a külső magvas rétegben is. Hasonlóan a fejlődő retinához, a felnőtt állatokban is vizsgáltuk a caveolin-1, a c-src és a foszfo-caveolin-1 lokalizációját. A caveolin-1 jelenléte egyértelmű volt a beltágokban, míg a kütagok nem- vagy alig jelölődtek. A külső magvas réteg szintén tartalmazott caveolin-1-et, ahol mint ismert, ebben a rétegben döntően a fotoreceptorok sejttestjei és Müller sejtek nyúlványai találhatóak. A caveolin-1-el ellentétben a foszfo-caveolin-1 csak a kütagokban volt jelen, míg a beltágok és a külső magvas réteg nem jelölődtek. A c-src elrendeződése a retinában hasonló volt a caveolin-1 esetében látottakhoz: a c-src ellenes ellenanyag elsősorban a beltágokat jelölte meg, míg a kütagokat alig és a külső magvas rétegben diffúzan szétszórt pontszerű struktúrákat jelölt. Ezután teljes retinalizátumok és kütagizolátumok foszfo-caveolin-1 tartalmát hasonlítottunk össze biokémiai módszerek felhasználásával. Mint vártuk a kütag izolátumok jóval több rodopszint és rodopszin kinázt tartalmaztak összehasonlítva a teljes retinamintákkal. A caveolin-1, foszfo-caveolin-1 és c-src mind jelen voltak mindkét mintatípusban (Berta és mts., 2011b). Mivel a hörcsög fotoreceptorai, más rágcsálókhoz hasonlóan igen vékonyak, a kül- és beltágok részleteinek azonosítása fénymikroszkóppal nem lehetséges, viszont a *Xenopus laevis* fotoreceptorai jóval nagyobbak. A pontosabb fehérjelokalizáció érdekében a *Xenopus* retináját is megjelöltük caveolin-1- és foszfo-caveolin-1 ellenes ellenanyaggal, és azt tapasztaltuk, hogy a foszfo-caveolin-1 a kütagok peremén és cíliumaiban volt megtalálható. A caveolin-1 ellenes ellenanyagunk nem adott specifikus jelölődést ebben a fajban.

### 3. A caveolinok lokalizációja különböző öröklött retinadegenerációkban kutyában

Először le akartuk írni a caveolinok elrendeződését a normál kutya retinában. Kísérleteink azt mutatták, hogy a caveolin-1, a caveolin-2 és a c-src megtalálható a külső magvas réteg sejtjeiben, ami arra utal, hogy fotoreceptorok ill. esetleg Müller sejtek jelölődhetnek e rétegben. Lópatkó alakú ill. kis kerek struktúrák váltak láthatóvá a ezekkel az ellenanyagokkal a külső és a belső magvas réteg határán: ezek megjelenésük alapján a csapok és pálcikák preszinaptikus termináljainak tűnnek. A beltágok egyértelmű jelölődést mutattak, míg a kültágok csak nagyon gyengén vagy gyakorlatilag egyáltalán nem jelölődtek. A caveolin-3 ellenes antitest ebben a fajban egyáltalán nem jelölt meg fotoreceptorokat. A foszfo-caveolin-1 itt is csak a kültágokban volt jelen, míg a foszfo-caveolin-2 teljesen hasonló jelölést adott mint a caveolin-2. A pigment epithelium tartalmazott caveolin-1-et, caveolin-2-et, foszfo-caveolin-1-et, foszfo-caveolin-2-et és c-src-t, de caveolin-3-at nem. A belsőbb elhelyezkedésű retinarétegekben a caveolin-1, a caveolin-2, a foszfo-caveolin-1, a foszfo-caveolin-2 és a c-src erős jelölést adott az erek közelében, viszont a belső magvas réteg és a ganglion sejtek rétege csak gyengén jelölődött. Érdekes módon a caveolin-3 olyan sejteket jelölt meg, amelyek morfológiájuk és elhelyezkedésük alapján horizontális sejteknek tűnnek. Ezután ugyanezen ellenanyagok segítségével különböző retinadegenerációkban szenvedő (*erd*, *rcd1*, *crd2* and *XLPR2*) kutyák retináit is megvizsgáltuk. Az itt kapott eredményeket összehasonlítottuk a normál retinában megfigyelttel és tapasztaltunk is bizonyos különbségeket. Ezek szerint a fotoreceptorok elfajulása valamennyire érinti a raft proteinek kifejeződését is. A legszembetűnőbb eredmény az volt, hogy a foszfo-caveolin-1 nem adott pozitív reakciót a kültágokban egyetlen betegségben sem, ami arra utalhat, hogy ezek a beteg fotoreceptorok talán nem képesek foszforilálni a caveolin-1-et. Érdekes volt az az eredmény is, hogy a *XLPR2* és a *crd2* retinákban a caveolin-2 semmilyen struktúrát nem jelölt, míg az *erd* és a *rcd1* retinában hasonló volt, mint a normál állatban.

### 4. A caveolin izoformák elrendeződése a maki retinában

Caveolin-1: A makula területén a caveolin-1 a retina minden rétegében

megfigyelhető volt és a jelölés erőssége alig mutatott különbségeket az egyes rétegek között. Mind a kül-, mind a beltagokban látható volt a jelölés. A külső- és belső magvas rétegben a jelölt apró struktúrák a plazmamembrán mentén sorakoztak. A ganglion sejtek rétege ill. a két plexiform réteg diffúz jelölődést mutatott. A retina perifériáján, a caveolin-1 ugyanezen rétegekben volt jelen, viszont a jelek sűrűsége láthatóan kisebb volt. A corpus ciliare területén mindkét réteg tartalmazott caveolin-1-et.

Caveolin-2: a caveolin-2 immunjelölése különbözött a caveolin-1-étől. A maki retina alig tartalmazott caveolin-1-et. Gyenge jeleket találtunk a ganglion sejtek rétegében. A corpus ciliare területén nem láttunk jelölődést.

Caveolin-3: A makula régiójában és a perifériás területeken is a caveolin-3 immunjelölése hasonló volt a caveolin-1-hez, de a jelek becsült sűrűsége jóval kisebb volt. Jelölődést láttunk a ganglion sejtek rétege és a belső limitáns membrán között, a jelek becsült sűrűsége alacsony és közepes volt. A caveolin-3 megtalálható volt a corpus ciliare-t borító hámban is (Berta és mts., 2007b).

## 5. A caveolinok elrendeződése a melanoma malignum miatt enukleált humán szemek retinájában

Caveolin-1: Az ellenanyag megjelölte a retina összes rétegét. A leggyengébb jelölődést a pigment epitheliumban tapasztaltuk. Más rétegekben a jelek becsült mennyisége alacsony és nagyon magas szint között mozgott. Az immunjelölés egy jellegzetes centroperifériás grádienszt mutatott: a legcentrálisabb területen tapasztalt alacsonyabb szintről felemelkedett egészen magas szintre, majd lecsökkent egészen alacsony szintre a legperifériásabb részeken.

Caveolin-2: Itt immunjelölődést tapasztaltunk a külső magvas réteg és a belső limitáns membrán között, ennek becsült mennyisége nagyon alacsony és közepes szint között mozgott. A perifériásabb területeken viszont a belső plexiform rétegben, az idegrostok rétegében és a belső limitáns membrán területén nem láttunk specifikus reakciót. A corpus ciliare hámjában szintén nem láttunk jeleket.

Caveolin-3: A makula területén a caveolin-3 a belső magvas rétegtől a belső limitáns membránig volt jelen, a jelek becsült sűrűsége nagyon alacsony és közepes szint között mozgott. Perifériásabb területeken hasonló jelölődést tapasztaltunk, viszont itt a

kültagok is megjelölődtek. A corpus ciliare területén mindkét epithel rétegben láttuk specifikus reakciót, melynek általunk becsült mennyisége alacsony ill. közepes volt (Berta és mts., 2007a).

## 6. Korai retinadegeneráció (*erd*) kutyákban

Először leírtuk az *erd* retina fejlődésének és degenerációjának morfológiai mozzanatait fénymikroszkóppal 7  $\mu$ m-es hematoxylin-eozinnal festett metszeteken. Ezzel a módszerrel a retina fejlődése normálisnak tűnik egészen 7,7 hetes korig és 8,3 hetes kortól kezdve látszanak az elfajulás első jelei. 12,3 hetes korban már a kül- és beltagok számának csökkenése, ill. a megmaradt beltagok rövidülése igen kifejezett. Ezek az elváltozások még súlyosabbá válnak 14,1 hetes korban. Egészen eddig a pontig, a külső magvas réteg vastagsága gyakorlatilag változatlan marad, viszont 48,1 hetes korra ez a réteg drámai módon elvékonyodik és ekkorra már a kül- és beltagok egészen csökevényessé válnak. A belső magvas réteg vastagsága csak közepes mértékben csökken. 62 hetes korra a degeneráció olyan súlyossá válik, hogy a külső magvas réteg már csak egyetlen sejtréteget tartalmaz. A retina gyakorlatilag teljesen elfajul 101 hetes korra, ekkor már a gliasejtek dominálnak és fotoreceptorok már nem azonosíthatóak, majd 165 hetes korra a retina extrém módon elvékonyodik.

Immunitokémia segítségével kimutattuk, hogy már 4,3 hetes korban részleges rodopszin miszlokalizáció látható a külső magva rétegben. A kültagok hosszúsága nem egyenletes és a kontúrjaik is szabálytalanok. 7,7 és 14,1 hetes kor között a pálcikák elfajulása progresszívvé válik: a kültagok rendezetlenné válnak, hosszuk igen heterogén, egy részük nagyon megrövidül vagy el is tűnik. A rodopszin miszlokalizációja súlyossá válik. Az L/M opszin és a S opszin megtalálható az hCAR-ral azonosított csapokban. A csapok száma és elrendeződése normális volt minden vizsgált életkorban (4,3-14,1 hét). A morfológiájuk viszont kórosnak mutatkozott, a kontúrjaik szabálytalanná válnak hasonlóan a pálcikákhoz. Érdekes módon a monoklonális OS-2 antitest nem csak a kék csapokat jelölte, hanem 7,7 és 14,1 hetes kor között megjelölte a pálcikák kültagjait is.

A sejtpusztulás kinetikájának meghatározására TUNEL jelölést használtunk a retina kifejlődése alatt (4,3 hét) és után (7,7-14,1 hét). Úgy találtuk, hogy a sejthalál időszaka elnyújtott és két csúcsa is van 7,7 és 11,6 hetes korban. Annak érdekében,

hogy a külső magvas réteg változását számszerűsíteni tudjuk, lemértük annak vastagságának változását. 4,3 és 7,7 hetes kor között a külső magvas réteg vastagsága csak minimálisan csökken, majd 48,1 hetes korra drámaian elvékonyodik. A csökkenés folyamatos egészen 62 hetes korig. Felfigyeltünk arra az érdekes dologra, hogy a magas számú sejthalál ellenére a külső magvas réteg vastagsága gyakorlatilag változatlan marad 4,3 és 7,7 hetes kor között, ami felvetette azt, hogy ekkor sejtosztódásnak is történnie kell. Ennek kimutatására és kvantifikálására PCNA jelölést használtunk. Mint várható volt 4,3 és 7,7 hetes kor között magas számú osztódás volt e rétegben megfigyelhető. Hasonlóan a sejthalál kinetikájához, a sejtosztódásban is két csúcs volt megfigyelhető, még hozzá pontosan ugyanazon időpontokban, mint a sejthalál esetében.

A génexpresszió leírására qRT-PCR-t használtunk, vizsgáltuk az STK38L és az még egy NDR családdhoz tartozó gén, a LATS1 expresszióját *erd* és kontroll állatokban. Az STK38L expressziója állandó maradt a fejlődés alatt a kontroll állatokban. Az *erd* retinákban (mRNS-ükben az exon 4 érintett), az exon 6 ellenes próbák azt mutatták, hogy 8,3/9,9 hetes és 11,9/14,1 hetes korban a kóros mRNS mennyisége megemelkedett ( $0.05 \leq p \leq 0.1$ ). A LATS1 expressziója magasabb volt a 3 hetes normál mintákban ill. 8,3/9,9 hetes és 11,9/14,1 hetes *erd* retinákban.

A immunoblot analízis azt mutatta, hogy három fehérje, az S opszin, az L/M opszin és az RDS peripherin mennyisége magasabb volt 6,4 hetes és 9,9 hetes *erd* állatokban, összehasonlítva a 8 hetes kontrollal.

Autoradiográfias kültagmegújulással foglalkozó vizsgálataink során mintákat vettünk 1,2,3 és 4 nappal az intravitrealisan beadott  $^3\text{H}$ -leucin és  $^3\text{H}$ -fukóz izotópokat tartalmazó injekció után. Mint várható volt, elkülönült diszkek leválását tapasztaltuk a normál minták pálcikáiban. A mutáns állatokban viszont, nem voltak jól elkülöníthető sávok, hanem diffúz radioaktív jeleket láttunk a kültagok magasságában. Ez a fajta jelölés a csapokra jellemző. Ezt kiegészítve, egy sor biokémiai vizsgálatot csináltunk az opszin bioszintézis és degradáció követésére  $^3\text{H}$ -fukóz és  $^{14}\text{C}$ -leucin intravitrealis injekciója után szintén 1,2,3 és 4 nappal. Az izotópok beépülése különbözött a kontroll és mutáns állatokban: normál állatokban a beépült izotóp mennyisége folyamatosan növekedett, míg az *erd* állatokban a 2. naptól ez a mennyiség fokozatosan csökkent (Berta és mts., 2011a).

## Következtetések

Eredetileg úgy gondolták, hogy a caveolinok a központi idegrendszerben csak a gliasejtekben vannak jelen. Újabb vizsgálatok azonban kimutatták, hogy mindhárom caveolin izoforma expresszálódik központi idegrendszeri neuronokban (Head és Insel, 2007). Ugyanakkor, érdekes módon, ugyanezen sejtekben caveolákat nem tudtak kimutatni, viszont lipid raftokat igen. Ma már széles körben elfogadott tény, hogy a caveolinok léteznek a caveolákon kívül is (Head és Insel, 2007). A caveolinoknak két alapvető funkciójuk van az idegsejtekben, egyrészt a szinapszisok fenntartásában és stabilitásában vesznek részt, másrészt fontos szerepük van az intracelluláris jelátvitelben (Stern és Mermelstein, 2010).

Annak ellenére, hogy az egyes fajok között jelentős különbségek lehetnek, az eddigi irodalmi adatok és saját eredményeink alapján mondhatjuk, hogy a caveolinok a gerincesek retinájának szerves alkotóelemei. A mi munkacsoportunk elsőként írta le a caveolin izoformák lokalizációját és expresszióját a humán és a főemlős retinában, korábban csak hagyományos laboratóriumi állatokat (egér és patkány) használtak fel e célra (Bridges és mts., 2001; Kachi és mts., 2001; Ueda, 2002).

Az emlős retinákon végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy itt a különböző caveolin izoformák kisebb mennyiségben vannak jelen, mint a melanoma malignum choroideae miatt enukleált szemek retinájában emberben. A rágcsálók retinájában eddig csak néhány sejttypusban írták le a caveolin-1 jelenlétét (Bridges és mts., 2001; Kachi és mts., 2001; Ueda, 2002).

A saját vizsgálataink azt mutatták, hogy a caveolin-1 viszonylag egyenletesen oszlik el mind a maki, mind a humán retinában, de a szemikvantitatív analízisünk alapján a mennyisége nagyobb a humán retinában, mint a makiban (Berta és mts., 2007a; Berta és mts., 2007b). A caveolin-2 esetében a korábbi közlemények csak arról számoltak be, hogy ez a protein a retina erei körül mutatható ki (Ueda, 2002). A mi megfigyeléseink a maki retinában megerősítik ezen adatokat. Viszont a humán retinában a caveolin-2 a retina számos rétegében volt kimutatható, a külső magvas réteg és a belső limitáns membrán között. A fehérje becsült mennyisége is nagyobb volt a humán retinában, mint a makiban (Berta és mts., 2007a; Berta és mts., 2007b).

Egészen eddig egyetlen közlemény sem foglalkozott a retina caveolin-3 tartalmával. Eredetileg a caveolin-3-at izom specifikusnak gondolták, azonban az utóbbi időben leírták ezt a fehérjét asztroglia sejtekben és vegetatív ganglionokban (Kiss és mts., 2002). Ma már szintén ismert, hogy a caveolin-3 megtalálható a csirke fejlődésének korai szakaszában a központi idegrendszerben (Shin és mts., 2003). Ha összehasonlítjuk az emberi és a maki retinát, a caveolin-3 esetében nem tapasztaltunk olyan nagy mennyiségi különbségeket, mint a caveolin-1 és 2 esetében. Mégis, a caveolin-3 a humán retina több rétegében volt kimutatható, mint a makiban. A caveolin-3 elrendeződése a humán retinában hasonló volt a caveolin-2 elrendeződéséhez: immunreakció volt kimutatható a külső magvas réteg és a belső limitáns membrán között (Berta és mts., 2007a; Berta és mts., 2007b). Ezen eredményeket összefoglalva mondhatjuk, hogy a caveolin izoformák elrendeződése és becsült mennyisége is különbözött a két fajban. Annak ellenére, hogy a caveolin egy igen konzervatív protein, expressziós mintázata és mennyisége is más lehet a különböző fajokban ill. szövettípusokban. Szintén nem kizárható, hogy más faktorok, mint a minták előkészítése vagy a choroideális tumor jelenléte, befolyásolták az eredményeinket.

Az első morfológiai eredményekkel párhuzamosan más munkacsoportok biokémiai módszerekkel vizsgálták a retina caveolin tartalmát és kimutatták a caveolin-1-et a pálcikák kültagjának lipid raft frakciójában (Boesze-Battaglia és mts., 2002). Később a rodopszin (Seno és mts., 2001) mellett a rodopszin kináz (Senin és mts., 2004) és a c-src-t (Martin és mts., 2005) is kimutatták ugyanabban a membránfrakcióban. Mivel a rodopszin és a rodopszin kináz fontos alkotóelemei a fototranszdukciónak, míg a caveolin-1 és a c-src a lipid raftok ismert alkotóelemei (Pike és mts., 2003), továbbá mind a négy protein a fotoreceptorokban ugyanabban a membránfrakcióban volt kimutatható, így felmerül annak a lehetősége, hogy talán e két rendszer között funkcionális kapcsolat is van. Annak ellenére, hogy a biokémiai vizsgálatok a caveolin-1-et és a c-src-t a kültag egy membránfrakciójában mutatták ki (Boesze-Battaglia és mts., 2002; Martin és mts., 2005), mégis e fehérjék immuncitokémiával inkább a beltagban és a külső magvas rétegben mutathatóak ki, a kültagok gyengén vagy egyáltalán nem jelölődtek (Berta és mts., 2007a; Berta és mts., 2007b; Elliott és mts., 2008, Kachi és mts., 2001; Kim és mts. 2006).

A mi vizsgálataink hasonló eredményt mutattak a Szíriai Aranyhörcsög fotoreceptorainak esetében is (Berta és mts., 2011b).

A caveolin-1 a tirozin 14-en foszforilálódik és feltételezik, hogy ez a foszforilált caveolin forma szerepet játszik membrán domének olyan internalizációs folyamataiban (del Pozo és mts., 2005), amelyek hasonlítanak a kültag korongjainak kialakulásához. Ugyanakkor eddig egyetlen irodalmi adat sincsen a caveolin foszforilációjával kapcsolatban a retinális fotoreceptorokban. A mi eredményeink azt mutatták, hogy a foszfo-caveolin-1 érdekes módon majdnem kizárólag a fotoreceptorok kültagjaiban van jelen a felnőtt hörcsög retinában. Sajnos mivel e fajban a fotoreceptorok kültagjai igen vékonyak, pontosabb lokalizációra nem volt lehetőségünk (Berta és mts., 2011b). Viszont a munkánkban felhasznált *Xenopus laevis* nagyobb precizításra volt lehetőség, hiszen e fajban a fotoreceptorok kültagjai jóval nagyobbak. E fajban kimutattuk, hogy a foszfo-caveolin-1 a kültagok peremén ill. cíliumaiban található. Továbbá biokémiai módszerekkel is kimutattuk a foszfo-caveolin-1 jelenlétét az általunk izolált kültagfrakcióban. Ezen eredmények alapján elképzelhetőnek tűnik, hogy a caveolin-1 foszforilálódik mielőtt vagy miután bejut a beltágból a kültagba, esetleg a kettő határán a cíliumban. Ezt az elképzelést az is alátámasztja, hogy a c-src, az enzim, ami foszforilálja a caveolint (Li és mts., 1996), döntő többségében a beltágban van jelen (Berta és mts., 2011b). In vitro kísérletek is alátámasztják ezt az elképzelést (Elliott és Ghalayini, 2008).

Az az elképzelésünk, hogy esetleg a caveolin-1 egy passzív vagy aktív szereplője a rodopszin transzportnak eredetileg onnan származik, hogy a fejlődő hörcsög retinában a rodopszin, a caveolin-1, a rodopszin kináz and c-src expressziós mintázata igen hasonlóknak tűnt. Kettősen jelölt immuncitokémia segítségével kimutattuk, hogy a rodopszin kolokalizál mind a caveolin-1-el, mind a c-src-vel nem csak a fejlődő, hanem a felnőtt hörcsög retinában is. Ezt az eredményünket alátámasztottuk koimmunprecipitáció segítségével is (Berta és mts., 2011b). Továbbá ezen pontszerű struktúrák rodopszin tartalma és elhelyezkedése vezetett minket abba az irányba, hogy valószínűleg e struktúrák rodopszin transzport karrierek (Deretic, 2006), amelyek rodopszint (egy transzmembrán protein) szállítanak a kültag felé. Amennyiben ez így van, a rodopszin transzport karrierek lipid raftokat kell hogy tartalmazzanak, amelyek különböző proteineket gyűjtenek össze, például caveolin-1-et, c-src-t vagy



ROM-1-t. Ez az elképzelés jól illik ahhoz a nemrégben megjelent közleményhez, hogy integráns membránproteinek ill. membránhoz különböző módon (geranyl-geranyláció, palmitoyláció) kötött fehérjék egy közös útvonalon jutnak el a kültagba (Baker és mts., 2008). Felvetődik annak a lehetősége, hogy a caveolin-1 a rodopszin transzportot irányítja és/vagy szabályozza.

A lipid raftok ill. a caveolin-1 funkciója a fotoreceptorokban persze továbbra is egy nyitott kérdés marad és biztosan vitás téma lesz a közeljövőben is. Lehetségesnek tűnik, hogy lipid raftok szállítanak fototranszdukciós fehérjéket vagy, hogy szerepük van fototranszdukciós folyamatok szabályozásában, mivel leírták, hogy a lipid raftok fontos szerepet játszanak olyan intracelluláris folyamatokban mint például apikális membrán proteinek irányított szortírozása vagy a szignál transzdukció epithel sejtekben (Kurzchalia és Parton, 1999). Ami a caveolinokat illeti, a caveolin-1 és foszforilált formája képesek arra, hogy enzimek aktivitását szabályozzák a "scaffolding" doménjük segítségével (Schlegel és mts., 1998; Swaney és mts., 2006). Számos olyan enzim szerepel a fototranszdukcióban, amelynek a szabályozására a caveolin-1 vagy a foszfo-caveolin-1 képes lehet, de ez a probléma szintén megoldatlan marad. További vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy pontosan mi a szerepe a caveolin-1-nek és foszforilált formájának a fotoreceptorokban zajló folyamatokban. Különösen érdekes kérdés, hogy vajon miért kell a caveolin-1-nek foszforilálnia mielőtt belép a beltágból a kültagba. További összehasonlító morfológiai vizsgálatok is szükségesek, hogy megérthessük más fajokban milyen elrendezésben vannak jelen a caveolinok és mi a funkciójuk. Mi összehasonlítottuk a kutya és a hörcsög retinájának caveolin expresszióját, de jelentős különbségeket nem tapasztaltunk.

A kutyában STK38L gén mutációja az *erd* fenotípushoz vezet, amelyben kóros fotoreceptor fejlődés figyelhető meg. Ez mindenekelőtt a pálcikákat érinti (Acland és Aguirre, 1987). A korai retinadegeneráció egyedinek tűnik a retinadegenerációk között számos értelemben. A kül- és beltágok hosszúságai igen variábilis, az egyes fotoreceptor csoportok szinkronizált fejlődésének hiány mind olyan jelenségek, amelyeket más retinadegenerációkban még nem írtak le. Az opszin miszlokalizációja valószínűleg egy olyan mozzanata a fotoreceptorok kóros állapotának, amely egy sejtspecifikus kifejeződési formája a kóros génnek (Beltran és mts., 2006; Rohrer és mts., 2005). Az alapján, hogy az opszin miszlokalizáció és a neurite sprouting, azaz

neurit csírák megjelenése a pálcikákhoz köthető, feltételezhetjük, hogy az STK38L egy pálcika specifikus gén és a csapokban megfigyelt degenerációs folyamatok csak másodlagosan alakulnak ki. Az *erd* retinában a TUNEL segítségével kimutatott apoptózis terminálisan kifejlődött fotoreceptorokban jelenik meg, csak miután a retina fejlődése már befejeződött (Acland és Aguirre, 1987). A sejtpusztulással egy időben sejtosztódás is megfigyelhető a külső magvas rétegben, ezt két különböző proliferációs markerrel is sikerült kimutatnunk (PCNA and KI-67). Immuncitokémia segítségével kizártuk annak a lehetőségét, hogy ezen sejtek Müller sejtek, mikroglia, retinális progenitor sejtek lennének. Az eredményeink alapján mondhatjuk, hogy a proliferáló sejtek a külső magvas rétegben fotoreceptorok kelljenek, hogy legyenek (Berta és mts., 2011a). Eddig rajtunk kívül még senkinek sem sikerült kimutatnia, hogy fotoreceptorok újabb generációja jelenne meg természetes úton egy retinadegenerációban. Ami továbbra sem világos, hogy vajon milyen szignálok szükségesek ahhoz, hogy egyes fotoreceptorok a sejthalál, mások az osztódás útját válasszák. A sejthalál fázisával egy időben osztódási folyamatok megváltoztatják a fotoreceptor populáció összetételét: a csaptípusok változatlanok maradnak, viszont a pálcikák új generációja kicsit hasonlóvá válik a csapokhoz. Ezt a biokémiai vizsgálataink ill. az izotópos membrán megújulási és opszin szintézissel kapcsolatos vizsgálataink is alátámasztják (Berta és mts., 2011a). Ezután, ugyanúgy mint más retinadegenerációkban, a fotoreceptorok sejthalála lesz a domináns, amely a retina szerkezetének megállíthatatlan pusztulásával jár együtt. Mégis ez a sejtproliferációs fázis igen érdekes és a retina rejtett regenerációs képességére utalhat és feltételezhetően az STK38L gén irányítása alatt áll. Ennek nagy jelentősége lehet a jövőben nem csak az alap kutatásban, hanem hatással lehet klinikai vizsgálatokra, amelyek retinadegenerációk megelőzését vagy gyógyítását célozzák.

A retinadegenerációk jelenleg gyógyíthatatlan betegségek. A fotoreceptorok fejlődésével és degenerációjával kapcsolatos vizsgálatok elengedhetetlenek ahhoz, hogy olyan új, eddig ismeretlen fotoreceptor differenciációs mechanizmusok lássanak napvilágot, amelyek manipulálásával a jövőben talán az elfajult fotoreceptor réteg helyreállítása válik majd lehetővé. Vizsgálataink során leírtuk, hogy egy új fehérje, a caveolin-1, fontos szerepet játszhat a fotoreceptorok fejlődésében, illetve, hogy egy új gén, az STK38L, szerepet játszhat a fotoreceptorok osztódásának és differenciálódásának szabályozásában.

## Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Berta, A.I., Kiss, A.L., Kemeny-Beke, A., Lukats, A., Szabo, A., and Szel, A. (2007a). Different caveolin isoforms in the retina of melanoma malignum affected human eye. *Mol Vis* 13, 881-886. IF:2,329
2. Berta, A.I., Kiss, A.L., Lukats, A., Szabo, A., and Szel, A. (2007b). Distribution of caveolin isoforms in the lemur retina. *J Vet Sci* 8, 295-297.
3. Berta, A.I., Boesze-Battaglia, K., Genini, S., Goldstein, O., O'Brien, P.J., Szel, A., Acland, G.M., Beltran, W.A., and Aguirre, G.D. (2011a). Photoreceptor Cell Death, Proliferation and Formation of Hybrid Rod/S-Cone Photoreceptors in the Degenerating STK38L Mutant Retina. *PLoS One* 6, e24074. IF:4,092
4. Berta, A.I., Boesze-Battaglia, K., Magyar, A., Szel, A., and Kiss, A.L. (2011b). Localization of caveolin-1 and c-src in mature and differentiating photoreceptors: raft proteins co-distribute with rhodopsin during development. *J Mol Histol* 2011, 22. IF: 1,484

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

Nincs.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom kollégáimnak és barátaimnak egyrészt a Humánmorfológiai Intézetben, különös tekintettel a Sejt- és Molekuláris Biológiai Labor munkatársaira, másrészt a philadelphiai Pennsylvania Egyetemen az Eye Research Lab, School of Veterinary Medicine dolgozóinak.

Rengeteg segítséget kaptam mindkét labor asszisztenseitől, Lőcsey Katalintól, Kutasi Margittól, Svetlana Savina-tól, Jessica Rowling-tól és Lydia Melnyk-től.

Hálával tartozom tanárimnak, Szél Ágostonnak, Kiss Annának, Gustavo Aguirre-nek, Kathleen Boesze-Battaglia-nak, Magyar Attilának és Röhlich Pálnak.