

УДК 612.84

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕЙРОНОВ СЕТЧАТКИ

© 2009 г. Е.М. Максимова

*Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН
127994 Москва, Б. Каретный пер., 19
E-mail: maximova@iitp.ru*

Поступила в редакцию 18.06.2009 г.

В сетчатке позвоночных животных существует 10–15 типов ганглиозных клеток, обрабатывающих параллельно (каждый тип по-своему) зрительное изображение на поле рецепторов и посылающих свои выходные сигналы в разные первичные зрительные центры мозга. Дендриты каждого типа ганглиозных клеток, как кафелем, покрывают всю площадь сетчатки на разных уровнях внутреннего синаптического слоя, где они получают входные сигналы от разных типов интернейронов. Характер обработки изображения определяется специфическими синаптическими связями. В процессе морфогенеза клетки узнают друг друга, устанавливают контакты и распределяют “территории обслуживания” при помощи мембранных адгезивных молекул из надсемейства иммуноглобулинов. Витальные молекулярно-генетические методы маркирования позволяют установить соответствие морфологических и физиологических свойств нейронов и увидеть процесс формирования этих свойств. Обнаружен новый тип быстрых off-дирекционально избирательных ганглиозных клеток, экспрессирующих Jam-B. Медленные дирекционально избирательные ганглиозные клетки, реагирующие на движение стимула снизу вверх в поле зрения, маркируются белком SPIG1.

Ключевые слова: сетчатка, ганглиозные клетки, дендриты, дирекциональная избирательность, адгезивные молекулы: Dscam, Dscam-L, Sidekick-1, Sidekick-2, Dasm, Jam-B, SPIG1.

Все рецепторное поле сетчатки разделено на области обслуживания отдельными ганглиозными клетками (ГК) – рецептивные поля ГК (Masland, 2001). В сетчатке позвоночных существует полтора десятка типов ГК, различающихся по физиологическим, морфологическим и биохимическим свойствам (Marc, Jones, 2002; Rockhill et al., 2002; Sun et al., 2006; Kong et al., 2005). ГК каждого типа осуществляют свою специфическую обработку исходного зрительного изображения на поле рецепторов. Результат этой обработки – свои выходные сигналы – ГК посылают по аксонам в соответствующие первичные зрительные центры мозга: зрительные покровы (tectum opticum), или верхние бугорки четверохолмия у млекопитающих, коленчатые тела, ядра добавочной зрительной системы (ДЗС), супрахиазматическое ядро и др. Обобщая разные физиологические классификации ГК, разработанные разными авторами на сетчатках разных животных, можно выделить обычные ГК с концентрической организацией рецептивного поля и необычные, такие как дирекционально избирательные ганглиозные

клетки (ДИ ГК), детекторы пятна (или детекторы локальной границы), детекторы ориентированных линий (Masland, Martin, 2001). Характер обработки зрительного изображения, осуществляемый ГК, определяется ее специфическими связями с полем фоторецепторов через интернейроны – биполяры и амакриновые клетки. Дендритные ветвления ганглиозных клеток каждого типа полностью, мозаично, как кафелем, покрывают все поле зрения. Мозаичное покрытие (tiling) гарантирует, что каждая область сетчатки и тем самым каждая область поля зрения будет покрыта (обычно единожды) дендритами каждого типа ГК (Wässle et al. 1981; Rockhill et al., 2000; Jan, Jan, 2001).

Уже на уровне наружного синаптического слоя происходит разделение нервных потоков (цепей) на on- и off-пути, обрабатывающие увеличение и уменьшение яркости. Это разделение сохраняется во внутреннем синаптическом слое (ВСС), где аксоны off- и on-биполяров оканчиваются в разных горизонтах, так называемых подпластинах *a* и *b* (Famiglietti, Kolb, 1976, Famiglietti, 1992). Там различают по крайней мере десять страт –

параллельных уровней ветвления отростков интернейронов разных популяций – биполяров и дофаминэргических, глицинэргических, ацетилхолинэргических, ГАМКэргических и других амакриновых клеток. Дендриты ГК ветвятся и образуют синапсы в одной или нескольких стратах. Эти стратоспецифические связи и определяют, на какие свойства зрительных стимулов реагируют разные типы ГК. Можно сказать, что форма дендрита определяет физиологию клетки.

Формирование страт ВСС в развитии и роль адгезивных молекул в этом процессе

Расположение клеточных тел по слоям, их плотность, характер ветвления отростков, взаиморасположение дендритов клеток одной популяции (мозаика дендритных полей), и отростков клеток разных типов (костратификация и кофасцикуляция) устанавливается в разные периоды онтогенеза сетчатки. Общее количество ветвей дендрита, количество и свойства его ветвлений, длину, уровень стратификации, а также величину дендритного поля определяют в процессе морфогенеза многочисленные факторы: транскрипционные регуляторы, регуляторные мембранные механизмы, цитоскелетные или mRNA связанные белки, многие поверхностные молекулы и внутриклеточные сигнальные механизмы (Shi et al., 2004; Gao, 2007).

На ранних этапах развития сетчатки дендриты ГК ветвятся диффузно по всей толще ВСС и только позже, постнатально происходит их окончательное формирование. Показано, что для созревания on/off дендритного расслоения ГК необходим афферентный нервный приток от биполяров и амакриновых клеток (Vodnarenko, Chalupa, 1993). Считалось, что стратификация дендритов ГК происходит главным образом за счет удаления лишних, не получивших возбуждающих афферентных входов, отростков диффузных дендритных деревьев. (Bisti et al., 1998; Xu, Tian, 2004; Coombs et al., 2007). Как биполяры, так и ацетилхолинэргические амакрины могут предлагать ламинарные сигналы для созревания дендритов ГК (Zhou, 2001). На сетчатках хорька, мыши, хомячка показано, что спонтанные волны активности, возникающие в амакриновых звездчатых ацетилхолинэргических клетках, в раннем постнатальном периоде развития сетчатки синхронизованы с периодом активного движения филоподий (возникновения и элиминации) дендритов ГК. Возможно, эти волны являются причиной, вызывающей этот процесс (Wong, 1999). Движение филоподий дендритов повышает вероятность их встречи с аксонами клеток предыдущих этажей и установле-

нии синаптических контактов. Ацетилхолиновые волны вызывают синхронное срабатывание ганглиозных клеток в одном глазу, и разновременное в разных глазах, что важно для формирования структуры следующих этажей зрительной системы (Wiesel, Hubel, 1963; Demas et al., 2003; Firth et al., 2005; Guido, 2008). Показано, что установление ламинарно- и колончато- специфических ретиноктальных связей у мыши происходит в результате уточнения структуры аксональных терминалей, за счет удаления (втягивания) некоторых из них, с четвертого по десятый постнатальные дни до открытия глаз, как раз в период возникновения спонтанных АХ волн в сетчатке (Wong et al., 1998).

На генетически модифицированной мыши, селективно экспрессирующей зеленый флуоресцирующий белок (GFP) в целой популяции фазических off-альфа ГК, соотнесены их мозаичное расположение, дендритная анатомия и электрические реакции с полной картой их аксональных проекций в мозг. Показано, что клетки этого типа проецируются в верхние бугорки четверохолмия и (их колатерали) в дорзальное латеральное колленчатое тело, причем аксональные терминали ламинарно ограничены на определенной глубине в каждом из этих ядер-мишеней. Аксональные терминали фазических off-альфа ГК в верхних бугорках организованы в колонки. И ламинарное и колончатое расположение развиваются как аксональные уточнения. При устранении ацетилхолиновых волн в сетчатке ламинарная специфика связей в верхних бугорках и ДКТ не нарушается, но не происходит образования колонок. Таким образом показано, что спонтанная активность в сетчатке способствует сегрегации аксонов ГК одного типа на генетически определенной сенсорной карте. (Huberman et al., 2008; Liets et al., 2003).

После открытия глаз зрительный опыт ремоделирует и консолидирует нервные сетчаточные циклы до взрослого зрелого состояния. Некоторые системы нейромедиаторов, такие как глутамат-, ацетилхолин-, ГАМК- и глицинэргические действуют порознь и совместно, изменяя и уточняя дендритную структуру ГК.

Другим важным механизмом установления точных нейронных связей является прицельное нахождение своего положения аксонами и дендритами в определенных синаптических пластинах-адресное прораствание. Покадровая съемка (time lapse) отдельных ГК *in vivo*, визуализированных (GFP) в сетчатке мальков данио последовательно в разные дни показала, что дендриты мультистратифицированных ГК генерируют кроны последо-

вательно, обычно в направлении от внутренней к наружной сетчатке, причем каждое деревце точно разрастается на своем уровне ВСС. Одновременная визуализация ГК и субпопуляции пресинаптических амакриновых интернейронов показали, что, по-видимому, дендриты ГК находят уже сформированные ранее плексусы амакринов (Jeff et al., 2006).

На 5-дневной рыбе данио в ВСС сетчатки существует девять страт, где устанавливают синаптические контакты аксоны биполяров, отростки амакриновых и дендриты ГК. В тектуме четыре пластины аксональных окончаний ГК буквально “упираются” в страты нейритов клеток собственно тектума. Ни устранение световой стимуляции путем выращивания в темноте, ни уменьшение активности сетчатки за счет отключения оп-канала при помощи АРВ не влияло ни на организацию страт во ВСС, ни в тектуме (Nevin et al., 2008; Ott et al., 2007).

Бесценную информацию о созревании сетчатки представили опыты по трансгенному маркированию индивидуальных клеточных адгезивных молекул. Адгезивные молекулы относятся к надсемейству иммуноглобулинов – белковых молекул, находящихся на поверхности мембраны клеток, или трансмембранно. В своей структуре они имеют иммунодомен (один или несколько). Они экспрессируются в определенные периоды развития и (наряду с другими факторами) играют большую роль в эмбриогенезе, регулируя расположение клеточных тел, отношения соседних дендритных ветвлений и аксонов нейронов одной популяции и разных популяций, в установлении синаптических контактов, морфогенезе шипиков и синаптической пластичности. Адгезивные молекулы – это тот инструмент, при помощи которого клетки узнают друг друга, объединяются в физиологические ансамбли и распределяют территориальные влияния (Sakisaka, Takai, 2005; Fuerst et al., 2008).

На нейронах сетчатки в разных исследованиях были маркированы такие молекулы, как Dscam (Down syndrome cell adhesion molecule – Даун-синдром адгезивная молекула), Dasm-1 (dendrite arborization and synapse maturation 1 – арборизация дендритов и созревание синапсов 1), Sidekick-1, Sidekick-2 (трансмембранные молекулы “Соратники” – специальные адгезивные молекулы, которые определяют синаптическую специфичность по принципу “ключ к замку”), JAM-B (junction adhesion molecule B), SPIG1 – секреторная молекула неизвестной функции, которая состоит из фоллистатинподобного домена, экстра-

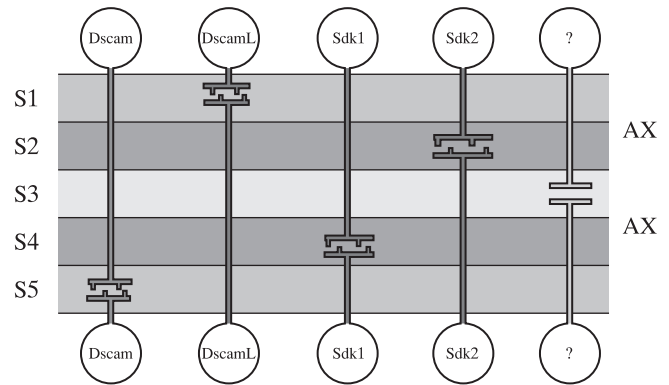


Рис. 1. Схематическое представление вертикального среза сетчатки, окрашенной иммунохимически специфическими антителами к адгезивным молекулам Dscam, DscamL, Sidekick-1 and Sidekick-2 и холин ацетилтрансферазе (AX).

Адгезивные молекулы Dscam, DscamL, Sidekick-1 and Sidekick-2 экспрессируются в неперекрывающихся сообществах клеток сетчатки, сконцентрированы в разных стратах ВСС и намечают четыре пути обработки и прохождения зрительного сигнала; S1 – S5 страты ВСС; AX – положение двух плексусов (off-дистального и оп-проксимального) ацетилхолинэргических звездчатых амакриновых клеток; “?” – обозначает нейроны, вероятно, экспрессирующие иные адгезивные молекулы. (По Yamagata et al., 2006, изменено).

клеточного кальцийсвязывающего домена и двух иммуноглобулинподобных доменов.

В сетчатке цыпленка показано, что Dscam, DscamL, Sidekick-1, Sidekick-2 – экспрессируются в неперекрывающихся субпопуляциях интернейронов (биполярах и разных типах амакриновых клеток) и ГК, которые образуют синапсы в разных стратах ВСС. Dscams и Sidekicks маркируют и помогают выделить четыре параллельных пути во внутренней сетчатке (рис. 1). Каждый тип молекул сконцентрирован в определенных стратах и каждый обеспечивает гомофильную адгезию. (Гомофильная адгезия показана и на культуре клеток.) Изучение утраты (knock out) или усиления (knock in) их функции *in vivo* показывает, что эти молекулы принимают участие в определении страт ВСС, где ветвятся и синаптически связываются нейроны-партнеры.

Dscam, DscamL, Sidekick-1, Sidekick-2 необходимы и достаточны для гарантии специфической арборизации отростков в ВСС сетчатки. Аксоны ГК сетчатки, экспрессирующих каждую из этих четырех молекул надсемейства иммуноглобулинов, устанавливают синаптические контакты в разных тектальных подпластинах, а, возможно, и определяют их формирование.

При этом Dscams и Sidekicks маркируют только 60% ГК и такую же часть интернейронов сетчатки. Существуют, по-видимому, и другие аггезивные молекулы, которые маркируют Dscam и Sidekicks- негативные нейроны. Предполагается существование целого кода молекул надсемейства иммуноглобулинов для ламинарной спецификации в сетчатке, и, вероятно, в других частях ЦНС (Yamagata et al., 2006; Yamagata, Sanes, 2008).

При помощи трансгенного маркирования адгезивных молекул сделаны еще два крупных открытия, важных для понимания механизмов спецификации типов ГК сетчатки.

– Впервые обнаружены свойства мембраны дирекционально избирательных ГК, коррелирующие с выделяемым ими предпочтительным направлением движения стимула (Yonehara et al., 2008).

– Методом трансгенного маркирования JAM-B в сетчатке мыши выявлен ранее неизвестный подкласс быстрых ДИ ГК off-типа, разительно отличающийся от изучаемых уже 45 лет ДИ ГК в сетчатках разных животных (Kim et al., 2008).

Дирекционально-избирательные ганглиозные клетки сетчатки

Дирекционально избирательные клетки реагируют только на стимулы, движущиеся в определенном (предпочтительном) направлении, и не реагируют при движении в противоположном (нулевом) направлении, т.е. умеют вычислять направление движения. (Barlow et al., 1964; Taylor et al., 2000). ДИ ГК описаны в сетчатках рыб (Jacobson, Gaze, 1964; Cronly-Dillon, 1964; Зенкин, Пигарев, 1969; Максимова и др., 1971; Maximov et al., 2005; Максимов и др. 2005), черепаха (Bowling, 1980), голубя (Maturana, Frenk, 1963), кролика (Barlow et al., 1964; Yang, Masland, 1994; Taylor, Vaney, 2002), кошки (Cleland, Levick, 1974); мыши (Weng et al., 2005; Sun et al., 2006). ДИ ГК делят на два класса по типу их реакции на знак контраста стимула, скорость движения и по их центральным проекциям. Медленные on-ДИ ГК реагируют на светлые стимулы, движущиеся медленно (1.2–2 град./сек) по более темному фону, и проецируются в ядра добавочной зрительной системы (ДЗС), нейроны которой участвуют наряду с полукружными каналами, в организации оптокинетического рефлекса. Медленные on-ДИ ГК подразделяются на три группы по одному из трех предпочтительных направлений движения стимулов, отличающихся друг от друга на 120°, сообразно плоскостям полукружных каналов. Быстрые on-off ДИ ГК реагируют на быстро движущиеся стимулы, независи-

мо от знака контраста, и проецируются в верхние бугры четверохолмия (или тетум оптикум) и латеральные колленчатые тела. Быстрые ДИ ГК млекопитающих подразделяются на четыре группы, предпочитающие дорзентральное, вентродорзальное, темпоранозальное и назотемпоральное направления движения (Oyster, Barlow, 1967). У рыб и водных черепах, в отличие от млекопитающих, быстрые ДИ ГК делятся на шесть подтипов: on- и off- подтипы, в каждом из которых существуют три группы клеток, избирательных к одному из трех предпочтительных направлений стимула (Bowling, 1980; Maximov et al., 2005; Максимов и др., 2005).

Морфологически быстрые ДИ ГК у всех исследованных животных очень похожи. Кружевные, плоские, симметричные относительно тела клетки, дендритные ветвления быстрых дирекционалов костратифицированы с плексусами отростков on- и off-популяций звездчатых (starburst) амакриновых клеток (He et al., 1999; Dong et al., 2004; Максимова и др., 2006). Причем ДИ ГК, выделяющие разные направления движения, морфологически неразличимы. У кролика их дендриты образуют во ВСС четыре независимых мозаики (Vaney, 1994; Amthor, Oyster, 1995).

Дендриты медленных on- ДИ ГК кофасцилированы с холинэргическим плексусом on-популяции звездчатых амакриновых клеток и там костратифицированы с on- кронами быстрых дирекционалов (рис. 2.). Паттерн синаптических входов медленных on- ДИ ГК очень схож с таковым быстрых on-off ДИ ГК. Все говорит в пользу того, что механизмы вычисления и кодирования направления движения у этих двух классов дирекционалов общие (Koch et al., 1982; Sun et al., 2006). Звездчатые амакриновые клетки играют ключевую роль в организации дирекциональной избирательности, влияя на передачу сигнала с bipolarов на дендриты ГК при помощи двух медиаторов – ацетилхолина и ГАМК. Именно ГАМК ответственна за организацию дирекциональной избирательности (Caldwell et al., 1978; Ariel, Daw, 1981; Yoshida et al., 2001; Kittila, Massey, 1997).

Очевидно, что дирекциональная чувствительность в сетчатке требует асимметричного “напаивания” тормозных входов на дендриты четырех подтипов ДИ ГК у млекопитающих (и трех у черепах и рыб), предпочитающих движение в одном из четырех кардинальных направлений, и трех подтипов медленных дирекционалов. Показано, что нелинейные взаимодействия между возбуждающими и тормозными входными сигналами происходят именно постсинаптически на дендри-

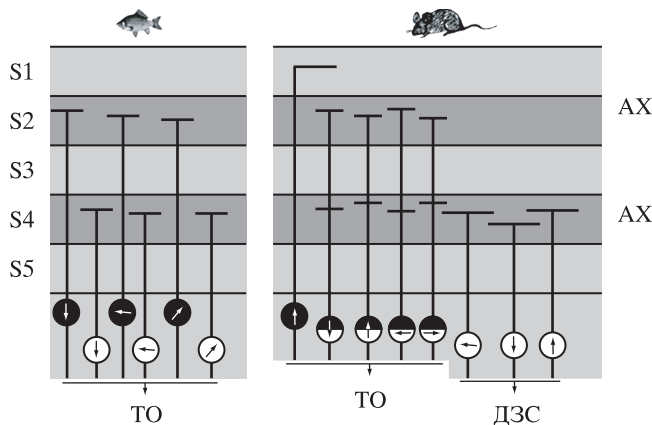


Рис. 2. Схематическое изображение уровней стратификации дирекционально избирательных элементов разных типов в сетчатке рыбы (слева) и млекопитающих (справа) и адресов их проекций. S1-S5 страты ВСС; AX – положение отростков звездчатых ацетилхолинэргических амакриновых клеток (в S2 off- типа, в S4 – on- типа). Черные кружочки – тела off дирекционалов, белые – on- дирекционалов, зачерненные наполовину – on-off – дирекционалов. Стрелками внутри кружочков обозначены предпочтительные направления, выделяемые дирекционалами. ТО – тектум оптикум, ДЗС – добавочная зрительная система.

тах ДИ ГК (Taylor et al., 2000; Taylor, Vaney, 2002; Stasheff, Masland, 2002).

Никому из исследователей до последнего времени, несмотря на тщательные прицельные поиски, не удавалось отметить никаких анизотропий строения дендритов, коррелирующих с выделением предпочтительного или “нуль”-направления, ни в строении дендритных крон, ни в расположении синапсов на дендритных ветвлениях быстрых и медленных ДИ ГК, ни в пределах дендрита одной клетки, ни в дендритах разных ГК, выделяющих разные направления движения (Amthor et al., 1984; He et al., 1999; Dong et al., 2004).

Изначально предполагалось, что в формировании дирекциональной чувствительности (также как в on/off расслоении во ВСС), ведущую роль могут играть ацетилхолиновые волны и зрительный опыт. Нервная пластичность, зависящая от активности, давно известна и на примере развития кортикальных структур (Wiesel, Hubel, 1963). С этой целью исследовали и сравнивали свойства рецептивных полей, зависимость реакции от скорости и морфологию быстрых ДИ ГК у кроликов, выращенных при нормальном световом режиме и в темноте. Показано, что зрительный опыт не критичен для построения свойств дирекциональности (Chan, Chiao, 2008). Аналогичные результаты получены на мыши. Показано при по-

мощи уникального мультиэлектродного устройства для экстраклеточной регистрации реакций от многих ГК одновременно, что четыре подтипа on-off ДИ ГК уже существуют в момент прорезания глаз, у мыши, воспитанной в полной темноте, и у трансгенной мыши с отсутствием ацетилхолинэргических волн в сетчатке. Следовательно, дирекциональная чувствительность и в сетчатке мыши определена молекулярными генетическими программами и устанавливается в большой мере независимо от patterned activity и зрительного опыта (Elstrott et al., 2008).

Медленные ДИ ГК панвентральной области сетчатки мыши, выделяющие движение вверх и вниз

Возникновение дирекциональной чувствительности как результата молекулярно-генетических программ подтвердилось и на медленных on- ДИ ГК мыши из панвентральной области сетчатки, проецирующихся в медиальное терминальное ядро (МТЯ) – главное ядро ДЗС, отвечающей за оптокинетический рефлекс. Была произведена генетически модифицированная мышь, у которой клетки, экспрессирующие SPIG 1, были визуализированы GFP. Оказалось, что SPIG1 экспрессируется в единственном подтипе ГК, проецирующихся в МТЯ. Их дендриты были костратифицированы с on-плексусом ацетилхолинэргических амакриновых клеток во ВСС. Следовательно SPIG 1-положительные ГК являются on- ДИ ГК. Количество SPIG 1-положительных ГК оказалось вдвое меньше, чем ГК, проецирующихся в МТЯ, которые выявляются ретроградным окрашиванием из МТЯ холеротоксином В (СТВ). При одновременной визуализации обоих маркеров – (СТВ)-красного и (GFP)- зеленого – было обнаружено, что ГК, проецирующиеся в это ядро, представлены двумя популяциями: на плоском препарате сетчатки наглядно представлены две отдельные, но взаимосвязанные, мозаики равной плотности, образованные желтыми (красный + зеленый) SPIG 1-положительными и красными – SPIG 1-отрицательными ГК. Поскольку примененный способ маркирования витальный, была возможность исследовать электрическую активность этих двух сортов ГК на препарате изолированной сетчатки. Оказалось, что SPIG 1-положительные ДИ ГК отвечали предпочтительно на движение зрительных стимулов (черно-белых решеток) в дорзовентральном направлении по сетчатке, т.е. снизу вверх в поле зрения мыши, SPIG 1-отрицательные ГК – на движение в противоположном направлении – сверху вниз (рис. 3). У мыши, выращенной в темноте, SPIG1-положи-

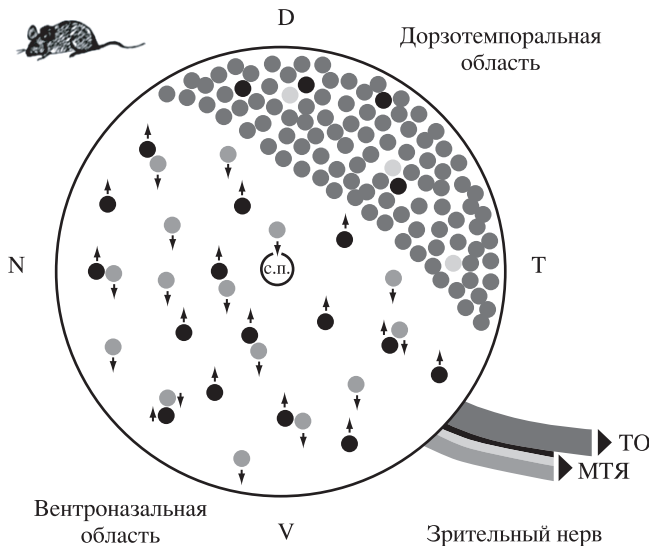


Рис. 3. Схематическое изображение профилей экспрессии SPIG1 в ганглиозных клетках сетчатки мыши.

В панвентроназальной области SPIG1 экспрессируется только в клетках, проецирующихся в медиальное терминальное ядро (МТЯ) ДЗС. В этой области сетчатки есть и другие клетки, проецирующиеся в МТЯ, но не экспрессирующие SPIG1. Клетки каждой из этих двух субпопуляций (SPIG1+ и SPIG1-) образуют свою мозаику. Часто SPIG1+ и SPIG1- клетки расположены парами. SPIG1+ ганглиозные клетки по электрофизиологическим и морфологическим показателям оказались оп-медленными дирекционалами, которые предпочитают движение стимулов вверх, а SPIG1- отрицательные – движение вниз в поле зрения мыши. Стрелками при кружочках – клетках обозначены предпочтительные направления движения стимулов в поле зрения мыши.

Ганглиозные клетки дорзотемпоральной области, экспрессирующие SPIG1, в основном проецируются в верхний бугорок четверохолмия (ТО), а также дорзальное латеральное коленчатое тело и в ДЗС. Их физиологические характеристики не известны.

D – дорзальное, V – вентральное, T – темпоральное, N – назальное направления.

С.П. – слепое пятно. (По Yonehara K. et al., 2008, изменено).

тельные ГК обладали дирекциональной чувствительностью, и у животного был нормально выражен оптокинетический рефлекс. Таким образом было показано, что предпочтение к восприятию движения стимула снизу вверх для SPIG1-положительных ГК – одного из подтипов медленных оп-дирекционалов, организуется независимо от зрительного опыта. ГК из обеих популяций (SPIG1+ и SPIG1-) были окрашены внутриклеточно краской DiI и изучена морфология их дендритных ветвлений в конфокальном микроскопе. Как и в других аналогичных исследованиях не было

обнаружено никаких морфологических отличий между ГК разных популяций. **Единственным отличием медленных оп- ДИ ГК, выделяющих противоположные предпочтительные направления движения стимулов, является наличие или отсутствие экспрессии адгезивной молекулы SPIG1** (Yonehara et al., 2008; 2009).

Остается вопрос: как на одном и том же плексусе звездчатых амакриновых клеток строятся три предпочтительных направления медленных дирекционалов и четыре взаимоперпендикулярных предпочтительных направления, детектируемые быстрыми дирекционалами? Можно предположить, что SPIG1, принимает участие в формировании специфических тормозных синаптических контактов, и SPIG1-положительные ГК в процессе синаптогенеза “выбирают” в ацетилхолиновом плексусе соответствующие ветви звездчатых амакриновых клеток, которые, как показано, тоже обладают избирательностью к направлению движения стимула (Gavrikov et al., 2006). Пока это невозможно увидеть “простым глазом”, даже с помощью конфокального микроскопа. Можно также предположить, что существует еще по крайней мере шесть других адгезивных молекул, ответственных за организацию синаптических контактов ДИ ГК во ВСС, выделяющих другие предпочтительные направления движения зрительных стимулов.

“Новые” быстрые дирекционалы мыши

При том, что построение механизма дирекциональности до сих пор до конца не понято, несмотря на множество известных подробностей, устойчивый образ единого принципиального строения и организации свойств ДИ ГК сформировался в сознании исследователей за полувековую историю их изучения (Fried et al., 2002). В мартовском номере “Nature” 2008 г. появилась статья, описывающая в сетчатке мыши совершенно новый и до толе невиданный тип ДИ ГК, визуализированных методом трансгенного маркирования адгезивных молекул контактов В (JAM-B) желтым флуоресцирующим белком (YFP). Морфология дендритов этих ДИ ГК, уровень их стратификации во ВСС разительно отличаются от этих характеристик у изучаемых уже 45 лет быстрых и медленных ДИ ГК (Kim et al., 2008). Эти клетки имеют асимметричные узкие дендритные деревья, вытянутые в дорзовентральном направлении на сетчатке (рис. 4). (На плоском препарате сетчатки они выглядят как кроны плакучих берез под сильным северным ветром.) Иммунохимически показано, что их дендриты стратифицированы дистальнее плексуса off- популяции звездчатых ацетилхоли-

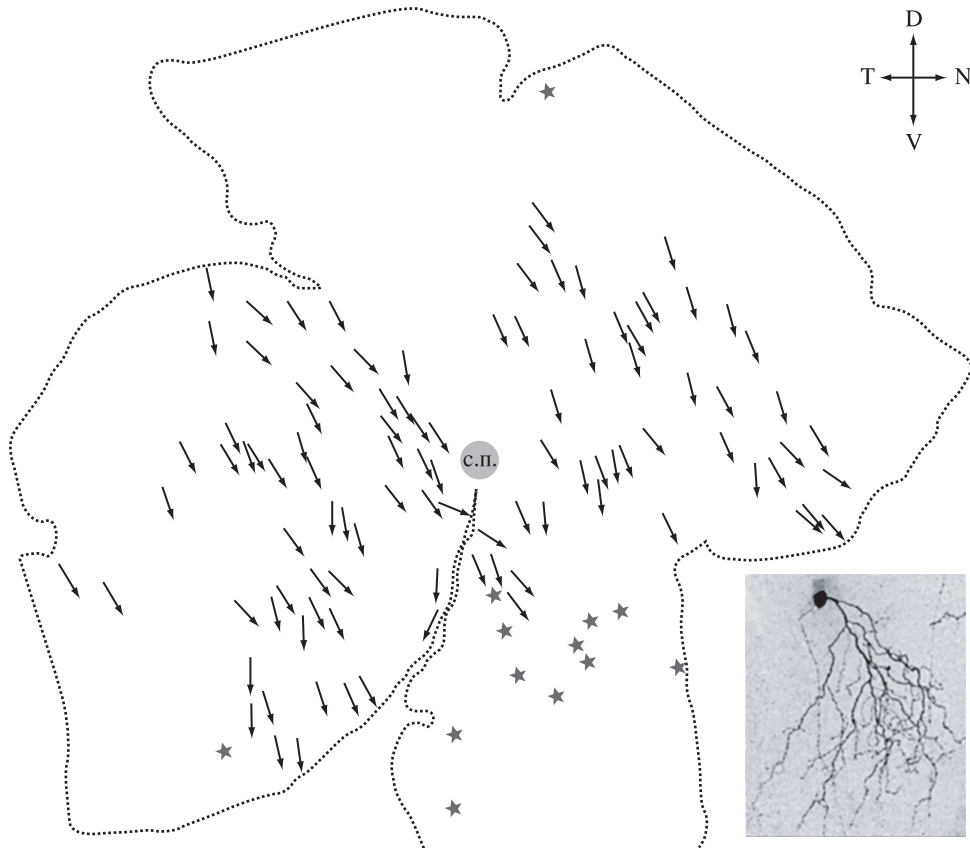


Рис. 4. Плоский препарат сетчатки мыши, где стрелками показаны положение ганглиозных клеток, экспрессирующих JAM-B, и ориентации их дендритов.

На врезке слева – вид одной из таких клеток. Предпочтительное направление, вычисляемое этими клетками совпадает с направлением дендрита. Звездочками обозначены ганглиозные клетки с симметричными дендритами, не обладавшие свойством дирекциональности. С.П. – слепое пятно; D – дорзальное, V – вентральное, T – темпоральное, N – назальное направления. (По Kim et al., 2008, изменено).

нэргических амакриновых клеток, в страте 1, где ветвятся отростки дофаминэргических и глицинэргических амакриновых клеток (рис. 2).

Витальный метод визуализации позволил провести электрофизиологическое исследование маркированных клеток. По физиологическим критериям – это быстрые off- ДИ ГК с асимметричными рецептивными полями, реагирующие избирательно на стимулы, движущиеся в соматодендритном направлении (рис. 4). Поскольку хрусталик переворачивает изображение внешнего мира на сетчатке, эти клетки в жизни реагируют на движение темных предметов снизу вверх в поле зрения мыши. Несколько клеток с симметричными дендритами (визуализированные тем же способом в той же сетчатке) не обладали дирекциональной избирательностью. *У “новых” ДИ ГК структура дендрита таким образом коррелирует со свойством дирекциональной избирательности, тогда как у “старых” ДИ ГК, как быстрых, так и*

медленных, никакой асимметрии в структуре дендритных ветвлений (как уже неоднократно подчеркивалось) не было обнаружено. Как и ранее описанные и подробно исследованные быстрые on-off ДИ ГК мыши, “новые” off- дирекционалы проецируются в ретинореципиентный слой верхних бугорков четверохолмия – структуру среднего мозга, осуществляющего сенсомоторную интеграцию, где их аксоны образуют клубочки терминалей.

Факт существования в одной сетчатке дирекционально избирательных ганглиозных клеток, сходных физиологически, но различных морфологически, у которых одно и то же свойство детектирования направления движения строится на разных преэлементах, работающих на разных медиаторах, сам по себе примечателен. Он ставит вопрос о том, зачем (или почему) для построения в одной сетчатке сходных по функции элементов, посылающих свои сигналы в один отдел мозга,

понадобились два принципиально разных механизма организации дирекциональной избирательности?

В ближайшее время можно ожидать новые работы на трансгенных животных с визуализацией адгезивных молекул, которые приблизят нас к пониманию формирования клеточных функций и механизмов их реализации в сетчатке.

Работа поддержана РФФИ (грант № 07-04-00516).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зенкин Г.М., Пугарев И.Н.* Детекторные свойства ганглиозных клеток сетчатки щуки // *Биофизика*. 1969. Т. 14. С. 722–730.
- Максимов В.В., Максимова Е.М., Максимов П.В.* Классификация дирекционально-избирательных элементов, регистрируемых в тектуме караса // *Сенсорные системы*. 2005. Т. 19. № 4. С. 342–356.
- Максимова Е.М., Левичкина Е.В., Утина И.А.* Морфология предполагаемых дирекционально-избирательных ганглиозных клеток, трассированных DiI в сетчатке рыб // *Сенсорные системы*. 2006. Т. 20. № 4. С. 279–287.
- Максимова Е.М., Орлов О.Ю., Диментман А.М.* Исследование зрительной системы нескольких видов морских рыб // *Вопросы ихтиологии*. 1971. Т. 11. С. 893–899.
- Amthor F.R., Oyster C.W., Takahashi E.S.* Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina // *Brain Res.* 1984. V. 298. P. 187–190.
- Amthor F.R., Oyster C.W.* Spatial organization of retinal information about the direction of image motion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 4002–4005.
- Ariel M., Daw N.W.* Pharmacological analysis of directionally sensitive rabbit retinal ganglion cells // *J. Physiol.* 1982. V. 324. P. 161–185.
- Barlow H.B., Hill R.M., Levick W.R.* Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit // *J. Physiol.* 1964. V. 173(3). P. 377–407.
- Bisti S., Gargini C., Chalupa L. M.* Blockade of glutamate-mediated activity in the developing retina perturbs the functional segregation of on and off pathways // *J. Neurosci.* 1998. V. 18(13). P. 5019–5025.
- Bodnarenko S.R., Chalupa L.M.* Stratification of ON and OFF ganglion cell dendrites depends on glutamate-mediated afferent activity in the developing retina // *Nature*. 1993. V. 364. P. 144–146.
- Bowling D.B.* Light responses of ganglion cells in the retina of the turtle // *J. Physiol.* 1980. V. 299. P. 173–196.
- Caldwell J.H., Daw N.W., Wyatt H.J.* Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: lateral interactions for cells with more complex receptive fields // *J. Physiol.* 1978. V. 276. P. 277–298.
- Chan Y.C., Chiao C.C.* Effect of visual experience on the maturation of ON-OFF direction selective ganglion cells in the rabbit retina // *Vision Res.* 2008. V. 48. P. 2466–2475.
- Cleland B.G., Levick W.R.* Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat's retina and an overall classification // *J. Physiol.* 1974 V. 240(2). P. 457–492.
- Coombs J.L., List D., Van der, Chapula L.M.* Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 503. P. 803–814.
- Cronly-Dillon J.R.* Units sensitive to direction of movement in goldfish tectum // *Nature*. 1964. V. 203. P. 214–215.
- Demas J., Eglen S.J., Wong R.O.L.* Developmental loss of synchronous spontaneous activity in the mouse retina is independent of visual experience // *J. Neurosci.* 2003. V. 23(7). P. 2851.
- Dong W., Sun W., Zhang Y., Chen X., He S.* Dendritic relationship between starburst amacrine cells and direction-selective ganglion cells in the rabbit retina // *J. Physiol.* 2004. V. 556. P. 11–17.
- Elstrott J., Anishchenko A., Greschner M., Sher A., Litke A. M., Chichilnisky E.J., Feller M.B.* Direction selectivity in the retina is established independent of visual experience and cholinergic retinal waves // *Neuron*. 2008. V. 58(4). P. 499–506.
- Famiglietti E.V. Jr., Kolb H.* Structural basis for ON- and OFF-center responses in retinal ganglion cells // *Science*. 1976. V. 194. P. 193–195.
- Famiglietti E.V.* New metrics for analysis of dendritic branching patterns demonstrating similarities and differences in ON and ON-OFF directionally selective retinal ganglion cells // *J. Comp. Neurol.* 1992. V. 324. P. 295–321.
- Firth S.I., Wang C.-T., Feller M.B.* Retinal waves: mechanisms and function in visual system development // *Cell Calcium*. 2005. V 37. P. 425–432.
- Fuerst P.G., Koizumi A., Masland R.H., Burgess R. W.* Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM // *Nature*. 2008. V. 451. P. 470–474.
- Fried S.I., Münth T.A., Verblin F.S.* Mechanisms and circuitry underlying directional electivity in the retina // *Nature*. 2002. V. 420. P. 411–414.
- Gavrikov K.E., Nilson J.E., Dmitriev A.V., Zucker C.L., Mangel S.C.* Dendritic compartmentalization of chloride cotransporters underlies directional responses of starburst amacrine cells in retina // *PNAS*. 2006. V. 103. P. 18793–18798.
- Gao F.-B.* Molecular and cellular mechanisms of dendritic morphogenesis // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. V. 17(5). P. 525–532.

- Guido W.* Refinement of the retinogeniculate pathway // *J. Physiol.* 2008. V. 586. P. 4357–4362.
- He Sh., Zhe Fei Jin, Richard H. Masland.* The nondiscriminating zone of directionally selective retinal ganglion cells: comparison with dendritic structure and implications for mechanism // *J. Neurosci.* 1999. V. 19(18). P. 8049–8056.
- Huberman A.D., Feller M.B., Chapman B.* Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields // *Neuron.* 2008. V. 59. P. 425–438.
- Jacobson M., Gaze R.M.* Types of visual response from single units in the optic tectum and optic nerve of the goldfish // *Q. J. Exp. Physiol.* 1964. V. 49. P. 199–209.
- Jan Y.-N., Jan L.Y.* Dendrites // *Genes Dev.* 2001. V. 15. P. 2627–2641.
- Jeff S., Mumm J.S., Williams Ph.R., Godinho L., Koerber A., Pittman A.J., Roeser T., Chi-Bin Chien, Baier H., Wong R.O.L.* In vivo imaging reveals dendritic targeting of laminated afferents by zebrafish retinal ganglion cells // *Neuron.* 2006. V. 52(4). P. 609–621.
- Kim In-Jung, Zhang Y., Yamagata M., Meister M., Sanes J.R.* Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion // *Nature.* 2008. V. 452. P. 478–482.
- Kittila C.A., Massey S.C.* Pharmacology of directionally selective ganglion cells in the rabbit retina // *J. Neurophysiol.* 1997. V. 77. P. 675–689.
- Kong J.H., Fish D.R., Rockhill R.L., Masland R.H.* Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits // *J. Comp. Neurol.* 2005. V. 489(3). P. 293–310.
- Koch C., Poggio T., Torre V.* Dendritic computation of direction selectivity by retinal ganglion cells // *Phil. Trans. R. Soc.* 1982. V. 298. P. 227–264.
- Liets L.C., Olshausen B.A., Wang G.-Y., Chalupa L.M.* Spontaneous activity of morphologically identified ganglion cells in the developing ferret retina // *J. Neurosci.* 2003. V. 23(19). P. 7343–7350.
- Marc R.E., Jones B.W.* Molecular phenotyping of retinal ganglion cells // *J. Neurosci.* 2002. V. 22(2). P. 413–427.
- Maturana H.R., Frenk S.* Directional movement and horizontal edge detectors in the pigeon retina // *Science.* 1963. V. 142. P. 977–979.
- Masland R.H.* The fundamental plan of the retina // *Nature.* 2001. V. 4. P. 877–886.
- Masland R.H., Martin P.R.* The unsolved mystery of vision // *Current Biology.* 2001. V. 17. P. R577–R582.
- Maximov V., Maximova E., Maximov P.* Direction selectivity in the goldfish tectum revisited. // *Annals of the New York Acad. Sci.* 2005. V. 1048. P. 198–205.
- Nevin L.M., Taylor M.R., Baier H.* Hardwiring of fine synaptic layers in the zebrafish visual pathway // *Neural Development.* 2008. V. 3. P. 36.
- Ott M., Walz B.C., Paulsen U.J., Mack A.F., Wagner H.-J.* Retinotectal ganglion cells in the zebrafish, *Danio rerio* // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 501. P. 647–658.
- Oyster C.W., Barlow H.B.* Direction-selective units in rabbit retina: distribution of preferred directions // *Science.* 1967. V. 155. P. 841–842.
- Rockhill R.L., Daly F.J., MacNeil M.A., Brown S.P., Masland R.H.* The diversity of ganglion cells in a mammalian retina // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 3831–3843.
- Rockhill R.L., Euler T., Masland R.H.* Spatial order within but not between types of retinal neurons // *PNAS.* 2000. V. 97. N. 5. P. 2307.
- Sakisaka T., Takai Y.* Cell adhesion molecules in the CNS // *J. Cell Science.* 2005. V. 118. P. 5407–5410.
- Stasheff S.F., Masland R.H.* Functional inhibition in direction-selective retinal ganglion cells: spatiotemporal extent and intralaminar interactions // *J. Neurophysiol.* 2002. V. 88. P. 1026–1039.
- Sun W., Deng Q., Levick W.R., He Sh.* ON direction-selective ganglion cells in the mouse retina // *J. Physiol.* 2006. V. 576. P. 197–202.
- Shi S.-H., Cox D.N., Wang D., Jan L.J., Jan Y.-N.* Control of dendrite arborization by an Ig family member, dendrite arborization and synapse maturation 1 (Dasm1) // *PNAS.* 2004. V. 101. № 36. P. 13345.
- Taylor W.R., He Sh., Levick W.R., Vaney D.I.* Dendritic computation of direction selectivity by retinal ganglion cells // *Science.* 2000. V. 289. P. 2347.
- Taylor W.R., Vaney D.I.* Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina // *J. Neurosci.* 2002. V. 22(17). P. 7712–7720.
- Vaney D.I.* Territorial organization of direction-selective ganglion cells in rabbit retina // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 6301–6316.
- Wässle H., Peichl L., Boycott B.B.* Dendritic territories of cat retinal ganglion cells // *Nature.* 1981. V. 292. P. 344–345.
- Weng Sh., Sun W.I., He Sh.* Identification of ON–OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina // *J. Physiol.* 2005. V. 562. P. 915–923.
- Wiesel T.N., Hubel D.H.* Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cats lateral geniculate body // *J. Neurophysiol.* 1963. V. 26. P. 978–993.
- Wong R.O.L.* Retinal waves and visual system development // *Ann. Rev. Neurosci.* 1999. V. 22. P. 29–47.
- Wong W.T., Sanes J.R., Wong R.O.L.* Developmentally regulated spontaneous activity in the embryonic chick retina // *J. Neurosci.* 1998. V. 18(21). P. 8839–8852.
- Xu H., Tian N.* Pathway-specific maturation, visual deprivation, and development of retinal pathway // *Neuroscientist.* 2004. V. 10(4). P. 337–346.

- Yamagata M., Sanes J.R.* Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina // *Nature*. 2008. V. 451. P. 465–469.
- Yamagata M., Weiner J.A., Dulac C., Roth K.A., Sanes J.R.* Labeled lines in the retinotectal system: Markers for retinorecipient sublaminae and the retinal ganglion cell subsets that innervate them // *Mol. Cell. Neurosci.* 2006. V. 33. P. 296–310.
- Yang G., Masland R.H.* Receptive fields and dendritic structure of directionally selective retinal ganglion cells // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 5267–5280.
- Yonehara K., Shintani T., Suzuki R., Sakuta H., Takeuchi Y.* Expression of SPIG1 reveals development of a retinal ganglion cell subtype projecting to the medial terminal nucleus in the mouse // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. P. 1533.
- Yonehara K., Ishikane H., Sakuta H., Shintani T., Nakamura-Yonehara K., Kamiya N.L., Usui Sh., Noda M.* Identification of Retinal Ganglion Cells and Their Projections Involved in Central Transmission of Information about Upward and Downward Image Motion // *PLoS ONE*. 2009. V. 4(1). P. 4320.
- Yoshida K., Watanabe D., Ishikane H., Tachibana M., Pastan I., Nakanishi S.* A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement // *Neuron*. 2001. V. 30. P. 771–780.
- Zhou Z.J.* The function of the cholinergic system in the developing mammalian retina // *Prog. Brain Res.* 2001. V. 131. P. 599–613.

Molecular-genetic identification of retinal neurons

E.M. Maximova

*Institute for Information Transmission Problems (The Kharkevich Institute), RAS
127994 Moscow, Bolshoi Karetny, 19*

There are 10–15 types of ganglion cells in the vertebrate retina that process in parallel visual image and send their signals to different primary visual centres. Dendrites of each ganglion cell type tile all retinal surface on different levels of inner synaptic layer where they receive inputs from different interneurons. Their specific synaptic connections determine the processing. Retinal cells recognize and contact each other, defining “spaces of operating” by use of adhesive membrane molecules of immunoglobuline superfamily in the process of morphogenesis. Specific molecular markers and genetic methods permit to evaluate the correspondence between morphological and physiological cells properties in development. A new unknown type of off-direction selective ganglion cells expressing Jam-B had been visualized in mice retina. Slow on-direction selective ganglion cells projecting into MTN of AOS expressing SPIG1 prefer upward direction of motion.

Key words: retina, ganglion cells, dendrites, direction selectivity, adhesive molecules: Dscam, Dscam-L, Sidekick-1, SideKick-2, Dasm, Jam-B, SPIG1.