

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Szabályozásbiológiai Program

A dúcsejtek által meghatározott párhuzamos retinális pályákon haladó információ funkcionális heterogenitásának vizsgálata

PhD értekezés

Tengölics Ádám Jonatán



PÉCS, 2020

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Szabályozásbiológiai Program

A dúcsejtek által meghatározott párhuzamos retinális pályákon haladó információ funkcionális heterogenitásának vizsgálata

PhD értekezés

Tengölics Ádám Jonatán

Témavezető:

Dr. Völgyi Béla
habil. egyetemi docens

.....
Dr. Völgyi Béla,
habil. egyetemi docens,
Témavezető

.....
Dr. Gábrriel Róbert,
habil. egyetemi tanár,
PTE-BDI,
Iskolavezető

PÉCS, 2020

Tartalomjegyzék

1. Bevezető.....	1
2. Rövidítések.....	2
3. Irodalmi áttekintés.....	5
3.1. Az emlős retina.....	5
3.2. A retina rétegei, sejtípusai.....	5
3.3. A dúcsejtípusok sokfélesége az egér retinában.....	13
3.4. Párhuzamos információs csatornák.....	15
3.5. Ca ²⁺ -képzővizsgálatok.....	17
3.6. Ca ²⁺ -kötő fehérjék a retinában.....	21
3.7. Neuromorf retinális modellek.....	23
4. Célkitűzések.....	26
5. Anyagok és módszerek.....	27
5.1. Állatok és preparálás.....	27
5.2. Ca ²⁺ -képzővizsgálatok.....	28
5.3. Elektrofiziológiai vizsgálatok (extracelluláris elvezetések, MEA, Patch Clamp).....	30
5.4. Farmakológia.....	31
5.5. Immunhisztokémia, Neurobiotin injekció és konfokális mikroszkópia.....	32
5.6. Fehérjeexpresszió mérése és sejtek csoportosítása.....	35
5.7. Neuromorf retina modell.....	35
6. Eredmények.....	38
6.1. Ca ²⁺ -képzővizsgálatok (indikátorok vs. GMO törzsek használata).....	38
6.2. Az RGC-k heterogenitása fényválasz késéseik alapján.....	42
6.2.1. A dúcsejt fényválaszok időkéseinek sokfélesége.....	42
6.2.2. Az időkések variabilitásának alapja a vizsgált sejtek sokfélesége.....	44
6.2.3. Az időkések sejtípus specifikitása.....	45
6.2.4. A válaszkésések stimulus függősége.....	47
6.2.5. A preszinaptikus retinális hálózatok szerepe az RGC válaszkésések kialakításában.....	51
6.2.6. Retinális pályaelemek hatása a RGC-k fényválasz késéseire.....	56
6.3. A retinális dúcsejtek heterogenitása az expresszált CaBP-k alapján.....	58
6.4. A dúcsejtek kódolási mechanizmusát befolyásoló retinális kapcsolatok feltérképezése.....	63
7. Az eredmények megbeszélése.....	68
7.1. Metodológiai megfontolások.....	68
7.2. Az RGC válaszkésések heterogenitása.....	71
7.2.1. A válaszkésések tartománya és sejtípus specifikitása.....	71
7.2.2. A retinális hálózat meghatározó szerepe a válaszkésések kialakításában.....	72
7.2.3. A stimulus paraméterek hatása a válaszkésésekre.....	73
7.3. A párhuzamos információs csatornák csomópontjaiként funkcionáló RGC-k azonosítása.....	76

7.4. Az interneuronális kapcsolatok szerepe a retinális kód kialakításában	77
8. Összefoglalás.....	78
9. Summary	79
10. Felhasznált irodalom	80
11. Köszönetnyilvánítás	91
12. Saját publikációk.....	92
12.1. MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat	92
12.2. Disszertáció alapjául szolgáló publikációk.....	94
12.3. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia közlemények.....	94
12.3. Egyéb tudományos közlemények.....	95
12.4. Egyéb konferencia közlemények.....	95

1. Bevezető

„*A szem a lélek tükré*”, mondták a korai filozófusok. *Cliché* mivolta ellenére sikeresen rátapintottak még bőven a témában dolgozó kutatók előtt arra a ma már ismert tényre, hogy a retinánk a központi idegrendszerünk „kiterjesztése”, nyúlványa. Így, ha a retinát vizsgáljuk, nem pusztán a látás mibenlétéről, az azt meghatározó esszenciális mechanizmusokról szerzünk információt, de közvetten, vagy közvetlenül magáról az agyi információ feldolgozásáról is, ugyanis a retinális és agyi folyamatok neuronjaik fiziológiájában és kinetikáiban is meglehetősen hasonlóak. Nem mehetünk el amellett a tény mellett sem, hogy minden emlős (és a gerincesek túlnyomó többsége), így az ember számára is a környezet információinak megközelítőleg 90%-át a vizuális információk teszik ki. Ezért a látás számunkra az egyik (hanem a) legfontosabb érzékszervünk. Folyamatainak mélyreható vizsgálatával és megértésével, komplexebb képet kapunk nem csak arról, hogy hogyan dolgozzuk fel a vizuális információt, de arról is, hogy ezen információ tudatosulása, csoportosítása, rendszerezése és központi pályákon történő újra eloszlása, illetve memóriában történő rögzülése révén hogyan érzékeljük, tanuljuk a minket körülvevő világot és hogyan alkalmazkodunk hozzá. Ezen információk pedig hozzájárulhatnak az alaptudásunk gazdagításán túl más olyan modern tudományterület (informatika, robotika) fejlődéséhez, ahol a kognitív, autonóm rendszerek kiépítése és tökéletesítése a cél. A kutatások ezen új hullámára a legjobb példa, hogy a neuromorf modellek területén az első idegrendszert imitáló modellek a retinát vették alapul (Rosenblatt, 1958; Fukushima et al., 1970) és a mai napig a retina az a modell, ami a legtöbb mai sikeres neuromorf rendszer alapját képezi. Ezek alapján látszik, hogy a retinán végzett, annak fiziológiás, neurokémiai és jelfeldolgozási folyamatait célzó vizsgálatok a modern neurobiológia élvonalába tartoznak és eredményei számos más területen is nagy sikerrel hasznosíthatók. Ezért mindig aktuális és véleményem szerint soha el nem évülő téma a retina kutatás bármely aspektusa, így ezen dolgozat témája is, melyben a retinális dúcsejtek heterogenitását és a párhuzamos információs csatornákon történő jelátvitel kapcsolatát taglalom az egér retinában, és ehhez vizsgálatainkban a modern neurobiológia szinte teljes eszköztárát bevetettük, az immunhisztokémiától, az elektrofiziológia és Ca^{2+} -képződésén át, egészen olyan friss és aktuális kísérleti módszerekig, mint a számítógépes modellek alkalmazása.

2. Rövidítések

AAV adeno-asszociált vírus

AC *Amacrine cell*/amakrin sejt

AII AII-es amakrin sejt

AM *acetoxymethyl ester/észter*

AMPA α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepronic

AMPA-R α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepronic receptor

AP akciós potenciál

ATP adenzin-trifoszfát

BAPTA 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid/-sav

BC *Bipolar cell*/bipoláris sejt

c centrális

Ca²⁺ kalcium ion

CaB Calbindin

CaBP *Calcium binding protein*/kalciumkötő fehérje

CaR Calretinin

CCD *Charge-coupled Device*/töltés-csatolt eszköz

CGL *corpus geniculatum laterale*

cGMP ciklikus guanozin monofoszfát

D dorzális

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO dimetil-szulfoxid

ECS *extracell solution*/extracelluláris oldat

EGTA ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid/-sav

EPSP excitatórikus posztszinaptikus potenciál

ER endoplazmatikus retikulum

FRET *Förster resonance energy transfer/ Fluorescent resonance energy transfer*

GABA *gamma-aminobutyric acid*/ gamma-aminovajsav

GCL *Ganglion cell layer*/dúcsejtek rétege

GECI *genetically encoded calcium indicator*/genetikailag kódolt Ca²⁺ indikátor

GFP *green fluorescent protein*

GJ *gap junction*/réskapcsolat/elektromos szinapszis
GMO genetikailag módosított organizmus
GTP guanozin-trifoszfát
HC *Horizontal cell*/horizontális sejt
HEPES *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*/-sav
ICS *Intracell solution*/Intracelluláris oldat
iGluR ionotrop glutamát receptor
IHC *immunohistochemistry*/immunhisztokémia
INL *Inner nuclear layer*/belső sejtes/magvas réteg
IP₃ inozitol trifoszfát
IP₃R inozitol trifoszfát receptor
IPL *Inner plexiform layer*/belső rostos réteg
IPSP inhibitoros posztszinaptikus potenciál
ISI *interspike intervall*
ISO A kamera fényérzékenysége
LA *large*/nagy amakrin sejt
MEA *multielectrode array*
MFA *meclofenamic acid*/meklofenaminsav
mGluR metabotrop glutamát receptor
N nazális
NA numerikus apertúra
nAChR nikotinos acetilkolin receptor
NCX nátrium-kalcium pumpa/*exchanger*
NeuN *neuronal nuclei antibody*
NFL *Nerve fiber layer*/idegrost réteg
NMDA N-metil-D-aszpartát
NMDA-R N-metil-D-aszpartát receptor
OGB-1 Oregon Green BAPTA-1
OLM *Outer limiting membrane*/külső határoló membrán
ONL *Outer nuclear layer*/külső magvas/sejtes réteg
OPL *Outer plexiform layer*/külső rostos réteg

p perifériás

PA poliaxonális amakrin sejt

PBS *Phosphate-Buffered Saline*/foszfát puffer sóoldat

PE *Pigment epithelium*

PFA paraformaldehid

PL *Photoreceptor Layer*/fotoreceptorok rétege

PMCA plazma membrán Ca^{2+} ATPáz

PMT *PhotoMultiplier*

PR *Photoreceptor*/fotoreceptor

PSTH peristimulus hisztogram

PTX *pikrotoxin*

PV Parvalbumin

PV-tdT parvalbumin-tdTomato

RBPMS *RNA-binding protein with multiple splicing*

RGC *Retinal Ganglion Cell*/retinális dúcsejt

ROI *region of interest*/vizsgálati terület

RyR rianodin receptor

SA *small*/kis amakrin sejt

sCMOS *scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor*

SD *standard deviation*/ szórás

SERCA szarko-/endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATPáz

SR szarkoplazmatikus retikulum

T temporális

Thy1 THY miocita differenciációs antigén 1

TRPC tranziens receptor potenciál függő csatorna C

TTL Tranzisztor-tranzisztor logika/négyszögimpulzus

V ventrális

VGCC *voltage-gated calcium channels*/feszültség-függő Ca^{2+} - csatorna

VLSI *very large scale integration*/nagyon nagy léptékű integráció

YFP *yellow fluorescent protein*

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az emlős retina

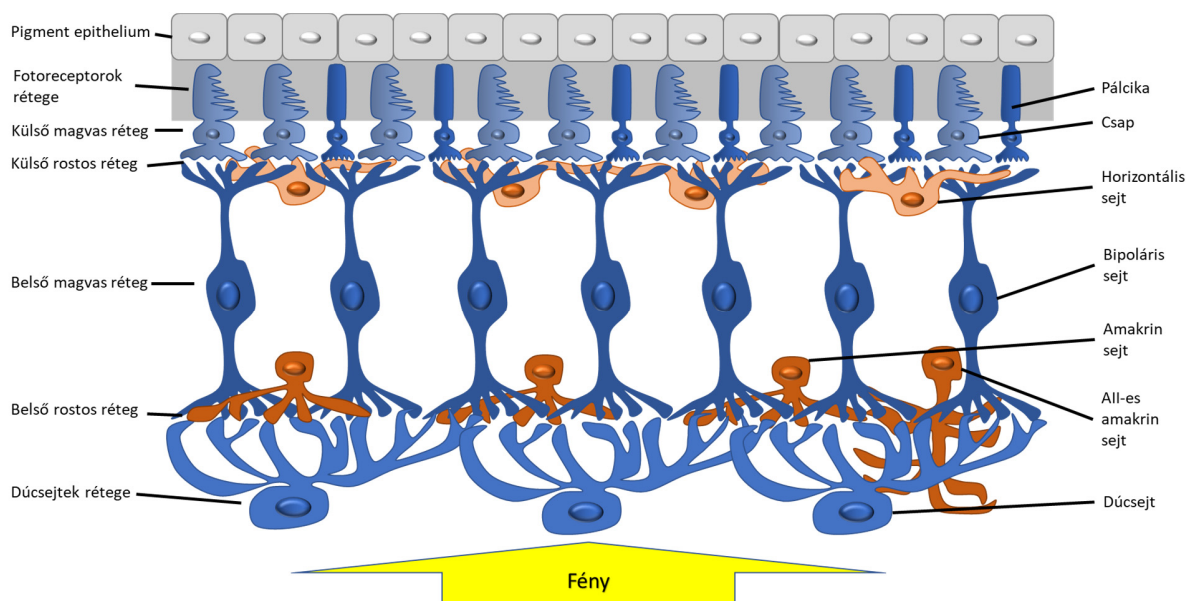
A külvilágból származó információ túlnyomó többségét a látásunk segítségével tapasztaljuk meg. Ezt a feladatot tölti be a gerincesek fényérzékeny idegszövege: a retina. A retina a szemben elhelyezkedő, annak belső falát bélelő többretegű idegszövet. A szem fénytörő és továbbító közegei (szemlencse, üvegtest) egy kétdimenziós képet alkotnak és fókuszálnak a külvilágról a retinára, mely a vizuális információt akciós potenciálok sorozatává kódolja, és az optikus idegen (*nervus opticus*) keresztül továbbítja az agyba, ahol kialakul a tényleges képi érzékelés.

A retina közepén található az optikus ideg ki- és belépési helye. Ezt más néven vakfoltnak is nevezzük, utalva arra, hogy ezen a ponton nem található fotoreceptorok. Ettől a ponttól ágaznak szét a főbb vérerek. Ezen kívül még található számos fajspecifikus kiemelt terület is. Ilyen például az emberszabású majmok *fovea-ja* (éleslátás helye), ahol a csapok maximális, a pálcikák minimális számban vannak jelen. A *fovea* területén a csapok a fényérzékelés szempontjából leghatékonyabb elrendezésben, hexagonális mozaikban helyezkednek el. Továbbá igaz az éleslátás helyére az is, hogy egyedül itt valósul meg az 1:1 kapcsolat a fotoreceptorok (*photoreceptor* - PR), a bipoláris sejtek (*Bipolar Cell* - BC) és a dúcsejtek (*Retinal Ganglion Cell* - RGC) között (Polyak, 1942). A többi faj (nem emberszabású majom) esetén a *fovea* hiányzik, de más fajspecifikus régió található, ilyen például a nyúlfélék látócsíkja, vagy a ragadozók (kutya- és macskafélék pl.) *area centralis*-a. A macskafélék retinája mögött egy fényvisszaverő réteg, a *Tapetum lucidum* is megfigyelhető. Ez a diverzitás azonban csak a részletesebb morfológiai, fiziológiai és biokémiai vizsgálatok során válik nyilvánvalóvá, ugyanis a legalapvetőbb alaktani és működési elvek az évmilliók óta tartó evolúciós folyamatok során sem változtak számottevően (Wässle és Boycott, 1991).

3.2. A retina rétegei, sejtípusai

A retina egy igen komplex és kompakt idegrendszeri terület. Összehasonlítva az agykéreggel, ugyanúgy rétegekből épül fel, viszont ezek a rétegek egyszerűbb felépítésűek és jobban elkülöníthetők egymástól. Ez az oka annak, hogy az idegrendszeri kutatások közkedvelt vizsgálati objektumává vált és a mai napig igen nagy jelentőséggel bíró neurobiológiai modell mind az alap-, mind az alkalmazott kutatások terén. Számos hasonlóság mutatkozik az agy, a

gerincvelő és a retina között tekintettel az anatómiájára, a funkcionalitására, sérülésekre adott válaszaira és immunológiai folyamatokra vonatkozóan. Számos agyi, neurodegeneratív rendellenesség szintén manifesztálódik a retinában is (London et al., 2013). Az emlős retina több, határoló membránokkal elválasztott rétegből épül fel, melyek a fény útja szerint fordított, viszont az információ áramlásával megegyező sorrendben figyelhetők meg, ezek a következők: *pigment epithelium* (**PE**), fotoreceptorok rétege (*photoreceptor layer*: **PL**), külső határoló membrán (*outer limiting membrane*: **OLM**), külső sejtes réteg (*outer nuclear layer*: **ONL**), külső rostos réteg (*outer plexiform layer*: **OPL**), belső sejtes réteg (*inner nuclear layer*: **INL**), belső rostos réteg (*inner plexiform layer*: **IPL**), dúcsejtek rétege (*ganglion cell layer*: **GCL**), az idegrostréteg (*nerve fiber layer*: **NFL**) és a belső határoló membrán (*inner limiting membrane*: **ILM**). A NFL-ben a retinális dúcsejtek (*retinal ganglion cell*: RGC) axonjai futnak, hogy *nervus opticus*-ban összegyűjtve, végül kilépjenek a szemből és továbbítsák az információt az agy felé (Kolb et al., 1995). Ezekben a rétegekben foglalnak tehát helyet a retina 5 alapvető sejtosztályának képviselői, melyek a retina információs útvonalainak az alkotóelemeit is képezik. A retina legfőbb információs útvonalának a sematikus működése szerint: a fotoreceptorok (*photoreceptors*: PR) a fény fotonjai által hordozott információt érzékelik, majd ezt továbbítják az átjátszó/átkapcsoló szerepet betöltő serkentő interneuronoknak, a bipoláris sejteknek (*bipolar cell*: BC). Ez utóbbiak aztán az információt az RGC-knek továbbítják, melyek bemeneteiket integrálva akciós potenciál (AP) sorozat kódot generálnak és azt a látóidegen keresztül továbbítják az agy felé. A horizontális sejtek (*horizontal cell*: HC) és amakrin sejtek (*amacrine cell*: AC) gátló interneuronok, melyek a párhuzamos információs csatornák összehangolásával járulnak hozzá a képi információ finomhangolásához. Ilyen finomhangolás például a fotoreceptorok széli gátlása, mely a horizontális sejtek közreműködésével valósul meg (Hartline, 1957).



1. ábra: A retina sematikus ábrája a különböző rétegek és sejttípusok jelölésével.

A retina legkülső rétege a **pigment epithelium**. A PE sejtek lapos epitheliális sejtek, méhkas-szerűen, hatszöges eloszlásban rendeződnek el (maguk a sejtek is hexagonális alakúak) egymáshoz képest. A sejteket egymással szoros kapcsolatok (*tight junction*) kötik össze és sötét pigmentet (melanoszómákban található melanin) tartalmaznak. A retina irányában a PE sejtek nyúlványokat növesztenek, melyek a fotoreceptorok külső szegmensét veszik körül. Ez az egyrétegű szövet a pigment granulumokon kívül fagoszómákat is tartalmaz, melyek a fotoreceptorokról folyamatosan leváló disztális fotoreceptor külső szegmens darabkák eltakarításában játszanak szerepet. Fő feladatuk a fotoreceptorok táplálása és védelme (pl. fény okozta oxidatív stressz ellen) és a pigment segítségével a fény belső reflexiójának megakadályozása. Innen származik a fotoreceptorok fototranszdukciójához nélkülözhetetlen retinal, a PE ennek a metabolizmusában, raktározásában és újra-hasznosításában is szerepet játszik (Mendelsohn et al., 1991; McCaffery et al., 1992).

A PE-ot a **fotoreceptorok rétege** követi, ahol a PR-ok külső szegmensei találhatóak. Általánosan 2 vagy 3 típusú csap (különböző színtartományokra érzékeny) és egy féle pálcika fotoreceptor jellemzi az emlős retinát (Kolb et al., 1995). A fotoreceptorok sejtteste az ONL-ben, az OLM alatt sorakoznak, belső szegmensük és axon nyúlványuk az OPL területén található. A fényérzékeny külső szegmensek tehát a legdisztálisabb helyzetben találhatóak, ezek a PE felé

néznek és azok ujjszerű nyúlványai közé nyúlnak be (különösen fényadaptációt követően – a PE nyúlványok ugyanis adaptáció függő megnyúlás-rövidülés dinamikát követnek). A nagyobb, terebélyesebb kúpos struktúrájú csapok közé a vékonyabb csőszerű pálcikák ékelődnek. Minden fotoreceptor sejt tartalmaz egy opsin fehérjéből és egy A-vitamin eredetű kromofórból, a retinálból álló komplexet. Ez a komplex alkotja a vizuális pigmentet, melyek a fotoreceptorokban egy kettős lipid membránba beágyazódva helyezkednek el (a membrán a csapok esetében a plazmamembrán betűródése, a pálcikákban intracelluláris membránkorong). A retinal alapvetően 11-cis retinal izomer formájában van jelen, mely a rhodopsin molekulában az opsin nevű 7 transzmembrán domént tartalmazó fehérjéhez kapcsolódik. Az egész szerkezet az előbb említett lipid kettős membránba ágyazott, mely a betűródések és a korongszerű szerkezet miatt hatalmas felületet biztosít a fényérzékeny molekuláknak (Hargrave et al., 1983; 1984). A **fototranszdukción** során a foton hatására a 11-cis retinal konformációt vált és teljes transz retinallá változik (izomerizálódik). Ennek hatására további konformáció változások indulnak meg a molekulában, mely során felszabaduló energia aktivál egy G-proteint (transzducin), amely egy cGMP (ciklikus guanozin monofoszfát) foszfodiészterázt aktivál. Az enzim az aktiváció hatására az intracelluláris cGMP molekulák intenzív hidrolizációjába kezd, aminek hatására azok koncentrációja a sejten belül töredékére csökken. A lecsökkent intracelluláris cGMP szint hatására a plazmamembránon található cGMP függő kationcsatornák sorra bezárulnak, a sejt hiperpolarizálódik (ezzel párhuzamosan megszűnik az ún. „sötétáram” mely a -40mV-os depolarizált sötétadaptált sejtben figyelhető meg; összefoglalva: Stryer, 1991 és Yau, 1994). A PR a sötétáram folyamán folyamatosan glutamát neurotranszmittert szekretál a szinaptikus végződéseken, így fény hatására a glutamát leadás is csökken (esetleg megszűnik). A glutamát koncentrációjának változása a szinaptikus résben lesz a jel a fotoreceptorokkal szinaptizáló bipoláris és horizontális sejteknek. A **külső rostos rétegben** szinaptizálnak a PR-okkal a bipoláris sejtek és a horizontális sejtek. Ez utóbbiak sejtesteit viszont már a INL-ben találhatók. Itt megtörténik az fényerő növekedésének információját továbbító ON és a fényerő csökkenésének információját továbbító OFF retinális útvonalak elkülönítése, vagyis az ON és OFF információs csatornák különválása. Ugyancsak itt történik a *feedback* és *feedforward* gátlást biztosító horizontális sejtek segítségével a retina központ-környék organizációjának kialakulása (ez utóbbi folyamat a kontrasztérzékelés alappillére). Ezen kívül a csapok és a pálcikák ugyancsak külön rájuk jellemző csap-, illetve pálcika bipoláris sejtekkel szinaptizálnak, tehát az

első retinális szinaptikus rétegben megtörténik a csap- és pálcika eredetű információ szegregációja, ezzel külön csap és pálcika információs pályák létrehozása. Ugyanakkor az is ismeretes, hogy csap-csap, csap-pálcika és pálcika-pálcika elektromos szinapszisok is létesülnek így a két különálló információs csatorna nincs teljesen elszeparálva egymástól (Kolb, 1977). A legtöbb emlős retina pálcika domináns így a bipoláris sejtek túlnyomó többsége is pálcika bipoláris sejt. A pálcika bipoláris sejtek sejtteste az INL közepén és disztális részén több sorban található, dendritjeik felnyúlnak az OPL-be a csapok nyúlványai között, hogy elérjék a pálcikák végződéseit (*spherulus*). Ezzel szemben a csap bipoláris sejtek többnyire kiterjedt, néha diffúz rosthálózattal rendelkeznek az OPL-ben, mellyel több csap nyúlványával létesítenek kapcsolatot. A PR-okból felszabaduló glutamát a BC dendriteken található glutamát receptorokhoz köt és azokon olyan folyamatokat indít el, melyek végül a BC-ek membránpotenciáljának megváltozásához vezet. A BC-ek dendritjein található glutamát receptoroknak alapvetően 2 nagy csoportja figyelhető meg, ez a bipoláris sejtek további felosztásának alapja is. Az egyik BC csoport metabotrop glutamát receptorokkal (mGluR) rendelkezik, amely a glutamát jelenlétében (sötétben) hiperpolarizáltan tartja a membránt. Ez a hiperpolarizált állapot ezeknél a sejteknél fény hatására (a csökkenő szinaptikus glutamát koncentráció miatt) megszűnik, a sejt depolarizál. Mivel fény bekapcsolásának (fényerő növekedés) hatására ezek a sejtek depolarizálnak, ezeket ON bipoláris sejteknek nevezzük. ON BC-ek közé tartozik az összes pálcika BC és a csap BC-ek fele. A csap BC-ek másik fele (pálcika BC nem) ionotrop glutamát receptorokat tartalmaz (iGluR). Ezek a fény hatására csökkenő glutamát koncentráció miatt hiperpolarizálnak és a fényerő csökkenésekor növekvő szinaptikus glutamát koncentráció következtében depolarizálnak. Ez utóbbi BC-ek tehát a fényerő csökkenéséről szállítanak információt, így ezeket OFF bipoláris sejteknek nevezzük. Ezek az OFF információs csatornák első sejtjei (Werblin és Dowling, 1969; Kaneko, 1970; 1971; Murakami et al., 1975; Slaughter és Miller, 1983; Tessier-Lavigne et al., 1988). Az OPL-ben ezen túl, még jelen van egy harmadik sejt kapcsolat is, melyben a HC-ek kiterjedt dendrithálózatukkal a PR és a BC-ek dendritjeivel szinaptizálnak, azok felé GABA (*gamma-aminobutyric acid*/ gamma-aminovajsav) mediálta *feedback* és *feedforward* gátlást szolgáltatnak. A HC-nek legtöbb emlősben 2 alaptípusa van (bár a rágcsálókban, így az egérben is csak a B típus): a nagy kiterjedt dendritekkel rendelkező, nagy receptív mezéjű A- típus és a kisebb, de sűrűbb dendrithálózattal rendelkező B-típus (Kolb, 1974). Glutamát hiányában (a fényintenzitás csökkenésekor) ezek a sejtek is

hiperpolarizálódnak, kiterjedt receptív mezejükről összegzik a bemeneti információikat, majd annak mértékében széli gátlást szolgáltatnak a PR-k és BC-ek számára. A széli gátlás¹ alapja a HC-ek be- és kimeneteinek térbeli eltoltsága (*offset*), a széli gátlás pedig a retina központ-környék organizációjának, ezáltal a kontrasztok érzékelésének alapja (Hartline, 1957; Werblin és Dowling, 1969).

A **belső magvas rétegben** található az előbb említett BC-ek és HC-ek sejttestei, valamint a belső retina inhibitoros interneuronjai, az amakrin sejtek sejttestei is. Ez utóbbiaknak 50-60 morfológiailag elkülöníthető típusa van, melyeket dendritfaik mérete alapján alapvetően három kategória valamelyikébe sorolnak, melyek a következők: szűk dendritikus mezejű, ún. *narrow-field*, közepes dendritikus mezejű *medium-field* és a széles dendritikus mezejű *wide-field* amakrin sejtek. A keskeny dendritmezejűek legismertebb képviselői a AII sejtek. Az irányszelektivitás érzékelésében alapvető szerepet játszó ún. *starburst* amakrin sejtek közepes dendritmezejűek, míg például a pálcika bipoláris sejtre *feedback* inhibíciót szolgáltató A17 sejt egy széles dendritmezejű amakrin sejt. A dendritfa méretén kívül szokás figyelembe venni annak IPL-beli elágazás típusát is, egyes sejtek dendritjei diffúzan, mások rétegspecifikusan ágaznak el. Ez utóbbiak között lehetnek két alrétegében is elágazó (*bistratified*) amakrin sejtek, mint például az AII-es amakrin sejtek, melyek kapcsolatrendszerét és funkcióját a későbbiekben bővebben részletezem. Végül, ugyancsak az INL-ben figyelhetők meg a Müller féle glia sejtek sejttestei is.

A **belső rostos rétegben** a BC-ek axonjai találkoznak és szinapszisokat képeznek a különböző morfológiai és funkcionális csoportba osztható AC-kel és az RGC-k dendritjeivel. Ez a hálózat alkotja azt a neuropilt, mely (az OPL-ben megfigyelhető kapcsolatokkal együtt) bonyolult kapcsoltsági rendszerével felel a retina elsődleges információfeldolgozási és -rendszerezési mechanizmusaiért. Az AC-k serkentő bemeneteiket a BC axonterminálisoktól kapják és inhibitoros *feedback* és *feedforward* gátlást szolgáltatnak a belső retina sejtjei (RGC-k, BC-k és egyéb AC-k) felé. Az AC-ek mintegy fele GABA-t, másik fele glicint termel inhibitoros transzmitterként. Az RGC-k szerteágazó dendritjeikkel létesítenek kapcsolatot a BC

¹ 1967-ben Haldan Keffer Hartline Nobel-díjat kapott a látás neurofiziológiai alapjainak leírására irányuló kutatásaiért. Ennek része volt a fotoreceptorok széli gátlásának a leírása, mely tehát a HC-ek központ-környék organizáció kialakításának egy kulcsfolyamata. Lényege, hogy a HC-ek egy GABAerg gátló neurotranszmisszióval látják el receptív mezejük központi PR-ait, ha a receptív mezejük perifériáján található PR-ok fényt érzékelnek. Ez a mechanizmus felelős az objektumok éleinek és az éles kontrasztjelenségek a detektálásáért.

axonterminálisokkal és az AC nyúlványokkal, majd a beérkező információ integrálása és feldolgozása után a szummált jelet akciós potenciál (*AP/spike*) sorozat kóddá alakítják és tovább küldik az agy felé. Az AC-ek populációja mind funkciójában, mind morfológiájában igen diverz. Majom és emberi retina mintán mintegy 25 különböző AC típust sikerült elkülöníteni Golgi festéssel (Mariani, 1990; Kolb et al., 1992). Az AC-ek funkcionálisan is sokrétűek, számos egymástól nagyon különböző feladat ellátására szakosodtak. Az AC-ek GABA vagy glicin gátlás segítségével a párhuzamos információs útvonalak finomhangolását végzik. Egyes útvonalakat egymástól még jobban elszeparálnak (pl. ON- és OFF csatornák) míg mások működését összehangolják (Grünert, 2000). Ezzel a mechanizmussal szabályozzák a GCL-t elhagyó kódolt információcsomagok időbeli sorrendjét, valamint ezen szignálok sebességét (Kolb és Nelson, 1981; MacNeil és Masland, 1998). Ezen túlmenően egyes képviselőik hozzájárulnak a laterális gátlás folyamatához is (pl. S1/S2 sejtek a nyúl retinában; Völgyi et al., 2002), a mozgás irányának érzékeléséhez (Cohen és Miller, 1995), valamint az objektum/háttér mozgás elkülönítéséhez (Ölveczky et al., 2003; Baccus et al., 2008) az adott stimulusra aspecifikus funkciójú RGC-k gátlása révén. Más AC-ek viszont a direkt információ átadásban is szerepet játszanak. Az egyik legismertebb AC populáció az AII-ek csoportja. Ezek a sejtek az IPL OFF alrétegében található ún. lobuláris és az IPL ON rétegében elágazó transzverzális rostokkal rendelkeznek (*bistratified*). Alacsony fényintenzitás mellett (szkotopikus fényviszonyok – amikor a pálcikák aktívak, de a csapok még nem) az AII sejtek csak a transzverzális nyúlványaikon kapnak bemenetet az ON polaritású pálcika BC-től. Kimeneteik kétféleképpen, egyrészt jelkonzerváló, serkentő elektromos szinapszisokkal látják el transzverzális dendritjeikkel az ON csap BC-k axon terminálisait, másrészt inhibitoros, glicinerg szinapszisokat adnak az OFF csap BC-k axon terminálisaira. Fényszegény környezetben tehát az AII sejtek kulcsfontosságúak a pálcikák által érzékelt jel továbbításában és ON/OFF útvonalak összehangolásában (Famiglietti és Kolb, 1975).

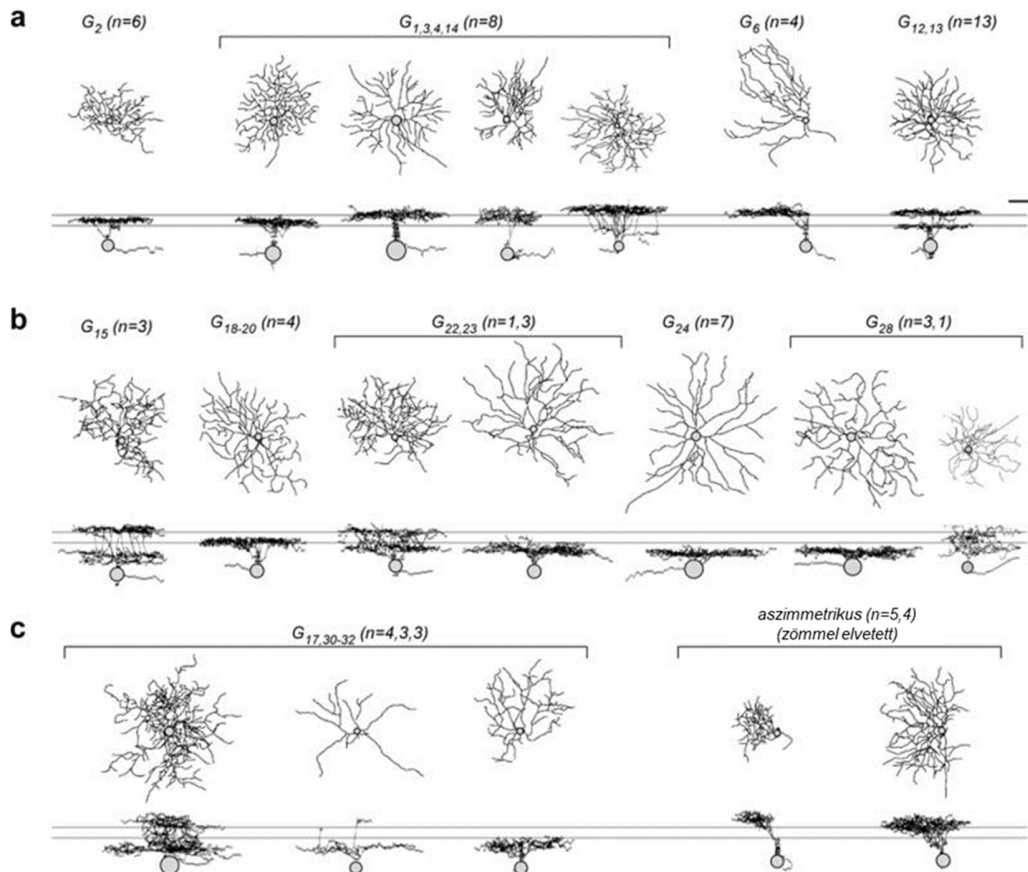
Az IPL két szublamínára (alréteg) oszlik. A szublamína-a (szklerális fél – az INL-lel határos) az OFF BC-ek axon terminálisait és OFF dúcsejtek dendritjeit és a köztük létrejövő kapcsolatokat tartalmazza, míg a szublamína-b (vitreális fél – a GCL-lel határos) az ON bipoláris és ganglion sejtek nyúlványvégződéseinek és kapcsolatainak a helye. Ilyenformán a fényerő növekedésének és csökkenésének kódolásában szerepet játszó idegsejtek kapcsolatai az IPL-ben térbelileg is elkülönülnek (ez az OPL területén még nem történt meg), így az ON és OFF útvonalak jobban

elválhatnak egymástól. Érdekes, hogy a mindkét polaritással rendelkező ún. ON-OFF sejtek (létezik ON-OFF AC és RGC is), vagy *bistratified*-ek, azaz mind az ON- mind az OFF alrétegekben tartalmaznak egy-egy dendrit ágat, vagy pedig *monostratified* dendritfával rendelkeznek, mely az IPL közepén, a két alréteg határán helyezkedik el.

A **ganglionsejtek rétegében** találhatóak a RGC-k melyek kiterjed dendritálózatukra érkező bemeneteiket összegezve, akciós AP sorozatot generálnak, mely a retina egyetlen kimenetén, az optikus rostokon (*nervus opticus*) keresztül halad az agyi látóközpont felé. Az RGC-k feladata a vizuális információ elsődleges feldolgozása is. A különböző RGC típusok funkcionálisan különböző információ feldolgozására specializálódtak, így a szín, kontraszt, fény intenzitása, a mozgás és annak iránya, objektum mérete stb. A képi jelenségekkel kapcsolatos információt receptív mezéjükről típus-specifikusan gyűjtik össze (Barlow et al., 1964; Nelson et al., 1978; 1993). A legalapvetőbb funkcionális csoportosítást Hartline, már 1938-ban megállapította elektrofiziológiai kísérletei alapján, mely szerint az RGC-k három csoportja különíthető el: a fény megjelenésére vagy intenzitásának növekedésére érzékeny ON, a fény megszűnésére, valamint intenzitásának csökkenésére érzékeny OFF és mindkét stimulusra érzékeny ON-OFF sejtek (Hartline, 1938). A dendritfa szerkezete, a sejttestek mérete, a dendritok kiterjedése, valamint az elágazásrendszer IPL-béli szintje alapján már Ramón y Cajal is számos különböző morfológiai típusba sorolható RGC-t azonosított be Golgi festéssel (Cajal, 1892). A legalapvetőbb morfológiai csoportosítás a következő csoportokra osztja az RGC-ket: alfa (legnagyobb sejttesttel és kiterjedt, szerteágazó nyúlványokkal rendelkező) sejtek, béta sejtek (Wässle et al., 1981), valamint nem alfa és béta sejtek. Az RGC-k végső kimeneti információt szállító axonjai végül az NFL-be futnak, ahol az optikus ideg (*nervus opticus*) ezeket összeszedve, több mint 1 millió idegszálat integrál (emberi retina esetén). A *nervus opticus* az információt az agy elsődleges átkapcsoló központjaiba (*corpus geniculatum laterale* - CGL, *colliculus superior*, *suprachiasmatic nucleus*, *intergeniculate leaflet* stb.) szállítja. Ezek közül a képalkotás szempontjából a CGL fontos, ahol az egyes információs csatornák helyi projekciós neuronokon kapcsolnak át, majd az elsődleges látókéreg felé továbbítják az elemekre bontott képi információt. A GCL-ben található továbbá az ún. *displaced* amakrin sejtek (dAC) szómái is, melyeknek (amint a név is utal rá) a sejtteste nem konvencionálisan az INL-ben, hanem a GCL-ben helyezkednek el. Ezek *wide-field* vagy *medium-field* AC-k, mindezülig *narrow-field* dAC-
ket nem sikerült leírni (Pérez et al., 2007). A dAC-k funkciójáról keveset tudunk, de ismert, hogy

mintegy 10%-uk spontán AP generálásra és GJ-függő AP oszcillációra képesek (Aboeela és Robinson, 2004). Néhány képviselőjük több axonnal is rendelkezik (poliaxonális AC-k; PA), melyek retinában betöltött szerepe egy napjainkban is igen aktívan kutatott terület.

3.3. A dúcsejtípusok sokfélesége az egér retinában



2. ábra: Az RGC-k morfológiai csoportosítása Baden és munkatársai szerint. a-c, példa az elektrofiziológiai felvételek vagy a Ca^{2+} -képződés után feltöltött RGC-k morfológiájának diverzitására. A különböző RGC-k klaszterek alapján meghatározott csoportokba rendezve vagy elvetve (**c, jobbra**) a fényválaszuk alapján. Aránymérték: 50 μ m (Baden et al. 2016).

Mint már az előző fejezetben is említésre került, a retinális dúcsejtek populációja mind funkcionálisan, mind morfológiailag igen diverz. Az egyes RGC-k számos vizuális karakterisztikára specializálódnak és ez megnyilvánul a morfológiájukban is, bár a mai napig a tudományterület egy aktuális feladata, hogy az egyes sejtek morfológiai sajátosságát összekösse a funkcionális specializációval. A bizonyos funkcionális karakterisztikák szerinti specializáció alapja a sejtek kapcsolati rendszere, azaz a dúcsejtek a dendritágaik közelében elhelyezkedő BC-

ek és AC-ek közül csak azokkal létesítenek kapcsolatot, amelyek a funkció ellátásához megfelelő információt hordozzák. Könnyen belátható, hogy a funkcionális kapcsolatok kiépítésekor a bemeneti sejtek eloszlása, nyúlványainak elhelyezkedése és azok sűrűsége meg fogja szabni egy adott dúcsejt dendritfájának méretét, az elágazás IPL-béli szintjét, a dendriteken elhelyezkedő posztszinaptikus felszínek helyeit és sűrűségét, vagyis a dendritfa elágazási mintázatát. Tehát nem túlzott elvárás az, hogy a számos (> 30) különböző alakot mutató dúcsejt, egyben hasonló számú funkcionális egység létezését jelenti az emlős retinában, melyek ezek szerint specifikusan járulhatnak hozzá a párhuzamos retinális információs útvonalakon történő jeltovábbításhoz. A morfológiai/funkcionális diverzitás megléte elsődleges kísérleti állatunknál, az egérnél sincs másképp. Számos tanulmány született a közelmúltban, mely az egér RGC-k morfológiai és funkcionális osztályozásával egyaránt foglalkozik (Sun et al., 2002; Badea és Nathans, 2004; Coombs et al., 2006; Völgyi et al., 2009; Baden et al., 2016). Míg Badea és Nathans még csak 12 féle morfológiai ganglion sejt típust határozott meg (9 *monostratified* és 3 *bistratified* klaszter; Badea és Nathans, 2004), addig Coombs és munkatársai (Coombs et al., 2006) már 14 féle, morfológiailag különböző RGC típust azonosítottak be. Sun és munkatársai viszont korábban, 2002-ben, összesen 19 féle különböző morfológiájú osztályba osztották az RGC-eket, melyek 4 nagyobb csoport részét képezték (RGA-D; Sun et al., 2002). Völgyi és munkatársai 2009-ben 22 féle RGC típust állapítottak meg, Neurobiotin jelölést követően a sejtek szoma-dendritikus morfológiája alapján (Völgyi et al., 2009). Ez a munka több szempontból úttörőnek tekinthető a többi összehasonlításához képest: 1. a legrészletesebb morfológiai leírást adta a különböző RGC típusokról, 2. az összehasonlításban a *gap junction* (réskapcsolat) mediálta Neurobiotin kapcsoltság is szerepelt mint kvalitatív/kvantitatív paraméter, mely nagy mértékben megkönnyítette egyes sejtek esetében az összehasonlítást és végül 3. az első olyan publikáció volt, ahol az RGC típusok száma nem korlátozódott a korábban becsült (és évtizedekig valósnak gondolt) 12-14-re, hanem legalább 22 morfológiai típust írt le azzal a megjegyzéssel, hogy a leírás nem teljes. Ez utóbbi munkában tehát a szerzők a különböző RGC altípusok réskapcsolati mintázatát is meghatározták és úgy találták, hogy a legtöbbjük (16) GJ kapcsolatot létesít szomszéd RGC-vel és AC-vel. Az is világossá vált, hogy a különböző altípusba tartozó RGC-k nem létesítenek egymással réskapcsolatot, ami altípus specifikus információs csatornák/mikrohálózatok létezését feltételezi. Vagyis minden RGC altípus többé-kevésbé rá jellemző réskapcsolati mintázattal is bír. De a morfológián kívül az RGC-k

csoporthozhatóak még génextpressziós tulajdonságaik (Huberman et al., 2009), neurokémiai markereik (összefoglalva: Kovács-Öller et al., 2019), és fénystimulusokra adott válaszaik kinetikája alapján is. A jelenlegi vizsgálatok olyan irányba tartanak, hogy a számos különböző vizsgálati módszerrel kapott eredményeket integrálni lehessen egyetlen közös rendszerben. Ez utóbbi munkák sorába illeszkedik Baden és munkatársainak 2016-os publikációja (Baden et al., 2016), amelyben elektrofiziológiai, Ca^{2+} -képződési és immunhisztokémiai módszerekkel 32 különböző dúcsejtípust különítették el egymástól (eredetileg 34 féle sejtípust azonosítottak be, de ebből később kettőt elvetettek fényválaszaik alapján; 2. ábra). Jelenleg ez utóbbi csoportosítás a legelfogadottabb. Ezek alapján is látszik, hogy még jelenleg sincs egy egységesen elfogadott rendszer és kapcsolatos nomenklatúra a RGC-ket illetően. Ennek a dolgozatnak többek között az is a célja, hogy olyan aspektusait is vizsgálja a retinális dúcsejtek működésének (fényválaszok késése, CaBP expresszió, Ca^{2+} kinetika), mely később akár a klasszifikáció alapját is szolgálhatja.

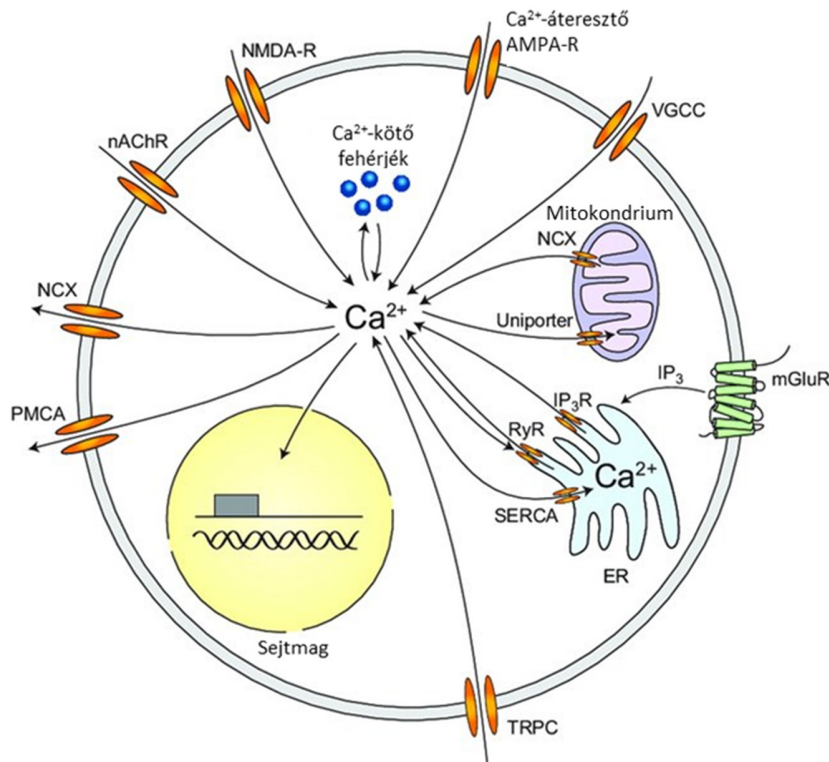
3.4. Párhuzamos információs csatornák

Az RGC-k bemeneteiket dendritjeiken keresztül, altípus-specifikus módon gyűjtik, azokat integrálják, majd AP sorozattá kódolják. Ezek az akcióspotenciál-sorozatok olyan párhuzamos információs csatornákon jutnak el az agyba, melyeknek kiindulópontja a retina egy-egy altípusába tartozó RGC-inek összessége (egyazon funkciót betöltő RGC-k). Mivel minden egyes funkcionális RGC altípus, csak a számára dedikált vizuális információ morzsát dolgozza fel, azt extrahálja a látott képből. A számos képi információ töredék mindegyike pedig a párhuzamos útvonalakon szállítódik a központi idegrendszer felé. A látókéreg magasabb rendű agyi területei (V2-4, MT stb.) lesznek azok a régiók, ahol a párhuzamos csatornák által szállított információ újra egyesül és látásérzetet alakít ki. Ez utóbbi mechanizmust „*feature binding*”-nak is nevezik (Ding et al., 2017), melynek során az egymással összetartozó képi információk alapján az agyban egy egységes kép alakul ki a látott objektumról. A „*feature binding*” jelenségét már korábban számos szenzoros rendszer esetében leírták, de a látás tekintetében egyelőre kevés a meggyőző bizonyíték. Arra azonban van adat, hogy a képi információ feldolgozása során az egyes információs csatornák külön-külön tájékoztatják az agyat az objektum egyes vizuális paramétereiről. Az eddigi tanulmányok alapján úgy tudjuk, hogy külön információs csatornán fut az agy felé az információ a tárgy helyzetéről (Venkataramani és Taylor, 2010; 2016; Nath és

Schwartz, 2016), mozgásáról és annak irányáról (Barlow et al., 1964; Barlow és Levick, 1965; Taylor és Vaney, 2002; Sabbah et al., 2017), valamint a tárgy és háttére egymáshoz viszonyított mozgásáról (Ölveczky et al., 2003; 2007; Baccus et al., 2008; Manookin et al., 2018). Ezeken a csatornákon az információ feltehetőleg különböző sebességekkel is mozog, mely sebességkülönbség eredhet a vizuális stimulus bizonyos karakterisztikáiból, valamint a sejtek sejtípus specifikus fiziológiás és morfológiai jellemzőiből. Ezeket támasztják alá azok a múltbeli munkák, melyek bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a mozgó tárgyakról gyorsabban továbbítódik az információ, mint a stacionárius, de felvillantott tárgyakról (Baldo és Klein, 1995; Purushothaman et al., 1998; Whitney és Murakami, 1998). Ezen túl a különböző axon átmérők is befolyásolják az információtovábbítás sebességét (Perge et al., 2012; Li et al., 2015). Az azonban még sokáig kérdéses volt, hogy ez az időbeli szeparáció a látórendszer mely szintjén is kezdődik. Számos bizonyíték mutat azonban afelé, hogy a folyamat már magában a retinában kezdődik, hisz a különböző RGC-k a stimulust különböző időkésekkel dolgozzák fel (Farrow és Masland, 2011; Li et al., 2015). Innen logikus a felvetés, hogy ezen időkésekben mutatkozó különbségeknek célja van és valószínűleg hozzájárulnak a vizuális információ kódolási mechanizmusaihoz. Erre szolgál bizonyítékul Gollisch és Meister 2008-as munkája, melyben megállapították, hogy az RGC-k fényválaszainak időbeli heterogenitása fontos részét képezi a vizuális kódnak, mely végül az agyi feldolgozó központok felé továbbítódik (Gollisch és Meister, 2008).

Ezek alapján nem elhanyagolható az RGC fényválaszok időbeli késéseinek heterogenitása és a retinális kód kialakításban betöltött szerepének vizsgálata. Ennek érdekében vizsgálataink és dolgozatom is igen erős fókuszot helyez ennek a kérdéskörnek a tanulmányozására.

3.5. Ca^{2+} -képződési vizsgálatok



3. ábra: Az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis a sejtekben. A Ca^{2+} elsődlegesen a Ca^{2+} -átérlesztő α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolepropionát (AMPA) és az N-metil-D-aszpartát (NMDA) glutamát receptorokon, a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákon (*voltage-gated calcium channels* – VGCC), a nikotinos acetilkolin receptorokon (nAChR) és a C-típusú tranzien receptor potenciál függő csatornákon (TRPC) jut be a sejtekbe az extracelluláris térből. Továbbá inozitol trifoszfát receptorok (IP_3R) és rianodin receptorok (RyR) által szabályozott, belső raktárakból szabadul fel. Az IP_3 metabotrop glutamát receptorok (mGluR) által termelt hírvivő molekula. A Ca^{2+} kiáramlás a plazma membrán Ca^{2+} ATPázai (PMCA), a nátrium-kalcium pumpa (NCX) és a szarko-/endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATPázai (SERCA) által szabályozott folyamat. A mitokondriumok szintén fontos szerepet töltenek be a neuronok Ca^{2+} homeosztázisának a fenntartásában (Grienberger és Konnerth, 2012).

A Ca^{2+} létfontosságú másodlagos hírvivő molekula minden élő sejt életében. Olyan, minden sejt számára kulcsfontosságú folyamatok szabályozásában játszik szerepet, mint a sejtciklus szabályozás és sejtosztódás (Pande et al., 1996), a sejtek sérülésre adott válaszreakciói és az apoptózis (Trump et al., 1984) vagy a különböző géntranszkripciós események (Greenberg et al., 1992). Ezen túl másodlagos hírvivő molekulaként számos sejt típus specifikus folyamatban is fontos szerepet tölt be: az izmok kontrakciójában (Szent-Györgyi, 1975.; különös tekintettel a szívizmokra, összefoglalva: Dulhunty, 2006), a neuronális jel kialakulásában és neurotranszmitter felszabadításban (Berridge, 1998) vagy a neuronok aktivitása által indukált géntranszkripciós eseményekben (Xia et al., 1996).

Ezért a sejtek számára kiemelkedően fontos az ion homeosztázis fenntartása és szabályozása. Az aktivitási mintázatok és az RGC-k funkció béli heterogenitásának ezért egyik sarokköve lehet az AP-k hatására lezajló intracelluláris Ca^{2+} -szint változás, mely a neuronok működésének az egyik alapmechanizmusa is (összefoglalva: 3. ábra; Grienberger és Konnerth, 2012). Így monitorozásával ugyanolyan releváns információkhoz juthatunk a retina párhuzamos pályákon történő, vizuális információ kódolási folyamatainak tekintetében, mint az elektrofiziológias membrán potenciál változások vizsgálatával, továbbá jól ki is egészítheti az ezen vizsgálatokkal feltárt információkat.

A fentebb említett célt szolgálja a Ca^{2+} -képalkotás technikája, mellyel nyomon követhető a szövet vagy sejtenyészlet Ca^{2+} szintjének időbeli aktivitása. A módszer tökéletes arra, hogy egy kiterjedt területen vizualizáljuk több neuron egyéni és populációs aktivitását is, ezáltal a „magas kimenetű” (*high-throughput*) technikák közé sorolható. A módszer a Ca^{2+} indikátor molekulák használatán alapszik. Ezek olyan specifikus molekulák, melyek a Ca^{2+} kötésére konformációt váltanak és ezzel megváltozik fluoreszcens tulajdonságuk is. Két fő csoportjuk van: a kémiai indikátorok és a genetikailag kódolt Ca^{2+} indikátorok (*genetically encoded calcium indicators* – GECIs). A kémiai indikátorok jelen használt generációjának a molekula vázát szinte kivétel nélkül a BAPTA (*1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) képezi, mely az EGTA-nak (*ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) egy homológia és szemben azzal, igen magas affinitást mutat a Ca^{2+} ionra (Tsien, 1980). Ezek a molekulák egy kelátor karboxil csoport segítségével a Ca^{2+} -ot megkötve kelátokat képeznek. A reakció során lezajló konformáció változások vezetnek majd ahhoz a fluoreszcens változáshoz is a molekulában, mely majd a mérhető jelet biztosítja a vizsgálatok során. Napjainkban ilyen indikátorok közül a Fura-2 (Hochstrate és Juse, 1991), a Fluo-4 (Newman, 2001), Fluo-8 (Bernard et al., 2013) és az Oregon Green BAPTA (Behrend et al., 2009) széles körben használt neurobiológiai vizsgálatokra, köszönhetően egyszerű alkalmazhatóságuknak és magas jel-zaj arányuknak. A festékek bejuttatásának több módja is van. A legkézenfekvőbb és egyben a legprocedurálisabb az indikátorok direkt injekciója mikropipettával vagy mikroelektrodával a célsejt(ek)be (Jaffe et al., 1992; Svoboda et al., 1997; Margrie, 2002). Bár a módszer viszonylag energiaigényes, de specifikus sejtek célzott jelölését teszi lehetővé. További egyszerűen alkalmazható technika a *bath-loading*, vagy más szóval „festékfürdő”, amikor a szövetet a festéket tartalmazó fiziológias oldatban inkubáljuk és hagyjuk, hogy a sejtek maguk vegyék fel

az indikátort (Gryniewicz et al., 1985). Ebben az esetben a festék sóinak észterezett változatait alkalmazzák, melyek az észter csoport lipofil tulajdonságai révén könnyebben bejutnak a sejtekbe, ahol a sejt észterázai az észtertől megszabadítva a kelátor karboxil csoportot, alkalmassá teszik az indikátort a Ca^{2+} kötésre (Tsien, 1981). További technika még az elektroporáció/elektropermeabilizáció módszere (lásd pl.: Briggman és Euler, 2011). Ez egy mikrobiológiai eljárás, melyben egy elektromos mezőbe helyezük a sejteket, annak érdekében, hogy növeljük a permeabilizációt. Az elektromos térerő hatására, így mintegy lyukakat hozunk létre ideiglenesen a sejtmembránon, ahol szabadon „bedifundálhat” a festék, melyet ilyenkor magas koncentrációjú cseppben a szövet és az elektróda közé helyeznek. Továbbá az oldat bejutását segíti, hogy a festék polaritásának megfelelően vándorol az elektromos térben. Az indikátorok másik vonala a genetikailag kódolt indikátorok, melyek előnye, hogy az organizmus sejtjeiben jelenlévő transzgén által, annak sejtjei önmaguk termelik meg a vizsgálatokhoz használni kívánt indikátort. Ezek a fehérje alapú genetikailag kódolt indikátorok, manapság egyre szélesebb körben használtak, főleg a neurobiológia területén, köszönhetően egyszerű alkalmazhatóságuknak (nem szükséges az indikátort a sejtekbe tölteni) tökéletesek akár *in vivo* vizsgálatokra is (Rocheffort et al., 2008). A legelső és a napjainkban is leggyakrabban használt GECI-k egy zöld fluoreszcens fehérjéből (*green fluorescent protein* – GFP, vagy annak valamely módosulata), egy calmodulinból és egy calmodulin kötő M13-as peptidből (mely a miozin könnyű lánc kináz egy *domain*-je) és egy újabb GFP, vagy YFP (*yellow fluorescent protein*), vagy ezek valamely származékának a láncából állnak (Miyawaki et al., 1997). Az indikátor működése a FRET (*Förster resonance energy transfer/ Fluorescent resonance energy transfer*) jelenségen alapszik. Eszerint két kromofór, egy gerjesztett donor- és egy akceptor kromofór között sugárzás nélküli energia átadás történhet meg, dipól-dipól kölcsönhatásukon keresztül, ha azok megfelelő közelségbe kerülnek egymáshoz (Förster, 1948; Sekar és Periasamy 2003). Az indikátor fehérjében található calmodulin, a Ca^{2+} -kötés hatására konformációt vált és ezzel körbe tekeredve az M13 domain-en, közelebb hozza egymáshoz a két kromofórt, ennek köszönhetően a donor energiát ad át az akceptornak, így megváltozik a molekula fluoreszcens tulajdonsága. A képalkotási mérések során ezt a változást fogjuk detektálni. A calmodulin helyett alternatíván alkalmaznak troponin C-t is a Ca^{2+} megkötésére (Heim és Griesbeck, 2004). Az indikátor alkalmazásának itt is több módja lehetséges. Transzgénikus, transzfekciós technikákkal, stabil törzseket hozhatunk létre, melyekben az indikátor termeltetéséért felelős

transzgen a vonalban generációról-generációra öröklődik. Ezeknek a vonalaknak további előnye, hogy egymással keresztezhetők, így tetszőleges tenyészetek hozhatók létre, melyek akár több különböző típusú markert is magukban hordoznak. Számos olyan vonal is van amelyik csak a promotert tartalmazza a célsejteken, amihez egy másik vonal keresztezésével „hozzáköthető” a célgén, így ezzel a technikával tetszőleges tenyészetek létrehozása lehetséges, melyekben csak a vizsgálni kívánt sejtípusok tartalmazzák a markert. Ilyen indikátorok közül a leggyakrabban használtak a GCaMP (Nakai et al., 2001) különböző változatai, pl.: GCaMP3 (Tian et al., 2009; Zariwala et al., 2012) és GCaMP6 (f/m/s – *fast/intermediate/slow* – gyors/ köztes/ lassú; Chen et al., 2013; Dana et al., 2014). Az első transzgenikus GCaMP állatot Ji és kollegái hozták létre 2004-ben (Ji et al. 2004), azóta az indikátor számos fejlesztésen esett át. Újabban kifejlesztettek már vörös fényt emittáló, úgynevezett red-CaMP-et is (Akerboom et al., 2013), mely kimondottan jól használható retinális vizsgálatokra egérben (az egér retina inszenzitív a vörös fényre). A kalcium indikátor termeléséért felelős transzgen bejuttatható felnőtt, vagy születés utáni állatba vírusinjekcióval is. Itt a transzgen egy vírusvektor genomjába van kódolva. Ez a vektor a legtöbb esetben adeno-asszociált vírus (AAV) (Chen et al., 2013; Weitz et al., 2013). Injektálhatjuk ezeket a vektorokat szisztémásan és célzottan is a célterületekre. Az általunk is használt thy1-GCaMP3-as konstrukt egyik legnagyobb előnye, hogy az indikátor csak a projekciós neuronokban, a retina tekintetében csak az RGC-kben termelődik. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az anti-GFP-vel jelölt Thy1-GCaMP3+ sejtek kollokalizációt mutattak a dúcsejt specifikus RBPMS (*RNA-binding protein with multiple splicing*) jelöléssel, de amakrin sejt markerekkel nem (Raymond et al., 2009, Blandford et al., 2019).

A Ca^{2+} -képződési vizsgálatok egyik sarokköve az előbb részletezett indikátorok alkalmazása. A másik lényeges aspektusa azonban maga a felvétel során alkalmazott mikroszkópos eljárás. Ezek alapján a technika kombinálható mind fluoreszcens (Lakowicz et al., 1992), mind konfokális (Williams, 1990) és két-foton mikroszkópiával is (Denk et al., 1990; Stosiek et al., 2003). A különböző mikroszkópiai eljárások tekintetében a legjelentősebb különbség a fényforrásban és a detektorban van. A fluoreszcens rendszereknél ez általában egy higany- vagy egy xenonlámpa, melynek fényét a megfelelő szűrők vagy monokromátor használatával állítjuk be a vizsgálatokban használni kívánt hullámhossz tartományokra. Az indikátort tartalmazó sejtek/szövetek által emittált fényt, sCMOS (*scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor*) (lásd pl.: Mohammed et al., 2016) kamerával, CCD (*Charge-coupled*

Device/töltés-csatolt eszköz) kamerával, vagy PMT (*PhotoMultipller*)-vel detektáljuk. Újabban a technológia fejlődése révén, egyre elterjedtebbek az olyan „költséghatékonyabb” megoldások, ahol nagy idő- és térbeli felbontású, de alapvetően nem tudományos célokra fejlesztett digitális kamerákat alkalmaznak. Ugyanis ma már ezek a „polgári” kamerák is képesek olyan teljesítményre, mely a tudományos vizsgálatok szigorú kritériumainak is megfelel (jelenleg laborunkban is egy ilyen kamerát használunk a Ca^{2+} -képalkotási felvételek rögzítésére). A konfokális és 2-foton eljárások, megadják nekünk az optikai szelektelés lehetőségét, mellyel a mintánk a z-tengely mentén, teljes mélységében, igen nagy precizitás mellett vizsgálható, a szövet fizikai roncsolása (szelektelés) nélkül.

3.6. Ca^{2+} -kötő fehérjék a retinában

A kalcium-kötő fehérjék (*calcium binding proteins* – CaBP) feladata, hogy az idegsejtek Ca^{2+} homeosztázisát fenntartsák, ezzel hozzájárulva azok aktivitási mintázatainak kialakításához (3. ábra). Így releváns markerként szolgálhatnak az RGC-k kombinált funkció szerinti és morfológiai/neurokémiai csoportosításához. Számos tanulmány született a retinában megtalálható CaBP-k expressziójáról (összefoglalva: Kovács-Öller et al., 2019), de arról még igen keveset tudunk, hogy ezek hogyan járulnak hozzá a retinális dúcsejtek képi kódolási mechanizmusához és a párhuzamos retinális pályákon történő információ továbbításhoz. Az RGC-k a retina egyedüli kimeneti idegsejtcsoportja. Mivel az RGC-k fény-kiváltotta tranziens Ca^{2+} koncentráció növekedésének kialakulásában és időbeli lefutásában is nagy szerepet kaphatnak a Ca^{2+} homeosztázist befolyásoló CaBP-k, ezért logikus következtetés az, hogy a CaBP-k meghatározó szerepet tölthetnek be a RGC-k kódolási mechanizmusában. A legtöbb korábbi vizsgálat során a CaBP-eket csak, mint celluláris neurokémiai markereket használták, csak kevés adat van arra vonatkozóan, hogy az idegsejtek aktivitási mintázatait jelenlétükkel hogyan befolyásolják.

A CaBP-k, ahogy a nevük is mutatja, az intracelluláris térben szabadon mozgó Ca^{2+} -t kötik meg, így járulnak hozzá a Ca^{2+} homeosztázis fenntartásához. Ez különösen fontos az idegsejtek tekintetében, hisz az idegi aktivitás intenzív Ca^{2+} anyagcserével jár, melynek során a citoplazma Ca^{2+} szintje ideiglenesen (néhány száz milliszekundum) sokszorosára nőhet. Mivel a Ca^{2+} sok enzim direkt vagy indirekt aktivátora, ezért a Ca^{2+} puffereles által CaBP-k jelentős szerepet töltenek be a Ca^{2+} függő szignáltranszdukciós folyamatok lefutásában is.

A neuronokban a leggyakrabban előforduló három CaBP a parvalbumin (PV), a calretinin (CaR) és a Calbindin (CaB). Az RGC-k tekintetében a **PV** a legszéleskörűbben vizsgált a három CaBP közül. Egér retinában eddig 7 (Münch et al., 2009), míg nyúlban 8 PV+ RGC-t sikerült beazonosítani (Lee et al., 2013). A PV továbbá (a CaR mellett) számos fajban jellemző markere az AII-es amakrin sejteknek (Sanna et al., 1990; Völgyi et al., 1997), bár a fehérje egérben nem volt jelen az AII-es sejtekben (Gábrriel és Straznický, 1992). Patkány retinában azonban azt is sikerült kimutatni, hogy az AII-es sejtek PV expressziója a cirkadián ritmus által befolyásolt (Gábrriel et al., 2004), így feltételezhetően szerepe van a fény adaptációs folyamatokban is. Molekula méretét tekintve a PV a legkisebb a három fehérje közül (kb. 12 kDa). Két funkcionális Ca^{2+} -kötő hellyel és három EF-hand motívummal (hélix-hurok-hélix motívum) rendelkezik (Schwaller, 2010).

A **CaR** expresszióját szintén leírták már az egér RGC-k tekintetében. 5 RGC sejtípust figyeltek meg, ami a CaR mellett CaB-t is expresszált (Lee et al., 2010; Gu et al., 2016). Emellett a CaR termelése az AII-es sejtekben is kimutatható a CaR-GFP GMO egerek retináiban, ugyanakkor a CaR IHC jelöléssel ezt nem sikerült igazolni (Huberman et al., 2008; Völgyi et al., 2013a). Molekulaszerkezetük nagyon hasonló a CaB-nel, korábban emiatt „calbindin 2-ként” azonosították. Molekula mérete 29 kDa és hat EF-hand motívummal rendelkezik, amelyből 5 funkcionál Ca^{2+} -kötő helyként (Schwaller, 2010).

Korábban már említésre került, hogy a **CaB** is jelen van az egér RGC-kben, ahol 5 sejtípust tekintve, koexpressziót mutat a CaR-nel (Lee et al., 2010; Gu et al., 2016). A retinában ezen túl a CaB tipikus markere az axonnal rendelkező HC-knek is, nem csak az egérben, hanem a legtöbb vizsgált emlős faj esetében is (Hamano et al., 1990). A PV-hez hasonlóan korábbi tanulmányok alapján feltételezhető a CaB szerepe is a cirkadián ritmusban, hiszen a fehérje nagy mértékben van jelen az ennek szabályozásáért felelős, szuprachiasmatikus mag interneuronjaiban (Stadler et al., 2010). Molekula mérete (a szerkezeti hasonlóság miatt is) nagyon közel van a CaR-éhez (28 kDa). Szerkezete globuláris, két Ca^{2+} -kötő hellyel és hat EF-hand motívummal (Noble et al., 2018). Mindhárom CaBP megtalálható az egér retina különböző AC populációiban, bár a PV termelését eddig nem sikerült igazolni a *displaced* AC-ek esetében (Kovács-Öller et al., 2019).

A fentiek alapján látható, hogy a CaBP-k markánsan jelen vannak a látórendszer számos sejtjében, akár azok specifikus markereiként is szolgálhatnak. Emiatt feltételezhető, hogy fontos szerepet töltenek be a vizuális információ feldolgozási folyamatiban is. De az RGC-kben

betöltött funkciójukról jelenleg rendkívül hiányosak az információink. Mivel az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozása hatással van az RGC-k aktivitási mintázatára és ezáltal az agy felé küldött neurális jelre, így feltételezhető, hogy a különböző funkcionális altípusba tartozó RGC-k egy rájuk jellemző CaBP expressziós mintázattal rendelkeznek.

3.7. Neuromorf retinális modellek

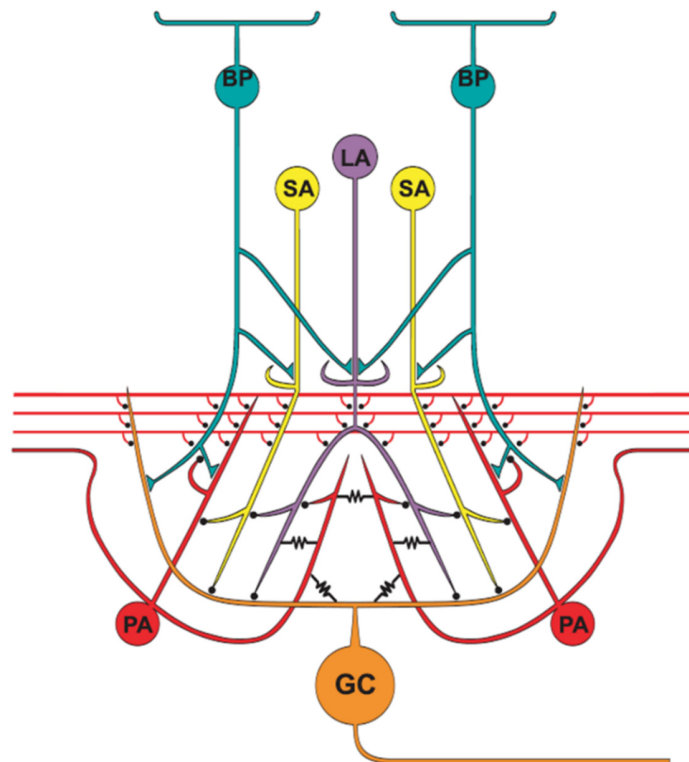
A neuromorf modellezés vagy *neuromorphic engineering* egy olyan napjainkban rohamosan fejlődő interdiszciplináris (biológia, matematika, fizika, számítástechnika) tudományterület, ahol az idegrendszer modelljeit (pl. érzékelés, motoros kontrol, vagy multiszenzoros érzékelés) tartalmazó digitális, kevert analóg/digitális VLSI (*very large scale integration* – nagyon nagy léptékű integráció) és szoftveres rendszereket alkalmaznak az idegrendszerben megtalálható neurobiológiai rendszerek modellezésére és leírására. Ezen modellrendszerek az idegrendszer behatóbb és precízebb tanulmányozását teszik lehetővé, hisz a mesterséges rendszerben a modellezett idegrendszer elemei egymásról leválaszthatók, környezetüktől elszeparálhatók, valamint a hálózatok mikroelemeik szintjén manipulálhatók. Ez a valós biológiai rendszerekben nem, vagy csak igen körülményesen kivitelezhető. Természetesen itt a legerősebb limitáló tényező mindig az a tudásanyag, ami a neurobiológiai rendszerekről jelenleg rendelkezésünkre áll. Továbbiakban ezen modellek lehetőségeket biztosítanak arra, hogy integrálva a neurobiológiai kutatások eredményeit, alkalmazásukkal fejlesszük a már meglévő informatikai rendszereket. Hisz minden érdekük ellenére, a ma használatban lévő hagyományos számítógépes, információs és kommunikációs rendszerek nem rendelkeznek azzal az adaptációs, önszervező és tanulási képességgel, mint a biológiai idegrendszerek (Indiveri és Horiuchi, 2011). Így ezen modellek alkalmazása olyan napjainkban aktuális tudományterületeken jelenthet áttörést, mint pl. a robotika, valamint lehetőséget biztosítanak a jelenleginél sokkal energiahatékonyabb számítástechnikai rendszerek megalkotására is.

A retinális kutatások már a kezdetektől összeforrtak a neuromorf modellek fejlődésével. Ez köszönhető annak, hogy a retinális neuronok és információs útvonalak egy igen letisztult és jól átlátható rendszert alkotnak (legalábbis a központi idegrendszer többi részéhez viszonyítva). Ennek alapján nem meglepő, hogy az első neuromorf modell, a perceptron (Rosenblatt, 1958) is magát a látórendszer információfeldolgozási folyamatait volt hivatott imitálni. Ez egy

hipotetikus idegrendszer matematikai modellje, annak megértésére, hogy a környező világról alkotott vizuális információt hogyan érzékeljük, milyen formában idézzük fel, az információ hogyan tárolódik a memóriában és hogyan befolyásolja a későbbi felismerést és a viselkedést. Később 1970-ben Fukushima és munkatársai (Fukushima et al., 1970) megalkották a retina kezdetleges elektronikus modelljét. Ez a rendszer 700 bemeneti sejtet (fotoreceptort) és ugyanennyi kimeneti sejtet (dúcsejt) tartalmazott. A dúcsejtek ON-központú, koncentrikus receptív mezővel bírtak. Jellegét tekintve ez a modell már egy különálló számítógép volt. A kutatások új hullámát Carver Mead és munkatársai indították el, az ún. nagyon nagy léptékű integrációs (VLSI) rendszerek alkalmazásával. Ezekben a rendszerekben a korábbiakkal szemben kihasználták a neuronokat helyettesítő tranzisztorok, biológiai neuronokhoz hasonló non-lineáris klasszifikációs karakterisztikáit, így már nem csupán „ON-OFF” kapcsolóként használták őket. Ehhez a mintát a retina osztályozott szinapszisairól vették (Mead, 1989). Ezek a neuromorf rendszerek a biológiai neuronokhoz hasonló tüzelő (*spiking*) aktivitást használnak az információ kódolására, ennek köszönhetően rendkívül energia-hatékonyak és hibatoleránsak.

Alap kutatásra többnyire számítógépes környezetben futtatható matematikai modelleket alkalmaznak. Így létrehozták már számos neurobiológia rendszer modelljét, többek között a *cerebellum*/oliva mag komplexének (Kenyon et al., 1998) és a látókéreg horizontális kapcsolatainak modelljét (Loxley et al., 2011). A közelmúltban számos retinális modellt is felhasználtak például a retinális dúcsejt válaszok késéseinek, a vizuális információ kódolásában betöltött szerepének a tanulmányozására (Gollisch és Meister, 2008), vagy a dúcsejtek magas frekvenciájú oszcillációs potenciáljainak modellezésére (Kenyon et al., 2003a; 2004; 2005). A Kenyon és munkatársai által kifejlesztett retinamodell alapvetően 5 sejtípust tartalmaz, 3 különböző rétegbe rendezve (4. ábra). Ezek a bipoláris sejtek (BP), kis, nagy, valamint poliaxonális amakrin sejtek (SA, LA, PA) és a dúcsejtek (RGC/GC). Az SA a modellben az AII-es amakrin sejtek felel meg, míg az LA a széles dendritmezejű (*wide-field*) amakrin sejt megfelelője. A PA a modellben is a poliaxonális amakrin sejtekre utal. Ez utóbbiak sejtteste a modell szerint *displaced*-ek (az élő retinában konvencionális és dAC poliaxonális sejt is létezik), bár a retinális modellben egyedül a sejtek kapcsolatrendszerének van jelentősége, a sejttest elhelyezkedésének nem. A rendszerben a RGC-k serkentő bemenetet kapnak a BC-ktől és gátló bemenetet az összes amakrin sejtől. Az amakrin sejtek gátló szinapszisaikkal egymást is szabályozzák. A PA-k GJ kapcsolatokon keresztül serkentő jelet kapnak az RGC-k felől és az

axonjuk minden kapcsolódó sejtet egy gátló szinapszissal lát el, különös tekintettel az RGC-kre és más PA-kra (Kenyon et al., 2005). Kenyon és munkatársai ezt a modellt később kiegészítették horizontális sejtekkel és csapokkal, egy másik munkájukban használt modell alapján (Kenyon et al., 2003b), itt a csapok serkentő bemenetet adnak a BC-knek és a HC-knek, míg a HC-k gátló visszacsatolást (*feedback* gátlás) képeznek a csapokkal. Ezt az utóbbi komplexebb modellt használtuk mi is munkáinkban, így jelen dolgozatban is. A modell ugyan nem tartalmazza a retinális hálózatok minden elemét, de így is sikeresen alkalmazható a párhuzamos retinális útvonalakon történő információáramlás tanulmányozására és a benne foglalt útvonalak vizuális információ kódolásban betöltött szerepére. Az alapkutatási használhatóságán túl, egy ilyen vagy ehhez hasonló retina modell továbbá, hozzájárulhat az alkalmazott, transzlációs gyógyászati kutatásokhoz és fejlesztésekhez is. Egy számítógépes retinális modell segíthet például, egy retinális prosztézis megtervezésében is, hiszen egy ilyen modellben gyorsan és humánusan (alany nélkül) elvégezhető a prosztézis finomhangolására és tesztelésére szolgáló kísérletek.



4. ábra: A retina modell sematikus ábrája az öt sejtípussal bipolaris (BP) sejtek, kis (SA), nagy (LA), és poliaxonális (PA) amakrin sejtek, és alfa ganglion (GC) sejtek. Mivel ez egy oldalnézeti kép, csak 2 BP látszik a tényleges 4-ből, ami ebben a kapcsolati rendszerben részt vesz. A modell itt látható változatában a stimulus direkt a BP-re érkezett (a fotoreceptorok csak később kerültek be a modellbe). Az ábra nem jeleníti meg a modell összes kapcsolatát (Kenyon et al., 2005).

4. Célkitűzések

Laboratóriumunkban évek óta folynak olyan kísérletek, amelyek a retinális idegsejtek közötti kapcsolatokat és ezáltal az információfeldolgozást vizsgálják. Kutatásaink központjában a párhuzamos retinális pályákon történő információ szállítás és a vizuális stimulusok retinális kódolása áll. A rendelkezésünkre álló metodológiai repertoár korábban egysejt elektrofiziológiai és hisztológiai technikákra épült. Ugyanakkor a vizsgált témakör és az általunk feltett kérdések szükségessé tették, hogy új, magas kimenetű (*high-throughput*) technikákat vonjunk be kísérleteinkbe. Ennek érdekében a dolgozatomban főbb célkitűzései a következők voltak:

1. A Ca^{2+} -képződési módszer, *in vitro* retina preparátumon való alkalmazásának kidolgozása és alkalmazásának tétele a dúcsejtek aktivitásának vizsgálatára.
2. A dúcsejtek funkcionális heterogenitásának és a párhuzamos retinális pályákon történő szignalizációnak a vizsgálata elektrofiziológiai és Ca^{2+} -képződési technikák kombinációjával; a dúcsejtek fényválaszainak időkései meghatározó tényezők vizsgálata.
3. A dúcsejtek neurokémiai heterogenitásának vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel, a termelt CaBP fehérjék alapján.
4. A morфомetrikus retina modell alkalmazásának tétele a párhuzamos retinális szignalizáció vizsgálatára és a fiziológiai méréseink (elektrofiziológia és Ca^{2+} -képződési kísérletek) alátámasztására.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Állatok és preparálás

Kísérleteinkben felnőtt (30-90 napos) C57BL/6J és Thy1-GCaMP3 (THY differenciációs antigén 1) (JAX #029860) egértörzseket (*Mus musculus*) használtunk. Ez utóbbi egy genetikailag módosított egértörzs, melynek RGC-i a módosítás révén önmaguk termelik a genetikailag kódolt Ca^{2+} indikátor fehérjét a GCaMP3-at, mely egy általánosabb, lassabb kinetikájú kalcium indikátor protein. Az állatokat 12/12 órás sötét/fény ciklusban tartottuk. A kísérletek a nappali órákban zajlottak, a disszekció 10 és 12 óra között történt. A fiziológiai kísérleteket megelőzően az állatok átestek egy 12 órás sötétadaptáción. A Ca^{2+} -képző kísérletek egy részében PV-GCaMP6f hibrid egértörzset használtunk. Ennek az egértörzsnek előnye a Thy1-GCaMP3-as állattal szemben, hogy a termelt indikátor jelentősen gyorsabb kinetikával bír. Hátránya viszont, hogy csak a sejtek egy alpopulációjában van jelen az indikátor protein (PV+ sejtek, 7 sejtípus egérben; Münch et al., 2009). Ezt a vonalat a Pvalb^{tm1(cre)Arbr} (JAC #017320) és a Ai95(ECL-GCaMP6f)-D (C57BL/6J) (JAX #028865) állatok keresztezésével hoztuk létre. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz, ezen túl használtunk még PV-Cre (JAX #017320) és tdTomato (JAX #007909) törzsek keresztezésével létrehozott hibrideket is. Az állatokat a kísérleteket megelőzően 150 μl isoflurane-al (4%, 0,2 ml/l), inhalációs módszerrel elaltattuk, majd nyaki diszlokációt hajtottunk végre rajtuk. A szemek és a retina eltávolítását és a boncolást halvány vörös megvilágítás alatt végeztük. A *cornea-t*, a lencsét és az üvegtestet, valamint a *pigment epithelium-ot* leválasztottuk a retináról. A vizsgálatok többségéhez a laborunk sztenderdjei szerint teljes retina preparátumot használtunk. A kipreparált retinát ezután szűrőpapírhoz (0,8- μm fekete; AABP; Millipore, Schwalbach, Germany) rögzítettük a könnyebb kezelhetőség végett. A preparátum ezután egy perfúziós kamrába került (RC-22, P-1 platformmal és Series 20 stage adapterrel (SA-NIK-AL; Warner Instruments, Hamden, USA), ahol oxigenizált (95% O_2 , 5% CO_2) és melegített (34 °C; in-line heater; Supertech Instruments, Pécs, Magyarország) emlős Ringer oldattal (pH=7,4) perfundáltuk. Maga a disszekció is ebben az emlős Ringer oldatban, oxigenizált körülmények között történt. Az állatok tartása, kezelése és kísérletes felhasználásuk is a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével (MÁB, BA02/2000-6/2006; BA/35/51-42/2016) és felügyelet alatt történtek.

Mindent megtettünk továbbá annak érdekében, hogy minimalizáljuk az állatokat ért stresszt, diszkomfort- és fájdalomérzetet. Minden kísérletet a 3R törvény elvei szerint végeztünk.

5.2. Ca²⁺-képzővizsgálatok

A Ca²⁺-képzővizsgálatokat C57BL/6J, Thy1-GCaMP3 és PV-GCaMP6f egértörzseken végeztük. A C57BL/6J törzsek esetében kémiai, Fluo-4 AM (Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) és Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB-1 hexapotassium só; Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) kalcium indikátorokat használtunk. A Fluo-4 indikátort *bath-loading* technikával juttattuk be a szövet sejtjeibe, ahol az indikátor magas koncentrációjú oldatát (50 µg indikátor + 7,19 µl dimetil-szulfoxid (DMSO)) emlős retina Ringer oldatban hígítottuk (2 µl indikátor + 1 ml Ringer). Ebbe a hígított oldatba került a szövet, ahol 30 perc inkubációs időt hagytunk arra, hogy a sejtek felvegyék a festéket. Az inkubáció után 3x1 ml retina Ringer oldattal kimostuk a retina által fel nem vett indikátor maradékot, majd további 40-45 percig inkubáltuk a szövetet, időt hagyva sejtjeinek a regenerációra. Mind az inkubációs mind a regenerációs idő alatt a szövetet fénytől elzárva, oxigenizált környezetben tartottuk. Az Oregon Green-t elektroporációval juttattuk a szövetbe. Itt a teljes retinát szűrőpapíron, GCL-el a felső elektróda felé fordítva, az elektroporátor (*In-vivo* Electroporator SP-4a; Supertech Instruments, Pécs, Magyarország) elektródái (CUY700P3L/E; Nepa Gene Co., Ltd., Ichikawa-City, Japán) közé helyeztük. A felső elektródára került az indikátor 5 mM-os oldatának (a natív só, emlős ringerben oldva) 1-2 µl-es cseppje. A felső elektródát a cseppel egy kézi mikromanipulátor segítségével addig engedték rá a szövetre, míg a csepp a felületi feszültség révén nem fuzionált a szövettel, ezzel egy összefüggő folyadék réteget alkotva a szövet és a felső elektróda között. Az elektroporátorral +13 V-os, 10 ms széles, 1 Hz frekvenciájú 10 db négyszögimpulzus adtunk le (Briggman és Euler, 2011). Ennek hatására a sejtek lipidmembránja rövid időközökre megnyílt a pulzusok alatt és így a festék bejuthatott az intracelluláris térbe. A beavatkozás után a szövetet sötétben tartva, oxigenizált emlős ringer oldatban, legalább 30 percig inkubáltuk időt hagyva ezzel a regenerációra. A GMO egértörzsek esetében az előbbiekhöz hasonló procedúrára nem volt szükség, itt közvetlenül a disszekció után megkezdődhetnek a mintán a mérések. A felvételek egy módosított Nikon FN1 mikroszkóppal zajlottak, mely 4x-es, 10x-es, 40x-es és 60x-es objektívekkel volt felszerelve (NA 0,31; 1,3; 0,8 és 1,0). Az RGC fényválaszokat teljes-mezejű fotopikus fénystimulus (l=490 nm, t=3s) után rögzítettük, 33,3 Hz, más esetben 25 Hz-es

és 60 Hz-es mintavételezési frekvenciával. Az excitációs fényt egy Polychrome V monokromátorral (FEI/TILL Photonics; Oregon, USA) állítottuk elő. A felvételeket egy Retiga 2000DC digitális kamerával (QImaging, Tuscon, USA) rögzítettük. A berendezés vezérlésére a gyártó által biztosított, Live Acquisition szoftvert (FEI/TILL Photonics; Oregon, USA) használtuk. A felvételekhez továbbá használatos egy másik *setup* is, ahol a fényforrásként egy Intensilight (Nikon) fényforrást használtunk és a felvételeket egy Sony A6300 kamerával rögzítettük. Az fényforrást ebben az esetben a WinWCP szoftver (John Dempster, University of Strathclyde) kontrolálta, TTL (tranzisztor-tranzisztor logika = négyszögimpulzus) pulzusok generálásával. A TTL pulzusok az Intensilight fényforrás kapcsolójába beépített mágneses kapcsolót, valamint egy LED fényforrást működtettek. Itt a felvételek mintavételezési frekvenciája 60 Hz volt, konstans ISO (kamera fényérzékenysége) és szűrő beállítások mellett, Full HD (1080p) minőségben. Későbbiekben a Retiga kamerát is lecseréltük egy Sony A6300-as kamerára. Ebben az esetben a Live Acquisition szoftvert már csupán a fényforrás vezérlésére használtuk, a kamerát előbb manuálisan, majd később a gyártó oldaláról elérhető Imaging Edge (Sony Imaging Products & Solutions Inc.) szoftverrel vezéreltük. A legtöbb esetben a bemeneti és kimeneti jelek összehangolásáért egy Imaging Computing Unit (ICU; FEI/TILL Photonics, Oregon, USA) központi vezérlőegység felelt. A felvételek előelemzéséhez FIJI szoftvert (NIH, Bethesda, USA; Schindelin et al., 2012) használtunk. Itt a vizsgálni kívánt sejtek manuális kiválasztását végeztük el, a ROI (*region of interest* – vizsgálati terület) *manager* beépített eszköz segítségével. A felvételek analízisére és a *spike* detekcióra a Matlab környezetben futó NeuroCa (Jang és Nam, 2015) integrált keretprogramot használtuk. A program az előzőleg kijelölt ROI-k felhasználásával két lépcsőben kiszűrte a háttérzajt, valamint a Ca^{2+} görbét normalizálta. Automatikusan egy low-pass Butterworth filter és a helyi maximumok használatával, a fluoreszcens változások ($\Delta F/F_0$) alapján detektálta a *spike*-okat minden kijelölt RGC-n és hozzájuk rendelte az iniciációs időket, amplitúdókat és a szélességeket (Jang és Nam, 2015). A program által kigyűjtött adatokból Microsoft Excel segítségével a fénystimulus idejének, a válaszok iniciációs időinek és az amplitúdók ismeretében meghatároztuk a RGC fényválaszok felfutási idejét, azok átlagát (válasz késés) és varianciáját (próbák közötti variancia). Továbbá kiszűrtük a spontán aktivitási eseményeket.

5.3. Elektrofiziológiai vizsgálatok (extracelluláris elvezetések, MEA, Patch Clamp)

Az egysejtes RGC extracelluláris elvezetésekhez wolfram mikroelektrodákat ($1\text{M}\Omega$; Kation Scientific LCC Minneapolis, MN, USA) használtunk. Az elektrodák egy AC differenciál erősítőhöz (DAM80i; World Precision Instruments, Sarasota, USA) csatlakoztak, és a jeleket egy analog-digitális átalakítóval (Digidata 1440a; Axon Instruments, Sunnyvale, USA) digitalizáltuk. Az RGC akciós potenciálok rögzítésére egy Axoscope-ot (Axon Instruments, Foster City, USA) használtunk, 20kHz-es mintavételezési frekvenciával. Néhány kísérletben multielektrodás elvezetést alkalmaztunk, melyekhez 64 vagy 128 csatornás MEA (multi electrode array) rendszert (Multichannel Systems GmbH., Reutlingen, Németország) használtunk, mely lehetővé tette számunkra, hogy egy időben több RGC aktivitását rögzítsük. A mérések során teljesmezejű, zöld ($\lambda = 525\text{ nm}$) fénystimulust alkalmaztunk. A homogén fényt közvetlenül a retina felszínére fókuszáltuk. A stimulus intenzitását a pálcikák fotoizomerizációjának időarányos rátájában fejeztük ki ($\text{Rh}^*/\text{pálcika/s}$; Rh^* itt és a későbbiekben is a pálcika izomerizációra utal). A fény intenzitását egy radiométer (Ealing Electro-optics, Holliston, USA) segítségével mértük le, és a pálcikák becsült denzitása ($437\ 000/\text{mm}^2$; Jeon et al., 1998) és a kvantumhatékonyság értéke ($0,67$; Penn és Williams, 1984) alapján számoltuk ki $\text{Rh}^*/\text{pálcika/s}$ -ban. Kísérleteinkben, ahol a stimulus intenzitásának a RGC-k válaszaira gyakorolt hatását vizsgáltuk, a stimulus intenzitását 10^{-2} -től, 10^4 $\text{Rh}^*/\text{pálcika/s}$ értékek között változtattuk, egy LED meghajtó (állítható DC kimenettel) használatával. A többi kísérletünkben, fotopikus stimulust (>102 $\text{Rh}^*/\text{pálcika/s}$) alkalmaztunk a retinán. A spektrális érzékenység vizsgálatánál, egy 100 W-os halogén lámpa és egy optikai pad segítségével teljesmezejű, fehér fénystimulust generáltunk. A fény intenzitást neutrál denzitás filterekkel ($\log -5,5$ és $\log 0$ között, $\log 0 = 0,25\text{ mW/cm}^2$), a spektrális komponenseket megfelelő szín-sáv áteresztő szűrőkkel (300, 360, 409, 437, 472, 495, 527, 562, 590, 632, 645 és 647 nm) állítottuk be. A patch clamp felvételeket egy Axopatch 200B patch clamp (PC) erősítővel (Axon Instruments) és ECS-el töltött (*Extracell solution* – extracelluláris oldat) pipettákkal (kb. $6\text{ M}\Omega$; boroszilikát üveg, 1,5/0,84 mm belső-/külső átmérő, WPI) viteleztük ki, sejthez rögzített (*cell-attached*) konfigurációban (*Voltage Clamp* mód). A jelek digitalizálását egy Digidata 1440A ADC-vel (analog-digitális konverter; Axon Instruments) és a felvételét WinWCP szoftver (John Dempster, University of Stratchlyde) segítségével hajtottuk végre. A stimulációhoz használt elektrodákat ICS-el (*Intracell solution* – intracelluláris oldat; 4-

9 M Ω boroszilikát üveg pipetták, 1,5/0,84 mm belső-/külső átmérő, WPI) töltöttük meg. Az elektródákat egy P-87 mikropipetta húzóval (Sutter Instruments) húztuk. Az ICS összetétele: 125 mM kálium-glükonát, 8 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP és 0,4 mM Na-GTP; pH 7.3 (kálium-hidroxiddal beállítva). Az analízist offline végeztük, Spike2 (Cambridge Electronics Design Ltd., Cambridge, Nagy-Britannia), Off-line Sorter (Plexon, Dallas, USA) és NeuroExplorer 5 (Nex Technologies, Littleton, USA) szoftverek segítségével. Az AP-ok detekciójához és azok stimulushoz rendeléséhez Spike 2-t, illetve Off-line Sorter-t használtunk. A kigyűjtött AP-ok alapján NeuroExplorerben, 10 ms-os bin (mintavételezési frekvencia) használatával peristimulus hisztogrammot (PSTH), illetve ráta hisztogramot generáltunk. Mindkét esetben a hisztogramok megalkotásának az alapját az AP-ok, adott binnek megfelelő időegységre vonatkoztatott, normalizált (ötszörös Gaussian szűrés) frekvenciája szolgáltatta. A PSTH-k esetében a program a fénystimulus utáni felvett időintervallumokat egymás alá rendezte, majd binenként vertikálisan átlagolta (minden stimulus utáni első binre egy átlag, majd minden stimulus utáni második binre egy átlag és így tovább), így egy egységes hisztogramot alkotott minden sejtre. A ráta hisztogramok esetében az adott sejt egymás utáni fényválaszait külön kezelte. A PSTH-k alapján megállapítottuk az RGC-k fényválasz csúcsainak pozícióját és ezek alapján a válaszok késéseit. Microsoft Excelben meghatároztuk a ráta hisztogramok alapján a próbák közötti variabilitást, végül az adatokat rendszereztük. További adatelemzésre és statisztikai analízisre az Origin 2018 (Originlab, Northampton, USA) programot használtunk.

5.4. Farmakológia

Bizonyos kísérletekben (Ca²⁺-képződés és MEA) farmakológiai kezelést alkalmaztunk a réskapcsolatok zárása és a GABAerg gátló bemenetek blokkolása céljából. Ezekkel a kísérletekkel vizsgáltuk, hogy a GABA mediálta gátlás vagy a GJ mediálta serkentés hogyan járul hozzá az RGC-k kódolási mechanizmusaihoz. A felvételek először kontroll körülmények között zajlottak (emlős Ringerben történő perfúzió), majd a GJ-k zárása végett 40 μ M meklofenaminsavat (Meclofenamic acid – MFA), illetve a GABAerg jelátvitel blokkolása végett 50 μ M pikrotoxint (PTX) tartalmazó Ringer oldatban 30 percig inkubáltuk a retinát. Az inkubációs idő lejárta után a felvételeket az adott drogot tartalmazó oldattal történő perfúzió közben rögzítettük. Ugyan a PTX nem specifikus GABA antagonist, hisz nagyobb

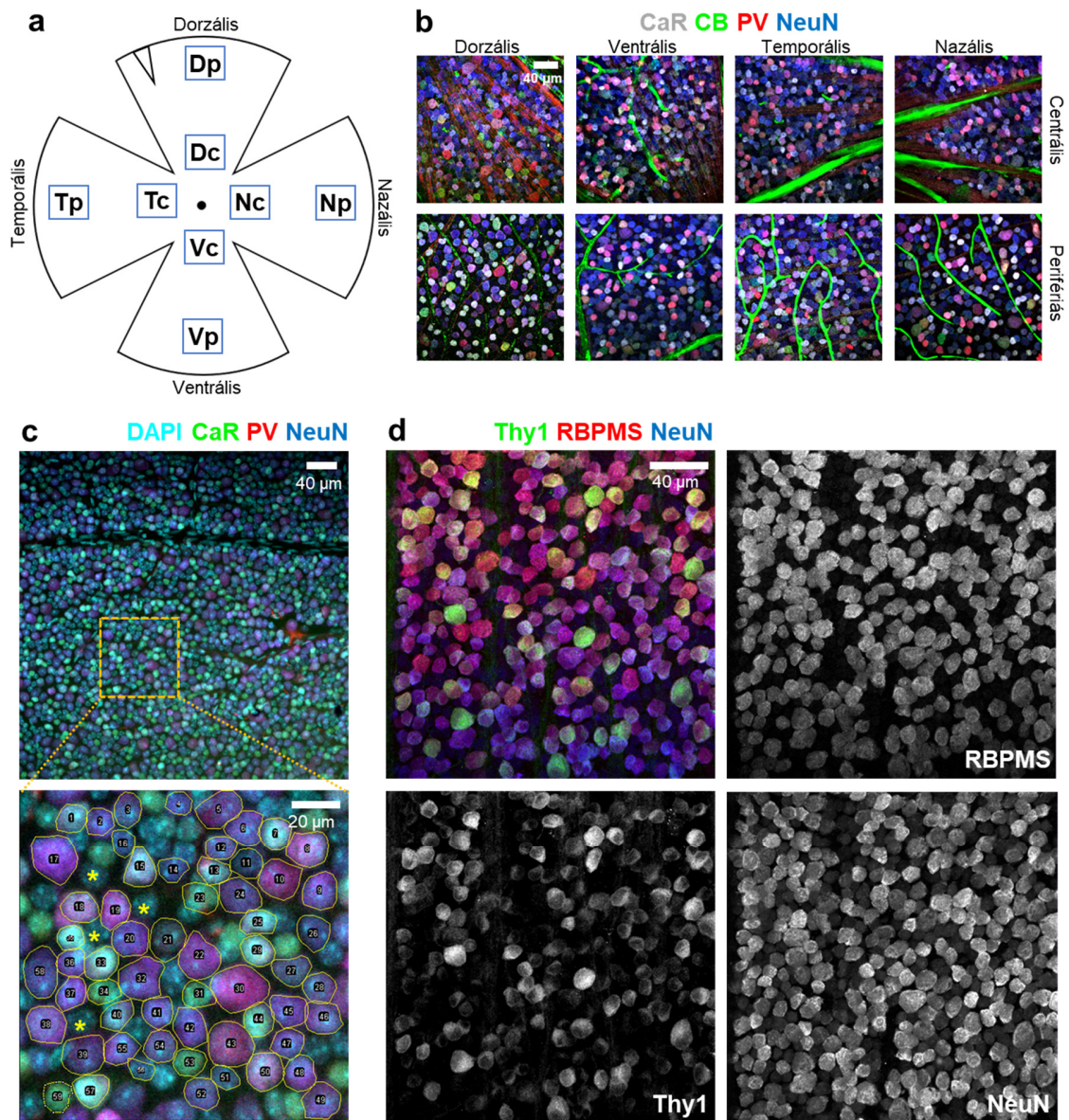
koncentrációban ($>100 \mu\text{M}$) a glicinnel is antagonizál (saját, korábbi tapasztalataink alapján), de az általunk használt alacsonyabb koncentrációban csak a GABAerg receptorokhoz köt.

5.5. Immunhisztokémia, Neurobiotin injekció és konfokális mikroszkópia

Bizonyos extracelluláris elvezetésekben mért sejteken, a morfológiai beazonosítás céljából (OFF-alfa karakterisztikával a fókuszbán), Neurobiotin jelölés és streptavidin festés kombinációját alkalmaztuk. A festék injekciót, a Patch Clamp vizsgálatoknál stimulációra használt elektródákkal (ICS-ben oldott, 0,5%-os A568-hidraziddal és 2% Neurobiotinnal töltve) hajtottuk végre a célsejtek membránjainak áttörése után. A Neurobiotin jelölés után a mintákat legalább 30 percig inkubáltuk, azután 4% PFA-ban fixáltuk 15-25 percig, majd PBS-el átmostuk, BTA-vel blokkoltuk (5% Bovine Serum Albumin, 0,5% Triton X-100, 0,05% Na-azid PBS-ben), végül BTA-ben oldott streptavidin-Cy3 vagy -Cy5-ban inkubáltuk egy éjszakán át. Az inkubáció után a retinát PBS-ben ismét átmostuk, majd egy tárgylemezen, Vectashielddel (Vector Laboratories) lefedtük a konfokális mikroszkópiához. A CaBP-k alapján történő, sejttypizálási vizsgálatoknál az izolált retinát a dorzális oldalon, az erek lefutásának jellegzetességei, azaz a *choroid* markerek segítségével megjelöltük (Wei et al., 2010) és ehhez viszonyítva meghatároztuk a szövet topográfiai régióit (5. ábra). A retinát 15 percig 4% PFA-ban fixáltuk, majd PBS-el átmostuk. BTA-vel, illetve bizonyos esetekben CTA-vel (5% Chemiblocker, 0,5% Triton-X100, 0,05% Na-azid PBS-ben) blokkoltuk a szövetet egy 24 medencés mikrobiológiai *plate* alján. A blokkolás időtartama legalább 2 óra, de ideális esetben 24 óra volt. A blokkolást követően az **1. táblázatban** bemutatott primer antitesteket használtuk, az antitestekben 24-72 órán át zajlott az inkubáció. 3x15 perc, PBS-ben történő mosást követően a másodlagos antitesteket is hozzáadtuk a szövethez (1. táblázat). A másodlagos antitestekben az inkubációs idő szigorúan 24 óra volt. Újabb 4x10-15 perc PBS-ben történő mosást követően egy tárgylemezen, a korábban ismertetett módon, Vectashielddel (Vector laboratories) a mintánkat GCL-el felfelé lefedtük. A mintáinkat egy Zeiss LSM710 konfokális mikroszkóppal szkenneltük, ami 20x ($Z = 1 \mu\text{m}$; Zeiss W Plan-Apochromat 20/1,0) és 63x objektívekkel ($Z = 0,5 \mu\text{m}$; Zeiss Plan Apochromat 63/1,4) volt felszerelve. A felvételeket magas felbontások és normalizált lézer intenzitás mellett végeztük. A fény és kontraszt esetleges minimális korrekcióját utólagosan az Adobe Photoshop CC (Adobe Systems Inc., San José, USA) és a FIJI (NIH, Bethesda, USA) szoftverekkel hajtottuk végre.

Elsődleges Antitestek				Másodlagos antitestek, festékek			
Név	Hígítás	Forrás	Kód	Név	Hígítás	Forrás	Kód
rb-Calretinin	1:2000	Invitrogen	180211	anti-rb-Alexa647	1:500	Invitrogen	A21245
ms-Calbindin	1:1000	SySy	214 011	anti-ms-Alexa488	1:1000	Invitrogen	A11017
ck-Parvalbumin	1:250	SySy	195 006	anti-ms-Cy3	1:500	Jackson	115-165003
rb-Parvalbumin	1:500	Thermo	PA1-933	anti-gp-DyLight405	1:500	Jackson	706-475-148
gp-NeuN/Fox 3	1:1000	SySy	266 004	anti-ck-Alexa568	1:500	AbCam	ab175477
rb-RBPMS	1:1000	Abcam	ab152101	anti-rb-DyLight405	1:500	Jackson	711-475-152
				DAPI	1:20,000	Sigma	D9542
				NeuroTrace 640/660	1:1000	Thermo	N21483

1. táblázat: Az immunhisztokémiai jelölések során használt antitestek.



5. ábra: A Ca^{2+} -kötő fehérjék (CaBP-k) expressziós szintjének mérése a retinában. **a.** A vizsgált retinális régiók sématis ábrája (V - ventrális, N - nazális, D - dorzális, T - temporális, c - centrális, p - perifériális). **b.** A vizsgált retinális régiók reprezentatív felvételei az összes alkalmazott marker bemutatásával. A DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) jól jelöli a sejtmagokat, azonban nem specifikus a neuronokra **(c)**. A NeuN (*neuronal nuclei antibody*) azonban szelektív a neuronokra, sőt a segítségével az RGC-k (fényesebb jelölés) és a *displaced AC*-k (gyengébb jelölés) is könnyen elkülöníthetők **(d)**. Ennek bizonyítására további RBPMS (*RNA-binding protein with multiple splicing*; RGC specifikus marker) jelölést alkalmaztunk Thy1-GCaMP3-as (THY miocita differenciációs antigén 1) egerek retináján. Ez alapján jól elkülöníthetők egymástól az RGC-k és GCL-ben található *displaced AC*-k. Egy központi 100 x 100 μm -es homogén területet választottunk ki minden 20x-os nagyításon felvett és egyesített szeletek esetében, hogy meghatározzuk a három CaBP expressziós szintjét. Minden NeuN+ sejtnek meghatároztuk a calretinin (CaR), parvalbumin (PV) és calbindin (CaB) expressziós szintjét (csak háromszoros és négyszeres jelölést alkalmaztunk a vizsgálatunk során). A sejteket a FIJI „vizsgálati terület” (*region of interest – ROI*) menedzsereszközével választottuk ki.

5.6. Fehérjeexpresszió mérése és sejtek csoportosítása

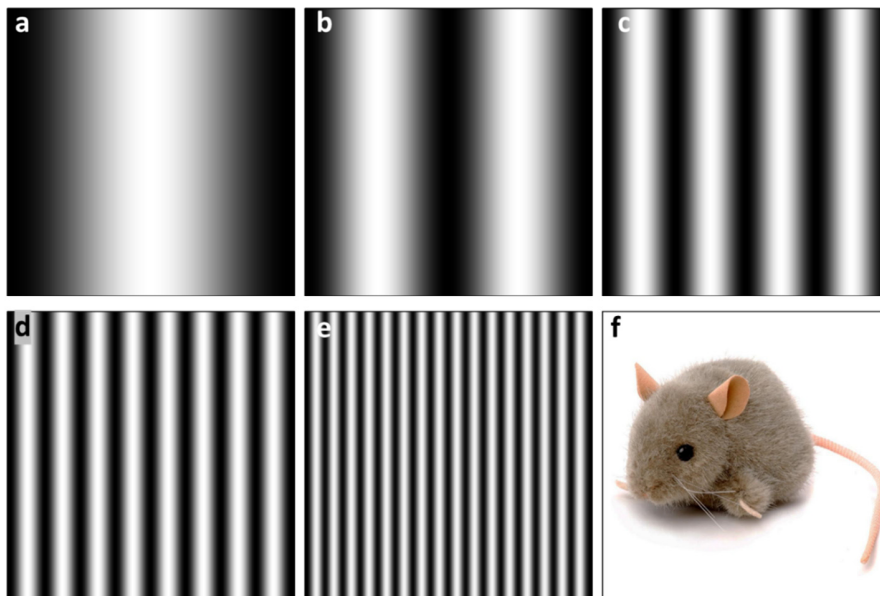
Minden mérés FIJI szoftverkörnyezetben történt (NIH, USA). A CaBP-k expressziós mintázatának meghatározásakor először egy 100x100 μm -es négyzetet vettünk fel, minden Z-stack-en az összes retinális régióra, majd a z-tengely mentén egyesítettük a képeket. A ROI-kat az összes RGC-re a NeuN (*neuronal nuclei* antitest) (1. táblázat; 5. ábra) jel alapján vettük fel, mely marker a neuronok sejtmagját jelöli és erősen szelektív az RGC-kre, de kevésbé a GCL-ben található *displaced* amakrin sejtekre. Ennek bizonyítására egy kettős festést alkalmaztunk egy RNS-kötő antitest (RBPMS, egy RGC szelektív marker) és NeuN használatával (Rodriguez et al., 2014; Lin et al., 2018). A sejtek CaBP jelöléseikhez tartozó átlagos szürke értékének intenzitását mértük. A szürke érték intenzitásokat egy relatív százalékos értékévé konvertálva normalizáltuk, így az expressziós szinteket egy 0-100%-os skálán kaptuk meg, mind a három fehérjére (CaB, CaR, PV). A relatív százalékos értékek alapján egy 10%-os felbontású eloszlási hisztogramon csoportosítottuk a sejteket, minden fehérje expressziója alapján. A z-tengely mentén történő egyesítés sajátossága miatt a sejtek vizsgált felülete, megegyezik a sejt optikai keresztmetszet szeletein felvett legnagyobb átmérővel, ezért egyszerűen csak területként hivatkozunk rá a későbbiekben. A sejtek precízebb csoportosítása érdekében klaszter analízist hajtottunk végre. A klaszter analízisekhez a Python SciKit-learning csomag (Pedregosa et al., 2011) Gaussian Mixture Model-jét használtuk, mely az elvárások maximalizálásának iterációs folyamatát használja. A normál eloszlás megállapítása után egy-utas Anova statisztikai analízist alkalmaztunk (Origin 2018, OriginLab, Northhampton, USA).

5.7. Neuromorf retina modell

A párhuzamos retinális útvonalak információ kódolásban betöltött szerepének vizsgálatára egy számítógépes neuromorf retina modellt alkalmaztunk. A modellt Los Alamos-ban dolgozó kollaborációs partnerünk, Dr. Garrett T. Kenyon és kollégái dolgozták ki, alkották meg és biztosították kutatócsoportunknak alapkutatási célokra. A jelenlegi modell két korábbi munkájuk kombinációjából született. Így 7 alapvető sejtípust tartalmaz: Csapokat (*Cone*), horizontális sejteket (HC) (Kenyon et al., 2003b), bipoláris sejteket (BC), nagy-, kicsi- és poliaxonális amakrin sejteket (LA, SA, PA) és dúcsejteket (RGC) (Kenyon et al., 2004). A modellben a csapok egy $n \times n$ -es mátrixban helyezkednek el ($n \times n = a$ beolvasott stimulus felbontása, pl.: 64×64 , tetszőlegesen változtatható) és a horizontális sejtek, valamint a dúcsejtek velük kapcsolatot

létesítve egy $n/2 \times n/2$ -es mátrixba rendeződnek. Minden csap gerjesztő szinapszissal ($V_{eq} = -10$ mV) látja el HC-ket és minden HC gátló visszacsatolást ad az összes csapnak a dendritikus mezején. Ezek a gátló szinapszisok a GABAerg mediációnak felelnek meg. A csapok serkentő szinapszisokkal továbbítják az információt a bipoláris sejteknek, melyek excitatorikus posztszinaptikus potenciálokkal (EPSPk) látják el a RGC-ket és az AC-ket. Az EPSPket, a különböző AC-któl jövő inhibíciós posztszinaptikus potenciálok (IPSPk) egyensúlyozzák ki. A modellben megtalálható három AC típus (SA, LA, PA) közül, csak a poliaxonális amakrin sejtek generálnak AP-okat. Mind a három AC típus egyirányú (*feedforward*) szinapszisokat létesít az RGC-vel, visszacsatoló (*feedback*) szinapszist a BC-vel. Továbbá az AC-k egymás között is létesítenek egyenragú szinaptikus kapcsolatokat, melyek a modellben a GJ-öket hivatottak képviselni. A modell paramétereinek további részletei Kenyon és mtsai. 2003-as, illetve 2004-es munkáiban olvashatók (Kenyon et al., 2003a; b; 2004). Kutatásainkban ezt a modellt hipotéziseink tesztelésére és a fiziológiai kísérleteink megerősítésére/kiegészítésére használjuk. A modellel tetszőleges stimulus olvastatható be, tetszőleges ideig. A stimulus alapján a modell szimulálja a sejtek membránpotenciál változásait és végeredményként egy elektrofiziológiai kísérlethez hasonlóan ezeket a változásokat, illetve a hozzájuk rendelt, kigyűjtött AP-okat és ezek idejét kapjuk meg. Ezek alapján egy GNU Octave-ban programozott analízis szkript segítségével az eredeti stimulus rekonstruálható az adott sejttípus szintjén, az AP frekvenciákból, így láthatjuk, hogy milyen mértékű az információ veszteség, illetve tömörülés a retinális útvonalak során. Továbbá ezen rekonstruált stimuluson a szkript vizualizálja az adott időpillanatban (képkockán) aktív sejteket is, legalábbis a dúcsejtek vonatkozásában, ahol tényleges információhordozó AP-ról beszélhetünk. A rekonstruált képi anyagon a modell sajátosságai végett egy pixel felel meg egy sejtnak. Ezentúl a szkripttel megrajzoltathatjuk a sejtek membránpotenciál változásainak görbéit is. A modellt kollaborátoraink C++ környezetben programozták és Linux vagy Mac operációs rendszer alatt fut, a Petavison, nyílt forráskódú, objektumorientált neurális szimulációs eszköztárban (webhely 1). Mi a modellt Linux operációs rendszer alatt futtattuk. A modellel számos stimulust olvastunk be, annak vizsgálata érdekében, hogy a GABA mediálta és a réskapcsolatok rendszere hogyan befolyásolja a retinális dúcsejtek párhuzamos információkódolásban betöltött szerepét. Ennek érdekében alkalmaztunk szimpla ON/OFF stimulust (váltakozó fehér és fekete háttér), különböző frekvenciájú (1-, 2-, 4-, 8- és 16 ciklus/retina) szinuszoid stimulusokat (ahol jól észlelhetők az éles kontrasztok közti

finom átmenetek, így könnyebben vizsgálható ezen kapcsolati elemek kontraszt jelenségek detekciójában betöltött funkciója) és egy komplexebb naturális stimulust (6. ábra). A stimulusok minden esetben 64 x 64 -es felbontásúak voltak, kivéve a természetes stimulusnál ahol a felbontás 800 x 800 volt. Ez a szimulációban ezzel megegyező számú sejtet (4096, illetve 640 000) jelentett a fotoreceptorok szintjén, illetve negyed ennyi (1024, illetve 160 000) sejtet a többi sejtípus szintjén, a modell kapcsolatrendszerének köszönhetően. Az ON/OFF stimulusal zajló kísérleteknél a sejtek átlagos késéseit (első akciós potenciál késése) és az ezek közötti varianciát gyűjtöttük ki. A kontrol szimulációkat olyanokkal vetettük össze, ahol a modellben kikapcsoltuk a GABAerg gátlást, illetve egy másik esetben a GJ-öket. Ezzel a fiziológiai méréseink során alkalmazott farmakológiai kezelést igyekeztünk imitálni. Mind a szinuszoid és mind a természetes stimulusok esetében megismételtük ugyanezt a procedúrát, de ebben az esetben a GCL szintjén rekonstruált stimulusban történt változásokat követtük nyomon. Ezzel látható bizonyítékot szolgáltatunk a két mikrohálózat, képi kódolásban betöltött szerepére. Az adatok kigyűjtése és kiértékelése a kollaboránsunk által írt, korábban említett GNU Octave szkripttel, illetve Matlab, FIJI (NIH, USA) és Microsoft Excel programokkal történt. További adat- és statisztikai analízisre Origin 2018 (Originlab, Northampton, USA) programot használtunk.



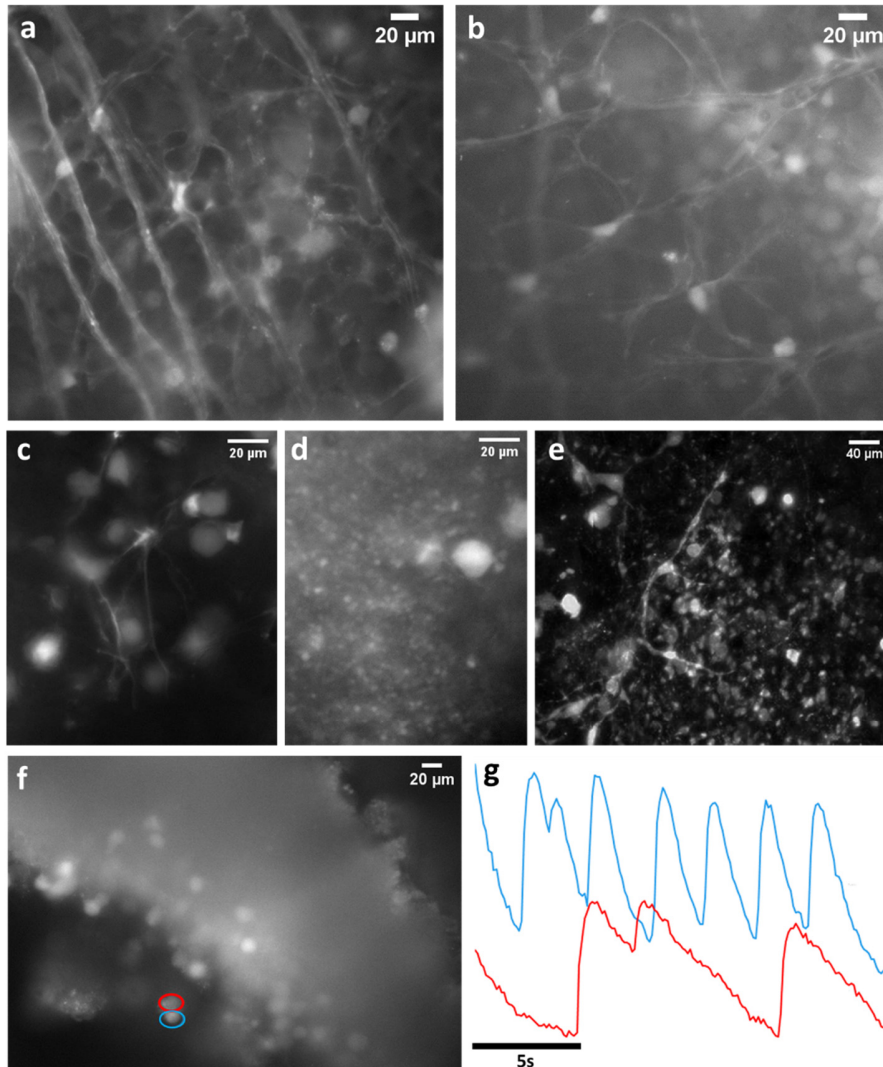
6. ábra: A retina modellnél alkalmazott stimulusok: a-e, szinuszoid stimulusok a GABAerg és a GJ rendszer kontrasztjelenségek modulációjában betöltött szerepének letisztultabb vizsgálatára. Itt különböző frekvenciákat alkalmaztunk: 1, 2, 4, 8 és 16 ciklus/retina (a, b, c, d és e, ennek megfelelően). **f,** Természetes stimulus a komplexebb kódolási és modulációs funkciók feltárására.

6. Eredmények

6.1. Ca²⁺-képalkotási vizsgálatok (indikátorok vs. GMO törzsek használata)

A Ca²⁺-képalkotási technika egy hatékony neurobiológiai módszer, mely lehetővé teszi a retina nagyobb területén nagyszámú RGC egyidejű vizsgálatát, így a sejtek egyéni sajátosságai később jól összevethetők populációs aktivitásukkal. A módszerrel az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció szintjének azon változásait követjük nyomon, amelyek megfelelnek a neuronok aktivitásának az *in vitro* egér retinában. A kalcium képalkotási vizsgálatokban kétféle indikátor típus ismert: a kémiai indikátorok és a genetikailag kódolt Ca²⁺ indikátorok (GECI). A kémiai Ca²⁺ indikátorok az élő neuronokba juttatást követően fotonokat bocsátanak ki, amikor az intracelluláris környezetben szabad Ca²⁺-t kötnek. Laborunkban már csatlakozásomat megelőzően is folytak sikeres kísérletek ezekkel az indikátorokkal (kiváltképp: Fluo-4, Calcium-Crimson, Fura-2), így munkám első fázisában én is ezt a módszertant használtam fel vizsgálataimhoz. Kezdetben a mintáinkon a Fluo-4 Ca²⁺ indikátort alkalmaztunk, és az egyes dúcsejtek szómáinak fluoreszcencia változásait, aktivitását, követtük nyomon. Az akkori kísérletes felállásban a próbálkozásaink határfoka viszonylag alacsony volt éppen ezért az én első feladatomban az lett, hogy a technikát úgy fejlesszem tovább, hogy az egy megbízható eszközként szerepelhessen jövőbeni vizsgálataink során. Az egyik legnagyobb nehézség ezekkel a mérésekkel, hogy a legtöbb indikátor (Fluo-4, Calcium-Crimson, Fura-2) bejuttatása az élő sejtbe meglehetősen komplikált feladat. Gyakran előfordul, hogy a szövet nem éli túl az indikátorok inkubációs idejét, vagy bizonyos technikáknál (*bath loading*) nem jut be kellő mennyiségű indikátor a vizsgálni kívánt sejtekbe. Ez annak köszönhető, hogy a legtöbb indikátor vízoldékony, így nem megfelelő lipofil tulajdonsággal rendelkezik a sejtfalon át történő diffúzióhoz (*loading*). Az ebből fakadó problémát úgy lehet megoldani, hogy az indikátor acetoxymetil (AM) észterrel ellátott változatait alkalmazzák, mely változatoknak ugyan jobbak a lipofil tulajdonságai (köszönhetően az észter csoportnak), de csökkenti azok vízoldhatóságát. Az így lecsökkent vízoldékonyosság miatt a kísérletező olyan köztes oldószerek alkalmazására kényszerül, mint a DMSO-s kezelés. A DMSO mellett, hogy jól oldja az észterezett sókat, még némiképp a sejtfal permeabilitását is növeli. A DMSO előnye egyben a hátránya is, a megnövekedett membrán-permeabilitás ugyanis elősegíti az indikátor intracelluláris térbe jutását, de sok esetben sejtek pusztulásához is vezet.

Ugyancsak alkalmazhatók az indikátorok nem észterezett sói bejuttatására olyan módszerek is mint, az elektroporáció.



7. ábra: A kémiai Ca^{2+} indikátorokkal végzett vizsgálatok. **a, b,** A Fluo-4, AM (acetoxymetil-észter) kémiai Ca^{2+} indikátorral készített felvételek. A felvételeken jól látszik, hogy az indikátor jelölte az RGC-
ket, habár csak szórványosan (nem az összes sejt vette fel az indikátort). Ezen túl jól kivehetőek az RGC-k
mellett jelölt asztrociták is (**b**). **c, d,** Az Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) indikátorral készített
felvételek. Itt is szintén jól jelölődtek az RGC-k (**c**), de ezen túlmenően, más sejtek is felvették az
indikátort (fotoreceptorok, bipoláris sejtek, amakrin sejtek (**d**)). **e,** Az OGB-1-el jelölt minta, konfokális
mikroszkópos felvétele. Az OGB-1 indikátor nagy előnye, hogy a paraformaldehiddel (PFA) történő
fixálás után is benn marad a sejtekben, szemben a Fluo-4 AM indikátorral, így alkalmas a minták
konfokális mikroszkópos vizsgálatára, és a vizsgált sejtípusok későbbi, pontos beazonosítására. **f, g,** Az
OGB-1 jelölt sejtek Ca^{2+} -képző felvétele, és a jelölt RGC-k (piros és kék ROI) Ca^{2+} kinetikái,
retinális hosszszetszeti szeleten. A fentebb említett metodikai sajátosságoknak köszönhetően, a más
rétegben jelölt nem RGC sejtek túl nagy háttérzajt biztosítottak mintáinkon, így nem tudtuk az RGC-k
 Ca^{2+} kinetikáit vizsgálni a laborunkban bevett módon (teljes retina preparátum), de hosszszetszeti
szeleteken sikeresen rögzítettünk RGC Ca^{2+} eseményeket (**g**).

Az elektroporációval hasonló a helyzet, sikeressége véletlenszerű, sokszor a vizsgálni kívánt sejtek pusztulásához vezetett. Szintén problematikus a kémiai Ca^{2+} indikátorok esetében az, hogy a kísérlet után néhány órával és/vagy a szövet fixálása miatt teljesen eltűnnek a sejtekből. Ezért a Ca^{2+} -képalkotó vizsgálatokat korábban csak a neuronok fiziológiájának tanulmányozására alkalmazták, de a vizsgált idegsejtek morfológiai azonosítása tekintetében nem volt alkalmazható.

Számos kísérletet végeztünk a Fluo-4-ral. Mint a képen (7a, b ábra) látható, jól jelölte a RGC-
ket, és lehetővé tette számunkra, hogy kövessük a jelölt sejtek aktivitását. A dúcsejtek mellett a retina asztrocitáit is jelölte az indikátor. Ezzel az indikátorral sok dúcsejt spontán aktivitását voltunk képesek egyidejűleg vizsgálni, tehát nagyon hasznosnak bizonyult a funkcionális mérések során. Sőt ez az indikátor is bejuttatható a sejtekbe elektroporációval, amely talán a legkevesebb károsodást okoz a szövetben. Amikor azonban a mintát a képalkotó kísérlet után fixáltuk és konfokális mikroszkópos vizsgálat céljából feldolgoztuk, soha nem tudtuk visszanyerni a jelölt sejteket, mivel ezek az indikátorok PFA-val nem fixálhatók. A legtöbb kémiai indikátorral hasonló eredményeket kaptunk, függetlenül a töltési módszertől. Az OGB-1, a Fluo-4-hoz hasonlóan részletes jelölést biztosít a retinán. Ezekben az esetekben a festéket elektroporációval töltöttük be az egér retina neuronjaiba. Az Oregon Green szintén alkalmazható volt az RGC-k aktivitásának követésére (7f, g ábra). Ezenkívül az Oregon Green festés, több napig fennmaradt a sejtekben, még konfokális mikroszkópiára való előkészítés (PFA fixálás) után is. A képen (7e ábra) a GCL látható, amelyet a képalkotás során megfigyeltünk. Ezenkívül az Oregon Green jelölést észleltük a belső magvas rétegben és a fotoreceptorokban is. Minden előnyük ellenére azonban a kémiai indikátorral történő jelölések nem bizonyultak teljesen megbízhatónak. Az indikátor bejuttatása függetlenül a procedúrától (*bath loading* vagy elektroporáció) minden esetben számottevő stresszfaktornak bizonyult, amely a szövet túlélését limitálta. Mindkét módszer alkalmazása után kellett hagyni egy bizonyos időt (min. 30 perc) a retinának a regenerációra, illetve a sejten belüli indikátor diffúzióra. További problémát jelentett a módszer aspecifitása. Ugyanis ezen metodikák esetében nincs garancia, hogy a bejuttatott indikátor csak a számunkra érdekes sejteket (itt RGC) jelöli. Bár az elektroporációnál az alkalmazott pulzusok paramétereinek (pulzusszám, feszültség, polaritás) finomhangolásával ez a bizonytalanság némiképp ellensúlyozható, de teljes mértékig nem kiküszöbölhető, hiszen az indikátor áthalad más rétegeken és sejttípusokon is, mialatt eléri a célsejtjeinket, így azokat is

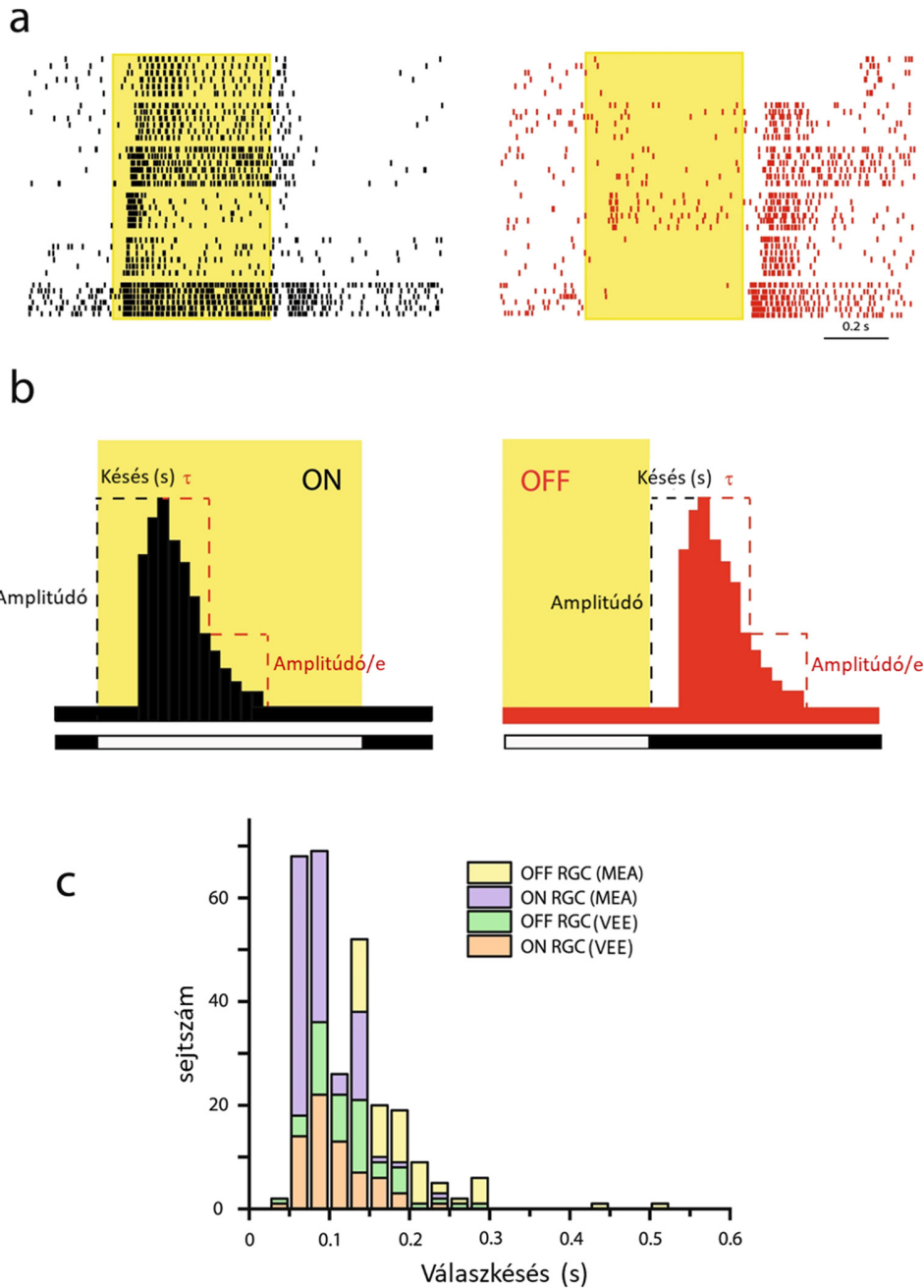
jelöli. Megfigyeltük például, hogy szinte minden esetben, amikor RGC-eket jelöltünk Oregon Green elektroporációval, megjelentek a mintáinkon jelölt AII-es amakrin sejtek is.

A felsorolt hiányosságok és a technika nehézsége miatt döntöttünk végül a GMO egértörzsek alkalmazása mellett. Két egértörzset teszteltünk, ezek a Thy1-GCaMP3 és a PV-GCaMP6f voltak. Ezen egértörzsek sajátja, hogy bizonyos sejteik a genetikai módosítás révén önmaguk termelik meg a használni kívánt, fehérje alapú Ca^{2+} indikátort, így kikerülhet velük a szövet sérülésével járó töltési procedúra. A Thy1-GCaMP3-as egértörzs minden dúcsejtjében kifejeződik a GCaMP3-as indikátor. Ez egy lassabb kinetikájú (átlag 100-300 ms felfutási idő) Ca^{2+} indikátor (Tian et al., 2009). Ezzel szemben a GCaMP6f jóval gyorsabb, már 60 ms felfutási idővel rendelkező Ca^{2+} -események detekcióját is lehetővé teszi (Chen et al., 2013). Ennek hátránya viszont, hogy a laborunkban elérhető törzsben csak a sejtek egy alpopulációjában, a parvalbumin Ca^{2+} -kötő fehérjét termelő sejtekben expresszálódik a GCaMP6f indikátor. Ugyanakkor ez a tény előnyként is szolgálhat olyan kísérleti körülmények között, amikor kifejezetten a parvalbumin tartalmú dúcsejtek aktivitását kívánjuk szelektíven vizsgálni. A két GMO egértörzs esetén az indikátorok a kémiai indikátorokhoz hasonló, sőt azoknál jobb idő- és térbeli felbontású felvételeket tettek lehetővé. Ezen túlmenően kísérleteink ezekkel az állatokkal megbízhatókká, jól standardizálhatókká váltak. A fentiek alapján végül úgy ítéltük meg, hogy a jelen dolgozat kísérleteiben elsősorban a Thy1-GCaMP3 egértörzset használjuk. Ez az egértörzs ugyanis minden RGC-ben stabilan fejezi ki az indikátorfehérjét, továbbá az egértörzs sokkal stabilabban fenntartható, mint a PV-GCaMP6f és az indikátor expressziója is markánsabb, stabilabb és fixálható.

6.2. Az RGC-k heterogenitása fényválasz késéseik alapján

6.2.1. A dűcsejt fényválaszok időkéseinek sokfélesége

Korábbi munkákból ismert, hogy a különböző altípusba sorolt RGC-k fényválaszainak időkése, azaz az agy felé induló információ időkése nagy különbségeket mutathat (Farrow és Masland, 2011; Li et al., 2015). Ugyanakkor arról, hogy milyen mechanizmusok állnak ennek hátterében, igen keveset tudunk. Ezzel kapcsolatosan három feltevésünk volt: 1. az időkések meghatározásában a preszinaptikus retinális hálózat elemeinek és azok kapcsolatrendszerének döntő szerep jut, 2. az RGC időkések hossza a fénystimulus egyes paramétereitől is függ és 3. az időkések RGC típus-specifikusak. A dolgozatomban bemutatott kísérletek nagy részét úgy terveztem meg, hogy ezeket a feltevéseket bizonyítsam (vagy cáfoljam). Ennek a kérdéskörnek a vizsgálata érdekében akciós potenciál (AP) sorozatokat vezettünk el egér retina RGC-jeiről, fotopikus ($I = 977 \text{ Rh}^*/\text{pálcika/s}$) fénystimulust (hossz = 0,5s; ciklus hossz = 2s; ismétlésszám = 6-7) követően. A vizsgálatainkhoz extracelluláris wolfram elektródás elvezetést és egy multielektrodás rendszert (MEA, 64-, illetve 128 csatorna, 100 μm elektróda távolság) használtunk (8a ábra). A két különböző technika használatával vizsgálatainkban a módszer(ek)ből adódó hibák csökkentése volt a célunk. Az RGC-k időbeli aspektusainak vizsgálatához a stimulus által kiváltott AP sorozataik alapján létrehozott, úgynevezett *peristimulus-time-histogram*-ot (PSTH) vettük alapul. Ezek felfutási ideje (a stimulus bekapcsolása és a maximális AP frekvencia – PSTH csúcs – között eltelt idő) alapján határoztuk meg a fényválaszok késését (8b ábra). A kapott válaszkéseket eloszlási hisztogramokon ábrázoltuk, annak reményében, hogy élesen elváló csoportokat azonosíthatunk, mely valamilyen szintű sejttípus specifikásra utal. Mivel a retinában az ON és OFF információk elszeparált információs csatornákon mozognak, ezért az ON és OFF komponenseket minden esetben külön kezeltük, még az ON-OFF sejtek esetében is (8. ábra).



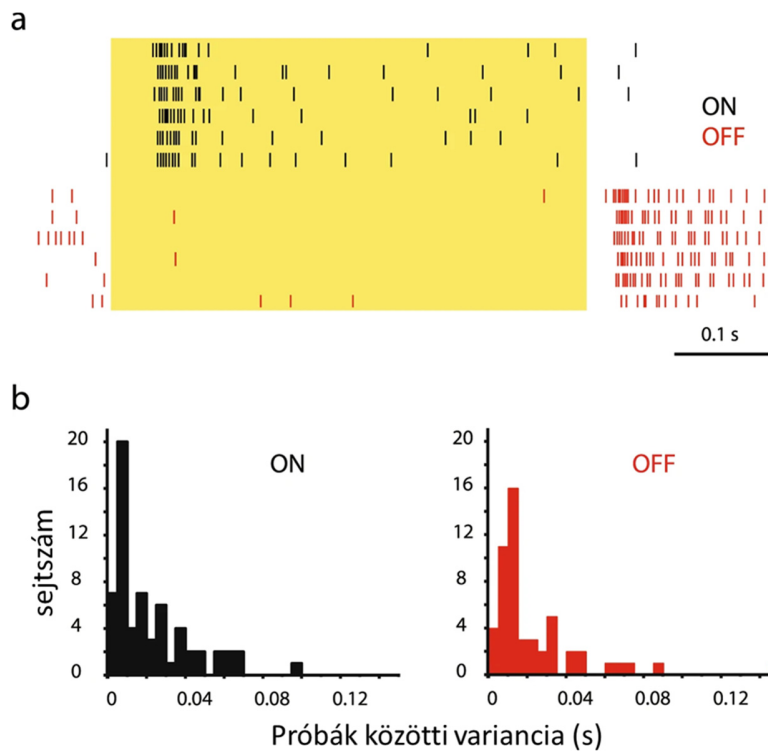
8. ábra: Az RGC válaszkésések eloszlása egy széles tartományt fed le. a, Az ábrapaneleken 6-6 ON- és OFF dúcsejt peristimulus raszter diagramjai láthatók a válaszkéséseik alapján csökkenő sorrendben összerendezve. (a sárga területek az ábrákon a teljes mezejű fénystimulus be- és kikapcsolását mutatják). **b,** A séma magyarázza a PSTH amplitúdó, a késés és a τ (a tranziencia) értékeinek meghatározásának menetét (bár ez utóbbi végül nem képezte részét vizsgálatainknak; ON és OFF a bal- és jobb oldalon). A válaszkéséseket a fény be- (ON-sejtek) vagy kikapcsolásától (OFF-sejtek) a PSTH-k csúcsáig (legmagasabb AP frekvencia) eltelt időben határoztuk meg. A τ érték azt az időt jelzi, ami ahhoz szükséges, hogy a válasz a csúcsától elérje maximum amplitúdója 1/e-ed részét. **c.** A hisztogram a PSTH csúcsok késéseinek eloszlását mutatja, a Wolfram elektródos ($n=67$ ON és $n=54$ OFF sejt), vagy a MEA felvételek ($n=107$ ON és 52 OFF) esetében. Az átlag késések tartománya 50-280 ms volt.

Eredményeink alapján az RGC-k teljes populációja (ON és OFF együtt) igen heterogénnek bizonyult válaszkéséseik alapján. A késések – néhány kivételtől eltekintve – egy viszonylag széles (45-300 ms) időintervallumon belül helyezkedtek el (8c ábra). A különböző kísérleti metodikák között volt némi különbség átlag válaszkéséseik tekintetében (wolfram elektródás felvételek - ON: átlag = 102,46 ms, SD = 39,17 ms, n = 67; OFF: átlag = 124,44 ms, SD = 49 ms; n = 54; MEA felvételek - ON: Átlag = 83,9 ms, SD = 28,77 ms, n = 107; OFF: átlag = 197,16 ms; SD = 71 ms; n = 52), de a válaszkésések mindkét esetben hasonlóan széles időskálán helyezkedtek el. Ez a kísérletsor igazolta azt, hogy a válaszkésések eloszlása és variabilitása nem függ a metodikától és a sejttest-elektroda közötti távolságtól, hiszen az egyik esetben (wolfram elektródás extracelluláris mérések) az elektróda közvetlen a sejttest közelében helyezkedett el, míg a másik esetben (MEA) nem, az eredmények mégis jól összevethetők egymással.

6.2.2. Az időkésések variabilitásának alapja a vizsgált sejtek sokfélesége

Mivel az előzőekben nem sikerült az RGC válaszkésések tekintetében csoportokat elkülöníteni, ezért továbbra is eldöntendő kérdés, hogy a fent leírt heterogenitásnak mi az alapja: 1. a sejtek közötti specifikus válaszkinetikákból adódó különbség (ez megerősítené feltevésünket, hogy a válaszok késése sejt típus specifikus) vagy 2. a sejtek egyéni válaszaik között mutatkozó variancia (ismétlődő stimulus esetén egyazon sejt különböző időkésésekkel válaszol - próbák közötti variabilitás/variancia). Ennek vizsgálatára a fenti populációból véletlenszerűen kiválasztottunk RGC-ket (n = 94) és megállapítottunk minden sejt próbák közti variabilitását.

A próbák közötti variabilitás is viszonylag heterogénnek bizonyult a vizsgált RGC-k esetén (9. ábra). Azonban a sejtek eloszlási hisztogramjai alapján látható, hogy csak a sejtek igen kis hányada mutatott akkora próbák közötti variabilitást (>90 ms), ami megfelelne a fentebb megállapított széles válaszkésési tartománynak (9b ábra). A sejtek többsége mind ON és mind OFF válaszok esetében csak igen kicsi varianciával válaszolt a fénystimulus ismétlésére (ON: átlag = 21,7 +/- 20,1 ms (SD), n = 63; OFF: átlag = 23,8 +/- 25,9 ms (SD), n = 53). Emellett az ON és OFF komponensek tekintetében a próbák közötti variabilitás nem különbözött szignifikánsan (p = 0,54; Mann-Whitney teszt). Ezek alapján arra következtettünk, hogy az egész populációra vonatkoztatott PSTH késések alapján megállapított széles válaszkésési intervallum, nem a sejtek egyéni válaszaiban mutatkozó variabilitásnak tudható be.

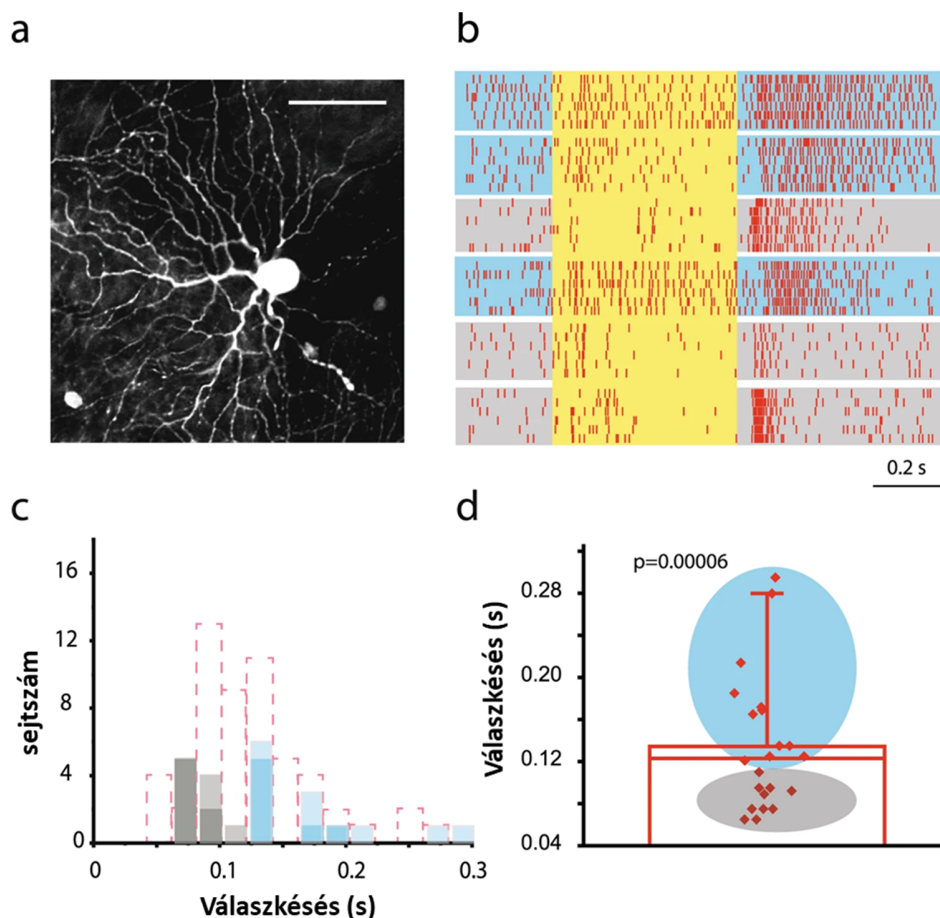


9. ábra: A független RGC-k nem mutatnak szignifikáns próbák közötti varianciát a válaszkésések tekintetében. **a**, A peristimulus raszterek hat egymást követő fényválaszt mutatnak egy ON (fenn) és egy OFF (lenn) RGC esetében. A független válaszok láthatóan mutatnak némi próbák közötti varianciát a válaszkésések tekintetében. **b**, A hisztogram a próbák közötti variabilitások eloszlását mutatja (6 próba=fénystimulus megegyező stimulus paraméterekkel) az ON- (balra; n=67) és OFF- (jobbra; n=54) sejtek tekintetében. A próbák közötti variabilitás átlagosan 40 ms alatti volt, mind az ON- és mind az OFF-sejtekre.

6.2.3. Az időkések sejt típus specifikása

Az előzőekben tapasztalt válaszkésések sejtek közötti nagy varianciája, és a relatív kicsi próbák közötti variancia arra enged következtetni, hogy a válaszok késése sejt típus függő.

Ennek közvetlen bizonyítására, Neurobiotinnal jelölt, OFF-Alfa RGC-kból történt elvezetésekot válogattunk ki, mely sejtek igen könnyen elkülöníthetők morfológiai sajátoságaik alapján (nagy, kerek, vagy kissé megnyújtott sejttest és széli pozíciójú sejt mag; dendritek sajátos elágazási mintázata; arborizáció a szublamina-a-ban, viszonylag nagy, kb 185 μm -es dendrit átmérő; karakterisztikus *tracer* kapcsolódási mintázat; Völgyi et al., 2005; 2009; 2013b, Pan et al., 2010; 10a ábra).



10. ábra: Az RGC válaszkésések sejttípus specifitása. **a,** A kép egy Neurobiotin jelölt RGC-t mutat, tipikus OFF-alfa morfológiával. Aránymérték: 50 μ m. **b,** A raszter 6 tiszta OFF-alfa morfológiájú RGC fotopikus fényválaszait mutatja; minden sejt esetében 6 egymást követő válasz (egymás alatt) látható. Az OFF-alfa RGC-k válaszkinetikái a mi esetünkben egyértelműen tovább oszthatók „fürge-tranziens” (*brisk-transient*; szürke háttérrel jelölve) és „lomha-fenntartott” (*sluggish-sustained*; kék háttérrel jelölve) alpopulációkra, támogatva korábbi munkák eredményeit. **c,** A válasz késéseken alapuló PSTH-k „fürge” (szürke) és „lomha” (kék), nem-átfedő populációkra oszlottak (összehasonlításként az összes wolfram elektródával rögzített OFF-RGC késés, piros szaggatott vonalas jelöléssel szerepel a háttérben). A wolfram elektródával rögzített OFF-alfa RGC-k adatai kiemelték, míg a sejthez rögzített üvegelektrodás (*cell-attached*) felvételek adatai halványabb színárnyalattal jelöltek. Ez a hisztogram mutatja, hogy egy önálló RGC altípus (mind a „fürge-tranziens” vagy a „lomha-fenntartott” OFF-RGC-k) csak egy szűk késési tartományt foglal el. **d,** Amikor az átlag OFF-alfa RGC-k válaszkésése meghatározásra került, minden „fürge-tranziens” sejt átlag alatti (szürke) késést mutatott, míg a „lomha-fenntartott” sejtek (világoskék) késései átlag felettiak voltak (az átlag alatti második vízszintes piros vonal az adatok medián értékét jelzi). A statisztikai analízis szignifikáns különbséget mutatott ($p=0,00006$; Mann-Whitney teszt) a „lomha” és a „fürge” OFF-alfa sejtek válaszaik késése között.

Az OFF-alfa RGC-k válaszkinetikáik alapján két alpopulációra oszthatók, egy részük „fürge-tranziens” (*brisk-transient*) mások „lomha-fenntartott” (*sluggish-sustained*) fényválasszal jellemezhetőek (Pang et al., 2003; Murphy és Rieke, 2006; van Wyk et al., 2009; Baden et

al.,2016; Krieger et al., 2017). Arra voltunk kíváncsiak, hogy a mi általunk vizsgált OFF-alfa sejtek fényválasz késései szintén két alpopulációra különíthetők-e el? A tisztán OFF-alfa morfológiával bíró sejteken végeztünk célzott wolfram elektródás extracelluláris (n=14) és üvegelektrodás (R=6 M Ω ; *cell-attached* konfiguráció; n=9) elvezetések. A sejteket a méréseket követően Neurobiotint tartalmazó másodlagos elektródák segítségével töltöttük fel.

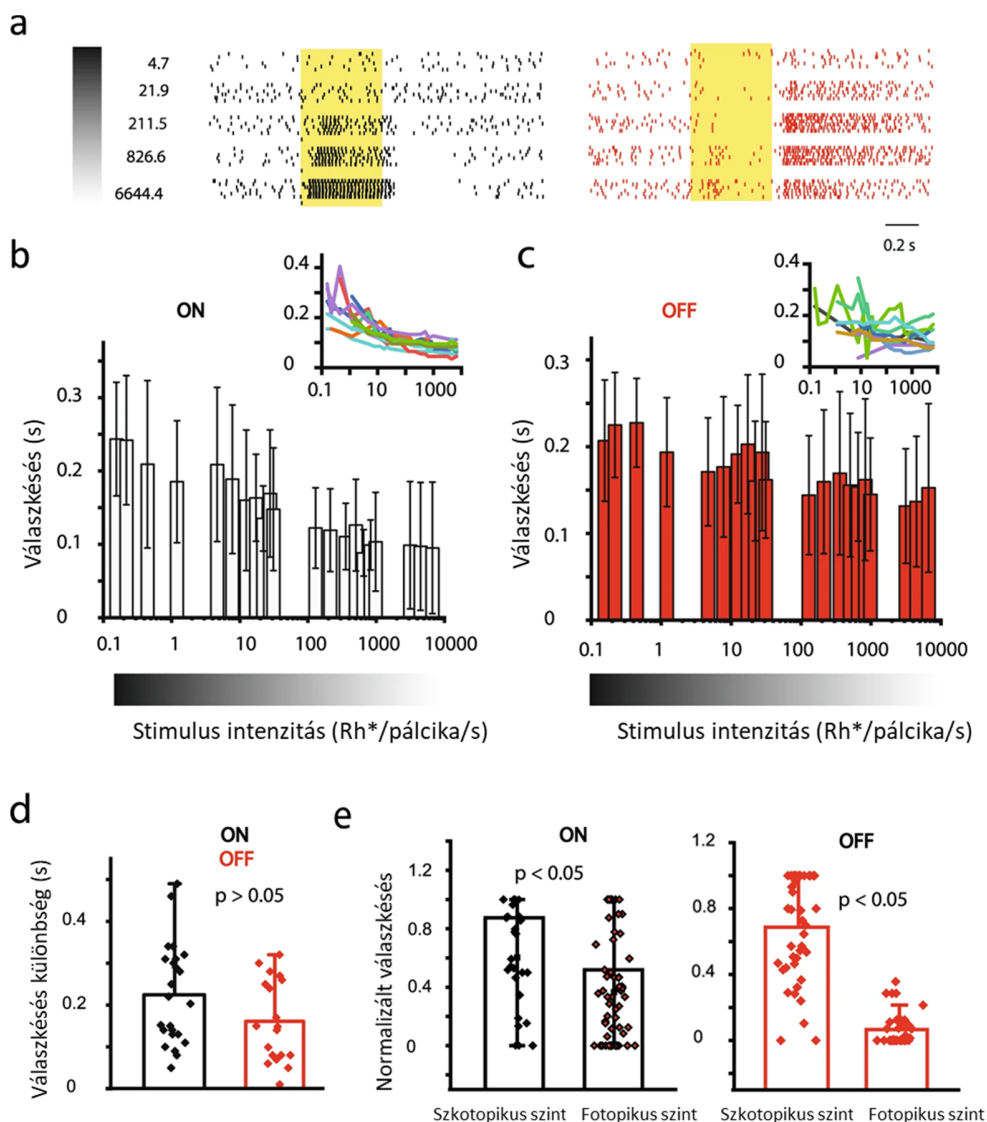
Az így vizsgált sejtjeink már AP sorozataik alapján is jól elkülönültek lassabb (*sluggish-sustained*) és gyorsabb (*brisk-transient*) alpopulációkra (10b ábra). A két metodikával nyert adatokat egy eloszlási hisztogramon ábrázoltuk, ahol két kísérletes megközelítés eredményeit összevetettük az előző vizsgálatokból származó összes OFF RGC (nem csak alfa) válaszkéséseivel és azok eloszlásával is (10c ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a két azonosított fiziológiai alpopuláció („füрге” és „lomha”) szignifikánsan is elkülönül egymástól (10c, d ábrák; „füрге-tranziens”: n=10, átlag késés = 87 ms +/-1,8 SD; „lomha-sustained”: n = 13, átlag késés = 177 ms +/-5,8 SD; Mann-Whitney teszt, p = 0,00006). Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltevésünket, hogy a megfigyelt válaszkésések sejtípus specifikusak a két OFF-alfa RGC populáció estében, valószínűsítve annak lehetőségét, hogy az összes RGC válaszkésés altípus specifikus. Ezen túlmenően a fenti vizsgálatok azt a feltevésünket is megerősítik, hogy a válaszkésések értékei nem függenek jelentősen a mérési technikától (a wolfram elektródás és üvegelektrodás mérések ugyanazt az eredményt produkálták).

6.2.4. A válaszkésések stimulus függősége

Arra már korábbi tanulmányok is rávilágítottak, hogy a fényválaszok időbeli késése szerepet játszik a retinális információ kódolásában (Gollisch és Meister, 2008; Gollisch, 2009; Gütig et al., 2013; Portelli et al., 2016) valamint, hogy ezeket a fényválaszokban mutatkozó késéseket erősen befolyásolják a stimulus bizonyos tér- és időbeli paraméterei (stimulus mérete, növekedése, csökkenése, objektum mozgása stb.; Mani és Schwartz, 2017). Az a kérdés azonban még napjainkig megválaszolatlan, hogy a fénystimulusok alapvetőbb paraméterei, melyek nem hordoznak magukban tér- és időbeli változásokat, így pl. a stimulus intenzitása, vagy hullámhossza, milyen hatással vannak a fényválaszok késésére, valamint ezek a késések milyen szerepet játszanak az előbb említett vizuális jellemzők kódolásában? Ez utóbbi kérdésekre kerestünk választ munkáink során. Ennek érdekében két kísérletsort hajtottunk végre. Az egyikben a vizsgált retinát egy erősödő intenzitású ($I = 1-7000 \text{ Rh}^*/\text{pálcika/s}$; $\lambda = 488 \text{ nm}$;

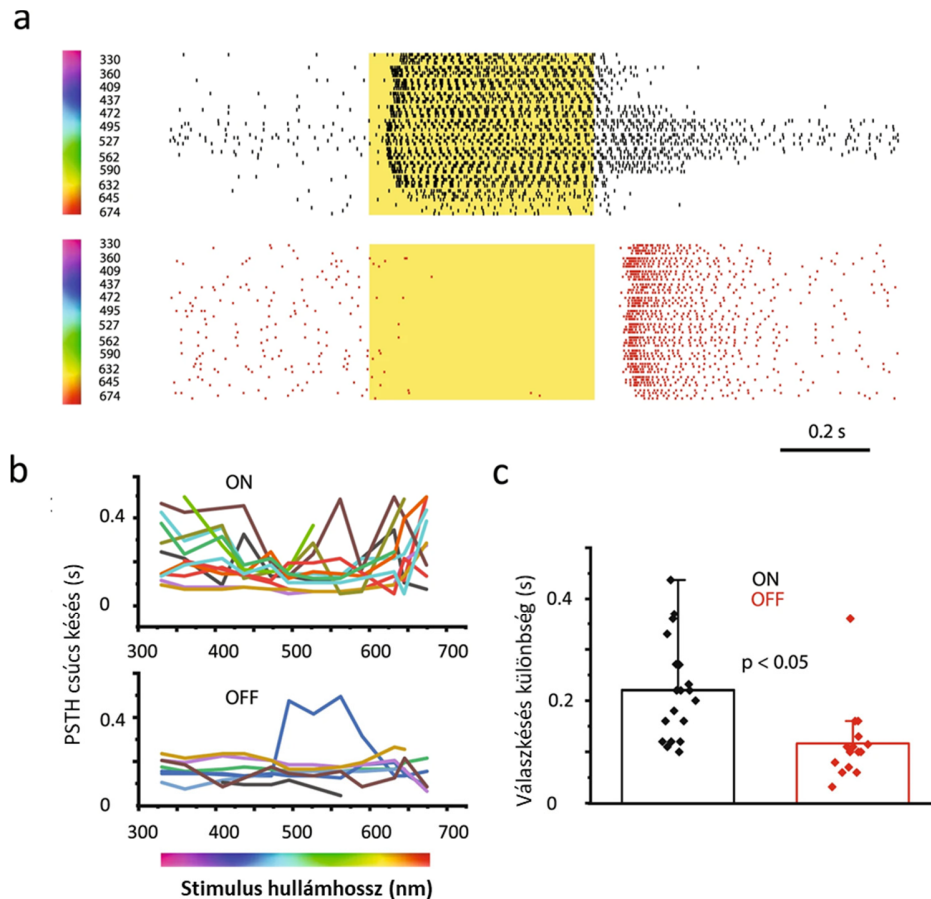
szkotopikustól, fotopikusig; 11. ábra), teljes mezejű, fénystimulus sorozattal ingereltük, miközben az RGC-kről (n=16) AP-okat vezettünk el, extracelluláris wolfram elektródákkal.

A kísérlet során általános tapasztalat volt, hogy a válaszkésések ideje csökkent, a stimulus erősségének növelésével (11a-d ábrák). Ugyanakkor úgy tűnik az ON sejtek érzékenyebbek voltak a stimulus erősségének változtatására, hisz náluk ez a késési időkből mutatkozó csökkenés sokkal markánsabb volt. A stimulus erősségével párhuzamosan gyorsuló válaszkészség tendenciája megfigyelhető volt az OFF sejtek esetében is, de ebben az esetben sokkal kevésbé szembetűnő (11b, c ábrák). Ez a különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0.068$; Mann-Whitney teszt), mikor a maximális válaszkésés különbségeket (sejtenként kivontuk egymásból az egész stimulus tartományban mért legnagyobb és legkisebb válaszkéséseket) vetettük össze a két populáció esetében. Ez annak ellenére alakult így, hogy az ON polaritású dűcsejtek válaszkinetikái még ebben az összehasonlításban is erősebb stimulus függőséget mutattak, mint OFF társaik (ON: átlag = 224,4 ms; SD = 120 ms; OFF: átlag = 160,9 ms; SD = 97,9 ms). Viszont mikor a szkotopikus ($I=0,15-1,2 \text{ Rh}^*/\text{pálcika/s}$) és fotopikus ($I=978-6645 \text{ Rh}^*/\text{pálcika/s}$) stimulusokra adott válaszok normalizált (Origin 2018, „minimum-maximum feature scaling”; $X' = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}$, ahol: X' =normalizált válaszkésés, X =a sejt egy bizonyos intenzitású stimulusra adott válaszkésése, X_{\min} =a sejt minimum válaszkésése az összes stimulus intenzitásra vonatkozóan, X_{\max} =a sejt maximum válaszkésése az összes stimulus intenzitásra vonatkozóan) késéseit hasonlítottuk össze, mindkét populáció tekintetében (ON és OFF) szignifikáns különbséget találtunk (ON: $p=0,0045$; OFF: $p \ll 0,001$; Mann-Whitney teszt). Tehát elmondhatjuk, hogy a fotopikus válaszok rövidebbnek bizonyultak jelezvén, hogy a válaszok késését egyértelműen befolyásolja a stimulus erőssége.



11. ábra: Az RGC válaszkésések függenek a stimulus erősségétől. **a**, A raszterek egy ON-(balra) és egy OFF RGC (jobbra), növekvő erősségű fénystimulusok (a számok balra a fény intenzitás értékeit mutatják Rh*/pálcika/s-ban kifejezve) által kiváltott, 6 egymás utáni fényválaszát mutatják. **b**, **c**, Az oszlop diagramok az átlag válaszkéséseket mutatják az ON- (**b**) és az OFF RGC (**c**) populációkban a stimulus intenzitások függvényében (x tengely, Rh*/pálcika/s; a mellék diagramok (jobbra fent) a független RGC-k válaszkésés értékeit mutatják). **d**, Az oszlop diagramok a válaszkésések maximális különbségeit mutatják, az ON- és az OFF RGC alpopulációk között (minden egyes pont egy sejt legnagyobb és legkisebb válaszkésésének a különbségét mutatja). Itt úgy tűnik, az OFF sejtek némiképp érzéketlenebbek a stimulus erősségének a változására, az ON sejt válaszok viszont egyértelmű stimuluserősség-függő csökkenést mutattak (nőtt a sebességük). Azonban ez a látszólagos különbség az ON- és az OFF RGC-k között nem volt szignifikáns ($p=0.068$; Mann-Whitney teszt). **e**, Az oszlop diagramok a szkotopikus ($I=0,15-1,2$ Rh*/pálcika/s) és a fotopikus ($I=978-6645$ Rh*/pálcika/s) fénystimulusokra adott válaszkésések összehasonlítását mutatják ugyanazon RGC populációkra (minden adatpont egy-egy sejt, adott stimulus intenzitásra adott normalizált válaszkésését mutatja). A fotopikus fényválaszok szignifikánsan gyorsabbak voltak az ON ($p=0,0045$; Mann-Whitney teszt) és OFF sejteknél ($p<<0,001$; Mann-Whitney teszt) egyaránt.

A második kísérletsorozatban a stimulus hullámhosszában történő változások válaszkésésekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Itt a stimulus hullámhosszát változtattuk 12 lépésben (330-674 nm tartományban; 330, 360, 409, 437, 495, 527, 562, 590, 632, 645 és 674 nm; 12. ábra), miközben az előzőekben leírt módon AP-okat vezetünk el, n=34 tetszőlegesen kiválasztott RGC-ről.



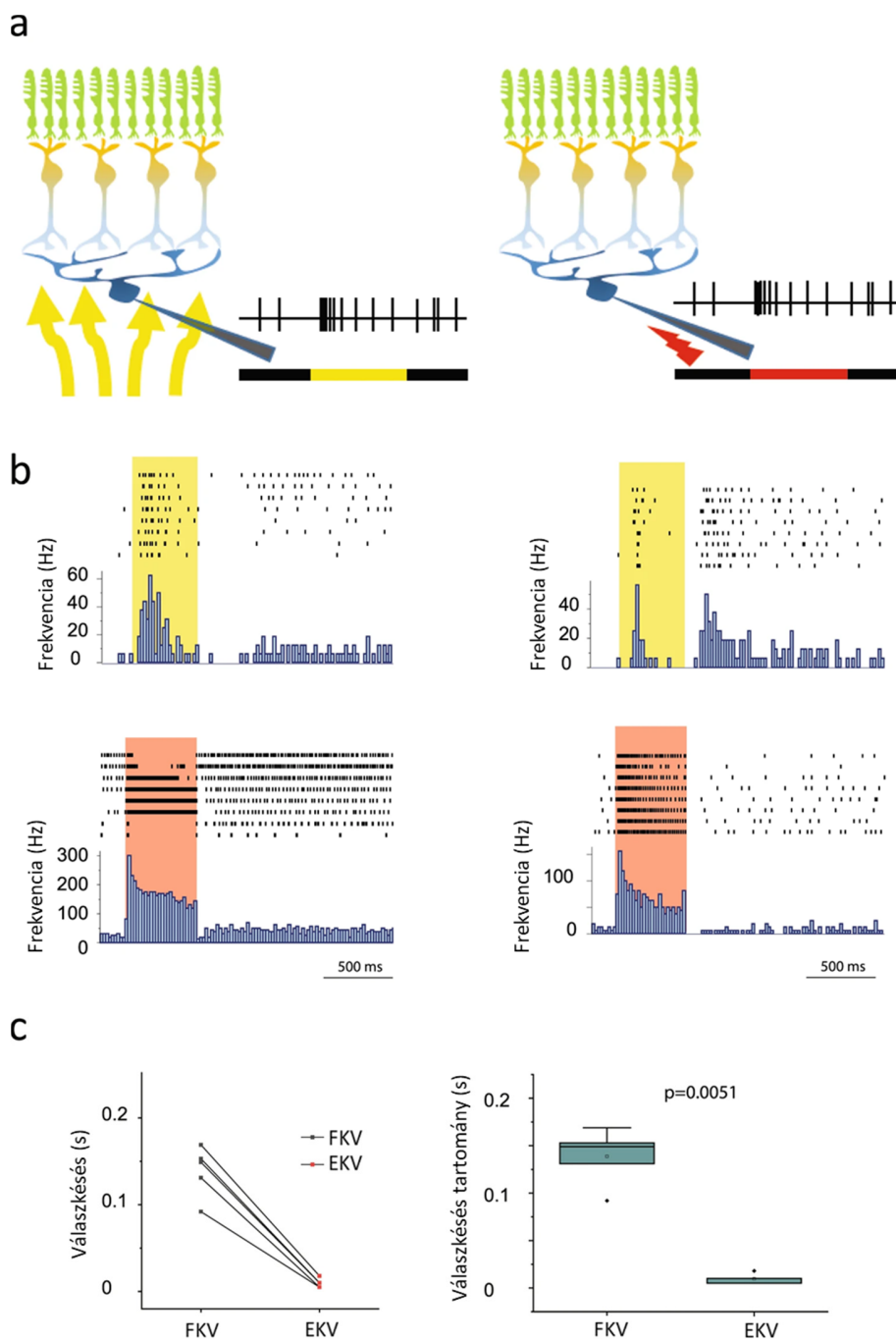
12. ábra: Az RGC válaszkésések függenek a fénystimulus spektrális tulajdonságaitól. **a,** A raszterek a különböző hullámhosszú (a hullámhosszokat a balra található számok jelzik; minden stimulusra hat ismétlés) fotopikus fénystimulusokra adott reprezentatív ON- (felül) és OFF RGC (alul) válaszokat mutatják. Tisztán látszik, hogy a válaszkésések változnak a stimulus hullámhosszának függvényében. **b.** A hisztogramok a független RGC-k (szinkódolt) válaszkéséseinek (y tengely) hullámhossz szerinti változatosságát mutatják. Az ON RGC-k (felső grafikon) szembevetően érzékenyebbek a stimulus hullámhossz változásaira, mint az OFF RGC-k (alsó grafikon). **c.** Az oszlop diagramok a maximális válaszkésés különbségeket mutatják az ON és OFF RGC válaszok esetében. Az ON sejtek szignifikánsan nagyobb varianciát mutatnak válaszaik késéseinek tekintetében, mint a vizsgált OFF RGC populáció (p=0,0004; Mann-Whitney teszt).

Ebben a kísérletben az előző kísérlethez hasonló különbséget figyeltünk meg az ON és OFF sejtek stimulus-függésében. Az OFF sejtek ebben az esetben is kevésbé voltak érzékenyek a stimulus paramétereinek változására, mint ON polaritású társaik (12. ábra). Míg az ON sejtek igen nagy fényhullámhossz-függő változatosságot mutattak válaszkéséseik tekintetében, addig az

OFF sejtek válaszkésései kevésbé voltak változékonyak (12b ábra). Továbbá megfigyelhető volt, hogy az RGC-k többsége (ON és OFF egyaránt) a 495 és 527 nm közötti, zöld színtartományú stimulusra válaszolt a legrövidebb időkéssel. Ez nem meglepő, hiszen az egér retina fotoreceptorai (így a többi retinális neuron is) erre a színtartományra a legérzékenyebb (12a ábra). Néhány sejt esetén másodlagos késési minimumokat is felfedeztünk a 360 nm-es UV fényválasz esetén, ami az egér retina UV érzékeny csapreceptorainak működésére utal (12b ábra). Mikor a korábban leírtakhoz hasonlóan megállapítottuk a maximális válaszkésési különbségeket, majd azokat összevetettük a két populáció viszonylatában (ON, n=19; OFF, n=15), azt találtuk, hogy az ON sejtek szignifikánsan nagyobb spektrum függő válaszkésési különbséget mutatnak, tehát statisztikailag is érzékenyebbek a stimulus hullámhossz változásaira, mint OFF társaik (12c ábra; ON átlag válaszkésés különbség: 221 ms, SD=97,8 ms; OFF átlag válaszkésés különbség: 116 ms, SD=76,2 ms; p=0,0004; Mann-Whitney teszt). A fenti két kísérletsorozat alapján tehát kijelenthető, hogy a különböző stimulus paraméterek, úgymint az intenzitás és a hullámhossz, számottevően módosíthatják az RGC-k válaszkéséseit.

6.2.5. A preszinaptikus retinális hálózatok szerepe az RGC válaszkésések kialakításában

Az egyik korábban bemutatott kísérletben feltártuk, hogy a teljes RGC populáció válaszkésés tartománya sokkal tágabb, mint egy-egy sejtípusé (mi két sejtípust vizsgáltunk, a tranziens és a fenntartott válaszó OFF-alfa sejteket). Ebből arra következtettünk, hogy a válaszkésések valószínűleg sejtípus specifikusak. Azonban az továbbra is kérdéses maradt, hogy a sejtípus specifikus válaszkésések hátterében, a sejtípusok eltérő membrántulajdonságai állnak, vagy már eleve a preszinaptikus retinális pályák szállítják az információt eltérő sebességgel a dúcsejtek felé (vagy esetleg ezek kombinációjáról van szó)? Ennek bizonyítása érdekében RGC-k (n=5) AP-jait vezettük el először egy teljes mezejű, fotopikus fénystimulust követően ($I = 7000 \text{ Rh}^*/\text{pálcika/s}$). Ezt követően a sejteket néhány percig sötét-adaptáltuk, majd direkt módon elektromosan ingereltük a sejtmembránt és a kiváltott AP választ detektáltuk. Az elektromos stimulálást és az AP-ok rögzítését üveg mikropipettával ($R = 6 \text{ M}\Omega$; *cell-attached* konfiguráció; stimulus paraméterek: +100 mV, $t=0,5 \text{ s}$; 13a ábra) végeztük.

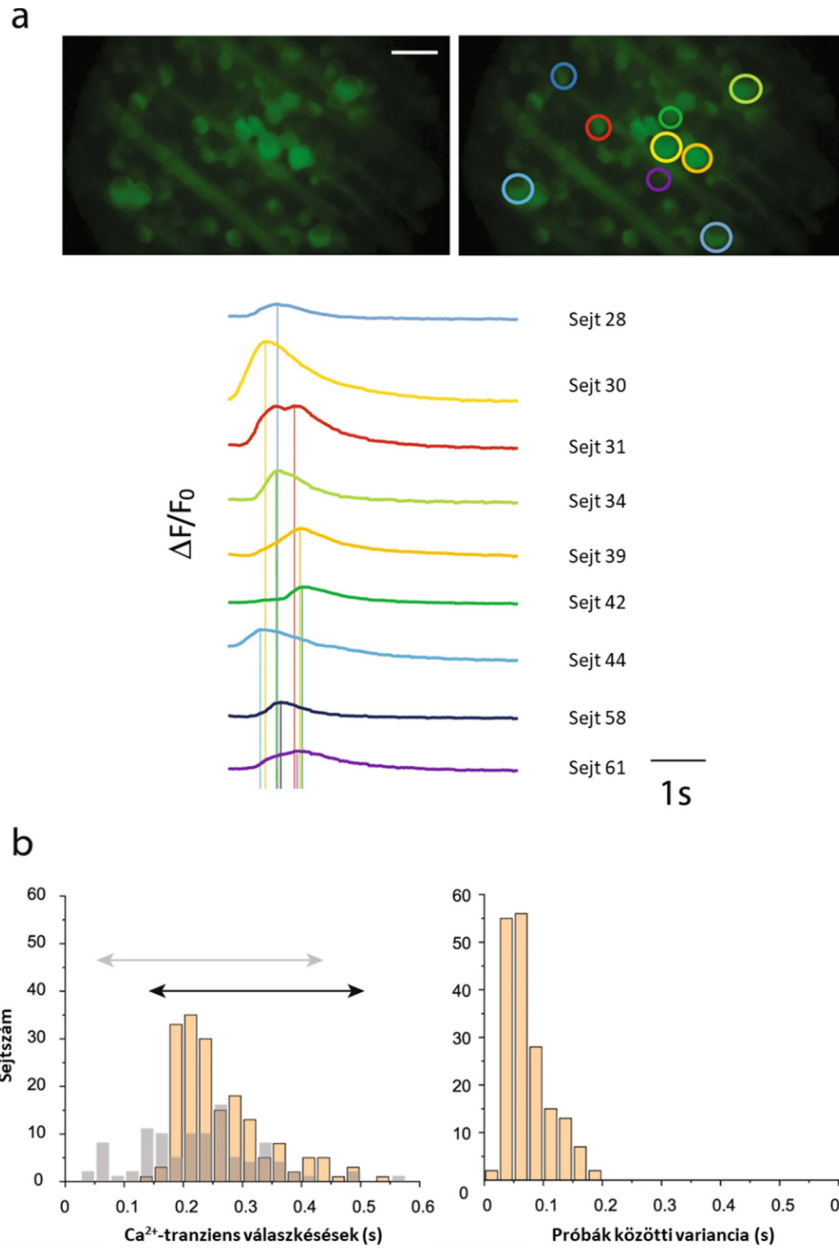


13. ábra: Az RGC válaszkésések tartománya színdőveően lecsökken, a preszinaptikus retinális hálózatok kiiktatásakor. a. A sematikus ábrák a két felvételi paradigmat mutatják; klasszikus *loose-patch* extracelluláris elvezetés üveg pipettával (balra), fénystimulust követően (sárga nyilak és sáv) és az elektromos stimulust követően (jobbra; vörös villám és sáv). **b.** A raszterek két reprezentatív RGC (bal és jobb panel) független válaszait mutatják; fényválaszok (fent) és elektromos stimulusra adott válaszok (lent) – mindkét esetben a raszterek és a PSTH-k is láthatók (n=5). **c.** A rövidebb válaszok mellett az RGC-k direkt elektromos stimulációja statisztikailag szignifikáns csökkenést eredményezett a késési tartományban a vizsgált sejtek populációjában (p<0,05; páros t-teszt; FKV – fény kiváltotta válaszok, EKV – elektromos stimulus kiváltotta válaszok).

Ez utóbbi módszerrel megkerültük az RGC-k preszinaptikus hálózati elemeit. A feltevésünk az volt, ha a dúcsejtek fényválasz késéseinek variabilitását főként az eltérő membrántulajdonságok szabják meg, akkor mind a fény- mind az elektromos ingerlés esetén a késéseknek hasonlóan tág intervallumot kell lefednie (ugyanakkor számítottunk arra, hogy a direkt ingerléses módszernél minden sejtválasz gyorsabb lesz, mint ugyanannak a sejtnek a fényválasza). Ellenben, ha a direkt ingerléssel kiváltott válaszok jelentősen kisebb késésintervallumot fednek le, akkor azzal bizonyítjuk a preszinaptikus hálózati elemek, válaszkésések alakulásában betöltött esszenciális szerepét.

A válaszkéséseket mindkét stimulus csoport esetében, a stimulus után (n=8) rögzített AP sorozatok alapján megalkotott PSTH-k felvételi idejében határoztuk meg. Ahogy az várható volt, minden vizsgált RGC rövidebb válaszkésést mutatott az elektromos stimulusra, mint a fénystimulusra (13b, c ábra). Ezen túlmenően a sejtek közötti átlagos válaszkésésekben mutatkozó különbségek, így a sejtek késési tartománya is szignifikánsan lecsökkent (13c ábra; $p=0,0051$; páros t-teszt). Ez bizonyítja, hogy az RGC válaszkéséseket nagyrészt nem a sejtek membrán tulajdonságai határozzák meg, hanem a preszinaptikus retinális hálózat. Tehát a retinális párhuzamos információs csatornákon a különböző képi aspektusokat (kontraszt, szín, mozgás stb.) szállító információ eltérő sebességgel halad és éri el a retina kimeneti elemeit, az RGC-eket.

Az előző kísérlet bizonyította a preszinaptikus retinális pályák szerepét a dúcsejt fényválasz késések meghatározásában. Azonban ennek a kísérletnek az alacsony elemszáma miatt nem szerettünk volna általánosítani, így további támogató bizonyítékokat kerestünk. Egy következő kísérletsorozatban Ca^{2+} -képződési kísérleteket alkalmaztunk a fenti kérdéskör vizsgálatára. A metodológia alapvetően különbözik az előző kísérletétől, tehát az esetleges módszertani hibák a két kísérletsorozat során kiküszöbölhetőek, másrészt a képződési vizsgálat lehetővé teszi azt, hogy számos RGC-t egyidejűleg vizsgáljunk. A képződési kísérletek egy részében Ca^{2+} válaszokat regisztráltunk Thy1-GCaMP3-as egerek RGC-in (n=178), teljes mezejű, szkotopikus fénystimulust követően (14a ábra; $t=3s$, $I = 7000 \text{ Rh}^*/\text{pálcika/s}$, $\lambda = 490 \text{ nm}$).



14. ábra: A fény által kiváltott RGC Ca^{2+} -tranziensek késései az AP-okhoz hasonló széles tartományban oszlanak el. a, A képeken egy Thy1-GCaMP3-as egér retina egy részlete látható a kiválasztott RGC ROI-kal (felül jobbra) és azok nélkül (felül balra). A görbék mutatják a szinkódolt RGC-k, fény kiváltotta Ca^{2+} -tranzienst eseményeit (lent). A tranziensekkel megegyező színű függőleges vonalak a válaszok csúcsát jelölik, az x-tengelyig történő meghosszabbításuk a csúcsok egymáshoz képesti nagy eltéréseit teszik egyértelművé. **b,** A hisztogramok a Ca^{2+} -tranzienst válaszreakciók eloszlását (balra) mutatják (Thy1-GCaMP3 – színes, $n=178$; PV-GCaMP6 – szürke $n=102$). A jobb oldali hisztogram a próbák közötti variációt mutatja. Annak ellenére, hogy a GCaMP6f indikátor gyorsabb kinetikával bír, a két állattörzs eloszlási hisztogramja hasonlóan széles késési tartományt fed le a vizsgált RGC-k esetében (fekete és szürke nyilakkal szemlélítve, a GCaMP3 és a GCaMP6f egértörzseknek megfelelő hisztogramok felett). Ez bizonyítja, hogy a széles válaszreakciósi tartomány nem a GCaMP3 lassú kinetikájának tudható be. Aránymérték: 50 μm .

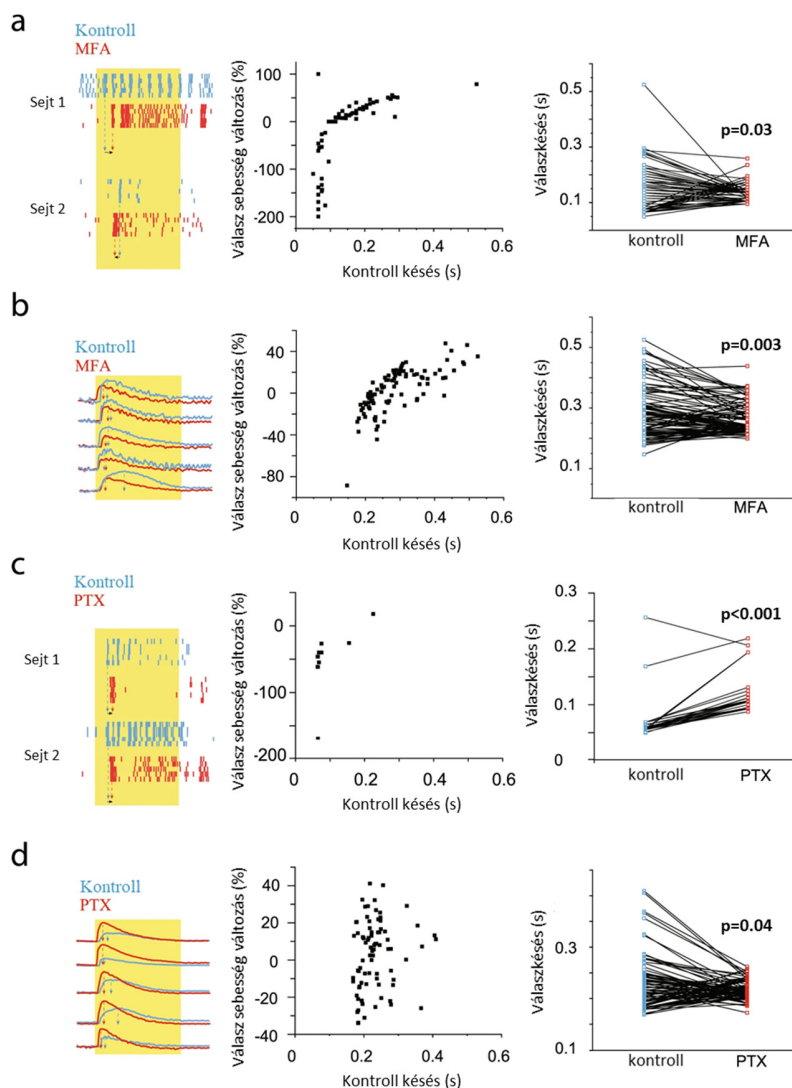
A kísérletek másik részében összehasonlításképpen PV-GCaMP6f egértörzs (n=102) egyedeit használtuk, ugyanis a GCaMP3 indikátor esetében felmerülhet az indikátor lassú kinetikájából fakadó mérési hiba (a GCaMP6f indikátor jóval gyorsabb kinetikával jellemezhető).

A képképzési kísérletek adataiból a válaszkésést a Ca^{2+} események csúcsainak időbeli pozíciója alapján (felfutási idő) határoztuk meg. A mérések megkezdése előtt számítottunk arra, hogy a Ca^{2+} -tranziensek jelentősen lassabb kinetikát mutatnak majd, mint amit az elektrofiziológiai méréseknél tapasztaltunk, de arra voltunk kíváncsiak, hogy a válaszkésések variabilitása összehasonlítható-e, a két kísérletsorozatban (elektrofiziológia vs. képképzés). A vizsgált dúcsejtek Ca^{2+} hullámainak felfutási ideje sejtenként nagyon eltérő volt, ami egybevág az elektrofiziológiai mérések során tapasztaltakkal. A vizsgált RGC Ca^{2+} -tranziens késések meglehetősen széles intervallumot fedtek le az eloszlási hisztogramon (140-520 ms; átlag = 261,8 +/-76,4 ms SD). Ez az eloszlási tartomány egyértelműen elkülönült a független sejtek szintjén jelentkező próbák közti varianciák eloszlásától (átlag = 73,46 +/-36,8 ms SD; 14b ábra), bizonyítva, hogy nem az egyedi sejtek válaszáinak variabilitása áll a jelenség hátterében, hanem a sejtek közötti különbségek (hasonlóan a korábbi elektrofiziológiai mérésekhez). Összegezve tehát, a Ca^{2+} és AP fényválaszok hasonlóan variábilisak voltak és hasonlóan széles késési intervallumot fedtek. Ez egyértelműen kizárja annak lehetőségét, hogy a nagyjából azonos sebességű párhuzamos csatornákon érkező információ a különböző RGC típusokból az eltérő AP generálási késés miatt váltson ki különböző sebességű fényválaszokat. A fény kiváltotta Ca^{2+} hullámok az AP sorozatokhoz hasonló késési változatosságot mutattak, tehát ez is azt bizonyítja, hogy már a párhuzamos csatornákon különböző késésekkel érkezik az információ a dúcsejtekhez.²

² Megjegyzés: Felvetődhet a kérdés, hogy ezen mérések eredményei mennyiben vethetők össze a korábbiakkal, hiszen az RGC-k Ca^{2+} -tranziensei lassabbak, mint a megfelelő RGC AP-ok. A képképzési vizsgálatokkal a célunk azonban nem az abszolút késési értékek meghatározása volt, hanem elsősorban a válaszkésések relatív dinamikus időbeli eloszlásának vizsgálata. Ebből az aspektusból a Ca^{2+} -tranziensek megfelelő referencia alapot szolgáltatottak vizsgálatunkban, melyet korábbi kutatások eredményei is alátámasztanak (Borghuis et al., 2011). Továbbá egy újabb kritikaként vetődhet fel az alkalmazott módszerrel kapcsolatban, hogy a Ca^{2+} -képképzési vizsgálatoknál erősen meghatározó tényező az alkalmazott indikátor kinetikai sajátosságai, így fennáll a probléma, hogy a lassabb válaszok esetleg a GCaMP3 lassabb kinetikájának tudhatók be csupán. Ennek cáfolatára a méréseinket, egy gyorsabb kinetikájú GCaMP6f GMO indikátor alkalmazásával is ellenőriztük, ahol csak a PV expresszázó sejtekben fejeződött ki az indikátor. Ennél az utóbbi törzsnél is ugyanúgy tapasztaltunk lassabb és gyorsabb válaszokat is egyaránt, valamint a válaszkésések eloszlása is hasonlóan széles tartományt fedett le (14b ábra; n = 102).

6.2.6. Retinális pályaelemek hatása a RGC-k fényválasz késéseire

A korábban bemutatott eredményeink alátámasztották, hogy az RGC-knél tapasztalt sejttípus specifikus válaszkésések legfőbb meghatározó faktora az adott retinális útvonalon haladó információ sebessége. Azt is megfigyeltük, hogy egyazon dúcsejt esetében a fénystimulus egyes paraméterei (a jelen munkában a stimulus erősségét és spektrális tulajdonságát vizsgáltuk) szintén moduláló hatással bírnak a válaszkésést illetően. Ez utóbbi megfigyelés alapján feltételezhető, hogy a válaszkésés stimulusfüggő finomhangolásában főként a retinális interneuron hálózat, horizontális szignalizációban részt vevő elemei vesznek részt. Ennek megválaszolása érdekében multielektrodás elektrofiziológiai (MEA) és Ca^{2+} -képzővizsgálatokat végeztünk egér retinán, miközben a két retinális hálózati elemet (az RGC-k GJ kapcsolatait és GABAerg laterális inhibíciót) farmakológiailag blokkoltuk (GJ blokk: MFA/meklofenaminsav, 40 μ M; GABA blokk: PTX/pikrotoxin, 50 μ M). A felvételeket először kontroll körülmények között végeztük, melyet a drogot tartalmazó oxigenizált ringer oldatban történő 20-30 perc inkubáció követett. A GJ-k blokkolása mindkét alkalmazott módszer esetén szemmel látható változást idézett elő a legtöbb vizsgált RGC válaszkésésében. Érdekes módon a gyors válaszokat általában lassította, a lassúakat gyorsította. Megfigyelhetőek voltak relatíve gyors sejtválaszok, melyeknek sebességet a kezelés akár 47%-ra csökkentette, míg néhány relatíve lassú válasz sebességét 200% -ra növelte (15a, b ábra). Ezek a változások azt vonták maguk után, hogy a válaszkésési variabilitás szignifikánsan lecsökkent; az AP-ok tekintetében az 50-300 ms tartományról (kb. 250 ms) 75-270 ms tartományra (kb. 195 ms; $p=0.03$; páros Wilcoxon-próba), a Ca^{2+} -tranziensek tekintetében 150-530 ms tartományról (380 ms), 180-350 ms tartományra (170 ms; $p=0.003$; páros Wilcoxon-próba). A GABA receptorok blokkolása (A- és C-típus egyaránt) esetében részben hasonló eredményeket kaptunk, mint a GJ blokkolásnál, azaz a GABA receptor inaktivációja egyes sejtek esetében válaszkésés csökkenést, máshol növekedést idézett elő, függetlenül a kísérletes megközelítéstől (15c, d ábra). Azonban ebben az esetben válaszkésés csökkenések és növekedések is egyaránt előfordultak eredetileg lassú és gyors fényválaszú sejtek esetében is. Ugyanakkor ebben az esetben is az RGC válaszkésések tartománya szignifikánsan csökkent. A válaszkésések tartománya 60-225 ms tartományról (165 ms) 90-195 ms tartományra (105 ms) csökkent az AP-ok esetében ($p<0.001$; páros Wilcoxon-próba) és 170-420 ms tartományról (250 ms), 175-275 ms tartományra (100 ms) a Ca^{2+} -képzővizsgálatok esetében ($p=0.04$; páros Wilcoxon-próba; 15c, d ábra).

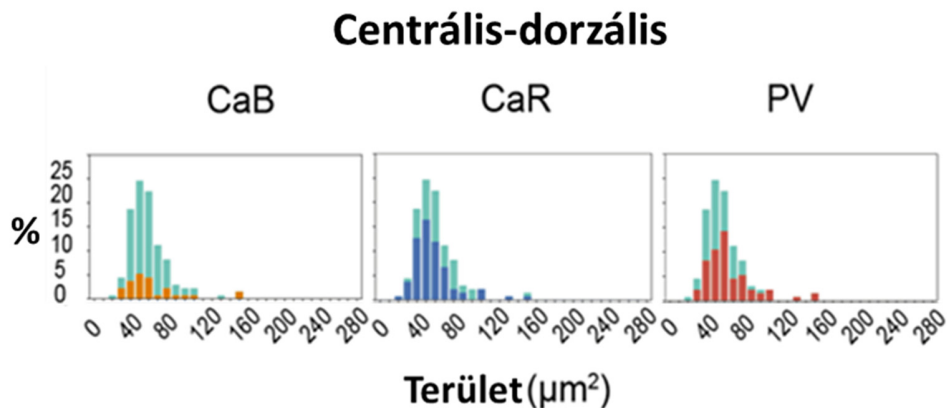


15. ábra: A laterális gátlás és GJ mediálta jelátvitel számottevően befolyásolja az RGC válaszreakciókat. **a**, RGC válaszok (balra) kontroll körülmények (kék) és GJ blokkolás után (piros; 40 μ M MFA). A középső hisztogramok mutatják az MFA indukálta változásokat az RGC ($n=159$) válaszreakciókban. A jobb oldali diagramok a kontroll és az MFA kezelés kiváltotta, RGC válaszreakciókat mutatják. Láthatóan a késési tartomány a GJ zárás követően számottevően lecsökkent. A változásokat itt és a következő diagramokon is a következőképpen számszerűsítettük: kontroll válasz – kezelés utáni válasz/kontroll válasz * 100). **b**, A kontroll körülmények közötti RGC Ca^{2+} fényválaszok (kék) és a GJ blokkolást követően (piros; 40 μ M MFA; balra) fényválaszok láthatóak. Középen az RGC ($n=95$) Ca^{2+} fényválaszok MFA indukálta változásait mutatjuk be, míg a jobb oldalon a RGC válaszreakció MFA kezelés hatására történő változása látható. A késési tartományok csökkenése itt is megfigyelhető **c**, RGC válaszok (balra) kontroll körülmények (kék) és GABAerg blokkolás után (piros; 50 μ M PTX). Középen láthatóak a PTX indukálta RGC ($n=31$) válaszreakció változások, jobbra ugyanezen kísérlet esetén az RGC-k késési tartományának csökkenését mutatjuk. **d**, RGC Ca^{2+} fényválaszok kontroll körülmények (kék) és PTX inkubációt (piros; 50 μ M PTX) követően. A diagramon PTX indukálta RGC ($n=83$; középső panel) Ca^{2+} fényválasz késési változásai láthatóak, míg a jobb oldali diagram a PTX indukálta válaszreakció tartományának redukcióját mutatja. A változások ezen felül minden esetben statisztikailag is szignifikánsnak bizonyultak ($p<0,05$; páros Wilcoxon-próba)

6.3. A retinális dúcsejtek heterogenitása az expresszált CaBP-k alapján

A fenti kísérletek eredményei rávilágítottak arra, hogy a párhuzamos retinális pályákon haladó információ rendkívül sokoldalú kinetikával (késés, tranziencia, ISI stb. – megjegyzés: ebben a munkában csak a fényválaszok időkéseiről szóló kísérletek találhatók meg, a válasz tranzienciájával, ISI-vel foglalkozó vizsgálatainkat bemutatók nem) jellemezhető akciós potenciál sorozatok formájában indul a dúcsejtek felől a felsőbb látóközpontok felé. Következő feladatunknak azt tekintettük, hogy az egyes pályák kiindulási pontjának tekinthető dúcsejteket azonosítsuk és alaktani tulajdonságaik alapján jellemezzük. Erre adhat lehetőséget egy-egy neurokémiai markerrel meghatározott populáció szelektív jelölése és vizsgálata. Az emlős dúcsejtek esetében azonban mindeztidáig nem kerültek leírásra 1:1 jelölésre (a marker kizárólag egy dúcsejtpopuláció összes tagját jelöli) alkalmas specifikus neurokémiai markerek. A Ca^{2+} -kötő pufferfehérjék (CaBP-k), a parvalbumin, a calretinin és a calbindin olyan markerek, melyeket nem egy, hanem több dúcsejt-típus is termel. Mindazonáltal úgy gondoltuk, hogy a fehérjék termelésének ténye, a jelölés intenzitása, valamint a jelölt sejtek számának nagysága olyan paraméterek, melyek együttesen legalább pár (3-4) dúcsejt-típust egyértelműen meghatároznak, így azok a többi dúcsejttől különválasztva vizsgálhatók. A CaBP termelő dúcsejtekről szóló megfigyeléseink a dolgozat alapjául is szolgáló, 2020-as (Kovács-Öller et al., 2020) közleményünkben szerepelnek részletesen, a jelen dolgozatban csak pár megfigyelést emelek ki.

Első vizsgálati felállásunkban azt szerettük volna meghatározni, hogy a CaBP termelő sejtek esetlegesen a dúcsejtek teljes populációjának egy olyan részét alkotják, melyek méretük alapján jól elkülöníthetőek a többi dúcsejttől. Ennek a kérdéskörnek a vizsgálatához NeuN háttérjelöléssel az összes GCL-beli dúcsejtet jelöltük, illetve a-PV, a-CaR és a-CaB szérumokkal a CaBP tartalmú sejteket szelektíven határoztuk meg. Ezek sejttesteinek területeit mértük meg (μm^2 -ben) és területi nagyság alapú eloszlási hisztogramokat hoztunk létre mindhárom CaBP-t termelő RGC populáció tekintetében. A CaBP-t termelő sejtek szómaterületeit ezután összevetettük a teljes dúcsejtpopuláció (NeuN pozitívitas) szómaterületeinek hisztogramjaival (kék háttér a képen; 16. ábra; megjegyzés: az ábrán csak a centrális/dorzális terület méréseit mutatjuk, de a vizsgálataink minden retinális területre kiterjedtek, lásd: Kovács-Öller et al., 2020).

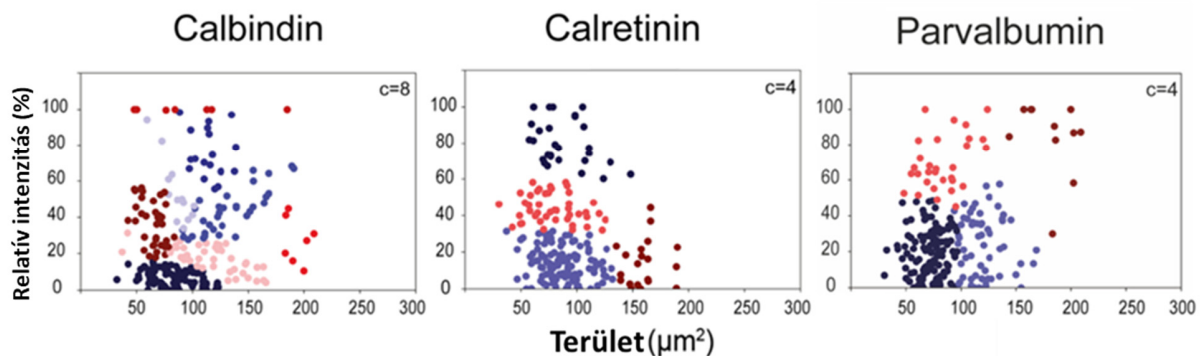


16. ábra: A CaBP-t expresszáló sejtek sejt méret szerinti eloszlási hisztogramjai. Minden CaBP-t expresszáló RGC (CaB: narancs, CaR: kék, PV: piros) méret szerinti eloszlásánál referenciaként látszik a háttérben az összes RGC méret szerinti eloszlása (világoskék – NeuN pozitív dúcsejtek). A hisztogramok $10 \mu\text{m}^2$ -es csoportokban mutatják az eredményeket. Az x tengely a sejt számok %-os arányát mutatja.

Ezek alapján látható, hogy az RGC-k sejt méret szerinti eloszlási hisztogramjai hasonló szélességűek (hasonló mérettartományt fednek le), mint a teljes RGC populációé. Ez alól némileg a CaB+ RGC populáció kivétel, ugyanis a CaB láthatóan a kisebb méretű dúcsejtekben termelődik nagyobb mértékben. A másik két fehérje (PV és CaR) esetében a CaBP-t termelő RGC-k gyakorlatilag a teljes dúcsejtpopuláció egész méret tartományát lefedik, így azok méreteik alapján nem elkülöníthetőek egyéb dúcsejtektől.

A következő vizsgálatban a sejttest mérete és a relatív jelölési intenzitás paramétereiket felhasználva végeztünk el klaszter analízist, remélve, hogy az előző vizsgálatnál egyértelműbb elkülönülést tapasztalunk a CaBP-t termelő sejtek esetében. Ennek érdekében a CaBP-t expresszáló RGC-k expressziós szintjeit (Fiji szoftver segítségével meghatározott átlag *gray-value*) sejttest területük függvényében ábrázoltuk egy pontdiagramon, majd ezeken hajtottuk végre a klaszter analízist. Az ábrán (17. ábra) a centrális-dorzális régiót emeltük ki szemléltetésképpen, a többi régió eloszlása is többségében megfelel az itt látottaknak (lásd: Kovács-Öller et al., 2020).

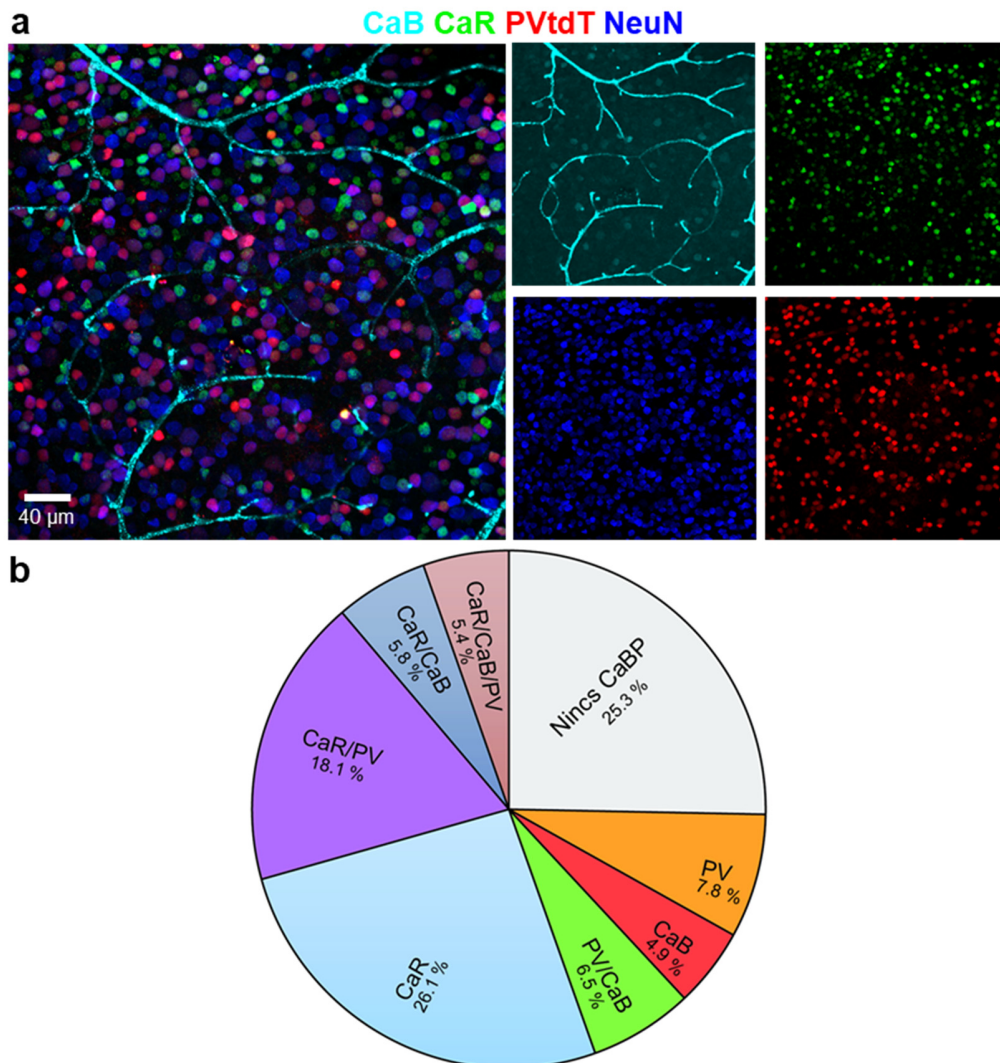
Centrális-dorzális



17. ábra: A CaB-t expresszáló RGC-k klaszter analízise (centrális-dorzális terület). A klaszter analízishez a sejtek két jellemzőjét (sejtméret és CaBP expressziós szint) használtuk fel. A pontok n=8 retina sejtjeit jelölik. Az RGC-k klaszterei szín-kódoltak. A klaszterek száma a jobb felső sarkokban található.

Az klaszter analízis rámutatott arra, hogy az összes vizsgált területen igen nagy a diverzitás az expresszált CaBP-k tekintetében. 4-9 klasztert sikerült meghatározni a három CaBP tekintetében (CaB: 4-9; CaR: 4-8 és PV: 4-8), melyek száma a vizsgált retinális területenként változó volt. A legjelentősebb különbségek a retina központja és a perifériája tekintetében voltak tetten érhetők, expressziós mintázatuk tekintetében azonban igen nehéz bármilyen következtetést levonni a vizsgált centro-perifériás változásokból a tanulmányozott RGC altípusok további morfológiai azonosítása nélkül. A vizsgálatok során részleteztük még a CaBP-t termelő sejtek expressziós szintjeinek és a termelő sejtek sejttest méreteinek retinális topográfiai viszonyait is, de ezekre a részletekre ebben a dolgozatban nem térünk ki (lásd: Kovács-Öller et al., 2020). Ugyan látszólag sikerült néhány RGC alpopulációt meghatározni az analízis alapján, de ezek egymástól csak kissé (több esetben egyáltalán nem) különültek el. Ez alapján nyilvánvaló volt, hogy ez a kétdimenziós klaszter analízisünk nem alkalmas a CaBP-t termelő RGC-k morfológiai/funkcionális csoportjainak elkülönítésére.

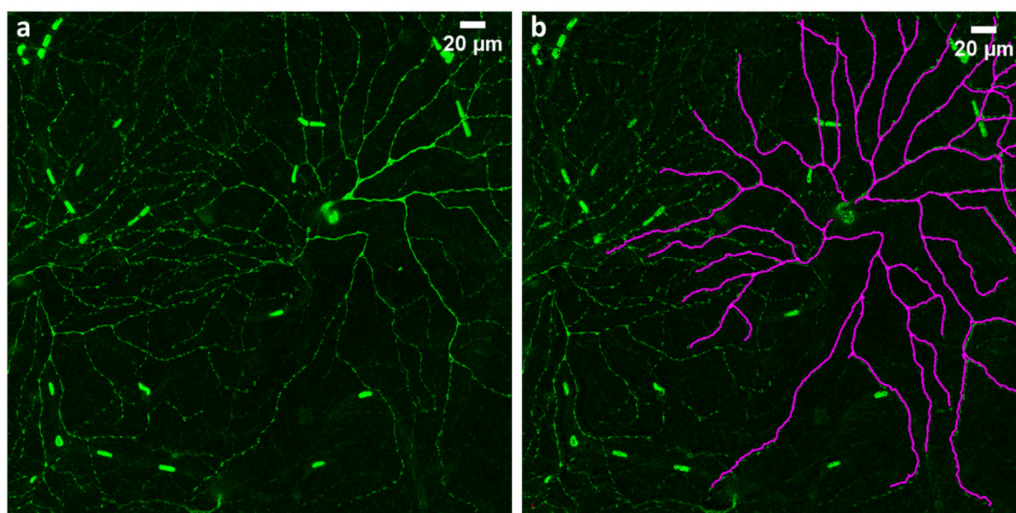
Megfigyeltük továbbá azt is, hogy a dúcsejtek nagy része nem egy, hanem két, esetleg három CaBP-t is termel.



18. ábra: A többszörös CaBP expresszió összehasonlítása. **a.** A parvalbumin-tdTomato (PV-tdT) GMO egér retinája CaB, CaR és NeuN jelöléssel (jobb oldalon a kompozit kép, míg bal oldalon a négy különálló csatorna szétosztva, jobbra az összes szín a fent jelölt CaBP-k betűszíneinek felel meg). **b.** A kör diagram mutatja az RGC-k CaBP expresszió szerinti arányait (nem-, egyszeresen-, kétszeresen- és háromszorosan expresszáló).

A koexpressziós vizsgálat fényt derített arra, hogy a legnagyobb arányban a CaR⁺ sejtek (26,1 %) voltak jelen a vizsgált populációban, a CaBP-t egyáltalán nem tartalmazó sejtek mellett (25,3 %; 18b ábra). Ha azonban ezt összevetjük a többszörösen jelölt sejtek összesített arányával (35,8%), kijelenthető, hogy a sejtek túlnyomó többsége több CaBP-t is expresszál szimultán. Ezzel szemben tiszta PV⁺ (7,8%) és tiszta CaB⁺ (4,9%) csak igen kis arányban voltak jelen a vizsgált RGC-k között. A többesjelölt sejtek mérete és jelölési intenzitása (hasonlóan az egy

CaBP-t termelő sejtekhez) ugyancsak széles tartományokat fed le, tehát típus szerinti elkülönítésre a többesjelölések sem alkalmasak. Összességében elmondható, hogy vizsgálataink során csupán némi topológiai eltérést és törvényszerűséget sikerült feltárnunk, mely eredmények alátámasztják a korábbi független tudományos munkák leírásait (Kim és Jeon, 2006; Lee et al., 2010), miszerint a három vizsgált CaBP az egér RGC-k egy igen heterogén populációjában fejeződik ki. Mivel korábban hasonlóan részletes adatok nem álltak rendelkezésre a CaBP termelő dúcsejtek eloszlásáról és az expresszió területi különbségeiről, ezért munkánk hiánypótló volt. A fentiek fényében tehát el kellett vetnünk azt a lehetőséget, hogy a párhuzamos csatornák pilléreiként szolgáló dúcsejteket egyszerű IHC módszerekkel a preparátumon meghatározzuk. Ugyanakkor egy, a laborunk munkatárai által végzett és jelenleg is zajló vizsgálati sorozatunk eredményesnek bizonyult a dúcsejtek morfológiai azonosításában és jellemzésében. Ebben a kísérletsorozatban a Thy1-GCaMP3 és PV-GCaMP6f, valamint PC-Cre-GFP állatokon végzett kísérleteket követően a vizsgált területről konfokális felvételek készíthetők és egy-egy kiválasztott dúcsejt a fluoreszcens jel alapján a teljes dendritfával követhető/kirajzolható Fiji szoftver környezetben (19. ábra).

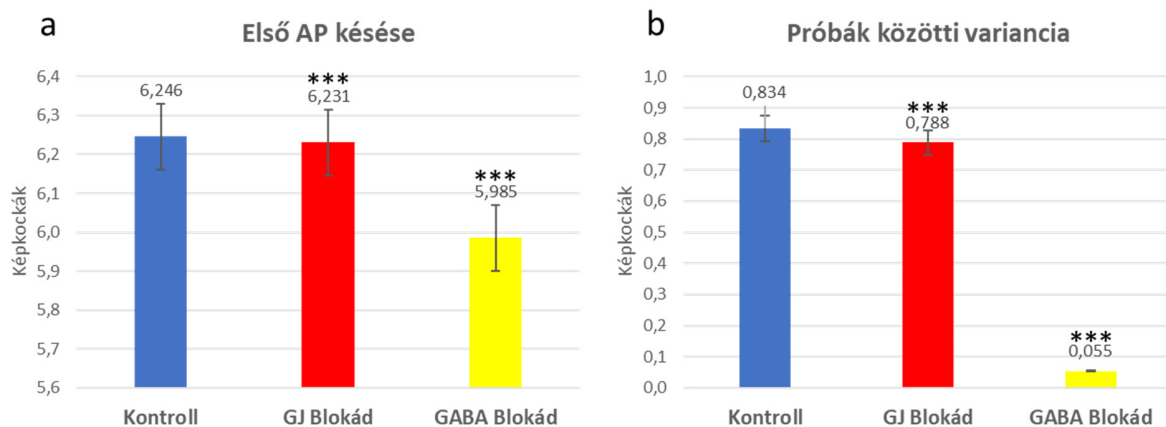


19. ábra: Egy PV+ RGC szóma-dendritikus morfológiájának a feltárása szoftveres (FIJI) nyomkövetéssel. a. GFP jelölt PV+ dúcsejtek, PV-Cre-GFP GMO egér retináján, konfokális mikroszkópos felvétel. **b.** Egy PV+ dúcsejt dendritjeinek szoftveres nyomkövetése, kirajzolása.

Kísérleteink során egyelőre az egyes elektrofiziológiai és képalkotási kísérletekben vizsgált dúcsejtjeinket ezzel az utóbbi módszerrel fogjuk karakterizálni, de mivel ezeket a kísérleteket főként munkatársaim végzik, ezért ezekről a dolgozatban nem szolgáltatok bővebb leírást.

6.4. A dúcsejtek kódolási mechanizmusát befolyásoló retinális kapcsolatok feltérképezése

A fenti elektrofiziológiai és képalkotási kísérletek alapján egyértelmű volt, hogy a GABAerg és GJ mediálta információáramlás nagyban befolyásolja a dúcsejtek által kialakított AP kód egyes paramétereit (késés, tranziencia stb.). Ugyanakkor a funkcionális farmakológiai kísérleteinkben specifikus antagonisták híján kénytelenek voltunk olyan farmakonokat használni (PTX, MFA), melyeknek a hatása széleskörű, így nem csak a vizsgálni kívánt kapcsolatokat iktattuk ki velük. A vizsgalatokat szeretnénk volna egy-egy jól körül határolt neuronális kapcsolat ki-, illetve bekapcsolására leszűkíteni, azonban sejtspecifikus blokkoló szerek hiányában erre nem volt farmakológiai lehetőség. Ugyanakkor kollaborációs kapcsolataink révén (Dr. Garrett T. Kenyon; Los Alamos National Laboratory, USA) használatunkba került egy olyan virtuális retina algoritmus, ahol a retinális hálózati elemek tetszőlegesen ki- és bekapcsolhatók, így a különböző retinális útvonalak egymástól elszeparálhatók. Ezekben a kísérletekben három különböző stimulust alkalmaztunk. Ezek egyike egy szimpla ON-OFF stimulus volt, ahol homogén fehér képet egy teljesen fekete követett. Egy 200 képkockányi ciklusban 100 fehér képkockát 100 fekete kép váltott egy ciklusban és egy mérés 10 cikusból állt (megjegyzés: a későbbiekben a szövegben ciklust gyakran hívjuk próbának). A modellel kapcsolatban tudni kell, hogy az időfaktor relatív, így ezt itt az egymást követő képkockák számában fejezzük ki. Az ON-OFF stimuluson túl különböző térbeli frekvenciájú szinuszoid stimulusokat (1-, 2-, 4-, 8- és 16 ciklus/retina) és egy természetes stimulust is alkalmaztunk, a retinális hálózatok valós vizuális információfeldolgozásában betöltött szerepének vizsgálata során. A kísérleteket elvégeztük kontroll körülmények között, majd megismételtük a megfelelő retinális hálózati elem (GJ, illetve GABAerg gátlás) kikapcsolása után. A retinamodell használatának majd az lesz a későbbieknek a nagy előnye a farmakológiai blokkolással szemben, hogy a GJ vagy GABA mediálta interakciót kikapcsolhatjuk specifikusan egyetlen kapcsolati elem esetében is (pl. *feedforward wide-field* amakrin sejt általi GABA inhibíció a dúcsejtek irányában). Ugyanakkor a jelen kísérleti felállásban azt szeretnénk volna tesztelni, hogy a fiziológiai mérések mennyire összeegyeztethetők a modellel, így a következő bemutatásra kerülő mérések során a GJ és GABA blokkád az algoritmus minden GJ és GABA kapcsolatára vonatkozik majd, hasonlóan a farmakológiai kezeléshez. Amennyiben a két megközelítés hasonló eredményt produkál, úgy a modell nagy eséllyel használható lesz a kapcsolatspecifikus vizsgálatokra is.



20. ábra: A GABAerg és a GJ szignalizáció válaszkésésekre gyakorolt hatásának vizsgálata a számítógépes retinamodellben. a. A késések átlagában mutatkozó változások a kontroll (kék) körülmények, a GJ (piros) és GABA (sárga) blokkolt állapotok között. Az első AP késése, szignifikánsan kisebb volt a GJ és GABA blokkolt állapotban, mint a kontroll körülmények között (** $p < 0,001$; páros Wilcoxon-próba). **b.** A próbák közötti variancia változásai a retina modellben, a GJ és GABA blokkolás hatására. A próbák közötti variancia számottevően és szignifikánsan csökkent a két retinális hálózati elem kiiktatását követően, különös tekintettel a GABAerg rendszerre (** $p < 0,001$; páros Wilcoxon-próba). Ez arra enged következtetni, hogy a GABAerg hálózat, az RGC-k gátlásával finom-hangolja azok válaszait és ezzel növeli válaszaik diverzitását is.

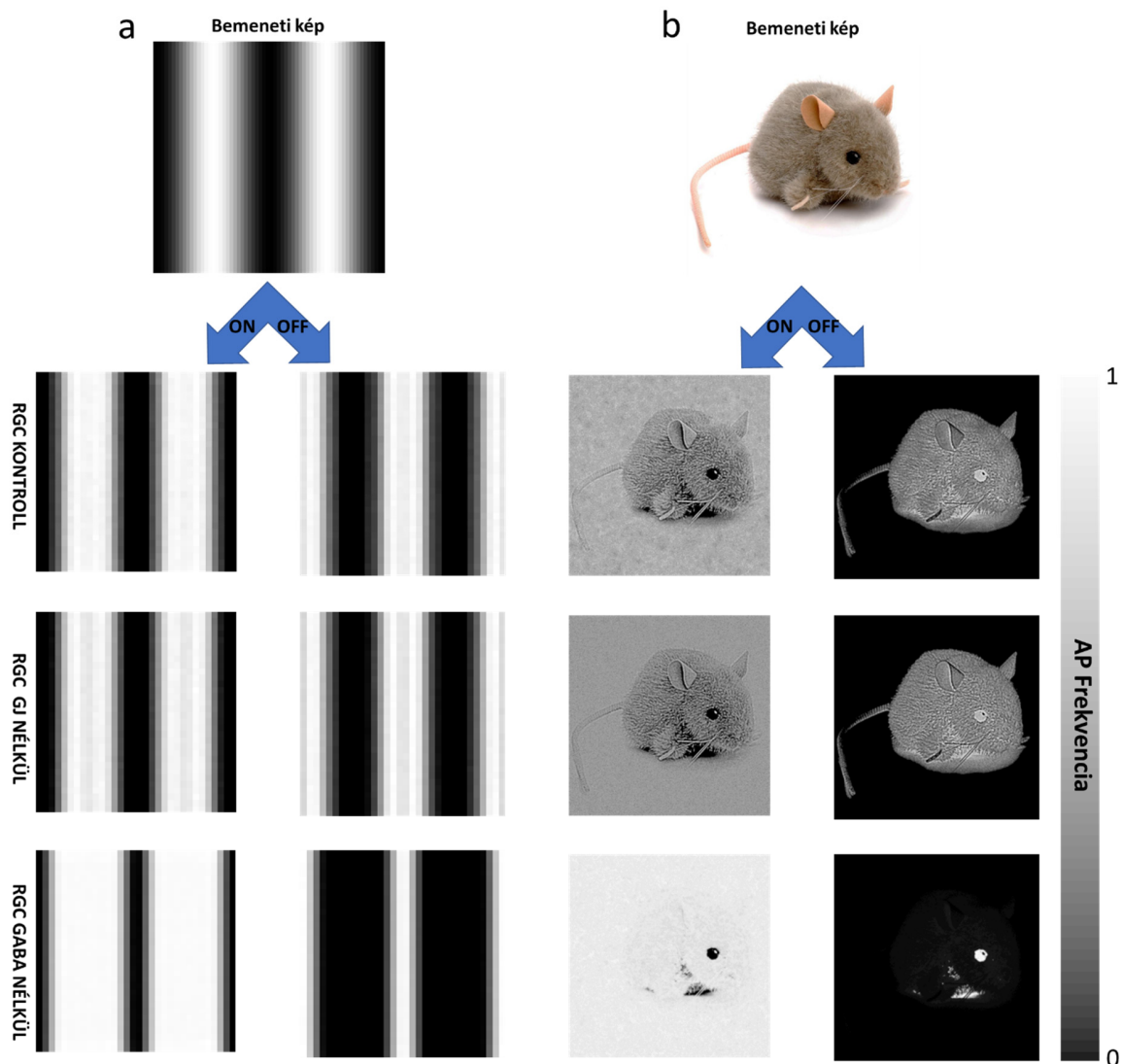
A retinális algoritmus és a korábbi funkcionális kísérleteink jobb megfeleltethetősége érdekében az ON-OFF stimulusok esetében kigyűjtöttük a stimulus kiváltotta (fehér képkocka - ON) első AP-k átlagos késési idejét³ minden dúcsejtre ($n = 1024$; 64×64 pixeles beolvastatott képi stimulus). Ugyancsak összegyűjtöttük minden sejt egyéni, próbák közötti varianciáját is, majd ezeket vetettük össze a kontroll és kísérletes felállások (GJ vagy GABA blokáád) között.

A modellben a válaszok késése hasonlóan változott a fiziológiai méréseinknél tapasztaltakhoz. Míg kontroll körülmények között az átlagos késés 6,246 képkockára volt a stimulustól, addig a GJ-k kiiktatásával ez az érték 6,231 (99,75%), a GABA rendszer kiiktatásával 5,985 (95,82%) volt. Habár ez a különbség elhanyagolhatónak tűnik, de statisztikai analízisünk alapján mindkét

³ Megjegyzés: Korábbi méréseinkben ugyan az AP-rátákat használtuk a válaszkésések megállapításához, erre a modellben nem volt lehetőségünk, metodikai korlátok miatt. Továbbá más korábbi munkákban is inkább az első AP késését (first-spike-delay) preferálták inkább (Chase és Young, 2007). Egy kiegészítő vizsgálatunkban azonban azt tapasztaltuk, hogy a késések eloszlása szinte megegyező volt a késési intervallumok tekintetében a két módszernél. Ugyan a first-spike-delay értékek általánosságban, természetükből fakadóan rövidebbek voltak (ON: 67,4 ms, SD = 43,3 ms, $n = 67$; OFF: 91,18 ms; SD = 120 ms, $n = 57$), mint a megfelelő PSTH késések, de az előbbi tapasztalás bizonyítja, hogy az adott kérdéskör vizsgálatára mindkét módszer helyes és jól alkalmazható megközelítés (lásd a dolgozatom alapjául szolgáló elsőszerzős cikk ide vonatkozó kiegészítő anyagát; Tengölics et al., 2019), így a modellenél kigyűjtött első AP késések összevethetők a korábbi AP rátán alapuló méréseinkkel.

esetben erősen szignifikáns volt a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,001$; páros Wilcoxon-próba; 20a ábra). A próbák közti varianciánál már jelentősebb különbség mutatkozott, kontroll kondíciók között ez 0,834 képkockányi volt, addig GJ-k nélkül 0,788-ra (94,48%), míg GABA nélkül 0,055-re (6,59%) csökkent. A különbség ebben az esetben is erősen szignifikáns volt ($p < 0,001$; páros Wilcoxon-próba; 20b ábra). A mérések eredményei tehát alátámasztják korábbi fiziológiai megfigyeléseinket, miszerint a retinális hálózatok GJ és GABA mediálta elemei hatással vannak a retinális dúcsejtek válaszkéséseire. Az is hasonlóság a két vizsgálati módszer eredményei között, hogy a GJ és GABA kapcsolatok kiiktatásával a sejtek egyéni válaszai is egységesebbek lesznek a válaszkésések tekintetében.

A továbbiakban azt teszteltük, hogy ezen retinális hálózati elemek milyen szerepet töltenek be a tényleges képfeldolgozásban. Módszerünk az volt, hogy a beolvastatott stimulust (21. ábra; fenn: „bemeneti kép”) összehasonlítottuk a modell által reprodukált dúcsejt aktivitási mintázattal (a dúcsejtek szintjén a retina által látott képpel). A képek reprodukciójához az algoritmus a sejtek AP frekvenciáját használta az egész kísérlet idejére vonatkozóan (összes AP/összes képkocka). Ezen frekvenciaértékeket aztán a következők szerint normalizálta: 1. az adott sejt AP frekvenciaértékéből kivonta az egész populáció legkisebb AP frekvenciaértékét, majd az így kapott értéket elosztotta az AP frekvenciatartománnyal (maximum AP frekvencia – minimum AP frekvencia, mindkettő az egész populációra vonatkozóan); 2. a normalizált relatív frekvenciaértékeket egy szürkeérték skálához rendelte; a kapott dúcsejt szürkeértékeknek megfelelő pixeleket retinotopikus mátrixba rendezve az algoritmus az eredményt egy szürkeárnyalatos kép formájában jelenítette meg (minden pixel egy sejtnak felel meg; ami a szinuszoid stimulus esetén $n=1024$, a természetes stimulus esetén $n=160\ 000$).



21. ábra: A stimulus RGC-k szintjén történő vizuális reprodukciója a sejtek relatív AP frekvenciái felhasználásával és ezek változásai a GJ és a GABA hálózat kiiktatása után. a. A legrepresentatívabb szinuszoid stimulus (2 ciklus/retina) reprodukciója az RGC-k ($n=1024$, egy pixel felel meg egy sejtnek, a sejtek relatív AP frekvenciája a jobb oldali skála szerint szín-kódolva) szintjén, kontroll, GJ kiiktatott és GABA kiiktatott körülmények között. Már itt is látszik a GABA kiiktatása után a finom kontrasztok eltűnése és az ON válaszok túlsúlyba kerülése a reprodukált képeken, azonban ennél a kísérletnél a GJ-k kiiktatása nem hozott látható markáns különbséget. **b.** A természetes stimulus reprodukciója az RGC-k ($n=160\ 000$, egy pixel felel meg egy sejtnek, a sejtek relatív AP frekvenciája a jobb oldali skála szerint szín-kódolva) szintjén. Ebben az esetben sokkal inkább tetten érhető, hogy a GABA kiiktatása révén csak a legélesebb kontrasztok maradnak érintetlenek, az ON válaszok teljes túlsúlyba kerülése révén. Ennél a kísérletnél a GJ kiiktatás esetében is szembe tűnnek a változások. A reprodukált kép ugyan némiképp élesebb lett, viszont eltűntek a kontroll körülmények között tapasztalt aktivitási gócpontok (sötétebb kerületű világosabb foltok a kép háttérében), a reprodukált kép sokkal homogénebb lett.

A GJ-k kiiktatásánál csak kis mértékben változott a reprodukált kép. Általánosságban elmondható, hogy GJ-k nélkül a kép némileg élesebb lett, eltűntek a legfinomabb kontrasztbéli átmenetek (21. ábra). A legjelentősebb különbség ugyanakkor a természetes stimulusnál volt elsősorban tetten érhető, ugyanis a kontroll felvételnél tapasztalt aktivitás gócpontok (világosabb foltok, körülöttük sötétebb koncentrikus átmenettel) teljesen eltűntek, vagyis a sejtek térbeli aktivitási mintázata (és velük együtt a reprodukált kép) sokkal homogénebb lett (21b ábra). Megjegyzés: a modell képes időben láthatóvá tenni a sejtek idő és térbeli aktivitását is, mely mozgókép formájában kinyerhető. Ez utóbbi felvételeken (itt nem mutatjuk) látszik, hogy az aktivitási gócpontok valójában tovahaladó aktivitási hullámok, melyeket a fiziológias Ca^{2+} -képződési és MEA extracelluláris méréseink során is gyakran tapasztalunk. A jelenlegi elképzelésünk az, hogy mivel ezek a tovahaladó hullámok folyamatos fényviszonyok, illetve homogén stimulus (modell) esetén a legintenzívebbek, ezért valószínű, hogy az ezek képi állandóságát, esetleg a képi motívumok egybetartozását kódolják. Ezek a hullámok a jelenség érdekes természeténél fogva későbbi kutatásaink potenciális tárgyát fogják képezni, a dolgozatban azonban a továbbiakban nem foglalkozok velük.

A GABAerg rendszer kikapcsolása tekintetében sokkal markánsabb különbségekre figyelhettünk fel. Az átmeneti kontrasztok itt szinte teljesen eltűntek, csak a stimulus legsötétebb és legvilágosabb részei maradtak kivehetőek, köszönhetően annak, hogy az ON aktivitás túlsúlyba került minden olyan területen, ahol volt bármilyen ON komponens (21. ábra). Ez bizonyítékul szolgál a GABAerg rendszer térbeli kontrasztérzékelést szabályozó funkciójára, különös tekintettel az ON sejtek esetében. A modellben végzett kísérletek tehát nagyrészt alátámasztották korábbi fiziológiai mérési eredményeinket és bizonyították az AC-ek felől érkező gátló mechanizmusok (GABAerg rendszer) és a GJ-k szerepét a dúcsejtek válaszkéséseinek kialakítása szempontjából. Ezen túlmenően a modell értékes eszköz lehet további vizsgálataink szempontjából, ugyanis nemcsak megerősítette korábbi méréseinket, hanem új kérdéseket is felvetett.

7. Az eredmények megbeszélése

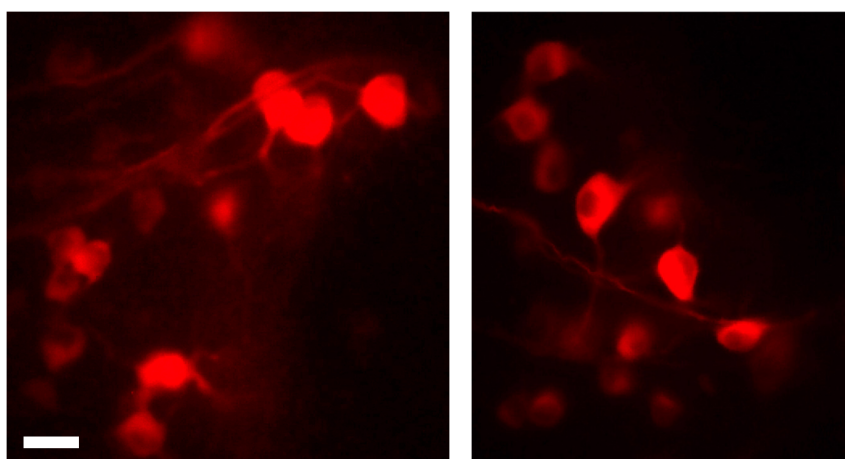
7.1. Metodológiai megfontolások

Az elektrofiziológiai méréseket munkatársaim végezték, viszont ezen vizsgálatok kiértékelése, a válaszkésések kinyerése és az ezek során alkalmazott analízis teljes mértékben a saját munkám eredménye, így ezen metodika tárgyalásánál is ez utóbbiakra fogok koncentrálni.

A Ca^{2+} -képződési metodika az egyik legjobb módszer több idegsejt paralel aktivitásának a vizsgálatára. Segítségével a sejtek egyéni aktivitásai jól összevethetők egymással, így a vizsgált szövet populációs aktivitása terén is levonhatjuk következtetéseinket. A kémiai indikátorokkal végzett vizsgálatok széles körben elterjedtek és a mai napig sok tanulmányban alkalmazottak (Hartwick et al., 2005; Behrend et al., 2009; Briggman és Euler, 2011), és korábban laborunkban is nagy sikerrel alkalmazott technika volt. Azonban az eredmények leírásakor tárgyalt problémák miatt kísérleteinkben indikátor termelő transzgenikus egértörzseket alkalmaztunk. A Thy1-GCaMP3 és GCaMP6f törzsek mindegyike magában hordozza a kémiai indikátorok előnyeit (például az Oregon Green fixálás utáni tartóssága), de kiküszöböli az indikátor töltésével járó procedúra összes negatív hatását. Ez a két leggyakrabban használt törzs fenntartott, stabil vonalakat képez így a transzgen generációkon át örökíthető. A birtokunkban lévő GCaMP6f törzs idegsejtjei önmagukban nem termelik az indikátor fehérjét, a gén kifejeződéséhez szükség van egy másik vonallal való keresztezésre. Laborunkban erre a célra Parvalbumin-Cre törzset használtuk mellyel a keresztezést követően PV-GCaMP6f utódokat kaptunk. Ezekben az egerekben minden PV⁺ neuron így az egér retinában 7 dúcsejt típus (Münch et al., 2009) termeli a GCaMP6f indikátor fehérjét. A GCaMP6f igen nagy előnye, hogy az indikátor az egyik leggyorsabb kinetikával rendelkezik a piacon elérhető GECI-k közül, szinte AP gyorsaságú Ca^{2+} válaszok rögzíthetők a segítségével (Chen et al., 2013; Dana et al., 2014). Ugyanakkor egyik hátránya (legalábbis az általunk létrehozott hibrid állatoknak), hogy csak a dúcsejtek egy bizonyos alpopulációjában expresszálódik (PV⁺ sejtek). Ezzel szemben a Thy1-GCaMP3 egy tiszta vonal, mely egyedeknek minden retinális dúcsejtje expresszálja az indikátort, ugyanakkor ez sokkal lassabb kinetikájú, mint a GCaMP6f esetén (Tian et al., 2009; Zariwala et al., 2012). Mivel a dolgozatban olyan kérdéseket szeretünk volna megválaszolni, amely az összes dúcsejt vizsgálatát megkívánta, ezért főként a Thy1-GCaMP3 egereket használtuk a kísérletekben. Ugyanakkor a PV-GCaMP6f egerek is hasznosnak bizonyultak abban a kísérletsorban, amikor

mindkét egértörzs dúcsejtjein végeztünk méréseket és azok összehasonlítása után meggyőződhattünk arról, hogy a képalkotási vizsgálatokban kapott eredmények nem a GCaMP3 indikátor lassú kinetikájának köszönhetőek (a gyors GCaMP6f indikátorral végzett kísérletek nagyon hasonló eredményre vezettek). Azon túl, hogy a vonal könnyebben fenntarthatónak bizonyult, a GCaMP3 dúcsejtek fluoreszcens jele is sokkal erősebb volt, továbbá jobban reagált a paraformaldehides fixálásra is, így post-hoc IHC vizsgálatokra is alkalmasabbnak bizonyult. Ez utóbbi tényező különösen azután vált fontossá, amikor kiderült, hogy neurokémiai markerek (CaBP-k) alkalmazásával nem fogjuk sikeresen elkülöníteni a mintegy 30 egynéhány dúcsejt típust (ugyanennyi párhuzamos pályát) egymástól és a méréseket követően a GCaMP3 jel alapján leszünk kénytelenek *trace*-elni és a sejteket azonosítani.

A fentebb említett GMO állatok mind stabil törzsek, azonban laborunkban mi magunk is képesek vagyunk előállítani genetikailag kódolt kalcium indikátort hordozó állatokat virális injekció technikával. Itt a fehérjetermelődésért felelős gént egy vírus vektor (általában AAV; Chen et al., 2013; Weitz et al., 2013) hordozza. A célsejtek megfertőzését követően azok kifejezik a bejuttatott szekvenciában kódolt fehérjét. Intravitrealis injekcióval hozható létre laborunkban például a RedCaMP GMO egér is, melyben a vírus vektorral bejuttatott fehérjekódoló szekvencia egy olyan indikátor termelődését idézi elő az egér dúcsejtjeiben, mely emissziós és excitációs hullámhossza is a vörös tartományba esik.



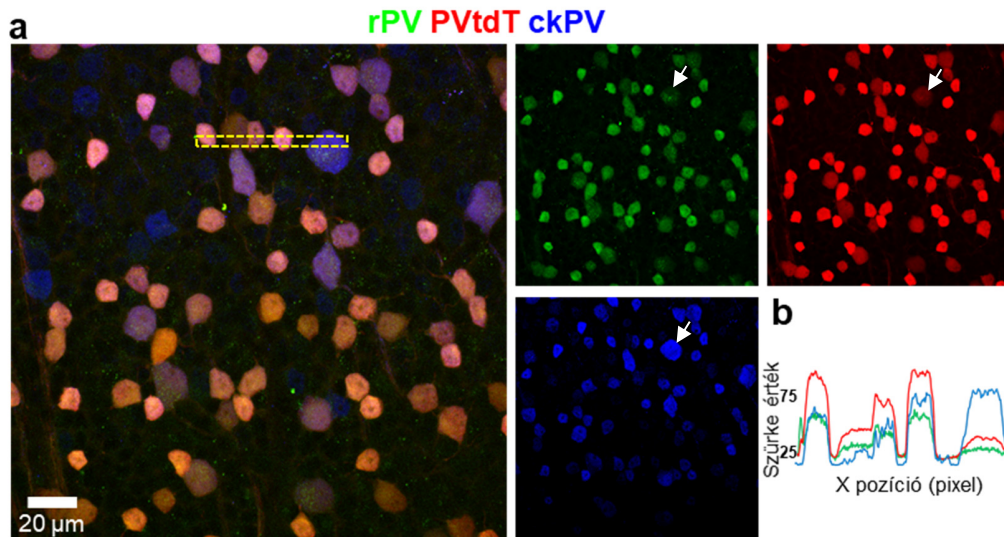
22. ábra: Redcamp Ca^{2+} indikátorral készült felvételek. Az indikátor magas biztonsággal jelöli az RGC-ket (Aránymérték: 20 μm)

Ez azért is fontos számunkra, mert az egér vörös csapok hiányában érzéketlen arra a fénytartományra, amellyel a képalkotási vizsgálatokat végezzük (22. ábra). A dolgozatom kísérleteinek elvégzésekor ez utóbbi lehetőség még nem állt rendelkezésünkre, de a jövőben tervezzük a RedCaMP állatok felhasználását kísérleteinkben.

Hasonlóan a képalkotási kísérletekhez, az elektrofiziológiai méréseknél is esetlegesen felléphettek olyan metodikai hibák, melyek torzíthatták a végső eredményeinket. Az általunk vizsgált RGC-k egy igen heterogén populációt alkottak, tekintve, hogy a mért sejtek többsége véletlenszerűen került kiválasztásra előzetes morfológiai beazonosítás nélkül, így a vizsgált sejtek fényválaszaik tekintetében is nagy változatosságot mutattak. A tapasztalt heterogenitás független volt a napszaktól, az egerek korától (P20-P90) vagy a preparáció és a mérés között eltelt időtől, vagyis összességében a mérési körülményektől. A méréseink eredményei ugyancsak függetlenek voltak az alkalmazott kísérleti metodikától (extracelluláris elvezetés, MEA, Ca^{2+} -képalkotás; 24. ábra) így ez tovább erősíti megállapításaink helyességét. Problémát jelenthetne továbbá a PSTH-k megalkotása során használt időbeli felbontás (10 ms), mely önmagában maximálisan +/- 5ms hibát eredményezhet adatainkban. Ha azonban tekintetbe vesszük az egész RGC populáció igen széles késési tartományát (kb 40-240 ms), akkor kijelenthetjük, hogy ez a hiba jelentéktelen a megállapított késési intervallumhoz képest. Továbbá tény, hogy hasonló fényválasz késésszerű különbségeket már korábban is leírtak különböző állatfajok retináin (Gollisch és Meister, 2008; Gollisch, 2009; Farrow és Masland, 2011), így a mi eredményeink is alátámasztják korábbi vizsgálatok eredményeit.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapját részben a jelölési intenzitás képezte. Ezzel kapcsolatban felmerülhet a probléma, hogy a jelölés intenzitása függhet a használt antitesttől. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára többszörös jelölést alkalmaztunk PV-tdT GMO egér retináján, két különböző állatból származó (rabbit/nyúl – r; chicken/csirke -ck) a-PV antitesttel és ezek intenzitásait vetettük össze egymással, remélve, hogy nem találunk lényeges különbséget. Megnyugtató eredmény volt az, hogy a jelölés specifikálásában nem volt különbség a különböző markerek esetén, tehát nem találtunk olyan sejteket, melyeket csak az egyik vagy másik szérum jelölt volna. De sajnos a jelölési intenzitást nagymértékben antitestfüggőnek találtuk, a nagy sejttestű RGC-k alacsony intenzitású jelölést mutattak a nyúlban termeltetett antiszérum

használata esetén, míg magas intenzitást a csirkében termeltetett szérum esetén (23b ábra és a fehér nyilak).



23. ábra: A jelölés intenzitás és a használt antitest közötti kapcsolat. a, A PV-tdT, nyúl-PV (rPV) és a csirke-PV (ckPV) antitest jelölések összehasonlítása, ugyanazon a retinán. **b,** A kimetszett terület (**a, jobbra**) a normalizált relatív intenzitások eltéréseit mutatja, a PV-tdT (piros) és a nyúl- (zöld), valamint a csirke-PV (kék) jelölések között.

Nehéz azonban azt meghatározni, hogy ezek a jelölésbeli különbségek milyen mértékben járultak hozzá a mért eredményeinkhez, mindenesetre ettől függetlenül is úgy találtuk, hogy a CaBP-kre alkalmazott IHC jelölés nem alkalmas az RGC-k morfológiai beazonosításához. Ugyanakkor ez utóbbi megfigyeléseink érdekes újabb, esetleg a későbbiekben vizsgálandó kérdéseket vetnek fel. Érdekes volna megismerni például a háttérét a különböző állatfajokból származó szérumok affinitásbeli különbségének. Elképzelhető, hogy a válasz az antigén reaktív epitópjának sztérikus viszonyaiban (térbeli hozzáférhetőség) rejlik, esetleg a működési állapottal (Ca^{2+} -kötés megléte/hiánya) is összefügghet. Ezek a kérdések jelenlegi ismereteink alapján nem megválaszolhatók és valószínűleg jövőbeli kutatások tárgyát képezik majd.

7.2. Az RGC válaszkésések heterogenitása

7.2.1. A válaszkésések tartománya és sejtípus specifitása

Munkánk során megállapítottuk, hogy az egér retina dúcsejtjeinek populációja egy viszonylag széles időintervallumon (kb. 40-240 ms) belül válaszol a fotopikus homogén fénystimulusra. Ez

a tartomány már önmagában mutatja a válasz késések heterogenitását, viszont mivel az eloszlási hisztogramokon nem tapasztaltunk élesen elkülönülő csoportokat, ezért a késések sejttípus specifikitása még további kérdés maradt. Azonban az összességében alacsony próbák közötti variabilitás részben alátámasztotta ezt a feltevést, ugyanis az ismételt stimulusokra adott válaszok varianciája maximálisan 10%-ban (kb. 24ms) járulhatott hozzá a megfigyelt széles válaszkésési tartományhoz. Hipotézisünket végül azok a megfigyelések támasztották alá, ahol a vizsgálatainkat két RGC altípusra szűkítettük („füрге” és „lomha” OFF-alfa RGC-k), melyekről kiderült, hogy fényválaszaik csak egy sokkal szűkebb késési tartomány fedtek le. A vizsgálatainkat egyelőre további, az *in vitro* preparátumon jól felismerhető, dúcsejtre nem terjesztettük ki, hogy a megfigyelést általános érvényűnek tekinthessük. Ugyanakkor számos korábbi megfigyelésünk és más kutatócsoportok adatai is azt bizonyítják, hogy a retinális dúcsejtek az ismételt stimulusokra relatíve megbízhatóan mindig nagyon hasonló kinetikai paraméterekkel (késés, tranziencia, ISI stb.) rendelkező fényválaszt produkálnak (Farrow és Masland, 2011; Baden et al., 2016). Ennélfogva nem gondoljuk, hogy túlságosan merész feltételezés az, hogy minden egyes dúcsejt egy relatíve keskeny válaszkésés tartománnyal rendelkezik és a teljes populáció esetén tapasztalt széles tartomány ezen egymással részben átfedő késéstartományok összességéként jelentkezik.

7.2.2. A retinális hálózat meghatározó szerepe a válaszkésések kialakításában

Továbbra is kérdés maradt azonban, hogy az altípus specifikus válaszkésési tartományok az egyes dúcsejttípusok eltérő sejtspecifikus membrántulajdonságain alapszanak, vagy a preszinaptikus retinális útvonalakon történő jelátvitel sebessége különbözik a retinális pályák között (és a pályák által megcélzott dúcsejt típusok között)? Erre a kérdésre is választ kaptunk, mikor a retinális hálózati elemek hatását az elektromos ingerlés segítségével kiküszöböltük. Ekkor a válaszok sebessége jelentősen felgyorsult (PSTH alapján kb. 10 ms), ami a direkt elektromos ingerlés miatt várható volt. Ugyanakkor a válaszok nem egyszerűen gyorsabbak lettek, hanem az általuk lefedett késési tartomány is kb. 200 ms-ról, kb. 10 ms-ra csökkent (a 10 ms gyakorlatilag a legkisebb bin-méret volt az analízisünkben, tehát a valós érték valószínűleg még alacsonyabb ennél). Ez a megfigyelés igazolta, hogy nem a dúcsejttípusok eltérő membrántulajdonságai, hanem a preszinaptikus hálózatokon zajló jelátvitel sebessége az, ami az elsődleges meghatározó faktora az RGC-k válaszkéséseinek.

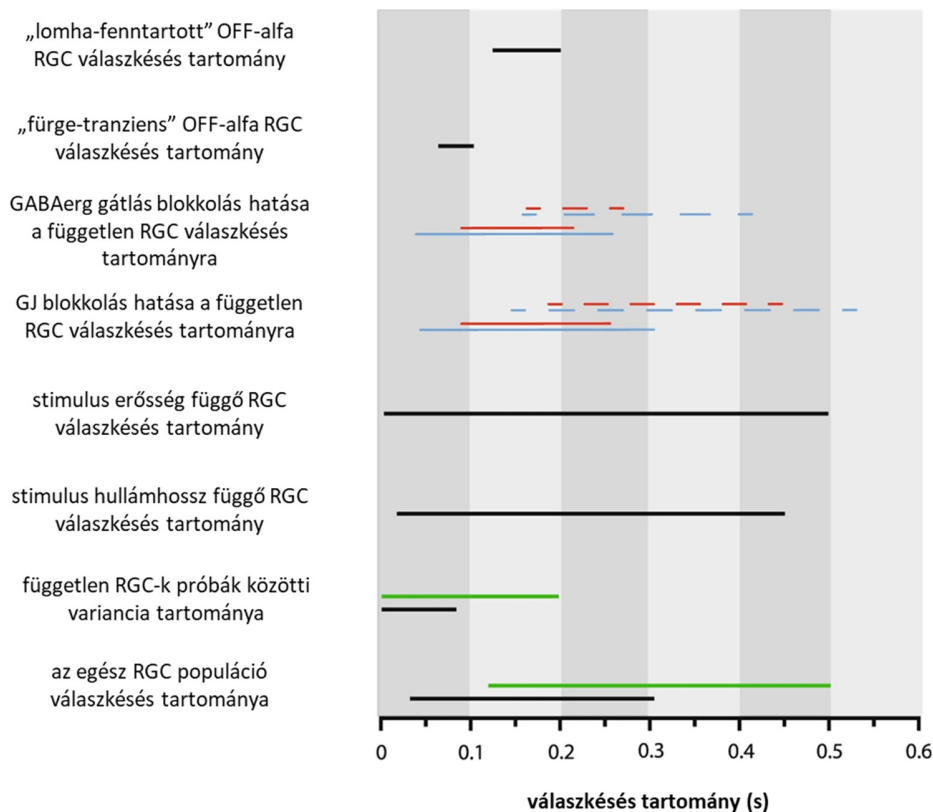
A fenti bizonyítékok ellenére azonban továbbra is felmerülhet, hogy esetleg más faktorok is hozzájárulhatnak a vizsgálatainkban megállapított széles időkézési tartományhoz. Az egyik ilyen aspektus a retinális dúcsejtek válaszaiban mutatkozó régióspecifikus válaszkésési különbségek. Ugyan főemlősöknél bizonyították, hogy a *fovea midget* dúcsejtjei 30 ms-al lassabban válaszolnak a fénystimulusra, mint a periférián található társaik (Sinha et al., 2017), azonban az egér esetében nem található ilyen kiemelt retinális régió (Dräger és Olsen, 1981; Jeon et al., 1998). Ezzel szemben ugyan némi *dorso-ventrális* különbségek megfigyelhetők az egér retina csap fotoreceptorainak érzékenysége tekintetében (Szél et al., 1992; Sun et al., 1997; Lyubarsky et al., 1999), azonban vizsgálatainkban feltárt dúcsejt késések igen nagy heterogenitást mutattak minden régióban, így véleményem szerint kizárható ezen a *dorso-ventrális* különbségek szerepe. Továbbá annak ellenére, hogy méréseinkben mi homogén, teljes mezejű stimulust alkalmaztunk, megfigyeléseinket alátámasztják azok a korábbi tanulmányok, ahol hasonló válaszsebességbeli különbségeket figyeltek meg a tárgy mozgását kódoló és a tárgy kontrasztját kódoló AP-ok sebessége között (Baldo és Klein, 1995; Purushothaman et al., 1998; Whitney és Murakami, 1998), melyek feltehetőleg különböző funkcionális altípusba tartozó RGC-ktől származnak. A szakirodalmi adatokon túl saját Ca^{2+} -képződési kísérleteink eredményei is arra utaltak, hogy már a dúcsejtekhez eljutó bemenetek késései is számottevőek. Ezeknek a fénystimulus kiváltotta tranziens eseményeknek mind a késési tartománya, mind az egyes sejtek válaszainak variabilitása összevethető az elektrofiziológiai megfigyeléseink eredményeivel. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy kizárható az a lehetőség, hogy a különböző retinális pályákon nagyjából hasonló sebességgel halad az információ, a különböző típusú dúcsejtek felé és csak a dúcsejtek heterogén membrántulajdonságai (eltérő λ és τ , eltérő elhelyezkedésű és koncentráltágú Na^+ csatorna az axon iniciációs szegmens területén stb.) játszanának szerepet a válaszkésések heterogenitásának kialakításában. A fentiek alapján tehát kijelenthető, hogy az első vizsgálatnál tapasztalt széles válaszkésési intervallum a különböző funkcionális altípusba tartozó dúcsejteket megcélzó preszinaptikus pályákon történő információáramlási sebességek heterogenitásának tudható be.

7.2.3. A stimulus paraméterek hatása a válaszkésésekre

Kísérleteink alapján tehát nyilvánvaló volt, hogy a dúcsejtek ugyanazon stimulusra adott válaszkésései típusfüggőek és a késések sebességét elsősorban a preszinaptikus pályák sebességei határozzák meg. Ugyanakkor korábbi tanulmányokban beszámoltak válaszkésések és

stimulus paraméterek közötti összefüggésekről (Gollisch és Meister, 2008; Gollisch, 2009; Gütig et al., 2013). Például egy V1 sejt válaszkésése módosítható akár 40-50 ms-mal is egy mozgó sáv-, vagy szinuszoid stimulus kontrasztjának vagy orientációjának a változtatásával (Carandini és Heeger, 1994; Albrecht, 1995; Gawne et al., 1996). Ezekben a kísérletekben általában a mozgással és a kontraszttal, mint két különböző képi aspektus információjának szállítási sebességével foglalkoztak. Ezeket a megfigyeléseket támasztották alá és egészítették ki a mi vizsgálataink is, melyekkel megmutattuk, hogy a stimulus erőssége, illetve kromatikus jellemzői (szín) miként módosítják a vizuális szignalizáció sebességét (az RGC-k válaszkéséseit). Míg a stimulus erőssége és a válaszkésések között fordított arányosság volt (erősödő stimulusra gyorsabban rövidebb késésekkel válaszoltak a sejtek), addig a kromatikus aspektusok tekintetében nem volt megállapítható ehhez hasonló összefüggés. Ez utóbbi esetben sokkal inkább az volt jellemző, hogy bizonyos RGC-k gyorsabban válaszoltak bizonyos hullámhossz tartományokra (általában a fotoreceptorok abszorpciós maximumához közel eső zöld fényre), mint másokra. A mi méréseink azt is megmutatták, hogy a párhuzamos képi pályákon haladó információ sebességbeli különbsége már retinális szinten is jelentkezik, és annak értékét a dúcsejteket bemenetekkel ellátó retinális pályák határozzák meg. Az általunk tapasztaltak és a korábban e téren végzett tanulmányok arra engednek következtetni, hogy a szignalizáció sebességbeli különbségei magasabb rendű funkcionális jelentőséggel bírnak, melyek feladata valamiképpen a látott kép komponenseinek a kódolásával függ össze. Ezt a feltevést támogatják azok a korábbi eredmények, melyek arra mutatnak rá, hogy az információáramlás különböző sebességgel halad az eltérő, párhuzamos retinális útvonalakon. Például a főemlősök *fovealis* fotopikus útvonalai lassabb jeleket küldenek az agyba a tárgy finom strukturális részleteiről, szemben a perifériás retinális útvonalak gyors szignáljaival, melyek elengedhetetlenek a gyorsabb mozgások észleléséhez (Solomon et al., 2002; Masland, 2017; Sinha et al., 2017). A válaszkésések képi információ kódolásában betöltött szerepét igazolja az a korábbi megfigyelés is, mely szerint a posztzinaptikus jelfeldolgozás dinamikája erősen függ a bejövő AP-ok időzítésétől (Usrey et al., 2000). Ezek alapján feltételezhető egy olyan temporális szűrő léte a vizuális központokban, mely a különböző vizuális információ morzsákról (szín, kontraszt, mozgás stb.) bejövő elkülönült AP sorozatokat egy rájuk jellemző időablak szerint válogatja szét a nekik megfelelő agyi információs útvonalakra. Ez az időablak mintegy szűrőként funkcionál: a kívül eső AP sorozatokat elveti, vagy egy másik információs pályára kapcsolja át. Ezt a feltevést

bizonyítja az a korábbi felfedezés, mely rámutat, hogy a macska kortikális piramis sejtjeiben egy kb. 2-9 ms-os időkonstans mérhető (Cardin et al., 2007), mely egy erős temporális szűrő jelenlétét feltételezi a vizuális kéregben.



24. ábra: A különböző stimulálási körülmények közötti válaszkésési tartományok összefoglalója. A diagram összehasonlítja a válaszkésési variációkat és változásokat, melyek ennek a dolgozatnak a részét képezték. A stimulálási és felvételi paradigma a bal oldalon olvashatók, a késési tartományokat a vízszintes szakaszok hossza ábrázolja (fekete – extracelluláris felvételek, zöld – Ca^{2+} -képződés, kék és piros – kontroll és farmakológiai körülmények az extracelluláris elvezetések (sima vonal) és a Ca^{2+} -képződési kísérletek (szaggatott vonal) esetén.

Ez az időkonstans feltehetőleg egy szigorú és szűk szűrőként funkcionál, mely szerint ezek a sejtek csak a megfelelő, 10 ms alatti befutó jeleket használják fel saját AP-jaik generálásához, így a nem megfelelő információkat ezzel a mechanizmussal elvetik, kiszűrik. Kísérleteink arra is rámutattak, hogy a válaszkésések kialakításában a dúcsejteket bemenetekkel ellátó párhuzamos retinális pályákon haladó információ sebességének van elsődleges szerepe (direkt stimulációs kísérletek és a Ca^{2+} események válaszkéséseinek heterogenitása). Ezeknek a retinális pályáknak az időkései a belső retina laterális inhibitoros (GABAerg amakrin sejtek) és serkentő (GJ kapcsolt amakrin sejtek) kapcsolatainak aktivitása, azok dinamikája határozza meg. Ez utóbbi

megállapításainkat az állatkísérleteken kívül az alkalmazott retinális számítógépes modell retinahálózaton végzett kísérletek is megerősítették. A szerzett ismeretek fényében feltételezzük, hogy a válaszkésések változtatásának a képessége egy olyan eszköz, melyet a látórendszer arra használ, hogy súlyozza az egyes pályákon haladó információkat, azok felsőbb integrátorokon kiváltott hatását és ezzel a képi környezet érzékelését. Továbbá az is egyértelmű munkánkából, hogy az időkésések finomhangolása már a retinában, a dúcsejteket informáló párhuzamos pályák szintjén megtörténik.

7.3. A párhuzamos információs csatornák csomópontjaiként funkcionáló RGC-k azonosítása

Az elektrofiziológiai és képalkotási kísérletek egyik eredménye az, hogy felismertük a különböző információs csatornákon haladó jel kinetikájának (ebben a munkában csak az időkésésekkel foglalkoztunk) a sokféleségét, és azt, hogy ez a sokféleség RGC/információs pálya specifikus. Ennél fogva egyik hosszútávú célunk az, hogy a párhuzamos információs pályák csomópontjaiként szereplő dúcsejteket morfológiai ismérveik alapján elkülöníthessük (megjegyzés: a dúcsejtek azért tekinthetők információs csomópontoknak, mert minden egyes típus szelektíven bemenetet kap egy-egy retinális információs útvonalon és az információ feldolgozása után tőlük indulnak a retino-genikulo-kortikális párhuzamos pályák). Első megközelítésben szeretnénk volna egyszerű immuncitokémiai módszerekkel legalább az RGC populáció egy kisebb hányadát típusspecifikus módon az ismert CaBP-k segítségével egymástól elkülöníteni. Ez a kísérletünk sajnos nem volt sikeres, mert: 1. a CaBP-k mindegyike (és ezek kombinációi is) több RGC populációt jelöl; 2. a CaBP-k expressziós szintjei még egy sejtípus képviselőit tekintve is nagyon változékonyak (ugyanannak a sejtípusnak lehetnek akár termelő és nem termelő képviselői is); 3. a jelölési intenzitás függhet az alkalmazott antitesttől.

Egy másik próbálkozásunk ugyanakkor sikeresnek bizonyult, és valószínűleg a közeljövőben alkalmazni is fogjuk a vizsgált dúcsejtek morfológiai azonosítására. Ennél a technikánál a képalkotási vizsgálatokat követően, konfokális felvételeket készítünk a vizsgált területről és egy-egy vagy több dúcsejtet a Fiji program, *tracer*-követési technikája segítségével, teljes dendritfával és elágazásrendszerrel rekonstruálunk. Bár ez a technika nagy odafigyelést és sok ráfordított időt igényel, de a mi kísérleti paradigmánk esetében tökéletesen alkalmazható (megjegyzés: ezt a metodikát dolgozatomban kísérletes részének befejezése után dolgoztuk ki és főleg a laborban dolgozó munkatársaim végzik, ezért a dolgozatban ezzel nem foglalkoztam bővebben).

7.4. Az interneuronális kapcsolatok szerepe a retinális kód kialakításában

A vizsgált retinális hálózati elemek válaszok késésére gyakorolt hatását egy neuromorf retina modellben is sikerült igazolni. Itt eloszlási tartomány megállapítása nem volt indokolt, hiszen a modell minden RGC-je és kapcsolati rendszere teljesen azonos egymással, de a sejtek egyéni válaszkinetikai szintjén a változások egyértelműek és egybevágóak a fiziológiai kísérletek eredményeivel. Az eloszlási tartományt nem tudtuk ugyan megerősíteni a modellel, de segítségével betekintést nyerhettünk a vizsgált hálózati elemek tényleges képi kódolásban betöltött szerepébe. Ezek alapján úgy tűnik, hogy mindkét rendszer többé-kevésbé a kontrasztjelenségek finomhangolásában játszik szerepet. Míg ezen a téren a GJ-k kiiktatása csak elenyésző változást eredményezett, mely a finom kontrasztjelenségek romlásában érhető tetten, addig a GABAerg blokkolás kiiktatása nagymértékben kiiktatta az átmeneti kontrasztokat (az objektum élei eltűntek a reprodukált képről). A GABAerg gátlás kiiktatásával túlsúlyba került az ON fényválasz a vizuális stimulus azon részein, ahol ON és OFF komponensek is keveredtek valamilyen arányban. Ezek alapján látszik, hogy a AC-ek felől érkező GABAerg inhibíció nagy szerepet játszik a stimulus térbeli komponenseinek egymástól való elválasztásában, a megfelelő sejtek laterális gátlása révén. További érdekesség, hogy a GJ-k kiiktatásával eltűntek a reprodukált stimulusról az aktivitási gócpontokat jelző, magasabb AP frekvenciájú (képen világosabb; 21b ábra) központtal és alacsonyabb AP frekvenciájú (képen sötétebb; 21b ábra) környékkel rendelkező területek. Ezek a gócpontok azokat az aktivitási hullámokat reprezentálják, melyeket az elektrofiziológiai és képalkotási kísérletünkben is tapasztaltunk korábban (a dolgozat anyagában nem szerepel). Feltételezzük, hogy ezek az aktivitási hullámok is fontos szerepet töltenek be a retina működésében és a képi információ kódolásában. Továbbá ezt a feltételezést erősíti az a megfigyelés is, hogy ezek a hullámok nemcsak a modell esetén, hanem az elektrofiziológiai és képalkotási kísérleteinkben is megszűnnek a GJ-k blokkolását követően. Ezen feltevések megerősítése azonban további, jövőbeli vizsgálatok tárgyát fogja képezni.

8. Összefoglalás

Az RGC-k egy heterogén idegsejt-populációt alkotnak az emlősök idegrendszerében, különböznek morfológiai sajátosságaikban, neurokémiai markereikben és funkciójukban. Kutatásaink középpontjában a párhuzamos retinális pályákon történő információszállítás és a vizuális stimulusok retinális kódolása áll. A témában végzett kutatásaink alapján a következő főbb eredményekre jutottunk:

1. Kidolgoztuk a Ca^{2+} -képalkotási technikák egy megbízható változatát az általunk használt *in vitro* egér (*Mus musculus*) retinán.
2. Bebizonyítottuk, hogy a párhuzamos retinális csatornákon haladó információ RGC típus-specifikus eltéréseket mutat a fényválaszok kinetikája (késés) tekintetében.
3. Megfigyeltük, hogy az RGC válaszkésések finomhangolásához a preszinaptikus retinális pályák aktív részvétele szükséges (különös tekintettel a laterális GABAerg és GJ-mediálta információáramlásra). Feltételezzük, hogy a válaszkésési finomhangolással a látórendszer súlyozza a szállított információ hatásfokát a felsőbb integrátorok aktiválásának tekintetében.
4. Az általunk vizsgált három CaBP nem bizonyult használható sejtspecifikus markernek, de a konfokális mikroszkópia és *offline tracer*-követési metodológia kombinációjával kidolgoztuk a képalkotási vizsgálatokban rögzített RGC-k azonosításának technikáját.
5. A retinális modellel végzett kísérletek nagyrészt alátámasztották a kísérleteinkben kapott eredményeket. Ezen felül a modell olyan új funkciót jósolt a GABA és GJ mediálta információáramlás képi kódolásban betöltött szerepének, melyet a közeljövőben érdemesnek tartunk tesztelni kísérletesen is.

9. Summary

The RGCs form a heterogenous population in the mammalian nervous system. They differ in their morfological aspects, neurochemical markers and functions. The main focus of our studies were the signaling of paralel retinal pathways and the coding of the visual stimuli in the retina. In our examinations, we came to the following conclusions:

1. We worked out a reliable Ca^{2+} -imaging technic on our main experimental model: the *in vitro* mouse (*Mus musculus*) retina.
2. We proved that the signaling on the paralel retinal pathways is RGC subtype specific in the term of the light response latencies.
3. We observed the active role of the presynaptic retinal circuits (especially the lateral GABAerg and GJ-mediated signaling) in the fine-tuning of RGC response latencies. We assume that the visual system utilizes this fine-tuning to weigh the efficiency of the carried information for the superior integrators.
4. The observed three CaBPs did not prove to be cell-type specific markers, but with the combination of confocal microscopy and the offline tracer tracking methodologies, we worked out the indentification technic of the RGCs recorded in the imaging experiments.
5. The experiments with the retina model mostly supported our physiological results. Moreover, it suggested us such a new functions to the role of GABA- and GJ-mediated signaling in the coding of visual information, which is worth for experimental testing in the near future.

10. Felhasznált irodalom

- Aboelela, S. W., & Robinson, D. W. (2004). Physiological response properties of displaced amacrine cells of the adult ferret retina. *Visual neuroscience*, 21(2), 135–144. doi:10.1017/s0952523804042051
- Akerboom, J., et al. (2013). Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6:2. doi:10.3389/fnmol.2013.00002
- Albrecht, D. G. (1995) Visual cortex neurons in monkey cat: effect of contrast on the spatial and temporal phase transfer functions. *Vis. Neurosci.*, 12(6):1191-210. doi:10.1017/s0952523800006817.
- Baccus, S. A., Ölveczky, B. P., Manu, M., & Meister, M. (2008). A Retinal Circuit That Computes Object Motion. *Journal of Neuroscience*, 28(27), 6807–6817. doi:10.1523/jneurosci.4206-07.2008
- Badea, T. C. & Nathans, J. (2004). Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *The Journal of Comparative Neurology*, 480(4), 331–351. doi:10.1002/cne.20304
- Baden, T., Berens, P., Franke, K., Román Rosón, M., Bethge, M. & Euler, T. (2016). The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*, 529(7586), 345–350. doi:10.1038/nature16468
- Baldo, M. V. C. & Klein, S. A. (1995) Extrapolation or attention shift? *Nature*, 378, 565–566. doi:10.1038/378565a0
- Barlow, H. B. & Levick, W. R. (1965) The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J. Physiol.*, 178(3):477-504. doi:10.1113/jphysiol.1965.sp007638.
- Barlow, H. B., Hill, R. M. & Levick, W. R. (1964) Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J. Physiol.*, 173(3):377-407. doi: 10.1113/jphysiol.1964.sp007463.
- Behrend, M. R., Ahuja, A. K., Humayun, M. S., Weiland, J. D. & Chow, R. H. (2009). Selective labeling of retinal ganglion cells with calcium indicators by retrograde loading in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 179(2), 166–172. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.01.019
- Bernard, M., Dejos, C., Bergès, T., Régnacq, M. & Voisin, P. (2013). Activation of rhodopsin gene transcription in cultured retinal precursors of chicken embryo: role of Ca²⁺ signaling and hyperpolarization-activated cation channels. *Journal of Neurochemistry*, 129(1), 85–98. doi:10.1111/jnc.12624
- Berridge, M. J. (1998) Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21(1):13-26. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80510-3.
- Blandford, S. N., Hooper, M. L., Yabana, T., Chauhan, B. C., Baldrige, W. H. & Farrell, S. R. M. (2019) Retinal Characterization of the Thy1-GCaMP3 Transgenic Mouse Line After Optic Nerve Transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 60(1):183-191. doi:10.1167/iovs.18-25861

- Borghuis, B. G., Tian, L., Xu, Y., Nikonov, S. S., Vardi, N., Zemelman, B. V., & Looger, L. L. (2011). Imaging Light Responses of Targeted Neuron Populations in the Rodent Retina. *Journal of Neuroscience*, 31(8), 2855–2867. doi:10.1523/jneurosci.6064-10.2011
- Briggman, K. L. & Euler, T. (2011). Bulk electroporation and population calcium imaging in the adult mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, 105(5), 2601–2609. doi:10.1152/jn.00722.2010
- Cajal, S. R. y (1892) La rétine des vertébrés. *Cellule*, 9:121–225
- Carandini, M. & Heeger, D. (1994) Summation and division by neurons in primate visual cortex. *Science*, 264(5163):1333-6. doi:10.1126/science.8191289.
- Cardin, J. A., Palmer, L. A. & Contreras, D. (2007) Stimulus feature selectivity in excitatory and inhibitory neurons in primary visual cortex. *J. Neurosci.*, 27(39):10333-44. doi:10.1523/JNEUROSCI.1692-07.2007.
- Chase, S. M. & Young, E. D. (2007) First-spike latency information in single neurons increases when referenced to population onset. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(12):5175-80. doi:10.1073/pnas.0610368104.
- Chen, T-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K. & Kim, D. S. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. doi:10.1038/nature12354
- Cohen, E. D. & Miller, R. F. (1995). Quinoxalines block the mechanism of directional selectivity in ganglion cells of the rabbit retina. *Proceedings of the National Academy of Science*, 92(4), 1127–1131. doi:10.1073/pnas.92.4.1127
- Coombs, J., van der List, D., Wang, G.-Y. & Chalupa, L. M. (2006). Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience*, 140(1):123-36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.079.
- Dana, H. et al. (2014). Thy1-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS One*, 9(9):e108697. doi:10.1371/journal.pone.0108697
- Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W.W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73-6. doi: 10.1126/science.2321027.
- Ding, S., Meng, L., Han, Y. & Xue, Y. (2017). A Review on Feature Binding Theory and Its Functions Observed in Perceptual Process. *Cognitive Computation*, 9(2), 194–206. doi:10.1007/s12559-016-9446-0
- Dräger, U. C. & Olsen, J. F. (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophth. Vis. Sci.*, 20, 285–293.
- Dulhunty, A. F. (2006) Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 33(9):763-72. doi: 10.1111/j.1440-1681.2006.04441.x.
- Famiglietti, E. V. & Kolb, H. (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Research*, 84(2), 293–300. doi:10.1016/0006-8993(75)90983-x

- Farrow, K. & Masland, R. H. (2011) Physiological clustering of visual channels in the mouse retina. *J. Neurophysiol.*, 105(4):1516-30. doi: 10.1152/jn.00331.2010.
- Förster, T. (1948) Intermolecular Energy Migration and Fluorescence. *Ann. Phys.*, 2:55-75. doi:10.1117/1.JBO.17.1.011002
- Fukushima, K., Yamaguchi, Y., Yasuda, M. & Nagata, S. (1970). An electronic model of the retina. *Proc. IEEE*, 58, 1950–1951.
- Gábríel, R. & Straznický C. (1992) Immunocytochemical localization of parvalbumin- and neurofilament triplet protein immunoreactivity in the cat retina: Colocalization in a subpopulation of AII amacrine cells. *Brain Res.*, 595:133–136. doi:10.1016/0006-8993(92)91462-N.
- Gábríel, R., Lesauter, J., Bánvölgyi, T., Petrovics, G., Silver, R. & Witkovsky, P. (2004) AII amacrine neurons of the rat retina show diurnal and circadian rhythms of parvalbumin immunoreactivity. *Cell Tissue Res.*, 315:181–186. doi:10.1007/s00441-003-0785-2.
- Gawne, T. J., Kjaer, T. W. & Richmond, B. J. (1996) Latency: another potential code for feature binding in striate cortex. *J. Neurophysiol.*, 76(2):1356-60. doi:10.1152/jn.1996.76.2.1356.
- Gollisch, T. & Meister, M. (2008) Rapid neural coding in the retina with relative spike latencies. *Science*, 319(5866):1108-11. doi: 10.1126/science.1149639.
- Gollisch, T. (2009). Throwing a glance at the neural code: Rapid information transmission in the visual system. *HFSP Journal*, 3(1), 36–46. doi:10.2976/1.3027089
- Greenberg, M., Thompson, M. & Sheng, M. (1992). Calcium regulation of immediate early gene transcription. *Journal of Physiology-Paris*, 86(1-3), 99–108. doi:10.1016/s0928-4257(05)80013-0
- Grienberger, C. & Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 73(5), 862–885. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.011
- Grünert, U. (2000) Distribution of GABA and Glycine receptors on bipolar and ganglion cells in the mammalian retina. *Microsc Res Tech.*, 50(2):130-40. doi: 10.1002/1097-0029(20000715)50:2<130::AID-JEMT5>3.0.CO;2-I.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260 (1985), pp. 3440-3450
- Gu, Y.-N., Lee, E.-S. & Jeon C.-J. (2016) Types and density of calbindin D28k-immunoreactive ganglion cells in mouse retina. *Exp. Eye Res.*, 145:327–336. doi:10.1016/j.exer.2016.02.001.
- Gütig, R., Gollisch, T., Sompolinsky, H. & Meister, M. (2013) Computing Complex Visual Features with Retinal Spike Times. *PLoS One* 8, e53063, doi:10.1371/journal.pone.0053063
- Hamano, K., Kiyama, H., Emson, P. C., Manabe, R., Nakauchi, M. & Tohyama M. (1990) Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. *J. Comp. Neurol.*, 302:417–424. doi:10.1002/cne.903020217.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E., Fong, S.-L., Mohana Rao, J. K. & Argos, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. *Biophysics of Structure and Mechanism*, 9(4), 235–244. doi:10.1007/bf00535659

- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Feldmann, R. J., Atkinson, P. H., Rao, J. K. M. & Argos, P. (1984) Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision Res.*, 24:1487–1499. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(84\)90311-0](https://doi.org/10.1016/0042-6989(84)90311-0)
- Hartline, H. K. (1938) The responses of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *Am J Physiol.*, 121:400–415. doi:10.1152/ajplegacy.1938.121.2.400
- Hartline, H. K. (1957). Inhibitory Interaction of Receptor Units in the Eye of *Limulus*. *J Gen Physiol*, 40(3), 357–376. doi:10.1085/jgp.40.3.357
- Hartwick, A. T. E., Zhang, X., Chauhan, B. C. & Baldrige, W. H. (2005). Functional assessment of glutamate clearance mechanisms in a chronic rat glaucoma model using retinal ganglion cell calcium imaging. *Journal of Neurochemistry*, 94(3), 794–807. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03214.x
- Heim, N. & Griesbeck, O. (2004). Genetically Encoded Indicators of Cellular Calcium Dynamics Based on Troponin C and Green Fluorescent Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14280–14286. doi:10.1074/jbc.m312751200
- Hochstrate, P. & Juse, A. (1991). Intracellular free calcium concentration in the blowfly retina studied by Fura-2. *Cell Calcium*, 12(10), 695–712. doi:10.1016/0143-4160(91)90039-h
- Huberman, A. D., Manu, M., Koch, S. M., Susman, M. W., Lutz, A. B., Ullian, E. M., Baccus, S. A., & Barres, B. A. (2008). Architecture and activity-mediated refinement of axonal projections from a mosaic of genetically identified retinal ganglion cells. *Neuron*, 59(3), 425–438. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.018
- Huberman, A. D., Wei, W., Elstrott, J., Stafford, B. K., Feller, M. B. & Barres, B. A. (2009). Genetic Identification of an On-Off Direction- Selective Retinal Ganglion Cell Subtype Reveals a Layer-Specific Subcortical Map of Posterior Motion. *Neuron*, 62(3), 327–334. doi:10.1016/j.neuron.2009.04.014
- Indiveri, G., & Horiuchi, T. K. (2011). *Frontiers in Neuromorphic Engineering*. *Frontiers in Neuroscience*, 5. doi:10.3389/fnins.2011.00118
- Jaffe, D. B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J. E., Miyakawa, H. & Ross, W. N. (1992). The spread of Na⁺ spikes determines the pattern of dendritic Ca²⁺ entry into hippocampal neurons. *Nature*, 357(6375), 244–246. doi:10.1038/357244a0
- Jang, M. J. & Nam, Y. (2015) NeuroCa: integrated framework for systematic analysis of spatiotemporal neuronal activity patterns from large-scale optical recording data. *NeuroPhotonics*. 2, 035003. doi:10.1117/1.NPh.2.3.035003.
- Jeon, C. J., Strettoi, E. & Masland, R. H. (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*. 18(21):8936-46. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998.
- Ji, G., et al. (2004). Ca²⁺-sensing Transgenic Mice: Postsynaptic Signaling in Smooth Muscle. *Journal of Biological Chemistr.*, 279(20), 21461–21468. doi:10.1074/jbc.m401084200
- Kaneko, A. (1970) Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar, and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol.*, 207(3):623-33. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009084.

- Kaneko, A. (1971) Physiological studies of single retinal cells and their morphological identification. *Vision Res.*, 3(Suppl):17-26. doi: 10.1016/0042-6989(71)90027-7.
- Kenyon, G. T., George, J., Travis, B. & Blagoev, K. (2005) Models of the Retina with Application to the Design of a Visual Prosthesis. *Los Alamos Science*, 29, 110-123.
- Kenyon, G. T., Medina, J. F. & Mauk, M. D. (1998). A Mathematical Model of the Cerebellar-Olivary System I: Self-Regulating Equilibrium of Climbing Fiber Activity. *Journal of Computational Neuroscience*, 5(1), 17–33. doi:10.1023/a:1008874209991
- Kenyon, G. T., Moore, B., Jeffs, J., Denning, K. S., Stephens, G. J., Travis, B. J., George, J. S., Theiler, J. & Marshak, D. W. (2003a). A model of high-frequency oscillatory potentials in retinal ganglion cells. *Visual neuroscience*, 20(5):465-80. doi: 10.1017/s0952523803205010.
- Kenyon, G. T., Travis, B. J., & Marshak, D. W. (2003b). Role of synaptic feedback and intrinsic voltage-gated currents in shaping cone light responses. *Neurocomputing*, 52-54, 125–133. doi:10.1016/s0925-2312(02)00790-7
- Kenyon, G. T., Travis, B. J., Theiler, J., George, J. S., Stephens, G. J. & Marshak, D. W. (2004). Stimulus-Specific Oscillations in a Retinal Model. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 15(5), 1083–1091. doi:10.1109/tnn.2004.832722
- Kim, T.-J. & Jeon, C.-J. (2006) Morphological Classification of Parvalbumin-Containing Retinal Ganglion Cells in Mouse: Single-Cell Injection after Immunocytochemistry. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47:2757–2764. doi:10.1167/iovs.05-1442.
- Kolb, H. & Nelson, R. (1981) Amacrine cells of the cat retina. *Vision Res.*, 21(11):1625-33. doi: 10.1016/0042-6989(81)90046-8.
- Kolb, H. (1974) The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: electron microscopy of Golgi-preparations. *J Comp Neurol.*, 155(1):1-14. doi: 10.1002/cne.901550102.
- Kolb, H. (1977) The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J Neurocytol.*, 6(2):131–153. doi: 10.1007/BF01261502
- Kolb, H., Fernandez, E. & Nelson, R. (1995-) *Webvision - The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City, USA: University of Utah Health Sciences Center.
- Kolb, H., Linberg, K. A. & Fisher S. K. (1992) The neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol.*, 318(2):147-87. doi: 10.1002/cne.903180204.
- Kovács-Öller, T. et al. (2020). Spatial Expression Pattern of the Major Ca²⁺-Buffer Proteins in Mouse Retinal Ganglion Cells. *Cells*, 9(4), 792. doi:10.3390/cells9040792
- Kovács-Öller, T., Szarka, G., Ganczer, A., Tengölics, Á., Balogh, B. & Völgyi, B. (2019) Expression of Ca²⁺-Binding Buffer Proteins in the Human and Mouse Retinal Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2229. doi:10.3390/ijms20092229
- Krieger, B., Qiao, M., Rousso, D. L., Sanes, J. R. & Meister, M. (2017) Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. *PLoS One*, 12, e0180091, doi:10.1371/journal.pone.0180091.

- Lakowicz, J. R., Szmajcinski, H. & Johnson, M. L. (1992). Calcium imaging using fluorescence lifetimes and long-wavelength probes. *Journal of Fluorescence*, 2(1), 47–62. doi:10.1007/bf00866388
- Lee, E.-S., Kim, T.-J. & Jeon, C.-J. (2013) Identification of parvalbumin-containing retinal ganglion cells in rabbit. *Exp. Eye Res.*, 110:113-24. doi:10.1016/j.exer.2013.02.018.
- Lee, E.-S., Lee, J.-Y. & Jeon, C.-J. (2010) Types and density of calretinin-containing retinal ganglion cells in mouse. *Neurosci. Res.*, 66:141–150. doi:10.1016/j.neures.2009.10.008.
- Li, P. H. et al. (2015) Anatomical identification of extracellularly recorded cells in large-scale multielectrode recordings. *J. Neurosci.* 35(11):4663-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3675-14.2015. Sr14
- Lin, Y.-S., Kuo, K.-T., Chen, S.-K. & Huang, H.-S. (2018) RBFOX3/NeuN is dispensable for visual function. *PLoS ONE.*, 13:e0192355 doi:10.1371/journal.pone.0192355.
- London, A., Benhar, I. & Schwartz, M. (2013) The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol.*, 9(1):44-53. doi:10.1038/nrneurol.2012.227
- Loxley, P. N., Bettencourt, L. M. & Kenyon, G. T. (2011). Ultra-fast detection of salient contours through horizontal connections in the primary visual cortex. *EPL (Europhysics Letters)*, 93(6), 64001. doi:10.1209/0295-5075/93/64001
- Lyubarsky, A. L., Falsini, B., Pennesi, M. E., Valentini, P. & Pugh, E. N. Jr. (1999) UV- and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse: a possible phenotype for coexpression of cone photopigments. *J. Neurosci.*, 19(1):442-55. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-01-00442.1999.
- MacNeil, M. A. & Masland, R. H. (1998) Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron.*, 20(5):971-82. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80478-x.
- Mani, A., & Schwartz, G. W. (2017). Circuit Mechanisms of a Retinal Ganglion Cell with Stimulus-Dependent Response Latency and Activation Beyond Its Dendrites. *Current Biology*, 27(4), 471–482. doi:10.1016/j.cub.2016.12.033.
- Manookin, M. B., Patterson, S. S. & Linehan, C. M. (2018) Neural mechanisms mediating motion sensitivity in parasol ganglion cells of the primate retina. *Neuron.* 97(6):1327-1340.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.006.
- Margrie, T., Brecht, M. & Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology*, 444(4), 491–498. doi:10.1007/s00424-002-0831-z
- Mariani, A. P. (1990) Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol.*, 301(3):382-400. doi: 10.1002/cne.903010305.
- Masland, R. H. (2017) Vision: Two Speeds in the Retina. *Curr. Biol.*, 27(8):R303-R305. doi:10.1016/j.cub.2017.02.056.
- McCaffery, P., Lee, M., Wagner, M. E., Sladek, N. E. & Dräger, U. C. (1992) Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Development*, 115:371-382
- Mead, C. A. (1989). *Analog VLSI and Neural Systems*. Reading, MA: Addison-Wesley.

- Mendelsohn, C., Ruberte, E., Le Meur, M., Morris-Kay, G. & Chambon, P. (1991) Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR- β promoter in transgenic animals. *Development*, 113:723-734.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645), 882–887. doi:10.1038/42264
- Mohammed, A. I., Gritton, H. J., Tseng, H., Bucklin, M. E., Yao, Z. & Han, X. (2016). An integrative approach for analyzing hundreds of neurons in task performing mice using wide-field calcium imaging. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep20986
- Murakami, M., Ohtsuka, T. & Shimazaki, H. (1975) The effects of aspartate and glutamate on bipolar cells in the carp retina. *Vision Res.*, 15(3):456-8. doi: 10.1016/0042-6989(75)90101-7.
- Murphy, G. J. & Rieke, F. (2006). Network Variability Limits Stimulus-Evoked Spike Timing Precision in Retinal Ganglion Cells. *Neuron*, 52(3), 511–524. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.014
- Münch, T.A., Da Silveira, R.A., Siegert, S., Viney, T.J., Awatramani, G.B. & Roska, B. (2009) Approach sensitivity in the retina processed by a multifunctional neural circuit. *Nat. Neurosci.*, 12:1308–1316. doi:10.1038/nn.2389.
- Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 19(2), 137–141. doi:10.1038/84397
- Nath, A. & Schwartz, G. W. (2016) Cardinal orientation selectivity is represented by two distinct ganglion cell types in mouse retina. *J. Neurosci.* 36(11):3208-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4554-15.2016.
- Nelson, R., Famiglietti, E. V. Jr & Kolb, H. (1978) Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol.*, 41(2):472-83. doi: 10.1152/jn.1978.41.2.472.
- Nelson, R., Kolb, H. & Freed, M. A. (1993) OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina. I: Intracellular electrophysiology and HRP stains. *J Comp Neurol.*, 329(1):68-84. doi: 10.1002/cne.903290106.
- Newman, E. A. (2001). Propagation of Intercellular Calcium Waves in Retinal Astrocytes and Müller Cells. *The Journal of Neuroscience*, 21(7), 2215–2223. doi:10.1523/jneurosci.21-07-02215.2001
- Noble, J.W., Almalki, R., Roe, S.M., Wagner, A., Duman, R. & Atack J.R. (2018) The X-ray structure of human calbindin-D28K: An improved model. *Acta Cryst. Sect. D Struct. Boil.*, 74:1008–1014. doi:10.1107/S2059798318011610.
- Ölveczky, B. P., Baccus, S. A. & Meister, M. (2003). Segregation of object and background motion in the retina. *Nature*, 423(6938), 401–408. doi:10.1038/nature01652
- Ölveczky, B. P., Baccus, S. A. & Meister, M. (2007) Retinal adaptation to object motion. *Neuron*. 56(4):689-700. doi: 10.1016/j.neuron.2007.09.030.
- Pan, F., Paul, D. L., Bloomfield, S. A. & Völgyi, B. (2010) Connexin36 is required for gap junctional coupling of most ganglion cell subtypes in the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(6), 911–927. doi:10.1002/cne.22254

- Pande, G., Kumar, N. A. & Manogaran, P. S. (1996) Flow cytometric study of changes in the intracellular free calcium during the cell cycle. *Cytometry*, 24(1):55-63. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19960501)24:1<55::AID-CYTO7>3.0.CO;2-H.
- Pang, J.-J., Gao, F., & Wu, S. M. (2003) Light-Evoked Excitatory and Inhibitory Synaptic Inputs to ON and OFF α Ganglion Cells in the Mouse Retina. *The Journal of Neuroscience*, 23(14), 6063–6073. doi:10.1523/jneurosci.23-14-06063.2003.
- Pedregosa, P. et al. (2011) Scikit-learn: Machine learning in python. *J. Mach. Learn. Res.*, 12:2825–2830.
- Penn, J. S. & Williams, T. P. (1984) A new microspectrophotometric method for measuring absorbance of rat photoreceptors. *Vision Res.* 24(11):1673-6. doi:10.1016/0042-6989(84)90325-0.
- Pérez De Sevilla Müller, L., Shelley, J., & Weiler, R. (2007). Displaced amacrine cells of the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 505(2), 177–189. doi:10.1002/cne.21487
- Perge, J. A., Niven, J. E., Mugnaini, E., Balasubramanian, V. & Sterling, P. (2012) Why do axons differ in caliber? *J. Neurosci.*, 32(2):626-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4254-11.2012.
- Polyak, S. L. (1942) *The Retina*. Chicago: University of Chicago
- Portelli, G. et al. (2016) Rank Order Coding: a Retinal Information Decoding Strategy Revealed by Large-Scale Multielectrode Array Retinal Recordings. *ENeuro*. 3, 0134-15.2016, doi: 10.1523/ENEURO.0134-15.2016.
- Purushothaman, G., Patel, S. S., Bedell, H. E. & Ogmen, H. (1998) Moving ahead through differential visual latency. *Nature*, 396(6710):424. doi:10.1038/24766.
- Raymond, I. D., Pool, A. L., Vila, A. & Brecha, N. C. (2009) A Thy1-CFP DBA/2J mouse line with cyan fluorescent protein expression in retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.*, 26(5-6):453-465. doi:10.1017/S095252380999023X
- Rocheffort, N. L., Jia, H. & Konnerth, A. (2008). Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 14(9), 389–399. doi:10.1016/j.molmed.2008.07.005
- Rodriguez, A.R., De Sevilla Müller, L.P. & Brecha, N.C. (2014) The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.*, 522:1411–1443. doi: 10.1002/cne.23521.
- Rosenblatt, F. (1958). The perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological Review*, 65(6):386-408. doi:10.1037/h0042519.
- Sabbah, S. Gemmer, J. A., Bhatia-Lin, A., Manoff, G., Castro, G., Siegel, J. K., Jeffery, N. & Berson, D. M. (2017). A retinal code for motion along the gravitational and body axes. *Nature.*, 546(7659):492-497. doi:10.1038/nature22818.
- Sanna, P. P., Keyser, K. T., Battenberg, E. & Bloom F. E. (1990) Parvalbumin immunoreactivity in the rat retina. *Neurosci. Lett.*, 118:136–139. doi:10.1016/0304-3940(90)90267-D.
- Schindelin, J., et al. (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.*, 9:676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.

- Schwaller, B. (2010) Cytosolic Ca²⁺ Buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2:a004051 doi:10.1101/cshperspect.a004051.
- Sekar, R. B. & Periasamy, A. (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology*, 160(5), 629–633. doi:10.1083/jcb.200210140
- Sinha, R., Hoon, M., Baudin, J., Okawa, H., Wong, R. O. L. & Rieke, F. (2017). Cellular and Circuit Mechanisms Shaping the Perceptual Properties of the Primate Fovea. *Cell*, 168(3), 413–426.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.01.005
- Slaughter, M. N. & Miller, R. F. (1983) Bipolar cells in the mudpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter. *Nature*, 303(5917):537-8. doi: 10.1038/303537a0.
- Solomon, S. G., Martin, P. R., White, A. J., Ruttiger, L. & Lee, B. B. (2002) Modulation sensitivity of ganglion cells in peripheral retina of macaque. *Vision Res.*, 42(27):2893-8. doi:10.1016/s0042-6989(02)00414-5.
- Stadler, F., Schmutz, I., Schwaller, B. & Albrecht, U. (2010) Lack of calbindin-D28k alters response of the murine circadian clock to light. *Chronobiol. Int.*, 27:68–82. doi:10.3109/07420521003648554.
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., & Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7319–7324. doi:10.1073/pnas.1232232100
- Stryer, L. (1991) Visual excitation and recovery. *J Biol Chem.*, 266(17):10711–24.
- Sun, H., Macke, J. P. & Nathans, J. (1997) Mechanisms of spectral tuning in the mouse green cone pigment. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(16):8860-5. doi:10.1073/pnas.94.16.8860.
- Sun, W., Li, N. & He, S. (2002). Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 451(2), 115–126. doi:10.1002/cne.10323
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. & Tank, D. W. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*, 385(6612), 161–165. doi:10.1038/385161a0
- Szél, A. et al. (1992) Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, 325(3):327-42. doi:10.1002/cne.903250302.
- Szent-Györgyi, A. G. (1975). Calcium regulation of muscle contraction. *Biophysical Journal*, 15(7), 707–723. doi:10.1016/s0006-3495(75)85849-8
- Taylor, W. R. & Vaney, D. I. (2002) Diverse synaptic mechanisms generate direction selectivity in the rabbit retina. *J. Neurosci.*, 22(17):7712-20. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-17-07712.2002.
- Tengölics, Á. J. et al. (2019) Response Latency Tuning by Retinal Circuits Modulates Signal Efficiency. *Sci Rep*, 9, 15110. doi:10.1038/s41598-019-51756-y
- Tessier-Lavigne, M., Attwell, D., Mobbs, P. & Wilson, M. (1988) Membrane currents in retinal bipolar cells of axolotl. *J. Gen. Physiol.*, 91(1):49-72. doi: 10.1085/jgp.91.1.49.
- Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S. A., Schreiter, E. R., Bargmann, C. I., Jayaraman, V., Svoboda, K. & Looger, L. L., (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods*, 6(12), 875–881. doi:10.1038/nmeth.1398

- Trump, B. F., Berezsky, I. K., Sato, T., Laiho, K. U., Phelps, P. C. & DeClaris, N. (1984). Cell calcium, cell injury and cell death. *Environmental Health Perspectives*, 57, 281–287. doi:10.1289/ehp.8457281
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396–2404. doi:10.1021/bi00552a018
- Tsien, R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290(5806), 527–528. doi:10.1038/290527a0
- Usrey, W. M., Alonso, J. M. & Reid, R. C. (2000) Synaptic interactions between thalamic inputs to simple cells in cat visual cortex. *J. Neurosci.*, 20(14):5461-7. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-14-05461.2000.
- Van Wyk, M., Wässle, H. & Taylor, W. R. (2009). Receptive field properties of ON- and OFF-ganglion cells in the mouse retina. *Visual Neuroscience*, 26(03), 297–308. doi:10.1017/s0952523809990137.
- Venkataramani, S. & Taylor, W. R. (2010) Orientation selectivity in rabbit retinal ganglion cells is mediated by presynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 30(46):15664-76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2081-10.2010.
- Venkataramani, S. & Taylor, W. R. (2016) Synaptic mechanisms generating orientation selectivity in the ON pathway of the rabbit retina. *J. Neurosci.*, 36(11):3336-49. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1432-15.2016.
- Völgyi, B., Abrams, J., Paul, D. L. & Bloomfield, S. A. (2005) Morphology and tracer coupling pattern of alpha ganglion cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, 492(1):66-77. doi:10.1002/cne.20700.
- Völgyi, B., Chheda, S. & Bloomfield, S. A. (2009). Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 512(5), 664–687. doi:10.1002/cne.21912
- Völgyi, B., Kovács-Oller, T., Atlasz, T., Wilhelm, M., & Gábel, R. (2013a). Gap junctional coupling in the vertebrate retina: variations on one theme? *Progress in retinal and eye research*, 34, 1–18. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.12.002
- Völgyi, B., Pan, F., Paul, D. L., Wang, J. T., Huberman, A. D. & Bloomfield, S. A. (2013b) Gap Junctions Are Essential for Generating the Correlated Spike Activity of Neighboring Retinal Ganglion Cells. *PLoS ONE*, 8(7), e69426. doi:10.1371/journal.pone.0069426
- Völgyi, B., Pollák, E., Buzás, P. & Gábel R. (1997) Calretinin in neurochemically well-defined cell populations of rabbit retina. *Brain Res.* 763:79–86. doi:10.1016/S0006-8993(97)00405-8.
- Völgyi, B., Xin, D. & Bloomfield, S. A. (2002). Feedback inhibition in the inner plexiform layer underlies the surround-mediated responses of AII amacrine cells in the mammalian retina. *The Journal of Physiology*, 539(2), 603–614. doi:10.1113/jphysiol.2001.013133
- Wässle, H. & Boycott, B. B. (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.*, 71(2):447-80. doi: 10.1152/physrev.1991.71.2.447.

Wässle, H., Peichl, L. & Boycott, B. B. (1981) Morphology and topography of On- and Off-alfa cells in the cat retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, 212(1187):157-75. doi: 10.1098/rspb.1981.0032.

Wei, W., Elstrott, J. & Feller, M. B. (2010) Two-photon targeted recording of GFP-expressing neurons for light responses and live-cell imaging in the mouse retina. *Nat. Protoc.*, 5:1347–1352. doi: 10.1038/nprot.2010.106.

Weitz, A. C., Behrend, M. R., Lee, N. S., Klein, R. L., Chiodo, V. A., Hauswirth, W. W., Humayun, M. S., Weiland, J. D. & Chow, R. H. (2013). Imaging the response of the retina to electrical stimulation with genetically encoded calcium indicators. *Journal of Neurophysiology*, 109(7), 1979–1988. doi:10.1152/jn.00852.2012

Werblin, F. S. & Dowling JE. (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.*, 32(3):339–355. doi: 10.1152/jn.1969.32.3.339.

Whitney, D. & Murakami, I. (1998) Latency difference, not spatial extrapolation. *Nat. Neurosci.*, 1, 656–657. doi:10.1038/3659

Williams, D. A. (1990). Quantitative intracellular calcium imaging with laser-scanning confocal microscopy. *Cell Calcium*, 11(9), 589–597. doi:10.1016/0143-4160(90)90013-k

Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K. & Greenberg, M. E. (1996). Calcium Influx via the NMDA Receptor Induces Immediate Early Gene Transcription by a MAP Kinase/ERK-Dependent Mechanism. *The Journal of Neuroscience*, 16(17), 5425–5436. doi:10.1523/jneurosci.16-17-05425.1996

Yau, K-W. (1994) Phototransduction mechanisms in retinal rods and cones. *Invest Ophthal. Vis. Sci.*, 35(1):9–32.

Zariwala, H. A., et al. (2012) A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging in vivo. *J Neurosci.*, 32(9):3131-3141. doi:10.1523/JNEUROSCI.4469-11.2012

Webhely 1: <https://petavision.github.io/>

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Gábrriel Róbert habil. egyetemi tanárnak a PTE-TTK, BDI vezetőjének támogatását és Dr. Völgyi Bélának (habil. egyetemi docens) a munkám során nyújtott szakmai segítségét, támogatást és a sok értékes iránymutatást, ami nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Szintén sok köszönetet érdemel Dr. Kovács-Öller Tamás a munkám során nyújtott összes szakmai tanácsáért és segítségéért és a dolgozatban felhasznált elektrofiziológiai mérések egy részének kivitelezéséért.

Külön köszönet illeti Balogh Márton, a kémiai indikátorokkal végzett Ca^{2+} -képződési kísérletek kezdeti nehézségeinél nyújtott hathatós szakmai tanácsaiért és segítségéért.

Köszönet illeti továbbá Ganczer Almát a dolgozatban szereplő MEA mérések kivitelezéséért.

Köszönöm Szarka Gergelynek az immunhisztokémiai vizsgálatok során nyújtott segítségét.

Hálával tartozom továbbá Dr. Garrett T. Kenyonak, hogy elérhetővé tette számunkra a retina modell alkalmazását, valamint Dr. Zentai Norbertnek, hogy segítette a modellt üzembe helyezni.

Külön köszönet szakdolgozómnak, Fülöp Kristófnak, továbbá laborunk, a PTE TTK Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék, valamint a PTE Szentágotthai János Kutatóközpont minden korábbi és jelenlegi munkatársának a munkám során nyújtott támogatásáért és segítségéért.

Végül köszönöm páromnak és családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak és támogattak, valamint elviseltek a disszertációírás nehezebb pillanataiban is. Ezen dolgozat elkészülte az ő érdemük is.

12. Saját publikációk

12.1. MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat

MTMT közlemény és idéző összefoglaló táblázat				
Tengölics Ádám adatai (2020.07.21)				
Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összes	Részletezve	Független	Összes
Tudományos közlemények				
I. Tudományos folyóiratcikk	<u>4</u>	---	---	---
külföldi kiadású szakfolyóiratban	---	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>3</u>
hazai kiadású szakfolyóiratban idegen nyelven	---	0	0	0
hazai kiadású szakfolyóiratban magyar nyelven	---	0	0	0
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Könyv, szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
b) Könyv, szerkesztőként ²	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	<u>1</u>	---	---	---
idegen nyelvű	---	<u>1</u>	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény folyóiratban vagy konferenciakötetben	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Közlemények összesen (I.-IV.)	<u>5</u>	---	<u>1</u>	<u>3</u>
Absztrakt ³	<u>11</u>	---	0	<u>1</u>
Kutatási adat	0		0	0
További tudományos művek ⁴	<u>4</u>	---	0	0
Összes tudományos közlemény	<u>20</u>	---	<u>1</u>	<u>4</u>
Hirsch index ⁵	<u>1</u>	---	---	---
Oktatási művek	0	---	---	---
Felsőoktatási művek	0	---	---	---
Felsőoktatási tankönyv idegen nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része idegen nyelven	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv része magyar nyelven	---	0	0	0
Oktatási anyag	0	---	0	0

Oltalmi formák	0	---	0	0
Alkotás	0	---	0	0
Ismeretterjesztő művek	0	---	---	---
Folyóiratcikk		0	0	0
Könyvek	---	0	0	0
További ismeretterjesztő művek	---	0	0	0
Közérdekű vagy nem besorolt művek ⁶	0	---	0	0
További közlemények ⁷	0		0	0
Egyéb szerzőség ⁸	0	---	0	0
Idézők szerkesztett művekre	---	---	0	0
Idézők disszertációban, egyéb típusban	---	---	0	0
Összes közlemény és összes idézőik	<u>20</u>	---	<u>1</u>	<u>4</u>

Megjegyzések
A táblázat számai hivatkozások is. A számra kattintva a program listázza azokat a műveket, amelyeket a cellában összeszámlált.
--- : Nem kitölthető cella
¹ A hivatkozások a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A disszertáció és egyéb típusú idézők összesítve a táblázat végén található.
² Szerkesztőként nem részesedik a könyv idézéséből
³ Csak a tudományos jellegű absztraktok.
⁴ Minden további még el nem számolt tudományos mű (kivéve alkotás vagy oltalmi forma), ahol a szerző: szerző, szerkesztő, kritikai vagy forráskiadás készítője szerzőségű.
⁵ A disszertációk és egyéb típusú idézők nélkül számolva. A sor értéke az "Összes tudományos közlemény" sor idézettségi adatait veszi alapul.
⁶ Minden Közérdekű, Nem besorolt jellegű közlemény, ahol a szerző nem egyéb szerzőségű szerző.
⁷ Ide értve minden olyan művet, mely a táblázat más, nevesített soraiban nem került összeszámlálásra.
⁸ Minden olyan egyéb szerzőségű mű, ahol a szerző nem: szerző, szerkesztő, kritikai vagy forráskiadás készítője szerzőségű.

2020. aug. 18. 10:15

Összesített Impakt Faktor: 17,476

Idézők: 4

Ebből független idézet: 1

12.2. Disszertáció alapjául szolgáló publikációk

Tengölics, Á. J., Szarka, G., Ganczer, A., Szabó-Meleg, E., Nyitrai, M., Kovács-Öller, T., & Völgyi, B. (2019). Response Latency Tuning by Retinal Circuits Modulates Signal Efficiency. *Scientific reports*, 9(1), 15110. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51756-y>. IF: 3.998

Kovács-Öller, T., Szarka, G., Tengölics, Á. J., Ganczer, A., Balogh, B., Szabó-Meleg, E., Nyitrai, M., & Völgyi, B. (2020). Spatial Expression Pattern of the Major Ca²⁺-Buffer Proteins in Mouse Retinal Ganglion Cells. *Cells*, 9(4), 792. <https://doi.org/10.3390/cells9040792>. IF: 4.366

12.3. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia közlemények

Tengölics, Á., Balogh, M., Debertin, G. & Völgyi, B. (2017) Characterization of Oregon-Green labeled mouse retinal neurons. Tavaszi Szél 2017 PhD Konferencia, Miskolc, Magyarország

Tengölics, Á., Ganczer, A., Balogh, M. & Völgyi, B. (2017) Ganglion cell responses impose a postdictive processing of Visual Signals in the brain. FENS Regional Meeting 2017, Pécs, Magyarország

Ganczer, A., Tengölics, Á. J. & Völgyi, B. (2017) Response Transiency of Retinal Ganglion Cells is Maintained when Input Dominance Switches Between Parallel Signalling Streams. ERM 2017, Párizs, Franciaország

Tengölics, Á., Albert, L., Varga, D., Ganczer, A., Balogh, M. & Völgyi, B. (2017) A retinális ganglionsejt válaszok befolyásának vizsgálata a vizuális jelek posztdiktív agyi feldolgozásában. SZTE Móra Ferenc Szakkollégium, Móra Nemzetközi Interdiszciplináris Konferencia, Szeged, Magyarország

Tengölics, Á. & Völgyi, B. (2018) A GABAerg inhibíció és a réskapcsolatok szerepe retinális dúcsejtek egyéni és populációs kódjának kialakításában. PTE Idegtudományi Centrum III. PhD és TDK Konferencia, Pécs, Magyarország

Tengölics, Á. J. & Völgyi, B. (2019) GABA and Gap Junction mediated distinct effects on retinal ganglion cell individual and population code. 16th Congress of Hungarian Neuroscience Society, Debrecen, Magyarország

Tengölics, Á. & Völgyi, B. (2019) A GABAerg inhibíció és a réskapcsolatok szerepe a retinális dúcsejtek egyéni és populációs kódjának kialakításában. ÚNKP 2018/19 Intézményi Szakmai Záró Konferencia, Pécs, Magyarország

Tengölics, Á. J., Zentai, N., Kenyon, G.T. & Völgyi, B. (2019) A retinális dúcsejtek egyéni és populációs kép kódolási mechanizmusának vizsgálata. 21. Látás Szimpózium, Pécs, Magyarország

Tengölics, Á. J., Zentai, N., Kenyon, G. T. & Völgyi, B., (2019) Opposite effects of inhibitory and gap junction mediated excitatory microcircuits on the ganglion cell population code. ERM 2019, Helsinki, Finnország

Fülöp, K. T., Tengölics, Á. J. & Völgyi, B. (2020) A Parvalbumin kalcium kötő fehérje expressziójának hatása a retinális dúcsejtek fényválaszainak kialakításában. In: Prisztóka, Gyöngyvér; Pfefferkorn, Laura-Jane; Kertai, Bendegúz (szerk.) XVIII. Szentágothai János Multidiszciplináris Konferencia és Hallgatói Verseny Absztrakt kötet, Pécs, Magyarország: János Szentágothai Scholastic Honorary Society, Faculty of Sciences, University of Pécs, pp. 21-22., 2 p.

12.3. Egyéb tudományos közlemények

Tengölics, Á., Farkas, S., Gazdag, Z., Pollák, E., Engelmann, P. & Molnár, L. (2015) Putative biomarkers in ecotoxicology: from monitor species to cellular bio- markers. In: Gábor, Molnár; Károly, Kutics; Sándor, Farkas (szerk.) *Interaction of natural and social processes in shallow lake areas*. Kaposvár, Magyarország: Kaposvár University, pp. 103-122., 20 p.

Kovács-Öller, T., Szarka, G., Ganczer, A., Tengölics, Á., Balogh, B., & Völgyi, B. (2019). Expression of Ca²⁺-Binding Buffer Proteins in the Human and Mouse Retinal Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2229. <https://doi.org/10.3390/ijms20092229>. IF: 4.556

Kovács-Öller, T., Ivanova, E., Szarka, G., Tengölics, Á. J., Völgyi, B., & Sagdullaev, B. T. (2020). Imatinib Sets Pericyte Mosaic in the Retina. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2522. <https://doi.org/10.3390/ijms21072522>. IF: 4.556

12.4. Egyéb konferencia közlemények

Gaľuszka, A., Tengölics, Á., Molnár, L. & Plytycz, B. (2014) Effects of thermal conditions on regeneration of tail segments in *Eisenia andrei* and *Aporrectodea caliginosa*. Ogólnopolskie Seminarium, Krakko, Lengyelország

Tengölics, Á., Gazdag, Z. & Molnár, L. (2014) Enzyme activity of test species *Eisenia andrei* (*Annelida, Clitellata*) as a factor of both physiology and toxicology. Interaction of Natural and Social Processes in Shallow Lake Areas, Kaposvár, Magyarország

Farkas, S., Tengölics, Á., Rumpler, É., Bazsó, A., Gazdag, Z., Kazinczi, G., Pál-Fám, F. & Molnár, L. (2014) Enzymological and morphological biomarkers in environmental toxicology: from recognition to standardization. In: Molnár, Gábor; Farkas, Sándor (szerk.) Interaction of Natural and Social Processes in Shallow Lake Areas: International conference Kaposvár, Magyarország: Kaposvári Egyetem, Balaton Kutatóintézet, pp. 36-36., 1 p.

Farkas, S., Rumpler, É., Tengölics, Á., Kazinczi, G., Pál-Fám, F. & Molnár, László. (2014) Szubletális koncentrációjú nehézfémek talajfaunát károsító hatásainak tanulmányozása ökotoxikológiai vizsgálatokkal. In: Molnár, Gábor; Farkas, Sándor (szerk.) Természet és társadalom a Balaton régióban: Tudományos konferencia a sekély vizű tavas területek multidiszciplináris kutatásáról: Absztraktkötet, Kaposvár, Magyarország: Kaposvári Egyetem, Balaton Kutatóintézet, pp. 29-29., 1 p.

Tengölics, Á. (2017) Retinális kemoprosztézis. PTE Innovációs Nap, Pécs. Magyarország

Tengölics, Á. (2017) iEye: A vakság gyógyításától a szembe ültethető okostelefonig. Kutatók Éjszakája 2017, Pécs, Magyarország

Tengölics, Á. (2018) Retinális Kemoprosztézis. PTE Innovációs Nap, Inspirációs Poszter Szekció, Pécs, Magyarország

Kovács-Öller, T., Szarka, G. & Tengölics, Á. J. (2019) Szemezgetés a retinában. Kutatók Éjszakája 2019, Pécs, Magyarország

Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott

név: **Tengölics Ádám Jonatán**

születési név: **Tengölics Ádám Jonatán**

anyja neve: **Németh Vera**

születési hely, idő: **Budapest, 1990.08.24.**

A dúcsejtek által meghatározott párhuzamos retinális pályákon haladó információ funkcionális heterogenitásának a vizsgálata

című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a(z)

PTE- TTK, Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola részére.

Témavezető neve

Dr. Völgyi Béla

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolában (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: Pécs, 2020.08.28.

.....
doktorjelölt aláírása