

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A retinális dúcsejtek fényválaszának időbeli sajátosságait befolyásoló tényezők vizsgálata: tranziencia és oszcillációs aktivitás az emlős retinában

PhD értekezés

Ganczer Alma

Témavezető:

Dr. Völgyi Béla



Pécs, 2021

1. Bevezetés

A központi idegrendszerben a környezet leképezésére használt információ jelentős része származik a látórendszerből. A retinában akár már egyetlen foton energiája is képes elindítani azt a jelátviteli kaszkádot, melynek eredményeképp akciós potenciálok sorozata indul meg a magasabb látóközpontok felé. Az emlős retinát anatómiai felépítése szerint hat jól elhatárolható szövettani rétegre bonthatjuk, melyet idegsejtek öt, a következőkben felsorolt jellegzetes osztálya épít fel: a kiinduló lépésként szolgáló fototranszdukció a fotoreceptorok feladata, az ő információjukat pedig ún. bipoláris sejtek továbbítják a dúcsejteknek, míg a hálózat szabályozásért a horizontális és az amakrin sejtek funkcionálisan rendkívül különböző csoportjai lesznek felelősek.

A retinális dúcsejtek a retina legbelső rétegében, a dúcsejtek (idegen nevükön ganglionsejtek) rétegében találhatóak. Működésüket tekintve jellemzően ON, OFF, vagy ON-OFF csoportokat különítünk el annak függvényében, hogy adott sejt a fénystimulus megjelenésének és/vagy megszűnésének hatására generál akciós potenciál sorozatokat. A dúcsejteket tipizálásában a kódolt információ minősége is segít: ismerünk például olyan sejttypusokat, amelyek csak preferált irányban megvalósuló mozgás érzékelésére képesek (irányszelekció). A retina tehát a környezetet nem egységes képként, hanem párhuzamos, részekre bontott információáramok segítségével részekre bontva kódolja, így a mozgási, kontraszt vagy színinformációk egymástól elválasztva, külön útvonalon szállítódnak. További jellegzetessége a retinális dúcsejteknek, hogy a válaszkésés

tekintetében is különböznek, illetve a fényválasz, ha kiváltódott, különböző sejtekben eltérő sebességgel cseng le. Azokat a sejteket/válaszokat, ahol az akciós potenciál sorozat gyorsan szűnik meg, tranziensnek tekintjük, míg azokat, ahol a fénystimulust elnyújtott elektromos aktivitás követi, fenntartottnak. Arról viszont, hogy pontosan mi határozza meg egy tranziens vagy egy fenntartott fényválasz kialakulását, jelenleg nincs egyetértés.

Ismert továbbá, hogy a dúcsejtek képesek elektromos aktivitásukat oszcillálni, ezzel tovább növelve a retinális kód információtartalmát. Bár az oszcillációs aktivitását már több különböző gerinces fajban is leírták, a pontos mechanizmust, amely az oszcillációt kiváltja és a retina különböző pontjai között szinkronizálja, nem teljes egészében ismert.

2. Célkitűzések

Elsődleges célunk a dúcsejtekben leírt tranziens/fenntartott kettősséget meghatározó tényezők felderítése volt. Bár a témában már számos elmélet született, egyelőre nem sikerült azonosítani a retinális dúcsejtek tranzienciájának forrását. Célul tűztük ki továbbá, hogy az elektromos elvezetéseinkben megjelenő szinkronizált oszcillációs aktivitást kialakító tényezőket meghatározzuk. Ennek fényében tehát az itt bemutatott kísérletes munka célkitűzései röviden a következők voltak:

1. Kidolgozni egy megfelelő módszert a tranziencia mérésére, mely lehetővé teszi a tranziens és fenntartott fényválaszok számértékekkel történő megadását és összehasonlítását

2. Meghatározni és egymástól megbízhatóan elhatárolni a tranziens és fenntartott fényválaszok korábban ismert két csoportját
3. Feltérképezni a tranziens/fenntartott kettősség eredetét, meghatározni a tranzienciát befolyásoló tényezőket a külső és a belső retinában
4. Azonosítani a dúcsejtek oszcillációs aktivitását kialakító és a szinkronizációt befolyásoló tényezőket

3. Anyag és módszer

3.1 Extracelluláris elvezetések

A dúcsejtek fényválaszát extracelluláris egysejt (szénszálas mikroelektródák, Kation Scientific LCC, Minneapolis, MN, USA) vagy többsejt (MEA; MultiChannel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany) elvezetésekben rögzítettük *in vitro* egér (*Mus musculus*) retinából.

3.2. Farmakológia

Kontroll felvételek készítéséhez és farmakológia kezelés hiányában emlős retina ringert használtunk a szövet funkcióképességének megőrzéséhez. Az oldat összetétele: NaCl 125mM/dm³, KCl 3mM/dm³, CaCl₂ 2mM/dm³, NaH₂PO₄ 1.25mM/dm³, MgCl₂ 1mM/dm³, NaHCO₃ 25mM/dm³, glucose 10mM/dm³. A GABA-erg transzmisszió részleges felfüggesztéséhez pikrotoxint használtunk (PTX, 50μM). A réskapcsolatok kísérletes zárása egy meclofenmic acid (MFA 50μM) elnevezésű elektromos szinapszis blokkolóval történt. A párhuzamos retinális pályák tranzienciára gyakorolt

tesztelésénél APB-t (L-2amino-4- phosphonobutyric acid, L-AP4, 50 μ M) alkalmaztunk metabotróp glutamátreceptor agonistaként.

3.3 Adatelemzés

Az akciós potenciálok szűrése szoftveresen a Spike2 (Cambridge Electronics Design Ltd., Cambridge, UK) segítségével zajlott. A tranziencia méréséhez peristimulus idő hisztogramokat (PSTH) generáltunk, melyek az időegységre (bin=10ms esetünkben) jutó akciós potenciálok számát jelenítik meg az eltelt idő függvényében. A statisztikai tesztek elvégzéséhez az IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA) és az Origin (OriginLab, Northampton, MA, USA) felületét vettük igénybe.

4. Eredmények

4.1. A tranziencia mérése

Négy különböző számítási módszer összehasonlítása után úgy találtuk, hogy az általunk PSTH τ (vagy PSTH τ au) néven alkalmazott megközelítés a legcélszerűbb számunkra a tranziencia számítására. Ez a módszer a fényválasz csúcsintenzitásának 1/e-ad részére csökkenéshez szükséges időt veszi alapul: a PSTH τ értéke így az időskálán értelmezendő, az alacsonyabb értékek jellemzően tranziens, a magasabb értékek fenntartott válaszokat takarnak. Előnye, hogy a kísérleti elrendezéstől függetlenül alkalmazható és lehetőséget nyújt a bipoláris sejteken mért tranziens és fenntartott válaszokkal történő összehasonlításra, ahol akciós potenciálok hiányában csak a lassú potenciálok kinetikáját vehetjük alapul.

4.2. A tranziencia eloszlása

Várakozásainkkal ellentétben a $PSTH_{\tau}$ értékek nem tükrözik egyértelműen a válaszok tranziens és fenntartott populációját. Az általunk mért tranziencia értékek széles skálán oszlanak el és nem mutatnak reprezentatív tranziens/fenntartott elválást, ugyanakkor kirajzolódik egy harmadik, korábban figyelmen kívül hagyott átmeneti kategória is, amely nem mutat egyértelmű tranziens vagy fenntartott jellegeket, bár az általunk rögzített fényválaszok jelentős része ebbe a csoportba tartozna. Az eloszlás széles skálája egyaránt megfigyelhető volt az ON és OFF válaszok esetén, ON-OFF sejtek esetén pedig előfordult a két válaszkomponens teljesen különböző válaszkinetikája is.

4.3 A tranzienciát meghatározó tényezők

Mivel mind az ON, mind pedig az OFF válaszok képesek különböző kinetikájú fényválaszok kialakítására, feltételezhetjük, hogy az ismert kettősség forrása nem a bipoláris sejtek poszt-szinaptikus glutamát receptorainak eloszlásában keresendő (mGluR6 ON és AMPA/kainát receptorok OFF sejtek esetén). Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a párhuzamos retinális pályák közötti váltás sem eredményezi feltétlenül a tranziencia megváltozását: a fényinger intenzitásának csökkentése csak az ON válaszok esetén eredményezett szignifikáns különbséget ($p < 0.05$) a dúcsejtek tranzienciájában, holott ebben az esetben egyedül mGluR6 receptorokkal találkozhatunk a poszt-szinaptikus felszínen (szemben az OFF válaszokkal, ahol a pálcika és a csap útvonal különböző receptortípusokat alkalmaz).

PTX kezelés hatására már az ON és OFF válaszok tranzienciája is szignifikánsan változott, ez pedig sok esetben nem csak a PSTHr számértéknek változását, hanem valódi fenntartotról tranziensre kinetikára váltást is eredményezett. A GABA-erg inhibíció szelektív gátlása ugyanakkor az akciós potenciálok számának növekedését is maga után vonta, illetve tapasztaltuk kontroll körülmények között nem mérhető OFF komponensek megjelenését és az ON válaszokat hirtelen megszüntető erős gátló hatás megjelenését is. Utóbbi eset rávilágít arra a lehetőségre, hogy a GABA-erg transzmisszió vélhetőleg jelentős szerepet játszik a fenntartott fényválaszok kialakításában. MFA alkalmazásával szintén szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget tapasztaltunk a kontroll és a kezelést követő felvételeken mérhető tranziencia értékében.

4.4 Oszcillációs aktivitás

A tranziencia mérésében jelentős akadályt jelentett a jellemzően fenntartott ON válaszok esetén megfigyelhető oszcillációs aktivitás, amely a hisztogramon rendszeresen ismétlődő lokális minimum és maximum értékeket eredményezett. OFF válaszok esetén a fényválasz hasonló, átlagosan 24Hz körüli oszcillációját nem tudtuk kimutatni. PTX hatására azonban az ON válaszok oszcillációja is megszűnt (vagy mérsékelődött), míg MFA hozzáadásával a korábban megfigyelt szinkronizációt tudtuk megzavarni, bizonyítva, hogy a réskapcsolatok normál működése elengedhetetlen a dűcsejtek működésének összehangolásához.

5. Összegzés

A célkitűzésben összefoglalt pontokra reagálva:

1. Teszteltük és a rendelkezésünkre álló módszerek közül kiválasztottuk a PSTHr módszerét, melyről úgy érezzük, hogy megfelelő és széles körben alkalmazható módszere a tranziencia számításának
2. Kísérletes eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a tranziencia értékek alapján nem különíthetünk el egyértelmű tranziens és fenntartott kategóriákat, ugyanakkor egy korábban figyelmen kívül hagyott köztes vagy intermedier kategória bevezetését mindenképp szükségesnek érezzük a dichotómiába nem illeszkedő válaszok leírására
3. A tranzienciát nem egyetlen döntő tényező határozza meg, hanem a dúcsejteken konvergáló szignál útvonalak interakciójának eredményeképp alakul ki
4. Kijelenthetjük, hogy a retinális dúcsejtekben az oszcilláció kialakításához GABA-erg transzmisszió szükséges, ugyanakkor az egyéni sejtek oszcillációs aktivitásának összehangolásában a réskapcsolatoknak jut a legfontosabb szerep.

6. Publikációs lista

6.1. Az eljárás témakörében készült publikációk:

Ganczer A., Balogh M., Albert L., Debertin G., Kovács-Öller T., Völgyi B (2017): Transiency of retinal ganglion cell action potential responses determined by PSTH time constant. *PLoS One*, 12(9):e0183436. doi:10.1371/journal.pone.0183436.

Tengölics Á.J., Szarka G., **Ganczer A.**, et al. (2019): Response Latency Tuning by Retinal Circuits Modulates Signal Efficiency. *Scientific Reports*, 9(1):15110. doi:10.1038/s41598-019-51756-y

6.2. Az eljárás témakörében készült konferencia absztraktok:

Ganczer A., Szarka G., Völgyi B. (2019): Gap Junction Coupled Amacrine Cell Networks Mediate Synchronized Oscillatory Spiking in Mouse Retinal Ganglion Cells. *European Retina Meeting (ERM 2019)*.

Ganczer A., Szarka G., Völgyi B. (2019): Inhibiting Inner Retinal Signal Transmission Results in Sustained-to-Transient Switch in RGC Light Responses. *A Magyar Idegtudományi Társaság konferenciája (MITT 2019)*.

Ganczer A., Balogh M., Völgyi B. (2017): Temporal Response Features of Retinal Ganglion Cells are Mostly Determined in the Inner Retina. *Federation of European Neuroscience Societies konferenciája (FENS 2017)*.

Ganczer A., Tengölics Á.J., Völgyi B. (2017): Response Transiency of Retinal Ganglion Cells is Maintained when Input Dominance Switches Between Parallel Signalling Streams. *European Retina Meeting (ERM 2017)*.

Tengölics Á.J., **Ganczer A.**, Balogh, M., Völgyi, B. (2017): Ganglion cell responses impose a postdictive processing of Visual Signals in the brain. *Federation of European Neuroscience Societies konferenciája (FENS 2017)*.

Ganczer A., Balogh M., Atlasz T., Völgyi B. (2016): Transient and Sustained Response Characteristics of Ganglion Cells are Determined in the Inner Retina. *IBRO Workshop (IBRO 2016)*.

6.3. Az eljárás témakörén kívül készült publikációk

Kovács-Öller T., Szarka G., Tengölics Á.J., 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

Kovács-Öller T., Debertin G., Balogh M., et al. (2017): Connexin36 Expression in the Mammalian Retina: A Multiple-Species Comparison. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11:65. doi:10.3389/fncel.2017.00065

Szalai R., Ganczer A., Magyari L., Matyas P., Bene J., Melegh B. (2015): Interethnic differences of cytochrome P450 gene polymorphisms may influence outcome of taxane therapy in Roma and Hungarian populations. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(6):453-456. doi:10.1016/j.dmpk.2015.08.001

Nagy A., Sipeky C., Szalai R., et al. (2015): Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations. *BMC Genetics*, 16:108. doi:10.1186/s12863-015-0262-4

Sipeky C., Weber A., Melegh B.I., et al. (2015): Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1):280-283. doi:10.1016/j.etap.2015.05.008

Sipeky C., Matyas P., Melegh M., et al. (2014): Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from

Hungary: implication for public health intervention. *Molecular Biology Reports*, 41(9):6105-6110. doi:10.1007/s11033-014-3488-8

6.4. Az eljárás témakörén kívül készült nem referált konferencia absztraktok

Tengölics Á., Albert L., Varga D., Ganczer A., Balogh M., Völgyi B.: A retinális ganglionsejt válaszok befolyásának vizsgálata a vizuális jelek posztdiktív agyi feldolgozásában, *I. Móra Nemzetközi Interdiszciplináris Konferencia* (2017)

Tengölics Á., Ganczer A., Balogh M., Völgyi B.: Ganglion cell responses impose a postdictive processing of Visual Signals in the brain, *Federation of European Neuroscience Societies konferenciája* (FENS 2017).

7. Tudománymetriai adatok (2021)

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: 6.74

Független idézetek száma: 2