

pal.balazs\_80\_23

MTA Doktori Értekezés

**Ioncsatornákon és gliasejteken keresztül érvényesülő  
neuromodulációs mechanizmusok hatása az idegrendszeri  
excitabilitásra**

Pál Balázs

DE ÁOK Élettani Intézet

Debrecen

2023

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
<b>1. Összefoglalás .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Bevezetés .....</b>	<b>9</b>
2.1. A vizsgált struktúrák .....	9
2.1.1. A szaglóbám .....	9
2.1.2. Az agytörzsi hallópálya .....	10
2.1.3. A retikuláris aktivációs rendszer .....	13
2.1.4. A raphe magvak .....	18
2.2. Az általunk vizsgált neuronális ioncsatornák elektrofiziológiai és <i>in vivo</i> szerepeik ...	19
2.2.1. Az ANO2/TMEM16B csatorna .....	19
2.2.2. Az M-áram .....	20
2.2.3. A PPN neuronok esetében jelentős más membránsajátságok .....	21
2.3. Az asztrociták hatásai .....	22
2.3.1. Az asztrociták élettani és kórélettani szerepe .....	22
2.3.2. Az extraszinaptikus glutamaterg szignalizáció jelentősége .....	23
2.3.3. Az asztrociták által szabályozott neuronális extraszinaptikus áramok (Pál, 2015)	27
2.4. A RAS kolinerg ágára ható neuromodulációs hatások .....	29
2.4.1. Muszkarinos hatások .....	29
2.4.2. Endokannabinoid hatások .....	30
2.4.3. Szerotonerg hatások .....	32
2.4.4. Orexinerg hatások .....	33
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>34</b>
<b>4. Az alkalmazott technikák .....</b>	<b>34</b>
4.1. Felhasznált állatok .....	35
4.2. Szelet elektrofiziológia .....	38
4.2.1. Vékonszelet preparátum készítése .....	38
4.2.2. Szelet elektrofiziológia .....	39
4.2.3. Elektroolfaktogramm (EOG) .....	42
3.3. <i>In vitro</i> kalcium- és glutamát képzőanyagok .....	43
4.4. Opto-és kemogenetika .....	44
4.5. <i>In vivo</i> imaging, sztereotaxiás módszerek .....	45
4.6. Viselkedési tesztek .....	46
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>48</b>
5.1. Ioncsatornákon keresztül érvényesülő neuronális neuromodulációs mechanizmusok ..	48

5.1.1. Szaglópálya primer neuronok modulációja kalcium-aktivált kloridcsatornákon keresztül .....	48
5.2. A hallópálya kolinerg modulációja az M-áramon és más muszkarinos acetilkolin receptorhoz kötött hatásokon keresztül .....	52
5.3. A retikuláris aktivációs rendszer egyes tagjainak kolinerg modulációja az M-áramon keresztül .....	56
5.4. A PPN neuronok membránsajátságai és az azokért felelős ionáramok .....	67
5.5. Gliasejteken keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások .....	72
5.5.1. A nucleus pedunculopontinus neuronok asztrocitákon keresztüli modulációja.....	72
5.5.2.2. A lassú inward áramok korfüggése és hatása a szinaptikus plaszticitásra .....	83
<b>6. Megbeszélés.....</b>	<b>89</b>
6.1. Ioncsatornákon keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások.....	89
6.1.1. Ioncsatornákon keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások szenzoros struktúrákon.....	89
6.1.2. Ioncsatornákon érvényesülő neuromodulációs hatások a RAS-ban.....	93
6.2. Asztrocita aktiváción és az extraszinaptikus glutamát felszabaduláson keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások .....	100
6.2.1. A neuronális ingerlékenység asztrocitafüggő, tónusos változásai .....	101
6.2.2. A SIC-ek szerepe a neuromodulációs mechanizmusokban.....	105
6.2.3. A SIC-ek általános szerepei és életkorfüggése.....	107
6.3. További tudományos tervek .....	110
<b>7. A főbb megállapítások összegzése .....</b>	<b>111</b>
<b>A disszertáció alapjául szolgáló publikációk .....</b>	<b>112</b>
<b>A jelölt tudományos publikációi .....</b>	<b>114</b>
<b>Hivatkozások jegyzéke .....</b>	<b>119</b>

**Rövidítések jegyzéke**

2-AG	2-arachydonoyl-glicerol
4-DAMP	1,1-dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide
5-HT	5-hidroxi-triptamin
AAV	adeno-asszociált vírus
ACEA	arachidonyl-2'-chloroethylamide
aCSF	atreficiális cerebroszpinális folyadék
AF-DX116	otenzepad, 11-[[2-[(Diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-one
AI	adaptációs index
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANO	anocetamin
AP	akciós potenciál
AVCN	nucleus cochlearis anteroventralis
BAPTA	1,2-bis( <i>o</i> -aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
Best2	bestrophin-2
Bl6	Black-6
CA1	cornu Ammonis, 1-es régió
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CB1, 2	1-es, 2-es típusú kannabinoid receptor
ChAT	kolin acetiltranszferáz
ChR2	channelrhodopsin-2
CIC	colliculus inferior, centrális mag
CNG	ciklikus nukleotid kapuzott ('cyclic nucleotide gated')
CNO	clozapine-N-oxid
CPCCOEt	7-Hydroxyiminocyclopropan[b]chromen-1 $\alpha$ -carboxylic acid ethyl ester
CV	variációs koefficiens ('coefficient of variation')
D-AP5	D(-)-AP-5, D(-)-APV, D-2-Amino-5-phosphonovaleric acid
DAQ	data acquisition unit
dB	decibel

DCN	nucleus cochlearis ventralis
DD	teljesen sötét periódus ('darkness')
DFNA2	'deafness nonsyndromic autosomal dominant 2'
DGL $\alpha$	diacilglicerol lipáz $\alpha$
DL-TBOA	DL-threo-beta-Benzoyloxyaspartate
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNLL	nucleus dorsalis lemnisci lateralis
DR	nucleus raphe dorsalis
DSE	a serkentés depolarizáció indukált szuppressziója ('depolarization-induced suppression of excitation')
DSI	a gátlás depolarizáció indukált szuppressziója ('depolarization-induced suppression of inhibition')
EAAT	'excitatory amino acid transporter'
ECM	extracelluláris mátrix
EOG	elektroolfaktogramm
EPSC	excitatórikus posztszinaptikus áram ('current')
FAAH	'fatty acid amidohydrolase'
GABA	gamma-amino vajsav ('butyric acid')
GAD2	2-es típusú glutamát dekarboxiláz
GFAP	gliális fibrilláris savas ('acidic') protein
GIRK	G protein kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatorna (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)
GLAST	glutamát-aszpartát transzporter
GLT-1	1-es típusú glutamát transzporter
GPR55, 119	55-ös, 119-es G-protein kapcsolt receptor
GRIN	'gradient index'
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hM3D	humán M3 muszkarinos receptor
ICU	'imaging control unit'
Il-1	interleukin-1
INLL	nucleus intermedius lemnisci lateralis
IPSC	inhibitórikus posztszinaptikus áram ('current')

KCNQ	'KQT-like channel'
LDLD	6 óránként változó világos-sötét periódus (L: 'light'; D: 'darkness')
LDT	nucleus laterodorsalis tegmentalis
LL	folytonosan világos környezet ('light')
LSO	nucleus lateralis olivae superioris
LTD	'long term depression'
LTP	'long term potentiation'
MGL	monoacilglicerol lipáz
mGluR	metabotróp glutamátreceptor
MNI-	4-methoxy-7-nitroindoliny-
MNTB	nucleus medialis corporis trapezoidei
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride
MR	nucleus raphe medianus
MSO	nucleus medialis olivae superioris
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NAPE-PLD	N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt
NFA	nifluminsav
nhTMEM16	Nectria haematococca TMEM16
NLL	a lemniscus lateralis magjai
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NR	normál Ringer oldat
OGB	Oregon Green BAPTA 1 AM
OXR1, 2	1-es, 2-es típusú orexin receptor
PIP2	foszfatidiliinozitol-biszfoszfát
PLC $\beta$	foszfolipáz C $\beta$
PnC	nucleus pontis caudalis
PPN	nucleus pedunclopontinus
PPR	'paired pulse ratio'
Pr5	nucleus principalis nervi trigemini

PVCN	nucleus cochlearis posteroventralis
RAS	retikuláris aktivációs rendszer
REM	'rapid eye movement'
SEM	'standard error of the mean'
Sert	szerootonin transzporter
SIC	'slow inward current'
SnC	substantia nigra, pars compacta
SOC	oliva superior complex/ 'slow outward current' (szövegkörnyezettől függően)
Sp5	nucleus spinalis nervi trigemini
STDP	'spike timing dependent plasticity'
TMEM16	'transmembrane member 16'
TNF- $\alpha$	tumornekrózis faktor $\alpha$
TTX	tetrodotoxin
UCM707	(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(3-Furanylmethyl)-5,8,11,14-eicosatetraenamide
Vglut2	2-es típusú vezikuláris glutamáttranszporter
VNLL	nucleus ventralis lemnisci lateralis
VRAC	'volume regulated anion channel'
VTA	area tegmentalis ventralis
WIN55,212-2	(11R)-2-methyl-11-(morpholin-4-ylmethyl)-3-[(naphthalen-1-yl)carbonyl]-9-oxa-1-azatricyclo[6.3.1.0 <sup>4,12</sup> ]dodeca-2,4,6,8(12)-tetraene

## 1. Összefoglalás

Önálló kutatásaim tárgyául a neuromodulációs hatások agytörzsi struktúrákon betöltött élettani és kórélettani szerepét választottam; ez a téma vált a vezetésem alatt álló laboratórium új, általam megalapozott irányvonalává. A jelen munkában a neuromodulációs hatások ioncsatornákon és gliasejteken keresztüli hatását egér, patkány és humán túlélő agyszeleteken történő elektrofiziológiai mérési módszerekkel, opto- és kemogenetikával, morfológiai módszerekkel és viselkedési tesztekkel vizsgáltuk.

A kísérletekhez használt módszerek jelentős részét (kiváltott szinaptikus áramok, flash fotolízis, opto- és kemogenetika, sztereotaxiás operációk, morfometriai analízis, humán minták vizsgálata, viselkedési tesztek) én vezettem be a laboratóriumban.

Megállapítottuk, hogy az ANO2 kloridcsatorna közvetlen szerepet nem tölt be a szaglási folyamatban. Ezzel szemben a muszkarinos kolinerg hatások a hallópálya és a retikuláris aktivációs rendszer több elemén is pre- és posztszinaptikus támadáspontokon –sok esetben az M-áramon- keresztül, sejtípusfüggő módon befolyásolják a tüzelési mintázatot és a neuronális szinkronizációt.

Az endokannabinoid, muszkarinos, szerotoninerg és orexinerg neuromodulációs hatások vizsgálatakor megállapítottuk, hogy létezik egy nem-specifikus, asztrocitafüggő komponense, amit 'gliomodulációnak' hívhatunk. Itt az asztrocita aktiváció az extraszinaptikus glutamátkoncentráció növekedésén keresztül metabotróp glutamát receptorokon keresztül okozott tónusos depolarizációt és hiperpolarizációt, valamint N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorokon keresztül fázisos depolarizációt hozott létre. Míg az előbbi hatás a mesencephalonban az alvás-ébrenlét ciklusok, a szenzoros kapuzás és a mozgásszabályozás modulációjához vezetett, addig a fázisos depolarizáció hosszú távú szinaptikus plaszticitás kialakítására volt alkalmas. Mindezek a folyamatok egérben gyenge, emberben szoros életkorfüggést mutattak.

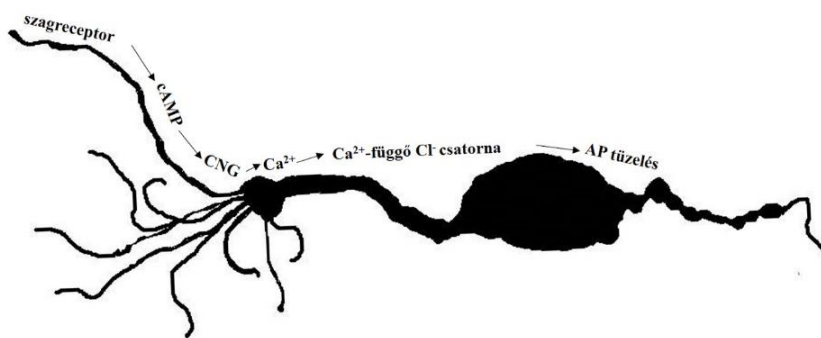


## 2. Bevezetés

### 2.1.A vizsgált struktúrák

#### 2.1.1.A szaglóhám

Az orrüregben elhelyezkedő fő szaglóhám mellett a szaglást egérben több járulékos szaglószer, mint a vomeronasalis szerv szolgálja. A receptorsejtek ezen szervekben a szaglóhám neuronok, amelyek a támasztó- és mirigysejtek mellett helyezkednek el a szaglóhámiban (Menco és Morrison, 2003; Kleene, 2008). Ezek a sejtek bipolárisak. Egyik nyúlványuk egy elágazódás nélküli axon, amelyik a bulbus olfactoriusban képez szinapszist. Másik, ellenpólusról kiinduló nyúlványuk egy rövid dendrit, ami a felszíni mucusrétegben egy végbunkóban végződik. Az utóbbiból átlagosan 17, 15-50  $\mu\text{m}$  hosszúságú cilium ered, amelyek ugyancsak a mucusban találhatóak (Menco és Morrison, 2003; 1. ábra).



**1. ábra. A szaglóhám receptorok aktivációs kaskádja.**

A receptoráram létrejötte szempontjából jelentős ioncsatornák a ciliumok membránjában

találhatóak. A több, mint 1100-féle szagreceptor G-protein kapcsolt (Dorrego-Rivas és Grubb, 2022). A mucusba oldódott szaganyag a receptort aktiválja, ami a  $G_{olf}$  fehérjén keresztül a III. típusú adenilát ciklázot aktiválja (Touhara, 2007; Malnic, 2007; Jones és Reed, 1989; Bakalyar és Reed, 1990). A cAMP koncentráció ciliumon belüli megemelkedése a ciklikus nukleotid kapuzott (CNG) csatornát nyitja. Ez a csatorna kationokra, többek között kalciumra permeábilis. A csatorna nyitásán keresztül létrejövő depolarizáción túl, ha az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése elég nagy, kalciumaktivált kloridcsatornák nyitását okozza (Dhallan és mtsai, 1990; Reisert és mtsai, 2003). A klorid magas intracelluláris és alacsonyabb extracelluláris koncentrációja miatt (54 és 55 mmol/l; Reuter és mtsai, 1998) ezen csatornák nyitása a klorid kiáramlását, így depolarizációt eredményez. Emlősökben a kloridcsatorna nyitását jelentős erősítő lépésnek gondolták, ami a receptor áram 80-90%-áért felelős (Reisert és mtsai, 2003; Nickell és mtsai, 2006; Boccaccio és Menini, 2007; 1. ábra).

A receptoráram lecsengéséért szintén számos mechanizmus felelős. Ilyenek a  $G_{olf}$  inaktivációja, a cAMP és kalcium eldiffundálása, eltávolítása a csatornák környezetéből és a cAMP hidrolízise foszfodiesterázok által. A megemelkedett intracelluláris kalciumszint közvetlenül és kalmodulinon keresztül csökkentheti a ciklikus nukleotid kapuzott (CNG) csatornák cAMP érzékenységét. Korlátozott hatékonysággal kalciumaktivált káliumcsatornák is hozzájárulhatnak a neuronok depolarizációjához (Kleene, 2009; Delgado és Bacigalupo, 2004).

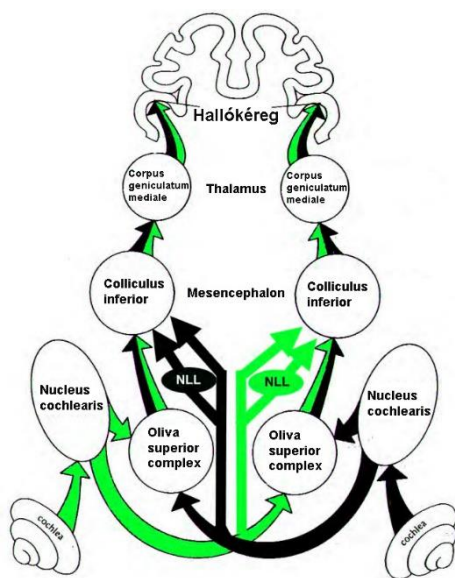
A szaglóhám kalciumaktivált kloridcsatornájának identitását és jelentőségét kívántuk megismerni posztdoktori kutatásaim alatt. A kalciumaktivált kloridcsatornát a Jentsch labor kutatásai az ANO2 csatornaként azonosították és kiemelkedő szerepét megkérdőjelezték, további kutatások lényegesnek, de nem elengedhetetlennek mutatták be.

### **2.1.2. Az agytörzsi hallópálya**

A központi hallópálya a hangnak, a levegő longitudinális rezgéseinek a frekvenciáját, intenzitását és irányát érzékeli nagy időbeli felbontással. A hallópálya nagyfokú összetettsége szükséges ahhoz, hogy egyszerre történjen meg mindezen modalitások érzékelése. A rendszerben jelen van a konvergencia és divergencia, a széli gátlás, integratív működések és más szenzoros (szomatoszenzoros, vestibularis) bemenetek hatása. A hallópálya hangingerek által kiváltott reflexek (pl. állatokban a fül hegyezése vagy az akusztikus startle reflex) is részt vesz (Pickles, 2015). A hallópálya egy fő rendezőelve a tonotopia, ami számos struktúra felépítésében tetten érhető. Ez azt jelenti, hogy egyes sejtszövetek felelősek egyes frekvenciatartományok érzékeléséért, a szomszédos frekvenciatartományok detektálása az agyi struktúrák szomszédos területein történik. A hallópálya legtöbb tagja binauralis, azaz mindkét fülből származó bemenetet kap; ez alól csak annak az első tagja, a nucleus cochlearis a kivétel, ami monauralis, csak az egyik oldalról származó bemenetet kap (Pickles, 2015; Szücs és Rusznák, 2002).

A nervus acusticusban futó rostok az agytörzsbe belépéskor egy anterior és egy posterior ágra oszlanak. Az anterior ág a ventralis, nucleus cochlearis anteroventralissal (AVCN) kezdődő, hangforrást lokalizáló pályának ad bemenetet, a posterior ág a dorsalis pályának. Az utóbbi a nucleus cochlearis dorsalissal (DCN) és posteroventralissal (PVCN) veszi kezdetét, amelyek a hanginger további, összetett elemzésében kapnak szerepet (Pickles, 2015).

Az AVCN fő sejtípusai a szferikális és globuláris borzas ('bushy') sejtek. A sejttestükön a nervus acusticus rostjaival formált 1-4 óriásszinapszis, a Held-féle végződés található. A szferikális borzas sejteken egyetlen preszinaptikus rost aktivációja létre tud akciós potenciált hozni 1:1 arányban, nagy időbeli hűséggel. A globularis borzas sejteken több konvergencia és átlagoló működés figyelhető meg (Kopp-Steinplflug és mtsai, 2002; Joris és mtsai, 1994). A szferikális borzas sejtek a stria acustica ventralison keresztül az oliva superior complex egyik tagjába, a nucleus olivaris superior medialisba (MSO), valamint az ellenoldali nucleus medianus corporis trapezoideibe (MNTB) vetít mindkét oldalon. Az MNTB az ellenoldali nucleus olivaris superior lateralist (LSO) látja el rostokkal. A szferikális borzas sejtek az azonos oldali LSO-ba projiciálnak.



2. A hallópálya felépítése. Zöld, fekete nyilak: egyik oldali cochlea felől érkező rostok. (NLL: a lemniscus lateralis magjai)

Az MSO neuronokat főleg az ellenoldali hangforrás aktiválja, míg az LSO neuronokat az azonos oldali ingerületek aktiválják, az ellenoldaliak gátolják (Grothe és mtsai, 2010; Golding és Oertel, 2012). Mind az MSO, mind az LSO direkt rostokat küld a colliculus inferiorba. Míg ezen MSO rostok nagy része az azonos oldalon marad, addig az LSO rostok átkereszteződnek. Mivel az MSO bemenetei nagyrészt az ellenoldalról származnak, a colliculus inferiorra mindkét esetben átkeresztezett pálya éri el (Pickles, 2015).

A colliculus inferiorra a felszálló rostok a lemniscus lateralisra keresztül érik el. A lemniscus lateralis magjai a nucleus dorsalis, intermedius és ventralis lemnisci lateralis (DNLL, INLL, VNLL). A DNLL az azonos oldali MSO-ból, mindkét oldali LSO-ból és az ellenoldali nucleus cochlearisból kap bemenetet (Pecka és mtsai, 2010). A DNLL rostjai nagyrészt gátlók, amelyek mindkét oldali colliculus inferiorra és az ellenoldali DNLL-t érik el. A VNLL fő bemenetét az ellenoldali nucleus cochlearis ventralis és az azonos oldali MNTB adja (Kelly és mtsai, 2009). Szemben a DNLL bemeneteivel, ez a mag az oliva superior komplexből nem kap bemenetet, így a hangforrás lokalizációban nem vesz részt (Malmierca és mtsai, 1998).

A nervus acusticus rostok posterior ága a komplex hanginger elemzésért és a verticalis síkú hangforrás lokalizációért felelős.

A nucleus cochlearis posteroventralis fő sejt típusa az octopus sejt, amelyek 60 feletti nervus acusticus végződést fogadnak, emiatt a nagy számban egyszerre érkező serkentő stimulusok fogják csak aktiválni. Az octopus sejtek jelentősége a hangerősség ingadozásának érzékelésében van (McGinley és Oertel, 2006; Golding és Oertel, 2012). Az octopus sejtek az ellenoldali VNLL-be projiciálnak.

A nucleus cochlearis dorsalis (DCN) nemcsak a nervus acusticus felőli, hanem szomatoszenzoros és vestibularis bemeneteket is kapnak (Oertel és Young, 2004). Élettani szerepe a hangforrás lokalizációval összefüggő reflexekben van (pl. a fül hegyezésében állatoknál; Sutherland és mtsai, 1998; vagy az akusztikus startle reflexben; Koch, 1999). Kiemelkedő kórélettani szerepe van a magnak a tinnitus kialakulásában (Kaltenbach, 2011). A DCN-ből ered az ún. nem-lemniscalis hallópálya, aminek elemei a colliculus inferiorban, a corpus geniculatum medialéban és a hallókéregben is megtalálhatóak. A hangingerek multimodális feldolgozásáért és a reflexek szervezéséért felelős (Pickles és mtsai, 2015).

A DCN koncentrikus szerveződésű rétegekből tevődik össze. A legkülsőbb a molekuláris réteg, ahol a szemcsesejtek axonjai futnak. A következő a piramis- vagy fusiform sejtek rétege. Itt a névadó sejt típuson túl a szemcse-, kocsikerék- ('cartwheel') és csillag ('stellate') sejtek szómái találhatóak. A két mélyebb rétegben a piramis sejtek basalis dendritjei, valamint az óriás sejtek és multipolaris sejtek szómái helyezkednek el (Oertel és Wu, 1989). A szemcse-, piramis- és óriás sejtek glutamaterg serkentő neuronok, míg a csillag-, kocsikerék- és multipoláris sejtek GABAerg és glicinerg neuronok.

A nervus acusticus I. típusú ganglion spirale sejtekből eredő axonjai a szemcsesejteket és a piramis sejtek basalis dendritfáját, míg a II. típusú sejtek rostjai a kocsikerék- és csillagsejteket látják el serkentő bemenettel. Az utóbbiak a piramis sejtekkel formálnak gátló szinapszisokat (Zhang és Oertel, 1993).

A DCN struktúrájában és funkciójában a cerebellummal mutat rokonságot; valamint fejlődéstani kapcsolat is felfedezhető a két struktúra között (Devor, 2000; Bell, 2002).

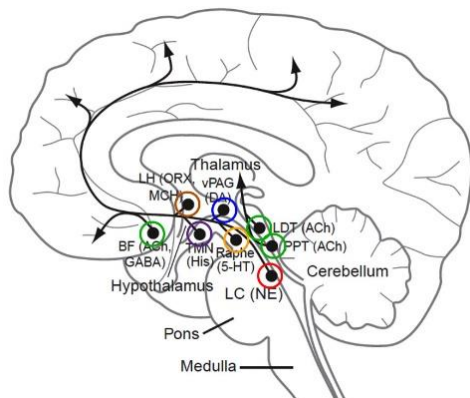
A hallópálya legnagyobb mesencephalicus magja a colliculus inferior. A magban konvergál a hallópálya dorsalis és ventralis ága. A mag serkentő és gátló bemenetei a DNLL-ből, VNLL-ből és a nucleus cochlearisból származnak (Pickles, 2012). A colliculus inferioron belüli legnagyobb struktúra a centrális mag. Jellegzetesen lamináris szerveződésű, egy lamina egy karakterisztikus frekvencia érzékelésére hivatott (Alkhatib és mtsai, 2006; LeBeau és mtsai, 2001). A centrális mag neuronjait nagyrészt az ellenoldali stimulusok aktiválják, de az azonos

oldali stimulusok finom hangolják és erősítik az ellenoldaliakat (Kuwada és mtsai, 2011). A külső mag és a dorsalis cortex a colliculus inferior további fontos területei. A külső mag bementei az ellenoldali nucleus cochlearisból, a centrális magból és szomatoszenzoros bemenetektől származnak, míg a dorsalis cortex nem kap közvetlen felszálló bemenetet a hallópályából, csak az ellenoldali colliculus inferiorból (Irvine, 1986). A dorsalis cortex neuronjait széles frekvenciatartományok ingerlik és gyorsan habituálódnak; a stimulus elején mutatnak nagy amplitúdójú válaszokat. A struktúra szerepe az új hangforrások felismerésében lehet (Pickles, 2015; Lumani és Zhang, 2010). A külső mag a szomatoszenzoros és akusztikus bemeneteket integrálja, az azok által kiváltott reflexek szervezésében lehet szerepe (Jain és Shore, 2006; 2. ábra).

Tudományos munkásságom egy része az agytörzsi hallópálya muszkarinos neuromodulációjának megismerésére irányult.

### 2.1.3. A retikuláris aktivációs rendszer

A retikuláris aktivációs rendszer (RAS) a pons és mesencephalon területén elhelyezkedő magcsoport, amelynek kritikus szerepe van a deszinkronizált kérgi aktivitás és az ébrenléti állapot fenntartásában. Mindehhez a mesopontin struktúrákkal előagyai (mint a basalis előagy kolinerg magjai) és hypothalamicus struktúrák (mint a lateralis hypothalamus és a nucleus tuberomammillaris) is hozzájárulnak.



3. ábra. A retikuláris aktivációs rendszer magjai. A fő neurotranszmittereket színes körök jelölik (zöld: acetilkolin, piros: noradrenalin, sárga: szerotonin, kék: dopamin, lila: hisztamin, barna: orexin, MCH)

A RAS magjainak egy fontos jellegzetessége, hogy jellegzetes neurotranszmitterekkel rendelkező neuronokat is tartalmaznak. Ilyen a locus coeruleus, ahol noradrenerg, a raphe magvak, ahol szerotonerg, az area tegmentalis ventralis, ahol dopaminerg, a nucleus laterodorsalis tegmentalis és nucleus pedunculo pontinus, ahol kolinerg projekciós neuronok fordulnak elő. Hasonló, diencephalicus és előagyai struktúrák az orexinerg neuronokat tartalmazó lateralis hypothalamicus area, a hisztaminerg neuronokat magába foglaló nucleus tuberomammillaris és a kolinerg basalis előagyai magvak (mint a nucleus basalis Meynerti, a

septalis magvak, a horizontalis és ventralis diagonalis szalag és a substantia innominata). Érdeemes azonban megjegyezni, hogy mindezen magvak nemcsak ritkábban előforduló neurotranszmitterrel bíró neuronokat tartalmaznak, hanem ezek glutamaterg és GABAerg neuronokkal együtt fordulnak elő és alkotnak lokális hálózatot. A RAS-nak van csak glutamaterg felszálló projekcióval rendelkező tagja is, mint a nucleus parabrachialis. Leírtak továbbá glicinerg felszálló rostokat is, amelyek nagyrészt a nucleus raphe magnusból veszik eredetüket (Giber és mtsai, 2015; Bardóczy és mtsai, 2017). A RAS magjaiban kotranszmitterként számos neuropeptid (mint az urotenzin vagy galanin) is előfordul (Steriade és McCarley, 2003; Cornwall és Philipson, 1988; Newman és Ginsberg, 1994.; Steriade és Glenn, 1982; Steriade és mtsai, 1988; Bardóczy és mtsai, 2017; 3. ábra)

A RAS fő bemeneteit a gerincvelői felszálló szenzoros rostokból, a halló- és látópálya felől nyeri, emellett reciprok kapcsolatban van számos, rostralisabban elhelyezkedő agyterülettel. A RAS projekciói két fő útvonalat követnek: a dorsalis útvonal a thalamuson keresztül befolyásolja a cortex aktivitását, míg a ventralis útvonal a hypothalamuson és basalis előagyron keresztül. Egyes, újabb források szerint a ventralis útvonal a fő útvonal, a dorsalis pedig modulálja az előbbi funkcióját (Steriade és McCarley, 2003).

A RAS fő élettani szerepe az ébrenlét fenntartása és stabilizálása. Az ébrenlét kialakításán túl a gyors szemmozgással járó (REM)- és lassú hullámú alvás közötti átmenet kialakításában is szerepet kapnak a RAS magjai. Nagy vonalakban, a nucleus pedunculopontinus (PPN), nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT) és az area tegmentalis ventralis (VTA) az ébrenlét és a REM alvás alatt aktívabb, míg a raphe magvak és a locus coeruleus az ébrenlét és a lassú hullámú alvás alatt. A fenti klasszikus képet árnyalja ugyanakkor, hogy csaknem minden magban találtak olyan neuronokat, amelyek a REM alvás, a lassú hullámú alvás, vagy az ébrenlét alatt a legaktívabbak; így egy jellegzetes aktivitási mintázat alakul ki az egyes alvás-ébrenléti fázisokban (Garcia-Rill, 1990; Mena-Segovia és Bolam, 2017).

Több RAS struktúra szerepet játszik a mozgásszabályozásban. Ide tartoznak a raphe magvak, a VTA és a PPN (utóbbi a nucleus cuneiformissal alkotja a mesencephalicus locomotor régiót). A raphe magvak és a VTA érzelmekben betöltött szerepe is ismert, a raphe magvak és a PPN a startle reflexben közvetlen szerepet is kapnak, valamint annak szabályozásával a szenzoros kapuzásban is részt vesznek (Garcia-Rill, 1990; Mena-Segovia és Bolam, 2017; Monti, 2011).

Az agytörzsi és a basalis előagyi kolinerg struktúrákat Ch1-Ch6 jelöléssel szokás csoportosítani (Mesulam és mtsai, 1983). A Ch1 a nucleus septalis medialis, a Ch2 a nucleus striae diagonalis verticalist jelöli. Ezek a struktúrák a hippocampusba küldenek rostokat. A Ch3 a nucleus striae diagonalis horizontalisnak, a Ch4 a nucleus basalis magnocellularisnak és substantia innominatanak felel meg. Az előbbi a bulbus olfactoriusba, utóbbi a cortexbe és az amygdalába vetít (Bigl és mtsai, 1982; Wenk és mtsai, 1980; Henderson, 1981). A Ch5 a PPN-t, a Ch6 az LDT-t jelöli. Ezek a magok számos egyéb agyterületen kívül a thalamusba adnak kolinerg bemenetet (Woolf és Butcher, 2011).

Kisebb kolinerg neuroncsoportok előfordulnak még a medialis habenulában, a striatumban, a bulbus olfactoriusban és a Cajella complexben (Woolf és Butcher, 2011).

#### *2.1.3.1. A PPN általános leírása*

A jelen disszertáció alapjául szolgáló vizsgálatok számottevő része a PPN megismerését célozta. Ez a mag a középagyi tegmentumban helyezkedik el, a pedunculus cerebellaris superiorától lateralisán és a lemniscus lateralistól medialisán. A rostrocaudalis tengelyen a substantia nigra és a nucleus parabrachialis között található. Tőle dorsalisán a nucleus cuneiformis és precuneiformis található, amelyekkel a mesencephalicus locomotor központot alkotják (Mena-Segovia és Bolam, 2017). A mag határai számos esetben nem pontosan körülhatárolhatóak, a PPN neuronok dendritjei sokszor más magok területére is átnyúlnak. Funkcionális átfedés is megfigyelhető a PPN és a nucleus cuneiformis neuronok között (Dautan és mtsai, 2021).

A PPN szinaptikus kapcsolatai kiterjedtek. A felszálló szenzoros bemeneteken túl a substantia nigra, a nucleus subthalamicus és a cortex felől érkező leszálló rostok bírnak kiemelkedő jelentőséggel (Garcia-Rill, 1990; Reese és mtsai, 1995). A PPN neuronok által beidegzett területek jelentősen különböznek a kolinerg és nem-kolinerg neuronok esetében. A kolinerg neuronok axonjai több (átlagosan 5), felszálló és leszálló kollateralissal rendelkeznek. A felszálló kollateralisok a colliculus inferiorban és superiorban, a substantia nigrában és nucleus subthalamicusban, a thalamusban, a lateralis hypothalamusban, a ventralis pallidumban, a mediolateralis septumban végződnek (Bevan és Bolam, 1995; Saper és Loewy, 1982; Dautan és mtsai, 2016a; 2016b; Woolf és Butcher, 1986; Motts és Schofield, 2009; Steriade és mtsai, 1988). A leszálló rostok a startle reflexben is szerepet kapó nucleus pontis caudalist és gigantocellularist, valamint a nucleus pontis oralist, de egyes szerzők szerint a

gerincvelőt is ellátják kolinerg rostokkal (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Spann és Grofova, 1989; Rye és mtsai, 1988). A nem-kolinerg (glutamaterg és GABAerg) neuronok axonjai kevesebb, átlagosan két kollateralissal rendelkeznek, az agytörzsön kívül a basalis ganglionokat, a thalamust és a hypothalamust idegzik be (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Ros és mtsai, 2010; Barroso-Chinea és mtsai, 2011; Ford és mtsai, 1995).

A PPN egyik legjobban dokumentált élettani szerepe az alvás-ébrenlét szabályozása. A PPN kolinerg neuronok az ébrenlét és a REM alvás alatt és közvetlenül előtte magasabb frekvenciával tüzelnek, mint a lassú hullámú alvás alatt. A kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája az ébrenlétbe vagy REM alvásba történő átmenet alatt emelkedik meg jelentősen, utána alacsonyabb frekvenciára esik vissza és optogenetikai stimulációjuk REM alvást indukál (Boucetta és mtsai, 2014; Petzold és mtsai, 2015; Grace és mtsai, 2014). A nem-kolinerg neuronok ugyancsak részt vesznek az ébrenlét és REM alvás szabályozásában: a glutamaterg populáció szelektív kemogenetikai aktivációja meghosszabbítja az ébrenlét idejét (Boucetta és mtsai, 2014; Kroeger és mtsai, 2017; Cox és mtsai, 2016).

A PPN a nucleus cuneiformissal együtt a mesencephalicus locomotor régió része. A nucleus cuneiformis egészének elektromos stimulációja az izomtónus fokozódásához és komplex mozgásmintázathoz vezetett, míg a PPN nem szelektív stimulációja atóniát idézett elő (Takakusaki és mtsai, 2016; Mena-Segovia és Bolam, 2017). A nucleus cuneiformis glutamaterg neuronjainak szelektív optogenetikai stimulációja az állat stimulációs frekvenciával egyenes arányban gyorsuló mozgását, a PPN glutamaterg neuronoké az állat lassú, fürkésző mozgását alakítja ki (Dautan és mtsai, 2021).

A PPN a szenzoros kapuzásban, annak egy jól vizsgálható és számszerűsíthető reflexében, a startle reflexben és annak prepulzus gátlásában is szerepet kap. A startle reflex egy intenzív és hirtelen, potenciálisan ártalmas stimulusra adott gyors, védekező jellegű motoros reakció. A kiváltó stimulus szerint létezik akusztikus, vestibularis és taktilis startle; továbbá ismert a halak olfactorius és a főemlősök vizuális startle reflexe (Koch, 1999; Yeomans és mtsai, 2006). A mag egészének elektromos stimulációja a reflexet magát nem, de annak prepulzus gátlását modulálta. A PPN kolinerg neuronok szelektív optogenetikai ingerlése azonban magának a startle reflexnek növelte meg az amplitúdóját (Koch és mtsai, 1993; Azzopardi és mtsai, 2018).

A PPN kórélettani jelentőséggel is bír. A régió szelektív léziója a peduncularis hallucinosis nevű betegséget hozza létre, ami a skizofrénia pozitív tüneteire emlékeztető



hanghallucinációkkal jár (Benke, 2006). Parkinson-kórban és skizofréniában is megfigyelték a PPN kolinerg neuronok számának a csökkenését (Garcia-Rill, 1990). A Parkinson-kórra emlékeztető mozgási tünetekkel, csökkent startle reflexszel és demenciával járó progresszív szupranukleáris parézist jól lehetett modellezni a PPN kolinerg neuronok szelektív léziójával (MacLaren és mtsai, 2018).

### 1.3.2. A PPN neuronok csoportosítása

A PPN neuronok morfológiájukat és funkciójukat tekintve is változatosak, emiatt többféle megközelítés szerint csoportosították őket.

Neurokémiai tulajdonságaik szerint a legalapvetőbb csoportosítás a neuronok kolinerg és nem-kolinerg csoportokra osztása. A kolinerg neuronok a caudalis pars compacta területén nagyobb arányban vannak jelen, mint a rostralis pars dissipatában (Mena-Segovia és mtsai, 2009; Wang és Morales, 2009). A kolinerg és nem-kolinerg neuronok a szóma alakja és méretei alapján nem különíthetők el élesen, de egyes szerzők szerint a kolinerg neuronok szómájának átmérője szignifikánsan nagyobb (Reese és mtsai, 1995; Garcia-Rill, 1990).

A kolinerg neuronok neurokémiai azonosítása a kolin acetiltransferáz (ChAT), NADPH diaphoráz és neuronális nitrogén monoxid szintetáz immunhisztokémiai jelölésével történik (Takakusaki és mtsai, 1996; Saitoh és mtsai, 2003; Veleanu és mtsai, 2016). A nem-kolinerg neuronok glutamatergek és GABAergek lehetnek. Létezik továbbá egy kis populáció, ami egyszerre kolinerg és glutamaterg (Wang és Morales, 2009). Funkcionális tulajdonságaik alapján ezek a neuronok jól illeszkednek a kolinerg neuronok közé (Dautan és mtsai, 2021).

Más fehérjék immunjelölésével további morfológiai alcsoportok definiálhatók. Kalciumkötő fehérjék, mint a calbindin, calretinin és parvalbumin is használhatók a PPN neuronok csoportosítására. Parvalbumin pozitív neuronok csak elvétve fordulnak elő. A calbindin nem található kolinerg neuronokban, a calretinin néhány esetben jelen van bennük. A calbindin és calretinin a GABAerg és glutamaterg neuronokban eltérő arányban van jelen és rostrocaudalis gradienst is mutat az immunopozitivitásuk (Martinez-Gonzalez és mtsai, 2009; 2012). További lehetséges markerek a galanin és urotenzin II nevű neuropeptidek. Az előbbi megjelenése ugyancsak rostrocaudalis gradienst mutat (Huitron-Resendiz és mtsai, 2005; Elson és mtsai, 2018).

A PPN neuronokat szokás két membránsajátságuk, az A-áram és az alacsony küszöbű kalciumtűskék megléte vagy hiánya szerint csoportosítani. Az eredeti leírás (Leonard és Llinas,

1988) szerint az I-es típusú neuron kalciumtűskékkel rendelkezik. A II-es típusúnak A-árama van, de kalciumtűskéi nem; míg a III-as típuson mindkét membránsajátság jelen van. Kang és Kitai (1990) elkülönít egy további, általuk is III-asnak nevezett típust, amelyiken egyik jelenség sem tetten érhető. A további leírások többé-kevésbé a fenti két szerzőpáros leírását követik (Takakusaki és mtsai, 1996; Ye és mtsai, 2010). Az elektrofiziológiai sejttípusok a neurokémiai sejttípusokkal némi összefüggést mutatott: az I. csoportban a kolinerg neuronok aránya 0-3%, a II. csoportban 54-75% volt (Leonard és Llinas, 1988; Takakusaki és mtsai, 1996).

A PPN neuronokat *in vivo* tüzelési tulajdonságaik alapján is csoportosították. Altatott patkányon végzett kísérletek alapján a kolinerg neuronok zömét az alacsony frekvenciával tüzelő neuronok tették ki. Ezek a neuronok a kérgi lassú hullámú aktivitás aktív fázisaiban és a gamma aktivitás alatt fokozták a tüzelési frekvenciájukat. A magas frekvenciával tüzelő neuronok egy kis alpopulációt tettek ki, amelyek a lassú hullámú aktivitás passzív fázisában tüzeltek és a gamma aktivitással nem mutatott korrelációt a tüzelésük (Mena-Segovia és mtsai, 2008). A nem-kolinerg neuronok között háromféle tüzelési mintázatot találtak. A "csendes" neuronok a corticalis szinkronizáció alatt nem tüzeltek, csak a deszinkronizáció alatt. A "tónusosan tüzelő" neuronok viszonylag állandó és a corticalis aktivitástól független frekvenciával tüzelnek. A "szabálytalanul tüzelők" a tüzelési frekvenciájukat vagy növelték, vagy csökkentették a corticalis deszinkronizáció során (Ros és mtsai, 2010).

A PPN neuronokat az aktivitási ciklusok alatti viselkedésük alapján is csoportosították. Elkülönítettek ébrenlét és REM alvás alatt aktív, csak REM alvás alatt aktív és csak ébrenlét alatt aktív neuronokat. Az első csoportba tartoztak a kolinerg neuronok, de GABAerg és glutamaterg neuronok is voltak a csoportban. A második csoport GABAerg és glutamaterg, míg a harmadik csoport kizárólag glutamaterg neuronokat tartalmazott (Boucetta és mtsai, 2014).

#### **2.1.4. A raphe magvak**

A raphe magvak az agytörzs szerotonerg rendszerét képezik, amelyek projekcióik szerint rendezett topográfiai szerveződést mutatnak. A caudalis szerotonerg magvak -a nucleus raphe magnus, obscurus és pallidus- a gerincvelő és agytörzs felé vetítenek, míg a rostralis struktúrák, mint a nucleus raphe medianus (MR) és a nucleus raphe dorsalis (DR) előagyi területek felé (Dorocic és mtsai, 2014; Hornung, 2003; Lowry, 2002). A MR a hypothalamust, nucleus accumbentst, a septumot és a hippocampust, míg a DR a fentiekén kívül a

frontoparietális kérget és az amygdalát látja el szerotonerg rostokkal (Soiza-Reilly és Kathryn, 2014; Dorocic és mtsai, 2014). A rostralis raphe magvak projekciói a dorsoventralis tengely mentén szerveződő topográfiai eloszlást követnek (Hale és Lowry, 2011; Ren és mtsai, 2018).

A DR és MR számos alpopulációját lehet elkülöníteni expressziós markereik, elektrofiziológiai sajátágaik és morfológiai jegyeik alapján (Andrade és Haj-Dahmane, 2013).

A DR és MR a RAS részei, így részt vesznek az alvás-ébrenlét szabályozásában. Ébrenlét és non-REM alvás alatt a DR aktív, míg REM alvás alatt aktivitása csökken (Monti, 2011). A raphe magvak a mozgás és az affektív állapotok szabályozásában is szerepet kapnak (Maier és Watkins, 2005; Ohmura és mtsai, 2020). A DR rostralis része szerepet játszik a mozgásfüggő stressz toleranciában (Greenwood és mtsai, 2003), míg az MR a krónikus pszichoszociális stresszhez történő adaptációhoz járul hozzá (Graeff és mtsai, 1996).

## **2.2. Az általunk vizsgált neuronális ioncsatornák elektrofiziológiai és *in vivo* szerepeik**

### **2.2.1. Az ANO2/TMEM16B csatorna**

Az ANO2 csatorna a kalciumaktivált kloridcsatornák közé tartozik, ami számos fajban előfordul a gerinctelenektől az emlősökig. A csatornát kódoló első megismert gén a TMEM16A/ANO1 volt, amelyről később feltételezték, hogy 8 transzmembrán doménnel rendelkező fehérjét kódol (Caputo és mtsai, 2008; Schroeder és mtsai, 2008; Yang és mtsai, 2008). Az először felfedezett ANO1 mellett további 9 ANO gént (ANO2-ANO10; TMEM16B-TMEM16K) írtak le (Oh és Jung, 2016).

A kalciumaktivált kloridcsatornákon kalciummentes intracelluláris tér esetén nem folyik áram. Alacsony intracelluláris kalciumkoncentráció esetén kifelé egyenirányító áram folyik keresztül rajtuk, míg magasabb kalciumkoncentráció esetén az egyenirányítás eltűnik (Kuruma és Hartzell, 1999; 2000).

A kalciumaktivált kloridcsatorna szerkezetét egy gomba, a *Nectria haematococca* TMEM16 proteinjének, a nhTMEM16-nak a leírásából ismerjük (Yang és mtsai, 2008). A funkcionális nhTMEM16 egy dimer, aminek alegységei egyenként 8 helyett 10 transzmembrán doménnel rendelkeznek. Az alegységek laterális oldalán egy szűk rés található, aminek egy hidrofíli zsebe szolgál kalciumkötő helyként. A rés nyílása körül 4 bázisos aminosav oldallánc

foglal helyet, amiből feltételezték, ez szolgál szelektivitási szűrőként, továbbá hogy a lateralisán elhelyezkedő rés szolgál pórusként a kloridionok számára (Peters és mtsai, 2015).

A legrészletesebben leírt kalciumaktivált kloridcsatorna az ANO1, ami számos helyen fellelhető. Többek között az epithelialis kloridszekrécióért felelős, de a vascularis és légúti simaizomsejteken is jelen van, valamint a hátsó gyöki ganglionban a nocicepciót szolgálja (Oh és Jung, 2016). Funkcionális ANO2-t a szaglóhámon kívül a hippocampusban is találtak, ahol a szinaptikus neurotranszmisszió modulációjában játszik szerepet (Huang és mtsai, 2012).

### 2.2.2. Az M-áram

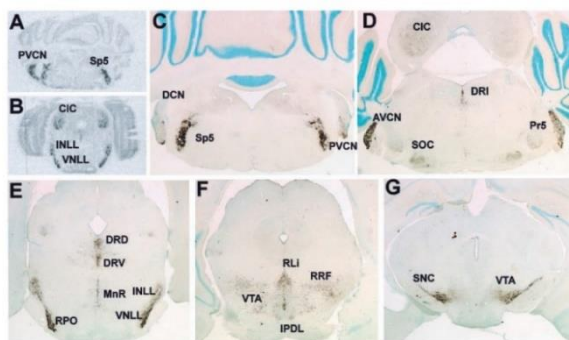
Az M-áram egy alacsony küszöbű feszültségfüggő káliumáram, ami lassan aktiválódik és nem inaktiválódik (Brown, 1988; Marrion, 1997). A nevében az M arra utal, hogy a G<sub>q</sub> kapcsolt muszkarinos acetilkolin receptorok (M1, M3, M5) aktivációja képes az áramot gátolni. Más, G protein kapcsolt receptorok (mint a P2Y purinerg, a GPR55 kannabinoid, az 5HTC2 szerotoninerg, az 1-es típusú angiotenzin vagy a 2-es típusú bradikinin receptorok) is ugyanilyen hatást fejtenek ki (Brown, 1988; Charpak és mtsai, 1990; Moore és mtsai, 1994). Ennek a gátlásnak a leginkább elfogadott mechanizmusa, hogy az M-áramért felelős csatorna nyitásához a foszfatidilinozitol-biszfoszfát (PIP<sub>2</sub>) megfelelően magas koncentrációban kell jelen legyen a membránban. Ha a G<sub>q</sub> protein a foszfolipáz C enzimet aktiválja, a PIP<sub>2</sub> hidrolízisével annak szintje lecsökken és a csatorna gátlás alá kerül (Suh és Hille, 2002). Emellett más mechanizmusok is ismertek (kalcium-kalmodulin kölcsönhatáson keresztül, Gamper és Shapiro, 2003; protein kináz C általi csatorna foszforiláció, Hoshi és mtsai, 2003).

Az M-áramért felelős ioncsatorna KCNQ, vagy más nómenklatúra szerint Kv7 alegységekből épül fel. A KCNQ1 alegység a központi idegrendszerben nem fordul elő, csak a KCNQ2-5 alegységek. Homo- és heterotetramer csatornák egyaránt előfordulnak. A leggyakoribb heterotetramer a KCNQ2/3, de KCNQ4/5 heterotetramer is létezik (Wang és mtsai, 1998; Cooper és mtsai, 2001; Roche és mtsai, 2002; Pan és mtsai, 2006).

A KCNQ alegységek által formált csatornák a szomatodendritikus régió túl az axondombon és az axon terminálison is előfordulnak (Devaux és mtsai, 2004; Martire és mtsai, 2004; Huang és Trussell, 2011).

Az M-áram a neuronális ingerlékenységet képes hatékonyan szabályozni és a neuromodulációs hatások gyakran ennek az áramnak a gátlásán keresztül fokozzák az

excitabilitást. Az egyes akciós potenciálok és akcióspotenciál-sorozatok jellegzetességeit is szabályozza: feleős az utóhiperpolarizáció közepes és késői szakaszának kialakításáért, valamint a tüzelési frekvencia adaptáció jelenségéért. Az utóbbi alatt az akcióspotenciál-sorozat alatti fokozatos tüzelési frekvenciacsökkenést értjük (Tzingounis és mtsai, 2010; Mateos-Aparicio és mtsai, 2014; Koyama és Appel, 2006; Navarro-López és mtsai, 2009; Tzingounis és Nicoll, 2008; Nigro és mtsai, 2014). Preszinaptikus lokalizációban az M-áram a neurotranszmitter felszabadulást szabályozza (Huang és Trussell, 2011).



4. ábra. *KCNQ4* pozitív agyterületek az agytörzsben, coronalis metszeteken (Kharkovets és mtsai ; 2000). A-B. *In situ* hibridizáció. C-G. Immunhisztokémia. Pozitív területek: CIC = colliculus inferior, nucl. centralis; DCN = nucleus cochlearis dorsalis; DR = nucleus raphe dorsalis; DLL, ILL, VLL = nuclus lemnisci lateralis dorsalis, intermedier, ventralis; Sp5, Pr5 = nucleus trigeminalis spinalis és principalis; SOC = oliva superior complex; SnC = substantia nigra, pars compacta; VTA = area tegmentalis ventralis.

A *KCNQ2*, *3* és *5* alegységek a központi idegrendszer számos területén megtalálhatóak, de a *KCNQ4* alegység előfordulása az agytörzsi hallópályára, a nervus trigeminus magjaira és a RAS egyes elemeire korlátozódik (Kharkovets és mtsai, 2000; 4. ábra). A periférián a *KCNQ4* alegység a cochlea külső szőrsejtjein, a Merkel- és Pacini-testeken és a hátsógyöki ganglionban fordul elő (Kharkovets és mtsai, 2000; 2006; Heidenreich és mtsai, 2011).

Emberben a *KCNQ4* alegység domináns negatív mutációja okozza a DFNA2 nem-szindrómás 2-es típusú halláscsökkenést. Itt a külső (és ennek következményeként a belső) szőrsejtek degenerációja az életkorral előre haladó, a folyamat végén 60 dB-es halláscsökkenés jön létre (Kharkovets és mtsai, 2006; Carignano és mtsai, 2019). A halláscsökkenés nem-szindrómás voltát Heidenreich és mtsai (2011) eredményei kérdőjelezték meg először, amikor a tapintásérzet érzékenyebbé válását mutatták be ezeken a betegeken és egérmodellen egyaránt.

### 2.2.3. A PPN neuronok esetében jelentős más membránsajátságok

A PPN neuronok elektrofiziológiai csoportosításában jelentős szerepet játszik az A-áram megléte vagy hiánya. Az A-áram egy tranzienst feszültségfüggő káliumáram, amit a gyors aktiváció és inaktiváció jellemez. A vizsgálatához jellegzetesen egy előimpulzussal hiperpolarizálják a neuront, ami elmozdítja a csatorna inaktivációját. Az A-áram jelenlétére utal az első akciós potenciálnak a depolarizáló impulzus kezdetéhez képest megfigyelt késése

vagy az első két akciós potenciál közötti időintervallum megnyúlása. Az A-áramhoz hasonlóan markáns, de annál lassabb inaktivációt mutató káliumáram a dendrotoxin-érzékeny káliumáram. Az A-áramért felelős ioncsatornát a Kv1.4, 3.4, 4.2 és 4.3 alegységek építik fel. A dendrotoxin-érzékeny áramért felelős ioncsatornát a Kv1.1, 1.2 és 1.6 alegységek alkotják (Coetzee és mtsai, 1999).

A PPN neuronok jellegzetes, de nem kizárólag rájuk jellemző jelensége a magas küszöbű membránpotenciál oszcilláció. Ezt nagy amplitúdójú depolarizáló impulzusok váltják ki, a jelenség küszöbe -20 és +10 mV körül van. Az oszcillációk amplitúdóját (és a jelenség detektálhatóságát) növeli, ha nem négyszög, hanem rámpa alakú depolarizáló impulzussal váltják ki azokat. Az oszcillációk frekvenciája az alfától a gamma tartományig húzódó széles sávban található. Az oszcillációk hátterében elsősorban P/Q, valamint kisebb részben N típusú kalciumáramok aktivációja áll, de megjelenésükhöz elengedhetetlen a káliumáramok jelenléte is. Az oszcillációknak az akcióspotenciál-tüzelés frekvenciájának maximalizálásában tulajdonítanak szerepet (Kezunovic és mtsai, 2013). Jelen munkában ezen oszcillációk kritikai vizsgálatát végeztük el.

## **2.3. Az asztrociták hatásai**

### **2.3.1. Az asztrociták élettani és kórélettani szerepe**

Az asztrociták a gliasejtek egy, a központi idegrendszerben elterjedt típusa. Alcsoportjaikként megkülönböztetünk protoplazmás és fibrózus asztrocitákat. A rágcsálókban és az emberben az asztrocita-neuron arány eltérő: az agykéregben egérben ez 0,36, míg emberben 1,48. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy ez az arány szorosabb korrelációt, fordított arányosságot mutat a neuronok denzitásával (és végső soron az agy méretével; Herculano-Houzel, 2014). Ez nem az egyetlen különbség, mert hominidákban ezen típusokon kívül számos más alcsoportot ismerünk, mint a varikózus projekciós és interlamináris asztrocitákat. A fibrózus és protoplazmás asztrociták az egérben leírtaktól a méretükben és kalciumhullámaik terjedési sebességében is különböznek (Oberheim és mtsai, 2009). A humán asztrociták eltérő sajátosságai a tanulási folyamatokat is elősegíthetik (Han és mtsai, 2013).

Bár az asztrocitákat nem-ingerlékeny sejtekként ismerjük, speciális "ingerlékenysége" az ún. "kalcium-excitabilitás", ami azt jelenti, hogy spontánul és különböző hatásokra is

képesek az intracelluláris kalcium koncentrációjukat hullámszerűen megváltoztatni (Verkhatsky és mtsai, 2012). A neuronok neurotranszmittereihez hasonlóan, az asztrociták is szabadítanak fel ún. gliotranszmittereket. Ilyen gliotranszmitterek a glutamát, ATP, adenzin, GABA, D-serin, taurin, IL-1, TNF- $\alpha$ , neurotrofinok és prosztaglandinok (Frank, 2013). A neurotranszmitterekkel szemben, nemcsak kalciumfüggő exocitózissal (Papura és mtsai, 1994; Bezzi és mtsai, 2004; Martineau és mtsai, 2013), hanem több más módon, mint transzportereken (cisztin-glutamát antiport; Warr és mtsai, 1999), connexon/pannexon hemichannel-en (Cotrina és mtsai, 1998; Ye és mtsai, 2003), ionotróp purinoreceptoron (Duan és mtsai, 2003), reverz módú glutamát- vagy GABA transzporterén (Szatkowski és mtsai, 1990; Gallo és mtsai, 1991), volumen regulált anioncsatornán (VRAC-on) és szerves anion transzporterén (Rosenberg és mtsai, 1994; Wang és mtsai, 2002) keresztül is felszabadulnak.

Az asztrociták élettani funkciói összetettek. Az extracelluláris tér ion- és neurotranszmitter koncentrációját és a szinaptikus plaszticitást szabályozzák, neuromodulációs hatásokban vesznek részt és az agyi metabolizmusban is összetett szerepet kapnak. A neuronhálózatok szinkronizálásában és szenzoros funkciókban is közreműködnek (Gourine és mtsai, 2010; Halassa és Haydon, 2010; Henneberger és mtsai, 2010; Poskanzer és Yuste, 2011; Navarrete és mtsai, 2012; Frank, 2013). Kiterjedt kórélettani szerepeik is ismertek: a teljesség igénye nélkül neurodegeneratív megbetegedésekben, stroke-ban és epilepsziában, Alzheimer-, Huntington- és Parkinson-kórban, amyotrophiás lateralsclerosisban, frontotemporalis demenciában és primer cerebellaris atrophiában is leírták szerepüket (Tian és mtsai, 2005; Halassa és Haydon, 2010; Han és mtsai, 2012; Shan és mtsai, 2012; Orr és mtsai, 2015; Sica, 2015; Zimmer és mtsai, 2015).

### **2.3.2. Az extraszinaptikus glutamaterg szignalizáció jelentősége (Pál, 2018)**

Az extraszinaptikus glutamaterg szignalizáció számos élettani és kórélettani folyamatban játszik kiemelkedő szerepet. Az élettani folyamatok közül a neuronális ingerlékenységet, azok nyugalmi membránpotenciálját határozza meg (Pál, 2015), neuroendokrin szekréción mechanizmusokban tölt be komplex feladatokat (Pai és mtsai, 2016; Stern és mtsai, 2016; Zhang és mtsai, 2017), az alvás-ébrenlét ciklusok szabályozásának egy fontos faktora (Oikonomou és mtsai, 2015; Dash és mtsai, 2009; Milojkovic és mtsai, 2005; Poskanzer és Yuste, 2016), a homeosztatisz szinaptikus plaszticitást és hosszú távú depressziót (LTD) képes meghatározni (Armbruster és mtsai, 2016; Soares és mtsai, 2013;

Kollen és mtsai, 2008; Papouin és mtsai, 2012). Számos neurológiai, pszichiátriai megbetegedésben ismert a kóroki szerepe vagy hozzájárulása a betegség súlyosbodásához (Alzheimer-kór, Huang és mtsai, 2018; Hoshi és mtsai, 2018; stroke és traumás agysérülés; Rossi és mtsai, 2000; Soria és mtsai, 2014; epilepszia, Petr és mtsai, 2005; skizofrénia, Javitt, 2010; addikció, Li és mtsai, 2018; sclerosis multiplex, Bernstein és mtsai, 2015; Huntington-kór, Ben Haim és mtsai, 2015; amyotrophiás lateralsclerosis, Van Den Bosch és mtsai, 2006; glioma, de Groot és Sontheimer, 1999).

Az extraszinaptikus glutamát forrásai lehetnek a neuronok, asztrociták, a mikroglia és oligodendroglia. A neuronok esetében az egyik fő forrás a szinaptikus szóródás. Ez a jelenség nem véletlenszerű glutamát kiáramlás, hanem az asztrociták és az extracelluláris mátrix által szabályozott folyamat. A szinaptikus glutamát az asztrociták metabotróp glutamát receptorait (mGluR) aktiválva azok glutamát felszabadítását és –felvételét megváltoztatja, így további, felerősített glutamát szóródáshoz vezet (Nie és Weng, 2009; Shen és mtsai, 2014; Rimmele és mtsai, 2017; Marcol és mtsai, 2015; Syková és Vargová, 2008; Wild és mtsai, 2015). Patológias körülmények között a neuronok non-szinaptikusan, a glutamát transzporterek reverz működésén keresztül is képesek glutamátot felszabadítani (Rossi és mtsai, 2000; La Bella és mtsai, 2007; Soria és mtsai, 2016; Wendt és mtsai, 2016).

Az asztrociták a glutamátot mint gliotranszmittert változatos módokon képesek felszabadítani, ahogy az fentebb leírásra került. Rajtuk kívül a mikroglia is képes glutamátot felszabadítani. Az előbbi az asztrocitákhoz hasonlóan számos mechanizmussal képes ezt megtenni, mint gap junction hemichannel (Maezawa és Jin, 2010), reverz módú glutamát transzporter (Noda és mtsai, 2000) vagy sejtduzzadás által aktivált glutamát permeábilis kloridcsatorna (Schlichter és mtsai, 2011).

A glutamát koncentrációja a szinaptikus vezikulákban a legnagyobb, 100 mmol/l körüli, míg a szinaptikus részben 6-7 mmol/l-es. Ezzel szemben, az extraszinaptikus glutamát koncentrációja jóval alacsonyabb; mérési módszertől is függően 0,18 - 45  $\mu$ mol/l-nek adódott (van der Zeyden és mtsai, 2008; Moghaddam, 1993; Lerma és mtsai, 1986). A glutamát diffúzióját a felszabadulási helye és a receptora között -és így a kifejtett hatását is- a diffúziós útvonal kanyarulatossága, az extracelluláris mátrix összetétele és az extracelluláris tér mérete is meghatározza. Az utóbbi az alvás-ébrenlét ciklusokkal is változik: ébrenlét alatt az extracelluláris tér a cortex 13-15%-át teszi ki, ami alvás alatt a 24%-ot is elérheti (Syková, 2004; Xie és mtsai, 2013; Marcoli és mtsai, 2015; Syková és Vargová, 2008).

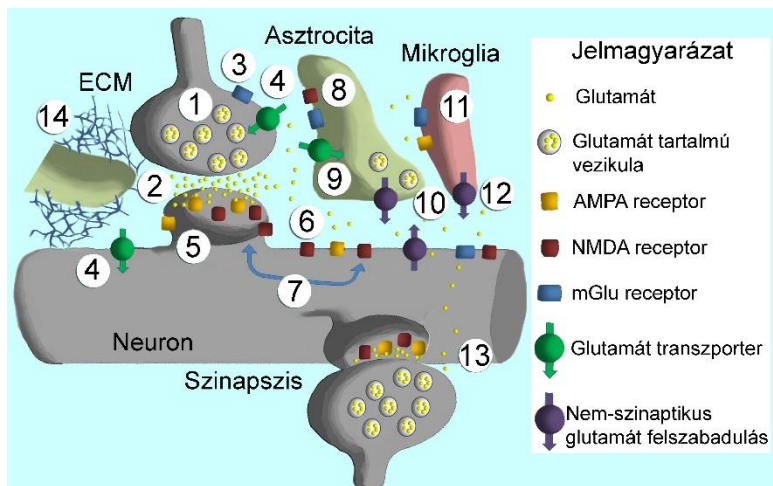


Az extraszinaptikus glutamát receptorok közül a leginkább ismert a neuronális extraszinaptikus NMDA receptor. Az NMDA receptor tetramer szerkezetű, ami di- vagy triheteromer formában fordul elő. A GluN1 alegység mellett a GluN2A alegységet inkább a szinaptikus, míg a GluN2B alegységet inkább az extraszinaptikus NMDA receptor jellegzetes alegységének tartják. Ez a szabály azonban nem minden esetben érvényes, mert a GluN2B alegység számos agyterületen a szinapszisokban is megtalálható (Papouin és Oliet, 2014; Paoletti és mtsai, 2013). A GluN2C alegység szinaptikusan és extraszinaptikusan egyaránt előfordul, a GluN2D kizárólag extraszinaptikus, míg a GluN3A fejlődéstani jelentőségű (Petralia, 2012). Az extraszinaptikus NMDA receptorok a dendriteken és a periszinaptikus régióban az asztrocita végtalpakkal szemben 'cluster'-eket formálnak (Papouin és Oliet, 2014). Funkcionális NMDA receptorok az asztrocitákon és az oligodendroglían is találhatóak, de hiányoznak az *in situ* mikrogljáról (Gundersen és mtsai, 2015; Verkhratsky és Kirchhoff, 2007; Dzamba és mtsai, 2015; Wendt és mtsai, 2016).

Egyes agyterületeken (mint a hippocampus gyurus dentatusa, a cerebellum, a nucleus tractus solitarii és a gerincvelő; Matott és mtsai, 2017; Kopach és Voitenko, 2013) extraszinaptikus AMPA receptorokat is találni. Az asztrocitákon, a Bergmann glián és a mikroglían ugyancsak van funkcionális AMPA receptor (Höft és mtsai, 2014; Cervetto és mtsai, 2015; Beppu és mtsai, 2013).

Az extraszinaptikus glutamát receptorok egy további fontos típusa az mGluR. A neuronokon nemcsak axonális és preszinaptikus lokalizációja ismert, hanem peri- és extraszinaptikusan is jelen van. Mind az I., mind a II. csoportba tartozó mGluR-ok ismertek ezekben a lokalizációkban (Ferraguti és Shigemoto, 2006; Nicoletti és mtsai, 2011; Luján és mtsai, 1997; Tamaru és mtsai, 2001).

Az asztrociták szintén rendelkeznek mGluR-ral, amelyek közül az mGluR3 és -5 a legismertebb. Az mGluR5 2 hetesnél fiatalabb állatokban található meg nagy denzitásban. Az mGluR3 minden életkorban jelen van, de felnőtt korban válik a fő mGluR típusá (Aronica és mtsai, 2003; Petralia és mtsai, 1996; Nicoletti és mtsai, 2011). Az oligodendroglia és a mikroglia is rendelkezik mGluR-ral. A mikroglia glutamát- és citokin felszabadítását az I. csoportú mGluR aktiváció gátolja, míg a II. csoportú serkenti a citokin felszabadulást (Farso és mtsai, 2009; Piers és mtsai, 2011; Kim és Na, 2016; Kaushal és Schlichter, 2008).



**5. ábra. Az extraszinaptikus glutamát eredete, diffúziója és hatásai.** 1. Glutamát tartalmú vezikulák felszabadulása. 2. A szinaptikus rés magas koncentrációjú (6-7 mmol/l) glutamátja a posztzinaptikus AMPA- és NMDA receptorokat aktiválja. 3. A preszinaptikus mGluR aktiváció a neurotranszmitter felszabadulást szabályozza. 4. Neuronális glutamát felvétel glutamát transzporterek keresztül. 5. Periszinaptikus AMPA- és NMDA receptorok. 6. Extraszinaptikus NMDA-, AMPA- és mGluR. 7. A

szinaptikus és extraszinaptikus receptorkészletek közti közlekedés. 8. Asztrocita NMDA- és mGluR. 9. Asztrocita glutamát felvétel glutamát transzporterekkel. 10. Asztrocita glutamát felszabadulás vezikula exocitózissal és sokféle más mechanizmussal. 11. Mikroglia AMPA- és mGluR. 12. Mikroglia glutamát felszabadulás. 13. Heteroszínaptikus aktiváció glutamát szóródáson keresztül. 14. Az extracelluláris mátrix (ECM) és az asztrocita vékonyulványok lassítják a glutamát diffúziót.

Az extraszinaptikus glutamát eltávolítását nagyrészt, de nem kizárólag az asztrociták végzik. Az asztrociták a felvett glutamátot a glutamin szintetáz nevű enzimmel glutaminná alakítják, majd az extracelluláris térbe juttatják. A glutamint a neuronok felveszik és visszaalakítják glutaminná; ezt a körforgást hívják glutamin-glutamát ciklusnak (Rose és mtsai, 2013; Rodriguez és mtsai, 2013). Ennek a lebontó működésnek a következményeként az asztrociták intracelluláris glutamát koncentrációja mintegy hatoda a neuronokénak (0,5 és 3,1 mmol/l).

A glutamát transzporterek a központi idegrendszerben olyan gyakoriak, hogy az összes protein mintegy 1%-át teszik ki. Ezeket a transzportereket az EAAT ("excitatory amino acid transporter") néven szokták illetni. 5 altípusuk van. Az EAAT1-et rágcásalókban GLAST-ként ("glutamate-aspartate transporter"), az EAAT2-t GLT-1-ként ("type 1 glutamate transporter") ismerik. Ezek a transzporterek a glutamátot (vagy aszpartátot) 3 Na<sup>+</sup> és egy H<sup>+</sup> ionnal kotranszportban és egy K<sup>+</sup> ionnal antiportban szállítják (Milton és Smith, 2018).

Az EAAT1 és EAAT2 zömmel asztrocitákon található, az utóbbi az előagyban különösen nagy denzitásban van jelen és a glutamát felvétel 90%-áért felel. Bár asztrocitákra specifikus transzporternek ismerik, az EAAT2 a hippocampusban neuronokon is előfordul preszinaptikus lokalizációban (Furness és mtsai, 2008). Az EAAT3 és EAAT4 neuronokra jellemző transzporter (Furness és mtsai, 2008; Holmseth és mtsai, 2012), az EAAT5 a retinából ismert (Vandenberg és Ryan, 2013; 5. ábra).

Bár az extraszinaptikus glutamaterg szignalizáció számos olyan sajátossággal rendelkezik, amiért különálló szignalizációs rendszernek lehetne tekinteni, szervesen összefügg a neuronális szinaptikus, hálózati aktivitással. Éppen ezért a szinaptikus és extraszinaptikus glutamaterg szignalizációt érdemes egymással összefüggésben vizsgálni, megfontolni.

### **2.3.3. Az asztrociták által szabályozott neuronális extraszinaptikus áramok** (Pál, 2015)

A központi idegrendszer számos területén leírt neuronális extraszinaptikus áramok nagy változatosságot mutatnak kinetikájukban és irányukban, valamint az érték felelős neuro/gliotranszmitterben és annak receptorában. Létrejöttükért nem kizárólag asztrocita-aktivitás, hanem sok esetben az extraszinaptikus neurotranszmitter koncentrációk változásai felelősek. Az extraszinaptikus neurotranszmitter koncentrációt azonban, ha nem is kizárólagosan, de nagyrészt az asztrociták szabályozzák.

Az extraszinaptikus áramok közül az egyik legrészletesebben leírt jelenség a lassú befelé irányuló áram ("slow inward current", SIC). Az excitatórikus posztszinaptikus áramoktól (EPSC) elkülönül számos paraméterében. A SIC-ek amplitúdója 18-477 pA közötti, és lassú 'rise time' (13-332 ms) jellemzi. Az áram leszálló szára egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illeszthető (decay tau = 72-1630 ms). Ezzel szemben, a miniatűr EPSC-k amplitúdója 19-40 pA közötti, a 'rise time' 1-6 ms-os, a leszállószár pedig két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illeszthető ( $\tau_1 = 6,6 - 27,6$  ms,  $\tau_2 = 83-146$  ms; Fellin és mtsai, 2004; Shigetomi és mtsai, 2008; Bardoni és mtsai, 2010; Reyes-Haro és mtsai, 2010). A SIC-ek paraméterei ugyanakkor nagy variabilitást mutatnak. A glutamát diffúziós útja a felszabadulás helye és a receptor között éppúgy meghatározza azt, mint az extraszinaptikus glutamát koncentráció változásának nagysága. Mindkét paraméter növekedése megnyújtja a SIC-ek időtartamát (Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Carmignoto és Fellin, 2006).

A SIC-ek GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptor aktiváció következményei és az asztrocita aktiváció jól kimutatható szerepet játszik létrejöttükben (Araque és mtsai, 1998; Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Perea és Araque, 2005; D'Ascenso és mtsai, 2007; Bardoni és mtsai, 2010; Pirrtimaki és mtsai, 2011; Chen és mtsai, 2012; Perea és mtsai, 2014).

A SIC-ek élettani szerepét az egy asztrocita doménbe eső szomszédos neuronok excitabilitásának szinkronizálásában látták, bár az előagyból származó adatokat az irodalomban egyetlen agytörzsből származó tanulmány nem tudta alátámasztani (Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; D'Ascenso és mtsai, 2007; Pirttimaki és mtsai, 2011; Reyes-Haro és mtsai, 2010).

A jelenséget számos agyterületen megfigyelték (hippocampus, Carmignoto és Fellin, 2006; látókéreg, Perea és mtsai, 2014; bulbus olfactorius, Kozlov és mtsai, 2006; nucleus accumbens, D'Ascenso és mtsai, 2007; thalamus, Parri és mtsai, 2001; nucleus medianus corporis trapezoidei, MNTB, Reyes-Haro és mtsai, 2010; gerincvelő, Bardoni és mtsai, 2010).

A SIC-ek mellett azok gátló "párja", a lassú kifelé irányuló áram ('slow outward current', SOC) is ismert. Ez az extraszinaptikus GABA<sub>A</sub> receptorok aktivációjához köthető jelenség azonban csak néhány agyterületen került leírásra (ventrobasalis thalamus, Jiménez-González és mtsai, 2011; bulbus olfactorius, Kozlov és mtsai, 2006; hippocampus, Le Meur és mtsai, 2012).

A fázisos excitatórikus áramok mellett tónusos befelé irányuló neuronális áramok is ismertek. Ezekért is a glutamát (valamint az NMDA receptor koaktivátor glicin) felszabadulás felelős. A receptoraik elsősorban ugyancsak az extraszinaptikus NMDA receptorok felelősek (Jabaudon és mtsai, 1999; Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Le Meur és mtsai, 2007; Papouin és mtsai, 2012; Petralia, 2012; Papouin és Oliet, 2014), bár a cerebellumban az extraszinaptikus AMPA receptorok aktivációja hozza őket létre (Sasaki és mtsai, 2012; Beppu és mtsai, 2014).

A SIC-ekhez hasonlóan a jelenség kialakulásához az asztrociták jelentősen hozzájárulnak (Jabaudon és mtsai, 1999; Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Le Meur és mtsai, 2007; Fleming és mtsai, 2011). A tónusos befelé irányuló áramok és a SIC-ek kialakulása összefügghet egymással: a glutamát felszabadulási helyéhez közeli NMDA receptorok aktivációja SIC-eket, míg az attól távoli receptorok aktivációja tónusos áramokat hoz létre (Jabaudon és mtsai, 1999; Angulo és mtsai, 2004).

A tónusos befelé irányuló áramoknak szerepet tulajdonítanak tanulási folyamatokban. Az EAAT2 glutamát transzporter protein expressziójának csökkenése egyes tanulási folyamatokat gyorsította, míg másokat lassította (Kiryk és mtsai, 2008).

Ezek az áramok ugyancsak számos agyterületen ismertek (hippocampus, Jabaudon és mtsai, 1999; Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Le Meur és mtsai, 2007; Papouin és mtsai, 2012; nucleus supraopticus, Fleming és mtsai, 2011; gerincvelő, Nie és mtsai, 2010; cerebellum, Sasaki és mtsai, 2012).

Az előbbi áram gátló párja, a tónusos kifelé irányuló áram ugyancsak ismert. Ezt GABA vagy glicin felszabadulása és extraszinaptikus GABA<sub>A</sub> és glicin receptorokhoz kötődése váltja ki. Számos agyterületen ismert (cortex, striatum, hippocampus, cerebellum, thalamus, agytörzs; Semyanov és mtsai, 2004; Connelly és mtsai, 2013; Lee és Maguire, 2014). A tónusos kifelé irányuló áram nem kizárólag asztrocita aktiváció következménye, hanem a gátló szinapszisokból történő GABA szóródás is eredményezheti. Az asztrociták is képesek GABA felszabadítására több mechanizmussal, esetenként glutamát felvételével egyidejűen, azt mintegy GABA<sub>A</sub>-ra cserélve (Lee és mtsai, 2010; Angulo és mtsai, 2008; Héja és mtsai, 2012).

A jelenségnek szerepe van a neuronális ingerlékenység szabályozásában, a hálózati oszcillációkban és fejlődéstani folyamatokban (mint a sejtosztódás gátlása és a sejtmigráció serkentése; Semyanov és mtsai, 2004; Park és mtsai, 2009; Connelly és mtsai, 2013; Lee és Maguire, 2014).

A fiziológias körülmények között jelen levő áramok mellett kórélettani körülmények között megfigyelhető áramok is ismertek. Ennek egy fontos példája az ischaemia által kiváltott befelé irányuló áram. Ez nagy, nanoamperes nagyságrendbe eső amplitúdójú áram, ami egy gyors és egy 'steady state' komponenssel rendelkezik. A többi befelé irányuló áramhoz hasonlóan ez is GluN2B alegységet tartalmazó extraszinaptikus NMDA receptor aktiváció következménye. Feltételezett szerepe a kérgi kúszó depolarizáció létrejöttében lehet. Ez az utóbbi egy ischaemiás vagy traumás agysérülés következtében létrejövő, az agykérgen tovaterjedő jelenség, ami súlyosbíthatja az eredeti sérülést (Rossi és mtsai, 2000; Soria és mtsai, 2016; Wendt és mtsai, 2016).

## **2.4. A RAS kolinerg ágára ható neuromodulációs hatások**

### **2.4.1. Muszkarinos hatások**

A muszkarinos acetilkolin receptorok (M1-5) G protein kapcsolt metabotróp receptorok. Az M1, -3 és -5 G<sub>q</sub> kapcsolt és az intracelluláris kalciumszint emelésén keresztül fejti ki a

hatását, míg az M2 és -4 G<sub>i</sub> kapcsolt és az adenilát cikláz gátlásán keresztül hat (Delmas és Brown, 2005; Brown és Passmore, 2009).

A mAChR-okat aktiváló acetilkolin az agytörzsnek és már subcorticalis struktúráknak kolínerg bemenetet biztosító PPN-ből és LDT-ből, valamint az oliva superior complexből származik (Woolf és Butcher, 2011; Chen és mtsai, 1994). A DCN-t és az attól caudalisan elhelyezkedő struktúrákat az oliva superiorból eredő rostok, a pons nagy részét és a középagyat a PPN és LDT látja el kolínerg rostokkal. A PPN az ellenoldali PPN-ből, az LDT-ből és a magon belüli kollaterálisokból kap kolínerg rostokat (Ye és mtsai, 2010; Mena-Segovia és mtsai, 2008). Egyes szerzők szerint átfedés van a DCN kolínerg rostokkal történő ellátásában a mesopontin kolínerg struktúrák és az olivocohlearis nyaláb között (Woolf és Butcher, 2011).

Korábbi irodalmi adatok alapján ismert volt a DCN-ben az M2 és M4 receptorok jelenléte (Chen és mtsai, 1994; 1999). A muszkarinos stimuláció a magban tónusosan serkentő jellegű, a kocsikerék- és piramis sejtek tüzelési frekvenciáját növeli (Chen és mtsai, 1994; Zhang és Kaltenbach, 2000). A muszkarinos hatások fiziológias körülmények között erősítő funkciót láthatnak el, míg kórélettani szerepüket az mutatja, hogy a cochlea sérülése esetén a muszkarinos rendszer több tagja felregulálódik és a sérüléssel ellenkező oldalon levő nucleus cochlearis aktivitása fokozódik (Kaltenbach és Zhang, 2007; Bledsoe és mtsai, 2009).

A PPN-ben M1, M2 és M4 receptorok jelenléte ismert. Az M1 receptor ingerlése befelé irányuló áramot aktivált, az M2 és M4 receptorok stimulációja befelé egyenirányító káliumáram nyitására keresztül hiperpolarizálta a neuronokat, míg néhány neuron bifázisos, depolarizációval, majd hiperpolarizációval járó választ mutatott (Ye és mtsai, 2010; Leonard és Llinás, 1994).

#### **2.4.2. Endokannabinoid hatások**

Az endokannabinoidok lipid természetű anyagok, mint a prototípusos anandamid és 2-arachidonoil-glicerol (2-AG), az oleamid, a virodhamin, a noladin éter vagy az N-arachidonildopamin (Devane és mtsai, 1992, Murillo-Rodriguez, 2008; Freund és mtsai, 2003). A kannabinoidok receptorai közül elsőként, még az endogén ligandjaik megismerése előtt az 1-es típusú kannabinoid receptort (CB1) írták le (Devane és mtsai, 1988; Matsuda és mtsai, 1990). További receptorai a 2-es típusú kannabinoid (CB2) receptor, a GPR55 és a GPR119 (Munro és mtsai, 1993; Brown, 2007; Drmota és mtsai, 2004; Overton és mtsai, 2006).

A neuronokban az endokannabinoidok szintézisének első lépése a neuronális depolarizáció és az intracelluláris kalciumszint növekedése vagy I-es csoportú mGluR aktiváció. A 2-AG szintézise a foszfolipáz C $\beta$  (PLC $\beta$ ) enzim által foszfatidilinozitolból történő diacilglicerol szintézisével indul, amit a diacilglicerol lipáz  $\alpha$  (DGL $\alpha$ ) alakít végül 2-AG-vá. Az anandamid szintézisének kulcsenzime a N-acil-foszfatidiletanolamin-hidrolizáló foszfolipáz-D (NAPE-PLD); (Katona és mtsai, 2006; Katona és Freund, 2012; Castillo és mtsai, 2012; Di Marzo, 2011). A 2-AG lebontásának legfontosabb résztvevője a monoacilglicerol-lipáz (MGL), az anandamidnál a zsírsavamid-hidroláz ("fatty acid amide hydrolase", FAAH). Ezek az enzimek az endokannabinoidok hatásának a hosszát is kontrollálják (Castillo és mtsai, 2012; Gulyás és mtsai, 2004).

A CB1 receptor G $_{i/o}$  kapcsolt receptorként írták le, de ismert a G $_s$  fehérjét is képes aktiválni (Demuth és Molleman, 2006). Ennek megfelelően az adenilát cikláz gátlását és aktivációját is leírták az esetében (Demuth és Molleman, 2006), csakúgy, mint az intracelluláris kalciumkoncentráció növekedését (Sugiura és mtsai, 1997) és egyes ioncsatornák modulációját. A P/Q-, L- és N-típusú kalciumáramokat, a D- és M-típusú káliumáramokat gátolja, míg G-fehérje kapcsolt befelé egyenirányító kálium csatornák (GIRK) áramait és az A-áramot stimulálja (Demuth és Molleman, 2006; Mackie, 1995; Mu és mtsai, 1999; Schweitzer, 2000).

Az endokannabinoidok legismertebb központi idegrendszeri hatása a preszinaptikus CB1 receptorokon keresztül valósul meg. A posztszinaptikus neuron depolarizációja endokannabinoidok felszabadulásához vezet, amelyek retrográd neurotranszmitterként a preszinaptikus CB1 receptort aktiválják és a neurotranszmitter felszabadulást gátolják. Ezt a hatást, a szinapszis gátló vagy serkentő mivolta szerint mint a gátlás vagy serkentés depolarizáció-indukált szuppresszióját ("depolarization-induced suppression of inhibition", DSI; ("depolarization-induced suppression of excitation", DSE) ismerik (Katona és mtsai, 2006; Ohno-Shosaku és mtsai, 2001; Wilson és Nicoll, 2001; Kreitzer és Regehr, 2001). A hosszú távú szinaptikus plaszticitásra gyakorolt endokannabinoid hatás is ismert; az endokannabinoidok CB1 receptor aktiváción keresztül hosszú távú depressziót hoznak létre (Gerdeman és mtsai, 2002; Robbe és mtsai, 2002).

A neuronok mellett az asztrociták is rendelkeznek CB1 receptorral. A hippocampalis piramissejtek depolarizációjával párhuzamosan felszabaduló endokannabinoidok a környező asztrocitákat CB1 receptoron keresztül aktiválják, amelyek a neuronális excitabilitást és szinaptikus aktivitást összetett módon (pl. SIC-eken keresztül) szabályozzák (Navarrete és Araque, 2008; 2010). Az asztrociták CB1 receptorának aktivációja a neocortexben glutamát

felszabaduláson és preszinaptikus NMDA receptor aktiváción keresztül képes LTD-t indukálni (Min és Nevian, 2012).

Az asztrociták nemcsak reagálnak az endokannabinoidokra, hanem maguk is képesek azokat szintetizálni és felszabadítani (Hegyi és mtsai, 2012; 2018; Stella, 2009).

Egyes tanulmányok az asztrocita CB1 receptornak mint mitokondriális receptornak tulajdonítanak fontos szerepet (Serrat és mtsai, 2021).

Az alvás és a kannabinoidok kapcsolata évtizedek óta ismert. Exogén kannabinoidok emberben a REM alvás időtartamát csökkentették, míg a lassú hullámú alvás hosszát megnyújtották (Feinberg és mtsai, 1975; Pivik és mtsai, 1972). Állatkísérletekben mind a REM-, mind a lassú hullámú alvás időtartama megnőtt (Murillo-Rodriguez, 2008; Murillo-Rodriguez és mtsai, 2008; Herrera-Solís és mtsai, 2010). Az endokannabinoidok termelődése és hatása is cirkadián változásokat mutat. Ébrenlét és alvásmegvonás alatt a pons és a hippocampus területén megemelkedik az endokannabinoidok szintje (Martinez-Vargas és mtsai, 2003; Rueda-Orozco és mtsai, 2008; Vaughn és mtsai, 2010).

### **2.4.3. Szerotonerg hatások**

A nucleus raphe medialis és dorsalis biztosítja a PPN és a RAS több más tagja számára a szerotonerg bemenetet. A szerotonin receptorai 7 osztályba sorolhatók (5-HT<sub>1-7</sub>). Az 5HT<sub>1A</sub> és 5-HT<sub>1B</sub> az adenilát cikláz gátlásán keresztül, az 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> és 5-HT<sub>2C</sub> receptorok a foszfolipáz C aktivációján keresztül, az 5-HT<sub>3</sub> receptor kationcsatorna aktiváción keresztül, míg az 5-HT<sub>6</sub> és 5-HT<sub>7</sub> az adenilát cikláz serkentésén keresztül hat (Monti, 2011).

A PPN neuronokon az 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> és 5HT<sub>7</sub> receptorok jelenléte ismert (Fay és Kubin, 2000; Fay és Kubin, 2001; Morilak és Ciaranello, 1993; Tohyama és Takatsuji, 1998). A szerotoninről ismert, hogy az ébrenlétet és a lassú hullámú alvást serkenti, míg a REM alvást gátolja (Monti, 2011; Garcia-Rill, 1990). A PPN "REM-on" kolinerg neuronjaira a poszt-szinaptikus szerotonin receptorok aktivációja gátló hatású; azokat hiperpolarizálja és csökkenti a tüzelési frekvenciájukat (Leonard és Llinas, 1990; Leonard és Llinas, 1994; Kobayashi és mtsai, 2003). A PPN neuronok gátlása hozzájárul a szerotonin REM alvást gátló hatásához.



#### 2.4.4. Orexinerg hatások

A hypocretin néven is ismert orexin a lateralis hypothalamusban termelődik prepro-orexinként, amiből két típusa, az orexin-A és -B alakul ki. Az orexinerg neuronok a cortexbe, diencephalicus és agytörzsi struktúrákba is projiciálnak; az utóbbiak közül ismert a PPN-be adott bemenetük (Tsujino és Sakurai, 2009; Inutsuka és Yamanaka, 2013). Két  $G_q$ -kapcsolt receptoruk ismert, az 1-es és 2-es típusú orexin receptor (OXR1 és 2). A két receptor affinitása különböző orexin-A-ra és B-re, és mindkettő megtalálható számos agyterületen (Bourgin és mtsai., 2000; Cluderay mtsai., 2002; Greco és Shiromani, 2001; Hervieu mtsai., 2001; Marcus mtsai., 2001; Suzuki mtsai., 2002; Trivedi mtsai., 1998).

Az orexin szerepet kap a táplálékfelvétel és az energia homeosztázis szabályozásában. Orexin receptor knockout egerekben hypophagia és késői kezdetű obesitas alakul ki. Ezzel összhangban, az orexinerg rendszer sérült működésével járó narkolepsziában csökken a kalóriabevitelt és a beteg testtömeg indexe megnő (Hara és mtsai, 2001; Schuld és mtsai, 2000). Az orexinerg rendszer a jutalmazásban is részt vesz. Az area tementalis ventralis dopaminerg neuronjait az orexin stimulálja; *in vivo* kísérletben az ide injektált orexin az állat jutalommotivált viselkedését facilitálja (Borgland és mtsai, 2006; Korotkova és mtsai, 2003; Harris és mtsai, 2005).

Az orexinerg rendszer az alvás-ébrenlét szabályozásban is részt vesz. A RAS elemein (mint a locus coeruleus, a raphe magvak, a PPN és LDT, valamint a nucleus tuberomammillaris és a basalis előagy) depolarizációt okoz és a tüzelési frekvenciát fokozza (Hagan és mtsai, 1999; Brown és mtsai, 2002; Yamanaka és mtsai, 2002; Eggermann és mtsai, 2001; Burlet és mtsai, 2002). Az orexinerg neuromoduláció célterületeire injektált orexin-A, valamint az orexinerg neuronok szelektív opto- és kemogenetikai stimulációja az ébrenlétben töltött időt növelte a REM- és a lassú hullámú alvás rovására (Adamantidis és mtsai, 2007; Sasaki és mtsai, 2011; Xi és mtsai, 2001).

Az ébrenlét és az energia homeosztázis szabályozása mutat összefüggéseket: az éhes állatban orexin szabadul fel, ami ébren tartja, lehetővé téve neki a táplálék felkutatását (Tsujino és Sakurai, 2009).

Az orexinerg rendszer sérülése esetén a narkolepszia nevű betegség alakul ki. A beteg nappali álmoságtól és az ébrenlét stabilitásának megszűnésétől, továbbá az izomtónus elvesztésétől (kataplexiától) szenved. Az orexinerg rendszer sérülését humán megbetegedés esetén az orexinerg neuronok nagy arányú (80% feletti) pusztulásával és az orexin-A szint

jelentős csökkenése jelenti (Peyron és mtsai, 2000; Mignot és mtsai, 2002; Tsujino és Sakurai, 2009). Állatmodellekben a prepro-orexin gén vagy az OX2R elvesztésével lehetett modellezni a betegséget (Chemelli és mtsai, 1999; Lin és mtsai, 1999).

### 3. Célkitűzések

1. Meg kívántuk ismerni a szaglóhám kalciumaktivált kloridcsatornájának identitását és jelentőségét a primer szenzoros neuron aktivációban (*Billig és mtsai, 2011*)
2. A nucleus cochlearis dorsalis és a colliculus inferior muszkarinos kolinerg neuromodulációjának hálózati és posztszinaptikus, M-áramon keresztül kifejtett hatását kívántuk feltérképezni (*Pál és mtsai, 2009; további nem közölt adatok*).
3. Az M-áramnak a PPN-ben betöltött szerepét, az érte felelős csatorna alegység összetételét terveztük megfigyelni (*Bordás és mtsai, 2015; Bayasgalan és mtsai, 2021a; Maamrah és mtsai, 2023*).
4. Az M-áram jelenlétének az MR és DR szerotonerg neuronok közötti megoszlását, annak esetleges topográfiai mintázatát kívántuk megismerni (*Bayasgalan és mtsai, 2021b*).
5. A PPN-en érvényesülő neuromodulációs hatások átfedéseinek hátterét, annak eredetét terveztük megérteni (*Kőszeghy és mtsai, 2015; Kovács és mtsai, 2015; 2017; Kovács és Pál, 2017; Kovács és mtsai, 2019*).
6. A fázisos asztrocita-függő befelé irányuló áramok fiziológias és patológiás szerepét, annak életkorfüggését kívántuk egérben és emberben megismerni (*Kovács és Pál, 2017; Csemer és mtsai, 2023*).

### 4. Az alkalmazott technikák

A DE ÁOK Neurobiológiai Laboratóriuma, ahol PhD hallgatóként, majd posztdoktorként dolgoztam, fő profilját tekintve a hallópálya egyes elemein végzett sejt- és szelet elektrofiziológiai, kalcium imaging és immunhisztokémiai kutatásokat. Thomas Jentsch laboratóriumában volt alkalmam bepillantani a transzgén technikákba. Posztdoktori tevékenységem során, majd később a laboratórium vezetőjeként további technikákat vezettem be. A szelet-elektrofiziológiát kiegészítettem kiváltott posztszinaptikus áramok vizsgálatával, flash fotolízissel, opto- és kemogenetikával, transzgén egértörzsek használatával és operációból

származó túlélő akut humán agyszeletekkel. Részben kollaborációs partnerek segítségével, részben saját tervezésű mérőmódszerekkel viselkedési tesztekkel egészítettem ki a kísérleti módszertanunkat. Sztereotaxiás műtétekre alkalmas egér műtőt hoztam létre. Dr. Szücs Péterrel folytatott együttműködésünkön keresztül agy blokkpreparátumon végzett elektrofiziológiai méréseket végeztem, továbbá morfometriai módszereket is alkalmaztam.

#### **4.1.Felhasznált állatok**

A disszertációban szereplő kísérleteket az érvényes nemzeti és nemzetközi törvényi szabályozással összhangban végeztük (2010/63/EU sz. EU direktíva az állatkísérletekről). A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérletes Bizottsága hagyta jóvá (6/2011/DEMÁB, 5/2015/DEMÁB, 19/2019/DEMÁB, 2/2012/DEMÁB).

Kísérleteinkhez 4-14 napos vad típusú Wistar patkányokat (Pál és mtsai, 2009), valamint 8-22 napos, felnőtt (2-6 hónapos) vagy idős (12 hónap feletti) egereket használtunk. Az általunk alkalmazott vad típusú egerek a C3H és B16 törzsekbe tartoztak. Konstitucionális knockout egértörzsek közül Thomas Jentsch laboratóriumban (MDC/FMP, Berlin, Németország) létrehozott, C3H alapú KCNQ4 knockout egértörzset (Kharkovets és mtsai, 2006) és az ugyancsak ebben a laboratóriumban B16 alapú ANO2 knockout egértörzset (Billig és mtsai, 2011) használtuk. Mindkét egértörzset heterozigóta tenyészpárok létrehozásával tartottuk fenn. Az utódokat genotipizáltuk, a homozigóta egyedeket (knockout, vad típusú alomtárs) használtuk fel a kísérletekhez. A CB1 receptor knockout egerek Andreas Zimmer laboratóriumából (Bonn, Németország) származtak; itt is knockout egyedeket és vad típusú alomtársakat használtunk a kísérletekhez (Zimmer és mtsai, 1999).

A cre-lox rendszer felhasználásával, különböző, a Jackson Laboratories-től beszerzett homozigóta transzgén állatok keresztezésével (1-3. táblázat) is hoztunk létre transzgén egereket. Ezek az egerek bizonyos sejtjeikben fejeztek ki fluoreszcens markereket, genetikailag kódolt kalciumindikátort, valamint optogenetikai aktuátort.

A cre-lox rendszer részleges helyettesítése és a fluoreszcens markerek, opto- és kemogenetikai aktuátorok, valamint kalcium- és neurotranszmitter indikátorok agyterületekre és sejttípusokra egyaránt specifikus expresszáltatása céljából sztereotaxiás célzóberendezéssel egyes agyterületekre (neocortex, PPN, nucleus pontis caudalis) adeno-asszociált vírusvektorral juttattuk be a megfelelő plazmidot. A felhasznált vírusok, az azok által hordozott plazmidok

által kódolt fehérjék és a kísérleti felhasználásuk a 4. táblázatban láthatóak (Addgene, MA, USA).

<i>Elnevezés</i>	<i>Jax szám</i>	<i>Teljes név</i>	<i>Cre expresszió helye</i>
<i>ChAT-cre</i>	<i>006410</i>	<i>B6;129S6-Chat<sup>tm2(cre)Lowl</sup>/J</i>	<i>kolinerg neuronok</i>
<i>GAD2-cre</i>	<i>010802</i>	<i>Gad2<sup>tm2(cre)Zjh</sup>/J</i>	<i>GAD2 (GAD65) pozitív GABAerg neuronok</i>
<i>Vglut2-cre</i>	<i>028863</i>	<i>B6J.129S6(FVB)-Slc17a6<sup>tm2(cre)Lowl</sup>/MwarJ</i>	<i>Vglut2-expresszáló (glutamaterg) neuronok</i>
<i>Sert-cre</i>	<i>014554</i>	<i>B6.129(Cg)-Slc6a4<sup>tm1(cre)Xz</sup>/J</i>	<i>szerotonerg neuronok</i>
<i>GFAP-cre</i>	<i>012886</i>	<i>B6.Cg-Tg(Gfap-cre)73.12Mvs/J</i>	<i>központi idegrendszeri asztrociták, neuronális összegek, egyes neuronok</i>

**1. táblázat. A munkáinkban használt driver törzsek**

<i>Elnevezés</i>	<i>Jax szám</i>	<i>Teljes név</i>	<i>Expresszált fehérje</i>
<i>lox-tdTomato</i>	<i>007905</i>	<i>B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J</i>	<i>vörös fluoreszcens marker</i>
<i>lox-ChR2</i>	<i>012569</i>	<i>B6;129S-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze</sup>/J</i>	<i>channelrhodopsin 2 optogenetikai aktuátor és sárga fluoreszcens marker (EYFP)</i>
<i>lox-GCaMP6f</i>	<i>028866</i>	<i>B6J.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm96(CAG-GCaMP6s)Hze</sup>/MwarJ</i>	<i>GCaMP6f genetikailag kódolt zöld kalciumindikátor</i>

**2. táblázat. A munkáinkban használt riporter törzsek**

<i>Elnevezés</i>	<i>Driver törzs</i>	<i>Riporter törzs</i>	<i>Expresszió</i>	<i>Saját referenciák</i>
<i>ChAT-tdTomato</i>	<i>ChAT-cre</i>	<i>lox-tdTomato</i>	<i>vörös fluoreszcens marker kolinerg neuronokban</i>	<i>Kőszeghy és mtsai, 2015; Bordás és mtsai, 2015; Petzold és mtsai, 2015; Kovács és Pál, 2017; Baksa és mtsai, 2019; Kovács és mtsai, 2019; Dautan és mtsai, 2021; Bayasgalan és mtsai, 2021b</i>
<i>GAD2-tdTomato</i>	<i>GAD2-cre</i>	<i>lox-tdTomato</i>	<i>vörös fluoreszcens marker GABAerg (GAD65 pozitív) kolinerg neuronokban</i>	<i>Kőszeghy és mtsai, 2015; Bordás és mtsai, 2015; Petzold és mtsai, 2015; Kovács és Pál, 2017; Dautan és mtsai, 2021; Bayasgalan és mtsai, 2021b</i>
<i>Sert-tdTomato</i>	<i>Sert-cre</i>	<i>lox-tdTomato</i>	<i>vörös fluoreszcens marker szerotoninerg neuronokban</i>	<i>Bayasgalan és mtsai, 2021a</i>
<i>Vglut2-tdTomato</i>	<i>Vglut2-cre</i>	<i>lox-tdTomato</i>	<i>vörös fluoreszcens marker glutamaterg (Vglut2 pozitív) neuronokban</i>	<i>Baksa és mtsai, 2019; Dautan és mtsai, 2021; Bayasgalan és mtsai, 2021b</i>
<i>GFAP-tdTomato</i>	<i>GFAP-cre</i>	<i>lox-tdTomato</i>	<i>vörös fluoreszcens marker asztrocitákban, a gyrus dentatus neuronjaiban, elvéve neocorticalis neuronokban</i>	<i>Kovács és Pál, 2017; Kovács és mtsai, 2019</i>
<i>ChAT-ChR2</i>	<i>ChAT-cre</i>	<i>lox-ChR2</i>	<i>channelrhodopsin 2 optogenetikai aktuátor kolinerg neuronokban</i>	<i>Bayasgalan és mtsai, 2021b</i>
<i>GFAP-ChR2</i>	<i>GFAP-cre</i>	<i>lox-ChR2</i>	<i>channelrhodopsin 2 optogenetikai aktuátor asztrocitákban, a gyrus dentatus neuronjaiban, elvéve neocorticalis neuronokban</i>	<i>Kovács és mtsai, 2017; Kovács és Pál, 2017</i>
<i>GFAP-GCaMP6f</i>	<i>GFAP-cre</i>	<i>lox-GCaMP6f</i>	<i>CGaMP6f kalciumindikátor, a gyrus dentatus neuronjaiban, elvéve neocorticalis neuronokban</i>	<i>nem publikált adatok</i>

3. táblázat. A cre-lox rendszer használatával létrehozott transzgén egerek áttekintése

<i>Pontos megnevezés, típus</i>	<i>Kifejeződés célpontja</i>	<i>Kifejeződött fehérje</i>
<i>pAAV-GFAP-hM3D(Gq)-mCherry (AAV5)</i>	<i>asztrociták</i>	<i>hM3D kemogenetikai aktuátor és mCherry marker</i>
<i>pAAV-GFAP104-mCherry (AAV5)</i>	<i>asztrociták</i>	<i>mCherry marker (kontroll)</i>
<i>pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA (AAV9)</i>	<i>cre rekombinázt kifejező sejtek</i>	<i>ChR2 kemogenetikai aktuátor és mCherry marker</i>
<i>pZac2.1 gfaABC1D-lck-GCaMP6f (AAV5)</i>	<i>cre rekombinázt kifejező sejtek</i>	<i>GCaMP6f</i>
<i>pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry (AAV Retrograde)</i>	<i>neuronok a bejuttatás helyén és az injekció helyére projiciáló struktúrákban</i>	<i>hM3D kemogenetikai aktuátor és mCherry marker</i>
<i>pAAV-hSyn-DIO- mCherry (AAV Retrograde)</i>	<i>neuronok a bejuttatás helyén és az injekció helyére projiciáló struktúrákban</i>	<i>mCherry marker (kontroll)</i>
<i>pAAV.hSyn.iGluSnFr.WPRE.SV40</i>	<i>neuronok</i>	<i>iGluSnFr glutamát szenzor</i>

**4. táblázat. Az általunk használt vírusok és plazmidok áttekintő táblázata**

## 4.2. Szelet elektrofiziológia

### 4.2.1. Vékonyszelet preparátum készítése

A vékonyszelet preparátumokhoz alacsony nátrium tartalmú arteficiális cerebrospinalis folyadékot (aCSF) használtunk, az alábbi összetétellel (mmol/l-ben): szacharóz, 130; glicerol, 60; NaCl, 25; KCl 2,5; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glükóz, 10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; myo-inozitol, 3; aszkorbinsav, 0,5; nátrium piruvát, 2. Az oldat pH-ja 7,4 volt. A preparáláshoz az oldatot jéghidegen (0- -2°C) használtuk. Egyes esetekben a NaCl teljesen hiányzott és kizárólag szacharózzal került helyettesítésre (250 mmol/l), a pH pedig 7,2 volt (Pál és mtsai, 2009). A szaglóhám és a vomeronasalis szerv preparálásához normál Ringer oldatot használtunk az alábbi összetétellel (mmol/l-ben): NaCl, 140; KCl, 5; glükóz, 10; nátrium piruvát, 1; HEPES, 10; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1. A pH NaOH felhasználásával 7,4-re lett beállítva.

A kísérleti állatokat 12 napos kor alatt dekapitációval, 12 napos kor felett cervicalis diszlokációval és ezt követő dekapitációval áldoztuk fel. A nucleus cochlearisból parasagittalis, a PPN-t tartalmazó agytörzsből és a neocortexből coronalis szeleteket készítettünk. A szaglóhámából és a vomeronasalis szervből azok 4% alacsony olvadáspontú agarózba (Biozym

Phor Agarose, Biozym Scientific GmbH, Németország) történő beágyazását követően a felszínre vagy a hossz tengelyre merőleges szeleteket készítettünk. A preparáláshoz a Jentsch laboratóriumban Leica VT1200S vibratómot, a többi esetben Microm HM 650V (Microm International GmbH, Walldorf, Németország) használtunk. Általában 200 µm vastagságú szeleteket preparáltunk. Ennél vastagabb, 500 µm-es szeletet az LDT optogenetikai aktivációja és a PPN kolinerg neuronokon történő mérés során készítettünk. Az oldatot folyamatosan buborékolattuk karbogén gázkeverékkel (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

A szeletek kipreparálása után 1 órán át 37°C-on, normál NaCl-tartalmú aCSF-ben inkubáltuk őket. A normál aCSF összetétele az alábbi volt (mmol/l): NaCl, 120; KCl 2,5; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glükóz, 10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; myo-inozitol, 3; aszkorbinsav, 0,5; nátrium piruvát, 2. Az oldat pH-ját 7,4-re állítottuk be és folyamatosan buborékolattuk karbogén gázkeverékkel. A nominálisan magnéziummentes aCSF alkalmazásának kivételével minden esetben ezt az oldatot használtuk kísérleteinkben.

#### **4.2.2. Szelet elektrofiziológia**

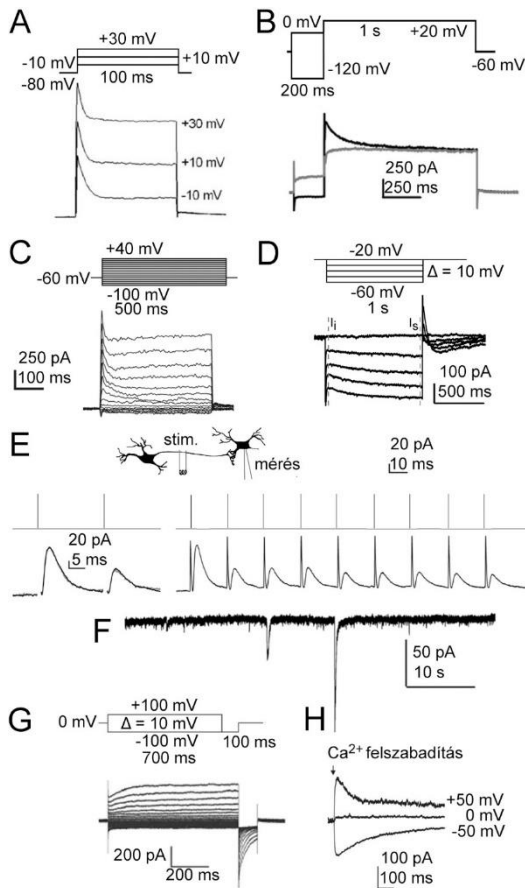
A szelet elektrofiziológiai vizsgálatokhoz használt debreceni mérőrendszer Zeiss Axioskop mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) és 2 db Axopatch 200A erősítővel (Molecular Devices, Union City, CA, USA) volt felszerelve. Az adatok rögzítése Clampex 10.0 szoftverrel (Molecular Devices, Union City, CA, USA) történt, míg az elemzésükhöz Clampfit 10.0 (Molecular Devices, Union City, CA, USA) és MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, GA, USA) szoftvereket használtunk. A fluoreszcens jelek láthatóvá tételéhez, fluoreszcens képalkotáson alapuló mérésekhez és egyes esetekben az optogenetikai stimulációhoz a Till Photonics rendszerét (Till Photonics GmbH, Gräfeling, Németország) használtuk. A rendszer xenon izzóval szerelt Polychrome V fényforrásból, CCD kamerából (SensiCam, PCO AG, Kelheim, Németország), képalkotási kontroll egységből (imaging control unit; ICU) és Till Vision szoftverből (4.0.1.3) állt. Egyes kísérletekben a preszinaptikus rostok elektromos stimulációjához saját készítésű monopoláris vagy wolfrám szálú bipoláris stimuláló elektródát (Microprobe Inc., Gaithersburg, USA) és BioStim STC-7a elektromos stimulátort (Supertech, Pécs) használtunk. Az optogenetikai stimulációhoz a Thorlabs Starter Kit LED fényforrását (470 nm, Thorlabs, Newton, NJ, USA) használtuk. A mérőrendszer a flash fotolízis kísérletekhez fel volt szerelve UV villanólámpával (JML-C2, Rapp OptoElectronic GmbH, Wedel, Németország), amivel az egész látóteret világítottuk meg.

A patch clamp kísérletekhez 5-8 M $\Omega$  ellenállású boroszilikát elektródákat készítettünk, amelyeket az alábbi összetételű belső oldattal töltöttünk meg (mmol/l): kálium glükonát, 120; NaCl, 5; 4-(hidroxietil)-1-piperazinétán-szulfonsav (HEPES), 10; Na<sub>2</sub>-foszfokreatinin, 10; EGTA, 2; CaCl<sub>2</sub>, 0,1; Mg-ATP, 5; Na<sub>3</sub>-GTP, 0,3; biocytin, 8; pH7,3. A méréseket az esetek nagy részében a neuron szómáján végeztük. Egyes esetekben két szomszédos szómán, valamint a neuronális szómán és annak proximális dendritjén végzett páros mérésre került sor.

A szaglóhám és vomeronasalis szerv neuronok szómáján végzett méréshez 5, a dendrit végbunkón 8-10 M $\Omega$  ellenállású pipettával mértünk. A szaglóhámon és a vomeronasalis szervben történő méréshez az alábbi belső oldatot használtuk (mmol/l): CsCl, 140; HEPES, 4; EGTA, 1; Mg-ATP, 2. A pH-t 7,2-re állítottuk CsOH segítségével. A szabad kalciumszintet a Maxchelator program (<http://maxchelator.stanford.edu/>) segítségével 0; 1,5 és 13  $\mu$ mol/l koncentrációra állítottuk be.

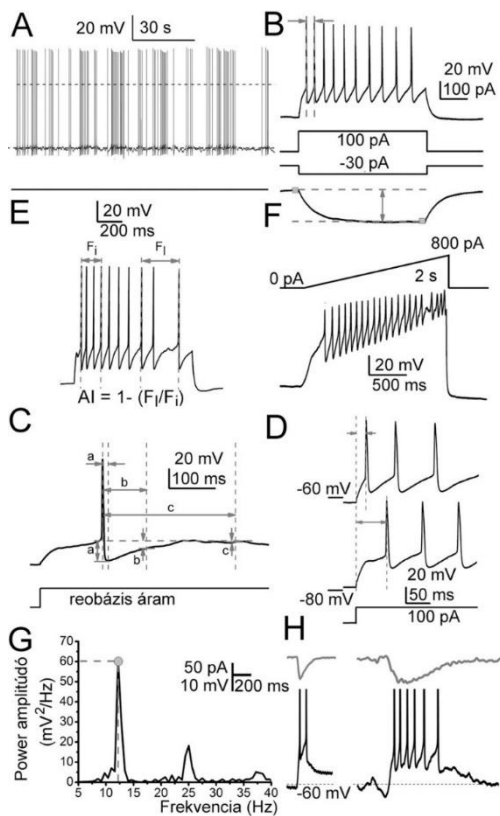
Csak azok a mérések kerültek eredményként feldolgozásra, ahol a szivárgó áram minimális volt és a soros ellenállás stabilan 20 M $\Omega$  alatti volt feszültség- és 30 M $\Omega$  alatti áram-clamp elrendezésben. Az elektrofiziológiai mérések feszültség- és áram-clamp elrendezésben, szobahőn (kb. 25°C-on) történtek. A mérésekhez használt feszültség- és áram-clamp protokollokat a 6. és 7. ábra szemlélteti.





**6. ábra. A dolgozat kísérleteihez használt feszültség-clamp protokollok. A-B.** A-áram méréséhez használt protokollok. **A.** -80 mV tartópotenciálról alkalmazott, 100 ms hosszúságú, -10, +10 és +30 mV amplitúdójú depolarizáló feszültséglépcsők (fent) és az alkalmazásukkal mért áramgörbék (lent). **B.** -60 mV-os tartópotenciálról induló, 200 ms hosszúságú, -120 mV-os és 0 mV-os előlépcsőket alkalmazó, 1 s hosszúságú, +20 mV amplitúdójú feszültséglépcső (fent) és a hatására kialakuló áramok (fekete: -120 mV-os előlépcső, szürke: 0 mV-os előlépcső). **C-D.** M-áram méréséhez használt protokollok. **C.** -60 mV-ról induló, 500 ms hosszúságú, -100 mV-ról +40 mV-ig 10 mV-onként emelkedő feszültséglépcsők (fent) és a hatásukra kialakuló áram (lent). **D.** M-áram relaxációs protokoll. -20 mV-os tartópotenciálról alkalmazott, 1 s hosszúságú repolarizáló feszültséglépcsők -30 és -60 mV között, 10 mV-onként (fent) és az alkalmazásuk alatt mért áram (lent). **E.** Stimulációs protokollok. A preszinaptikus rostokat naCSF-fel töltött patch elektródát magába foglaló monopoláris elektródával vagy wolfrám bipoláris elektródával stimuláltuk és a keletkező posztzinaptikus áramokat a posztzinaptikus sejten mértük. IPSC mérésekor a serkentő neurotranszmissziót 50  $\mu\text{mol/l}$  NBQX (AMPA receptor gátlószer) és 10  $\mu\text{mol/l}$  D-AP5 (NMDA receptor gátlószer) alkalmazásával gátoltuk. EPSC mérésekor a gátló neurotranszmissziót 10  $\mu\text{mol/l}$  bikukullin ( $\text{GABA}_A$

receptor gátlószer) és 1  $\mu\text{mol/l}$  sztrichnin (glicin receptor gátlószer) alkalmazásával blokkoltuk. A mérések végén NBQX-et, D-AP5-öt, sztrichnint és bikukullint a fenti koncentrációkban tartalmazó blokkoló koktéllal is végeztünk méréseket annak igazolására, hogy a mért áram valóban posztzinaptikus áram volt. Az ábrán 2 és 9 pulzust tartalmazó, 50 Hz-es stimuláló protokollt és an hatására keletkező IPSC-eket látjuk. A stimuláló áram erősségét az adott kísérletekben állítottuk be az optimális posztzinaptikus áramamplitúdó és kimaradás szám érdekében; 2 és 85  $\mu\text{A}$  közötti értékkel. **F.** Gapfree protokoll, -60 mV-os tartópotenciálról mérve. A mérés feszültséglépcsők nélkül folyamatosan, 2 és 35 perc közötti időtartammal zajlott. **G.** Kalciumaktivált kloridáram méréséhez használt protokoll. 0 mV-os tartópotenciálról alkalmaztunk 700 ms hosszúságú, -100 és +100 mV között 10 mV-os lépcsőkkel emelkedő feszültségprotokollt, amit 100 ms hosszúságú, -100 mV-os utólépcső követett. **H.** Intracelluláris kalcium felszabadítási protokoll. A tartópotenciált -50, 0 és +50 mV-on tartottuk, miközben UV villanólámpával (Rapp OptoElektronik GmbH, Kronsamp, Németország) szabadtítottuk fel a belső oldatból és az intracelluláris térből a kalciumot.



**7. ábra. A dolgozat kísérleteihez használt áram-clamp protokollok.** A. Spontán akcióspotenciál-tüzelés mérése áram-clamp üzemmódban, gapfree protokollal (folyamatos mérés 5-80 perc hosszúsággal). B. Áramlépcsők által kiváltott feszültségválaszok és akcióspotenciál-sorozatok mérése. -30 mV-tól +120 mV-ig, 10 mV-os lépésekkel alkalmaztunk 1 s hosszúságú áramlépcsőket (két példa a lépcsőkre középen). A bemenő ellenállást -30 mV-os áramlépcsővel, a kezdeti és a steady state hiperpolarizáció különbségéből határoztuk meg (lent, ld. szürke szaggatott vonalak). Az átlagos tüzelési frekvenciát a 100 pA amplitúdójú, 1 s időtartamú áramlépcső hatására létrejövő akciós potenciálok számaként, a maximális tüzelési frekvenciát a két, egymáshoz legközelebb eső akciós potenciált (az esetek túlnyomó részében az első kettőt) figyelembe véve határoztuk meg (fent, ld. szürke szaggatott vonalak). C. Az akciós potenciál utóhiperpolarizáció paramétereinek meghatározása (a. korai utóhiperpolarizáció, b. közepes utóhiperpolarizáció, c. késői utóhiperpolarizáció; ld. szürke vonalak). D. Az első akciós potenciál késésének mérése. A nyugalmi membránpotenciált -60 és -80 mV-ra állítottuk és 100 pA áramlépcsőt alkalmaztunk. E. Az adaptációs index (AI) meghatározása. Itt is 100 pA nagyságú depolarizáló áraminjekciót alkalmaztunk.  $F_i$ : kezdeti tüzelési frekvencia, az első 3, akciós potenciálok közötti időintervallum figyelembe vételével.  $F_f$ : az impulzus végén megfigyelt tüzelési frekvencia, az utolsó 2, akciós potenciálok közötti időintervallum alapján. F-G. A magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációk mérése. F. A magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációkat 1  $\mu\text{mol/l}$  TTX jelenlétében mértük, 0-tól 800 pA-ig emelkedő, 2 s időtartamú rámpa protokollal. G. A rámpa protokoll teljes hosszát figyelembe véve végeztük el a mért adatok power analizisét. H. Lassú befelé irányuló áramok (slow inward current, SIC) által kiváltott depolarizáció vizsgálata. Áram-protokollként használt SIC-ek (fent, szürke) és a hatásukra keletkező akcióspotenciál-tüzelés.

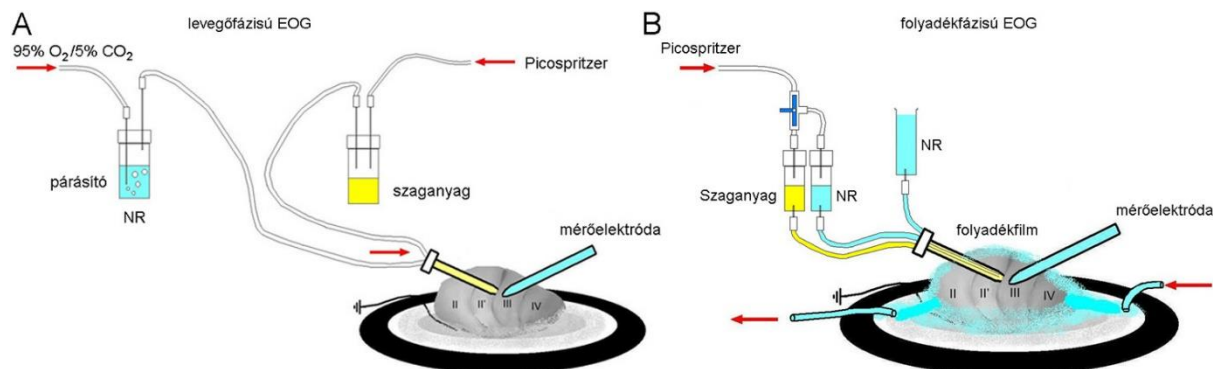
#### 4.2.3. Elektroolfaktogramm (EOG)

A szaglőhámon történő extracelluláris mérésekhez az egeret dekapitáltuk és az arckoponyát sagittális irányban megfeleztük, a fő szaglőhámot szabaddá tettük. A mérésekhez normál Ringer (NR) oldatot használtunk (összetétel mmol/l-ben: NaCl, 140; KCl, 5; glükóz, 10; nátrium piruvát, 1; HEPES, 10; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; pH = 7.4 NaOH-dal beállítva; az ozmolalitás 321 mOsm/kg volt). A preparátum 0,5% agarózban volt beágyazva. A feszültségmérésre NR oldattal töltött pipettával került sor. A szaganyagokat feloldva, folyadékfázisban; vagy egy 15 ml-es palackban levő 2 ml oldat felől a karbogén gázkeverékbe beoldódva alkalmaztuk picospritzer (Toohey Spritzer, Toohey Company, Fairfield, NJ, USA) alkalmazásával. Szaganyagok alkalmazása esetén egy pulzus 200 ms időtartamú, míg forskolin alkalmazásakor 2 s hosszúságú volt.

Az alábbi szaganyagokat alkalmaztuk:

- "Mix1": izopentil-acetát, hexanal, eucalyptol, limonén, 2-heptanon, mentilacetát, mentaolaj, eugenol, etil valerát, etilbutirát, etiltiglát, alliltiglát, octanal, izobutil propionát, acetal, hexanonsav, 2-hexanén (valamennyi 100  $\mu\text{mol/l}$  koncentrációban)
- "Mix2": d-carvon, 1-heptanol, 2-metilbutirát, geraniol, izopentilamin, 2-hexanon, acetofenon, 1-octanal (valamennyi 100  $\mu\text{mol/l}$  koncentrációban)
- Külön alkalmazva: izopentil-acetát, etilvalerát, geraniol egyenként, 1 mmol/l koncentrációban
- Forskolin, 30  $\mu\text{mol/l}$
- Szintetikus prérifarkas vizelet, 1:20 hígításban

Valamennyi szaganyagot 0,5% DMSO-t tartalmazó NR oldatban oldottuk fel (8. ábra)



8. ábra. Levegő- és folyadékfázisú elektroolfaktogram (EOG) vázlatos rajza. A. Levegőfázisú EOG (Cygnar és mtsai, 2010 alapján). B. Folyadékfázisú EOG (Nickell és mtsai, 2006 alapján).

### 3.3. In vitro kalcium- és glutamát képzés

A kalcium- és glutamát képzést 200  $\mu\text{m}$  vastagságú agyszeleteken végeztük.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció változásainak vizualizálásához Oregon Green 488 BAPTA 1 acetoxi-metilésztert (OGB, Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) használtunk. A 25-45 perces, 37°C-on végzett inkubáció során 33  $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációban használtuk a festéket. A szeletek inkubációját egy, Dr. Kőszeghy Áron által tervezett túlnyomásos kamrában, karbogénnal (95%  $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ ) kivitelezett túlnyomásos oxigenizáció mellett végeztük el. Egyes esetekben GCaMP6f genetikailag kódolt fluoreszcens kalciumindikátort használtunk ugyanerre a célra, amit vagy a cre-lox rendszerben történő keresztezéssel, vagy vírusvektorral bejuttatott plazmid segítségével fejeztünk ki (ld. fent). A szeletek láthatóvá tételéhez és az optikai méréshez Zeiss Axioskop mikroszkópot (Carl Zeiss AG) használtunk. A mikroszkóp a Till Photonics fluoreszcens képző rendszerével (Till

Photonics GmbH, Gräfeling, Németország) volt felszerelve, ami xenon izzóval felszerelt Polychrome V fényforrást, képalkotási kontroll egységet ("imaging control unit", ICU) és a Till Vision szoftver 4.0.1.3 változatát foglalta magába. A gerjesztő hullámhossz 488 nm volt, a szűrőkészlet egy dikroikus tükröt (Omega XF2031 505DRLPXR; Omega Drive, Brattleboro, VT, USA) és egy emissziós szűrőt (LP 515, Till Photonics) tartalmazott. A képalkotás során 10 Hz frekvenciával és 344x260 pixel felbontással készítettünk képeket. Egyes esetekben az inkubáció 20  $\mu\text{mol/l}$  Rhod-2 AM (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) fluoreszcens festékkel történt. Ebben az esetben a gerjesztő hullámhossz 550 nm volt és egy másik szűrőkészletet használtunk. Ez a szűrőkészlet Omega XF2019 590DRLP dikroikus tükröt és Omega 3RD590LP emissziós szűrőt tartalmazott (Omega Drive, Brattleboro, VT, USA).

#### **4.4. Opto-és kemogenetika**

Optogenetikai vizsgálatainkat szelet-elektrofiziológiával együtt végeztük. Az optogenetikai aktuátor minden esetben ChR2 volt, amit a cre-lox törzsek keresztezésével fejeztünk ki asztrocitákban, kolinerg vagy glutamaterg neuronokban (1-3. táblázat). A megvilágítás módja az asztrociták optogenetikai stimulációja esetén epifluoreszcens volt. A fent leírt fluoreszcens képalkotó rendszer segítségével a teljes látóteret 480 nm hullámhosszúságú fényvel világítottuk meg folyamatosan 1 percen át, vagy 10 Hz frekvenciával alkalmazott 10 ms hosszúságú pulzusokat használtunk. Más esetekben egy külső, 470 nm hullámhosszúságú LED-del (Thorlabs, Newton, NJ, USA) világítottuk meg a szelet egy régióját folyamatosan 1 percen át, vagy 1 Hz frekvenciával alkalmazott 500 ms hosszú megvilágítási ciklusokat alkalmazva.

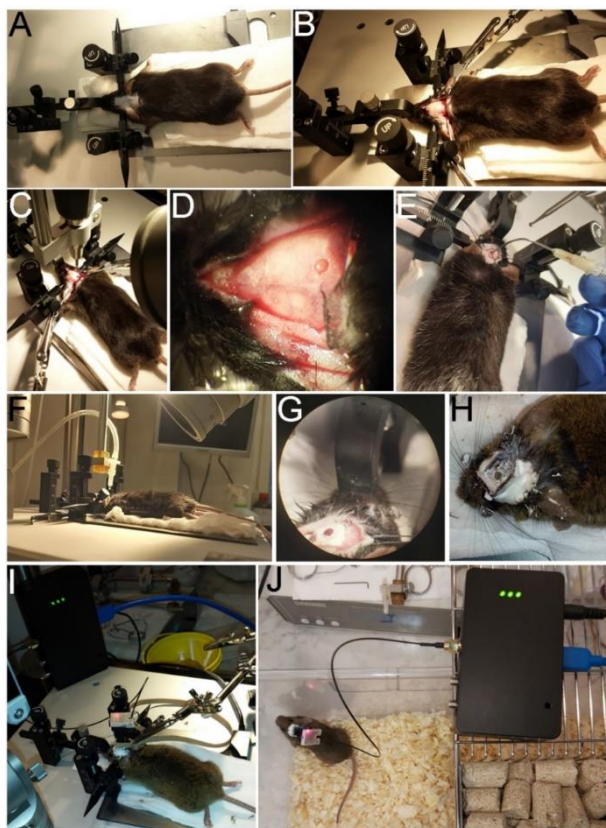
Kemogenetikai vizsgálataink során hM3D receptort alkalmaztunk aktuátorként, amit clozapine N-oxid (CNO) segítségével aktiváltunk. Az aktuátort kódoló plazmidot minden esetben vírusvektorral juttattuk be. A PPN asztrocitáiba mindkét oldalon alkalmazott sztereotaxiás injekcióval juttattunk be asztrocita-függő módon kifejeződő plazmidot (pAAV-GFAP-hM3D(Gq)-mCherry (AAV5)), míg a nucleus pontis caudalisba retrográd módon terjedő adeno-asszociált vírussal, mint vektorral juttattunk neuronokban kifejeződő plazmidot (pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry (AAV Retrograde)). Mindegyik esetben mCherry jelölőfehérje is kifejeződött az aktuátorral együtt. Kontrollként a megfelelő, csak mCherry jelölőfehérjét kifejező plazmidot hordozó vírusokat használtunk (pAAV-GFAP104-mCherry (AAV5), pAAV-hSyn-DIO- mCherry (AAV Retrograde); 4. táblázat).

A kemogenetikát felhasználó szelet-elektrofiziológiai vizsgálatok során 10  $\mu\text{mol/l}$  CNO-val aktiváltuk az aktuátort. A viselkedési tesztek során a CNO-t vagy ivóvízzel vette fel az egér, vagy intraperitonealis (*ip.*) injekció formájában (1 mg/kg). Az utóbbi esetben a kontroll kísérleteket fiziológiás sóoldat *ip.* injekciójával végeztük el.

#### **4.5. In vivo imaging, sztereotaxiás módszerek**

Az *in vivo* imaging-hez GCaMP6f genetikailag kódolt fluoreszcens indikátort különböző sejtvonalakban (Vglut2, GAD2, GFAP promoter alatt) kifejező egértörzseket használtunk. A műtét során 2 mm átmérőjű fűróheggyel craniotomiát végeztünk, a célterület és a craniotomia közötti területen levő agyszövetet szívóval távolítottuk el. A koponyacsont vérzéscsillapításához csontviaszt, az agyállományi vérzés csillapításához fiziológiás sóoldattal átitatott vattaheggyel végzett óvatos kompressziót használtunk. A gradient index (GRIN) lencsét a vizsgált agyterületbe (neocortex, mesencephalon; GRINTECH GmbH, Jéna, Németország) ezt követően ültettünk, amit fogcementtel rögzítettünk (Pentron, Jičín, Cseh Köztársaság). A második ülésben az *in vivo* fluoreszcens mikroszkóp (Miniscope, Labmaker UG, Berlin, Németország) tartókeretét rögzítettük, ugyancsak fogcementtel. A kísérleti állat a beültetett GRIN lencsét és a keretet viselte állandóan, a mikroszkóp az imaging időtartamára került az egér fején rögzítésre (9. ábra).

A vírusok bejuttatása a célterületekre (nucleus pontis caudalis -PnC, PPN, neocortex) sztereotaxiás célzóberendezés (RWD, Shenzhen, Kína) segítségével, a Paxinos atlasz (Franklin és Paxinos, 2013) koordinátáit felhasználva történt. A koordinátákat az 5. táblázat tartalmazza.



**9. ábra. A GRIN lencse beültetés lépései.** A. Az egér fejének rögzítése a sztereotaxiás berendezésben; szőrtelenítés. B. A fejbőr megnyitása, a koponya felszínének feltárása. C. Craniotomia fúróval. D. A fúrt craniotomiás nyílás, vérezscillapítást követően. E. A célterület felett levő agyszövet eltávolítása szivóberendezéssel. F. A GRIN lencse pozicionálása. G. A beültetett GRIN lencse és rögzítése fogcementtel. H. A kamera tartókeretének rögzítése. I. A kamera rögzítése. J. A Kamera és a kiolvasó egység (data acquisition unit, DAQ).

A műtétek alatt az állatok ip. alkalmazott ketamin-xylozin anesztéziában részesültek (100 mg/kg ketamin, 10 mg/kg xylozin). Az állatokat az altatás alatt fűtőpaddal melegítettük. A műtéteket követően az állatok 3-5 napon át per os ibuprofen fájdalomcsillapításban részesültek.

Célterület	Bregmától mért távolság (negatív szám: caudalis irány; mm)	Középvonaltól mért távolság (mm)	Mélység (calvariától mérve, mm)	Injektált térfogat (nl)
PPN	-4,6	1,05	2,75	200
PnC	-6	0,6	5	200
Neocortex	-2	1,5	0; 0,2; 0,4	3x200

**5. táblázat. A vírusinjekció során használt koordináták.**

#### 4.6. Viselkedési tesztek

A viselkedési tesztek során a cirkadián ritmust és a mozgásteljesítményt (activity wheel test-tel) és az akusztikus startle reflex amplitúdóját vizsgáltuk kontroll körülmények között, KCNQ4 knockout állatokon és akut vagy krónikus kemogenetikai kísérletekben.



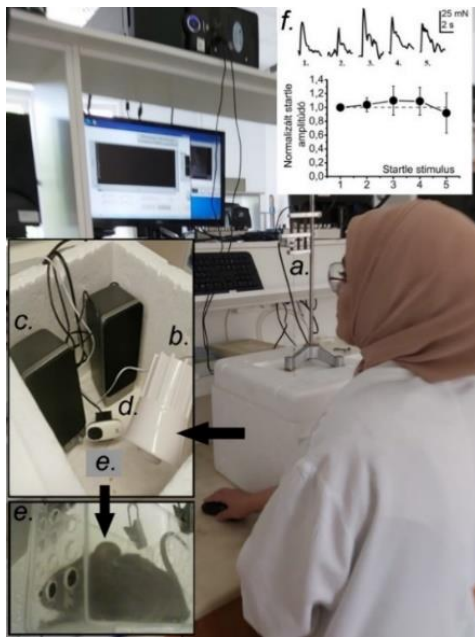
10. ábra. A kísérleti állat az activity wheel test közben.

Az activity wheel test során a kísérleti berendezés (Campden Instruments Ltd, Loughborough, Egyesült Királyság) egy ketrecet és egy mókuskereket tartalmazott, amit a kísérlet időtartama alatt egyedül tartott egér önkéntesen használt (10. ábra). A mókuskerek átfordulásainak számát 10 perces időintervallumokban összegezve mértük. 6-6 órás fény-sötétség ciklusokat és teljes sötétséget, vagy 12-12 órás fény-sötétség ciklusokat alkalmaztunk. Az így nyert adatokból az egerek napi vagy aktív időszakokban megfigyelt futásteljesítményét vagy aktivitásuk periódus idejét határoztuk meg. Az utóbbihoz a Lomb-Scargle periodogramot ([www.circadian.org](http://www.circadian.org)) használtuk. Az activity wheel test-et KCNQ4 knockout állatokon és vad típusú alomtársaikon 6-6 órás fény-sötétség ciklusokkal és teljes sötétségben használtuk. A 24 órás helyett 12 órás ciklusokat azért használtuk, hogy kizárjuk, hogy a C3H alapú törzsben az eredményeinket esetleg befolyásoló vakság fordul elő. A C3H vonal esetében leírták, hogy az állat öregedésével előfordulhat vakság (Gormann és Elliott, 2003; Harrison és mtsai, 2016).

Az akusztikus startle reflex méréséhez egy saját magunk által tervezett és épített rendszert használtunk. Ez az Élettani Intézet gyakorlati termében elérhető kontrakciós erő mérésére szolgáló mérőrendszert vette alapul. Ez a mérőrendszer egy erőmérő transzducert, egy erősítőt (Experimetria Kft, Budapest), egy analóg-digitális jelátalakítót (NI-PCI-6221; National Instruments, Debrecen, Hungary) és egy ehhez a rendszerhez fejlesztett szoftvert (Dr. Szentesi Péter) tartalmaz. A mérést egy hungarocell dobozban történt annak érdekében, hogy az egeret minél jobban izoláljuk a környezeti hatásoktól. Az egér a doboz aljától 2-3 mm-re emelkedő, az erőmérő rendszerre felfüggesztett 8x3,5x5,5 cm-es (hossz, mélység, magasság), a tetején nyitott és a rövidebb lapjain perforált plexi dobozban foglalt helyet. A dobozban helyet kapott egy folyamatosan 60 dB fehér zajt játszó hangszóró, egy 105 dB hangerősséget produkáló riasztósziréna és egy, a plexi dobozra irányuló webkamera (11. ábra). Miután az egér megnyugodott az általa korábban megszokott plexi dobozban (azaz legalább 2 percig stabil alapvonal volt az erőmérővel mérhető és a kamera a nyugodtan elhelyezkedett egeret mutatta). Ezt követően 2 percenként 1 s hosszúságú 105 dB erősségű zajnak (startle stimulusnak) tettük ki az egeret és az erőmérő által kimért összerezzenést detektáltuk. A startle stimulust 2 percenként, 5-ször alkalmaztunk. Habitúciót vagy prepulzus gátlást nem figyeltünk meg az 5 stimulus alkalmazása során (11. ábra).



Az akusztikus startle reflexet 2 hónapos KCNQ4 knockout állatokon és vad típusú



alomtársaikon, valamint az akusztikus startle reflexért felelős neuronális hálózat kemogenetikai aktivációja során vizsgáltuk. Az utóbbi esetben kontrollként ip. fiziológiás sóoldatot, egy újabb kísérleti napon ip. CNO-t alkalmaztunk (1 mg/kg).

**11. ábra. Az akusztikus startle reflex vizsgálata.** a-e. A mérőrendszer részei. a. Transzducer. b-e. A nyíllal jelölt doboz belseje: b. riasztósziréna, c. hangszóró, d. kamera, e. felfüggesztett plexi doboz az egérrel. f. 5 egymás utáni akusztikus startle reflex amplitúdója és 5 eset statisztikai értékelése (az első startle amplitúdóra normalizálva, átlag  $\pm$  SEM). A fényképen a témavezetésem alatt dolgozó PhD hallgató, Baneen Maamrah végzi a kísérletet.

## 5. Eredmények

### 5.1. Ioncsatornákon keresztül érvényesülő neuronális neuromodulációs mechanizmusok

#### 5.1.1. Szaglóhám primer neuronok modulációja kalcium-aktivált kloridcsatornákon keresztül

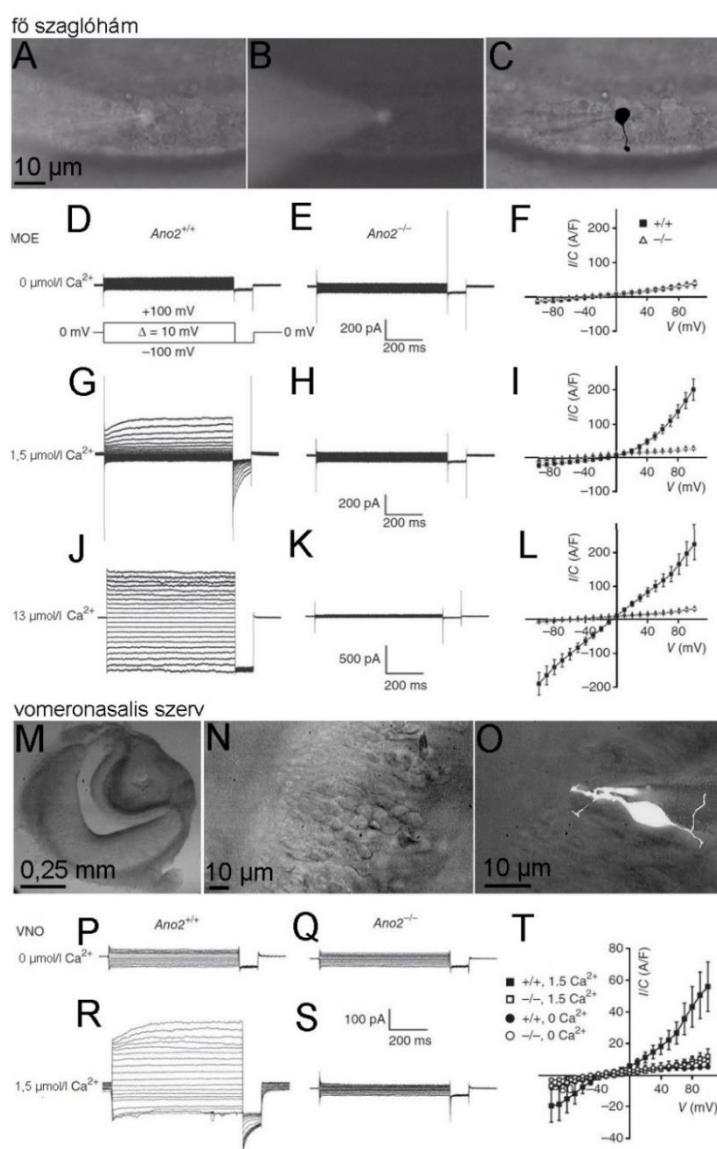
*Az alábbi eredmények a következő publikációban szerepelnek: Billig és mtsai, 2011.*

Az először bemutatott kísérletsorozatot berlini tanulmányutam során, Thomas Jentsch laboratóriumában, az ő szakmai irányítása alatt végeztem. A transzgén egértörzs létrehozása, valamint az immunhisztokémiai és viselkedési tesztek Gwendolyn Billig PhD hallgató munkái. A kísérletsorozat fő kérdése az volt, hogy a szaglóhám ANO2 (TMEM16B) kalciumaktivált kloridcsatornája hogyan modulálja a szaglóhám membránsajátságait és milyen aktív szerepet játszik a szaganyagok érzékelésében.

A primer szaglóhámából készült szeleteken a szenzoros neuronok szómáján végeztem patch clamp kísérleteket teljes sejtes elrendezésben, a kation áramok lehetőség szerinti teljes gátlása mellett. Vad típusú állaton, nominálisan kalciummentes intracelluláris oldatot használva nem volt mérhető áram, 1,5  $\mu\text{mol/l}$ -es szabad kalciumkoncentráció mellett kifelé egyenirányító áram jelent meg, míg 13  $\mu\text{mol/l}$ -es szabad kalciumkoncentrációnál megszűnt az



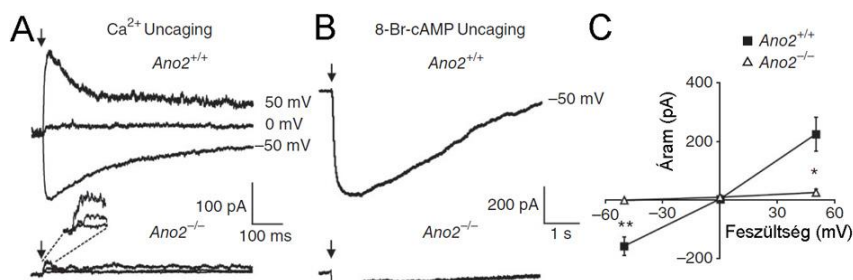
egyenirányítás (12. ábra, A-L). A megfigyelt áram hasonló volt a heterológ expressziós rendszerben mért ANO1 és ANO2 áramokkal, valamint a kétéltűeken mért kloridáramokkal (Schroeder és mtsai, 2008; Stephan és mtsai, 2009; Stöhr és mtsai, 2009; Pifferi és mtsai, 2009; Sagheddu és mtsai, 2010). Ezek az áramok nem voltak jelen az ANO2 knockout egérből származó mintákon (12. ábra, A-L). A vomeronasalis szerv szenzoros neuronjainak végbunkóin kalciummentes belső oldatot használva mind a vad típusú, mind a knockout mintákon jelen volt egy kis amplitúdójú háttér áram. 1,5  $\mu\text{mol/l}$ -es intracelluláris kalcium koncentráció esetén a vad típusú mintákon kifelé egyenirányító áram jelent meg, ami a knockout mintáról hiányzott (12. ábra, M-T).



**12. ábra.** A fő szaglóhám szenzoros neuronok sejttestén és a vomeronasalis szerv szenzoros neuronok dendritikus végbunkóján is megtalálható az ANO2 ioncsatorna kalcium aktivált kloridárama. A-C. Egy patch clamp kísérletbe bevont és jelölt szenzoros neuron a szaglóhámából. D-L. A fő szaglóhám neuron kalciumaktivált kloridárama, amely hiányzik az ANO2 knockout állatból származó preparátumból. D-F. Kalciummentes belső oldattal mért ionáram vad típusú egéren ( $ANO2^{+/+}$ ), a feszültségprotokoll az áramgörbe alatt (D),  $ANO2$  knockout egéren ( $ANO2^{-/-}$ ; E) és a két csoporton mért áramok áram denzitás-feszültség karakterisztikája (fekete négyzet: vad típusú, üres háromszög: knockout; átlag  $\pm$  SEM). G-I. 1,5  $\mu\text{mol/l}$  kalcium tartalmú belső oldattal történt árammérések, a D-F. panelekkel azonos elrendezésben. J-L. 13  $\mu\text{mol/l}$  kalcium tartalmú belső oldattal történt árammérések, a D-F. panelekkel azonos elrendezésben. M-O. A vomeronasalis szerv keresztmetszete átnézeti képen (M), a szaglóhámja nagy nagyítással (N) és egy Alexa488 fluoreszcens festékkel jelölt, a dendritikus végbunkóról elvezetett szenzoros neuron képe. P-Q. Kalciummentes belső oldattal mért ionáram vad típusú egéren ( $ANO2^{+/+}$ ; P) és  $ANO2$  knockout egéren ( $ANO2^{-/-}$ ; Q). R-S. 1,5  $\mu\text{mol/l}$  kalcium tartalmú belső oldattal történt árammérések, a P-Q. panelekkel azonos elrendezésben. T. Áramdenzitás-feszültség karakterisztika (üres négyzet: vad típusú, 0 kalcium, üres kör: knockout, 0 kalcium; fekete négyzet: vad típusú, 1,5  $\mu\text{mol/l}$  kalcium, fekete kör: knockout, 1,5  $\mu\text{mol/l}$  kalcium; átlag  $\pm$  SEM).

Annak érdekében, hogy kizárjuk egy esetlegesen fennmaradó tranziens kalciumaktivált kloridcsatorna jelenlétét a knockout mintákon, az intracelluláris kalciumszintet „caged” kalcium flash fotolízisével növeltük és ugyancsak flash fotolízissel szabadítottunk fel „caged” 8-Br-cAMP-t (membránpermeábilis cAMP analógot). Mindkét esetben nagy amplitúdójú, gyorsan aktiválódó tranziens áramok keletkeztek, amelyek a klorid reverzálpotenciáljánál fordultak meg. A knockout egéren egy sokkal kisebb (a vad típusú 10%-ánál kevesebb) amplitúdójú és a kálium reverzálpotenciáljánál megforduló áramot lehetett mérni (13. ábra).

A fentiek alapján arra lehetett következtetni, hogy a fő szaglóhám és a vomeronasalis szerv szenzoros neuronok fő kalciumaktivált kloridáramát az ANO2 csatornák mediálják.



**13. ábra. Intracelluláris kalcium- és 8-Br-cAMP felszabadulás hatására mért áramok vad típusú és ANO2 knockout állaton.** A. Flash fotolízissel történő kalciumfelszabadítás hatására létrejövő áramok

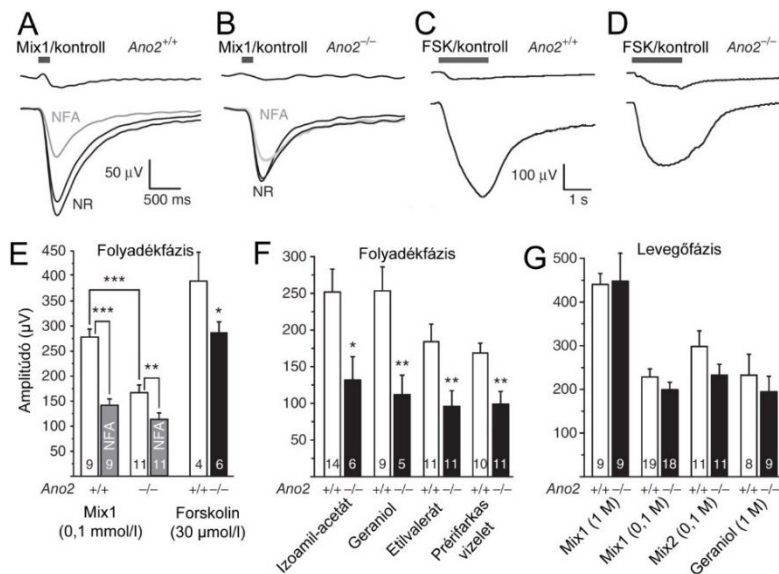
különböző tartópotenciálokban vad típusú ( $ANO2^{+/+}$ , fent) és  $ANO2$  knockout ( $-/-$ ; lent) állatokból származó fő szaglóhám preparátumokon (nyíl: flash fotolízis időpontja). B. Flash fotolízissel történő 8-Br-cAMP felszabadítás hatására létrejövő áramok -50 mV tartópotenciálon vad típusú ( $ANO2^{+/+}$ , fent) és  $ANO2$  knockout ( $-/-$ ; lent) állatokból származó fő szaglóhám preparátumokon. C. Az A panelen bemutatott mérések áram-feszültség karakterisztikája (fekete négyszög: vad típusú, üres háromszög:  $ANO2^{-/-}$ ; átlag  $\pm$  SEM).

A következő kísérletben a teljes szaglóhámot tartalmazó ex vivo preparátumon elektroolfaktogramra (EOG) segítségével vizsgáltuk egyes szaganyagok hatását. Folyadékfázisú EOG mérésekor a szaglóhám felszínét Ringer oldattal mostuk folyamatosan és oldott szaganyagokat alkalmaztunk. A mosó oldat nifluminsavat (NFA, kalciumaktivált kloridcsatorna gátlószer, Yang és mtsai, 2008; Schroeder és mtsai, 2008; Stephan és mtsai, 2009; Pifferi és mtsai, 2009) tartalmazó oldatra volt cserélhető. A szaganyagokra adott válasz mintegy 40%-kal csökkent a knockout egérből származó mintákon a vad típusú alomtársak mintáihoz képest. Hasonló megfigyeléseket tettünk forskolin alkalmazásával (az adenilát cikláz direkt aktiválásával). Az NFA alkalmazása mind vad típusú, mind knockout mintákon csökkentette az EOG amplitúdóját. A vad típusú és knockout minták NFA gátlásának összehasonlításából következtethető, hogy az NFA hatásának csak mintegy 60%-a az  $Ano2$  gátlása (14. ábra, A-F).

A következő lépésben levegőfázisú EOG-ot mértünk, mert ennek az alkalmazása során a szaglóhámot borító nyák ionkoncentrációi a fiziológias értékekhez közelebbiek maradnak. A folyadékfázisú EOG-gal ellentétben, itt nem láttunk különbséget a vad típusú és knockout

minták között (14. ábra, G). Ezt a megfigyelést támogatja, hogy kloridérzékeny mikroelektrodával végzett mérésekkel igazoltuk, hogy nincs szignifikáns különbség a vad típusú és knockout minták felszíni kloridkoncentrációiban (+/+ :  $84 \pm 11,8$  mmol/l; -/- :  $84,4 \pm 9$  mmol/l; n = 6 és 11).

A fenti mérések és a viselkedési tesztek alapján (Billig és mtsai, 2011) azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kalciumaktivált kloridcsatornák szerepe kisebb a szaglásban, mint eddig gondolták.



**14. ábra. A folyadékfázisú EOG amplitúdója szignifikánsan csökken, de nem tűnik el ANO2 knockout állatban.**

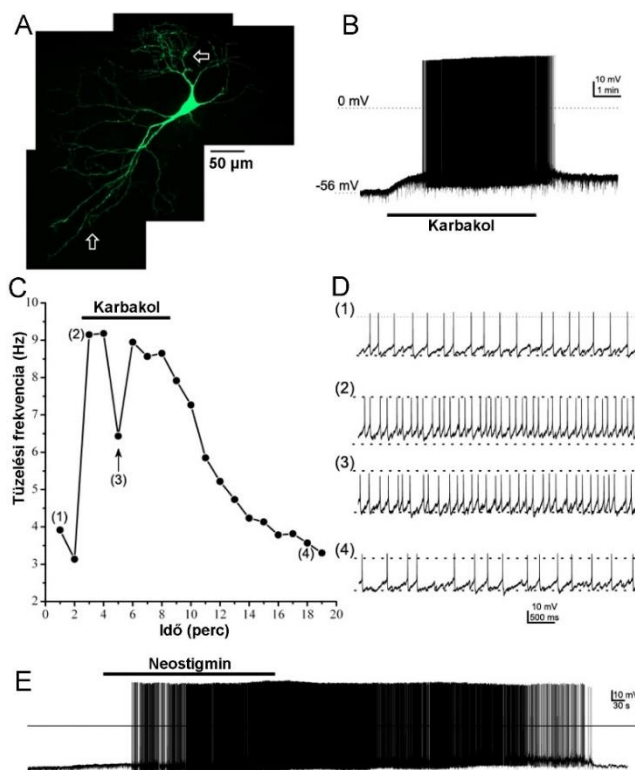
**A.** Reprezentatív folyadékfázisú EOG kontroll oldattal (fent) és az 1. számú szaganyag keverékkel (lent; mix 1: izopentilacetát, hexanal, eucalyptol, limonén, 2-heptanon, mentilacetát, borsmenta olaj, eugenol, etilvalerát, etilbutirát, etiltiglát, alliltiglát, octanal, isobutilpropionát, acetal, hexanonsav, 2-hexanén, 100 µmol/l mindegyik), normál Ringer oldatban (NR, fekete vonal, kontroll és kimosás) és nifluminsav (NFA) jelenlétében (szürke vonal), vad típusú állaton

(ANO2 +/+). **B.** EOG az A panelhez hasonló elrendezésben, ANO2 knockout (-/-) egéren. **C.** EOG kontroll oldattal (fent) és 30 mmol/l forskolin jelenlétében, normál Ringer (fekete vonal) és NFA alkalmazásával (szürke vonal), vad típusú állaton (ANO2 +/+). **D.** EOG ANO2 knockout állaton (-/-), a C panelhez hasonló elrendezéssel. **E.** Az EOG amplitúdók statisztikai összehasonlítása kontroll körülmények közt (üres oszlop) és NFA jelenlétében (szürke oszlop), vad típusú (+/+) és knockout állatokon (-/-) az 1. szagkeverék (Mix 1) alkalmazásakor. Vad típusú (+/+, üres oszlop) és knockout állatokból (-/-, fekete oszlop) származó adatok forskolin alkalmazásakor (jobbra). Oszlopok: átlag ± SEM, az esetszámok az oszlopra írva találhatóak. **F.** Folyadékfázisú EOG amplitúdók statisztikai összehasonlítása vad típusú (+/+, üres oszlop) és knockout állatok (-/-, fekete oszlop) esetén, különböző szaganyagokkal. **G.** Levegőfázisú EOG amplitúdók statisztikai összehasonlítása vad típusú (+/+, üres oszlop) és knockout állatok (-/-, fekete oszlop) esetén, szaganyagokkal és szaganyag-keverékekkel (Mix 2: d-carvon, 1-heptanol, 2-metilbutirát, geraniol, isopentilamin, 2-hexanon, acetofenon, 1-octanal). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

## 5.2. A hallópálya kolinerg modulációja az M-áramon és más muszkarinos acetilkolin receptorhoz kötött hatásokon keresztül

*Az alábbi eredmények a következő publikációban szerepelnek: Pál és mtsai, 2009; nem közölt előkísérletes adatok a colliculus inferior vizsgálatáról*

A hallópálya kolinerg modulációjának vizsgálatát a DCN óriássejtjein kezdtük. Az óriássejtek a DCN mély rétegében kapnak helyet és a mag egyik fő projekciós neurontípusát képezik a külön réteget képező fusiform sejtek mellett (amelyekről az óriássejtekhez hasonló eredményeket kaptunk, de az alacsony esetszám miatt nem került publikálásra). Az óriássejteket a patch clamp mérések során biocitinnel jelöltük és a mérést követően, korábbi irodalmi adatok alapján azonosítottuk (Ryugo és Willard, 1985; Zhang és Oertel, 1993; Alibardi, 1999). Az óriássejtek nagyméretű (30-50  $\mu\text{m}$  átmérőjű) többszögű szómával rendelkeznek, amiből 4 vagy több fő dendrit ered. A dendritek a DCN minden rétegében megtalálhatóak, a felszíni rétegbe nyúló dendrit elágazódása különösen gazdag (15. ábra, A). A projektbe 184 óriássejtet vontunk be, míg további 110 egyéb sejtet kizártunk.



**15. ábra.** A DCN óriássejtek tüzelési frekvenciáját a kolinerg stimuláció növeli. **A.** Egy biocitinnel jelölt óriássejt. A nyilak az apicalis és basalis dendritfát jelölik. **B.** Egy óriássejt membránpotenciál- és akciós potenciál tüzelés változása 50  $\mu\text{mol/l}$  karbakol alkalmazása alatt. **C.** A tüzelési frekvencia változása karbakol hatására (1: kontroll; 2: karbakol alkalmazása alatt; 3: karbakol jelenlétében, a kiindulási értékre visszaállított membránpotenciállal, 4: kimosás). **D.** A C1 panel számmal jelölt részeihez tartozó reprezentatív mérések (szaggatott vonal: 0 mV). **E.** Reprezentatív akcióspotenciál tüzelés 100  $\mu\text{mol/l}$  neostigmin hatására.

Áram-clamp elrendezésben 36 óriássejten mértünk. A nyugalmi membránpotenciál  $-51 \pm 2$  mV-nak adódott. 3 neuron  $2,4 \pm 0,5$  Hz-es frekvenciájú spontán akcióspotenciál-tüzelést mutatott. 50  $\mu\text{mol/l}$  karbakol (muszkarinos acetilkolin receptor agonista) hatására a neuronok depolarizálódtak  $-45 \pm 1$  mV-ra, és valamennyi neuron akcióspotenciál-sorozatot tüzelt  $7,3 \pm 1,3$  Hz frekvenciával (15. ábra, B). Amikor karbakol alkalmazása közben a membránpotenciált az eredeti nyugalmi membránpotenciál értékre állítottuk vissza folyamatos

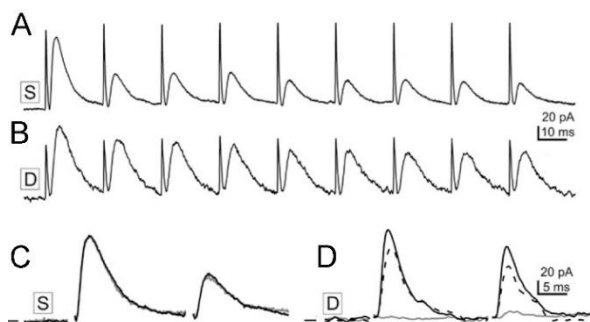
hiperpolarizáló áraminjekcióval, az akcióspotenciál-tüzelés frekvenciája  $4,5 \pm 2$  Hz-re mérséklődött, de nem szűnt meg vagy tért vissza a kiindulási értékre. Ez arra utal, hogy a látott akcióspotenciál-tüzelés nem kizárólag a közvetlen depolarizáció eredménye, hanem hálózati hatásoknak is következménye. A kimosást követően a membránpotenciál  $-52 \pm 3$  mV-ra tért vissza, míg 3 eset kivételével megszűnt az akcióspotenciál-tüzelés. A fennmaradó 3 esetben a tüzelési frekvencia  $2,6 \pm 0,5$  Hz volt (15. ábra, C-D).

Egy következő kísérletben a szeletben jelen levő acetilkolinnak az óriássejtekre gyakorolt hatását kívántuk megfigyelni az acetilkolin észteráz gátló neostigmin ( $50 \mu\text{mol/l}$ ) alkalmazásával. A neostigmin hatása lassabban kezdődött és csengett le, mint a karbakolé, de  $8,5 \pm 2,7$  mV depolarizációt okozott és  $5,49$  Hz akcióspotenciál-tüzelést az amúgy nem tüzelő 5 db óriássejten (15. ábra, E).

A következő kísérletben a felületes és mély rétegekből származó gátló szinaptikus neurotranszmisszióra gyakorolt muszkarinos hatást vizsgáltuk. A felületes és mély rétegek gátló rostjainak  $50$  Hz-es elektromos sorozat stimulációja során az első IPSC-k amplitúdója nem különbözött egymástól szignifikánsan ( $138 \pm 9$  és  $120 \pm 18$  pA,  $n = 8$ ;  $p = 0,218$ ). A felületes réteg további IPSC-inek amplitúdóját jelentősen csökkentette a rövid távú depresszió, míg a mély réteg esetén ez a jelenség sokkal gyengébbnek bizonyult. A 2. és az 1. IPSC amplitúdóinak aránya (a „paired pulse ratio”, PPR) a felületes réteg esetén  $0,5 \pm 0,1$ , míg a mély rétegben  $0,95 \pm 0,2$  volt (16. ábra, A-B).

A rövid távú plaszticitásban megfigyelt különbségek mellett az IPSC-ken érvényesülő muszkarinos hatások is különböztek. A felületes rétegre nem gyakorolt a karbakol gátló hatást, míg a mély rétegben az első IPSC amplitúdója  $32 \pm 11$  pA-re csökkent (a kontroll  $26 \pm 9\%$ -ára;  $n = 8$ ;  $p = 0,000154$ ; 16. ábra, C-D).

A hatásért felelős muszkarinos receptor típusokat  $1 \mu\text{mol/l}$  koncentrációban alkalmazott specifikus antagonistákkal történő előkezeléssel vizsgáltuk. A karbakol gátló hatását ( $74 \pm 9\%$  gátlás) a nem specifikus atropin ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) majdnem teljesen kivédte ( $5\%$  gátlás,  $n = 7$ ;  $p = 0,000845$ ). A specifikus gátlószerek közül az M1 receptor specifikus pirenzepin, az M2 specifikus AF-DX116 és az M4 specifikus tropicamid hatástalannak bizonyult ( $n = 7$  mindegyik esetben), de az M3 specifikus 4-DAMP az atropin gátló hatására emlékeztető gátlást gyakorolt ( $8 \pm 7\%$ ,  $n = 6$ ;  $p = 0,000225$ ).



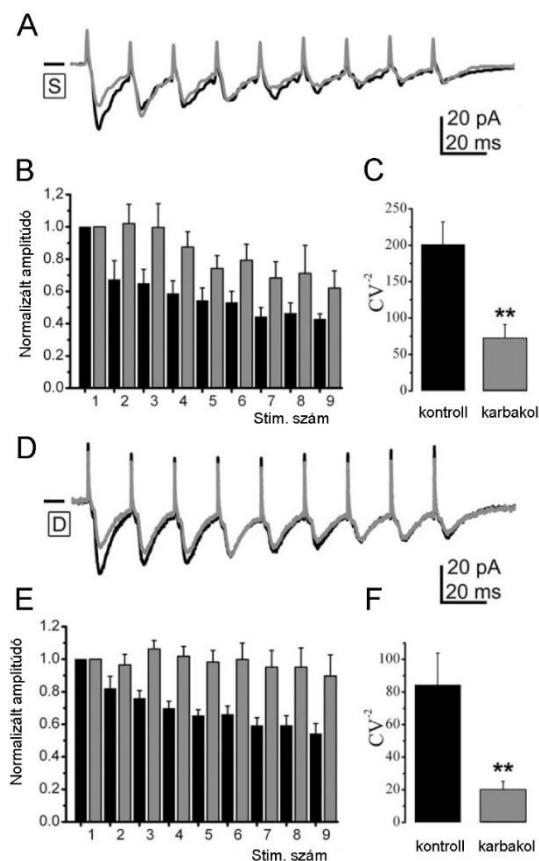
**16. ábra.** Az óriássejtek IPSC-inek muszkarinos modulációja. **A.** A felületes réteg (S) 50 Hz-es elektromos stimulációjával kiváltott IPSC-k. **B.** A mély réteg (D) elektromos stimulációjával kiváltott IPSC-k. **C-D.** 50  $\mu\text{mol/l}$  karbakol (szürke vonal) jelenlétében mért IPSC-k felületes (C, S) és mély (D, D) stimulációval kiváltva (szaggatott vonal: kimosás).

Az EPSC-eket a felületes és mély rétegek ingerlésével, a gátló szinaptikus neurotranszmissziót felfüggesztő sztrichnin és bikukullin jelenlétében vizsgáltuk. A felületes réteg stimulációjával kiváltott első EPSC amplitúdója  $45 \pm 10$  pA volt, míg gyenge rövid távú depressziót figyeltünk meg ( $\text{PPR} = 0,72 \pm 0,09$ ;  $n = 8$ ). Karbakolt alkalmazva az első amplitúdó csökkent ( $32 \pm 12$  pA-re,  $p = 0,049$ ) és a PPR emelkedett ( $1,02 \pm 0,05$ ;  $p = 0,035$ ; 17. ábra, A-B). A variációs koefficiens (CV) számításakor azt állapítottuk meg, hogy az  $1/\text{CV}^2$  érték szignifikánsan csökkent ( $p = 0,007$ ; 17. ábra, C). Mindez preszinaptikus hatásra utal.

A mély réteg stimulációjával kiváltott EPSC-k átlagos amplitúdója nagyobbak bizonyult ( $99 \pm 6$  pA,  $n = 6$ ), míg a rövid távú szinaptikus depresszió gyengébb volt ( $\text{PPR} = 0,82 \pm 0,07$ ). Karbakol jelenlétében, a felületes rétegben látottakhoz hasonlóan, az amplitúdó csökkent, míg a PPR növekedett ( $57 \pm 7$  pA;  $p = 0,049$  és  $1,01 \pm 0,05$ ;  $p = 0,0026$ ). Az  $1/\text{CV}^2$  érték szignifikánsan csökkent ( $p = 0,0036$ ; 17. ábra, D-F), ami ugyancsak szignifikáns hatásra utalt.

Az IPSC-khez hasonlóan itt is megvizsgáltuk, hogy a karbakol által kiváltott hatásokat milyen szelektív muszkarinos antagonistákkal tudjuk kivédeni. A felületes réteg esetében a nem szelektív atropin hatása az M3 receptor specifikus 4-DAMP-hez bizonyult hasonlóknak, míg a mély réteg esetén az AF-DX116 (M2 szelektív), a 4-DAMP (M3 szelektív) és a tropicamid (M4 szelektív) egyaránt hatékonyak bizonyult.





**17. ábra. Karbakol hatása a felületes és mély rétegekből kiváltott EPSC-kre.** **A.** Reprezentatív áramgörbék kontroll körülmények között (fekete) és karbakol jelenlétében (szürke) a felületes réteg stimulációjával kiváltva. **B.** Az első EPSC-re normalizált EPSC amplitúdók kontroll esetben (fekete) és karbakol alkalmazásakor (szürke). **C.** Az EPSC-k variációs koefficiensének (CV) változása karbakol hatására (fekete: kontroll, szürke: karbakol). **D-F.** Karbakol hatása a mély réteg (D) stimulációjával kiváltott EPSC-kre, az A-C. panelekkel azonos elrendezésben. \*\*:  $p < 0,01$

A karbakol előkezelés nélkül alkalmazva, -60 mV tartópotenciálon történő mérés során  $129 \pm 27$  pA-os befelé irányuló tónusos áramot keltett. Tetraetil-ammónium alkalmazásával hasonló áram jött létre  $146 \pm 44$  pA amplitúdóval, amit karbakol hozzáadása már nem növelt tovább. A karbakol által keltett tónusos áram létrejöttét az atropin, 4-DAMP (M3) és tropicamid (M4) előkezelés kivédte. A mért tónusos áram

hátterében egy depolarizáció-aktivált káliumáram, valószínűleg az M-áram állt.

A DCN óriássejtek axonjainak fő célpontja a colliculus inferior. Vizsgálataink következő tárgya ez a mag volt. A colliculus inferior centrális magjának neuronjain az esetek mintegy felében mértünk 40 pA feletti amplitúdójú M-áramot. Itt az M-áramot relaxációs protokoll segítségével mértük (-20 mV tartópotenciálról alkalmazott -40 mV-os repolarizáló lépcsővel), és az M-áram specifikus blokkolószerére, az XE991-re érzékeny komponensként határoztuk meg. Az M-áramért felelős és egyes agytörzsi magokra specifikus alegység, a KCNQ4 génjének kiütése az M-áram amplitúdóját tendenciaszerűen csökkentette, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Ezzel szemben a KCNQ4 knockout egér colliculus inferior neuronjain csaknem teljesen eltűntek a sIPSC-k, míg a sEPSC-k frekvenciája és amplitúdója is változatlan maradt. A colliculus inferior vizsgálatával született adatok nem kerültek publikációra.

A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy a hallópálya kolinerg modulációja mind pre-, mind posztzinaptikus támadáspontú. A neuronális excitabilitás és a szinaptikus neurotranszmisszió szabályozásához jelentősen hozzájárul az M-áram.

### 5.3. A retikuláris aktivációs rendszer egyes tagjainak kolinerg modulációja az M-áramon keresztül

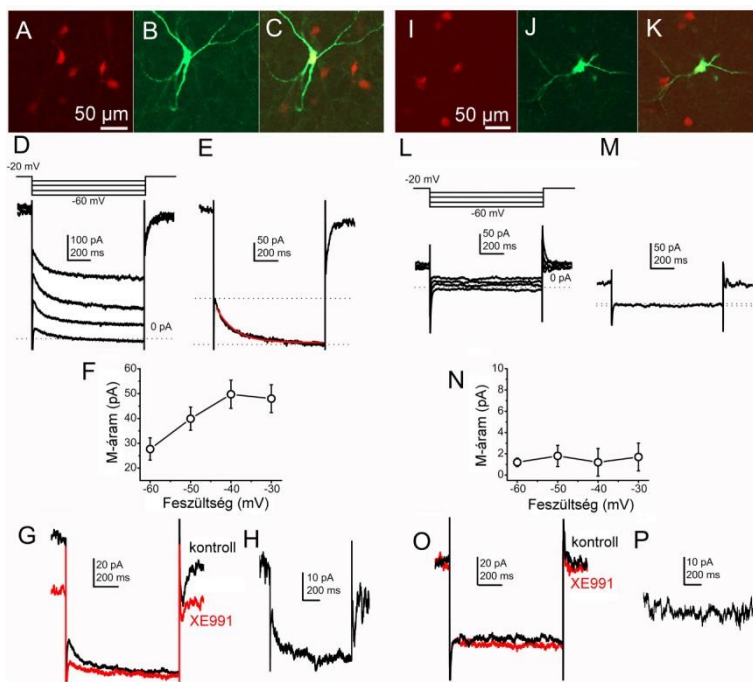
*Az alábbi eredmények a következő publikációkban szerepelnek: Bordás és mtsai, 2015; Bayasgalan és mtsai, 2021a; Bayasgalan és mtsai, 2021b; Maamrah és mtsai, 2023*

Az M-áram kutatását célzó vizsgálataink következő helye a retikuláris aktivációs rendszer, azon belül is a PPN és a DR, MR voltak. A PPN-t mint olyan kolinerg magot vizsgáltuk, ami nemcsak a kolinerg bemenetet biztosítja az agytörzsi hallópálya és más subcorticalis struktúrák számára, hanem maga is célpontja a kolinerg neuromodulációnak. A DR és MR a korábról ismert KCNQ4 pozitivitása miatt lett vizsgálataink tárgya (Kharkovets és mtsai, 2000).

Első lépésként azt vizsgáltuk, hogy a PPN sejttípusai rendelkeznek-e a szómárol elvezethető M-árammal. Ehhez a projekthez tdTomato fluoreszcens proteint kolin acetiltransferáz- (ChAT) és 2-es típusú glutamát dekarboxiláz (GAD2) promoter alatt expresszáló egereket használtunk a kolinerg és GABAerg neuronok láthatóvá tételére (18. ábra, A-C és I-K; Bordás és mtsai, 2015). Később 2-es típusú vezikuláris glutamát transzporter (Vglut2) promoter alatt tdTomato-t expresszáló egereket is használtunk a glutamaterg neuronok azonosítására (Bayasgalan és mtsai, 2021a; Dautan és mtsai, 2021).

Az M-áram méréséhez az M-áram relaxációs protokollt használtuk és az M-áram amplitúdóját mint a repolarizációs lépcső alatti azonnali és steady state áramok különbségét vagy mint a -20 mV tartópotenciálon XE991 hatására mért tartóáram csökkenést vettük figyelembe. A két érték nem különbözött szignifikánsan egymástól. Kolinerg neuronokon mérve, 21 esetben mértünk M-áramot és 2 további esetben nem. A -40 mV-on mért repolarizációs lépcső átlagos nagysága  $-49,7 \pm 5,1$  pA volt (az M-áram nélküli két neuront kivéve a statisztikából  $-53,9 \pm 4,8$  pA). XE991 hatására a -20 mV-on mért tartóáram  $39,7 \pm 7,5$  pA-t csökkent (18. ábra, D-H). GABAerg neuronokon nem volt M-áram mérhető ( $n = 13$ ; 18. ábra, L-P), glutamaterg neuronokon 32 esetből 2 alkalommal találtunk M-áramot (azonban előfordulnak egyszerre kolinerg és glutamaterg neuronok is a PPN-ben, ezek ebbe a populációba tartoztak; Wang és Morales, 2009; Bayasgalan és mtsai, 2021).





**18. ábra.** A PPN kolinerg neuronjai rendelkeznek M-árammal, míg a GABAerg neuronok nem. A-C. Egy PPN kolinerg neuron képe több egymásra vetített konfokális rétegfelvételen (A, piros: ChAT-függő tdTomato expresszió; B, zöld: biocitin; C: a piros és zöld felvételek egymásra vetítése). D. Reprezentatív M-áram felvétel (lent) M-áram relaxációs feszültség protokollal (fent). E. -40 mV-os repolarizációs lépcsőnél mért M-áram (piros: az M-áram relaxáció egy exponenciális tagot tartalmazó függvényvel történő illesztése; szaggatott vonalak: az azonnali és steady state áramok, amelyek különbségeként határoztuk meg az M-áramot). F. Az M-áram átlagos amplitúdója a repolarizációs feszültséglépcsők nagyságának függvényében. G. -40 mV-os repolarizációs feszültséglépcsővel mért reprezentatív áramgörbék kontroll körülmények között (fekete) és XE991 jelenlétében (piros). H. A G panel fekete és piros áramgörbéinek különbsége, az XE991-érzékeny áramkomponens. I-P. Felvételek és M-áram mérések egy GAD65-pozitív, GABAerg PPN neuronról az A-H. panelekkel megegyező elrendezésben. A neuronnak nem volt M-árama.

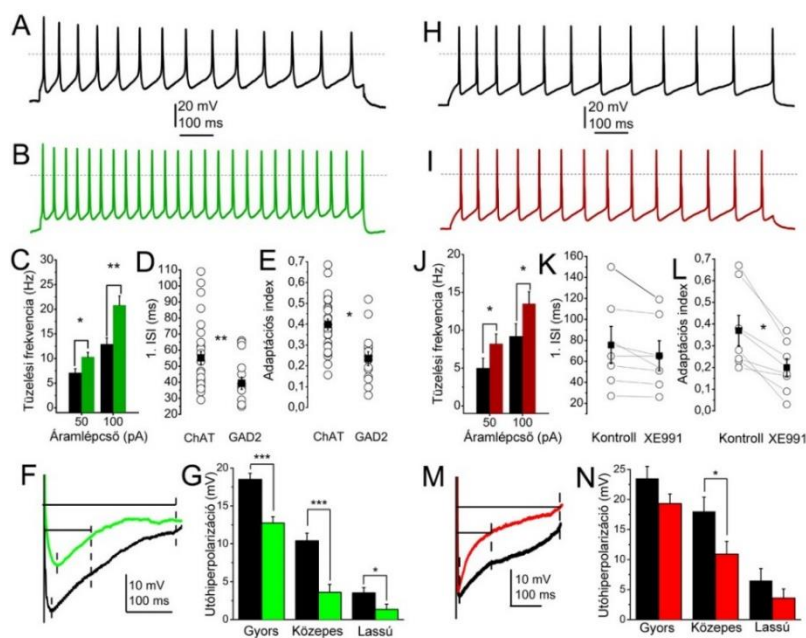
Ahogy korábbi irodalmi adatokból is ismert, az M-áram a neuron tüzelési sajátságait befolyásolja (Madison és Nicoll, 1984; Nigro és mtsai, 2014; Koyama és Appel, 2006). A vizsgált sajátságok a tüzelési frekvencia, a tüzelési frekvencia adaptáció és az utóhiperpolarizáció voltak. Ezeket a paramétereket hasonlítottuk össze az M-árammal rendelkező kolinerg és az azzal nem rendelkező GABAerg neuronok esetén.

A tüzelési frekvencia 50 és 100 pA depolarizáló áraminjekció esetén kolinerg neuronokon  $7,1 \pm 0,83$  és  $12,89 \pm 1,28$  Hz, a GABAerg neuronokon szignifikánsan nagyobb,  $10,28 \pm 0,95$  és  $20,81 \pm 1,89$  Hz volt ( $p = 0,01$  és  $0,001$ ; 19. ábra, A-D). A tüzelési frekvencia adaptáció számszerűsítésére az adaptációs indexet (AI) használtuk. A kolinerg neuronok nagyobb adaptációt mutattak: adaptációs indexük magas,  $0,4 \pm 0,02$ ; míg a GABAerg neuronoké szignifikánsan alacsonyabb volt ( $0,23 \pm 0,03$ ;  $p = 0,0002$ ; 19. ábra, E).

A gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció amplitúdója is szignifikánsan lassabb volt a kolinerg neuronokon, mint a GABAerg neuronokon (19. ábra, F-G).

Mivel a két neuronpopuláció közötti különbség számos más ioncsatorna és a méretbeli, morfológiai különbségek számlájára írható, azt is vizsgáltuk, hogy a kolinerg neuronok az M-áram gátlásával mennyire lehetnek a GABAerg neuronokhoz hasonlóak a fenti sajátságaikban. Az M-áram gátlószerének, az XE991-nek a jelenlétében a kolinerg neuronok tüzelési

frekvenciája szignifikánsan megnövekedett ( $9,2 \pm 1,6$  Hz-ről  $13,5 \pm 1,6$  Hz-re 100 pA-es depolarizáló áramlépcsővel,  $p = 0,04$ ; 19. ábra, H-K). Az AI markáns csökkenést mutatott ( $0,37 \pm 0,07$ -ről  $0,2 \pm 0,04$ -re;  $p = 0,033$ ; 19. ábra, L). Az utóhiperpolarizáció három komponense közül egyedül a közepes utóhiperpolarizáció mutatott szignifikáns csökkenést (19. ábra, M-N).



**19. ábra. Az M-áram (vagy annak további hiánya) további membrántulajdonságokat is meghatároz a PPN neuronokon. A-G. kolinerg és GABAerg neuronok membránsajátságainak összevetése. A. Egy kolinerg neuron akcióspotenciál-sorozat tüzelése, 100 pA amplitúdójú és 1 s hosszú depolarizáló áraminjekcióval kiváltva. B. Egy GABAerg neuron akcióspotenciál-sorozat tüzelése. C-E. Kolinerg (fekete, ChAT) és GABAerg neuronok (zöld, GAD2) 50 és 100 pA-es depolarizáló áramlépcsők hatására mért tüzelési frekvenciája (C), első 'interspike' intervalluma (D, 1.ISI, az első és 2. akciós potenciál közti időkülönbség) és adaptációs indexe (E, oszlopok, négyzetek: átlag  $\pm$  SEM; üres körök: egyedi adatok). F. Egy kolinerg (fekete) és egy GABAerg neuron (zöld) utóhiperpolarizációja (szaggatott vonalak balról jobbra: gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció meghatározási helye). G. A gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció amplitúdójának összehasonlítása (fekete: kolinerg, zöld: GABAerg). H-N. Az M-áram gátlásának hatása kolinerg neuronok membránsajátságaira. H-I. Egy kolinerg neuron akcióspotenciál-sorozat tüzelése kontroll esetben (fekete, H) és XE991 jelenlétében (piros, I). J-L. Egy kolinerg neuron 50 és 100 pA-es depolarizáló áramlépcsők hatására mért tüzelési frekvenciája (J), első 'interspike' intervalluma (K) és adaptációs indexe (L) kontroll körülmények között (fekete) és XE991 jelenlétében (piros). M. Egy kolinerg neuron utóhiperpolarizációja kontroll körülmények között (fekete) és XE991 jelenlétében (piros). N. A gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció amplitúdójának összehasonlítása (fekete: kontroll, piros: XE991). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$**

és adaptációs indexe (E, oszlopok, négyzetek: átlag  $\pm$  SEM; üres körök: egyedi adatok). F. Egy kolinerg (fekete) és egy GABAerg neuron (zöld) utóhiperpolarizációja (szaggatott vonalak balról jobbra: gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció meghatározási helye). G. A gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció amplitúdójának összehasonlítása (fekete: kolinerg, zöld: GABAerg). H-N. Az M-áram gátlásának hatása kolinerg neuronok membránsajátságaira. H-I. Egy kolinerg neuron akcióspotenciál-sorozat tüzelése kontroll esetben (fekete, H) és XE991 jelenlétében (piros, I). J-L. Egy kolinerg neuron 50 és 100 pA-es depolarizáló áramlépcsők hatására mért tüzelési frekvenciája (J), első 'interspike' intervalluma (K) és adaptációs indexe (L) kontroll körülmények között (fekete) és XE991 jelenlétében (piros). M. Egy kolinerg neuron utóhiperpolarizációja kontroll körülmények között (fekete) és XE991 jelenlétében (piros). N. A gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció amplitúdójának összehasonlítása (fekete: kontroll, piros: XE991). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

A PPN neuronok egy fontos sajátsága a magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció, amit P/Q- és N típusú kalciumáramok és káliumáramok mediálnak és rámpa alakú depolarizáló impulzussal nagyobb amplitúdójú oszcillációkat lehet kiváltani (Kezunovic és mtsai, 2011; 2013). Az oszcillációkat az akcióspotenciál-tüzelés részben elfedi, ezért TTX jelenlétében lehet teljesen mérhetővé tenni (20. ábra, A-B). Az oszcillációk frekvenciája a 10-45 Hz közötti tartományba esik. Megfigyeléseink alapján, a Garcia-Rill munkacsoport megállapításaival éles kontrasztban (Kezunovic és mtsai, 2011; 2013) ezeket az oszcillációkat csak kolinerg neuronokon láttunk és csaknem teljesen hiányoztak a GABAerg neuronokon ( $n = 17$  kolinerg és 11 GABAerg neuron). Előkísérletes adatok alapján, a glutamaterg neuronokról is nagyrészt

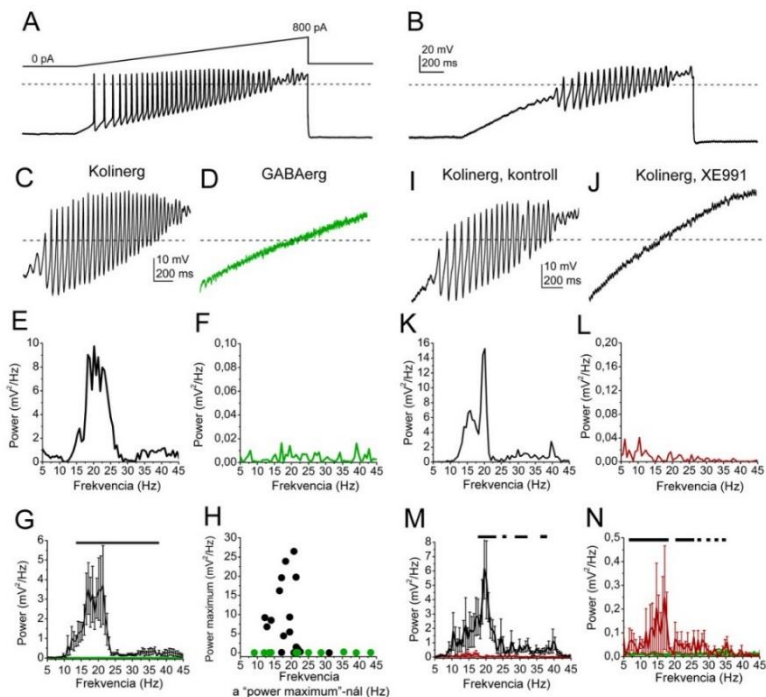
hiányoztak, eltekintve a glutamát és acetilkolin kotranszmitterrel rendelkező kis alpopulációtól (20. ábra, C-H).

A tüzelési sajátságok vizsgálatához hasonlóan, az M-áram membránpotenciál-oscillációkban betöltött szerepét XE991 segítségével vizsgáltuk. Az XE991 a membránpotenciál oscillációkat nagyrészt blokkolta, de még bizonyos frekvenciatartományokban így is szignifikánsan nagyobb power amplitúdóval rendelkezett a kolinerg neuronok XE991-rezisztens oscillációja, mint a GABAerg sejteken kontroll körülmények között mért aktivitás (20. ábra, I-M). Ez alól a 20 Hz körüli frekvenciasáv volt kivétel, ahol az XE991 teljesen gátolta az oscillációs aktivitást (n = 17; 20. ábra, N).

Nem publikált adataink vannak az M-áram nyitószerek oscillációkra gyakorolt hatásáról. Az oscilláció küszöbét a nyitószerek még magasabbá tették, míg az oscillációk power amplitúdóját minden frekvenciatartományban csökkentették.

A fentieket összefoglalva, a PPN főbb neurontípusai közül csak a kolinerg neuronok rendelkeznek M-árammal, ami jelentős mértékben felelős a kolinerg neuronok más neurontípusoktól eltérő tüzelési frekvenciájának és mintázatának kialakításáért. Az M-áram, mint a káliumáramok egyike, a magas küszöbű membránpotenciál-oscillációk kialakításához is hozzájárul.

Az M-áramért felelős ioncsatornák egyik alegysége a KCNQ4. Bár a PPN-t Kharkovets és mtsai (2000) nem említették, mint az alegységet tartalmazó agytörzsi területet, közepes intenzitású jelölés a közleményábrájukon is látható volt és a Jentsch munkacsoporttól kapott KCNQ4 elleni primer antitesttel előkísérletként végzett jelölés a PPN területén immunopozitivitást mutatott.

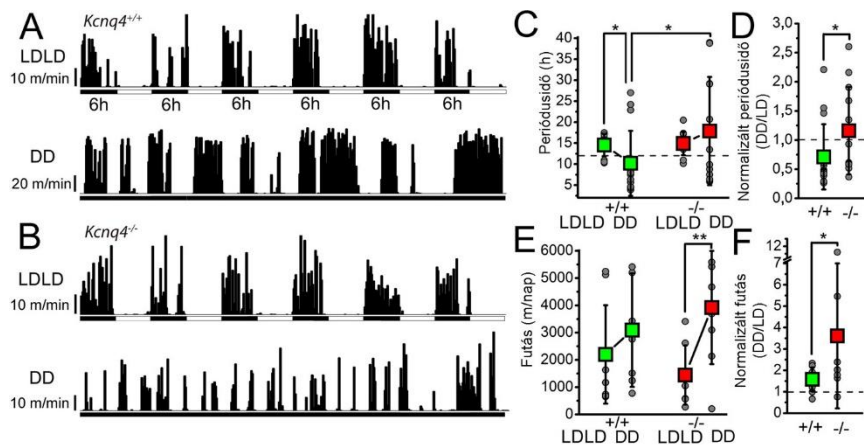


20. ábra. A magas küszöbű membránpotenciál-oscillációk a kolinerg neuronok jellemzői. A-B. A membránpotenciál-oscillációk vizsgálatának protokollja. A. Rámpa alakú depolarizáló áram protokoll (fent) és a hatására mért reprezentatív feszültséggörbe. B. A feszültséggörbe TTX jelenlétében, ahol az akciós potenciálok nem fedik el a membránpotenciál-oscillációt. C. Egy kolinerg neuron membránpotenciál-oscillációja (fekete). D. Egy GABAerg sejt reprezentatív feszültséggörbéje, membránpotenciál-oscilláció nélkül (zöld). Szaggatott vonal: 0 mV. E-F. A C-D. paneleken bemutatott oscilációk power spektruma (E., fekete, kolinerg neuron; F., zöld, GABAerg neuron). G-H. A kolinerg (fekete) és GABAerg neuronok (zöld) power spektrumának statisztikai összehasonlítása (átlag  $\pm$  SEM). A vízszintes vonal azt az adattartományt jelöli, ahol szignifikáns különbség található. I-J. Egy kolinerg neuron membránpotenciál-oscillációja kontroll körülmények között (I) és az M-áram gátlószer XE991 jelenlétében (szaggatott vonal: 0 mV). K-L. Az I-J. panelek oscilációinak power spektruma (K., fekete, kontroll; L piros, XE991 jelenlétében). M. A kolinerg neuronokon kontroll körülmények között (fekete) és XE991 jelenlétében (piros) kapott power spektrumok statisztikai összehasonlítása (átlag  $\pm$  SEM). N. A kolinerg neuronokon XE991 jelenlétében mért power spektrum átlagok (piros) összevetése a GABAerg sejteken mértekkel (zöld). A vízszintes vonalak azt az adattartományt jelölik, ahol szignifikáns különbség található.

Mivel a PPN (más RAS magvakkal, mint az erős pozitivitást mutató raphe magvakkal együtt) a cirkadián ritmus és a mozgás szabályozásában is részt vesz, az első kísérletünk annak a feltérképezésére irányult, hogy a KCNQ4 alegység hiánya befolyásolja-e ezeket a funkciókat. Kísérletünkhez "activity wheel test"-et használtunk, 6-6 órás fény-sötétség váltakozásokkal (LDLD). A 12-12 órás periódusok helyett azért választottuk ezt, a 7 nap adaptációt szükségessé tevő modellt, hogy kizárjuk a törzs alapjául szolgáló C3H egértörzsből előforduló vakság jelenlétét, ami jelentősen zavarná a kísérletet (Gorman és Elliott, 2003; Harrison és mtsai, 2016). Az adaptációt követő 5 nap után további 5 napig az egereket teljes sötétségben tartottuk. Az elemzéshez az 5 napos periódusok utolsó 3 napját használtuk (21.ábra, A-B). Az LDLD periódusok alatt sem a periódusidőben, sem a futási távolságban nem volt különbség a knockout egerek és vad típusú alomtársaik között. Teljes sötétségben (DD) a vad típusú állatokban kis mértékben, de szignifikánsan csökkent a periódusidő, míg knockout állatokban nőtt. A sötétség alatti, kontrollra normalizált periódusidő szignifikánsan különbözött a vad típusú és knockout állatokban (21.ábra, C-D). A knockout egerek futási távolsága (a numerikusan alacsonyabb kontroll futási távolsághoz képest szignifikáns növekedést mutatott sötétben. Ez a

szignifikánsan nagyobb növekedés látszott akkor is, amikor a kontrollra normalizáltuk a sötétben megtett távot (21. ábra, E-F).

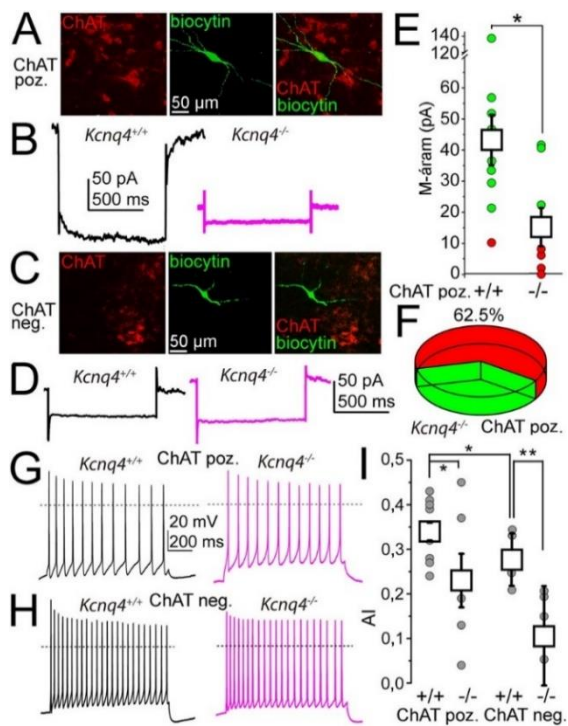
A kísérletből megállapítottuk, hogy váltakozó fény-sötétség viszonyok mellett a KCNQ4 alegység hiánya nincs hatással az állat cirkadián ritmusára vagy mozgására, de a sötétséghez történő adaptációban jelentős különbségeket okoz.



**21. ábra.** A **KCNQ4** ioncsatorna alegység elvesztése a cirkadián ritmus adaptációját érinti. **A.** Egy vad típusú (*Kcnq4*<sup>+/+</sup>) egér 'activity wheel test' használatával mért mozgásteljesítménye 6 óránként váltakozó megvilágítás-sötétség periódusokkal (LDLD) és teljes sötétségben (DD). **A** fekete oszlopok a 10 perces időintervallumokban megtett távolságot mutatják. **B.** Egy **KCNQ4** knockout egér mozgásteljesítménye, az **A** panelhez hasonló elrendezésben. **C.** A periódusidő változása teljes sötétség hatására vad típusú (zöld, **+/+**) és knockout egér esetén (piros, **-/-**). Szaggatott vonal: 12 óra; négyzetek: átlag ± SEM; szürke pontok: egyedi adatok. **D.** Az LDLD periódus alatti mérésre normalizált DD periódusidő adatok, a **C.** panelhez hasonló elrendezéssel. **E.** A napi futásteljesítmény változása teljes sötétség (DD) bekövetkeztével, a **C.** panelhez hasonló elrendezéssel. **F.** Az LDLD periódus alatti mérésre normalizált DD futásteljesítmény adatok, a **D.** pannellel megegyező elrendezéssel. \*:  $p < 0,05$

Kollaborációs partnerünk, Guillermo Spitzmaul (Bahia Blanca, Argentína) immunhisztokémiai és PCR eredményei azt mutatták, hogy nem a KCNQ4 az egyetlen M-áram alegység a PPN neuronjain, hanem a KCNQ3 és 5 is jelen van a neuronok szómáján. a KCNQ2 a neuronokhoz futó rostokon (Bayasgalan és mtsai, 2021a). Ezen kísérletek nyomán meg kívántuk vizsgálni a KCNQ4 alegység sejt szintű funkcionális jelenlétét a PPN neuronokon. Ehhez az egyik stratégia a vad típusú alomtársak és a KCNQ4 knockout egerek különböző PPN neuronjain mérhető M-áramok összehasonlítása volt. A kolinerg neuronok esetében a vad típusú minták 7,7%-áról hiányzott az M-áram, míg a knockout minták 62,5%-áról ( $n = 13$  vad típusú és 8 knockout). A  $-40$  mV-os repolarizáló lépcsőnél mért átlagos M-áram amplitúdó vad típusú mintán  $175,97 \pm 27,67$  pA, knockout mintán  $66,95 \pm 19,8$  pA volt ( $p = 0,006$ ). A nem-kolinerg neuronokon, a genotípustól függetlenül, itt sem volt M-áram (22. ábra, A-F). A kolinerg neuronok adaptációs indexe a vad típusú mintákhoz képest szignifikánsan csökkent a knockout mintákon (vad típus:  $0,34 \pm 0,02$ , knockout:  $0,23 \pm 0,04$ ;  $p = 0,039$ ;  $n = 9$  és 6). Ahogy vártuk, a vad típusú minták nem-kolinerg neuronjainak adaptációs indexe szignifikánsan alacsonyabb volt a kolinerg neuronokénál ( $0,28 \pm 0,06$ ;  $p = 0,04$ ).



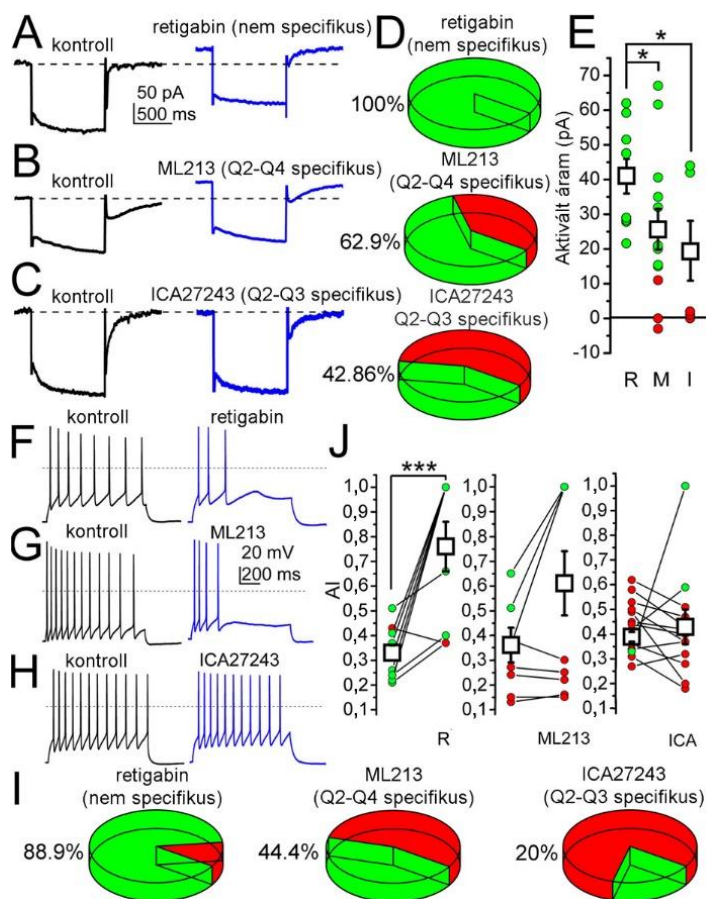


**22. ábra.** A kolinerg neuronok egy nagyobb populációja esetén a *KCNQ4* alegység elvesztése az *M*-áram hiányához vezet. **A.** Egy kolinerg neuron képe (bal panel, piros, ChAT: kolin acetiltransferáz immunjelölés; középső panel, zöld: biocitin jelölés, jobb panel: a két előző panel egymásra vetített képe). **B.** Reprezentatív *M*-áram mérések -40 mV-os repolarizációs feszültséglepcső protokollal, kolinerg neuronokon egy vad típusú egyedből (fekete, *Kcnq4* +/+) és egy *KCNQ4* knockout állatból (-/-; magenta). **C.** Egy nem-kolinerg neuron képe az A panellel azonos elrendezéssel. Reprezentatív *M*-áram mérések egy vad típusú egyedből (fekete, *Kcnq4* +/+) és egy *KCNQ4* knockout állatból (-/-; magenta). **D.** Reprezentatív *M*-áram mérések nem-kolinerg neuronokból a B panellel azonos elrendezésben. **E.** -40 mV-os repolarizáció alatt kolinerg neuronokon mért *M*-áram amplitúdók statisztikai összehasonlítása vad típusú (+/+) és knockout (-/-) mintákon (zöld pont: egyedi adat, ahol van *M*-áram; piros pont: egyedi adat, ahol nincs *M*-áram; fehér négyzet: átlag  $\pm$  SEM). **F.** Az *M*-árammal nem rendelkező neuronok aránya (piros, 62,5%) kolinerg sejteken, knockout mintán

kördiagrammal szemléltetve. **G.** 100 pA depolarizációs áramlepcsővel kiváltott akcióspotenciál-sorozat kolinerg neuronokon vad típusú (fekete, *Kcnq4*+/+) és knockout egyedekből (magenta, *Kcnq4*-/-) származó mintákról (szaggatott vonal: 0 mV). **H.** Nem-kolinerg neuronokon a G panellel megegyező módon mért és azonos elrendezésben bemutatott akcióspotenciál-sorozatok. **I.** A különböző körülmények között mért akcióspotenciál-sorozatok adaptációs indexének (AI) statisztikai összehasonlítása (fehér négyzet: átlag  $\pm$  SEM, szürke pontok: egyedi adatok). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

Meglepően, a knockout minták nem-kolinerg neuronjainak ezen értéke szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a vad típusú mintákon látott értékek ( $0,11 \pm 0,11$ ;  $p = 0,0094$ ;  $n = 5-5$ ; 22. ábra, G-I).

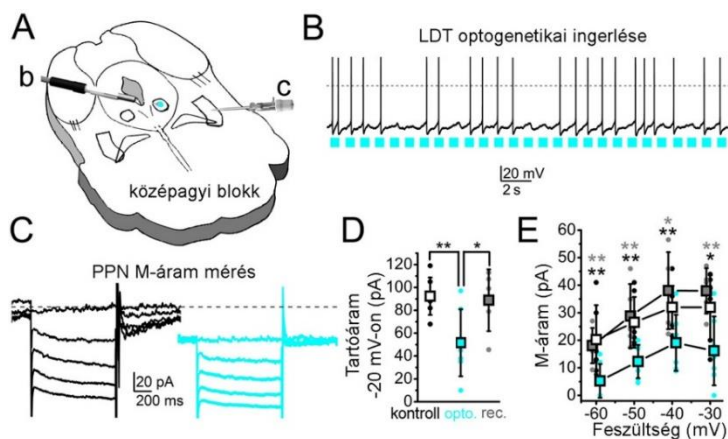
A *KCNQ4* alegység funkcionális jelentőségét szelektív *M*-áram nyitószerrel is vizsgáltuk. A -20 mV-on mért tartóáram nyitószer hatására pozitívabb értékeket vett fel a nem specifikus retigabin (20  $\mu\text{mol/l}$ ) esetében 100%-ban, a *KCNQ2-4* specifikus ML213 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) jelenlétében 62,9%-ban, a *KCNQ2-3* specifikus ICA27243 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) jelenlétében 42,86%-ban. Retigabin esetében a tartóáram  $95,25 \pm 11,96$  pA-ról  $140,23 \pm 12,24$  pA-re nőtt ( $n = 11$ ), ML213 esetén az átlagos kifelé irányuló áramnövekedés  $25,61 \pm 5,94$  pA volt ( $n = 13$ ), míg ICA27243 esetében  $19 \pm 8,6$  pA ( $n = 7$ ; 23. ábra, A-E). Az AI változással hasonló megfigyeléseket tettünk. A retigabin az esetek 88,9%-ában növelte az AI-t (átlagosan  $0,33 \pm 0,035$ -ről  $0,755 \pm 0,19$ -re,  $p = 0,0005$ ,  $n = 9$ ), az ML213 az esetek 44,4%-ában ( $0,357 \pm 0,066$ -ről  $0,608 \pm 0,131$ -re,  $p = 0,067$ ,  $n = 10$ ), míg az ICA27243 mindössze 20%-ban ( $0,392 \pm 0,025$ -ről  $0,439 \pm 0,098$ -ra,  $n = 10$ ). A fenti adatok és az immunhisztokémiai eredmények arra engednek következtetni, hogy a PPN neuronok mintegy felében a *KCNQ4* meghatározó *M*-áramért felelős ioncsatorna alegység (23. ábra F-J).



SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

**23. ábra. Nem specifikus és alegységspecifikus M-áram nyitószerek hatása PPN kolinerg neuronokra.** A-C. Reprezentatív áramgörbék (fekete: kontroll, kék: nyitószer hatása, szaggatott vonal: -20 mV-on mért kontroll tartóáram). D. A nyitószere reagáló neuronok százalékos aránya kördiagrammon (zöld: nyitószere reagáló neuronok, piros: nem reagáló neuronok). E. A nyitószerek által aktivált tartóáramok statisztikai összehasonlítása (R: retigabin; M: ML213; I: ICA27243; fehér négyzetek: átlag  $\pm$  SEM, zöld pontok: nyitószere reagáló neuronok egyedi adatai, piros pontok: nyitószere nem reagáló neuronok egyedi adatai). F-H. Reprezentatív akcióspotenciál-sorozatok az A-C. panelekhez hasonló elrendezéssel (szaggatott vonal: 0 mV). I. A nyitószere AI növekedést mutató neuronok százalékos aránya kördiagrammon (zöld: nyitószere reagáló neuronok, piros: nem reagáló neuronok). J. Az adaptációs index (AI) nyitószere megfigyelt változásai (zöld: nyitószere AI növekedést mutató neuronok, piros: nem reagáló neuronok; fehér négyzetek: átlag  $\pm$

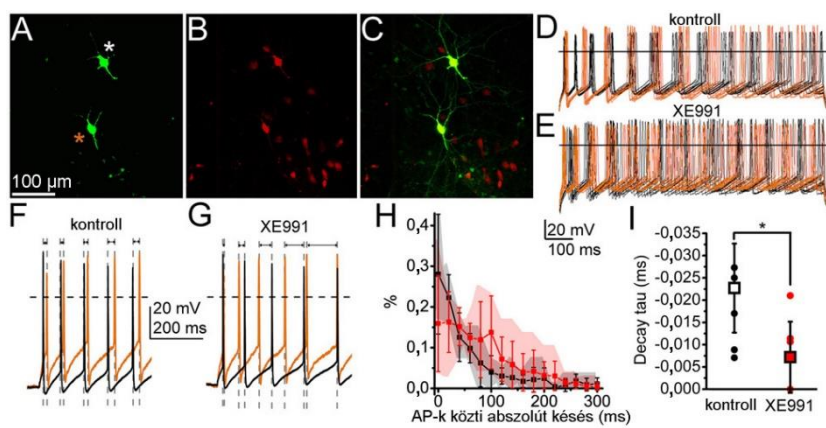
A következő kísérlet az M-áram *in situ* felszabaduló acetilkolin általi modulációját vizsgálta. Itt 500  $\mu$ m vastag blokkpreparátumokat hoztunk létre ChAT-ChR2 egér agytörzséből, ami a ChR2 optogenetikai aktuátort kolinerg neuronokban fejezi ki. A kolinerg LDT-t ingereltük 1 Hz frekvenciájú, 470 nm-es fényel történő megvilágítással és a PPN kolinerg neuronjain mértük az M-áramot. Az LDT optogenetikai ingerlése alatt az M-áram amplitúdója szignifikánsan csökkent, amit az ingerlés megszűnése után regeneráció követett ( $n = 7$ ; 24. ábra). Az azonos oldali LDT-ből felszabaduló acetilkolin elegendőnek bizonyult a PPN M-áramának részleges gátlására.



**24. ábra.** A *nucleus laterodorsalis tegmentalis* (LDT) optogenetikai ingerlése gátolja az M-áramot. **A.** A mérés sémás rajza. Az 500  $\mu\text{m}$  vastag középagyi blokkon az LDT-be optikai szálat helyeztünk és megvilágítottuk 470 nm-es fényvel, 2 Hz frekvenciával (b), míg a PPN-ben patch clamp mérést végeztünk (c). **B.** Az LDT optogenetikai ingerlésével látott akcióspotenciál-tüzelés az LDT neuronokon (kék sávok: optogenetikai ingerlés). **C.** Reprezentatív M-áram mérés a PPN-ből (fekete:

megvilágítás előtt, kék: megvilágítás alatt, szaggatott vonal: kontroll tartóáram -20 mV-on). **D.** A -20 mV-on mért tartóáramok statisztikai összehasonlítása (fehér négyzet és szürke pontok: kontroll átlag  $\pm$  SEM és egyedi adatok; kék négyzet és kék pontok: optogenetikai ingerlés, fehér négyzet és fekete pontok: regenerációt követő mérés). **E.** Az M-áram amplitúdók statisztikai összehasonlítása (fehér négyzet és fekete pontok: kontroll átlag  $\pm$  SEM és egyedi adatok; kék négyzet és kék pontok: optogenetikai ingerlés, fehér négyzet és szürke pontok: regenerációt követő mérés; fekete csillagok: kontroll és megvilágítás alatti adatok összehasonlítása; szürke csillagok: regenerációt követő és megvilágítás alatti adatok összehasonlítása). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

Az M-áram szerepét a neuronális szinkronizációban két szomszédos PPN kolinerg neuronon egyidejűen végzett akcióspotenciál-méréssel mutattuk meg. Mindkét neuron egyidejű 100 pA depolarizáló áraminjekciót kapott, aminek hatására akcióspotenciál-sorozatot tüzeltek. Az első 5 akcióspotenciál egymástól mért időkülönbségeit hasonlítottuk össze kontroll körülmények között és az M-áram gátlószer XE991 alkalmazásával. Azt találtuk, hogy a kontroll körülmények közötti szinkronizáció az M-áram gátlásával szignifikánsan kisebb mértékű lesz (az eloszlási hisztogramok decay tau-ja  $-0,022 \pm 0,01$  ről  $-0,007 \pm 0,008$ -ra csökkent;  $n = 6$ ;  $p = 0,03$ ; 25. ábra).

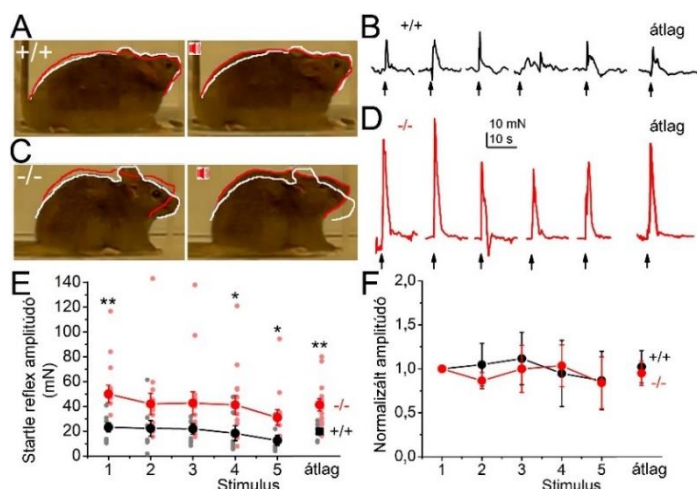


**25. ábra.** Az M-áram gátlása a szomszédos neuronok tüzelésének deszinkronizációjához vezet. **A-C.** Mérés során jelölt kolinerg neuronok. **A,** zöld: biocitin; **B,** kolin acetiltransferáz promotor alatti *tdTomato* (piros) expresszió; **C,** egymásra vetített kép. **D-E.** Az A paneleken látható neuronokon 100 pA depolarizáló áraminjekcióval egyszerre

kiváltott 10-10 akcióspotenciál-sorozat (piros: piros csillaggal jelölt neuron tüzelése, fekete: fehér csillaggal jelölt neuron tüzelése, egyenes vonal: 0 mV) kontroll körülmények között (D) és XE991 hatására (E). **F-G.** Az első öt akcióspotenciál közötti késés mérése a két neuron között kontroll esetben (F) és XE991 hatása alatt (G). Szaggatott vonal: 0 mV. **H.** Az akcióspotenciálok közötti késések hisztogramja (fekete: kontroll átlag  $\pm$  SEM; piros: XE991 átlag  $\pm$  SEM; szürke mező: kontroll egyedi adatok tartománya, rózsaszín mező: XE991 jelenlétében mért egyedi adatok tartománya). **I.** Az egyedi hisztogramok egy exponenciális tagot tartalmazó illesztésével kapott decay tau statisztikai összehasonlítása. \*:  $p < 0,05$



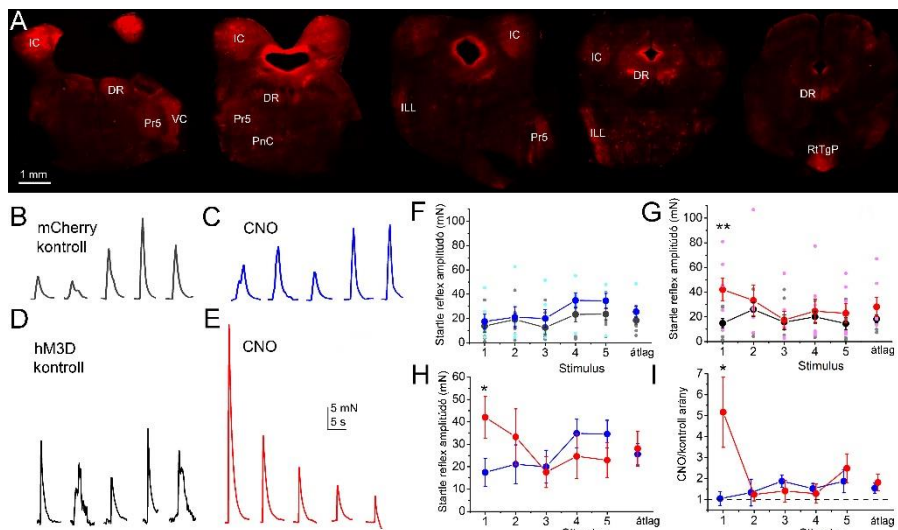
A KCNQ4 alegység hiánya egy további viselkedési tesztben is eltéréshez vezetett. Az általunk épített mérőrendszer segítségével vizsgáltuk az akusztikus startle reflex amplitúdóját és habituációját, öt, egymást percenként követő hanginger segítségével (26. ábra). Az első amplitúdók a kétféle genotípus esetén szignifikánsan különböztek egymástól ( $23,22 \pm 3,74$  mN a vad típusú és  $49,96 \pm 7,15$  mN a knockout állatok esetén,  $n = 8$  vad típusú és 14 knockout;  $p = 0,007$ ), csakúgy, mint az öt amplitúdó átlaga ( $19,76 \pm 2,14$  mN a vad típusú és  $41,27 \pm 4,97$  mN a knockout állat esetén,  $p = 0,0025$ ). A startle amplitúdók habituációt nem mutattak (26.ábra).



**26. ábra.** Az akusztikus startle reflex amplitúdója jelentősen nagyobb KCNQ4 knockout állatokban, mint a vad típusú alomtársakban. **A.** Vad típusú egér elmozdulása akusztikus startle stimulus hatására (fehér körvonal: nyugalomban, piros körvonal: akusztikus stimulus alatt). **B.** Öt, 1 perces időintervallumokkal egymást követő startle válasz és átlaguk vad típusú egér esetén. **C-D.** KCNQ4 knockout egér akusztikus startle reflexének vizsgálata, az A-B paneleken látott elrendezésben. **E.** Az öt egymást követő startle reflex amplitúdójának és az átlagos válasznak az átlagai vad típusú (átlag  $\pm$  SEM; fekete szimbólumok) és KCNQ4 knockout egerek (piros szimbólumok) esetén (szürke pontok: individuális vad típusú adatok, rózsaszín pontok: individuális knockout adatok). **F.** Az első startle amplitúdóra normalizált további amplitúdók megjelenítése (ld. E panel). A startle amplitúdó rövid távú habituációt nem mutat. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

feke szimbólumok) és KCNQ4 knockout egerek (piros szimbólumok) esetén (szürke pontok: individuális vad típusú adatok, rózsaszín pontok: individuális knockout adatok). **F.** Az első startle amplitúdóra normalizált további amplitúdók megjelenítése (ld. E panel). A startle amplitúdó rövid távú habituációt nem mutat. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

A startle amplitúdó növekedés hátterében a kismértékű cochlea károsodás és az agytörzsi hiperexcitabilitás is állhat. A két alapvető ok elkülönítésére egy tisztán agytörzsi hiperexcitabilitást mutató állatmodellen is vizsgáltuk a startle reflexet és annak habituációját. A nucleus pontis caudalis és az abba projiciáló struktúrák neuronjaiban expresszáltattunk hM3D kemogenetikai aktuátort és mCherry piros jelölő proteint 5 esetben. Másik 5 esetben, kontroll csoportként ugyanott egyedül mCherry-t expresszáltattunk. A kemogenetikai aktuátort intraperitonealis CNO-val aktiválva az első startle amplitúdók szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a kontroll csoportban ( $17,47 \pm 6,29$  mN a kontroll csoportban és  $42,05 \pm 9,26$  mN a hM3D expresszáló csoportban (27.ábra, A-H). A különböző genotípusú állatokon végzett előző kísérlettel szemben, a kemogenetikai módszerrel kiváltott agytörzsi hiperexcitabilitás az első startle amplitúdó növekedés mellett erős habituációt is okozott (27.ábra, I).

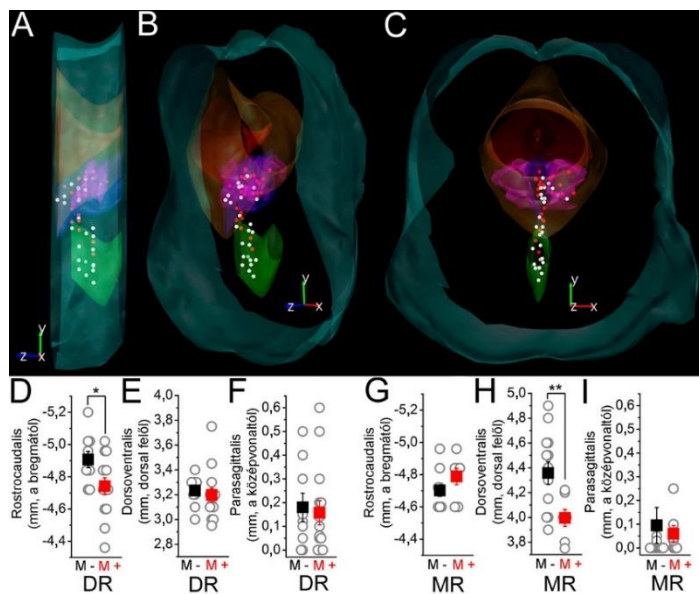


**27. ábra.** Az agytörzsi hiperexcitabilitás az akusztikus startle reflex amplitúdóját és habituációját is növelte.

A. mCherry expresszió (és a hM3D kemogenetikai aktuátor) az agytörzsben a nucleus pontis caudalisba történő retrográd módon terjedő vírus vektor injekciójának következménye. (LDT: nucleus laterodorsalis tegmentalis, VC: nucleus cochlearis ventralis, Pr5:

nucleus principalis trigemini, PnC: nucleus pontis caudalis, SOC: oliva superior complex, DR: nucleus raphe dorsalis, PnR: nucleus raphe pontis, IC: colliculus inferior, ILL: nucleus intermedius lemnisci lateralis, DLL: nucleus dorsalis lemnisci lateralis, SPTG: nucleus tegmentalis subpeduncularis; kalibrációs egyenes: 1 mm). B-C. Startle válaszok csak mCherry fluoreszcens proteint kifejező egerek esetén kontroll körülmények között (B, fekete) és CNO intraperitonealis injekciója után (C, kék). D-E. Startle válaszok hM3D kemogenetikai aktuátort is kifejező egerek esetén kontroll körülmények között (D, fekete) és CNO intraperitonealis injekciója után (E, piros). F. Az öt egymást követő startle reflex amplitúdójának és az átlagos válasznak az átlagai mCherry-t kifejező egérben kontroll körülmények között (átlag  $\pm$  SEM; szürke szimbólumok) és CNO adását követően (kék szimbólumok) esetén (szürke pontok: individuális kontroll adatok, világoskék pontok: individuális CNO adatok). G. Az öt egymást követő startle reflex amplitúdójának és az átlagos válasznak az átlagai hM3D-t kifejező egérben kontroll körülmények között (átlag  $\pm$  SEM; fekete szimbólumok) és CNO adását követően (piros szimbólumok) esetén (szürke pontok: individuális kontroll adatok, rózsaszín pontok: individuális CNO adatok). H. CNO alkalmazása esetén megfigyelt startle amplitúdó átlagok mCherry kontroll (kék) és hM3D expresszió (piros) esetén. I. A CNO nélküli kontrollra normalizált CNO kezelés alatti startle amplitúdó átlagok mCherry kontroll (kék) és hM3D expresszió (piros) esetén. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

A KCNQ4 immunjelölés a RAS magjai közül a legintenzívebb a DR-ben és MR-ben, ezért további vizsgálatunk tárgya ez a két struktúra volt. A két mag szerotonerg neuronjait két alpopulációra tudtuk az M-áram megléte vagy hiánya alapján osztani. Akárcsak a PPN-ben, az M-áram meghatározza az AI-t és az utóhiperpolarizáció amplitúdóját, de a bemenő ellenállás és az egyes neuronokon itt is jelen levő magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációk amplitúdója és frekvenciája független tőle.



28. ábra. Az M-árammal rendelkező és M-áram nélküli szerotonerg neuronok térbeli elhelyezkedése az MR-ben és a DR-ben. A-C. M árammal rendelkező (piros) és nem rendelkező (fehér) szómák térbeli elhelyezkedése az agytörzs három különböző orientációjú metszeten bemutatva (zöldeskék: agytörzsi kontúr, piros: aqueductus kontúr, kék: nucleus raphe dorsalis kontúr, zöld: nucleus raphe medialis kontúr. D-E. Az M-árammal nem rendelkező (M-, fekete) és azzal rendelkező (M+, piros) neuronok rostrocaudalis (D), dorsoventralis (E) és parasagittalis (F) koordinátáinak statisztikai összehasonlítása a DR esetén (négyzetek: átlag  $\pm$  SEM; szürke körök: egyedi adatok).

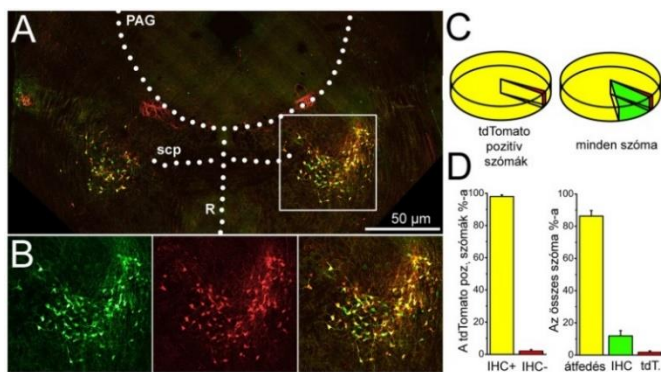
G-I. A D-E. panelek elrendezésével megegyező összehasonlítás az MR esetén. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

Az M-árammal rendelkező és azzal nem rendelkező szerotonerg neuronok az MR és DR területén jellegzetes topográfiai eloszlást mutatnak. A DR esetében az M-árammal rendelkező neuronok rostralisabban helyezkednek el: a szóma átlagosan  $4,74 \pm 0,05$  mm-re caudalisan volt a bregmától az M-árammal rendelkező, míg  $4,9 \pm 0,05$  mm-re az M-árammal nem rendelkezők esetén ( $p = 0,02$ ; 28. ábra, A-F). Az MR-en belül az M-árammal rendelkező neuronok dorsalisan, míg az azzal nem rendelkezők ventralisan találhatóak ( $3,99 \pm 0,07$  mm a dorsalis felszíntől ventralis irányban az M-árammal rendelkezők, míg  $4,36 \pm 0,09$  mm az M-árammal nem rendelkezők esetén,  $p = 0,007$ ; 28. ábra, A-C, G-I).

#### 5.4. A PPN neuronok membránsajátságai és az azokért felelős ionáramok

*Az alábbi eredmények a következő publikációban szerepelnek: Baksa és mtsai, 2019*

A PPN kolinerg neuronjai membránsajátságait tekintve nem képeznek homogén populációt. A klasszikus leírások szerint (Kang és Kitai, 1991; Leonard és Llinas, 1995) az A-áram és a kalciumtűskék megléte vagy hiánya szerint 3 vagy 4 csoportba osztották ezeket a neuronokat. Az újabb technikák felhasználásával és az azóta ismertté vált és a korábban leírt elektrofiziológiai sajátságok közötti korrelációk keresésével kívántuk a régi csoportosítás fenntarthatóságát megvizsgálni és kiegészíteni újabb megfigyelésekkel.



**29. ábra.** A PPN kolinerg neuronok azonosíthatóak ChAT promotor alatti tdTomato expresszióval. A. A PPN-t magába foglaló közepagi régió coronalis metszete (PAG: periaquaeductalis szürkeállomány, R: raphe, scp: pedunculus cerebellaris superior). A kolin acetiltransferáz immunhisztokémiai jelölésének (zöld) és a tdTomato expressziójának (piros) egymásra vetített képe. A fehér négyzettel jelölt terület van kinagyítva a B panelen. B. Kolin acetiltransferáz

immunhisztokémiai jelölés (zöld, balra) átfedése a ChAT-függő tdTomato expresszióval (tdTomato: középen, piros; egymásra vetített kép: jobbra). C. (balra) A tdTomato pozitív szómák ChAT immunopozitivitásának (sárga) aránya kördiagrammon. A piros terület a ChAT negatív szómák arányát jelöli. (jobbra) A tdTomato- és ChAT immunopozitív (sárga), a csak tdTomato (piros) és csak ChAT immunopozitív (zöld) szómák aránya a teljes (valamilyen jelölést mutató) populációban. D. A C panel kördiagrammján láthatóak statisztikai értékelése (3 önálló immunhisztokémiai kísérlet átlaga  $\pm$  SEM).

A PPN neuronok jelölésére az utóbbi évtizedig kizárólagosan, de natív minták esetében a mai napig a *post hoc* ChAT immunhisztokémiát alkalmazzák. Az emellett általunk is gyakori módszer a neurontípusok genetikai azonosítás, amihez mi ebben az esetben a ChAT függően kifejeződő tdTomato piros fluoreszcens fehérjét használtuk.

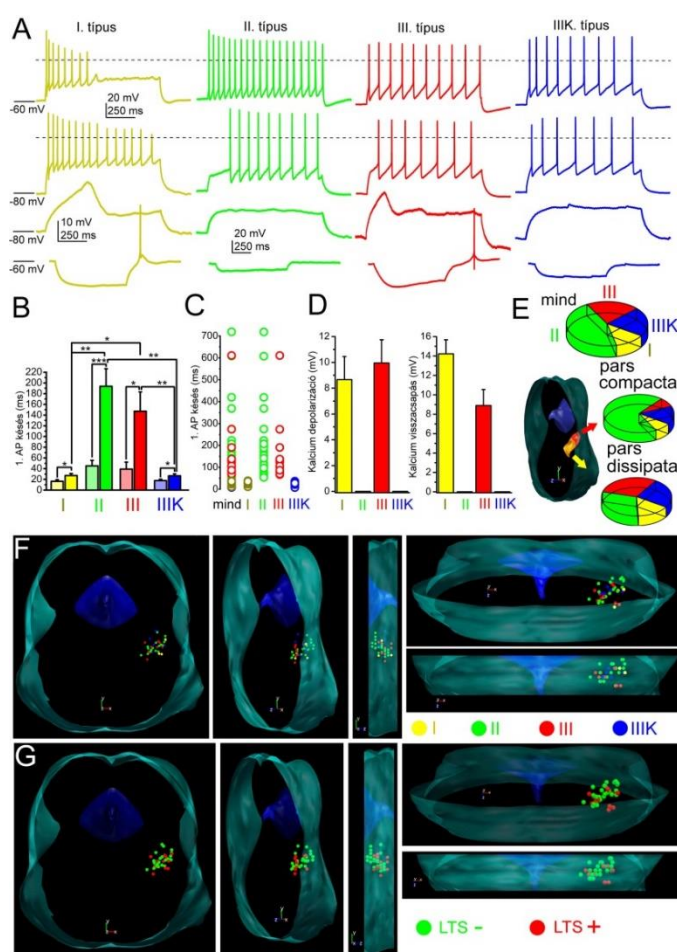
Megvizsgáltuk, hogy a ChAT immunopozitív és tdTomato-t kifejező populációk mekkora arányban fednek át. Ehhez 3 ChAT-tdTomato egér 12 metszetében megszámlált 379 neuront vizsgáltunk. Ha kizárólag a tdTomato pozitív szómákra korlátoztuk a vizsgálatunkat, azt állapítottuk meg, hogy mindössze  $2 \pm 1\%$ -uk bizonyult ChAT immunhisztokémiával negatívnak. Ezek a szómák a mag széli területein helyezkedtek el. A valamilyen módon jelölődött összes kolinerg neuront figyelembe véve,  $86,8 \pm 3,5\%$  mind ChAT immunopozitivitást, mind tdTomato expressziót mutatott.  $11,9 \pm 3,3\%$  csak ChAT immunjelölést, míg  $1,76 \pm 0,9\%$  csak tdTomato-t expresszált (29. ábra). Összességében a tdTomato expresszió a kolinerg neuronok jó markerének tűnik, különösen akkor, ha a mag szélén elszórt tdTomato pozitív szómákat nem emeljük be a vizsgálatba.

A következő kísérletben a klasszikus elektrofiziológiai csoportokba eső neuronok sajátosságait és topográfiai eloszlását vizsgáltuk. Az I. csoportba a kalciumáramok jelenléte miatt kialakuló kalciumtüskékkel (mint az alacsony küszöbű tüske és a visszacsapódási tüske) rendelkező, de A-árammal (tranzienst káliumárammal) nem rendelkező neuronokat soroltuk (30. ábra, A-D). A II. csoportba a csak A-árammal, a III. csoportba a mind A-árammal, mind kalciumtüskékkel rendelkező neuronokat, míg a IIIK. csoportba az egyik sajátossággal sem rendelkező neuronokat soroltuk. A 'K' jelölés az első elektrofiziológiai leírás szerzői kezdőbetűjéből származik, mert ők definiálták így a III. csoportot (Kang és Kitai, 1991). A



vizsgált 91 neuronból 12 tartozott az I. csoportba (13,18%), 44 a II. csoportba (48,35%), 19 a III. csoportba (20,88%) és 16 a IIIK. csoportba (17,58%).

A pars compactában (a mag caudalis részén) a II. típus volt a domináns sejtípus, 69,2% tartozott ide. A IIIK. típus 15,38%-kal, az I. és a III. 7,69-7,69%-kal képviseltette magát. A rostralis elhelyezkedő pars dissipatában 15% volt I. típusú, 30-30% II. és III., míg 25% tartozott a IIIK. típusba (30. ábra, E-F). Az alacsony küszöbű kalciumtüskékkel rendelkező neuronok (I. és III. típus) inkább a rostralis PPN-ben helyezkedtek el (30. ábra, G) és típusosan bipoláris neuronok voltak. A kalciumtüskékkel nem rendelkezők (II. és IIIK.) jellemzően a caudalis PPN multipoláris sejtjei voltak.

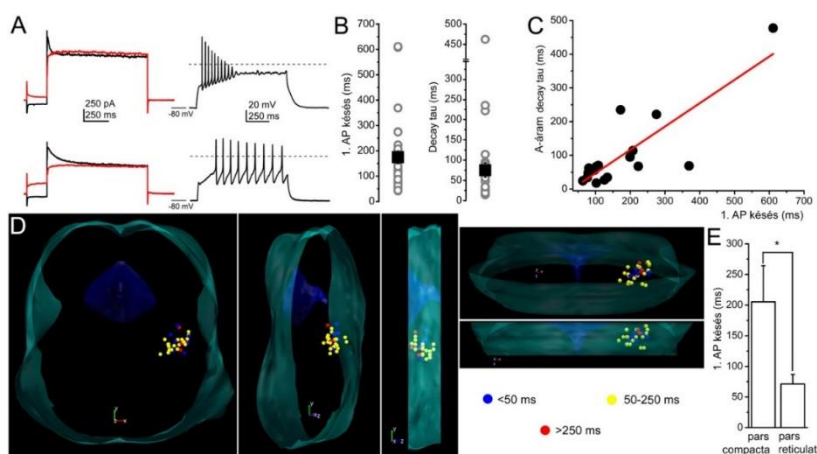


**30. ábra.** A PPN kolinerg neuronok elektrofiziológiai sejtípusai eltérő arányban vannak jelen a pars compacta és pars dissipata területén. **A.** Az egyes elektrofiziológiai sejtípusokba tartozó neuronokról elvezetett membránpotenciál-változások (I: okker; II: zöld; III: piros; IIIK: kék) +100, +50, +20 és -30 pA nagyságú áramlépcsőkkel (szaggatott vonal: 0 mV). **B.** Az első akciós potenciál késésének statisztikai értékelése (átlag ± SEM) az egyes elektrofiziológiai sejtípusok esetén (színek ld. A panel; halvány színű oszlopok: +50 pA áraminjekció, élénk szín: +100 pA). **C.** Az első akciós potenciál késés egyedi adatai +100 pA áramlépcső esetén. **D.** A kalcium depolarizáció és kalcium visszacsapás amplitúdójának statisztikai értékelése (átlag ± SEM) az egyes elektrofiziológiai sejtípusok esetén (színek ld. A panel). **E.** Az egyes sejtípusok aránya kördiagramon a PPN két részében (pars dissipata, pars compacta). **F.** A különböző elektrofiziológiai sejtípusokba tartozó neuronok számainak elhelyezkedése háromdimenziós agytörzs modellen (színek ld. A panel). **G.** Alacsony küszöbű kalciumtüskékkel ('low threshold spike', LTS) rendelkező (LTS+) és azok nélküli (LTS-) neuronok számainak elhelyezkedése háromdimenziós agytörzs modellen (színek ld. A panel). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

neuronok számainak elhelyezkedése háromdimenziós agytörzs modellen (színek ld. A panel). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

A II. és III. típusú sejtek rendelkeznek A-árammal vagy -80 mV-os nyugalmi membránpotenciál értéken az első akciós potenciál késik a depolarizáló lépcső kezdetéhez képest. Az első akciós potenciál késése az ezen két csoportba eső neuronokon átlagosan  $174,57 \pm 24,7$  ms volt (57,3 és 718,9 ms között). Az A-áram decay tau-ja (egy exponenciális tagot

tartalmazó függvénnyel illesztve)  $75 \pm 17,5$  ms volt (14,3 és 477,4 ms között; 31. ábra, A-B). Az első akciós potenciál késési ideje egyenesen arányos volt a tranziens kifelé irányuló áram decay tau-jával (a lineáris illesztés  $R^2$  értéke 0,673 volt;  $n = 18$ ; 31. ábra, C). A hosszú akcióspotenciál-késéssel rendelkező neuronok jellegzetesen a pars compactában helyezkedtek el, átlagosan  $205,3 \pm 59$  ms késéssel. A pars dissipata neuronok késési ideje szignifikánsan kevesebb,  $71,4 \pm 15,5$  s volt ( $p = 0,0033$ ; 31. ábra, D-E).



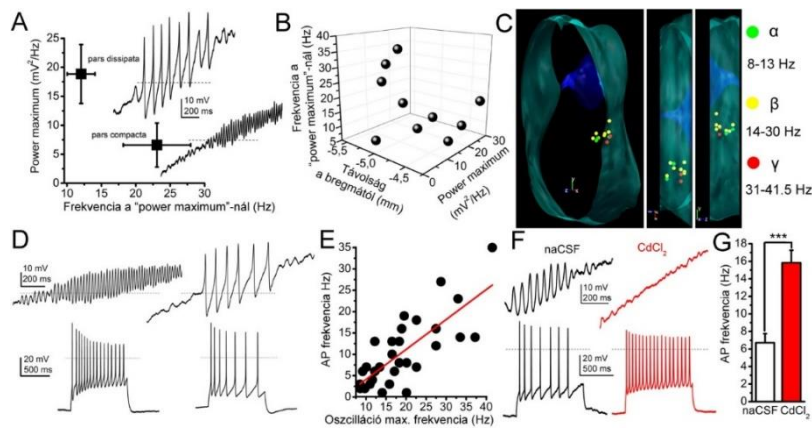
**31. ábra.** Az első akciós potenciál késésének időtartama jól korrelál az A-áram lecsengésének időállandójával.

A. Reprezentatív áram- és feszültséggörbék két neuronról. (balra) -120 (fekete) és -20 mV-os (piros) prepulzusok után alkalmazott +20 mV-os feszültséglépcsővel mért áramok. (jobbra) -80 mV tartópotenciálról, +100 pA áraminjekcióval kiváltott akcióspotenciál-sorozatok

(szaggatott vonal: 0 mV). B. Az első akciós potenciál késésének és a decay tau-nak a statisztikai értékelése (fekete négyzet: átlag  $\pm$  SEM; üres körök: egyedi adatok). C. Az A-áram lecsengésének időállandója az első akciós potenciál késésének függvényében (fekete pontok: egyedi adatok, piros vonal: lineáris illesztés). D. Különböző akcióspotenciál-késéssel rendelkező szómák térbeli elhelyezkedése a PPN-ben. E. Az első akciós potenciál késések összehasonlítása a pars compacta és pars reticulata esetén (átlag  $\pm$  SEM). \*:  $p < 0,05$

A magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció a PPN kolinerg neuronokra jellemző, fent már bemutatott jelenség (20. ábra). Ez a jelenség is rostrocaudalis különbségeket mutat. A pars compactában mért oszcillációk kis amplitúdójúak és magas frekvenciájúak ( $6,59 \pm 3,8$  mV<sup>2</sup>/Hz power amplitúdóhoz  $23,07 \pm 4,9$  Hz frekvencia társult), míg a pars dissipata oszcillációi alacsony frekvenciájúak és nagy amplitúdójúak ( $18,85 \pm 5,08$  mV<sup>2</sup>/Hz power amplitúdó,  $12,08 \pm 2,01$  Hz frekvencia; 32. ábra, A-C).

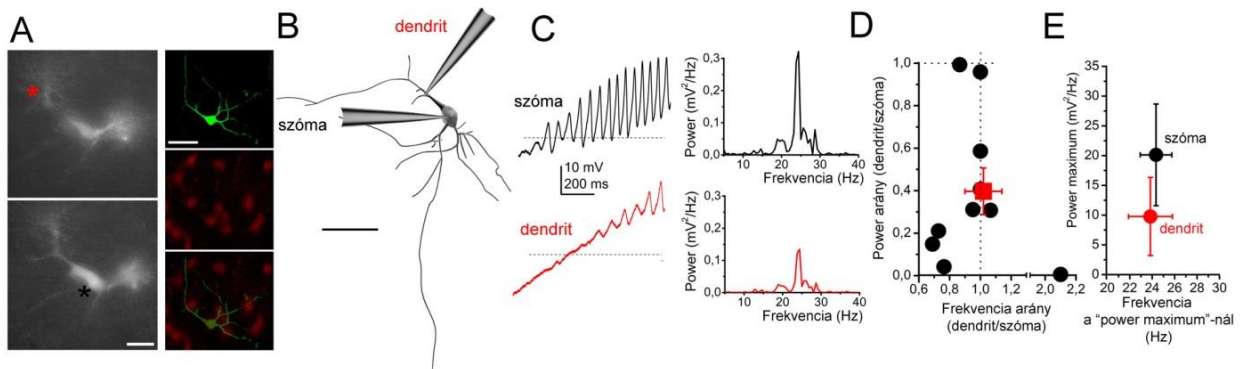
A power maximumnál mért oszcillációs frekvenciát korreláltattuk a 120 pA depolarizáló lépcsőnél mért átlagos akcióspotenciál-tüzeléssel és erős lineáris összefüggést találtunk ( $R^2 = 0,573$ , meredekség = 0,702; 32. ábra, D-E). 50  $\mu$ mol/l CdCl<sub>2</sub>-vel teljesen gátoltuk a membránpotenciál-oszcillációkat. Ezzel párhuzamosan az akciós potenciál tüzelés frekvenciája 120 pA depolarizáló áramlépcsőnél szignifikánsan emelkedett ( $6,71 \pm 1,04$  Hz-ről  $15,83 \pm 1,42$  Hz-re;  $n = 7$ ;  $p = 0,0006$ ; 32. ábra, F-G).



32. ábra. A magas küszöbű membránpotenciál-oscillációk sajátosságai jellegzetes térbeli eloszlást követnek és meghatározzák a neuron tüzelését. A. A power maximum a hozzá tartozó frekvencia függvényében (átlag ± SEM) reprezentatív feszültséggörbékkel (szaggatott vonal: 0 mV). B. Az oscillációk sajátosságainak egyedi adatpontjainak függése a szoma

térbeli pozíciójától. C. Különböző oscillációs frekvenciákkal rendelkező szómák térbeli elhelyezkedésének háromdimenziós térképe ( $\alpha$ : zöld,  $\beta$ : sárga,  $\gamma$ : piros). D. Két reprezentatív neuron membránpotenciál-oscillációja (fent) és 100 pA áraminjekcióval mért akcióspotenciál-tüzelése (szaggatott vonal: 0 mV). E. Az átlagos akcióspotenciál-tüzelési frekvencia a power maximumhoz tartozó oscillációs frekvencia függvényében (pontok: egyedi adatpontok; piros egyenes: lineáris illesztés). F. Reprezentatív oscillációs feszültséggörbék (fent) és akcióspotenciál-sorozatok kontroll körülmények között (fekete) és CdCl<sub>2</sub> jelenlétében (piros). G. A tüzelési frekvencia összehasonlítása kontroll esetben (üres oszlop) és CdCl<sub>2</sub> jelenlétében (piros oszlop; átlag ± SEM). \*\*\*:  $p < 0,001$

Szimultán szoma-dendrit páros méréseket végezve azt láttuk, hogy míg az oscillációs frekvencia a szómán és a proximális dendriteken csaknem megegyezik (a dendriten mért frekvencia a szómán mért  $102 \pm 11\%$ -a), addig a power amplitúdó a dendriten a szómáénak csak  $39,7 \pm 12\%$ -a ( $n = 10$ ; 33. ábra). Ez az arány megfelel a szómán kiváltott depolarizációnak a dendritre történő dekrement terjedésével ahol a szomatikus feszültségválasz  $42,4 \pm 4\%$ -át lehetett mérni.



33. ábra. A szoma membránpotenciál-oscillációinak az amplitúdója nagyobb, mint a proximális dendrité. A. Mérési helyek egy kolinerg neuronon. (balra) tdTomato fluoreszcencia a patch mikroszkóp alatt, két különböző optikai síkban (piros csillag: mérési hely a dendriten, fekete csillag: mérési hely a szómán). Kalibrációs egyenes: 20  $\mu$ m. (jobbra, fentről le) Biocitin jelölés (zöld), tdTomato expresszió (piros), egymásra vetített képek (lent). Kalibrációs egyenes: 50  $\mu$ m. B. A szomatikus és dendritikus mérési helyek megjelenítése az A panelen is látható rekonstruált neuronon. Kalibrációs egyenes: 50  $\mu$ m. C. Az A-B. panelen látható neuron szómájáról (fekete) és proximális dendritjéről (piros) elvezetett membránpotenciál-oscillációk (szaggatott vonal: 0 mV) és a hozzájuk tartozó power spektrumok. D. A dendriten és szómán mért power amplitúdó aránya a dendriten és szómán mért oscillációs frekvencia arányának függvényében (piros négyzet: átlag ± SEM; fekete pontok: egyedi adatok; szaggatott vonalak: 1). E. A power maximum a hozzá tartozó frekvencia függvényében (szóma: fekete; dendrit: piros; átlag ± SEM).

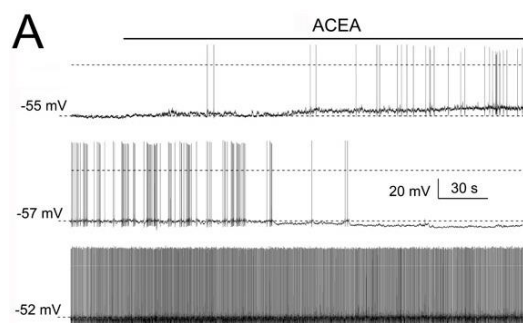
## 5.5. Gliasejteken keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások

### 5.5.1. A nucleus pedunculopontinus neuronok asztrocitákon keresztüli modulációja

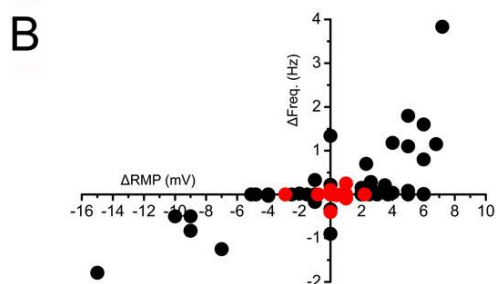
#### 5.5.1.1. Tónusos, mGluR-mediált áramokon keresztüli neuromoduláció

Az alábbi eredmények a következő publikációkban szerepelnek: Kőszeghy és mtsai, 2015; Kovács és mtsai, 2017; Kovács és mtsai, 2015

A PPN-re ható számos neuromodulációs hatás közül először az (endo)kannabinoid hatást vizsgáltuk. PPN neuronok nyugalmi membránpotenciál- és spontán akcióspotenciál-tüzelését vizsgáltuk kontroll körülmények között és 5  $\mu\text{mol/l}$  ACEA jelenlétében. A neuronok egy része depolarizálódott és növelte tüzelési frekvenciáját, egy további alpopuláció hiperpolarizálódott és csökkentette vagy megszüntette a spontán tüzelést, egy harmadik neuroncsoport pedig nem válaszolt az ACEA alkalmazására ( $n = 43$ ; 34. ábra, A).



34. ábra. A CB1 receptor agonista ACEA egyes PPN neuronokat depolarizál, másokat hiperpolarizál és egy harmadik csoportra nem hat. A. Három reprezentatív spontán akcióspotenciál-tüzelési aktivitás, a neuron saját membránpotenciálján mérve (alsó szaggatott vonal: kiindulási membránpotenciál, felső szaggatott vonal: 0 mV). B. A tüzelési frekvencia változása ( $\Delta\text{Freq}$ ) a membránpotenciál változásának ( $\Delta\text{RMP}$ ) függvényében vad típusú (fekete pontok) és CB1 knockout egérből származó PPN neuronokon (piros pontok).



A megfigyelt háromféle válasz a membránpotenciál és a tüzelési frekvencia spontán fluktuációjától szignifikánsan különbözött ( $1,031 \pm 0,183$  mV spontán fluktuáció  $4,322 \pm 0,477$  mV ACEA hatására bekövetkező változás,  $p < 0,001$ ),

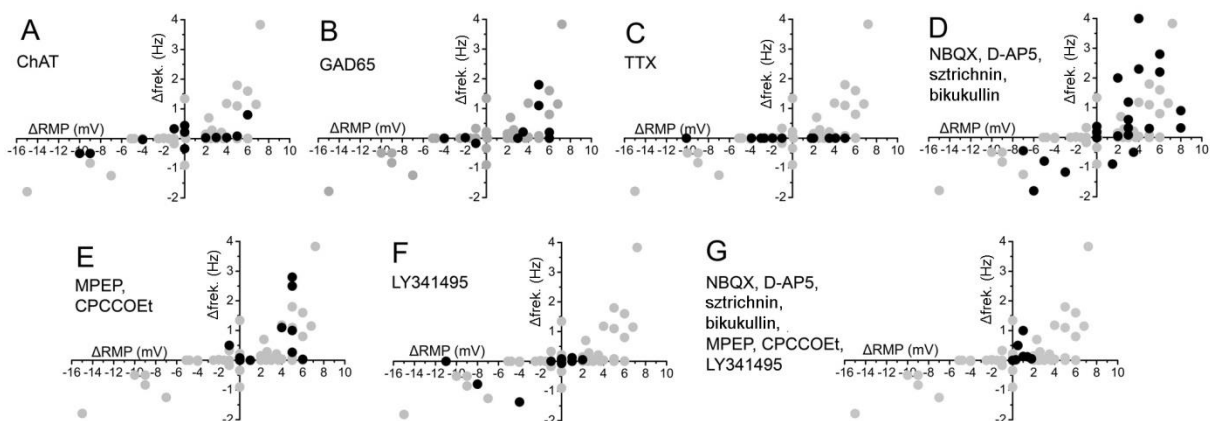
csakúgy, mint a CB1 knockout egérből származó preparátumokon történt mérések eredményétől ( $0,838 \pm 0,243$  mV;  $n = 13$ ;  $p < 0,0001$  a vad típusú állaton ACEA mellett megfigyeltekkel és  $p > 0,9999$  a spontán fluktuációval szemben; 34. ábra, B). Egy másik CB1 receptor agonista, a WIN55,212-2 (1  $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 16$ ) és az anandamid membrán transzport gátló UCM707 (10  $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 13$ ) hasonló hatást fejtett ki, mint az ACEA ( $p = 0,7308$  és  $0,6611$ ).

A CB1 receptor agonista WIN55,212-2 és ACEA tónusos befelé vagy kifelé irányuló áramokat keltett egyes neuronpopulációkon, míg hatástalan marad más neuronokon. Az



általunk vizsgált 17-ből 7 neuronon tónusos befelé irányuló, másik 3 neuronon tónusos kifelé irányuló áram, a további 7 neuronon semmilyen tónusos áram nem keletkezett. CB1 knockout egérből származó mintán vagy thapsigarginnal történt inkubáció után nem keletkeztek tónusos áramok.

A spontán EPSC-k esetében frekvencianövekedést, a spontán IPSC-k esetében frekvenciacsökkenést láttunk előinkubáció nélkül a CB1 receptor agonista hatására. Thapsigargin előinkubáció után mind az EPSC-k, mind az IPSC-k esetében frekvenciacsökkenést okozott a WIN55,212-2.



**35.ábra. A tónusos membránpotenciál válaszok jellemzése. A-B. A membránpotenciál válaszok csak kis mértékben függenek a sejttypustól. A.** A tüzelési frekvencia változása ( $\Delta$ fрек) a membránpotenciál változásának ( $\Delta$ RMP) ACEA hatására az összes kontroll esetben (szürke pontok) és kolinerg neuronok (ChAT) esetében (fekete). A további panelek elrendezése az A panelhez hasonló. **B.** GABAerg neuronok tónusos membránpotenciál változása (fekete). **C-D.** Az akcióspotenciál-tüzelés és a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlása nem előzte meg a membránpotenciál-változásokat. **C.** TTX előkezeléssel mért membránpotenciál-változások (fekete). **D.** A gyors szinaptikus neurotranszmissziót gátló szerekkel (NBQX, D-AP5, sztrichnin, bikukullin) előkezelt neuronokon történt mérések. **E.** Az I. csoportú mGluR-ok gátlása (MPEP, CPCCOEt) megelőzte az ACEA hatására bekövetkező hiperpolarizációt. **F.** A II. csoportú mGluR-ok gátlása (LY341495) megelőzte az ACEA hatására bekövetkező depolarizációt. **G.** A gyors szinaptikus neurotranszmissziót gátló szereket az I. és II. csoportú mGluR-ok gátlószereivel kiegészítve az ACEA membránpotenciálra gyakorolt hatása eltűnik.

A következő kísérletsorozatban a CB1 receptor aktivációra bekövetkező háromféle neuronális válasz sajátosságait vizsgáltuk: a kolinerg és a GABAerg populációk válaszait hasonlítottuk össze a teljes populációéval. A de- vagy hiperpolarizáció nem volt kizárólagosan jellemző egy neurokémiai sejttypusra, bár az arányuk eltérő volt. 9 kolinerg neuronból 4 depolarizálódott, 2 hiperpolarizálódott és 3 nem válaszolt. 10 GABAerg neuronból 7 depolarizálódott és 3 hiperpolarizálódott (35.ábra, A-B). Az akcióspotenciál-tüzelés gátlása tetrodotoxinnal ( $1 \mu\text{mol/l}$ ;  $n = 13$ ) vagy a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlása ( $10 \mu\text{mol/l}$  NBQX,  $50 \mu\text{mol/l}$  D-AP5,  $1 \mu\text{mol/l}$  sztrichnin,  $10 \mu\text{mol/l}$  bikukullin tartalmú koktéllal;  $n = 24$ ;  $p = 0,603$  a membránpotenciál esetén) nem okozott a kontroll elrendezéshez képest szignifikáns változást a membránpotenciál változásaiban (természetesen a TTX az

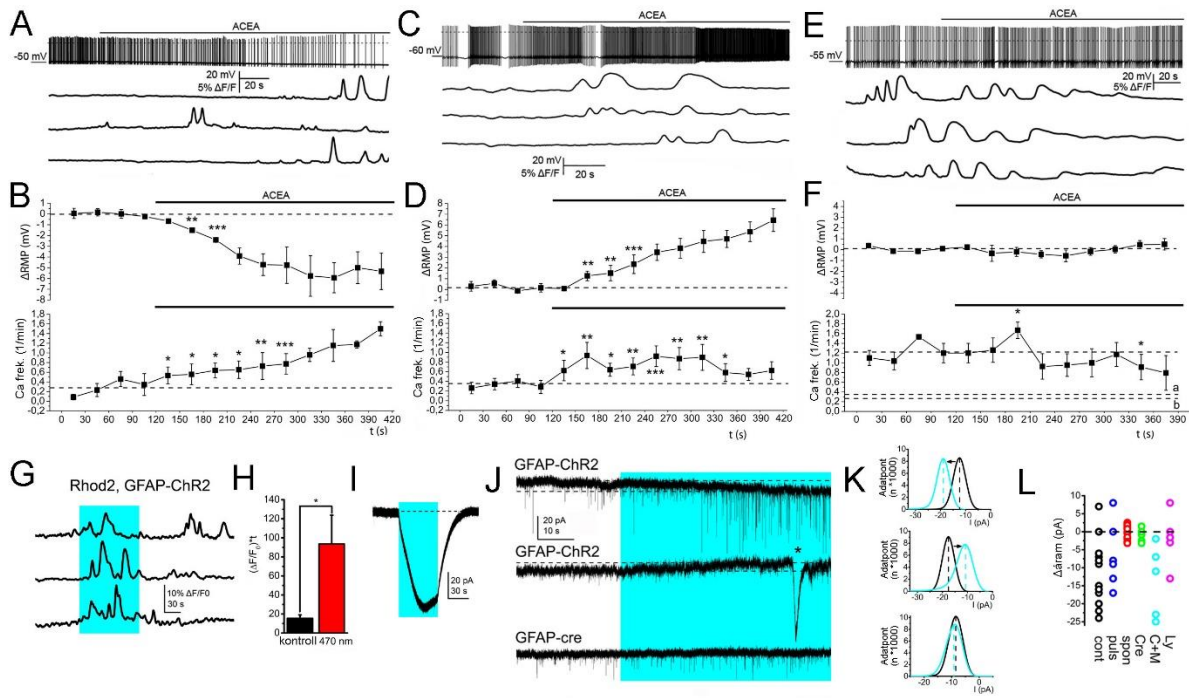
akcióspotenciál-tüzelést, a gátló koktél a posztzinaptikus potenciálokat teljesen gátolta; 35.ábra, C-D).

Az I. csoportú mGluR antagonistá koktél (10  $\mu\text{mol/l}$  MPEP, 100  $\mu\text{mol/l}$  CPCCOEt) a hiperpolarizációt, míg a II. csoportú mGluR antagonistá (10  $\mu\text{mol/l}$  LY341495) a depolarizációt gátolta ( $n = 21$ ;  $p = 0,021$  és  $n = 10$ ;  $p = 0,0111$ ; 35.ábra, E-F). Az mGluR gátlószerekkel kiegészített neurotranszmisszió blokkoló koktél (NBQX, D-AP5, sztrichnin, bikukullin, MPEP, CPCCOEt, LY341495) valamennyi membránpotenciál változást elmosta ( $n = 7$ ; 35. ábra, G).

Az intracelluláris kalciumszint változásait mérő előkísérleteinkben gyakran tapasztaltuk, hogy egyes, OGB-jelölt sejtek lassú kalciumhullámok produkálásával reagálnak ACEA bemosására. Ezek a sejtek elektrofiziológiai és morfológiai módszerekkel vizsgálva nem-ingerlékeny sejteknek, azokon belül asztrocitáknak bizonyultak ( $n = 4$  patch clamp,  $n = 8$  loose patch mérés).

Az asztrociták szerepét az ACEA hatására kialakuló depolarizációban úgy kívántuk vizsgálni, hogy párhuzamosan végeztünk patch clamp kísérletet egy neuronon és fluoreszcens kalciummérést az 50  $\mu\text{m}$ -en belül lévő 5-21 jelölt asztrocitán. 7 neuron esetében az ACEA depolarizációt okozott. A depolarizáció kezdetével egy időben, vagy azt megelőzően az asztrociták kalciumhullám-frekvenciája megemelkedett, elért egy mintegy 3 percig tartó platót, utána csökkent. A platónál mért átlagos legmagasabb frekvencia  $0,93 \pm 0,27/\text{perc}$  volt (36. ábra, A-B). További 5 esetben a neuront hiperpolarizálta az ACEA alkalmazása. A neuronális válasszal együtt vagy azelőtt az asztrocita kalciumhullámok frekvenciája a mérés alatt folyamatosan nőtt ( $1,5 \pm 0,14/\text{perces maximális frekvenciáig}$ ; 36. ábra, C-D). Másik 4 esetben a neuron membránpotenciálja változatlan maradt. Itt az asztrociták már a kontroll mérés alatt magas kalciumhullám-frekvenciát mutattak, ami nem nőtt tovább szignifikánsan ( $1,16 \pm 0,1/\text{percről } 1,22 \pm 0,08/\text{percre}$ ; 36. ábra, E-F).

Az ACEA kezelésre elmaradó neuronális választ jól modelleztük 50 nmol/l ACEA-val végzett előkezeléssel. Itt már az előkezelés alatt magas volt az akcióspotenciál-frekvencia és az asztrocita kalciumhullám-frekvencia, amit 5  $\mu\text{mol/l}$  ACEA alkalmazása már nem növelt tovább.



**36.ábra. A PPN neuronok membránpotenciáljára gyakorolt kannabinoid hatás asztrocita aktiváció következménye. A-F.** Az asztrocita aktiváció megelőzi a neuronális membránpotenciál változását. **A.** Egy ACEA hatására depolarizálódó neuronról elvezetett spontán akcióspotenciál-tüzelés és három szomszédos asztrocita párhuzamosan mért kalciumhullámjai. **B.** A neuronális membránpotenciál változásai ( $\Delta RMP$ ; azon esetek átlaga, ahol depolarizáció történt) és az asztrociták kalciumhullámjainak frekvenciája ugyanazon időskálán (átlag  $\pm$  SEM). A szaggatott vonalak a kiindulási értékeket jelölik. **C-D.** Egy ACEA hatására hiperpolarizálódó neuronról és a környező asztrocitákról történő reprezentatív mérések és a hasonló mérések statisztikai értékelése, az **E-F.** panelekkel megegyező elrendezésben. **E-F.** Egy ACEA hatására változást nem mutató neuronról és a környező asztrocitákról történő reprezentatív mérések és a hasonló mérések statisztikai értékelése, az **E-F.** panelekkel megegyező elrendezésben. **G-L.** Az asztrociták optogenetikai aktivációja hasonló membránpotenciál-változásokat okoz, mint amelyet a CB1 receptor agonista váltott ki. **G.** Egy Rhod2 kalciumfestékkel töltött, GFAP-ChR2 egérből származó mintán történő kalciummérés kontroll esetben és 470 nm-es fényvel történő megvilágítás alatt (kék négyzet). **H.** A megvilágítás előtti (fekete) és alatti (piros) kalciumhullám integráljának statisztikai értékelése. **I.** Egy GFAP-ChR2 egérből származó asztrocita fényárama (megvilágítás: kék négyzet). **J.** Egy neuronon történő membránpotenciál mérés az asztrociták optogenetikai aktivációja előtt és azzal egy időben (kék négyzet). Szaggatott vonalak: a megvilágítás előtti és alatti nyugalmi membránpotenciálok. **K.** A Q panelen látható mérés adatpontjainak histogramja (fekete: megvilágítás előtt, kék: megvilágítás alatt). **L.** A tartóáram ( $\Delta$ áram) változása folyamatos (fekete, „cont”) és pulzatilis (50 Hz, 10 ms; kék; „puls”) megvilágítás alatt, megvilágítás nélkül (piros; „spont”), GFAP-cre egéren megvilágítással (zöld, „cre”), az I. csoportú mGluR gátló CPCCOEt és MPEP (világoskék, „c+m”), és a II. csoportú mGluR gátló LY341495 (magenta, „Ly”) jelenlétében.

Immunhisztokémiai és funkcionális kísérletekkel megállapítottuk, hogy a PPN asztrociták rendelkeznek CB1 receptorral, aminek aktivációja megnöveli a kalciumhullámok frekvenciáját. Az immunhisztokémiai kísérleteket Prof. Antal Miklós laboratóriumában Dr. Hegyi Zoltán végezte (DE ÁOK Anatómiai Intézet). CB1 knockout egér asztrocitáin a kalciumhullámok frekvencianövekedése elmarad. Thapsigargin előinkubáció nemcsak az asztrociták kalciumválaszát gátolta, hanem a neuronok membránpotenciál-változásait is.

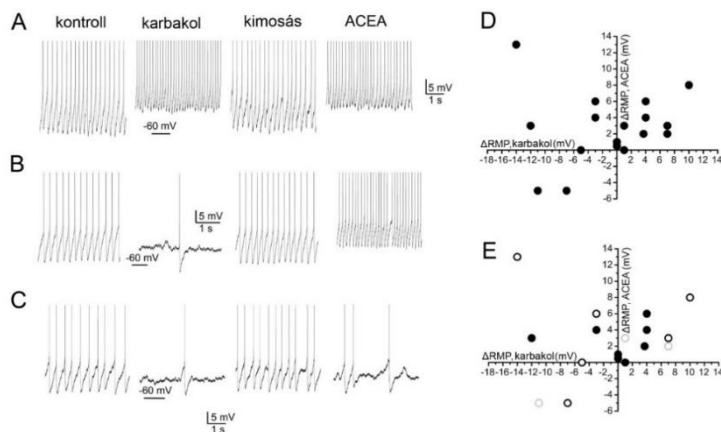
Az a feltételezés, hogy az asztrocitákon keresztül történik a neuronális depolarizáció és hiperpolarizáció, közvetett megfigyeléseken alapult. Időbeli egyezés volt az asztrocita aktiváció és a neuronális válasz között, a CB1 receptor jelen volt az asztrocitákon és az asztrocita kalcium szignalizáció nem szelektív gátlása a neuronális membránpotenciál változásokat kivédte. A következő kísérlettel a feltételezésünket közvetlenül alátámasztó adatot szeretnénk volna bemutatni. Az asztrociták közvetlen és szelektív aktivációját GFAP promoter alatt kifejeztetett ChR2 optogenetikai aktuátorral és 470 nm hullámhosszú fényvel történő megvilágítással kívántuk megvalósítani. Piros fluoreszcens kalciumfestékkel (Rhod2) töltöttünk fel szeleteket és a külső LED megvilágítás előtti és utáni méréseket hasonlítottuk össze ( $15,5 \pm 3,6$  és  $93,5 \pm 30,3 \Delta F/F_0$  \*s,  $n = 16$ ;  $p = 0,012$ ; 36.ábra, G-H). A ChR2-t kifejező asztrocitákon végzett patch clamp mérések  $-80$  mV-os tartópotenciálon  $65,7 \pm 2,6$  pA megvilágítás alatti befelé irányuló áramot, ún. fényáramot hoztak létre ( $n = 4$ ; 36.ábra, I).

A szelet megvilágításával és az asztrociták optogenetikai aktivációjával párhuzamosan patch clamp méréseket végeztünk neuronokon. Feszültség-clamp elrendezésben,  $-60$  mV-os tartópotenciálon 12 esetből 9 esetben befelé irányuló áram, 1 esetben kifelé irányuló áram, a további 2 esetben semmilyen áram nem keletkezett az asztrociták optogenetikai aktivációjának hatására (a tónusos áram abszolút változása  $11,45 \pm 3,39$  pA volt; 36.ábra, J-L). A folyamatos megvilágítással megegyező hatása volt a pulzatis (10 ms hosszúságú 10 Hz-es) megvilágításnak (5 befelé, 1 kifelé irányuló áram, 2 esetben nem keletkezett tónusos áram). Az mGluR antagonistákkal ugyanúgy lehetett kivédeni a létrejövő áramokat, mint az ACEA és WIN55,212-2 alkalmazásával kiváltott tónusos membránpotenciál-változásokat: a CPCCOEt és MPEP (mGluR I gátló) a kifelé, az LY341495 (mGluR II gátló) a befelé irányuló áramok kialakulását előzte meg. A sEPSC frekvencia megvilágítás hatására szignifikánsan megnövekedett ( $0,13 \pm 0,02$  Hz-ről  $0,27 \pm 0,07$  Hz-re, a kontroll  $224 \pm 28\%$ -ára;  $n = 8$ ;  $p = 0,049$ ); amit az LY341495 előkezelés kivédett ( $104 \pm 6\%$  növekedés maradt a kontrollhoz képest,  $n = 7$ ).

A posztszinaptikus neuron depolarizációja és a WIN55,212-2 egyaránt a kiváltott EPSC-k és miniatűr IPSC-k amplitúdójának csökkenéséhez vezetett az excitatórikus és inhibítórikus neurotranszmisszió depolarizáció indukált szuppresszióján („depolarization-induced suppression of excitation/inhibition”; DSE/DSI) keresztül.

Az asztrocita aktiváció szerepét ebben a folyamatban optogenetikai asztrocita stimulációval, asztrocita kalciumhullámok mérésével és két, 50 Hz-es frekvenciájú kiváltott EPSC rögzítésével végeztük. Az asztrociták optogenetikai ingerlése 7 esetből 6 alkalommal

befelé irányuló tónusos áram kialakulásához vezetett, míg egy esetben nem alakult ki tónusos áram (átlagosan  $11,14 \pm 4,8$  pA tónusos áram alakult ki). Az első EPSC amplitúdója ( $37,3 \pm 9,4$  pA kontroll körülmények között és  $36,4 \pm 9,8$  pA megvilágítás alatt) és a két EPSC amplitúdóinak hányadosa (PPR) változatlan maradt ( $1,48 \pm 0,3$  kontroll körülmények között és  $1,59 \pm 0,33$  megvilágítás alatt).



**38. ábra.** Az egymást követően alkalmazott karbakol és ACEA a neuronok nagy részének ingerlékenységére ugyanúgy hatott. **A.** Reprezentatív membránpotenciál változások egy olyan esetben, ahol mindkét agonista depolarizációt okozott. **B.** Reprezentatív membránpotenciál változások egy olyan esetben, ahol a karbakol hiperpolarizált és az ACEA depolarizált. **C.** Reprezentatív membránpotenciál változások egy olyan esetben, ahol mindkét agonista

hiperpolarizációt okozott. **D.** Az ACEA által okozott nyugalmi membránpotenciál változás ( $\Delta RMP$ , ACEA) a karbakol által okozott membránpotenciál változásának ( $\Delta RMP$ , karbakol) függvényében. Fekete pontok: egyedi adatok. **E.** A D panelen látható adatpontok sejt típus szerinti bontásban. Kitöltött fekete kör: kolinerg neuron, üres fekete kör: nem-kolinerg neuron, üres szürke kör: nem azonosított neuron.

Az egy neuromodulációs hatásra adott háromféle neuronális választ (depolarizáció, hiperpolarizáció, változatlan membránpotenciál) nemcsak CB1 receptor agonisták esetén láttuk, hanem karbakol és szerotonin (ld. alább) alkalmazása esetén. 22 PPN neuront vizsgálva, 10 depolarizálódott és növelte tüzelési frekvenciáját 50  $\mu\text{mol/l}$  karbakol hatására (45%), 7 (32%) hiperpolarizálódott és csökkentette tüzelési frekvenciáját vagy teljesen megszűnt a spontán aktivitása, további 5 (23%) nem válaszolt. Az ACEA által okozott hasonló hatástól nem találtunk szignifikáns eltérést ( $p = 0,885$  a membránpotenciál-változásra és  $p = 0,11$  a tüzelési frekvencia változásra).

Az ACEA és a karbakol hatásainak átfedéseit vizsgálva, a gyorsan és teljesen kimosható karbakolt alkalmaztuk először. Miután megfigyeltük és visszafordítottuk az általa okozott membránpotenciál változásokat, ACEA bemosásával folytattuk a kísérletet ( $n = 17$ ; 38. ábra, A-C). Hat esetben a karbakol depolarizációt okozott ( $5 \pm 0,6$  mV). Ezekben az esetekben az ACEA is depolarizált ( $3,8 \pm 0,38$  mV), a két hatás közti szignifikáns különbség nélkül ( $p = 0,053$ ). 7 neuront hiperpolarizált a karbakol ( $-7,7 \pm 1,9$  mV átlagosan), amelyek közül két esetben nem hatott, két esetben hiperpolarizációt, másik 4 esetben depolarizációt okozott az ACEA (átlagosan  $0,48 \pm 2,1$  mV membránpotenciál változás, ami szignifikánsan különbözik a

karbakol hatásától,  $p = 0,009$ ; 38. ábra, D-E). Összességében a 17 esetből 12 átfedést sikerült megfigyelni, ahol a depolarizáló hatásoknál teljes volt az átfedés.

#### 5.5.1.2. Fázisos, NMDAR-mediált áramokon keresztüli neuromoduláció

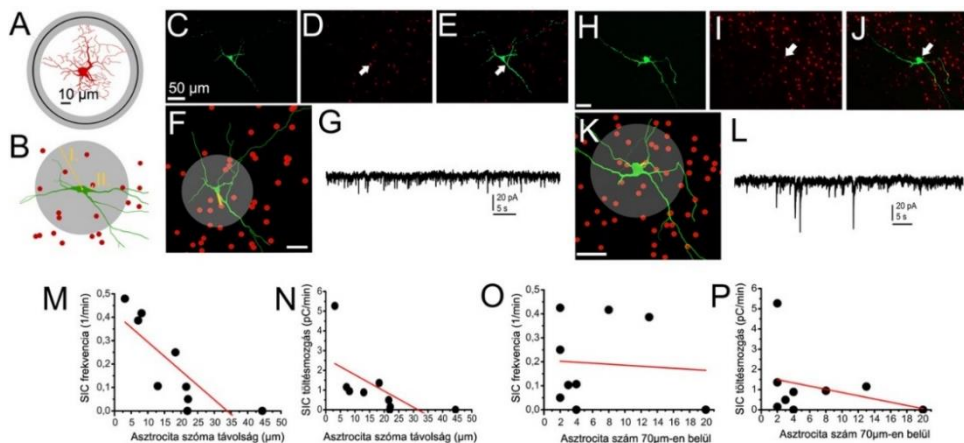
*Az alábbi eredmények a következő publikációkban szerepelnek: Kovács és Pál, 2017; Kovács és mtsai, 2019*

A fázisos, NMDAR-mediált ún. lassú befelé irányuló áramok („slow inward current”, SIC) asztrocita függő neuromodulációs hatásokban betöltött szerepét is vizsgáltuk. A SIC-ek a PPN neuronokon is jelen vannak és jól elkülöníthetőek az EPSC-ktől. 1 mmol/l  $Mg^{2+}$ -tartalmú mérőoldatban a neuronok 40%-án voltak jelen (frekvencia:  $0,09 \pm 0,05$ /perc; amplitúdó:  $43,3 \pm 10$  pA; rise time:  $220,1 \pm 33,1$  ms; decay tau:  $706 \pm 131$  ms; töltésmozgás:  $25,4 \pm 13,1$  pC;  $n = 15$ ). Nominálisan magnéziummentes oldatban (az NMDA receptor magnéziumblokádjának az elmozdításával) a neuronok 55.8%-a produkált SIC-eket (frekvencia:  $0,23 \pm 0,06$ /perc; amplitúdó:  $95,5 \pm 7,2$  pA; rise time:  $88,7 \pm 8,4$  ms; decay tau:  $285,3 \pm 24,7$  ms; töltésmozgás:  $25,4 \pm 13,1$  pC;  $n = 52$ ;  $p = 0,01$  a kétféle körülmény közt mért amplitúdó között).

A nominálisan magnéziummentes oldatban a SIC-ek és EPSC-k számos paramétere (frekvencia, amplitúdó, rise time, decay tau) szignifikánsan különbözött ( $p < 0,001$ ), ugyanakkor a frekvencia és az amplitúdó esetén a SIC-ek és EPSC-k szélső értékeiben találtunk átfedéseket, míg a rise time és decay tau esetén az individuális adatok sem mutattak átfedést (rise time: EPSC: 0,7-7,9 ms; SIC: 13,8-522 ms; decay tau: EPSC: 1,2-41,8; SIC: 48-1356 ms).

A SIC-ek a PPN-ben is asztrocita-aktiváció következtében történő glutamát felszabadulás és GluN2B alegységet tartalmazó neuronális extraszinaptikus NMDA receptor aktiváció következményei. A neuronális akcióspotenciál-tüzelést teljesen gátló TTX a SIC-ek frekvenciáját és felszálló szárának kinetikáját nem változtatta meg, de az amplitúdót szignifikánsan csökkentette ( $57,9 \pm 5,7$ ;  $p = 0,004$ ) és a decay tau-t megnyújtotta ( $428,4 \pm 41,7$  ms;  $p = 0,002$ ). A nem specifikus NMDAR gátló D-AP5 és a GluN2B alegység specifikus antagonistája ifenprodil a SIC aktivitást csaknem teljesen gátolta. Az asztrociták optogenetikai aktivációja a SIC frekvenciát nagymértékben, szignifikánsan növelte, azonban az így kiváltott SIC-ek kinetikája jelentősen lassabb volt, mint a spontánul létrejövő eseményeké (rise time:  $334 \pm 92$  ms; decay tau:  $960 \pm 291$  ms,  $p < 0,001$  mindkét esetben).

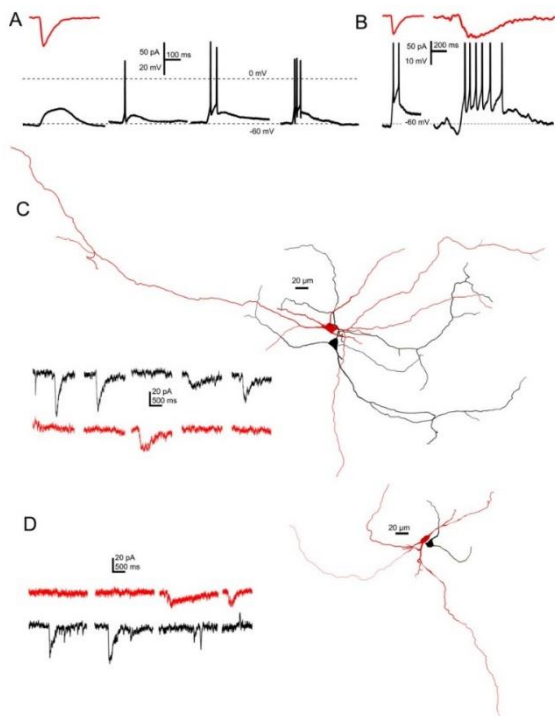
A SIC-ek jelenléte vagy hiánya nem függött a neurokémiai sejtípustól: a kolinerg és GABAerg neuronokon mért SIC-ek frekvenciája, amplitúdója és kinetikai paraméterei nem különböztek szignifikánsan.



**39. ábra.** A SIC-ek megjelenése egy neuronon függ a legközelebb eső asztrocita szóma távolságától. **A.** Egy asztrocita rekonstruált rajza. Fekete kör: a legmesszebbi asztrocita végnyúlvány átlagos távolsága, szürke kör: SEM. **B.** Egy rekonstruált neuron (zöld) és az azt körülvevő asztrocita sejttestek (piros pontok). I. okker egyenes és szürke kör: a neuronális szómától mért 70 μm sugarú kör; II. A neuronális szómához legközelebb eső asztrocita szóma. **C-E.** Egy biocitinnel jelölt neuron (**C**, zöld) és GFAP promotor alatti tdTomato expresszió (**D**, piros) és a két panel egymásra vetített képe (**E**). A nyíl a neuronhoz legközelebbi asztrocita szómát jelöli. **F.** A fenti neuron (zöld) és asztrocita szómák rekonstrukciós rajza (piros pontok). Szürke kör: 70 μm sugarú kör a szóma középpontja körül, okker egyenes: a neuronális szómához legközelebbi neuron távolsága. **G.** A C-F paneleken bemutatott neuronon mért reprezentatív áramgörbe, SIC nélkül. **H-L.** Egy másik neuron morfológiai rekonstrukciója és a rajta végzett árammérés SIC-ek megjelenésével a C-G panelekkel megegyező elrendezésben. **M-N.** A SIC frekvencia (**M**) és a SIC-ek általi töltésmozgás (**N**) a legközelebbi asztrocita és a vizsgált neuron szómái közti távolság függvényében (fekete pontok: egyedi adatok, piros vonal: lineáris illesztés). **O-P.** A SIC frekvencia (**O**) és a SIC-ek általi töltésmozgás (**P**) a vizsgált neuron szómájától 70 μm-en belül eső asztrociták számának függvényében (fekete pontok: egyedi adatok, piros vonal: lineáris illesztés).

Arra is választ kerestünk, hogy milyen, neuronok és asztrociták közötti topográfiai viszonytal hozható a magas vagy alacsony SIC aktivitás összefüggésbe. *Post hoc* morfológiai analízissel meghatároztuk a neuron szómájához legközelebbi asztrocita távolságát és a neuron szómájától 70 μm-en belüli asztrociták számát. Azért választottuk a 70 μm-es távolságot, mert a neuronok szómájának átlagos legnagyobb átmérője  $24,1 \pm 2,1 \mu\text{m}$ , míg a legtávolabbi asztrocita végtalp asztrocita szómától mért átlagos távolsága  $54,1 \pm 6,6 \mu\text{m}$  volt (39.ábra, A-L). A szómához legközelebb eső asztrocita távolsága fordítottan arányos volt a SIC frekvenciával ( $r^2 = -0,803$ ) és a SIC aktivitással (az egy perc alatt mért SIC-ek általi töltéstranszferrel;  $r^2 = -0,621$ ; 39.ábra, M-N). A 70 μm-en belüli asztrociták száma nem korrelált a SIC frekvenciával ( $r^2 = -0,074$ ) és gyenge fordított arányosságot mutatott a SIC aktivitással ( $r^2 = -0,306$ ; 39.ábra, O-P).





**40. ábra.** *A szomszédos PPN neuronokon nem jellemel meg egyidejű SIC-ek. A. Egy átlagos SIC (fent, piros), amit parancsjelként használva a PPN neuronok 12,5%-ában depolarizációt, 65%-ában 1 akciós potenciált, 15 és 7,5%-ában 2 vagy 3 akciós potenciált lehetett kiváltani (fekete feszültséggörbék; szaggatott vonalak: 0 és -60 mV). B. Egy átlagos és egy nagy töltésmozgással járó SIC (piros görbék, felül), amiket parancsjelként használva 2 és 6 akciós potenciálból álló sorozatokat (fekete feszültséggörbék) lehetett kiváltani. C-D. Egy-egy reprezentatív rekonstruált neuronpár a PPN-ből. A fekete áramgörbék a fekete, a piros áramgörbék a piros neuronról lettek egyidejűen elvezetve.*

A SIC-ekről korábban feltételezték, hogy a fő funkciójuk az egy asztrocita doménbe eső szómák szinkronizációja azok transziens depolarizációja által (Pirttimaki és mtsai, 2011).

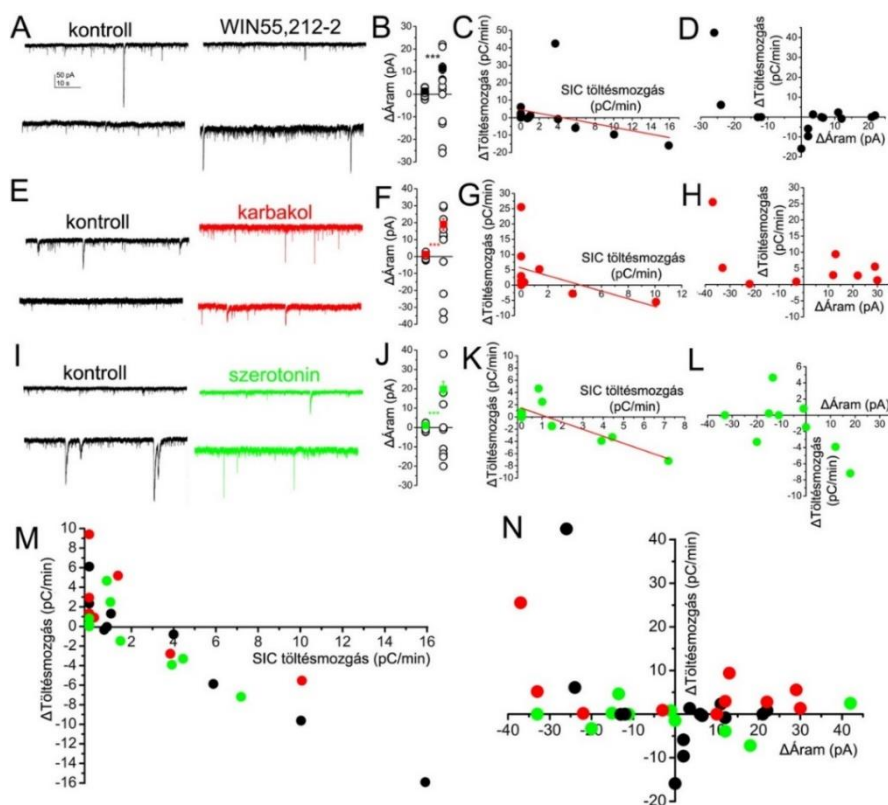
Ennek a lehetőségnek a vizsgálatához először

annak a lehetőségét vizsgáltuk meg, hogy egy SIC képes-e akciós potenciált vagy akcióspotenciál-sorozatot kiváltani. Egy átlagos SIC, parancsjelként használva -a neuronális membránsajátságok eltérése miatt 0-3 akciós potenciált, míg egy lassabb kinetikájú és nagyobb amplitúdójú SIC mindig akcióspotenciál-sorozatot váltott ki (40. ábra, A-B). Amikor két szomszédos, egymástól 20  $\mu\text{m}$ -en belül elhelyezkedő neuron szómájáról mértünk párhuzamosan, azt tapasztaltuk, hogy a két közeli neuron szómáján egyszerre soha nem jelentkezett SIC (32 SIC, 9 neuronpárról; 40. ábra, A-B), így az eredeti munkahipotézis a PPN neuronokra nézve nem bizonyult igazolhatónak.

Különböző neuromodulációs hatások (kannabinoid, muszkarinos, szerotonerg, orexinerg) képesek a neuronális ingerlékenységet tónusosan megváltoztatni és a SIC aktivitásra is hatnak. A következő kísérletsorozatban arra kerestünk választ, hogy a fázisos és tónusos glutamaterg hatások között van-e összefüggés, valamint hogy a SIC aktivitás modulációja milyen faktoroktól függ. Először WIN55,212-2 hatását vizsgáltuk a tónusos áramokra és SIC-ekre feszültség-clamp elrendezésben, -60 mV-os tartópotenciálon. 14 neuron közül 3 nem válaszolt (a 3,5 pA-nél kisebb változás megegyezett a spontán tartóáram fluktuáció mértékével, így csak az efeletti értékeket tekintettük válasznak), 7 neuron tónusos kifelé irányuló, 3 neuron tónusos befelé irányuló áramot mutatott (az átlagos abszolút változás  $11,5 \pm 2,34$  pA volt). A SIC aktivitás változása a kontroll körülmények között mért SIC aktivitástól függött: kis kiindulási SIC aktivitásnál (3 pC/perc alatt) a SIC aktivitás növekedett, míg ennél nagyobb SIC aktivitás esetén azt gátolta vagy teljesen elmosta a WIN55,212-2 ( $r^2 = -0,36$ ). A SIC aktivitás



változása a tartóáram változással nem, de annak abszolút értékével gyenge egyenes arányosságot mutatott ( $r^2 = 0,45$ ; 41. ábra, A-D). A karbakol esetében hasonló megfigyeléseket tettünk. 11 vizsgált neuronból 7 tónusos kifelé irányuló és 3 befelé irányuló tónusos áram létrejöttét rögzítettük, míg egy esetben a karbakol hatástalan maradt. A tónusos áramváltozás átlagos abszolút értéke  $18,9 \pm 3,42$  pA volt. A WIN55,212-2-vel tett megfigyelésekhez hasonlóan itt is a kiindulási SIC aktivitástól függött a SIC aktivitás karbakol hatására bekövetkező változása ( $r^2 = -0,46$ ), és a SIC aktivitás egyenesen arányos volt a tónusos tartóáram változás abszolút értékével ( $r^2 = 0,32$ ; 41. ábra, E-H).



**41. ábra. A SIC-ekre számos neuromodulációs mechanizmus egységesen és a tónusos áramoktól nagyrészt függetlenül hat.**

**A.** Két reprezentatív áramgörbe kontroll körülmények között és a CBI receptor agonista WIN55, 212-2 jelenlétében. **B.** A tartóáram változásai kontroll esetben (első pontsor, spontán fluktuáció) és WIN55,212-2 hatására. Üres körök: egyedi adatok, fekete kitöltött körök: a változás abszolút értékének átlagai  $\pm$  SEM. **C.** A SIC-ek általi egy perc alatti töltésmozgás WIN55,212-2 hatására bekövetkező változásai a kontroll körülmények

közötti SIC töltésmozgás függvényében (fekete pontok: egyedi adatok, piros egyenes: lineáris illesztés). **D.** A SIC-ek általi töltésmozgás WIN55,212-2 hatására bekövetkező változásai a tónusos áramváltozások függvényében (fekete pontok: egyedi adatok, piros egyenes: lineáris illesztés). **E-H.** Karbakol hatása a SIC aktivitásra, az A-D panelekhez hasonló elrendezésben. Piros szín: karbakol alkalmazásával mért áramgörbék (**E**), a változás abszolút értékének átlagai  $\pm$  SEM (**F**), egyedi adatok (**G-H**). **I-L.** Szerotonin hatása a SIC aktivitásra, az A-D panelekhez hasonló elrendezésben. Zöld szín: karbakol alkalmazásával mért áramgörbék (**I**), a változás abszolút értékének átlagai  $\pm$  SEM (**J**), egyedi adatok (**K-L**). **M.** A SIC-ek általi egy perc alatti töltésmozgás neuromodulációs hatásokra bekövetkező változásai a kontroll körülmények közötti SIC töltésmozgás függvényében (fekete pontok: WIN55,212-2, piros pontok: karbakol; zöld pontok: szerotonin jelenlétében rögzített egyedi adatok). **N.** A SIC-ek általi töltésmozgás neuromodulációs hatásokra bekövetkező változásai a tónusos áramváltozások függvényében (fekete pontok: WIN55,212-2, piros pontok: karbakol; zöld pontok: szerotonin jelenlétében rögzített egyedi adatok). \*\*\*:  $p < 0,001$

Szerotonin ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) bemosására 12 neuronból 4 mutatott tónusos kifelé, míg 6 tónusos befelé irányuló áramot, 2 nem válaszolt. Itt is a kiindulási SIC aktivitással volt fordítottan arányos a SIC aktivitás szerotoninnal látott növekedése ( $r^2 = -0,997$ ), de a többi

neuromodulációs hatástól eltérően a SIC aktivitás változás a tónusos áramváltozás abszolút értékével gyenge korrelációt, fordított arányosságot mutatott ( $r^2 = -0,305$ ; 41. ábra, I-L).

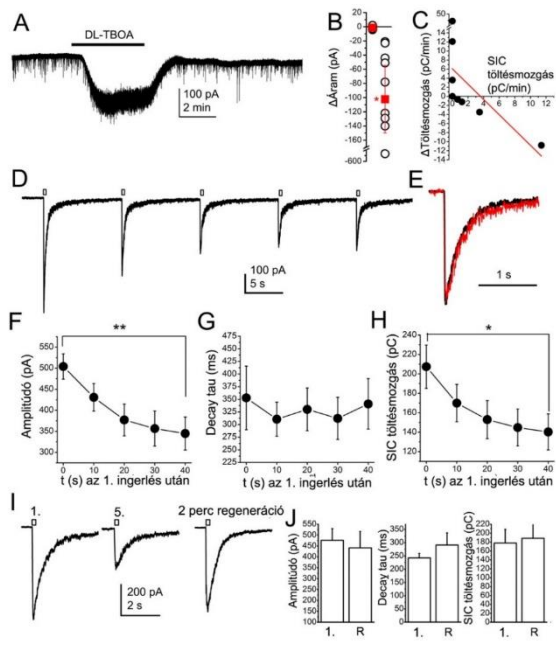
Orexin-A (200 nmol/l) bemosása esetén, a többi neuromodulációs hatástól eltérően, 21 esetből egy esetben láttunk tónusos kifelé irányuló áramot, egy esetben maradt el a hatás, és 19 esetben tónusos befelé irányuló áramot figyeltünk meg (átlagosan  $-17,32 \pm 3,11$  pA amplitúdóval). A többi neuromodulációs hatással megegyezően, az alacsony (2 pC/perc alatti) kiindulási SIC aktivitás esetén az orexin a SIC aktivitást növelte, míg magas SIC aktivitás esetén csökkentette. A kiindulási SIC aktivitás és annak orexin hatására látott változása erős lineáris összefüggést, fordított arányosságot mutatott ( $r^2 = -0,918$ ). A tónusos áramváltozás abszolút értéke és a SIC aktivitás változása nagyon gyenge fordított arányosságot mutatott ( $r^2 = -0,11$ ).

Valamennyi neuromodulációs hatást figyelembe véve, a SIC aktivitás hatásukra bekövetkező változása nagyon hasonló minden esetben és nem a neuromodulációs hatás természetétől, hanem a kiindulási SIC aktivitástól függ. Az ingerlékenység tónusos változása és a SIC aktivitás változása gyenge és ellentmondásos korrelációt mutat (41. ábra, M-N).

A fentiek alapján feltételeztük, hogy a SIC-eken látott neuromodulációs hatások az extraszinaptikus glutamát koncentrációtól és az NMDA receptor aktiváció és deszenzitizáció egyensúlyától függenek. A SIC-hez vezető glutamát felszabadulás modellezésére az elsősorban, de nem szelektíven az asztrociták glutamát felvételét gátló DL-TBOA (100 nmol/l) bemosásával végeztünk kísérletet. A TBOA  $102,25 \pm 47,66$  pA befelé irányuló áramot hozott létre és a SIC aktivitásra ugyanúgy hatott, mint a neuromodulációs hatások: 3 pC/perc kiindulási SIC aktivitás alatt serkentette, felette gátolta ( $r^2 = -0,59$ ;  $n = 9$ ; 42. ábra, A-C). A tónusos áram amplitúdója és a SIC aktivitás között nem volt korreláció ( $r^2 = -0,005$ ).

A TBOA használatával kapott eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a magas kiindulási SIC aktivitás esetén megfigyelt emelkedő glutamátszint miatti gátlás NMDA receptor inaktiváció vagy deszenzitizáció következménye. Az emelkedő glutamátszintnek az NMDA receptorokra kifejtett hatását 100  $\mu$ mol/l MNI-caged glutamát flash fotolízisével vizsgáltuk 10  $\mu$ mol/l NBQX (AMPA receptor gátlószer) jelenlétében. A fotolízist 5 alkalommal, 0,1 Hz frekvenciával ismételtük (42. ábra, D), majd megállított perfúzió mellett 2 perc várakozás után egyszer újra megismételtük ( $n = 10$ ). Mindegyik alkalommal egy tranzienst befelé irányuló áramot kaptunk, aminek kinetikai paraméterei mindegyik esetben megegyeztek, de az 5 egymást követő fotolízis alatt fokozatosan, szignifikánsan csökkentek (42. ábra, E-H).

A megállított perfúzióval 2 perc után megismételt fotolízis által keltett áram amplitúdója megegyezett az első fotolízis áramának amplitúdójával, így az MNI-caged glutamát deplécióját ki tudtuk zárni (42. ábra, I-J). A fenti kísérletek alapján az emelkedő extracelluláris glutamát koncentráció NMDA receptor inaktivációt okozott.



**42. ábra.** A glutamát transzporter gátló DL-TBOA és a glutamát uncaging hatása SIC-ekre jól modellezi a vizsgált neuromodulációs hatásokat. **A.** Reprezentatív áramgörbe DL-TBOA bemosása előtt, alatt és után. **B.** A TBOA alkalmazásakor bekövetkező tónusos áramváltozások statisztikai elemzése. Bal oldali pontok: spontán fluktuáció kontroll körülmények között, jobb oldali pontok: TBOA hatására létrejövő tónusos változások (üres körök: egyedi adatok, piros négyzetek: átlag ± SEM). **C.** A SIC-ek töltésmozgásának változása TBOA hatására a kontroll esetben mért SIC aktivitás függvényében (fekete pontok: egyedi adatok, piros egyenes: lineáris illesztés). **D.** 5 egymást követő glutamát uncaging (üres négyzetek) eredményét bemutató reprezentatív áramgörbe. A mérés NBQX (AMPA receptor gátlószer) jelenlétében történt. **E.** Az első (fekete) és ötödik (piros) glutamát áram az amplitúdók egymáshoz igazítását követően egymásra illesztett képe. **F-H.** Az 5 egymást követő glutamát áram paramétereinek (amplitúdó, **F**; decay tau, **G**; töltésmozgás, **H**) statisztikai összehasonlítása (átlag ± SEM). **I.** Az első, ötödik és megállított perfúzióval 2 perccel az ötödik után mért regenerálódott glutamát áram. **J.** Az első (1.) és a 2 perc regeneráció után mért glutamát áram (R) paramétereinek összehasonlítása (átlag ± SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

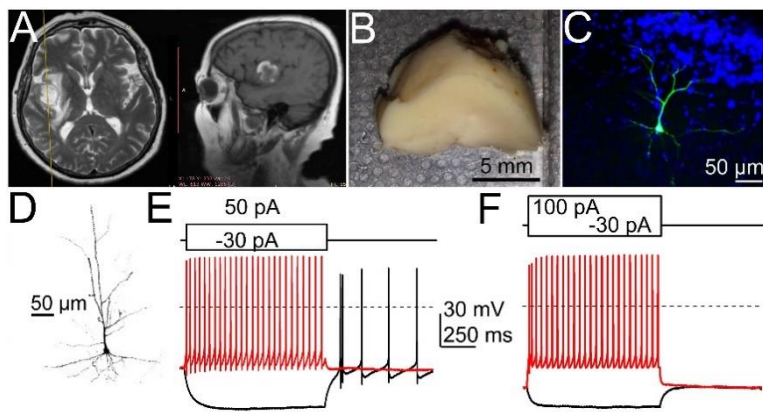
**H)** statisztikai összehasonlítása (átlag ± SEM). **I.** Az első, ötödik és megállított perfúzióval 2 perccel az ötödik után mért regenerálódott glutamát áram. **J.** Az első (1.) és a 2 perc regeneráció után mért glutamát áram (R) paramétereinek összehasonlítása (átlag ± SEM). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

A PPN-en asztrocitákon keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások robusztusnak látszottak, de mivel *ex vivo* körülmények között történt a mérés, valódi jelentőségüket *in vivo* rendszerben is szeretnénk megismerni. Folyamatban levő kísérleteinkben az asztrociták kemogenetikai aktivációját kombináljuk viselkedési tesztekkel. Eddigi kísérleteink alapján az asztrociták krónikus aktivációja a cirkadián ritmust, az izomtónus szabályozást és az akusztikus startle reflexet érinti.

### 5.5.2.2. A lassú inward áramok korfüggése és hatása a szinaptikus plaszticitásra

Az alábbi eredmények a következő forrásból származnak: Csemer és mtsai, 2023 (bírálat alatti kézirat)

A következő kísérletsorozatban a SIC-ek általános szerepét és annak a normál öregedéssel megfigyelhető összefüggéseit kívántuk feltárni. Ehhez az eddig használt egér modellen kívül humán neocorticalis mintákat is használtuk, amelyeket agyi tumorok eltávolításakor ugyancsak eltávolított ép kéregrészekből preparáltunk (43. ábra).



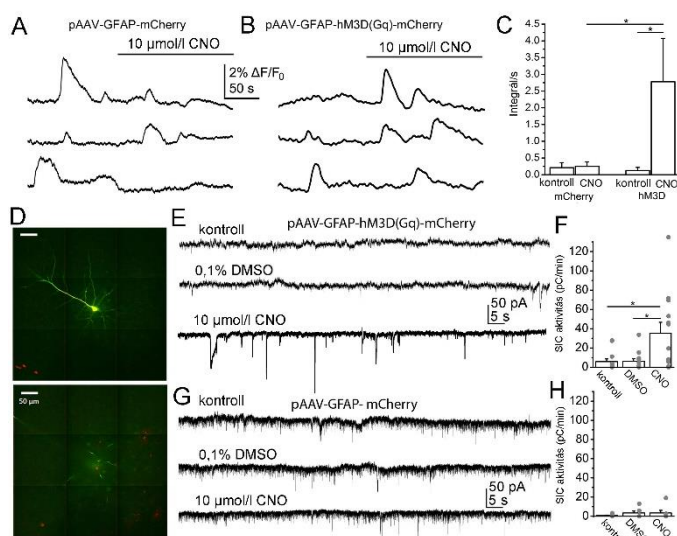
43. ábra. A humán szelet elektrofiziológiai vizsgálatokhoz használt preparátum. A. Tumor lokalizáció rétegfelvételeken. B. A tumor felől eltávolított ép agydarab. C. Patch clamp kísérlet során biocitinnel jelölt neocorticalis piramisajt (zöld: biocitin, kék: DAPI). D. Biocitinnel töltött piramisajt rekonstrukciója. E-F. Két piramisajtról elvezetett feszültséggörbék +50 (piros) és -30 pA (fekete) négyszög alakú áraminjekció

alatt.

Az első lépésben azt mutattuk meg, hogy mind az egér, mind a humán temporalis (és parietalis, humán esetén) neocortex piramisajtjein mért SIC-ek elkülöníthetőek az EPSC-ktől, és GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptor alegységek és asztrociták aktivációjának következményei. Az utóbbi feltételezést egér esetében mCherry fluoreszcens fehérjét és hM3D kemogenetikai aktuátort asztrocita specifikusan kifejező kísérleti minták használatával igazoltuk. Míg a kontroll állatok asztrocitáinak kalciumhullám aktivitása nem nőtt (kontroll:  $0,21 \pm 0,15 \Delta F/F_0/s$ ; CNO:  $0,25 \pm 0,13 \Delta F/F_0/s$ ;  $n = 8$  minta), addig a hM3D-t kifejező csoportban szignifikáns növekedést láttunk (kontroll:  $0,125 \pm 0,094 \Delta F/F_0/s$ ; CNO:  $2,78 \pm 1,29 \Delta F/F_0/s$ ;  $n = 8$  minta;  $p = 0,032$ ; 44. ábra, A-C).

Az asztrociták kemogenetikai aktivációja a SIC aktivitás nagymértékű növekedéséhez vezetett, ami a csak mCherry-t kifejező kontroll mintákban elmaradt (hM3D: aCSF:  $5,79 \pm 2,81$  pC/min; DMSO:  $6,22 \pm 2,66$  pC/min; CNO:  $35,43 \pm 11,1$  pC/min;  $n = 10$ ;  $p = 0,011$ ; mCherry: aCSF:  $0,82 \pm 0,53$  pC/min; DMSO:  $3,5 \pm 1,88$  pC/min; CNO:  $3,5 \pm 2,63$  pC/min;  $n = 6$ ;  $p = 0,58$ ; 44. ábra, D-G).

A humán és egér egyedi SIC-ek paraméterei eltérnek egymástól: a középkorú populációkat összehasonlítva az amplitúdó humánban kisebb volt (humán:  $31,2 \pm 11,5$  pA; egér:  $107,8 \pm 8,25$  pA;  $p = 0,0065$ ), viszont a rise time (humán:  $239,6 \pm 154$  ms; egér:  $153,8 \pm 20,4$  ms;  $p < 0,0001$ ), decay tau (humán:  $1,26 \pm 0,97$  s; egér:  $0,47 \pm 0,053$  s;  $p = 0,0042$ ) és töltéstranszfer nagyobb (humán:  $246,51 \pm 71,75$  ms; egér:  $31,03 \pm 4,5$  ms;  $p < 0,0001$ ;  $n = 9$  humán és 95 egér SIC; 45. ábra). A humán SIC kisebb amplitúdójához hozzájárulhattak a minta szállítási körülményei, mert a hasonlóan szállított egér minták esetében közel szignifikáns amplitúdó csökkenést láttunk (kontroll inkubáció:  $88,16 \pm 8,14$  pA; humánhoz hasonló szállítás:  $55,02 \pm 4,74$  pA;  $p = 0,054$ ).



#### 44.ábra. Az egér neocorticalis piramisisejtek lassú inward áramai (SIC-ei) asztrocitafüggők.

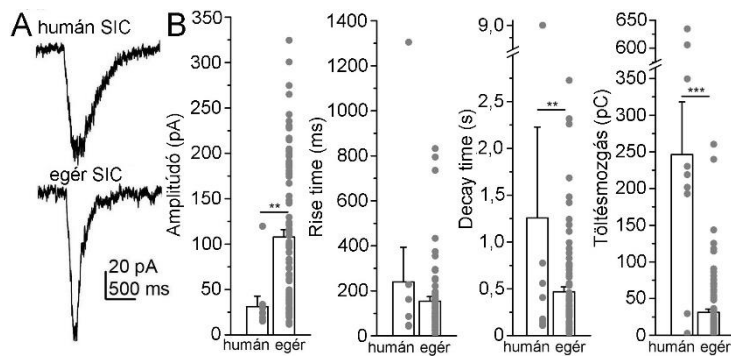
**A.** OGB-vel töltött, kizárólag mCherry-t kifejező asztrociták kalciumhullámai kontroll esetben és CNO kezelés alatt. **B.** hM3D-t kifejező asztrociták kalciumhullámai az A. panelhez hasonló körülmények között. **C.** A kalciumhullámok időegység alatti integráljának statisztikai összehasonlítása. **D-G.** A SIC-ek asztrocita-aktiváció következményei. **D.** mCherry fluoreszcens protein (és hM3D kemogenetikai aktuátor, piros) expressziója és egy biocitinnel jelölt piramisest (zöld) két konfokális rétegvétel. **E.** Reprezentatív árammérések kontroll körülmények között, 0,1% DMSO-val

és CNO-val (szelektív asztrocita aktiváció). **F.** Az F panelen bemutatott mérési körülmények SIC aktivitásának (összes percenkénti töltésmozgás) összehasonlítása. **G-H.** Kontroll állatokon (kizárólag mCherry expresszió) történő mérések az F-G panelekkel azonos elrendezésben. (Oszlopok: átlag ± SEM; szürke pontok: egyedi adatpontok; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ )

A SIC-ek bár fiziológiásan ritkán jelentkező események, feltehetően nem funkció nélküliek. Azt a feltételezést vizsgáltuk meg a továbbiakban, hogy a szinaptikus plaszticitásban szerepet játszanak-e. Ennek vizsgálatához először -60 mV-os tartópotenciálon regisztráltunk szinaptikus eseményeket és SIC-eket normál aCSF-ben, majd magnéziummentes aCSF-et mostunk be. Az EPSC-k amplitúdójának stabilizálódása után jelentkező első SIC előtti és utáni EPSC amplitúdót és frekvenciát elemeztük. Azt találtuk, hogy az esetek 34,6%-ában emelkedett a frekvencia és 23%-ban az amplitúdó, további 27%-ban csökkent mind a frekvencia, mind az amplitúdó; ugyanakkor a frekvencia további 38,4%-ban, az amplitúdó 50%-ban változatlan maradt ( $n = 26$ ; 46. ábra A-B).

A fenti kísérlet eredményei felvetették, hogy a SIC-ek önmagukban is képesek szinaptikus plaszticitás kialakítására. A következő lépésben a SIC-eket az asztrociták kemogenetikai aktivációjával váltottuk ki, miközben a vizsgált neuron serkentő szinaptikus bemeneteit stimulálva EPSC-t váltottunk ki. Azokat az eseteket elemeztük csak, ahol a SIC az EPSC előtt vagy után 1 s-on belül jelent meg. Az esetek 50%-ában láttunk változást ( $n = 18$ ). Ha a SIC előbb (negatív időeltolódás) vagy az EPSC-vel egy időben jelent meg (nulla időeltolódás), 21-137% amplitúdónövekedést figyeltünk meg (normalizált amplitúdók: negatív eltolódás:  $1,12 \pm 0,7$ ; nulla eltolódás:  $1,96 \pm 0,39$ ;  $p = 0,0015$ ). Ha a SIC az EPSC után jelentkezett (pozitív eltolódás), 22-33% csökkenést láttunk ( $0,93 \pm 0,08$ ; nulla és pozitív értékek közötti  $p = 0,0002$ ). A változás a mérések 40 perces időtartama alatt fennmaradt (46. ábra C-E). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a SIC-ek időzítésfüggő plaszticitást képesek kiváltani.





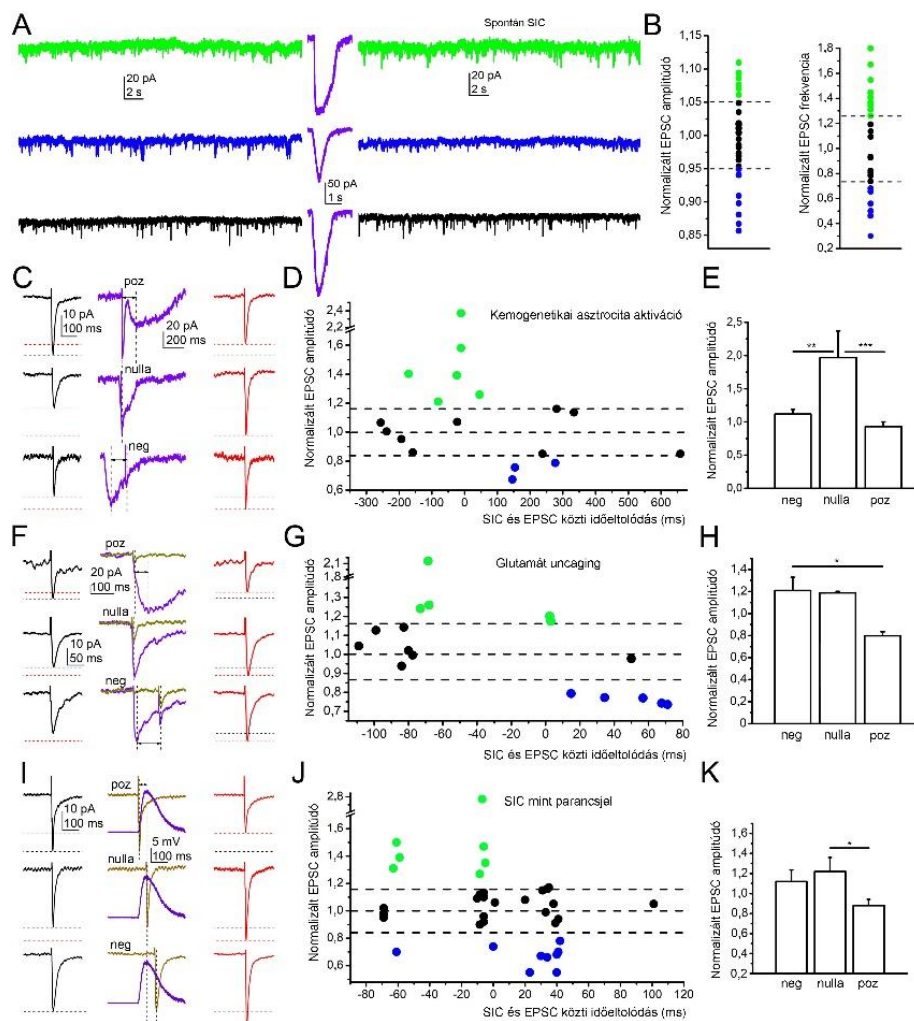
**45. ábra.** *A humán SIC-ek nagyobb töltésmozgással járnak, mint az egér SIC-ek. A. Reprezentatív humán és egér SIC áramgörbék. B. Humán és egér SIC paraméterek statisztikai összehasonlítása. (Oszlopok: átlag ± SEM; szürke pontok: egyedi adatpontok; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ )*

A SIC-ek az asztrocita

aktiváció jelei, amivel egyszerre nemcsak glutamát, hanem több más gliotranszmitter is ürül. Ezek szerepét MNI-caged glutamát flash fotolízissel történő felszabadításával kívántuk kizárni. Az esetek 58%-ában időzítésfüggő változást figyeltünk meg ( $n = 17$ ). Ha a glutamát áram megelőzte az EPSC-t vagy azzal egyszerre következett be, 17-116% amplitúdó növekedést láttunk. Ha az EPSC előbb érkezett, mint a glutamát áram, 21-26% amplitúdó csökkenést láttunk (negatív eltolódás:  $1,21 \pm 0,12$ ; nulla:  $1,19 \pm 0,01$ ; pozitív:  $0,79 \pm 0,04$ , negatív és pozitív közti  $p = 0,038$ ; 46. ábra F-H). Arra következtethetünk, hogy a glutamát felszabadulása váltotta ki a szinaptikus plaszticitást.

Mivel a glutamát nemcsak extraszinaptikus NMDA receptorokra hathat és nemcsak SIC-eket okozhat, más glutamát függő jelenségek kizárására egy korábban mért SIC-et parancsjelként használtunk. A fenti eredményekhez hasonlóan, ha a SIC az EPSC előtt vagy azzal egyidejűen érkezett, 27-177% EPSC amplitúdó növekedés következett be. Az EPSC után érkező SIC-ek 28-45% csökkenést okoztak (negatív:  $1,12 \pm 0,11$ ; nulla:  $1,22 \pm 0,14$ ; pozitív:  $0,88 \pm 0,06$ ; pozitív és nulla közti  $p = 0,041$ ; 46. ábra I-K).

A spontán SIC-ek EPSC-kre gyakorolt hatásának vizsgálatához (46. ábra, A-B) hasonló kísérletet végeztünk humán mintán is. Ott azt láttuk, hogy az összes eset 83%-ában 10-42% EPSC amplitúdó- és 97-200%-os frekvencianövekedés következett be az első SIC után ( $n = 6$ ; amplitúdó: SIC előtt:  $12,13 \pm 1,1$  pA; SIC után:  $15,1 \pm 1,3$  pA;  $p = 0,05$ ; frekvencia: SIC előtt:  $0,08 \pm 0,02$  Hz; SIC után:  $0,16 \pm 0,05$  Hz,  $p = 0,08$ ; 47. ábra). Kísérleteink eredményeként levonhatjuk azt a következtetést, hogy a SIC-ek képesek elektromos szignálként szinaptikus plaszticitást kiváltani mind egéren, mind emberi mintákon.

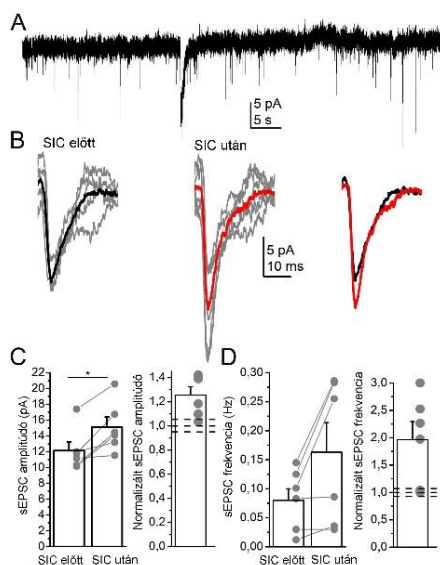


**46. ábra.** A SIC-ek önmagukban is képesek időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás kiváltására. **A-B.** A spontán megjelenő SIC-ek az esetek mintegy felében a spontán EPSC amplitúdót és frekvenciát megváltoztatják. **A.** Reprezentatív áramgörbék és az először detektált spontán SIC-ek (lila), ahol az EPSC-k amplitúdója és frekvenciája megnőtt (zöld), csökkent (kék) vagy nem változott (fekete). **B.** Az EPSC amplitúdó és frekvencia változása SIC hatására, a SIC előtti mérési adatokra normalizálva. (Pontok: individuális adatok; zöld: növekedés, kék: csökkenés, fekete: változatlan adatok. Szaggatott vonal: a mért spontán fluktuáció

nagysága.). **C-E.** Az asztrociták kemogenetikai aktivációja által létrehozott SIC-ek a kiváltott EPSC-k amplitúdóját időzítésfüggő módon változtatják meg. **C.** Reprezentatív áramgörbék az EPSC-k és SIC-ek különböző időzítéseivel (poz: pozitív időeltolódás, a SIC az EPSC után érkezik, nulla: a SIC és az EPSC egy időben történik, neg: negatív időeltolódás, a SIC megelőzi az EPSC-t; szaggatott vonalak: az események csúcsai, nyilak: a két esemény közti időeltolódás, lila görbék: a kemogenetikai aktivációval megjelenő SIC-ek és kiváltott EPSC-k, fekete görbék: 10 kiváltott EPSC átlaga a SIC előtt, piros görbék: 10 kiváltott EPSC átlaga a SIC után). **D.** A kiváltott EPSC amplitúdójának változása a SIC és az EPSC közti időintervallum függvényében (zöld: amplitúdó növekedés, kék: amplitúdó csökkenés, fekete: változatlan amplitúdó, szaggatott vonalak: a spontán amplitúdó fluktuáció tartománya). **E.** Az EPSC változások átlaga pozitív, nulla és negatív időeltolódás esetén (ld. fent, oszlopok: átlag  $\pm$  SEM). **F-H.** EPSC változások különböző időzítésű glutamát áramok esetén. **F.** Reprezentatív áramgörbék (okker: reprezentatív EPSC görbe, a további elrendezést ld. C panel). **G.** A kiváltott EPSC amplitúdójának változása a glutamát áram és az EPSC közti időintervallum függvényében (az elrendezést ld. D panel). **H.** Az EPSC változások átlaga pozitív, nulla és negatív időeltolódás esetén. **I-K.** EPSC változások parancsjelként használt, különböző időzítéssel kiváltott SIC-ek esetén. **I.** Reprezentatív áramgörbék (az elrendezést ld. C és F panelek). **J.** A kiváltott EPSC amplitúdójának változása a SIC parancsjel és az EPSC közti időintervallum függvényében (az elrendezést ld. D panel). **K.** Az EPSC változások átlaga pozitív, nulla és negatív időeltolódás esetén. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$

A SIC-ek korfüggése egéren részben ismert (Gomez-Gonzalo és mtsai, 2017), emberen azonban eddig még nem volt ismert, ezért célunk volt mindkét fajban bemutatni és összehasonlítani a SIC szignalizáció öregedését. Az egyedi SIC-ek általi töltésmozgás egéren -a korábbi irodalmi adatokkal összhangban- nem mutatott életkorfüggést fiatal:  $39,1 \pm 3,95$  pC;

középkorú:  $33,13 \pm 4,5$  p; idős:  $40,27 \pm 5,6$  pC;  $-5,3$  fC/nap csökkenés). A SIC aktivitás (időegység alatti töltésmozgás a SIC-ek által) a SIC frekvencia életkorfüggő csökkenése miatt hanyatlást mutatott. A SIC aktivitás ugyan szignifikánsan csökkent idős egyedekben, de nem tűnt el (fiatal:  $36,34 \pm 6,81$  pC/perc; középkorú:  $17,63 \pm 5,39$  pC/perc; idős:  $12,16 \pm 3,6$  pC/perc;  $-58,4$  fC/nap csökkenés; fiatal és öreg közti  $p = 0,0011$ ;  $n = 395$  SIC 62 mintából; 48.ábra, A-D).



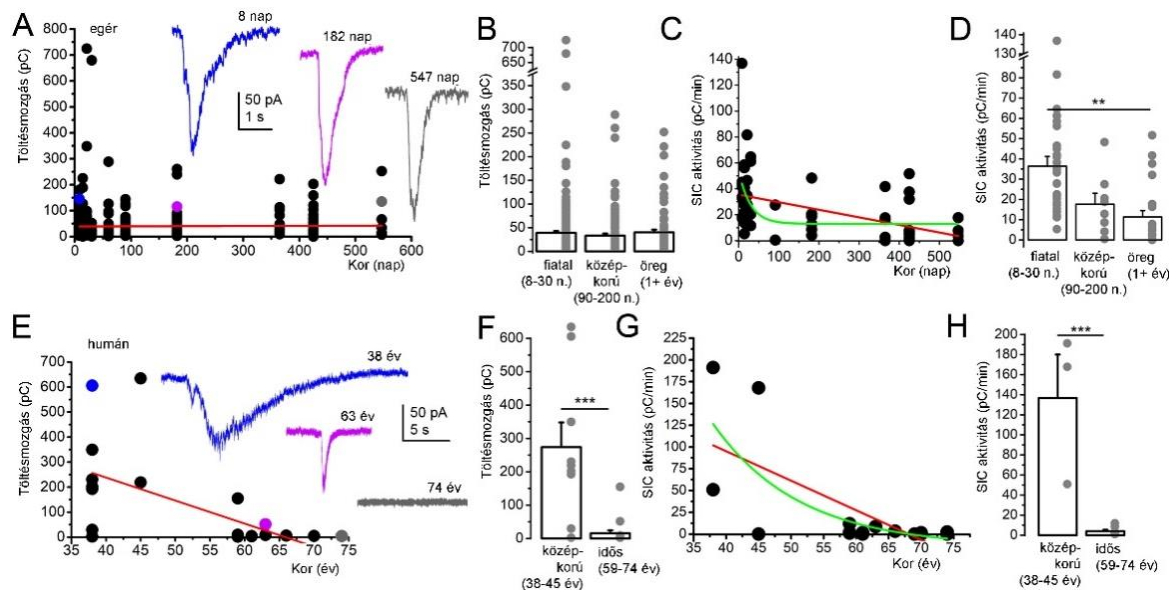
**47. ábra. A humán EPSC-k hasonló SIC-függő plaszticitást mutatnak.** **A.** Reprezentatív áramgörbe, amelyen spontán EPSC-k és egy SIC látható. **B.** Individuális EPSC-k (szürke) és átlaguk a SIC előtt (fekete) és után (piros). Az ábra jobb részén a SIC előtti és utáni átlagok egymásra vetített képe látható. **C.** A spontán EPSC-k amplitúdójának változásai a SIC előtt és után. **D.** A spontán EPSC-k amplitúdójának változásai a SIC előtt és után (oszlop: átlag  $\pm$  SEM, szürke pontok: individuális adatok; \*:  $p < 0,05$ ).

Erős kontrasztban az egéren megfigyeltekkel, emberben az egyes SIC-ek töltésmozgása az életkor előrehaladtával meredeken csökkent, majd 70 éves korra a SIC-ek eltűntek (középkorú:  $273,9 \pm 74,1$  pC; idős:  $15,9 \pm 8,6$  pC;  $-9,2$  pC/év csökkenés). Ezzel összhangban a SIC aktivitás is erőteljesen csökkent, majd megszűnt 70 éves korra (középkorú:  $136,6 \pm 43,4$  pC/perc; idős:  $4,03 \pm 1,42$  pC/perc;  $p < 0,0001$ ;  $n = 29$  SIC 12 mintából; 48.ábra, E-H).

Nemcsak maguknak a SIC-eket, hanem az EPSC-kre gyakorolt hatásukat is különböző módon érinti az öregedés egéren és emberben. Egéren a korrall előrehaladva csökken a SIC-ek EPSC amplitúdóra és frekvenciára kifejtett hatása: fiatal életkorban az esetek 80, középkorú egyedeken az esetek 75, míg öreg állatokon az esetek 50%-ában okozott a SIC változást az EPSC frekvenciában; az amplitúdóban 53, 50 és 25% volt az arány (abszolút frekvenciaváltozás: fiatal:  $0,445 \pm 0,059$ ; középkorú:  $0,367 \pm 0,15$ ; idős:  $0,332 \pm 0,1$ ; abszolút amplitúdóváltozás: fiatal:  $0,063 \pm 0,01$ ; középkorú:  $0,062 \pm 0,02$ ; idős:  $0,047 \pm 0,015$ ;  $n = 26$ ).

Emberben csak a frekvencia esetén láttunk hasonló csökkenést (abszolút frekvenciaváltozás: középkorú:  $2,59 \pm 0,22$ , idős:  $1,34 \pm 0,32$ ;  $p = 0,015$ ), de az amplitúdóra gyakorolt hatásban nem (abszolút amplitúdóváltozás: középkorú:  $1,18 \pm 0,12$ , idős:  $1,33 \pm 0,08$ ;  $p = 0,16$ ). Itt fontos megjegyezni, hogy az életkorrall maguknak a SIC-eknek a töltésmozgása is csökkent ( $n = 6$ ).





**48. ábra. Egér és humán SIC-ek korfüggő változásai.** A-D. Az egér SIC-ek paraméterei az életkorral nem változnak, de a SIC aktivitás idős állatban csökken. A. Individuális SIC-ek töltésmozgása (fekete pont) az életkor függvényében. A piros egyenes az adatok lineáris illesztése. A beillesztett görbék reprezentatív SIC-ek, az adatpontok színe a görbékével azonos. B. Különböző életkori tartományokban mért SIC töltésmozgások statisztikai összehasonlítása (oszlop: átlag  $\pm$  SEM, szürke pontok: individuális adatok). C. A SIC aktivitás (percenkénti össz töltésmozgás; fekete pont: individuális mérések) az életkor függvényében ábrázolva. (Piros egyenes: lineáris illesztés, zöld vonal: egy exponenciális tagot tartalmazó illesztés). D. Különböző életkori tartományokban mért SIC aktivitások statisztikai összehasonlítása (oszlop: átlag  $\pm$  SEM, szürke pontok: individuális adatok). E-H. A humán SIC-ek töltésmozgása az életkorral csökken és 70 év felett nem mérhető SIC aktivitás. A panelek elrendezése megegyezik az A-D panelekkel. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Ioncsatornákon keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások

#### 6.1.1. Ioncsatornákon keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások szenzoros struktúrákon

##### 6.1.1.1. Az ANO2 nem elengedhetetlen a szaglásban, de egyes esetekben az adaptációt szolgálja

A szenzoros funkciókat szabályozó ioncsatornák egyike az ANO2 kalciumaktivált kloridcsatorna. A retinán és egyes további központi idegrendszeri előfordulási helyeken kívül a szaglóhamban fordul elő nagy denzitásban (Billig és mtsai, 2011). Édesvízi állatokban nagyrészt a receptor neuronokból történő klorid kilépés felelős a receptor áram legnagyobb részéért, mivel az ion gradiensek a monovalens kationok általi depolarizációt nem teszik lehetővé (Kurahashi és Yau, 1993; Kleene és Pun, 1996). A szárazföldi állatokban a fő depolarizációért a CNG csatornák felelősek, de a szaglóhám neuronok ingerlékenységével

foglalkozó első leírások szerint a klorid efflux jelentősen erősíti azok hatását. Egyes tanulmányok szerint a receptoráram akár 80-90%-áért is a klorid efflux a felelős (Kleene, 1993; Kurahashi és Yau, 1993; Lowe és Gold, 1993; Reisert és mtsai, 2003).

A szaglóhám neuronok ciliumainak kalciumaktivált kloridáramáért potenciálisan két ioncsatorna, a Bestrophin-2 (Best2, Pifferi és mtsai, 2006) és az ANO2 (Hengl és mtsai, 2010; Stephan és mtsai, 2009) felelhet. Az előbbit a Best2 knockout egerek normál kloridáramainak detektálásával zárták ki (Pifferi és mtsai, 2009), az utóbbinak szerepét viszont Thomas Jentsch laboratóriumában a hozzájárulással erősítettük meg. Az ANO2 knockout egér fő szaglóhámjának és vomeronasalis szervének neuronjain teljesen hiányzott a kalciumaktivált kloridáram.

A várakozásokkal ellentétben, Gwendolyn Billig munkatársam ANO2 knockout egereken végzett viselkedési tesztjei nem mutattak ki szaglási deficitet. A folyadékfázisú EOG amplitúdók is –a várható 80-90%-os csökkenés helyett (Reisert és mtsai, 2005; Nickell és mtsai, 2006; Boccaccio és Menini, 2007)- mindössze 40%-os csökkenést mutattak. Ennek az eltérésnek az lehet az oka, hogy a kloridcsatorna hozzájárulását annak a nifluminsav általi gátlásával becsülték meg, ami nem szelektív az ANO2 általi áramra (Gribkoff és mtsai, 1996; Vogalis és mtsai, 2005; Nickell et al, 2006; Pinato és mtsai, 2008). Az általam mért 40%-os csökkenés az NKCC1 knockout egér 39-57% os EOG amplitúdó csökkenéséhez áll közelebb. Az NKCC1 felelős azért az intracelluláris klorid akkumulációért, ami a depolarizáló kloridáramhoz szükséges elektrokémiai gradienst létrehozza (Reisert és mtsai, 2005; Kaneko és mtsai, 2004; Nickell és mtsai, 2006; Hengl és mtsai, 2010; Nickell és mtsai, 2007). A levegőfázisú EOG amplitúdók nagyrészt változatlanok voltak.

A nifluminsav nem szelektív volta mellett a korábbi, 80-90% kloridáram hozzájárulást mérő kísérletektől való eltéréshez a szaglóhám neuronok izolálási módja is hozzájárulhatott. A ciliumokon levő ANO2 csatornák az izolált neuronokon a tight junction kapcsolatok megszűnése miatt a szóma membránjára diffundálnak, így a szómáról történő mérés esetén jobban befolyásolják annak membránpotenciál-változásait. A mucus és a Ringer(-szerű) mérőoldatok nátrium- és kloridkoncentrációi, így ezen ionok elektrokémiai gradiense között is jelentős különbségek lehetnek (55-85 mmol/l nátrium- és 55-93 mmol/l kloridkoncentráció a mucusban; 140 mmol/l koncentráció a Ringer-oldatban; Reuter és mtsai, 1998; Chiu és mtsai, 1988).

A folyadékfázisú EOG 40%-os amplitúdócsökkenésével járó, hasonló nagyságú tüzelési frekvencia csökkenés nem olyan nagymértékű, hogy a viselkedési teszttel felderíthető legyen. Ezzel a feltevessel összhangban van az a megfigyelés is, hogy a többek között az ANO2 gén deléciójával járó von Willebrand betegség sem jár a szaglás semmiféle érezhető károsodásával (Schneppenheim és mtsai, 2007).

Későbbi kutatások feltárták, hogy az ANO2 knockout minták szaglóhám neuronjainak az alap akcióspotenciál-tüzelési frekvenciája alacsonyabb, de a szaganyagok alkalmazásakor megfigyelt tüzelési frekvenciája magasabb, mint a vad típusúak esetében. A bulbus olfactoriusban glomeruluszám-növekedést is lehetett látni a knockout mintákon. Bár az ismert szaganyagok azonosítása a "buried food" tesztben ugyanolyan jól sikerült mindkét genotípus esetén, bizonyos ismeretlen szaganyagok azonosítására váltáskor a teszt teljesítése szignifikánsan lassabban sikerült a knockout egérnek (Pietra és mtsai, 2016).

A fenti megállapítások tükrében elmondhatjuk, hogy az ANO2 nem egy nélkülözhetetlen eleme a szaglóhám receptor működésének, de nem is egy véletlenül fennmaradt filogenetikai maradvány. A szerepe a szaglóhám neuronok tüzelésének modulációjában és bizonyos új, ismeretlen szaganyagokhoz való alkalmazkodásban van.

#### *6.1.1.2. A muszkarinos neuromodulációs hatások a hallópályán pleiotróp támadásponttal rendelkeznek*

A hallópálya agytörzsi szakaszának számos pontján érvényesül kolinerg neuromoduláció. Az alsóbb szakaszokon (a cochlea és a nucleus cochlearis szintjén) az olivocochlearis nyaláb, a felsőbb szakaszokon (colliculus inferior) a PPN a kolinerg rostok fő forrása.

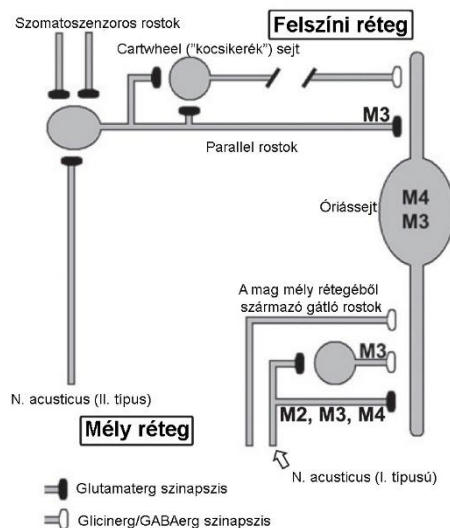
A nucleus cochlearisban a kolinerg beidegzés meglétére a kolin acetiltranszferáz- és vezikuláris acetilkolin transzporter pozitív boutonok jelenléte utal (Happe és Morley, 1998). Az M2, M3 és M4 muszkarinos acetilkolin receptorok magbeli előfordulása is ismert (Yao és mtsai, 1996; Chen és mtsai, 1994; 1995; 1999). A munkacsoport Q-PCR adatai alapján az M5 receptor jelentősége a magban alárendelt (Pap Pál, Pocsai Krisztina és Bakondi Gábor munkája). A muszkarinos acetilkolin receptorok sűrűsége a szemcsesejtes rétegben a legnagyobb és a mélyebb, fusiform, molekuláris és mély rétegek felé fokozatosan csökken (Jin és Godfrey, 2006). Azt találtuk, hogy a szemcsesejtek parallel rostjai által formált serkentő szinapszisokat M3, a mély réteg serkentő I-es típusú, nervus acusticusból származó rostjait M2,

M3, és M4, a mély réteg tuberculoventralis és T-csillag ("T-stellate") sejtjeinek gátló rostjait M3 receptor szabályozza. A felületes réteg kocsikerék- ("cartwheel-") sejtjeinek gátló rostjain nem érvényesült muszkarinos hatás.

A szóma ingerlékenységét M4 és kisebb részben M3 receptorok szabályozzák káliumáramok gátlásán keresztül. A karbakolérzékeny káliumáramnak volt egy gyors, A-áramra emlékeztető, és egy lassú, nem inaktiválódó komponense. Az utóbbi megfeleltethető az M-áramnak (Kharkovets és mtsai, 2000; Brown és Adams, 1980; 49. ábra.).

Az óriássejtek serkentő bemeneteinek modulációja, azaz sorozatingerlés esetén az első válaszon érvényesülő gátlás és a továbbiakon megfigyelhető enyhe serkentés és enyhe gátlás között levő változás a sorozat stimulusok esetén az óriássejteken megfigyelhető választ elodázzák, ezáltal megváltoztatják a neuron ismétlődő stimulusra bekövetkező tüzelési mintázatát (Thomson, 2000). A mély réteg gátló bemeneteinek gátlása az ottani feedforward gátlás felfüggesztésével jár. Az M-áram gátlása depolarizálja a neuront és fokozza annak ingerlékenységét (Delmas és Brown, 2005; Brown és Passmore, 2009). Az M-áramért felelős ioncsatornák bizonyos agytörzsi magvakra specifikus KCNQ4 alegysége a nucleus cochlearisban nagy sűrűségben fordul elő (Kharkovets és mtsai, 2000).

A hallópálya kolinerg beidegzése mind fiziológias, mind kóros körülmények között kap szerepet. A hallópálya tónusos kolinerg beidegzés alatt áll, mivel az atropin az auditív kiváltott potenciálok amplitúdóját *in vivo* rendszerben csökkentette (Ashkenazi és mtsai, 1999). Cochlea károsodás esetén a DCN-en érvényesülő kolinerg serkentés kórosan megerősödött (Jin és mtsai, 2005; 2006; Jin és Godfrey, 2006; Kaltenbach és Zhang, 2007). A muszkarinos neuromoduláció szerepe ennek megfelelően valószínűleg a DCN elemeinek és szinaptikus hálózatának a hangingerek erősségéhez hangolása.



49. ábra. A DCN óriássejtek szinaptikus bemenetei és az egyes lokalizációk muszkarinos modulációi.

A DCN hálózatain megfigyelt pleiotróp támadáspontú muszkarinos hatások valószínűleg a hallópálya más elemein, mint a colliculus inferior centrális magjának neuronjain is jelen vannak. Itt a hallópályára jellemző KCNQ4 alegység hiánya (azaz mintha erre az alegységre szelektíven és folyamatosan hatna egy extrém erős muszkarinos hatás) a szomatikus

M-áramot nem szignifikánsan csökkentette és a gátló neurotranszmissziót gátolta. Összességében ez a hatás itt is valószínűleg képes a neuronális ingerlékenység szomatikus és preszinaptikus támadáspontokon keresztüli fokozására és a DCN-ben látott erősítő funkció betöltésére. Eredményeink emellett felvetik a lehetőségét preszinaptikusan funkcionáló KCNQ4 alegység jelenlétére a colliculus inferiorban, mint ahogyan ezt a DCN-ben korábban megmutatták (Huang és Trussell, 2011).

## **6.1.2. Ioncsatornákon érvényesülő neuromodulációs hatások a RAS-ban**

### *6.1.2.1. A PPN és raphe neuronok ionáramai és ebből következő membrántulajdonságai alcsoportokat határoznak meg*

A PPN mint a RAS kolinerg magja, a raphe magvak mint szerotonerg magvak ismertek (Garcia-Rill, 2000; Monti, 2011; Mena-Segovia és Bolam, 2017). Kevésbé közismert, hogy bár ezek a ritkábban előforduló neurotranszmitterek jellemzőek ezekre a magvakra, itt is előfordulnak GABAerg és glutamaterg neuronok is. Ezen neurotranszmitterek mellett ko-transzmitterként számos neuropeptidet is megtalálunk itt (pl. urotenzin II vagy galanin, Steriade és McCarley, 2003; Cornwall és Phillipson, 1988; Newman és Ginsberg, 1994.; Steriade és Glenn, 1982; Steriade és mtsai, 1988). A neuronok szomatodendritikus morfológiája kevésbé függ a neurotranszmitter természetétől, méretükben is csak csekély különbségeket látni (Garcia-Rill, 1990; Mena-Segovia és Bolam, 2017). Szokás ezen magvak neuronjait projekcióik szerint is csoportosítani. A PPN kolinerg neuronokra jellemző, hogy axonjuk egy fel- és egy leszálló kollaterálissal mind a thalamust, mind a caudalis agytörzset ellátja (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Mena-Segovia és Bolam, 2017).

A morfológiai, neurokémiai és projekciós különbségeken alapuló beosztás mellett elektrofiziológiai csoportosítás is létezik. Itt az A-áram (vagy az első akciós potenciál -AP-késése) és az alacsony küszöbű kalciumtűskék megléte vagy hiánya alapján történik a neuronok csoportosítása (Kang és Kitai, 1990; Takakusaki és mtsai, 1996; Ye és mtsai, 2010; Leonard és Llinas, 1988). Az I. csoportba tartozó neuronok esetében van alacsony küszöbű kalciumtűske, de nincs A-áram. A II. típus esetén csak A-áram van, a III. típusba tartozóknál mindkét jelenség megfigyelhető, az általunk IIIK. csoportként nevezetteknél egyik sem látható. A „K” a csoportot III. csoportként leíró első szerzőpáros, Kang és Kitai kezdőbetűjére utal. Más leírók ugyanis a III. csoportot mindkét sajátossággal rendelkező neuronokra alkalmazták (Leonard és Llinas, 1988).

Mi két neurokémiaailag elkülöníthető populációban, a ChAT-pozitív kolinerg és a Vglut2-pozitív glutamaterg neuronok esetében vizsgáltuk az egyes elektrofiziológiai sejttípusok arányát (Baksa és mtsai, 2019; Dautan és mtsai, 2021). Az I. típus 13,18%-kal képviseltette magát a kolinerg és 22,7%-kal a glutamaterg neuronok között. II. típusú volt a kolinerg neuronok 48,35%-a és a glutamaterg neuronok 47,7%-a. A III. típusba 20,88 és 9,1%-uk esett, míg IIIK. besorolást 17,58 és 20,5%-uk kapott. Leegyszerűsítve a helyzetet, hasonló arányban fordultak elő a két populációban az egyes típusok: mind a kolinerg, mind a glutamaterg neuronok többsége II. típusú volt. Az I. típus mintegy 10%-kal gyakoribb volt a glutamaterg neuronok közt, de a III. típus ugyanennyivel ritkább.

Adataink nagy vonalakban egyeznek a korábbi tanulmányok megállapításaival. A II. típusú neuronokat tartja a leggyakoribbnak a legtöbb tanulmány valamennyi PPN neuronon belül, 52,2-75%-os aránnyal (Takakusaki és mtsai, 1996; Leonard és Llinas, 1994; Ye és mtsai, 2010). Kang és Kitai (1990) szerint viszont csupán a neuronok harmada tartozott ebbe a csoportba a PPN összes neuronját nézve. A kolinerg neuronokon belül nem találtak I-es csoportba tartozót, 82%-uk a II. és 18%-uk a III. csoportba tartozott (Takakusaki és mtsai, 1996). Egy másik tanulmány szerint 3% az I, 75% a II és 22% a III. csoportba tartozott (Leonard és Llinas, 1994). A glutamaterg neuronok megoszlását rajtunk kívül nem vizsgálták (Dautan és mtsai, 2021), a GABAerg populációról nekünk sincsen adatunk.

A korábbi elektrofiziológiai csoportosítási lehetőségek mellett a PPN kolinerg neuronok tranziens káliumárammal rendelkező alcsoportját (II-III.) a káliumáram inaktivációjának időállandója és az ezzel egyenesen arányos első AP késési idő alapján „korai” és „késői tüzelésű” neuronokra lehet osztani, akárcsak a basalis előagyi kolinerg neuronok esetében (Unal és mtsai, 2012; Bardóczi és mtsai, 2017).

A kolinerg neuronok túlnyomó része (91%) rendelkezik magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkkal. A jelenség P/Q- és N-típusú kalciumáramok és káliumáramok meglétéhez kötött, bizonyos oszcillációs aktivitások TTX-rezisztensek, mások TTX-érzékenyek (Kezunovic és mtsai, 2013; Bordás és mtsai, 2015). Hasonló membránpotenciál oszcillációk más agyterületeken is ismertek (entorhinalis cortex, neocortex, amygdala, thalamus, parabrachialis area; Llinás és mtsai, 1991; Alonso és Llinás, 1989; Pape és Driesang, 1998; Garcia-Rill és mtsai, 2013; Leonard és Llinás, 1990). Azt találtuk, hogy a PPN kolinerg neuronok egy csoportja kis amplitúdójú és nagy frekvenciájú, mások nagy amplitúdójú és kis frekvenciájú oszcillációkkal rendelkezik. Az oszcillációk frekvenciája jól korrelált a neuron tüzelési frekvenciájával. Ha az oszcillációs aktivitást CdCl<sub>2</sub>-vel gátoltuk, a

neuronok szignifikánsan növelték a tüzelési frekvenciájukat. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a membránpotenciál-oszcillációk szerepe a magasabb tüzelési frekvenciák „letiltása” lehet.

A szómáról és a proximális dendritről egyszerre elvezetett oszcillációs aktivitások azonos frekvenciája és a szómán mért jóval nagyobb amplitúdó arra utalhat, hogy az oszcillációk főleg a szómán vannak jelen, a proximális dendritre passzívan terjednek. Ez véleményem szerint ellentmond annak a kísérletes eredményekkel kellőképpen meg nem alapozott hipotézisnek, hogy az oszcillációk keletkezési helyei a distalis dendritek, ahonnan a proximális dendritek és a szóma felé terjednek (Kezunovic és mtsai, 2013; Hyde és mtsai, 2013).

Bár egyes szerzők állítják a létezését (Kezunovic és mtsai, 2013), GABAerg neuronokon semmilyen membránpotenciál-oszcillációt nem tapasztaltunk (Bordás és mtsai, 2015), glutamaterg neuronokon pedig csaknem kizárólagosan kis amplitúdójú, TTX-érzékeny, lassú nátriumáram-függő oszcillációkat figyeltünk meg (Dautan és mtsai, 2021).

A PPN membránpotenciál oszcillációi ugyanakkor az agy fiziológias működése során nem fordulhatnak elő. Létrejöttükhöz ugyanis elhúzódó (2 s hosszúságú), rámpa alakú, a neuront tartósan -30 - +10 mV felé depolarizáló impulzusok, láthatóvá tételükhöz a tüzelés gátlása szükséges. Ilyen kinetikájú és amplitúdójú depolarizációt például az excitotoxikus neuronpusztulást közvetlenül megelőző ischaemiás áramok képesek okozni (Pál, 2018), amelyek semmiképpen nem tekinthetők fiziológiasnak vagy a PPN működéséhez bárhogyan is hozzájáruló eseményeknek. A membránpotenciál-oszcillációk így akár artefaktumnak is tekinthetők. Mindazonáltal jelentőséggel bíró „artefaktumok”, hiszen bizonyos szomatikus kalcium- és káliumáramok funkcionális jelenlétéről árulkodnak.

A kolinerg és nem-kolinerg neuronok membránsajátságai között általunk talált legélesebb különbség az M-áram megléte a kolinerg neuronokon és annak hiánya a GABAerg és glutamaterg populációkon. Az M-áram –ahogy az a neuronális M-áram más struktúrákat vizsgáló leírásaiból ismert –a tüzelési frekvencia adaptációt (azaz az egy akcióspotenciál-sorozaton belüli frekvenciaesökkenést) fokozza (Delmas és Brown, 2005; Brown és Passmore, 2009; Nigro és mtsai, 2014), a közepes utóhiperpolarizáció amplitúdóját növeli és a tüzelési frekvenciát csökkenti (Koyama és Appel, 2006; Tzingounis és Nicoll, 2008; Tzingounis és mtsai, 2010). Ezek a jelenségek nemcsak a PPN kolinerg neuronjain, hanem az MR és DR szerotonerg neuronjain is látható volt.

Számos elektrofiziológiai paraméter, mint az elektrofiziológiai sejtípusok és az azokat meghatározó kalciumtűskék és az A-áram, valamint az oszcillációk paraméterei egy meghatározott topográfiai mintát követ a PPN-ben.

A caudalis pars compacta fő sejtípusa, a II. csoport 70%-kal, míg a III. mindössze 8%-kal képviseltette magát. A rostralis pars dissipata területén mindkét csoport 30-30%-ban volt jelen. Az alacsony küszöbű kalciumtűskék a rostralis PPN –re jellemzőek inkább, a késői tüzelésű, lassú kinetikájú tranziens káliumáramok a caudalis területre.

A magas küszöbű membránpotenciál oszcillációk amplitúdója kisebb, frekvenciája nagyobb (a  $\beta$  frekvenciasávban, 23 Hz körüli) a caudalis pars compacta neuronokon, míg a rostralis pars dissipata területén az amplitúdó nagy és a frekvencia kisebb (az  $\alpha$  frekvenciasávban, 12 Hz körül).

A DR és MR szerotonerg neuronjain az M-áram jelenléte ugyancsak topográfiai eloszlást követett. A DR-ben az M-árammal rendelkező neuronok rostralisabban, az MR-ben dorsalisabban helyezkedtek el.

Az egyes elektrofiziológiai paraméterek topográfiai eloszlása kutatástechnikai, fiziológiai és patofiziológiai jelentőséggel bír. A PPN caudalis része a VTA-ba és a dorsomedialis striatumba, míg a rostralis rész a substantia nigra pars compactába és a dorsolateralis striatumba küld rostokat (Mena-Segovia és Bolam, 2017; Dautan és mtsai, 2014; 2016). A mag rostralis területe a mozgásszabályozásban (Alderson és mtsai, 2008; Mena-Segovia, 2016), míg a caudalis régiók a tanulásban és figyelemben töltenek be szerepet (Inglis és mtsai, 2001; Wilson és mtsai, 2009). A rostralis PPN-be adott acetilkolin injekció rövidebb időn belül és nagyobb valószínűséggel váltott ki REM alvást, mint a caudalis magterületbe injektálva (Baghdoyan és mtsai, 1987). Humán vizsgálatokban a dorsalis PPN volt aktívabb, amikor az alanyok a saját mozgásukat képzelték el, és a ventralis területek, mikor tárgyakét (Karachi és mtsai, 2012).

A PPN egyes részeinek különbségei a Parkinson-kórban alkalmazott mély agyi stimulációkor is tetten érhetőek: a rostralis PPN-t stimulálva a beteg mozgási tünetei súlyosbodtak, míg a caudalis PPN stimuláció javította a mozgási tüneteket (Gut és Winn, 2015).

Összességében, a PPN egyes régióiban látható elektrofiziológiai különbségek ismerete segít az *in vivo* kísérletek tervezésében és kiértékelésében, valamint hozzájárul a PPN egyes



részeinek egymástól különböző élettani funkcióihoz és potenciálisan segíthet a PPN érintettségével járó neurológiai betegségek kezelésében.

Az M-áramot és így a neuronális ingerlékenységet és tüzelési mintázatot a szerotonin az 5HT<sub>2C</sub> receptoron keresztül képes modulálni (Roepke és mtsai, 2012), így az M-áram része lehet a raphe magvak szerotoninergerg autoregulációs mechanizmusainak. Mivel a DR rostralis része a mozgással összefüggő stressz toleranciában kap szerepet (Greenwood és mtsai, 2003), az MR pedig a krónikus pszichoszociális stresszhez történő adaptációban (Graeff és mtsai, 1996), az M-áram neuromodulációs szabályozása a stressz adaptációval függhet össze. Az M-áram ennek megfelelően az anxiolitikus terápia potenciális célpontja lehet (Zhao és mtsai, 2017).

#### *6.1.2.2. A KCNQ4 alegység lehetséges szerepe az agytörzsi neuromodulációban*

A KCNQ4 alegységről ismert, hogy a központi idegrendszeren belül egyes szenzoros magvakban (nucleus principalis és spinalis nervi trigemini, agytörzsi hallópálya magvai) és a RAS egyes elemeiben (raphe magvak, VTA) fordul elő (Kharkovets és mtsai, 2000). Ennek az alegységnek az élettani és kórélettani szerepét a korábbi, M-áramot és kolinerg neuromodulációt vizsgáló kutatásaink folytatásaként kezdtük el vizsgálni. Mivel a PPN a középagyban fontos kolinerg bemenetet biztosít számos más agytörzsi, KCNQ4 pozitív struktúra számára (mint a raphe magvak és az agytörzsi hallópálya számos eleme a DCN-től a colliculus inferiorig; Garcia-Rill, 1991; Mena-Segovia és Bolam, 2017), és előkísérletes adataink alapján ez a struktúra is KCNQ4 pozitív, vizsgálataink erre a magra irányultak. A PPN továbbá nemcsak küld kolinerg rostokat, hanem kolinocéptív terület is. A lokális kolinerg kollaterálisokon túl az ellenoldali PPN és a szomszédos kolinerg LDT is ide projiciál (Honda és Semba, 1995; Mena-Segovia és mtsai, 2008).

Az LDT szelektív optogenetikai stimulációjával lehetséges volt a PPN kolinerg neuronok M-áramát gátolni, tehát a kolinerg bemeneteknek az elektrofiziológiai paramétereket érintő, valódi funkcionális szerepe volt a mag működésében (Bayasgalan és mtsai, 2021). Ez a szerep a PPN neuronális tüzelés kolinerg hatásra bekövetkező deszinkronizációja, ami a kortikális deszinkronizációval párhuzamosan történik meg (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Boucetta és mtsai, 2014; Petzold és mtsai, 2015). A PPN kolinerg hatásra bekövetkező deszinkronizációja része a kolinerg autoregulációs mechanizmusoknak, ami az egymással összeköttetésben levő kolinerg magvak működésének összehangolását szolgálhatja.

A KCNQ4 alegység PPN-ben betöltött szerepének kutatása két kollaborációra alapult. A KCNQ4 knockout egértörzset a törzset generáló laboratórium vezetője, Thomas Jentsch (FMP/MDC, Berlin, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre. A munkában közreműködött Guillermo Spitzmaul és a laboratóriumába tartozó munkatársai (Leonardo Dionisio, Sofia Stupniki; Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina), akik qPCR-ral és immunhisztokémiával járultak hozzá a kísérletsorozathoz.

Argentín kollaborációs partnereink kimutatták a KCNQ3, -4 és -5 alegységek jelenlétét a vad típusú állatok PPN-jében. A KCNQ4 knockout állatokon nem az egyetlen eltérés volt a KCNQ4 hiánya, hanem a KCNQ3 mRNS mennyiségének a megemelkedése is látható volt.

Nem az összes kolinerg neuron rendelkezik KCNQ4 alegységgel, csupán egy alpopulációjuk. Különböző módszerekkel más-más arányban bizonyultak KCNQ4 pozitívnak. Immunhisztokémiai módszerrel mutatta ki kollaborációs partnerünk, hogy mindössze 9%-ukon volt jelen az alegység, míg az alegységekre szelektív nyitószerekkel ez az arány 14-27%-os volt. A különbség oka a nyitószerek nem teljes szelektivitása volt. Nem tudjuk kizárni, hogy a KCNQ2- és KCNQ4-szelektív ML213 a KCNQ5 alegységgel rendelkező csatornákat is nyitotta (Brueggemann és mtsai, 2014).

A KCNQ4 knockout és vad típusú állatok összehasonlításával a funkcionáló KCNQ4 alegységgel rendelkező neuronok arányát jóval jelentősebbnek, 62,5%-osnak becsültük. Ennek a jelentős eltérésnek az állhat a hátterében, hogy a KCNQ4 expressziójának a hiánya más KCNQ alegységek vagy egyéb ioncsatorna alegységek expresszióját, membránban helyeződését vagy funkcióját is megváltoztathatja. Ezt a feltevésünket alátámasztja, hogy az M-árammal nem rendelkező nem-kolinerg sejtek adaptációs indexe KCNQ4 knockout állatokban szignifikánsan csökkent. Ez azért lehetséges, mert más, olyan ioncsatorna alegységeket is érinthetett a KCNQ4 expresszió elvesztése, amelyek részt vesznek a tüzelési frekvencia adaptáció kialakításában (Ha és Cheong, 2017).

Az általunk a PPN-ben látottakkal összhangban, a KCNQ4 alegység a hátsógyöki ganglion neuronokon, a Merkel- és Pacini-testeken és a DR-ben is csak bizonyos sejteken és nem a teljes populáción van jelen (Heidenreich és mtsai, 2011; Zhao és mtsai, 2017).

A KCNQ4 alegység hiányának fő tünete a korrall előrehaladó, mintegy 60 dB-es halláscsökkenés. A halláscsökkenés hátterében az áll, hogy az alegység jelentős sűrűségben fordul elő a cochlearis külső szőrsejtek membránjában, így az ioncsatorna hiánya excitotoxikus sejtpusztulást okoz. Ez először a külső, majd a belső szőrsejteket is érinti, apicobasalis

különbségeket mutatva (Carignano és munkatársai, 2019). A KCNQ4 alegység domináns negatív mutációja okozza a humán DFNA2 nem-szindrómás halláscsökkenést (Kharkovets és mtsai, 2000; 2006).

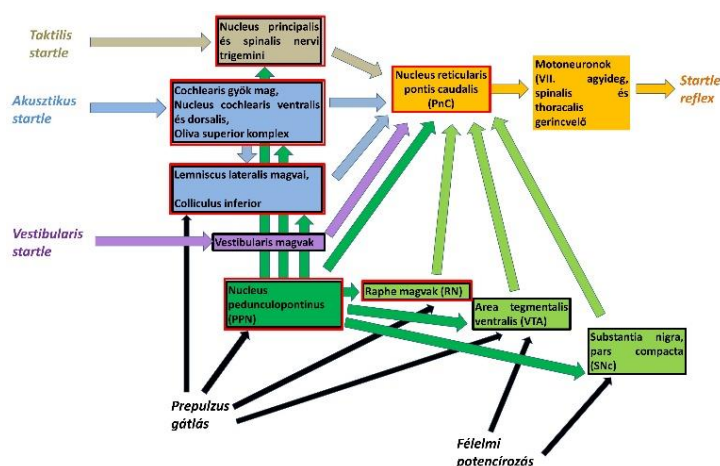
A KCNQ4 hiánya (aminek hatása nagyban hasonlít a domináns negatív mutációéra) azonban nem kizárólag halláscsökkenést okoz. Kimutatták a tapintás érzet erősödését mind egérmodellen, mind DFNA2 pácienseken (Heidenreich és mtsai, 2011). A DFNA2 szindrómás voltát erősítették az általunk végzett viselkedési tesztek eredményei is. A cirkadián ritmus külső fény-sötétség viszonyokhoz történő adaptációja az alegység hiányában zavart szenvedett. Teljes sötétségre váltva a knockout állatok aktivitással töltött ideje növekedett és nagyobb távolságokat tettek meg. Ennek a változásnak a háttérben kevésbé állt a hallás és a tapintás megváltozása, hiszen azokat a külső fényviszonyok változása kevésbé érinti. Feltételezhetjük, hogy sokkal inkább a RAS KCNQ4 pozitivitással rendelkező magjai voltak érintettek, amelyek mind az aktivitási ciklusok, mind a mozgás szabályozásában részt vesznek. Ilyen magvak a PPN, a raphe magvak és a VTA (Monti, 2011; Mena-Segovia és Bolam, 2017; Zhao és mtsai, 2017; MacLaren és mtsai, 2018; McGuier és mtsai, 2018; Jing és mtsai, 2019; Su és mtsai, 2019).

A jellegzetes agytörzsi, szenzoros struktúrákhoz és RAS magvakhoz kötött KCNQ4 expresszió már az első leírókban felvetette annak lehetőségét, hogy a KCNQ4 expressziós mintázat és a startle reflex között lehet összefüggés (50. ábra; Koch, 1999; Kharkovets és mtsai, 2000). A startle reflex egy erős és potenciálisan ártalmas ingerekre bekövetkező hirtelen motoros válasz. Rágcsálók esetében akusztikus, taktilis és vestibularis startle létezik, ami főemlősöknél optikai, halaknál olfaktórius startle reflexekkel is kiegészül (Koch, 1999; Zhang és mtsai, 2022a). A reflex és modulációja számos neurológiai betegségben érintett. A skizofrénia egyik endofenotípusa a startle reflex prepulzus gátlásának a csökkenése (Zhang és mtsai, 2022a). A progresszív szupranukleáris parézis a startle reflex deficitjével jár (MacLaren és mtsai, 2018). Változatos okokból kialakuló kis mértékű cochlea károsodás a reflex fokozódásával, míg nagy mértékű cochlea sérülés annak csökkenésével vagy eltűnésével jár (Zhang és mtsai, 2022b; Xiong és mtsai, 2017; Salloum és mtsai, 2014; Chen és mtsai, 2013). A hallópálya neuronjainak hiperexcitabilitása és a glicinerg gátlás kiesése hiperekplexiában a startle amplitúdót növelik (Bakker és mtsai, 2006; Dreissen, 2012; Xiong és mtsai, 2017).

Kísérleteinkkel igazoltuk azt a hipotézist, hogy a KCNQ4 alegység és a startle reflex közt van kapcsolat: a knockout egerekben a startle reflex amplitúdója jelentősen megnövekedett, és a növekedést nem érintette a reflex rövid távú habituációja. Ezzel szemben,

a tisztán az agytörzsi, startle reflexívben résztvevő magok kemogenetikai stimulációval okozott hiperexcitabilitása ugyan szintén szignifikánsan növelte a startle amplitúdót, de ez a kezdeti növekedés az erős rövid távú habituáció áldozata lett. A kétféle startle amplitúdó növekedés közti különbség háttere az lehet, hogy a knockout állatokban az agytörzsi hiperexcitabilitás egy éppen kifejlődő, kisméretű cochlea károsodással együtt jelentkezett, míg a cochlea ép volt a kemogenetikai agytörzsi stimuláció esetén. A másik lehetséges oka a különbségnek a CNO akusztikus startle reflexre naív esetekben, kemogenetikai aktuátor nélkül is kifejtett gátlása, ami az agytörzsi hiperexcitabilitás hatásait mérsékelheti (MacLaren és mtsai, 2018).

A fentiek összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy a KCNQ4 alegység elvesztése az eddig ismert tüneteken túl az aktivitási ciklusok adaptációját megzavarja és az akusztikus startle



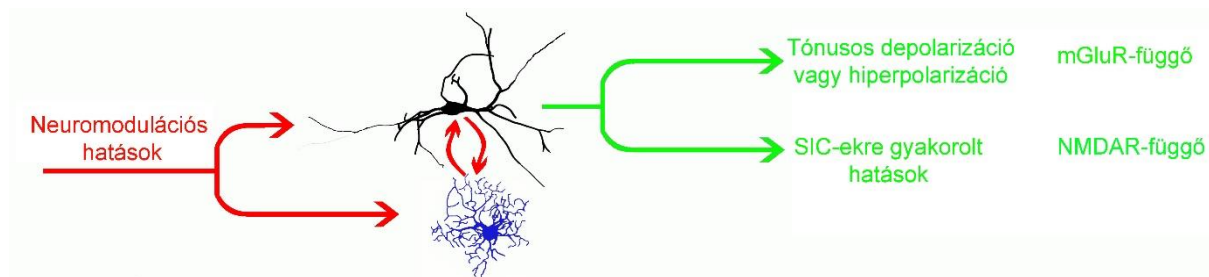
reflexet felerősíti.

**50. ábra. A startle reflexben résztvevő agytörzsi struktúrák.** Barna téglalapok és nyilak: taktilis startle; kék: akusztikus startle; lila: vestibularis startle; sárga: végső közös útvonal; zöld: startle reflex moduláció. Fekete keret: KCNQ4 pozitív struktúra, piros keret: a PnC-be juttatott retrográd terjedésű vírus által elért struktúrák.

## 6.2. Asztrocita aktiváción és az extraszinaptikus glutamát felszabaduláson keresztül érvényesülő neuromodulációs hatások

Az asztrociták a neuronális excitabilitás fontos szabályozói. Nemcsak az extracelluláris káliumkoncentrációt hivatottak beállítani káliumfelvételen keresztül, hanem az extraszinaptikus neurotranszmitter szintek alacsony szinten tartásáért felelősek (Perea és mtsai, 2009; Frank, 2013). Vizsgálatainkban az extraszinaptikus glutamát kapott kiemelkedő szerepet, amit az asztrociták (és kisebb mértékben a neuronok) EAAT1 és EAAT2 transzportereken keresztül szabályoznak, valamint vezikula exocitózissal és számos más módon (reverz módon működő glutamát transzporterek, cisztin-glutamát antiport, connexon/pannexon hemichannel, ionotróp purinerg receptor, VRAC) gliotranszmitterként felszabadítanak (Parpura és mtsai, 1994; Bezzi és mtsai, 2004; Szatkowski és mtsai, 1990; Warr és mtsai, 1999; Cotrina és mtsai, 1998; Ye és mtsai, 2003; Duan és mtsai, 2003; Rosenberg és mtsai, 1994; Pasantes Morales és Schousboe, 1988).

Az asztrocita aktiváción és az extraszinaptikus glutamátszint emelkedésén keresztül többféle neuromodulációs hatás egymással átfedő módon járul hozzá a PPN neuronok ingerlékenységének szabályozásához. Ezt a hatást jelen munkában 'gliomodulációként' emlegetjük.



51. ábra. A PPN neuromodulációs hatásainak asztrocitafüggő átfedései.

Többféle általunk vizsgált neuromodulációs hatás (kannabinoid, kolinerg, szerotoninerg és orexinerg) hasonlóan hat a PPN-re. A saját és irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy mind a neuronokra, mind az asztrocitákra közvetlenül hatnak. A neuromodulációs hatások által aktivált neuronok és asztrociták kölcsönhatásán keresztül kétféle válasz jön létre: tónusos, mGluR-on keresztüli és fázisos, extraszinaptikus NMDA receptor függő. A tónusos hatás, a mGluR típusától függően egyes sejteken depolarizáció, máshol hiperpolarizáció, a neuronok harmadik csoportján pedig válaszhiány. A fázisos hatás mindig depolarizál és függ a kiindulási SIC aktivitástól, de nem függ a neuromodulációs hatás típusától (51. ábra). A többtől részben elűt az orexinerg hatás: bár a SIC-ekre az orexin ugyanúgy hat, mint a többi neuromodulációs hatás, a tónusos membránpotenciál-változások az esetek túlnyomó többségében depolarizációt jelentenek.

### 6.2.1. A neuronális ingerlékenység asztrocitafüggő, tónusos változásai

Az általunk legrészletesebben vizsgált neuromodulációs hatás a CB1 receptoron keresztüli (endo)kannabinoid szignalizáció volt. A CB1 receptor legjobban ismert lokalizációja preszinaptikus, a serkentő és gátló szinapszisokon is előfordul (Katona és mtsai, 1999; 2006; Kreitzer és Regehr, 2001; Katona és Freund, 2012). Az asztrocitákon sejttenyészetben (Molina-Holgado és mtsai, 2003; Stella, 2004; Walter és Stella, 2003) és in situ is ismert a CB1 receptor jelenléte számos régióban, mint a nucleus accumbens, gyrus cinguli, medialis előagyai köteg, amygdala, gerincvelő és hippocampus (Rodriguez és mtsai, 2001; Moldrich és Wenger, 2000; Salio és mtsai, 2002; Navarrete és Araque, 2008; Hegyi és mtsai, 2009). A CB1 receptort

kifejező asztriciták kannabinoidokra kalciumhullámokkal reagálnak (Navarrete és Araque, 2008). A hippocampalis és a barrel cortex asztriciták CB1 receptorainak aktivációja a neuronális aktivitás következményeként felszabaduló endokannabinoidokon keresztül valósul meg. Az aktivált asztriciták glutamátot szabadítanak fel, amelyek mGluR-okon vagy NMDA receptoron keresztül hosszú távú szinaptikus plaszticitást idéznek elő (Navarrete és Araque, 2008; 2010; Castillo és mtsai, 2012; Min és Nevian, 2012; Han és mtsai, 2012; Coiret és mtsai, 2012). Az általunk megfigyelt endokannabinoid hatás hasonlóságokat mutat ezzel a megfigyeléssel, kivéve hogy a szinapszisokra gyakorolt hatás a tónusos de- és hiperpolarizáció kialakításában alárendelt szerepű. Mi a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlása mellett is megfigyeltük ugyanis a tónusos membránpotenciál-változásokat.

A tónusos membránpotenciál változások kialakításában az mGluR-oknak volt kulcsszerepe. Az I. csoportú mGluR-ok hiperpolarizációt, a II. csoportúak depolarizációt okoztak.

Morfológiai és funkcionális kísérletekből származó adatok bizonyítják az mGluR-ok közepagi jelenlétét (Wilson-Poe és mtsai, 2013; Kohlmeier és mtsai, 2013).

Az mGluR-ok preszinaptikusan, posztszinaptikusan és asztricitákon is jelen vannak (Ferraguti és Shigemoto, 2006; Niswender és Conn, 2010). Az asztrocita aktiváció során felszabadult glutamát preszinaptikus mGluR-okon hatva hosszú távú potencírozást okoz a hippocampusban (Navarrete és mtsai, 2012). Az asztricitákon is előfordulnak az I. és II. csoportú mGluR-ok (Petrália és mtsai, 1996; Schools és Kimelberg, 1999; Zur Nieden és Deitmer, 2006; D'Ascenzo és mtsai, 2007; Pirttimaki és Parri, 2012; Ferraguti és Shigemoto, 2006; Schoepp, 2001; D'Antoni és mtsai, 2008). Aktivációjukon keresztül az asztriciták képesek reagálni az extraszinaptikus glutamátszint változásaira (Zur Nieden és Deitmer, 2006), az asztriciták fokozzák kalciumhullám-aktivitásukat és további glutamátot szabadítanak fel („glutamát-indukált glutamát felszabadítás”; Bezzi és mtsai, 2004; Zur Nieden és Deitmer, 2006; Pirttimaki és mtsai, 2011; D'Ascenzo és mtsai, 2007). Más eredmények szerint ugyanakkor az mGluR gátlószerek nem változtatták meg az asztriciták kalciumhullám aktivitását (Nett és mtsai, 2002).

Számos tanulmány írta le az mGluR-ok posztszinaptikus szerepét is. Az I. csoportú mGluR aktiváció a CA1 piramissejteken és a gyrus cingulin L-típusú kalciumáram aktiváción (Libri és mtsai, 1997; Partridge és mtsai, 2014; Kato és mtsai, 2012; Zhang és Seguela, 2010) vagy a bulbus olfactorius szemcsesejteken nem szelektív kationáram aktiváción keresztül

depolarizációt okozott (Smith és mtsai, 2009). A II. csoportú mGluR aktivációja hiperpolarizál az L-típusú kalciumáram gátlásán (Chavis és mtsai, 1994; 1995) vagy káliumcsatornák aktivációján keresztül (Knoflach és Kemp, 1998; Irie és mtsai, 2006; Hermes és Renaud, 2011).

A fentiekben leírt hatások ellenkezőjét is kimutatták. Az I. csoportú mGluR5 aktivációja káliumáramokat aktiválva okozott hiperpolarizációt számos corticalis és subcorticalis struktúrában (hippocampus, amygdala, bulbus olfactorius, pallidum; Jian és mtsai, 2010; Mannaioni és mtsai, 2001; Poisik és mtsai, 2003; Rainnie és mtsai, 1994; Harata és mtsai, 1996), és a PPN szomszédjában levő másik kolinerg struktúrában, az LDT-ben (Kohlmeier és mtsai, 2013). A II. típusú mGluR aktivációja depolarizációt okozott a hippocampalis CA3 piramissejteken egy kationáram aktivációján és egy káliumáram gátlásán keresztül (Ster és mtsai, 2011).

Az általunk megfigyelt hatások az utóbb leírt posztszinaptikus mGluR hatásokra hasonlítottak. A preszinaptikus mGluR hatásokat azért zártuk ki, mert a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlása mellett is fennmaradtak a tónusos hatások. A neuronális posztszinaptikus támadáspont mellett az asztrociták mGluR-jaira gyakorolt hatást sem tudtuk teljesen kizárni. Ennek egyértelmű eldöntéséhez az mGluR-ok alcsoportjainak jelenlétét morfológiai módszerrel kell vizsgálni.

A neuronális reakció hiányát a kontroll körülmények között is fokozott kannabinoid tónussal magyaráztuk. Ez a magyarázat feltehetően túlegyszerűsíti a valóságot, mivel számos más aktivitásfüggő hatás is okozhatja.

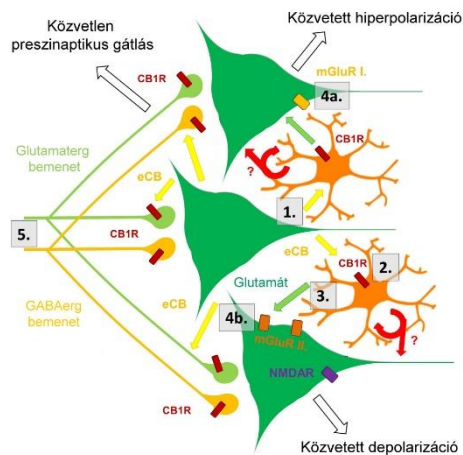
Azt, hogy tónusos membránpotenciál-változásokat asztrocita aktiváció kelti, több megfigyelés támasztja alá. Először, a thapsigarginnal előinkubált szeleteken eltűntek az asztrociták kalciumhullámai és a CB1 receptor stimulációra adott válaszok is. A thapsigargin az intracelluláris kalcium raktárak deplécióját okozza (Navarrete és Araque, 2008; 2010), ami jellemzően nagyobb hatással van az asztrocitákra, mint a neuronokra, azonban a hatásai nem szelektívek az asztrocitákra. Másodszor, az asztrocita kalciumhullámok megjelenése ACEA hatására egy időben történt vagy megelőzte a neuronális változásokat.

Mivel az előbbi két érv ugyan valószínűsíti, de nem bizonyítja az asztrociták meghatározó szerepét a neuronális excitabilitás tónusos változásaiban, a szelektív asztrocita stimuláció PPN neuronokra gyakorolt hatásait szeretnénk volna látni. Ehhez az asztrociták optogenetikai aktivációját hívtuk segítségül. Egy abban az időben újnak számító módszert használtunk: ChR2 optogenetikai aktuátort fejeztettünk ki GFAP promotor alatt (Gourine és



mtsai, 2010; Figueiredo és mtsai, 2011; Chen és mtsai, 2012; Perea és mtsai, 2014). A ChR2 egy 470 nm-es megvilágítással nyitható nem szelektív kationcsatorna,  $\text{Na}^+$ -,  $\text{H}^+$ -,  $\text{K}^+$ - és  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilitással (Ji és Wang, 2015; Gourine és mtsai, 2010; Figueiredo és mtsai, 2011; Chen és mtsai, 2013). Az asztrocita hullámokat az optogenetikai ingerlés során nemcsak a belépő kalcium által indukált intracelluláris kalciumfelszabadulás, hanem ATP felszabadulás és autokrin aktiváció hozza létre (Figueiredo és mtsai, 2011). Az optogenetikai stimuláció a gliotranszmitter felszabadulást sem kizárólag az intracelluláris kalciumszint emelkedésén, hanem a membránpotenciál depolarizációján és intracelluláris acidózis kialakulásán, valamint a sejtduzzadással aktivált VRAC csatornákon keresztül váltja ki (Abdullaev és mtsai, 2006; Kozlov és mtsai, 2006; Ji és Wang, 2015; Gourine és mtsai, 2010; Figueiredo és mtsai, 2011; Perea és mtsai, 2014; Beppu és mtsai, 2014). Az optogenetikai asztrocita aktiváció a nucleus retrotrapezoideusban, a cerebellumban és a vizuális cortexben is glutamát felszabadulást és a neuronok excitabilitásának fokozódását eredményezte (Gourine és mtsai, 2010; Figueiredo és mtsai, 2011; Sasaki és mtsai, 2012; Perea és mtsai, 2014). A mi kísérleti elrendezésünkben az asztrociták optogenetikai aktivációja mGluR-függő depolarizációt és hiperpolarizációt is váltott ki, de jóval nagyobb arányban fordult elő depolarizáció. Ennek az eltérésnek a hátterében a ChR2 nyitása után bekövetkező kálium kiáramlás és a neuronok környezetében bekövetkező extracelluláris káliumkoncentráció növekedés állhat. Az extracelluláris káliumkoncentráció növekedése neuronális depolarizációt, okozhat, torzítva az asztrocita aktiváció más hatásait (Octeau és mtsai, 2019). Ennek a torzító hatásnak ellenére a fenti eredmények alapján nagyon valószínű, hogy a megfigyelt neuronális membránpotenciál változások hátterében asztrocita aktiváció áll.

Az asztrocita aktiváció nem az egyedüli endokannabinoid hatás a PPN-ben. Akárcsak számos más szerző, mi is megfigyeltük, hogy a DSE és DSI jelensége a PPN szinaptikus kapcsolatait is érinti. Thapsigargin jelenlétében a CB1 receptor stimuláció mind a serkentő, mind a gátló neurotranszmisszió erősségét csökkentette, míg kontroll esetben a serkentő neurotranszmisszió fokozódott, a gátló neurotranszmisszió erőssége csökkent. Kontroll esetben a pre- és posztzinaptikus hatások összességét láttuk, míg thapsigarginnal csak a preszinaptikus hatást. Az asztrociták optogenetikai aktivációja a kiváltott EPSC-k paramétereit nem változtatta meg, a pre- és posztzinaptikus hatások egymástól függetlenek (52. ábra).



**52. ábra. A PPN endokannabinoid modulációjának sémás rajza.** (1) Neuronális depolarizáció. (2) Endokannabinoid (eCB) felszabadulás a környező asztrociták aktivációja. (3) Glutamát felszabadulás (vagy csökkent visszavételezés) az asztrocita aktiváció következményeként. (4a) A környező neuronok I-es csoportú mGluR-on keresztüli hiperpolarizációja. (4b) A környező neuronok II-es csoportú mGluR-on keresztüli depolarizációja. (5) A serkentő és gátló szinapszisok közvetlen preszinaptikus gátlása (DSE, DSI).

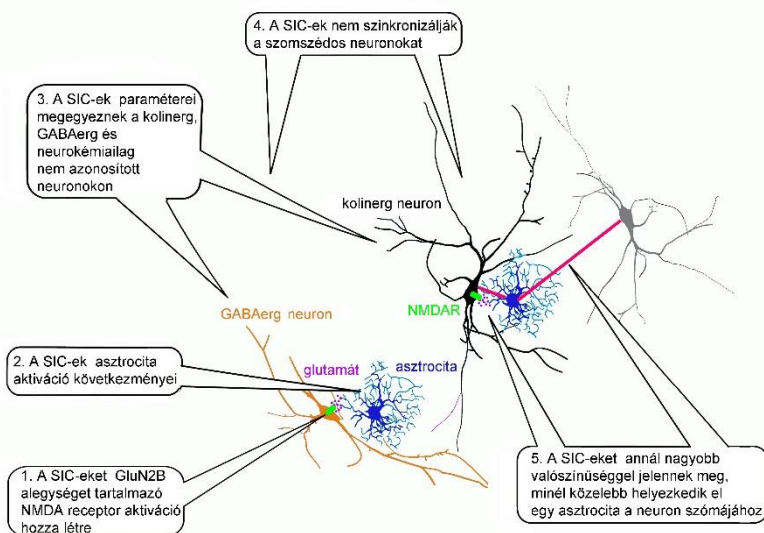
Az endokannabinoid hatáshoz hasonlóan depolarizáció, hiperpolarizáció és hatástalanság kombinációját mutatták a muszkarinos kolinerg és szerotonerg hatások. A kolinerg és endokannabinoid hatások a depolarizáció esetében teljes, a hiperpolarizáció és hatástalanság esetében részleges átfedést mutattak (Kovács és mtsai, 2015). Az orexin azonban kilógott a sorból: az irodalmi adatokkal összhangban, az esetek túlnyomó többségében depolarizációt okozott (Kovács és mtsai, 2019; Kim és mtsai, 2009; Kohlmeier és mtsai, 2008; 2013). A kolinerg és szerotonerg hatásoknál feltételezzük, hogy itt is jelen lehet egy hasonló, asztrocita- és mGluR-függő hatás, de a közvetlen neuronális hatások a kannabinoid hatásokhoz képest eltéréseket okoznak. Ezzel szemben, ha az orexinerg neuromodulációnál esetleg jelen is lehet egy hasonló asztrocitafüggő hatás, azt az erősebb közvetlen neuronális hatások eltakarják.

### 6.2.2. A SIC-ek szerepe a neuromodulációs mechanizmusokban

Több átfedést találtunk az egyes neuromodulációs hatások eredményében egy másik, asztrocita- és glutamátfüggő jelenségben, az NMDA receptor mediált tónusos befelé irányuló áramban.

A SIC-ek korábbi irodalmi adatokból ismertek számos központi idegrendszeri struktúra esetén. Ezek az események GluN2B alegységet tartalmazó neuronális extraszinaptikus NMDA receptorok aktivációjának következményei (Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Kozlov és mtsai, 2006; D'Ascenzo és mtsai, 2007; Carmignoto és Fellin, 2006; Lauderdale és mtsai, 2015; Papouin és Oliet, 2014). Ezeket a receptorokat az asztrocita aktiváció hatására felszabaduló glutamát aktiválja (Araque és mtsai, 1998; Angulo és mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; Pirttimaki és mtsai, 2011; Chen és mtsai, 2012; Perea és mtsai, 2014).

A SIC-ek a PPN neuronokról is elvezethetők, jellegzetességeiket az 53. ábrán foglaltam össze. Az általános, eddig is ismert sajátságokon túl néhány további, a struktúrára jellemző megállapítást is tettünk.



53. ábra. A PPN SIC-einek jellemzői

A SIC-ek frekvenciája és az általuk megvalósuló töltésmozgás nem függött a neurokémiai sejttípustól, de függött a legközelebbi asztrocita neuronális szómától (azaz a SIC mérési helyétől) mért távolságtól. Ez feltehetően a

szóma és azzal kapcsolatba kerülő asztrocita végtalpak száma (és a szóma közelében kialakuló extraszinaptikus glutamát koncentráció) közötti összefüggést is jelenti. A reaktív gliosis esetén ismert, hogy az asztrocita nyúlványok meghosszabbodása vagy visszahúzódása képes meghatározni a neuronális excitabilitást (Wang és Parpura, 2016).

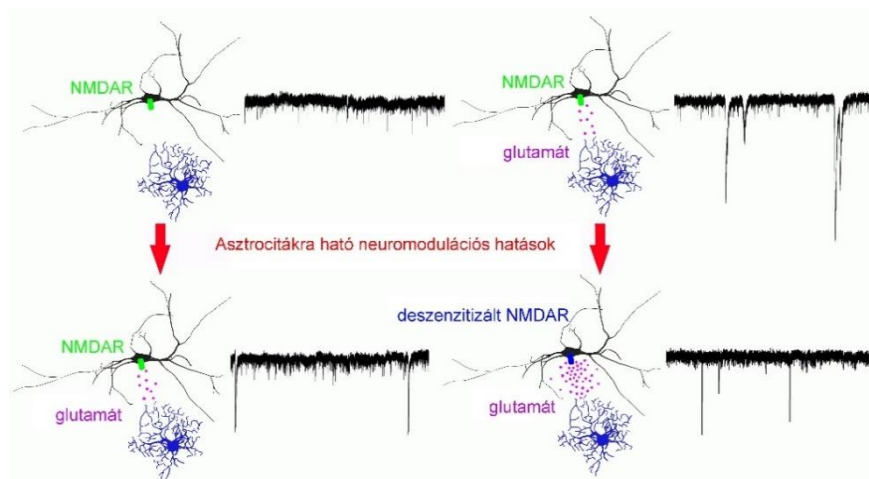
A SIC-ek amplitúdóját, kinetikai paramétereit több faktor is képes volt befolyásolni. Az asztrociták optogenetikai aktivációjával kiváltott SIC-ek szignifikánsan lassabbak voltak, mint a fiziológiához közelebbi körülmények között létrejövő SIC-ek. Ezek az események a hipoozmotikus mérőoldatban megfigyelt SIC-ekre emlékeztettek kinetikai paramétereikben. Az ilyenkor bekövetkező asztrocita duzzadás nemcsak glutamát felszabaduláshoz, hanem az extraszinaptikus tér csökkenésén keresztül a glutamát diffúzió változásaihoz is vezet (Lauderdale és mtsai, 2015).

A TTX alkalmazása a SIC amplitúdó csökkenéséhez és a decay tau megnyúlásához vezetett, de az események frekvenciája nem változott. Ennek az oka egy esetlegesen a SIC-ekre ható hálózati hatás elmaradása vagy a PPN-ben is jelen levő TTX-érzékeny perzisztens nátriumáram gátlása volt (Takakusaki és Kitai, 1997; Dautan és mtsai, 2021).

A SIC-ek egyik feltételezett szerepe az egy asztrocita doménben levő neuronok ingerlékenységének szinkronizálása. Több struktúrában ugyanis (thalamus, hippocampus, nucleus accumbens) a szomszédos neuronokon egyszerre jelentek meg SIC-ek (Angulo és

mtsai, 2004; Fellin és mtsai, 2004; D'Ascenso és mtsai, 2007; Pirttimaki és mtsai, 2011). Ahogy az MNTB neuronok esetén ugyancsak leírták (Reyes-Haro és mtsai, 2010), ilyen szinkronizációt a PPN-ben nem sikerült megfigyelni. Elképzelhető, hogy a SIC-eknek a rostralis struktúrákban és az agytörzsben eltérő szerepük lehet.

A SIC-ekre ható neuromodulációs hatások a PPN-ben egységesnek tűnnek. A kannabinoid, muszkarinos kolinerg, szerotonerg és orexinerg hatások a SIC aktivitást fokozták, ha kontroll körülmények között az alacsony volt; de gátolták, ha kontroll körülmények között magas volt. Ennek hátterében az áll, hogy az alacsony kiindulási extraszinaptikus glutamát koncentráció növekedése NMDA receptor aktivációt, míg a magas kiindulási glutamát koncentráció további növekedése NMDA receptor inaktivációt okoz (Vyklícky, 1993; 54. ábra).



54. ábra. A SIC-ekre ható neuromodulációs hatások kiindulástól függő eredményei

A neuronális ingerlékenység tónusos változásainak abszolút értékével a SIC-ekre gyakorolt kannabinoid, kolinerg és szerotoninerg hatások kis mértékű korrelációt mutattak, míg az orexinerg hatások esetén semmilyen összefüggést nem találtunk. Feltételezhető, hogy az első három hatás esetén az extraszinaptikus glutamát koncentráció növekedése mind mGluR, mind NMDA receptorokat aktivál és emellett a neuronokra gyakorolt direkt neuromodulációs hatás kisebb, míg az orexin esetén a direkt neuronális depolarizáció erősebb, mint az asztrocita-függő indirekt glutamaterg hatás (Kim és mtsai, 2009; Kohlmeier és mtsai, 2008; 2013).

### 6.2.3. A SIC-ek általános szerepei és életkorfüggése

A SIC-ek központi idegrendszeri általános jelentőségét és a jelenség életkorfüggését humán és egér temporalis és parietalis neocortex mintákon vizsgáltuk. A jelentőségén túl azért esett erre az agyterületre a választásunk, mert a műtéti szarmazó humán minták túlnyomó többsége erről az agyterületről származott.

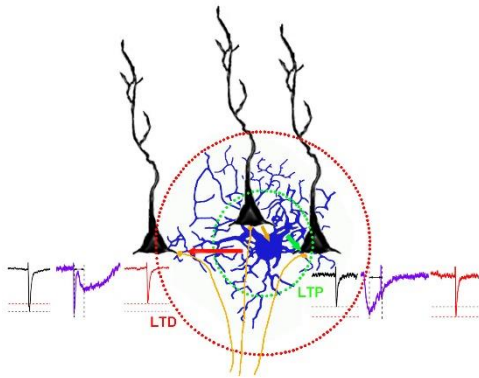
A humán neocortexben és hippocampusban egy közlemény már leírta a SIC-ek meglétét (Navarrete és mtsai, 2013). Ezt a megfigyelést mi is meg tudtuk erősíteni, valamint kiegészíteni azzal, hogy a humán SIC-ek amplitúdója kisebb, kinetikai paraméterei lassabbak és a SIC-ek általi töltésmozgás nagyobb volt, mint egéren. Ezen paraméterek eltérésének hátterében feltehetően a glutamát diffúziós útvonalának különbsége, így a koncentráció időbeli változásának az eltérései állnak (Carmignoto és Fellin, 2006; Fellin és mtsai, 2004). A humán asztrociták nyúlványai hosszabbak és több elágazódásuk van, így a diffúziós útvonalak hosszabbak (Syková, 2004; Syková és Vargová, 2008; Oberheim és mtsai, 2009; 2012). Nem tudjuk kizárni, hogy a humán SIC-ek kisebb amplitúdója a minta szállítási módjának a következménye. A hasonlóan kezelt egér mintákon ugyanis közel szignifikáns amplitúdó csökkenést láttunk a szokásos módon preparált egér agyszeletekhez képest.

A SIC-ek időzítésfüggő szerepet játszottak a szinaptikus plaszticitásban egér mintákon és feltehetően a humán minták esetében is hasonló szerepet tölthettek be. Ha a SIC a kiváltott EPSC-t megelőzte vagy azzal egy időben jelentkezett, a szinaptikus erősség fokozódott. Ha a SIC követte az EPSC-t, a szinapszis ereje gyengült.

Ez a jelenség hasonlít az időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás ('spike timing dependent plasticity', STDP) nevű jelenséghez. Ezt általában egyszerre, de egy időablakon belüli időkülönbséggel, 10-300 egymást követő esetben alkalmazott preszinaptikus stimulációval és posztszinaptikus akcióspotenciál-tüzeléssel váltják ki (Inglebert és Debanne, 2021). Fiatal rágsálók hippocampusában, ha a posztszinaptikus akciós potenciál megelőzi a preszinaptikus stimulációt, LTD jön létre; míg fordított esetben LTP-t lehet megfigyelni (Mansvelder és mtsai, 2019). Ezzel ellentétben a felnőtt humán hippocampusban ha a posztszinaptikus akciós potenciál több, mint 80 ms-mal megelőzte a preszinaptikus stimulációt, LTD alakult ki, de ennél kisebb időkülönbség esetén (ide értve az egyidejűen bekövetkező pre- és posztszinaptikus ingerlést) LTP jött létre (Testa-Silva és mtsai, 2010). A humán temporalis cortexben a fiatal rágsálók hippocampusában látott helyzet ellentéte jelent meg: ha a posztszinaptikus akciós potenciál jelentkezett először, LTP jött létre, de ha a preszinaptikus stimuláció volt először, akkor LTD-t lehetett megfigyelni (Verhoog és mtsai, 2013; Mansvelder és mtsai, 2019).

Korábban is ismert volt az asztrociták hozzájárulása a hosszú távú szinaptikus plaszticitáshoz. Az asztrociták egyes szerzők szerint modulálják azt (Martinez-Gallego és mtsai, 2022), mások kutatásai alapján az asztrocita aktivitás egymagában is ki tud LTP-t váltani (Adamsky és mtsai, 2018). A mi eredményeink ehhez képest abban számítanak újnak, hogy az asztrociták aktivitása által kiváltott neuronális depolarizáció mint elektromos jelenség is képes

önmagában hosszú távú szinaptikus plaszticitást kiváltani, az asztrocita aktiváció egyéb hatásai (pl. más gliotranszmitterek felszabadítása, ionkoncentráció változások, extraszinaptikus tér térfogatának változásai) nélkül is.



55. ábra. A SIC-ek időzítésfüggő szinaptikus plaszticitást keltő szerepe.

Feltételezéseink szerint az asztrociták által létrehozott időzítésfüggő szinaptikus plaszticitás az egy asztrocita doménon belüli szinapszisok erejét képes azok pozíciója szerint különbözően befolyásolni (55. ábra). Ha egy neuront aktivál egy serkentő bemenet, az a közeli asztrocita aktivációjához vezet (55. ábra; sárga nyíl; Kőszeghy és mtsai, 2015). Az asztrocita glutamátot szabadít fel, ami a környező neuronok extraszinaptikus NMDA receptorait a diffúziós útvonaltól függően aktiválja és kisebb vagy nagyobb késéssel SIC-eket hoz rajtuk létre (55. ábra; zöld és piros nyíl). Ha eközben egy bemenet több serkentő szinapszisa stimulálja ezeket a neuronokat, a neuron asztrocita doménon belül elfoglalt helye szerint LTP vagy LTD jön létre.

Az asztrociták számos morfológiai és funkcionális paraméterét érinti az öregedés. Idős rágcsálókban az asztrocita nyúlványok arborizációja és a végnyúlványok térfogata csökken (Robillard és mtsai, 2016; Popov és mtsai, 2021). A kalciumhullámokat produkáló asztrociták száma és metabotróp receptorokra adott válaszaik is csökkentek az életkorral; különös tekintettel az mGluR5 stimulációra adott gyengébb válaszra (Lalo és mtsai, 2011; 2018; Gomez-Gonzalo és mtsai, 2017). A kontroll körülmények között mért SIC frekvencia nem változott az életkor előrehaladtával az egér mintákon, de az I. csoportú mGluR stimulációra kisebb SIC frekvencianövekedés volt látható (Gomez-Gonzalo és mtsai, 2017).

Az irodalommal összhangban, egér mintákon nem láttunk változást az egyedi SIC-ek paramétereiben. A SIC frekvencia az állat életkorával ugyan csökkenést mutatott, de az 1 év feletti egereknél sem tűnt el a SIC aktivitás. Ezzel szemben, a humán egyedi SIC-ek általi töltésmozgás és a SIC frekvencia is erős csökkenést mutatott az életkorral, és 70 éves korra teljesen eltűnt. Ha a SIC-eket a szinaptikus plaszticitás fiziológias szabályozó mechanizmusának tekintjük, az időskori kognitív hanyatlás hátterében állhat ez a jelenség. Nagyobb frekvenciában a SIC-ek patológiás körülmények között fordulnak elő. Ha a SIC

aktivitás az életkorral csökken, ez magyarázhatja azt a megfigyelést, hogy a cortex kúszó depolarizáció általi sebezhetősége az életkorral csökken (Hertelendy és mtsai, 2019).

Az öregedés különbözően érinti a humán és egér cortexben a SIC-ek hatását a szinaptikus plaszticitásra. Egérben az öregedés a SIC-eknek a szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatását érinti, míg emberben az öregedés főleg magukat a SIC-eket érinti.

Összefoglalva a fentieket, a SIC-ek lehetnek az egy asztrocita doménon belüli szinapszisok erősségének szabályozói fiziológias körülmények között. A patológiás körülmények között nagy frekvenciával és amplitúdóval jelentkező SIC-ek a szinaptikus erősséget fokozhatják vagy véletlenszerűbbé tehetik, hozzájárulva az excitotoxicitáshoz, kérgi kúszó depolarizációhoz.

### 6.3. További tudományos tervek

A fenti, neuromodulációs hatások közös, asztrocitafüggő komponensét célzó kutatást *in vivo* kísérletekkel szeretném folytatni. Agyszeteleten kimutattunk egy jellegzetes asztrocita aktiváció által kiváltott neuronális aktivitási mintázatot, ami lehet egy nagy szereppel bíró szabályozó mechanizmus, de lehet akár a szinaptikus kapcsolataitól megfosztott szeletpreparátum által felnagyított jelenség is. Ennek tisztázására *in vivo* opto-és kemogenetikai asztrocita aktivációt kombinálunk viselkedési tesztekkel. Az erre irányuló kísérletek jelenleg folyamatban vannak, és valószínűsítik, hogy az asztrocita aktiváció a PPN-ben érinti a cirkadián szabályozást és a szenzoros kapuzást.

Metodikailag szeretnék az asztrociták többé-kevésbé szelektív gátlása vagy aktivációja irányából azok aktivitásának a megfigyelése felé elmozdulni, ugyanis még a legszelektívebbnek gondolt asztrocita aktiváció (pl. opto- és kemogenetika) is hagy kétséget az aktiváció szelektív és fiziológiához hasonlító volta felé. Az asztrocita működés szelektív megfigyelését genetikailag kódolt kalcium- és gliotranszmitter indikátorok, és *in vivo* fluoreszcens mikroszkópia használatával tervezem elérni.

A laboratórium kutatási témáinak hosszú távú irányát a fiziológias jelenségek leírásától szeretném az egyes konkrét neurológiai betegségek (mint a progresszív szupranukleáris parézis) kórélettani hátterének és terápiás lehetőségeinek a megismerése felé vinni.



## 7. A főbb megállapítások összegzése

1. A kalciumaktivált kloridcsatornák nélkülözhetők a szaglópálya neuronok aktivációjában (*Billig és mtsai, 2011*).
2. A muszkarinos kolinerg neuromoduláció a hallópálya több szintjén fejt ki összetett, pre- és posztszinaptikus hatásokat. A posztszinaptikus hatások egy részéért az M-áram a felelős (*Pál és mtsai, 2009; nem közölt adatok*).
3. Az M-áram a muszkarinos kolinerg neuromodulációs hatások egyik fontos közvetítője a PPN-ben. Az M-áram jelenléte a kolinerg neuronok funkcionális markere, ami hatékonyan modulálja azok tüzelési sajátságait, a szomszédos neuronok szinkronizációját. A bizonyos agytörzsi magvakban megtalálható KCNQ4 alegység deléciója más ioncsatorna fehérjék jelenlétében és funkciójában, membránsajátságokban, a cirkadián ritmus szabályozásában és a startle reflexben okoz változásokat (*Bordás és mtsai, 2015; Bayasgalan és mtsai, 2021a; Maamrah és mtsai, 2023*).
4. Az M-áram az MR és DR szerotonerg neuronok között is alcsoportokat határoz meg; azok topográfiaileg elkülönülnek az M-árammal nem rendelkező szerotonerg neuronoktól (*Bayasgalan és mtsai, 2021b*).
5. A PPN-en érvényesülő neuromodulációs hatások háttérének egy részében asztrocita-aktiváció áll. Az asztrocita-aktiváció tónusos excitabilitás-változásokat és fázisos aktivációt okoz. A tónusos hatások többféle neuromodulációs mechanizmus esetén nagy átfedéseket mutatnak, a fázisos aktiváció változása a neuromodulációs hatás előtt jelen lévő fázisos aktiváció mértékétől függ. A neuromodulációs hatások asztrocita-függő komponense a hatásoktól függetlenül átfed (*Kőszeghy és mtsai, 2015; Kovács és mtsai, 2015; 2017; Kovács és Pál, 2017; Kovács és mtsai, 2019*).
6. A fázisos asztrocita-függő aktiváció tanulási folyamatokban játszik szerepet, az életkorral csökken az amplitúdója, 70 év felett eltűnik (*Csemer és mtsai, 2023-bírálat alatt*).

**A disszertáció alapjául szolgáló publikációk***(Az MTMT nyilvános keresői felülete alapján)*

*Közlemények száma: 15 (ebből bíráló alatti: 1, D1: 5, Q1: 6; Q3: 3) Független hivatkozások száma: 379.*

*Utolsó szerzős közlemények száma: 11 (ebből bíráló alatti: 1, D1: 3, Q1: 4; Q3: 3) Független hivatkozások száma: 64.*

*Első/egyetlen szerzős közlemények száma: 3 (ebből D1: 1, Q1: 2) Független hivatkozások száma: 122.*

*Társ szerzős közlemények száma: 1 (ebből D1: 1) Független hivatkozások száma: 193.*

Csemer A, Kovács A, Maamrah B, Pocsai K, Korpás K, Klekner Á, Szücs P, Nánási PP, Pál B (2023) Astrocyte- and NMDA receptor-dependent slow inward currents differently contribute to synaptic plasticity in an age dependent manner in mouse and human neocortex. Under revision in Aging Cell.

Maamrah B, Pocsai K, Bayasgalan T, Csemer A, Pál B (2023) KCNQ4 potassium channel subunit deletion leads to exaggerated acoustic startle reflex in mice. Neuroreport 34(4): 232-237. Q3

Bayasgalan T, Stupniki S, Kovács A, Csemer A, Szentesi P, Pocsai K, Dionisio L, Spitzmaul G, Pál B. (2021) Alteration of mesopontine cholinergic function by the lack of KCNQ4 subunit. Frontiers in Cellular Neurosci. 15: 707789. Q1, összes idéző: 1; független idéző: 1

Bayasgalan T, Csemer A, Kovács A, Pocsai K, Pál B (2021) Topographical organization of M-current on dorsal and median raphe serotonergic neurons. Frontiers in Cellular Neurosci. 15: 614947. Q1, összes idéző: 1; független idéző: 1

Baksa B, Kovács A, Bayasgalan T, Szentesi P, Kőszeghy Á, Szücs P, Pál B (2019) Characterization of functional subgroups among genetically identified cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus. Cell Mol Life Sci. 76(14): 2799-2815. D1, összes idéző: 8; független idéző: 4

Kovács A; Baksa B; Bayasgalan T; Szentesi P; Csemer A; Pál B (2019) Orexinergic actions modify occurrence of slow inward currents on neurons in the pedunculopontine nucleus. Neuroreport 30(14): 933-938. Q3

Pál B (2018) Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. Cell Mol Life Sci. 75(16): 2917-2949. D1, összes idéző: 91; független idéző: 91

Kovács A, Pál B (2017) Astrocyte-dependent slow inward currents (SICs) participate in neuromodulatory mechanisms in the pedunculopontine nucleus (PPN). Frontiers in Cellular Neuroscience 11(16): 1-16. Q1, összes idéző: 19; független idéző: 16

Kovács A, Bordás Cs, Bíró T, Hegyi Z, Antal M, Szűcs P, Pál B (2017) Direct presynaptic and indirect astrocyte-mediated mechanisms both contribute to endocannabinoid signaling in the pedunculo pontine nucleus of mice. *Brain Structure Function* 222(1): 247-266. *DI, összes idéző: 16; független idéző: 12*

Bordas C, Kovacs A, Pal B (2015) The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell type-specific way in the pedunculo pontine nucleus of mice. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 9: 121; 92015. *Q1, összes idéző: 19; független idéző: 14*

Kovács A, Bordás C, Pál B (2015) Cholinergic and endocannabinoid neuromodulatory effects overlap on neurons of the pedunculo pontine nucleus of mice. *Neuroreport* 26(5): 273-278. *Q3, összes idéző: 7; független idéző: 4*

Kőszeghy Á, Kovács A, Bíró T, Szűcs P, Vince J, Hegyi Z, Antal M, Pál B (2015) Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunculo pontine nucleus (PPN) via astrocytes. *Brain Structure Function* 220(5): 3023-3041. *DI, összes idéző: 21; független idéző: 12*

Pál B (2015) Astrocytic actions on extrasynaptic neuronal currents. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 9: 474. *Q1, összes idéző: 26; független idéző: 24*

Billig G, Pál B, Fidzinski P, Jentsch T (2011) Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents are dispensable for olfaction. *Nat. Neurosci.* 14 (6), 763-769. *DI, összes idéző: 195; független idéző: 193*

Pál B., Kőszeghy Á., Pap P., Bakondi G., Pocsai K., Szűcs G., Rusznák Z. (2009) Targets, receptors and effects of muscarinic neuromodulation on giant neurones of the rat dorsal cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 30 (5), 769-782. *Q1, összes idéző: 10; független idéző: 7*

**A jelölt tudományos publikációi***(Az MTMT nyilvános keresői felülete alapján)*

*Közlemények száma: 41 (ebből D1: 14, Q1: 13; Q2: 7; Q3: 3; Q4: 1; nem besorolható: 3)  
Független hivatkozások száma: 936.*

*Utolsó szerzős közlemények száma: 10 (ebből D1: 3, Q1: 4; Q3: 3) Független hivatkozások száma: 92.*

*Első/egyetlen szerzős közlemények száma: 7 (ebből D1: 3, Q1: 2; Q2:1; Q4: 1) Független hivatkozások száma: 162*

*Társszerzős közlemények száma: 24 (ebből D1: 8, Q1: 7; Q2:6; nem besorolható: 3)  
Független hivatkozások száma: 682*

Maamrah B, Pocsai K, Bayasgalan T, Csemer A, Pál B (2023) KCNQ4 potassium channel subunit deletion leads to exaggerated acoustic startle reflex in mice. *Neuroreport* 34(4): 232-237. *Q3*

Gönczi M, Csemer A, Szabó L, Sztretye M, Fodor J, Pocsai K, Szenthe K, Keller-Pintér A, Köhler ZM, Nánási P, Szentandrassy N, Pál B, Csernoch L (2022) Astaxanthin exerts anabolic effects via pleiotropic modulation of the excitable tissue. *Int.J. Mol.Sci-* 23(2):917. *Q1*

Bayasgalan T, Stupniki S, Kovács A, Csemer A, Szentesi P, Pocsai K, Dionisio L, Spitzmaul G, Pál B. (2021) Alteration of mesopontine cholinergic function by the lack of KCNQ4 subunit. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 15: 707789. *Q1, összes idéző: 1; független idéző: 1*

Bayasgalan T, Csemer A, Kovacs A, Pocsai K, Pal B (2021) Topographical organization of M-current on dorsal and median raphe serotonergic neurons. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 15: 614947. *Q1, összes idéző: 1; független idéző: 1*

Dautan D, Kovacs A, Bayasgalan T, Diaz-Acevedo MA, Pal B, Mena-Segovia J (2021) Modulation of motor behavior by the mesencephalic locomotor region. *Cell Reports* 36(8): 109594. *D1, összes idéző: 21; független idéző: 21*

Baksa B, Kovács A, Bayasgalan T, Szentesi P, Kőszeghy Á, Szücs P, Pál B (2019) Characterization of functional subgroups among genetically identified cholinergic neurons in the pedunculo-pontine nucleus. *Cell Mol Life Sci.* 76(14): 2799-2815. *D1, összes idéző: 8; független idéző: 4*

Kovács A; Baksa B; Bayasgalan T; Szentesi P; Csemer A; Pál B (2019) Orexinergic actions modify occurrence of slow inward currents on neurons in the pedunculo-pontine nucleus. *Neuroreport* 30(14): 933-938. *Q3*

Pal B (2019) Response to "Concerns regarding Baksa et al., *Cell Molec. Life Sci.*, 2019." by Edgar Garcia-Rill and Francisco J. Urbano (CMLS-D-18-0156R1) *Cell Mol Life Sci* 76(23): 4583-4587. *D1*

Hegy Z, Oláh T, Kőszeghy Á, Piscitelli F, Holló K, Pál B, Csernoch L, Di Marzo V, Antal M (2018) CB1 receptor activation induces intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes. *Sci Reports* 8: 10562. *DI, összes idéző: 37; független idéző: 35*

Pál B (2018) Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cell Mol Life Sci.* 75(16): 2917-2949. *DI, összes idéző: 91; független idéző: 91*

Bardóczi Z, Pál B, Kőszeghy Á, Wilhelm T, Watanabe M, Záborszky L, Liposits Z, Kalló I (2017) Glycinergic input to the mouse basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci.* 37(39): 9534-9549. *DI, összes idéző: 7; független idéző: 6*

Gonczi M, Nagy D, Bai P, Pál B, Kis G, Antal M, Csernoch L (2017) Role of TASK-3 channels in the mitochondria of melanoma cells. *Acta Physiologica* 221(S713): 130-131.

Kovács A, Pál B (2017) Astrocyte-dependent slow inward currents (SICs) participate in neuromodulatory mechanisms in the pedunclopontine nucleus (PPN). *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11(16): 1-16. *Q1, összes idéző: 19; független idéző: 16*

Kovács A, Bordás Cs, Bíró T, Hegyi Z, Antal M, Szűcs P, Pál B (2017) Direct presynaptic and indirect astrocyte-mediated mechanisms both contribute to endocannabinoid signaling in the pedunclopontine nucleus of mice. *Brain Structure Function* 222(1): 247-266. *DI, összes idéző: 16; független idéző: 12*

Malina T, Krecsák L, Westerström A, Szemán-Nagy G, Gyémánt Gy, M-Hamvas M, Rowang E, L Harvey A, Warrell D, Pál B, Rusznák Z, Vasas G (2017) Individual variability of venom from the European adder (*Vipera berus berus*) from one locality in Eastern Hungary. *Toxicon* 135: 59-70. *Q2, összes idéző: 20; független idéző: 19*

Bordas C, Kovacs A, Pal B (2015) The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell type-specific way in the pedunclopontine nucleus of mice. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 9: 121; 92015. *Q1, összes idéző: 19; független idéző: 14*

Kovács A, Bordás C, Pál B (2015) Cholinergic and endocannabinoid neuromodulatory effects overlap on neurons of the pedunclopontine nucleus of mice. *Neuroreport* 26(5): 273-278. *Q3, összes idéző: 7; független idéző: 4*

Kőszeghy Á, Kovács A, Bíró T, Szűcs P, Vince J, Hegyi Z, Antal M, Pál B (2015) Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunclopontine nucleus (PPN) via astrocytes. *Brain Structure Function* 220(5): 3023-3041. *DI, összes idéző: 21; független idéző: 12*

Pál B (2015) Astrocytic actions on extrasynaptic neuronal currents. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 9: 474. *Q1, összes idéző: 26; független idéző: 24*

Petzold A, Valencia M, Pal B, Mena-Segovia, J (2015) Decoding brain state transitions in the pedunclopontine nucleus: cooperative phasic and tonic mechanisms. *Frontiers in Neural Circuits* 9:68. *Q1, összes idéző: 29; független idéző: 23*

Olah A, Toth BI, Borbiri I, Sugawara K, Szollosi AG, Czifra G, Pal B, Ambrus L, Kloepper J, Camera E, Ludovici M, Picardo M, Voets T, Zouboulis CC, Paus R, Bíró T (2014) Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest* 124(9): 3713-3724. *D1, összes idéző: 157; független idéző: 127*

Rusznak Z, Pal B, Koszeghy A, Fu Y, Szucs G, Paxinos G (2013) The hyperpolarization-activated non-specific cation current (I<sub>h</sub>) adjusts the membrane properties, excitability, and activity pattern of the giant cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *Eur J Neurosci.* 37(6): 876-890. *Q1, összes idéző: 10; független idéző: 10*

Szabo L, Szentandrassy N, Kistamas K, Hegyi B, Ruzsnavszky F, Vaczi K, Horvath B, Magyar J, Banyasz T, Pal B, Nánási P (2013) Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386(3): 239-246. *Q1, összes idéző: 6; független idéző: 3*

Bányász T, Bíró T, Cseri J, Csernoch L, Fodor J, Jóna I, Lukács B, Magyar J, Nánási PP, Pál B, Rusznák Z, Szentesi P, Szigeti G, Szűcs G (2012) *Physiological practice: A laboratory guide* Debrecen, Debrecen University Press

Lontay B, Pál B, Serfőző Z, Kőszeghy Á, Szűcs G, Rusznák Z, Erdódi F (2012) Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *J. Neurochem.* 123 (1), 84-99. *Q1, összes idéző: 11; független idéző: 5*

Billig G, Pál B, Fidzinski P, Jentsch T (2011) Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents are dispensable for olfaction. *Nat. Neurosci.* 14 (6), 763-769. *D1, összes idéző: 195; független idéző: 193*

Szabó L, Rusznák Z, Szűcs G, Asztalos L, Pál B (2010) Effect of tacrolimus on the excitatory synaptic transmission between the parallel fibers and pyramidal cells in the rat dorsal cochlear nucleus. *Transplant. Proc.* 42 (6), 2339-2343. *Q2, összes idéző: 2; független idéző: 2*

Kőszeghy Á, Pál B, Pap P, Pocsai K, Nagy Z, Szűcs G, Rusznák Z (2009) Purkinje-like cells of the rat cochlear nucleus: a combined functional and morphological study. *Brain Res.* 1297 57-69. *Q2, összes idéző: 6; független idéző: 5*

Pál B, Kőszeghy Á, Pap P, Bakondi G, Pocsai K, Szűcs G, Rusznák Z (2009) Targets, receptors and effects of muscarinic neuromodulation on giant neurons of the rat dorsal cochlear nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 30 (5), 769-782. *Q1, összes idéző: 10; független idéző: 7*

Elfant D, Pál B, Emptage N, Capogna M (2008) Specific inhibitory synapses shift the balance from feedforward to feedback inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 27 (1), 104-113. *Q1, összes idéző: 71; független idéző: 67*

Rusznák Z, Bakondi G, Pocsai K, Pór Á, Kosztka L, Pál B, Nagy D, Szűcs G.(2008) Voltage-gated potassium channel (Kv) subunits expressed in the rat cochlear nucleus. *J. Histochem. Cytochem.* 56 (5), 443-465. *D1, összes idéző: 27; független idéző: 24*

Pocsai K, Pál B, Pap P, Bakondi G, Kosztka L, Rusznák Z, Szűcs G. (2007) Rhodamine backfilling and confocal microscopy as a tool for the unambiguous identification of neuronal cell types: a study of the neurons of the rat cochlear nucleus. *Brain Res. Bull.* 71 (5), 529-539. *Q2, összes idéző: 13; független idéző: 7*

Szappanos H, Szigeti G, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi É, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter É, Pócsi I, Hagen S, Meyer V, Csernoch L (2006) The antifungal protein AFP secreted by *Aspergillus giganteus* does not cause detrimental effects on certain mammalian cells. *Peptides.* 27 (7), 1717-1725. *Q2, összes idéző: 46; független idéző: 38*

Kecskeméti V, Rusznák Z, Riba P, Pál B, Wagner R, Harasztosi C, Nánási P, Szűcs G.(2005) Norfloxetine and fluoxetine have similar anticonvulsant and Ca channel blocking potencies. *Brain Res. Bull.* 67 (1-2), 126-132. *Q2, összes idéző: 37; független idéző: 36*

Pál B, Pór Á, Pocsai K, Szűcs G, Rusznák Z. (2005) Voltage-gated and background K<sup>+</sup> channel subunits expressed by the bushy cells of the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 199 (1-2), 57-70. *Q2, összes idéző: 21; független idéző: 16*

Price C, Karayannis T, Pál B, Capogna M. (2005) Group II and III mGluRs-mediated presynaptic inhibition of EPSCs recorded from hippocampal interneurons of CA1 stratum lacunosum moleculare. *Neuropharmacology.* 49 (Suppl.1.), 45-56. *D1, összes idéző: 31; független idéző: 31*

Rusznák Z, Pocsai K, Pál B, Pap P, Csernoch L, Szűcs G. (2005) Time-dependent changes of the TASK-3 channel expression pattern of melanoma cells maintained in tissue culture: is there a connection between cell-division and TASK-3 expression? *J. Physiol.-London.* 567 (Suppl.), 3P-4P.

Szappanos H, Szigeti G, Pál B, Rusznák Z, Szűcs G, Rajnavölgyi É, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter É, Pócsi I, Marx F, Csernoch L (2005) The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371 (2), 122-132. *Q1, összes idéző: 47; független idéző: 25*

Pál B, Rusznák Z, Harasztosi C, Szűcs G (2004) Depolarization-activated K<sup>+</sup> currents of the bushy neurones of the rat cochlear nucleus in a thin brain slice preparation. *Acta Physiol Hung.* 91 (2), 83-98. *Q4*, *összes idéző: 7; független idéző: 3*

Rusznák Z, Pocsai K, Kovács I, Pór Á, Pál B, Bíró T, Szűcs G (2004) Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (12), 1532-1542. *D1*, *összes idéző: 38; független idéző: 33*

Pál B, Pór Á, Szűcs G, Kovács I, Rusznák Z (2003) HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (10), 2189-2199. *D1*, *összes idéző: 26; független idéző: 21*



**Hivatkozások jegyzéke**

Abdullaev, I. F., Rudkouskaya, A., Schools, G. P., Kimelberg, H. K., Mongin, A. A. (2006) Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat astrocytes. *J. Physiol.* 572(Pt 3):677-89.

Adamantidis AR., Zhang F., Aravanis AM., Deisseroth K., de Lecea L. (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature.* 450(7168):420-4.

Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T, Refaeli R, Horn H, Regev L, Groysman M, London M, Goshen I. (2018). Astrocytic activation generates de novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell.* 174(1), 59-71.

Alderson HL, Latimer MP, Winn P (2008) A functional dissociation of the anterior and posterior pedunculopontine tegmental nucleus: excitotoxic lesions have differential effects on locomotion and the response to nicotine. *Brain Struct Funct.* 213(1-2):247-53.

Alibardi L. (2001) Fine structure and neurotransmitter cytochemistry of neurons in the rat ventral cochlear nucleus projecting to the ipsilateral dorsal cochlear nucleus. *Ann Anat.* 183(5):459-69.

Alkhatib A, Biebel UW, Smolders JW. (2006) Inhibitory and excitatory response areas of neurons in the central nucleus of the inferior colliculus in unanesthetized chinchillas. *Exp Brain Res.* 174(1):124-43.

Alonso A., Llinás RR. (1989) Subthreshold Na<sup>+</sup>-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342(6246):175-177.

Andrade R, Haj-Dahmane S. (2013) Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. *ACS Chem Neurosci.* 4(1):22-5.

Angulo, M. C., Kozlov, A. S., Charpak, S., Audinat, E. (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* 24(31): 6920-6927.

Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2008) GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol.* 86: 297-303.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP & Haydon PG. (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 10, 2129-2142.

Armbruster M, Hanson E, Dulla CG. (2016) Glutamate clearance is locally modulated by presynaptic neuronal activity in the cerebral cortex. *J Neurosci.* 36(40):10404-10415.

Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D. (2003) Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci.* 17(10):2106-18.

Ashkenazi A, Freeman S, Argov Z. (1999) Effects of cholinergic blockers on auditory brain-stem evoked potentials in rats. *J Neurol Sci.* 164(2):124-8.

Azzopardi E., Louttit AG, DeOliveira C, Laviolette SR, Schmid S (2018) The role of cholinergic midbrain neurons in startle and prepulse inhibition. *J Neurosci.* 38(41):8798-8808.

Baghdoyan HA, Rodrigo- Angulo ML, McCarley RW, Hobson A (1987) A neuroanatomical gradient in pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Research* 414 (2):245-61.

Bakalyar HA, Reed RR (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 250(4986):1403-6.

Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA (2006) Startle syndromes. *Lancet Neurol.* 5(6):513-24.

Bardóczi Z, Pál B, Kőszeghy Á, Wilhelm T, Watanabe M, Záborszky L, Liposits Z, Kalló I. (2017) Glycinergic input to the mouse basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci.* 37(39):9534-9549.

Bardoni, R., Ghirri, A., Zonta, M., Betelli, C., Vitale, G., Ruggieri, V., Sandrini, M., Carmignoto, G. (2010) Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J. Physiol.* 588(Pt 5):831-46.

Barroso-Chinea P., Rico AJ., Conte-Perales L., Gómez-Bautista V., Luquin N., Sierra S., Roda E., Lanciego J.L. (2011). Glutamatergic and cholinergic pedunculo-pontine neurons innervate the thalamic parafascicular nucleus in rats: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct. Funct.* 216, 319–330.

Bell CC. (2002) Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behav Evol.* 59(5-6):312-26.

Ben Haim L, Ceyzériat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillermier M, Ruiz M, Petit F, Houitte D, Faivre E, Vandesquille M, Aron-Badin R, Dhenain M, Déglon N, Hantraye P, Brouillet E, Bonvento G, Escartin C. (2015) The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci.* 35(6):2817-29.

Benke T. (2006) Peduncular hallucinosis: a syndrome of impaired reality monitoring. *J Neurol.* 253(12):1561-71.

Beppu K, Kosai Y, Kido MA, Akimoto N, Mori Y, Kojima Y, Fujita K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ifuku M, Shinagawa R, Nabekura J, Sprengel R, Noda M. (2013) Expression, subunit composition, and function of AMPA-type glutamate receptors are changed in activated microglia; possible contribution of GluA2 (GluR-B)-deficiency under pathological conditions. *Glia*. 61(6):881-91.

Beppu, K., Sasaki, T., Tanaka, K. F., Yamanaka, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Matsui, K. (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81(2):314-20.

Bernstein HG, Steiner J, Guest PC, Dobrowolny H, Bogerts B. (2015) Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. *Schizophr Res*. 161(1):4-18.

Bevan MD., Bolam JP. (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J. Neurosci*. 15, 7105-7120.

Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*. 7(6):613-20.

Bigl, V., Woolf, N. J., Butcher, L. L. (1982) Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull* 8:727-749

Bledsoe SC Jr, Koehler S, Tucci DL, Zhou J, Le Prell C, Shore SE. (2009) Ventral cochlear nucleus responses to contralateral sound are mediated by commissural and olivocochlear pathways. *J Neurophysiol*. 102(2):886-900.

Boccaccio A, Menini A. (2007) Temporal development of cyclic nucleotide-gated and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents in isolated mouse olfactory sensory neurons. *J Neurophysiol*. 98(1):153-60.

Borgland SL., Taha SA., Sarti F., Fields HL., Bonci A. (2006) Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron*. 49(4):589-601.

Bourgin P, Huitrón-Résendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L. (2000) Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*. 20(20):7760-5.

Boucetta, S., Cissé, Y., Mainville, L., Morales, M., Jones, B. E. (2014) Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci*. 34(13):4708-27.

Brown, A.L., (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol*. 152, 567-575.

Brown DA. (1988) M currents. *Ion Channels*. 1:55-94.

Brown DA, Adams PR. (1980) Muscarinic suppression of a novel voltagesensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673–676.

Brown DA, Passmore GM. (2009) Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol.* 156(8):1185-95.

Brown RE., Sergeeva OA., Eriksson KS., Haas HL. (2002) Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J Neurosci.*15;22(20): 8850-9.

Brueggemann L. I., Haick J. M., Cribbs L. L., Byron K. L. (2014) Differential activation of vascular smooth muscle Kv7.4, Kv7.5, and Kv7.4/7.5 channels by ML213 and ICA-069673. *Mol Pharmacol.* 86, 330-341.

Burlet S., Tyler CJ., Leonard CS. (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci.* 22(7):2862-72.

Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeiffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. (2008) TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science.* 322(5901):590-4.

Carignano C., Barila E. P., Rías E. I., Dionisio L., Aztiria E., and Spitzmaul G. (2019) Inner hair cell and neuron degeneration contribute to hearing loss in a DFNA2-like mouse model. *Neurosci.* 410, 202-216.

Carmignoto,G, Fellin,T. (2006). Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for a neuronal synchronization in the hippocampus. *J.Physiol.(Paris)* 99,98–102.

Castillo PE., Thomas J. Younts, Andres E. Chavez, and Yuki Hashimoto (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron.*; 76(1):70-81

Cervetto C, Frattaroli D, Venturini A, Passalacqua M, Nobile M, Alloisio S, Tacchetti C, Maura G, Agnati LF, Marcoli M. (2015) Calcium-permeable AMPA receptors trigger vesicular glutamate release from Bergmann gliosomes. *Neuropharmacology.* 99:396-407.

Charpak, S., Gähwiler, B. H., Do, K. Q., Knöpfel, T. (1990) Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* 347:765–67

Chavis P, Fagni L, Bockaert J, Lansman JB (1995) Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology.* 34(8):929-37.

Chavis P, Shinozaki H, Bockaert J, Fagni L (1994) The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 14(11 Pt 2):7067-76.

Chemelli RM., Willie JT., Sinton CM., Elmquist JK., Scammell T., Lee C., Richardson JA., Williams SC., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch TE., Nakazato M., Hammer RE., Saper CB., Yanagisawa M. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 98(4):437-51.

Chen N, Sugihara H, Sharma J, Perea G, Petravicz J, Le C, Sur M. (2012). Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *PNAS* 109(41), E2832-41.

Chen K, Waller HJ, Godfrey DA. (1994) Cholinergic modulation of spontaneous activity in rat dorsal cochlear nucleus. *Hear Res*. 77(1-2):168-76.

Chen K, Waller HJ, Godfrey DA. (1995) Muscarinic receptor subtypes in rat dorsal cochlear nucleus. *Hear Res*. 89(1-2):137-45.

Chen K, Waller HJ, Godfrey TG, Godfrey DA. (1999) Glutamergic transmission of neuronal responses to carbachol in rat dorsal cochlear nucleus slices. *Neuroscience*. 90(3):1043-9.

Chen G, Lee C, Sandridge SA, Butler HM, Manzoor NF, Kaltenbach JA (2013) Behavioral evidence for possible simultaneous induction of hyperacusis and tinnitus following intense sound exposure. *J Assoc Res Otolaryngol*. 14(3):413-24.

Chiu D, Nakamura T; Gold GH (1988) Ionic composition of toad olfactory mucus measured with ion selective microelectrodes. *Chem. Senses (Abstract)* 13: 677-678

Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ. (2002) Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept*. 104(1-3):131-44.

Coetzee WA., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal MS., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B. (1999) Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Annals of the New York Academy of Science* 868:233-85

Coiret G, Ster J, Grewe B, Wendling F, Helmchen F, Gerber U, Benquet P. (2012) Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus. *PLoS One*. 7(5):e37320.

Connelly WM, Errington AC, Di Giovanni G, Crunelli V (2013) Metabotropic regulation of extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors. *Front Neural Circuits*. 7:171.

Cooper, E.C., Harrington, E., Jan, Y.N., and Jan L.Y. (2001) M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J. Neurosci*. 21:9529–9540.

Cornwall, J., Phillipson, O. T. (1988) Afferent projections to the parafascicular thalamic nucleus of the rat, as shown by the retrograde transport of wheat germ agglutinin. *Brain Res Bull* 20: 139–150.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15735-40.

Cox J., Pinto L., Dan Y. (2016). Calcium imaging of sleep-wake related neuronal activity in the dorsal pons. *Nat. Commun.* 7, 10763.

Cygnar KD, Stephan AB, Zhao H (2010) Analyzing responses of mouse olfactory sensory neurons using the air-phase electroolfactogram recording. *J Vis Exp*, doi: 10.3791/1850.

D'Antoni S, Berretta A, Bonaccorso CM, Bruno V, Aronica E, Nicoletti F, Catania MV (2008) Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res.* 33(12):2436-43.

D'Ascenso M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Aubertson YP, Moss SJ, Haydon PG. (2007). mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *PNAS* 104(6), 1995-2000.

Dautan D., Huerta-Ocampo I., Witten I.B., Deisseroth K., Bolam, JP., Gerdjikov T., Mena-Segovia J. (2014). A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509–4518.

Dautan D., Hacıoglu Bay H., Bolam JP., Gerdjikov TV., and Mena-Segovia J. (2016a). Extrinsic sources of cholinergic innervation of the striatal complex: a whole-brain mapping analysis. *Front. Neuroanat.* 10, 1.

Dautan D., Souza AS., Huerta-Ocampo I., Valencia M., Assous M., Witten IB., Deisseroth K., Tepper JM., Bolam JP., Gerdjikov TV., Mena-Segovia J. (2016b). Segregated cholinergic transmission modulates dopamine neurons integrated in distinct functional circuits. *Nat. Neurosci.* 19, 1025–1033.

Dautan D, Kovács A, Bayasgalan T, Diaz-Acevedo MA, Pal B, Mena-Segovia J. (2021) Modulation of motor behavior by the mesencephalic locomotor region. *Cell Rep.* 36(8):109594.

Dash MB, Douglas CL, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Tononi G. (2009) Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci.* 29(3):620-9.

de Groot J, Sontheimer H. (2011) Glutamate and the biology of gliomas. *Glia.* 59(8):1181-9.

Delgado R, Bacigalupo J. (2004) Cilium-attached and excised patch-clamp recordings of odourant-activated Ca-dependent K channels from chemosensory cilia of olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci.* 20(11):2975-80.

Delmas P, Brown DA. (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci.* 6(11):850-62.

Demuth D.G., Molleman A., 2006. Cannabinoid signalling. *Life Sciences* 78, 549-563.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*; 258(5090):1946-9.

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.*;34(5):605-13.

Devaux J. J., Kleopa K. A., Cooper E. C., and Scherer S. S. (2004) KCNQ2 is a nodal K<sup>+</sup> channel. *J Neurosci.* 24, 1236-1244.

Devor A. (2000) Is the cerebellum like cerebellar-like structures? *Brain Res Brain Res Rev.* 34(3):149-56.

Dhallan RS, Yau KW, Schrader KA, Reed RR (1990) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature.* 347(6289):184-7.

Di Marzo V (2011): Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci* 14, 9–15.

Dreissen YE, Bakker MJ, Koelman JH, Tijssen MA (2012) Exaggerated startle reactions. *Clin Neurophysiol.* 123(1):34-44.

Dorrego-Rivas A, Grubb MS. (2022) Developing and maintaining a nose-to-brain map of odorant identity.

*Open Biol.* 12(6):220053.

Drmotá T, Greasley P, Groblewski T. inventors, Astra Zeneca, assignee. (2004): Screening assays for cannabinoid-ligand-type modulators of GPR55; World Intellectual Property Organization patent application. PCT/GB2004/000571;

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci.* 23(4):1320-8.

Dzamba, D., Honsa, P., Valny, M., Kriska, J., Valihrach, L., Novosadova, V., Kubista, M., Anderova, M., (2015) Quantitative analysis of glutamate receptors in glial cells from the cortex of GFAP/EGFP mice following ischemic injury: focus on NMDA receptors. *Cell Mol Neurobiol.* 35(8):1187-202.

Eggermann E., Serafin M., Bayer L., Machard D., Saint-Mleux B., Jones BE., Mühlethaler M. (2001) Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience.* 108(2):177-81.

Elson JL., Kochaj R., Reynolds R., Pienaar IS. (2018) Temporal spatial profiling of pedunculopontine galanin-cholinergic. Neurons in the lactacystin rat model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 34:16–31.

Farso MC, O'Shea RD, Beart PM (2009) Evidence group I mGluR drugs modulate the activation profile of lipopolysaccharide-exposed microglia in culture. *Neurochem Res.* 34(10):1721-8.

Fay R., Kubin L. (2000) Pontomedullary distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptor-like protein in the rat, *J. Comp. Neurol.* 418 323–345.

Fay R., Kubin L. (2001) 5-HT<sub>2A</sub> receptor-like protein is present in small neurons located in rat mesopontine cholinergic nuclei, but absent from cholinergic neurons, *Neurosci. Lett.* 314 77–81.

Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG & Carmignoto G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43,729-743.

Feinberg I, Jones R, Walker JM, Cavness C, March J. (1975) Effects of high dosage delta-9-tetrahydrocannabinol on sleep patterns in man. *Clin Pharmacol Ther.*;17(4):458-66.

Ferraguti F, Shigemoto R. (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326(2):483-504.

Figueiredo, M., Lane, S., Tang, F., Liu, B. H., Hewinson, J., Marina, N., Kasymov, V., Souslova, E. A., Chudakov, D. M., Gourine, A. V., Teschemacher, A. G., Kasparov, S. (2011) Optogenetic experimentation on astrocytes. *Experimental Physiology* 96(1):40-50.

Fleming TM, Scott V, Naskar K, Joe N, Brown CH, Stern JE (2011) State-dependent changes in astrocyte regulation of extrasynaptic NMDA receptor signalling in neurosecretory neurons. *J. Physiol* 589.16: 3929-3941.

Ford B., Holmes CJ., Mainville L., Jones BE. (1995) GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 363, 177–196.

Frank MG (2013): Astroglial regulation of sleep homeostasis. *Curr Opin Neurobiol.*; 23(5):812–818



Franklin, K. B. J., Paxinos, G. (2013) *The mouse brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th Ed., Elsevier, San Diego.

Freund TF, Katona I, Piomelli D. (2003): Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.*;83(3):1017-66.

Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ, Gundersen V, Holmseth S, Lehre KP, Ullensvang K, Wojewodzic M, Zhou Y, Attwell D, Danbolt NC (2008) A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience*. 157(1):80-94.

Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC. (1996) Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *J Neurosci*. 16(8):2659-70.

Gamper N, Shapiro MS. (2003) Calmodulin mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of M-type K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol*. 122(1):17-31.

Garcia-Rill, E. (1991) The pedunculopontine nucleus. *Prog Neurobiol*. 36:363–389

Garcia-Rill, E., Kezunovic, N., Hyde, J., Simon, C., Beck, P., Urbano, F. J. (2013) Coherence and frequency in the reticular activating system (RAS). *Sleep Med Rev*. 17(3):227-38.

Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. (2002): Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.*;5(5):446-51.

Giber K, Diana MA, Plattner V, Dugué GP, Bokor H, Rousseau CV, Maglóczy Z, Havas L, Hangya B, Wildner H, Zeilhofer HU, Dieudonné S, Acsády L. (2015) A subcortical inhibitory signal for behavioral arrest in the thalamus. *Nat Neurosci*. 18(4):562-568.

Gómez-Gonzalo M, Martín-Fernandez M, Martínez-Murillo R, Mederos S, Hernández-Vivanco A, Jamison S, Fernandez AP, Serrano J, Calero P, Futch HS, Corpas R, Sanfeliu C, Perea G, Araque A. (2017) Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain. *Glia*. 65(4):569-580.

Golding NL, Oertel D. (2012) Synaptic integration in dendrites: exceptional need for speed.

*J Physiol*. 590(22):5563-9.

Golding NL, Oertel D. (2012) Synaptic integration in dendrites: exceptional need for speed.

*J Physiol*. 590(22):5563-9.

Gorman M. R., Elliott J. A. (2003) Entrainment of 2 subjective nights by daily light:dark:light:dark cycles in 3 rodent species. *J Biol Rhythms*. 18, 502-512.

Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., Teschemacher, A. G., Spyer, K. M., Deisseroth, K., Kasparov, S. (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329(5991):571-5.

Grace KP., Vanstone LE., Horner RL. (2014) Endogenous cholinergic input to the pontine REM sleep generator is not required for REM sleep to occur. *J. Neurosci*. 34, 14198–14209.

Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF. (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 54(1):129-41.

Greco MA, Shiromani PJ. (2001) Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 88(1-2):176-82.

Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M. (2003) Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*. 23(7):2889-98.

Grothe B, Pecka M, McAlpine D. (2010) Mechanisms of sound localization in mammals. *Physiol Rev*. 90(3):983-1012.

Gut NK., Winn P. (2015) Deep brain stimulation of different pedunculopontine targets in a novel rodent model of parkinsonism. *J Neurosci* 35 (12):4792-803.

Gulyás AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. (2004): Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*. 441-58.

Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. (2015) Neuroglial Transmission. *Physiol Rev*. 95(3):695-726.

Ha G. H., Cheong E. (2017) Spike frequency adaptation in neurons of the central nervous system. *Exp Neurobiol*. 26, 179-185.

Hagan JJ., Leslie RA., Patel S., Evans ML., Wattam TA., Holmes S., Benham CD., Taylor SG., Routledge C., Hemmati P., Munton RP., Ashmeade TE., Shah AS., Hatcher JP., Hatcher PD., Jones DN., Smith MI., Piper DC., Hunter AJ., Porter RA., Upton N. (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(19):10911-6.

Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behaviour. *Annu Rev Physiol* 72: 335-355.

Hale MW, Lowry CA. (2011) Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology (Berl)*. 213(2-3):243-64.

Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Marsicano G, Zhang X. (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*. 148(5): 1039-50.

Han KS, Woo J, Park H, Yoon BJ, Choi S, Lee CJ. (2013) Channel-mediated astrocytic glutamate release via Bestrophin-1 targets synaptic NMDARs. *Mol Brain*. 6:4.

Hara J., Beuckmann CT., Nambu T., Willie JT., Chemelli RM., Sinton CM., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 30(2):345-54.

Harata N, Katayama J, Takeshita Y, Murai Y, Akaike N (1996) Two components of metabotropic glutamate responses in acutely dissociated CA3 pyramidal neurons of the rat. *Brain Res* 711: 223-233.

Harris GC., Wimmer M., Aston-Jones G. (2005) A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*. 437(7058):556-9.

Harrison E. M., Walbeek T. J., Sun J., Johnson J., Poonawala Q., Gorman M. R. (2016) Extraordinary behavioral entrainment following circadian rhythm bifurcation in mice. *Sci Rep*. 6, 38479.

Hegy Z, Holló K, Kis G, Mackie K, Antal M (2012) Differential distribution of diacylglycerol lipase- $\alpha$  and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Glia* 60(9): 1316-29

Hegy Z, Kis G, Holló K, Ledent C, Antal M (2009) Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur J Neurosci*, 30(2): 251-62.

Hegy Z, Oláh T, Kőszeghy Á, Piscitelli F, Holló K, Pál B, Csernoch L, Di Marzo V, Antal M. (2018) CB<sub>1</sub> receptor activation induces intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes. *Sci Rep*. 8(1):10562.

Heidenreich M., Lechner S.G., Vardanyan V., Wetzel C., Cremens C. W., De Leenheer E. M., Aránguez G., Moreno-Pelayo M. A., Jentsch T. J., and Lewin G. R. (2011) KCNQ4 K<sup>+</sup> channels tune mechanoreceptors for normal touch sensation in mouse and man. *Nat Neurosci*. 15, 138-145.

Héja L, Nyitrai G, Kékesi O, Dobolyi A, Szabó P, Fiáth R, Ulbert I, Pál-Szente B, Palkovits M, Kardos J. (2012) Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biol.* 10:26.

Henderson, Z. (1981) A projection from acetylcholinesterase-containing neurones in the diagonal band to the occipital cortex of the rat. *Neuroscience* 6:1081–1088

Hengl T, Kaneko H, Dauner K, Vocke K, Frings S, Möhrle F. (2010) Molecular components of signal amplification in olfactory sensory cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 107(13):6052-7.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., Rusakov, D.A. (2010) Long term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.

Herculano-Houzel S. (2014) The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia.* 62(9):1377-91.

Hermes ML, Renaud LP (2011) Postsynaptic and presynaptic group II metabotropic glutamate receptor activation reduces neuronal excitability in rat midline paraventricular thalamic nucleus. *J Pharmacol Exp Ther.* 336(3):840-9.

Herrera-Solís, A., Vásquez, K. G., Prospéro-García, O. (2010) Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 95: 106-112.

Hertelendy P, Varga DP, Menyhárt Á, Bari F, Farkas E. (2019). Susceptibility of the cerebral cortex to spreading depolarization in neurological disease states: The impact of aging. *Neurochem Int.* 127,125-136.

Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. (2001) Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience.* 103(3):777-97.

Höft S, Griemsmann S, Seifert G, Steinhäuser C. (2014) Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369(1654):20130602.

Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN, Plachez C, Zhou Y, Furness DN, Bergles DE, Lehre KP, Danbolt NC. (2012) The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J Neurosci.* 32(17):6000-13.

Honda, T., Semba, K. (1995) An ultrastructural study of cholinergic and non-cholinergic neurons in the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei in the rat. *Neuroscience.* 68(3):837-53.

Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* . 26(4):331-43.

Hoshi A, Tsunoda A, Yamamoto T, Tada M, Kakita A, Ugawa Y. (2018) Altered expression of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human temporal cortex with Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 44(6):628-638.

Hoshi, N., Zhang, J. S., Omaki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, S., Wanaverbecq, N., Langeberg, L. K., Yoneda, Y., Scott, J. D., Brown, D. A., Higashida, H. (2003) AKAP150 signaling promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nature Neurosci.* 6, 564–571.

Huang H, Trussell LO. (2011) KCNQ5 channels control resting properties and release probability of a synapse. *Nat. Neurosci.* 14, 840–847.

Huang S, Tong H, Lei M, Zhou M, Guo W, Li G, Tang X, Li Z, Mo M, Zhang X, Chen X, Cen L, Wei L, Xiao Y, Li K, Huang Q, Yang X, Liu W, Zhang L, Qu S, Li S, Xu P. (2018) Astrocytic glutamatergic transporters are involved in A $\beta$ -induced synaptic dysfunction. *Brain Res.* 1678:129-137.

Huang WC, Xiao S, Huang F, Harfe BD, Jan YN, Jan LY. (2012) Calcium-activated chloride channels (CaCCs) regulate action potential and synaptic response in hippocampal neurons. *Neuron.* 74(1):179-92.

Huitron-Resendiz S., Kristensen MP., Sánchez-Alavez M., Clark SD., Grupke SL., Tyler C., Suzuki C., Nothacker HP., Civelli O., Criado JR., Henriksen SJ., Leonard CS., de Lecea L. (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci.*25(23):5465-74.

Hyde J, Kezunovic N, Urbano FJ, Garcia-Rill E (2013) Visualization of fast calcium oscillations in the parafascicular nucleus. *Pflugers Arch* 465(9):1327-40.

Inglebert Y, Debanne D. (2021). Calcium and spike timing-dependent plasticity. *Front Cell Neurosci.*, 15, 727336.

Inglis WL, Olmstead MC, Robbins TW (2001) Selective deficits in attentional performance on the 5-choice serial reaction time task following pedunculo-pontine tegmental nucleus lesions. *Behav Brain Res* 123:117–131.

Inutsuka A, Yamanaka A. (2013) The physiological role of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness and neuroendocrine functions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4:18.

Irie T, Fukui I, Ohmori H (2006) Activation of GIRK channels by muscarinic receptors and group II metabotropic glutamate receptors suppresses Golgi cell activity in the cochlear nucleus of mice. *J Neurophysiol.* 96(5):2633-44.

Irvine DRF (1986) The auditory brainstem. *Progress in Sensory Physiology* 7: 1-279.

Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U. (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *PNAS* 96: 8733-8738.

Jain R, Shore S. (2006) External inferior colliculus integrates trigeminal and acoustic information: unit responses to trigeminal nucleus and acoustic stimulation in the guinea pig. *Neurosci Lett.* 395(1):71-5.

Javitt DC. (2010) Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 47(1):4-16.

Ji ZG, Wang H (2015) Optogenetic control of astrocytes: is it possible to treat astrocyte-related epilepsy? *Brain Res. Bulletin* 110: 20-25.

Jian K, Cifelli P, Pignatelli A, Frigato E, Belluzzi O (2010) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res.* 1354:47-63.

Jiménez-González C, Pirttimäki T, Cope DW, Parri HR (2011) Non-neuronal, slow GABA signalling in the ventrobasal thalamus targets  $\delta$ -subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors. *Eur J Neurosci* 33:1471-1482.

Jin YM, Godfrey DA, Sun Y. (2005) Effects of cochlear ablation on choline acetyltransferase activity in the rat cochlear nucleus and superior olive. *J Neurosci Res.* 81(1):91-101.

Jin YM, Godfrey DA, Wang J, Kaltenbach JA. (2006) Effects of intense tone exposure on choline acetyltransferase activity in the hamster cochlear nucleus. *Hear Res.* 216-217:168-75.

Jin YM, Godfrey DA. (2006) Effects of cochlear ablation on muscarinic acetylcholine receptor binding in the rat cochlear nucleus. *J Neurosci Res.* 83(1):157-66.

Jing M. Y., Han X., Zhao T. Y., Wang Z. Y., Lu G. Y., Wu N., Song R., Li J. (2019) Re-examining the role of ventral tegmental area dopaminergic neurons in motor activity and reinforcement by chemogenetic and optogenetic manipulation in mice. *Metab Brain Dis.* 34, 1421-1430.

Jones DT, Reed RR (1989) Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science.* 244(4906):790-5.

Joris PX, Carney LH, Smith PH, Yin TC. (1994) Enhancement of neural synchronization in the anteroventral cochlear nucleus. I. Responses to tones at the characteristic frequency. *J Neurophysiol.* 71(3):1022-36.

Kaltenbach JA, Zhang J. (2007) Intense sound-induced plasticity in the dorsal cochlear nucleus of rats: evidence for cholinergic receptor upregulation. *Hear Res.* 226(1-2):232-43.

Kaltenbach JA. (2011) Tinnitus: Models and mechanisms. *Hear Res.* 276(1-2):52-60.

Kaneko H, Putzier I, Frings S, Kaupp UB, Gensch T. (2004) Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. *J Neurosci.* 24(36):7931-8.

Kang, Y., Kitai, S. T. (1990) Electrophysiological properties of pedunculopontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Res.* 3;535(1):79-95.

Karachi C, André A, Bertasi E, Bardinet E, Lehericy S, Bernard FA (2012) Functional parcellation of the lateral mesencephalus. *Journal of Neuroscience* 32 (27):9396-401.

Kato HK, Kassai H, Watabe AM, Aiba A, Manabe T. (2012) Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP3 receptor and L-type Ca<sup>2+</sup> channel in mouse CA1 pyramidal cells. *J Physiol.* 590(Pt 13):3019-34.

Katona I, Freund TF (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 35: 529-558.

Katona I, Sperl agh B, S ik A, K ofalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19: 4544–4558.

Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, et al. (2006): Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26: 5628–5637

Kaushal V, Schlichter LC. (2008) Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci.* 28(9):2221-30.

Kelly JB, van Adel BA, Ito M. (2009) Anatomical projections of the nuclei of the lateral lemniscus in the albino rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Neurol.* 512(4):573-93.

Kezunovic N, Hyde J, Goitia B, Bisagno V, Urbano FJ, Garcia-Rill E. (2013) Muscarinic modulation of high frequency oscillations in pedunculopontine neurons. *Front Neurol.* 4:176.

Kezunovic N, Urbano FJ, Simon C, Hyde J, Smith K, Garcia-Rill E. (2011) Mechanism behind gamma band activity in the pedunculopontine nucleus. *Eur J Neurosci.* 34(3):404-15.

Kharkovets T., Dedek K., Maier H., Schweizer M., Khimich D., Nouvian R., Vardanyan V., Leuwer R., Moser T., and Jentsch T. J. (2006) Mice with altered KCNQ4 K<sup>+</sup> channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *EMBO J.* 25, 642-652.

Kharkovets T., Hardelin J. P., Safieddine S., Schweizer M., El-Amraoui A., Petit C., and Jentsch T. J. (2000) KCNQ4, a K<sup>+</sup> channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *PNAS*. 97, 4333-4338.

Kim J, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K. (2009) Electrophysiological effects of orexins/hypocretins on pedunculopontine tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides* 30 (2):191-209.

Kim YK, Na KS. (2016) Role of glutamate receptors and glial cells in the pathophysiology of treatment-resistant depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 70:117-26.

Kiryk A, Aida T, Tanaka K, Banerjee P, Wilczynski GM, Meyza K, Knapska E, Filipkowski RK, Kaczmarek L, Danysz W. (2008) Behavioral characterization of GLT1 (+/-) mice as a model of mild glutamatergic hyperfunction. *Neurotox Res*. 13(1):19-30.

Kleene SJ, Pun RY. (1996) Persistence of the olfactory receptor current in a wide variety of extracellular environments. *J Neurophysiol*. 75(4):1386-91.

Kleene SJ. (1993) Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron*. 11(1):123-32.

Kleene SJ. (2008) The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem Senses*. 33(9):839-59.

Kleene SJ. (2009) Identifying olfaction's 'other channels'. *J Physiol*. 587(Pt 17):4135-6.

Knoflach F, Kemp JA (1998) Metabotropic glutamate group II receptors activate a G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in neurones of the rat cerebellum. *J Physiol*. 509 ( Pt 2):347-54.

Kobayashi, T., Homma, Y., Good, C., Skinner, R. D., Garcia-Rill, E. (2003) Developmental changes in the effects of serotonin on neurons in the region of the pedunculopontine nucleus, *Dev. Brain Res*. 140 (1) 57–66.

Koch M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol*. 59(2):107-28.

Kohlmeier KA, Christensen MH, Kristensen MP, Kristiansen U. (2013) Pharmacological evidence of functional inhibitory metabotropic glutamate receptors on mouse arousal-related cholinergic laterodorsal tegmental neurons. *Neuropharmacology* 66: 99-113.

Kohlmeier KA, Watanabe S, Tyler CJ, Burette S, Leonard CS. (2008) Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: noisy cation current activation and selective enhancement of Ca<sup>2+</sup> transients mediated by L-type calcium channels. *Journal of Neurophysiology* 100(4):2265-81. doi: 10.1152/jn.01388.2007



Kollen M, Dutar P, Jouvenceau A. (2008) The magnitude of hippocampal long term depression depends on the synaptic location of activated NR2-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*. 154(4):1308-17.

Kopach O, Voitenko N. (2013) Extrasynaptic AMPA receptors in the dorsal horn: evidence and functional significance. *Brain Res Bull*. 93:47-56.

Kopp-Scheinflug C, Dehmel S, Dörrscheidt GJ, Rübsamen R. (2002) Interaction of excitation and inhibition in anteroventral cochlear nucleus neurons that receive large endbulb synaptic endings. *J Neurosci*. 22(24):11004-18.

Korotkova TM., Sergeeva OA., Eriksson KS, Haas HL., Brown RE. (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci*. 23(1):7-11.

Koyama S, Appel SB. (2006) Characterization of M-current in ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol*. 96(2):535-43.

Kozlov, A. S., Angulo, M. C., Audinat, E., Chrupka, S. (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *PNAS* 103(26):10058-63.

Kreitzer AC, Regehr WG. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*. 29(3):717-27.

Kroeger D., Ferrari LL., Petit G., Mahoney CE., Fuller PM., Arrigoni E., Scammell TE. (2017) Cholinergic, glutamatergic, and GABAergic neurons of the pedunculopontine tegmental nucleus have distinct effects on sleep/wake behavior in mice. *J Neurosci* 37 (5):1352–1366.

Kurahashi T, Yau KW. (1993) Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*. 363(6424):71-4.

Kuruma A, Hartzell HC. (1999) Dynamics of calcium regulation of chloride currents in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol*. 276(1):C161-75.

Kuruma A, Hartzell HC. (2000) Bimodal control of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel by different Ca(2+) signals. *J Gen Physiol*. 115(1):59-80.

Kuwada S, Bishop B, Alex C, Condit DW, Kim DO. (2011) Spatial tuning to sound-source azimuth in the inferior colliculus of unanesthetized rabbit. *J Neurophysiol*. 106(5):2698-708.

La Bella V, Valentino F, Piccoli T, Piccoli F. (2007) Expression and developmental regulation of the cystine/glutamate exchanger (xc-) in the rat. *Neurochem Res*. 32(6):1081-90.

Lalo U, Bogdanov A, Pankratov Y. (2018). Diversity of astroglial effects on aging- and experience-related cortical metaplasticity. *Front Mol Neurosci.* 11,239.

Lalo U, Palygin O, North RA, Verkhatsky A, Pankratov Y. (2011) Age-dependent remodelling of ionotropic signalling in cortical astroglia. *Aging Cell.* 10(3),392-402.

Lauderdale, K., Murphy, T., Tung, T., Davila, D., Binder, D. K., Fiacco, T. A. (2015) Osmotic edema rapidly increases neuronal excitability through activation of NMDA receptor-dependent slow inward currents in juvenile and adult hippocampus. *ASN Neuro* 21;7(5).

Le Meur K, Galante M, Angulo MC, Audinat E. (2007) Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. *J Physiol.* 580(Pt. 2):373-83.

Le Meur K, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Audinat E. (2012) GABA release by hippocampal astrocytes. *Front Comput Neurosci.* 6:59.

LeBeau FE, Malmierca MS, Rees A. (2001) Iontophoresis in vivo demonstrates a key role for GABA(A) and glycinergic inhibition in shaping frequency response areas in the inferior colliculus of guinea pig. *J Neurosci.* 21(18):7303-12.

Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ. (2010) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science.* 330(6005):790-796.

Lee V, Maguire J (2014) The impact of tonic GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell. *Front Neural Circuits.* 8:3.

Leonard CS, Llinás R. (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience.* 59(2):309-30.

Leonard, C. S., Llinas, R. (1988) Electrophysiology of thalamic-projecting cholinergic brainstem neurons and their inhibition by Ach. *Neurosci. Abstr.* 14:297.

Leonard, C. S., Llinas, R. R. (1990) Serotonin inhibits mesopontine cholinergic neurons in vitro. *Neurosci. Abstr.* 16, 1233.

Lerma J, Herranz AS, Herreras O, Abaira V, Martín del Río R. (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* 384(1):145-55.

- Li X, Peng XQ, Jordan CJ, Li J, Bi GH, He Y, Yang HJ, Zhang HY, Gardner EL, Xi ZX. (2018) mGluR5 antagonism inhibits cocaine reinforcement and relapse by elevation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens via a CB1 receptor mechanism. *Sci Rep.* 8(1):3686.
- Libri V, Constanti A, Zibetti M, Postlethwaite M (1997) Metabotropic glutamate receptor subtypes mediating slow inward tail current (IADP) induction and inhibition of synaptic transmission in olfactory cortical neurones. *Br J Pharmacol.* 120(6):1083-95.
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell.* 98(3):365-76.
- Llinás RR, Grace AA, Yarom Y (1991) In vitro neurons in mammalian cortical layer 4 exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10- to 50-Hz frequency range. *Proc Natl Acad Sci* 88(3):897-901
- Lowe G, Gold GH. (1993) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature.* 366(6452):283-6.
- Lowry CA (2002) Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 14(11):911-23.
- Luján R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P. (1997) Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat.* 13(4):219-41.
- Lumani A, Zhang H. (2010) Responses of neurons in the rat's dorsal cortex of the inferior colliculus to monaural tone bursts. *Brain Res.* 1351:115-129.
- Mackie, K. (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook Exper Pharmacol* 168:299–325
- MacLaren DAA, Ljungberg TL, Griffin ME, Clark SD. (2018) Pedunculopontine tegmentum cholinergic loss leads to a progressive decline in motor abilities and neuropathological changes resembling progressive supranuclear palsy. *Eur J Neurosci.* 48(12):3477-3497.
- Madison DV, Nicoll RA. (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol.* 354:319-31.
- Maezawa I, Jin LW. (2010) Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. *J Neurosci.* 30(15):5346-56.

Maier SF, Watkins LR. (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4-5):829-41.

Malmierca MS, Leergaard TB, Bajo VM, Bjaalie JG, Merchán MA. (1998) Anatomic evidence of a three-dimensional mosaic pattern of tonotopic organization in the ventral complex of the lateral lemniscus in cat. *J Neurosci.* 18(24):10603-18.

Malnic B. (2007) Searching for the ligands of odorant receptors. *Mol Neurobiol* 35(2):175-81.

G1, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ (2001) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci.* 21(16):5925-34.

Mansvelder HD, Verhoog MB, Goriounova NA. (2019). Synaptic plasticity in human cortical circuits: cellular mechanisms of learning and memory in the human brain? *Curr Opin Neurobiol.* 54,186-193.

Marcoli M, Agnati LF, Benedetti F, Genedani S, Guidolin D, Ferraro L, Maura G, Fuxe K. (2015) On the role of the extracellular space on the holistic behavior of the brain. *Rev Neurosci.* 26(5):489-506.

Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK. (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435(1):6-25.

Marrion NV. (1997) Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 483–504.

Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP. (2013) Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci.* 33(8):3413-23.

Martínez-Gallego I, Pérez-Rodríguez M, Coatl-Cuaya H, Flores G & Rodríguez-Moreno A. (2022). Adenosine and astrocytes determine the developmental dynamics of spike timing-dependent plasticity in the somatosensory cortex. *J Neurosci.* 42(31),6038-52.

Martinez-Gonzalez C., Micklem BR., Bolam JP., Mena-Segovia, J. (2009). Neurons containing calcium-binding proteins are topographically organized in the pedunculopontine nucleus. *Neuroscience Meeting Planner.* Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2009.

Martinez-Gonzalez C., Wang HL., Micklem BR., Bolam JP., Mena-Segovia J. (2012) Subpopulations of cholinergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the pedunculopontine nucleus contain calcium-binding proteins and are heterogeneously distributed. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 35:723–734.

Martinez-Vargas M., Murillo-Rodriguez E., Gonzalez-Rivera R., Landa A., Mndez-Dazm., Prospro-Garca O., Navarro L. (2003): Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience.*;117:197–201.

Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., Tagliatela, M. (2004) M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals. *J. Neurosci.* 24, 592–597.

Mateos-Aparicio P, Murphy R, Storm JF (2014) Complementary functions of SK and Kv7/M potassium channels in excitability control and synaptic integration in rat hippocampal dentate granule cells. *J. Physiol.* 592(Pt. 4), 669–693.

Matott MP, Kline DD, Hasser EM. (2017) Glial EAAT2 regulation of extracellular nTS glutamate critically controls neuronal activity and cardiorespiratory reflexes. *J Physiol.* 595(17):6045-6063.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.*;346(6284):561-4.

McGinley MJ, Oertel D. (2006) Rate thresholds determine the precision of temporal integration in principal cells of the ventral cochlear nucleus. *Hear Res.* 216-217:52-63.

McGuier N. S., Rinker J. A., Cannady R., Fulmer D. B., Jones S. R., Hoffman M., Mulholland P. J. (2018) Identification and validation of midbrain *Kcnq4* regulation of heavy alcohol consumption in rodents. *Neuropharmacology.* 138, 10-19.

Mena-Segovia J. (2016) Structural and functional considerations of the cholinergic brainstem. *J Neural Transm (Vienna).* 123(7):731-736.

Mena-Segovia J., Micklem BR., Nair-Roberts RG., Ungless MA., Bolam JP. (2009) GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. *J. Comp. Neurol.* 515, 397–408.

Mena-Segovia, J., Bolam, J. P. (2017) Rethinking the pedunculopontine nucleus: from cellular organization to function. *Neuron.* 94(1):7-18.

Mena-Segovia, J., Sims, H. M., Magill, P. J., Bolam, J. P. (2008) Cholinergic brainstem neurons modulate cortical gamma activity during slow oscillations. *J. Physiol.* 586(Pt 12), 2947–2960.

Menco BPhM, Morrison EE, Doty RL (2003) Morphology of the mammalian olfactory epithelium: Form, fine structure, function, and pathology, *Handbook of olfaction and gustation*, 2nd edition. New York Marcel Dekker (pg. 17-49)

Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H., Levey, A. I. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. Dec;10(4):1185-201.

Mignot E., Lammers GJ., Ripley B., Okun M., Nevsimalova S., Overeem S., Vankova J., Black J., Harsh J., Bassetti C., Schrader H., Nishino S. (2002) The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*. 59(10):1553-62.

Milojkovic BA, Wuskell JP, Loew LM, Antic SD. (2005) Initiation of sodium spikelets in basal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *J Membr Biol*. 208(2):155-69.

Milton M, Smith PD. (2018) It's all about timing: the involvement of Kir4.1 channel regulation in acute ischemic stroke pathology. *Front Cell Neurosci*. 12:36.

Min R., Nevian T (2012) Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci*. 15(5):746-53.

Moghaddam B. (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem*. 60(5):1650-7.

Moldrich G, Wenger T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*. 21(11):1735-42.

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ (2003): Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neuroscience*; 23(16):6470–6474

Monti, J. M. (2011) Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews* 15 269-281.

Moore, S. D., Madamba, S. G., Schweitzer, P., Siggins, G. R. (1994) Voltage-dependent effects of opioid peptides on hippocampal CA3 pyramidal neurons in vitro. *J. Neurosci*. 14:809–20

Morilak, D. A., Ciaranello, R. D. (1993) 5-HT(2) receptor immunoreactivity on cholinergic neurons of the pontomesencephalic tegmentum shown by double immunofluorescence, *Brain Res*. 627 49–54.

Morley BJ, Happe HK. (2000) Cholinergic receptors: dual roles in transduction and plasticity. *Hear Res*. 147(1-2):104-12.

Motts SD., Schofield BR. (2009) Sources of cholinergic input to the inferior colliculus. *Neuroscience* 160, 103–114.

- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. (1999): Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther.*;291(2):893-902.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Murillo-Rodríguez, E. (2008) The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32: 1420-1427.
- Murillo-Rodríguez, E., Millán-Aldaco, D., Di Marzo, V., Drucker-Colín, R. (2008) The anandamide membrane transporter inhibitor, VDM-11, modulates sleep and c-Fos expression in the rat brain. *Neuroscience* 157(1):1-11.
- Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 58: 883-893.
- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68: 113 – 126.
- Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biology* 10(2): e1001259.
- Navarrete M, Perea G, Maglio L, Pastor J, García de Sola R, Araque A. (2013). Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cereb Cortex.* 23(5),1240-6.
- Navarro-López J, Jiménez-Díaz L, Géranton SM, Ashmore JF. (2009) Electrophysiological and molecular analysis of Kv7/KCNQ potassium channels in the inferior colliculus of adult guinea pig. *J Mol Neurosci.* 37(3):263-8.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD (2002) Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol.* 87(1):528-37.
- Newman, D. B., Ginsberg, C.Y. (1994) Brainstem reticular nuclei that project to the thalamus in rats: a retrograde tracer study. *Brain Behav Evol* 44: 1–39
- Nickell WT, Kleene NK, Gesteland RC, Kleene SJ (2006) Neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking NKCC1. *J Neurophysiol* 95, 2003-2006.
- Nickell WT, Kleene NK, Gesteland RC, Kleene SJ. (2006) Neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking NKCC1. *J Neurophysiol.* 95(3):2003-6.

Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL, Conn PJ, Ferraguti F, Schoepp DD, Wroblewski JT, Pin JP. (2011) Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*. 60(7-8):1017-41.

Nie H, Weng HR. (2009) Glutamate transporters prevent excessive activation of NMDA receptors and extrasynaptic glutamate spillover in the spinal dorsal horn. *J Neurophysiol*. 101(4):2041-51.

Nie H, Zhang H, Weng HR. (2010) Bidirectional neuron-glia interactions triggered by deficiency of glutamate uptake at spinal sensory synapses. *J Neurophysiol*. 104(2):713-25.

Nigro MJ, Mateos-Aparicio P, Storm JF. (2014) Expression and functional roles of Kv7/KCNQ/M-channels in rat medial entorhinal cortex layer II stellate cells. *J Neurosci*. 34(20):6807-12.

Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 50:295-322.

Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N. (2000) AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J Neurosci*. 2000 Jan 1;20(1):251-8.

Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*. 814,23-45.

Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 2009 Mar 11;29(10):3276-87.

Octeau JC, Gangwani MR, Allam SL, Tran D, Huang S, Hoang-Trong TM, Golshani P, Rumbell TH, Kozloski JR, Khakh BS. (2019) Transient, consequential increases in extracellular potassium ions accompany channelrhodopsin2 excitation. *Cell Rep*. 27(8):2249-2261.e7.

Oertel D, Wu SH. (1989) Morphology and physiology of cells in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J Comp Neurol*. 283(2):228-47.

Oh U, Jung J. (2016) Cellular functions of TMEM16/anoctamin. *Pflugers Arch*. 468(3):443-53.

Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Sasamori H, Nebuka M, Nishitani N, Tanaka KF, Yamanaka A, Yoshioka M. (2020) Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*. 167:107703.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*. 29(3):729-38



Oikonomou KD, Singh MB, Rich MT, Short SM, Antic SD. (2015) Contribution of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate and adenosine A1 receptors in the generation of dendritic glutamate-mediated plateau potentials. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370(1672). doi: 10.1098/rstb.2014.0193.

Orr AG., Hsiao EC., Wang MM., Ho K., Kim DH., Wang X., Guo W., Kang J., Yu GQ., Adame A., Devidze N., Dubal DB, Masliah E., Conklin BR., Mucke L. (2015) Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat. Neurosci.* 18, 423–434.

Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. (2006): Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.*;3(3):167-75

Pai YH, Lim CS, Park KA, Cho HS, Lee GS, Shin YS, Kim HW, Jeon BH, Yoon SH, Park JB. (2016) Facilitation of AMPA receptor-mediated steady-state current by extrasynaptic NMDA receptors in supraoptic magnocellular neurosecretory cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 20(4):425-32. doi: 10.4196/kjpp.2016.20.4.425.

Pál B. (2015) Astrocytic actions on extrasynaptic neuronal currents. *Front Cell Neurosci.* 9:474. doi: 10.3389/fncel.2015.00474.

Pál B. (2018) Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(16): 2917-2949.

Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J. Y., Cranstoun, S. D., Bennett, V., Scherer, S. S., Cooper, E. C. (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci.* 26:2599–2613.

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 14(6):383-400.

Pape HC., Driesang RB. (1998) Ionic mechanisms of intrinsic oscillations in neurons of the basolateral amygdaloid complex. *J Neurophysiol* 79(1):217-226.

Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell.* 150(3):633-46.

Papouin, T., Oliet, S. H., 2014. Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 369(1654):20130601

Park JB, Jo JY, Zheng H, Patel KP, Stern JE (2009) Regulation of tonic GABA inhibitory function, presympathetic neuronal activity and sympathetic outflow from the paraventricular nucleus by astroglial GABA transporters. *J Physiol.* 587.19: 4645-4660.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 369(6483):744-7.

Parri, H. R., Gould, T. M., Crunelli, V. (2001) Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature Neuroscience* 4: 803-812.

Partridge JG, Lewin AE, Yasko JR, Vicini S. (2014) Contrasting actions of Group I metabotropic glutamate receptors in distinct mouse striatal neurones. *J Physiol.* 592(Pt 13):2721-33.

Pecka M, Siveke I, Grothe B, Lesica NA. (2010) Enhancement of ITD coding within the initial stages of the auditory pathway. *J Neurophysiol.* 103(1):38-46.

Perea G, Araque A. (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25(9): 2192-2203.

Perea G, Navarrete M, Araque A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32(8):421-31.

Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M. (2014). Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun.* 5,3262.

Peters CJ, Yu H, Tien J, Jan YN, Li M, Jan LY. (2015) Four basic residues critical for the ion selectivity and pore blocker sensitivity of TMEM16A calcium-activated chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(11):3547-52.

Petr GT, Sun Y, Frederick NM, Zhou Y, Dhamne SC, Hameed MQ, Miranda C, Bedoya EA, Fischer KD, Arnsen W, Wang J, Danbolt NC, Rotenberg A, Aoki CJ, Rosenberg PA. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 25(29):6907-10.

Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience.* 71(4):949-76.

Petralia RS. (2012) Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *ScientificWorldJournal.* 2012:267120.

Petzold A., Valencia M., Pál, B., Mena-Segovia J. (2015). Decoding brain state transitions in the pedunculopontine nucleus: cooperative phasic and tonic mechanisms. *Front. Neural Circuits* 9, 68.

Peyron C., Faraco J., Rogers W., Ripley B., Overeem S., Charnay Y., Nevsimalova S., Aldrich M., Reynolds D., Albin R., Li R., Hungs M., Pedrazzoli M., Padigaru M., Kucherlapati M., Fan J., Maki R., Lammers GJ., Bouras C., Kucherlapati R., Nishino S., Mignot E. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med.* 6(9):991-7.

Pickles JO (2012) *An introduction to the physiology of hearing*, 4th edition, Brill, Leiden.

Pickles JO. (2015) Auditory pathways: anatomy and physiology. *Handb Clin Neurol.* 129:3-25.

Piers TM, Heales SJ, Pocock JM. (2011) Positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5 down-regulates fibrinogen-activated microglia providing neuronal protection. *Neurosci Lett.* 505(2):140-5.

Pietra G, Dibattista M, Menini A, Reisert J, Boccaccio A. (2016) The Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel TMEM16B regulates action potential firing and axonal targeting in olfactory sensory neurons. *J Gen Physiol.* 148(4):293-311.

Pifferi S, Dibattista M, Menini A. (2009) TMEM16B induces chloride currents activated by calcium in mammalian cells. *Pflugers Arch.* 458(6):1023-38.

Pifferi S, Pascarella G, Boccaccio A, Mazzatenta A, Gustincich S, Menini A, Zucchelli S. (2006) Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(34):12929-34.

Pirttimaki TM, Hall SD, Parri HR. (2011). Sustained neuronal activity generated by glial plasticity. *J. Neurosci.* 31(21), 7637-7647.

Pirttimaki, T. M., Parri, H. R. (2012) Glutamatergic input-output properties of thalamic astrocytes. *Neuroscience* 205: 18-28.

Pivik RT, Zarcone V, Dement WC, Hollister LE (1972): Delta-9-tetrahydrocannabinol and synhexl: effects on human sleep patterns. *Clin. Pharmacol. Ther.*;13: 426-436

Poisik OV, Mannaioni G, Traynelis S, Smith Y, Conn PJ (2003) Distinct functional roles of the metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the rat globus pallidus. *J Neurosci.* 23(1):122-30.

Popov A, Brazhe A, Denisov P, Sutyagina O, Li L, Lazareva N, Verkhatsky A, Semyanov A. (2021). Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity. *Aging Cell.* 20(3),e13334.

Poskanzer KE., Yuste R. (2016) Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(19):E2675-84.

Rainnie DG, Holmes KH, Shinnick-Gallagher P (1994) Activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors by trans-ACPD hyperpolarizes neurons of the basolateral amygdala. *J Neurosci* 14: 7208-7220.

Reese NB., Garcia-Rill E., Skinner RD. (1995) The pedunculopontine nucleus--auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol*; 47(2):105-33.

Reisert J, Bauer PJ, Yau KW, Frings S (2003) The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J Gen Physiol.* 122(3):349-63.

Reisert J, Lai J, Yau KW, Bradley J. (2005) Mechanism of the excitatory Cl- response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron.* 45(4):553-61.

Ren J, Friedmann D, Xiong J, Liu CD, Ferguson BR, Weerakkody T, DeLoach KE, Ran C, Pun A, Sun Y, Weissbourd B, Neve RL, Huguenard J, Horowitz MA, Luo L. (2018) Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems. *Cell.* 175(2):472-487.e20.

Reuter D, Zierold K, Schröder WH, Frings S. (1998) A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J Neurosci.* 18(17):6623-30.

Reyes-Haro D, Müller J, Boresch M, Pivneva T, Benedetti B, Scheller A, Nolte C & Kettenmann H. (2010). Neuron-astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Gen Physiol* 135(6), 583-594.

Rimmele TS, Rocher AB, Wellbourne-Wood J, Chatton JY. (2017) Control of glutamate transport by extracellular potassium: basis for a negative feedback on synaptic transmission. *Cereb Cortex.* 27(6):3272-3283.

*Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002): Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 99: 8384–8388.*

Robillard KN, Lee KM, Chiu KB, MacLean AG. (2016). Glial cell morphological and density changes through the lifespan of rhesus macaques. *Brain Behav Immun.* 55,60-69.

Roche, J.P., Westenbroek, R., Sorom, A.J., Hille, B., Mackie, K., Shapiro, M.S. (2002) Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K<sup>+</sup> channels. *Br. J. Pharmacol.* 137:1173–1186.

Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM. (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci.* 21(3):823-33.

Rodriguez M, Sabate M, Rodriguez-Sabate C, Morales I. (2013) The role of non-synaptic extracellular glutamate. *Brain Res Bull.* 93: 17-26.

Roepke TA, Smith AW, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. (2012) Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor-mediated inhibition of the M-current in hypothalamic POMC neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302(11):E1399-406.

Ros H., Magill PJ., Moss J., Bolam JP., Mena-Segovia J. (2010) Distinct types of noncholinergic pedunculopontine neurons are differentially modulated during global brain states. *Neuroscience* 170, 78–91.

Rose CF, Verkhratsky A, Parpura V. (2013) Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 41(6):1518-24.

Rosenberg PA, Knowles R, Knowles KP, Li Y. (1994) Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J Neurosci.* 14(5 Pt 2):2953-65.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 403(6767):316-21.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 403(6767):316-21.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 403(6767):316-21.

Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez CJ, Martinez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O (2008): A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology (Berl)*;198:565–576.

Rye DB., Lee, HJ., Saper CB., Wainer BH. (1988) Medullary and spinal efferents of the pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J. Comp. Neurol.* 269, 315–341.

Ryugo DK, Willard FH. (1985) The dorsal cochlear nucleus of the mouse: a light microscopic analysis of neurons that project to the inferior colliculus. *J Comp Neurol.* 242(3):381-96.

Saitoh, K., Hattori, S., Song, W. J., Isa, T., Takakusaki, K. (2003) Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 18, 879–886.

Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M. (2002) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 329(1):13-6.

Salloum RH, Yurosko C, Santiago L, Sandridge SA, Kaltenbach JA (2014) Induction of enhanced acoustic startle response by noise exposure: dependence on exposure conditions and testing parameters and possible relevance to hyperacusis. *PLoS One*. 9(10):e111747.

Saper, C. B., Loewy, A. D. (1982) Projections of the pedunculo-pontine tegmental nucleus in the rat: Evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res*. 252, 367-372.

Sasaki K, Suzuki M, Mieda M, Tsujino N, Roth B, Sakurai T. (2011) Pharmacogenetic modulation of orexin neurons alters sleep/wakefulness states in mice. *PLoS One*. 2011; 6(5):e20360.

Sasaki T., Beppu K., Tanaka K. F., Fukazawa Y., Shigemoto R., Matsui K. (2012). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20720–20725.

Schlichter LC, Mertens T, Liu B. (2011) Swelling activated Cl<sup>-</sup> channels in microglia: Biophysics, pharmacology and role in glutamate release. *Channels (Austin)*. 5(2):128-37.

Schneppenheim R, Castaman G, Federici AB, Kreuz W, Marschalek R, Oldenburg J, Oyen F, Budde U. (2007) A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3. *J Thromb Haemost*. 5(4):722-8.

Schoepp DD (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 299(1):12-20.

Schools GP, Kimelberg HK (1999) mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J Neurosci Res*. 58(4):533-43.

Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. (2008a) Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*. 134(6):1019-29.

Schroeder JP, Spanos M, Stevenson JR, Besheer J, Salling M, Hodge CW. (2008b) Cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior is associated with increased ERK1/2 phosphorylation in specific limbic brain regions: blockade by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*. 55(4):546-54.

Schuld A., Hebebrand J., Geller F., Pollmächer T. (2000) Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet*. 355(9211):1274-5.

Schweitzer P (2000): Cannabinoids decrease the K<sup>+</sup> M-Current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 20:51–58

Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonicly active GABA<sub>A</sub> receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends in Neurosci* 27(5): 262-269.

Shan D, Yates S, Roberts RC, McCullumsmith RE. (2012) Update on the neurobiology of schizophrenia: a role for extracellular microdomains. *Minerva Psichiatr.* 53(3):233-249.

Shen HW, Scofield MD, Boger H, Hensley M, Kalivas PW. (2014) Synaptic glutamate spillover due to impaired glutamate uptake mediates heroin relapse. *J Neurosci.* 34(16):5649-57.

Shigetomi, E., Bowser, D. N., Sofroniew, M. V., Khakh, B. S. (2008) Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 28(26):6659-63.

Sica R. E. (2015) Could astrocytes be the primary target of an offending agent causing the primary degenerative diseases of the human central nervous system? A hypothesis. *Med. Hypotheses* 84, 481–489.

Smith RS, Weitz CJ, Araneda RC (2009) Excitatory actions of noradrenaline and metabotropic glutamate receptor activation in granule cells of the accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 102(2):1103-14.

Soares C, Lee KF, Nassrallah W, Béïque JC. (2013) Differential subcellular targeting of glutamate receptor subtypes during homeostatic synaptic plasticity. *J Neurosci.* 33(33):13547-59.

Soiza-Reilly M, Goodfellow NM, Lambe EK, Commons KG (2015) Enhanced 5-HT<sub>1A</sub> receptor-dependent feedback control over dorsal raphe serotonin neurons in the SERT knockout mouse. *Neuropharmacology.* 89:185-92.

Soria FN, Pérez-Samartín A, Martín A, Gona KB, Llop J, Szczupak B, Chara JC, Matute C, Domercq M. (2014) Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *J Clin Invest.* 124(8):3645-55.

Soria FN, Zabala A, Pampliega O, Palomino A, Miguelez C, Ugedo L, Sato H, Matute C, Domercq M. (2016) Cystine/glutamate antiporter blockage induces myelin degeneration. *Glia.* 64(8):1381-95.

Soria FN, Zabala A, Pampliega O, Palomino A, Miguelez C, Ugedo L, Sato H, Matute C, Domercq M. (2016) Cystine/glutamate antiporter blockage induces myelin degeneration. *Glia.* 64(8):1381-95.

Spann, B. M., Grofova, I. (1989) Origin of ascending and spinal pathways from the nucleus pedunculopontinus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 283, 13-27.

Stella N (2009) Endocannabinoid signalling in microglial cells. *Neuropharmacology.* 244-253

Stella N. (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*. 48(4):267-77.

Stephan AB, Shum EY, Hirsh S, Cygnar KD, Reisert J, Zhao H. (2009) ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14;106(28):11776-81.

Ster J, Mateos JM, Grewe BF, Coiret G, Corti C, Corsi M, Helmchen F, Gerber U (2011) Enhancement of CA3 hippocampal network activity by activation of group II metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(24):9993-7.

Steriade, M., Glenn, L. L. (1982) Neocortical and caudate projections of intralaminar thalamic neurons and their synaptic excitation from midbrain reticular core. *J Neurophysiol* 48: 352–371

Steriade, M., McCarley, R. W. (2005): Brainstem control of wakefulness and sleep. New York: Springer.728pp

Steriade, M., Pare, D., Parent, A., Smith, Y. (1988) Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neuroscience* 25: 47–67

Stern JE, Son S, Biancardi VC, Zheng H, Sharma N, Patel KP. (2016) Astrocytes contribute to angiotensin II stimulation of hypothalamic neuronal activity and sympathetic outflow. *Hypertension*. 68(6):1483-1493.

Stöhr H, Heisig JB, Benz PM, Schöberl S, Milenkovic VM, Strauss O, Aartsen WM, Wijnholds J, Weber BH, Schulz HL. (2009) TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals. *J Neurosci*. 29(21):6809-18.

Su M., Li L., Wang J., Sun H., Zhang L., Zhao C., Xie Y., Gamper N., Du X., Zhang H. (2019) Kv7.4 channel contribute to projection-specific auto-inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Front Cell Neurosci*. 13, 557.

Sugiura Y, Ko CP (1997): Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J. Neuroscience*; 17: 1101–1111

Suh, B. C., Hille, B. (2002) Recovery from muscarinic modulation of M-current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35, 507–520

Sutherland DP, Masterton RB, Glendenning KK. (1998) Role of acoustic striae in hearing: reflexive responses to elevated sound-sources. *Behav Brain Res*. 97(1-2):1-12.



Suzuki R, Shimojima H, Funahashi H, Nakajo S, Yamada S, Guan JL, Tsurugano S, Uehara K, Takeyama Y, Kikuyama S, Shioda S. (2002) Orexin-1 receptor immunoreactivity in chemically identified target neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 324(1):5-8.

Syková E, Vargová L. (2008) Extrasynaptic transmission and the diffusion parameters of the extracellular space. *Neurochem Int.* 52(1-2):5-13.

Syková E. (2004) Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neuroscience.* 129(4):861-76.

Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature.* 348(6300):443-6.

Szucs G, Rusznák Z. (2002) Cellular regulatory mechanisms influencing the activity of the cochlear nucleus: a review. *Acta Physiol Hung.* 89(4):375-414.

Takakusaki K, Kitai ST (1997) Ionic mechanisms involved in the spontaneous firing of tegmental pedunculopontine nucleus neurons of the rat. *Neuroscience* 78(3):771-94.

Takakusaki K, Shiroyama T, Yamamoto T, Kitai ST (1996) Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *Journal of Comparative Neurology* 371 (3):345-61.

Takakusaki K., Chiba R., Nozu T., Okumura T. (2016) Brainstem control of locomotion and muscle tone with special reference to the role of the mesopontine tegmentum and medullary reticulospinal systems. *J Neural Transm* 123, 695–729.

Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R. (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience.* 106(3):481-503.

Testa-Silva G, Verhoog MB, Goriounova NA, Loebel A, Hjorth J, Baayen JC, de Kock CP & Mansvelder HD. (2010). Human synapses show a wide temporal window for spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci.* 2,12.

Thomson AM. (2000) Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses. *Trends Neurosci.* 23(7):305-12.

Tian GF., Azmi H., Takano T., Xu Q., Peng W., Lin J., Oberheim N., Lou N., Wang X., Zielke HR., Kango J., Nedergaard N. (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11, 973–981.

Tohyama, M., Takatsuji, K. (Eds.) (1998) Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat, Oxford University Press, New York, pp. 1–337.

Touhara K. (2007) Deorphanizing vertebrate olfactory receptors: recent advances in odorant-response assays. *Neurochem Int.* 51(2-4):132-9.

Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.* 438(1-2):71-5.

Tsujino N, Sakurai T. (2013) Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci.* 7:28.

Tsujino N., Sakurai T. (2009) Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.* 61(2):162-76.

Tzingounis AV, Heidenreich M, Kharkovets T, Spitzmaul G, Jensen HS, Nicoll RA, Jentsch TJ (2010) The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(22):10232-7.

Tzingounis AV, Nicoll RA. (2008) Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(50):19974-9.

Unal CT., Golowasch JP., Zaborszky L. (2012) Adult mouse basal forebrain harbors two distinct cholinergic populations defined by their electrophysiology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6(21).

Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1762(11-12):1068-82.

van der Zeyden M, Oldenziel WH, Rea K, Cremers TI, Westerink BH. (2008) Microdialysis of GABA and glutamate: analysis, interpretation and comparison with microsensors. *Pharmacol Biochem Behav.* 90(2):135-47.

Vandenberg RJ, Ryan RM. (2013) Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev.* 93(4):1621-57.

Vaughn LK, Denning G, Stuhr KL, de Wit H, Hill MN, Hillard CJ. (2010): Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? *Br. J. Pharmacol.*;160(3):530-43.

Veleanu M., Axen TA., Kristensen MP., Kohlmeier KA. (2016) Comparison of bNOS and chat immunohistochemistry in the laterodorsal tegmentum (LDT) and the pedunclopontine tegmentum (PPT) of the mouse from brain slices prepared for electrophysiology. *J Neurosci Methods* 263:23–35.

Verhoog MB, Goriounova NA, Obermayer J, Stroeder J, Hjorth JJ, Testa-Silva G, Baayen JC, de Kock CP, Meredith RM, Mansvelder HD. (2013). Mechanisms underlying the rules for associative plasticity at adult human neocortical synapses. *J Neurosci.* 33(43),17197-208.

Verkhratsky, A., Kirchhoff, F. (2007) NMDA receptors in glia. *Neuroscientist* 13(1):28-37.

Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J., Parpura, V. (2012) Calcium signalling in astroglia. *Molecular and Cellular Endocrinology* 353(1-2):45-56.

Vyklický, L. Jr., 1993. Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* 470:575-600.

Walter L, Stella N. (2003) Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia.* 44(1):85-90.

Wang HL., Morales M. (2009) Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 29(2), 340–358.

Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS (2000) Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol.* 57(6):1218-23.

Wang HS., Pan Z., Shi W., Brown BS., Wymore RS., Cohen IS., Dixon JE., McKinnon D. (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science.* 282:1890–1893.

Wang YF, Parpura V. (2016) Central role of maladapted astrocytic plasticity in ischemic brain edema formation. *Front Cell Neurosci.* 10:129.

Warr O, Takahashi M, Attwell D (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol.* 514 (Pt 3):783-93.

Wendt S, Wogram E, Korvers L, Kettenmann H. (2016) Experimental cortical spreading depression induces NMDA receptor dependent potassium currents in microglia. *J Neurosci.* 36(23):6165-74.

Wendt S, Wogram E, Korvers L, Kettenmann H. (2016) Experimental cortical spreading depression induces NMDA receptor dependent potassium currents in microglia. *J Neurosci.* 36(23):6165-74.

Wenk, H., Bigl, V., Meyer, U. (1980) Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res* 2:295–316

Wild AR, Bollands M, Morris PG, Jones S. (2015) Mechanisms regulating spill-over of synaptic glutamate to extrasynaptic NMDA receptors in mouse substantia nigra dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci.* 42(9):2633-43.

Wilson DIG, MacLaren DAA, Winn P (2009) Bar pressing for food: differential consequences of lesions to the anterior versus posterior pedunculopontine. *Eur J Neurosci.* 30(3):504-13.

Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature*, 410: 588–592.

Wilson-Poe AR, Mitchell VA, Vaughan CW. (2013) Postsynaptic mGluR mediated excitation of neurons in midbrain periaqueductal grey. *Neuropharmacology.* 66:348-54.

Wolf NJ., Butcher LL. (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res. Bull.* 16, 603–637.

Wolf, N. J., Butcher, L. L. (2011) Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behav Brain Res.* 221(2):488-98.

Xi MC, Morales FR, Chase MH. (2001) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res.* 901(1-2):259-64.

Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science.* 342(6156):373-7.

Xiong B, Alkharabsheh A, Manohar S, Chen GD, Yu N, Zhao X, Salvi R, Sun W (2017) Hyperexcitability of inferior colliculus and acoustic startle reflex with age-related hearing loss. *Hear Res.* 350:32-42.

Yamanaka A., Tsujino N., Funahashi H., Honda K., Guan JL., Wang QP., Tominaga M., Goto K., Shioda S., Sakurai T. (2002) Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(4):1237-45.

Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* 455(7217):1210-5.

Yao W, Godfrey DA, Levey AI. (1996) Immunolocalization of muscarinic acetylcholine subtype 2 receptors in rat cochlear nucleus. *J Comp Neurol.* 373(1):27-40.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci.* 23(9):3588-96.

Ye, M., Hayar, A., Strotman, B., Garcia-Rill, E. (2010) Cholinergic modulation of fast inhibitory and excitatory transmission to pedunculopontine thalamic projecting neurons. *J Neurophysiol* 2010; 103:2417–2432.

Yeomans JS., Lee J., Yeomans MH., Steidl S., Li L.(2006) Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience*. 142(4):921-9.

Zhang C, Ding D, Sun W, Hu BH, Manohar S, Salvi R (2022a) Time- and frequency-dependent changes in acoustic startle reflex amplitude following cyclodextrin-induced outer and inner cell loss. *Hear Res*. 415:108441.

Zhang J, Wang M, Wei B, Shi J, Yu T (2022b) Research progress in the study of startle reflex to disease states. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 18:427-435.

Zhang JS, Kaltenbach JA. (2000) Modulation of spontaneous activity by acetylcholine receptors in the rat dorsal cochlear nucleus in vivo. *Hear Res*. 140(1-2):7-17.

Zhang M, Biancardi VC, Stern JE. (2017) An increased extrasynaptic NMDA tone inhibits A-type K<sup>+</sup> current and increases excitability of hypothalamic neurosecretory neurons in hypertensive rats. *J Physiol*. 595(14):4647-4661.

Zhang S, Oertel D. (1993) Giant cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: intracellular recordings in slices. *J Neurophysiol*. 69(5):1398-408.

Zhang Z, Séguéla P (2010) Metabotropic induction of persistent activity in layers II/III of anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex*. 20(12):2948-57.

Zhao C, Su M, Wang Y, Li X, Zhang Y, Du X, Zhang H (2017) Selective modulation of K<sup>+</sup> channel Kv7.4 significantly affects the excitability of DRN 5-HT neurons. *Front Cell Neurosci* 14;11:405.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(10):5780-5.

Zimmer ER., Torrez VR., Kalinine E., Augustin MC., Zenki KC., Almeida RF., Hansel G., Muller PA., Souza OD., Mchado-Viera R., Portela VR. (2015) Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype. *Front. Cell. Neurosci*. 9:219.

Zur Nieden R, Deitmer JW (2006) The role of metabotropic glutamate receptors for the generation of calcium oscillations in rat hippocampal astrocytes in situ. *Cereb Cortex*. 16(5):676-87.