

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A nucleus pedunculopontinus direkt neuronális és indirekt, asztrocitafüggő neuromodulációs mechanizmusainak vizsgálata

Bordás Csilla

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

Debrecen, 2017

1. Tartalomjegyzék

2. Rövidítésjegyzék	4
3. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	7
3.1. A nucleus pedunculopontinus.....	7
3.1.1. A retikuláris aktivációs rendszer.....	8
3.1.2. A középagy és a bazális előagy kolinerg struktúrái	9
3.1.4. A PPN anatómiája, kapcsolatai.....	10
3.1.5. A PPN sejtípusai, markerei.....	12
3.1.6. A PPN szerepe az alvás-ébrenlét szabályozásában	16
3.1.7. A PPN-t befolyásoló neuromodulációs hatások.....	17
3.2. Az M-áram	19
3.3. Az endokannabinoid rendszer	24
3.4. Asztrocita-neuron kommunikáció.....	27
3.4.1. Általános megfontolások.....	27
3.4.2. Az asztrociták optogenetikai aktivációja.....	31
3.4.3. Asztrociták által aktivált neuronális áramok.....	33
4. Célkitűzések	37
5. Eszközök és módszerek	38
5.1. Oldatok.....	38
5.2. Állatok, preparálás.....	38
5.3. Elektrofiziológiai mérések	40
5.4. Farmakológia.....	42
5.5. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése.....	43
5.6. A biocitinnel jelölt neuronok láthatóvá tétele.....	44
5.7. Immunhisztokémia.....	45
5.8. Statisztikai analízis	46
6. Eredmények	47
6.1. Direkt neuronális neuromodulációs mechanizmusok vizsgálata	47
6.1.1. A kolinerg neuronok rendelkeznek M-árammal, míg a GABAerg neuronok nem	48

6.1.2. Az M-áram jeleléte vagy hiánya hozzájárul a kolinerg és a GABAerg neuronok közötti elektrofiziológiai különbségekhez	50
6.1.3. A magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkra hatással van az M-áram jelenléte.....	56
6.2. A PPN neuronokon érvényesülő indirekt, asztrocita-függő neuromodulációs hatások vizsgálata .	59
6.2.1. A PPN neuronjain lévő CB1 receptorok stimulációjának szinaptikus és extraszinaptikus hatásai	60
6.2.2. Az asztrociták optogenetikai aktivációjának hatása a PPN neuronjain.....	65
6.2.3. A CB1 receptor stimuláció által kiváltott direkt szinaptikus hatások	69
6.2.4. A CB1 receptor preszinaptikus és asztrocitán való elhelyezkedése.....	75
7. Megbeszélés	79
7.1. A neuromodulációs hatások egyik neuronális extraszinaptikus komponense	79
7.1.1. Az M-áram mint a PPN neuronok egy funkcionális markere.....	79
7.1.2. Az M-áram hatása a PPN kolinerg neuronok tüzelési mintázatára	80
7.1.3. Az M-áram hatása a PPN kolinerg neuronok tüzelési mintázatára	81
7.1.4. Funkcionális jelentőség	84
7.2. A neuromodulációs hatások preszinaptikus és asztrocita-függő komponensei	84
7.2.1. Asztrociták aktivációja által kiváltott neuronális tónusos áramok.....	85
7.2.2. Az asztrociták optogenetikai aktivációja.....	86
7.2.3. A szinaptikus áramokra gyakorolt endokannabinoid és asztrocita-függő szabályozó hatások.	87
7.2.4. Funkcionális jelentőség	90
7.2.5. A direkt és indirekt neuromodulációs hatások sémás összefoglalása.....	92
8. Összefoglalás	93
9. Summary.....	94
10. Köszönetnyilvánítás.....	95
11. Hivatkozásjegyzék.....	96

2. Rövidítésjegyzék

2-AG	2-arachidonoilglicerol
5-HT ₁ , -2 és -7	5-hidroxitriptamin receptor receptorcsalád altípusai
ACEA	(5Z,8Z,11Z,14Z)- <i>N</i> -(2-kloroetil)ikoza-5,8,11,14-tetraenamid
aCSF	mesterséges agyfolyadék (artificial cerebrospinal fluid)
AEA	arachidonoyl ethanolamide
AI	adaptációs index
AM	acetoxi metilészter
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BAPTA-1	1,2-bis(o-aminofenoxi)etán- <i>N,N,N',N'</i> -tetraecetsav
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CatCh	nagy kalciumpermeabilitású channelrhodopsin (calcium translocating channelrhodopsin)
CB ₁ , -2	1-es és 2-es típusú kannabinoid receptor
ChAT	kolin acetiltranszferáz (choline acetyltransferase)
ChR2	channelrhodopsin-2
CPCCOEt	7-(hidroxi-imino) ciklopropa[b]króm-n-1a-karboxilát-etil-észter
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahidrokannabinol
D-AP5	D-2-amino-5-foszfopentanoát
DAG	diacilglicerol
DFNA2	non-syndromic sensorineural deafness type 2
DSE	depolarization-induced suppression of excitatory
DSI	depolarization-induced suppression of inhibition
EAAT	serkentő aminosav transzporter (excitatory amino acid transporter)
EEG	elektroencefalográfia
EGTA	etilén glikol tetraecetsav (ethylene glycol tetraacetic acid)
EPSC	excitatórikus posztzinaptikus áram (excitatory postsynaptic current)
fAHP	gyors utóhiperpolarizáció (fast afterhyperpolarization)

GABA	gamma-amino-vajsav
GAD	glutamát dekarboxiláz (glutamic acid decarboxylase)
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein)
GluN2B	NMDA receptor alegység
GPR55, GPR119	G-fehérje kapcsolt kannabinoid receptorok (G protein –coupled receptor)
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav,(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
ICU	imaging control unit
IgG	immunglobulin G
IL-1	interleukin-1
IP ₃	inozitol 1,4,5-trifoszfát
IPSC	inhibitorikus posztszinaptikus áram (inhibitory postsynaptic current)
KCNQ	Kv7 feszültségfüggő kálium csatorna alternatív elnevezése
LC	locus coeruleus
LDT	nucleus laterodorsalis tegmentalis (laterodorsal tegmental nucleus)
LHRH	luteinizáló hormon-releasing hormon
LiGluR	fényaktiválható glutamát receptor mutáns
LTD	hosszú távú depresszió (long-term depression)
LTP	hosszú távú potenciózás (long-term potentiation)
mAHP	közepes utóhiperpolarizáció (medium afterhyperpolarization)
mGluR I	I-es csoportú metabotróp glutamát receptor
mGluR II	II-es csoportú metabotróp glutamát receptor
mIPSC	miniatűr inhibitorikus posztszinaptikus áram (inhibitory postsynaptic current)
M1	1-es típusú muszkarinos acetil-kolin receptor
M3	3-as típusú muszkarinos acetil-kolin receptor
MPEP	2-metil-6-(feniletinil) piridin
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]kinoxalin-2,3-dion,(2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl benzo[f]quinoxaline-2,3dione)
NMDA	N-metil-D-aspartát

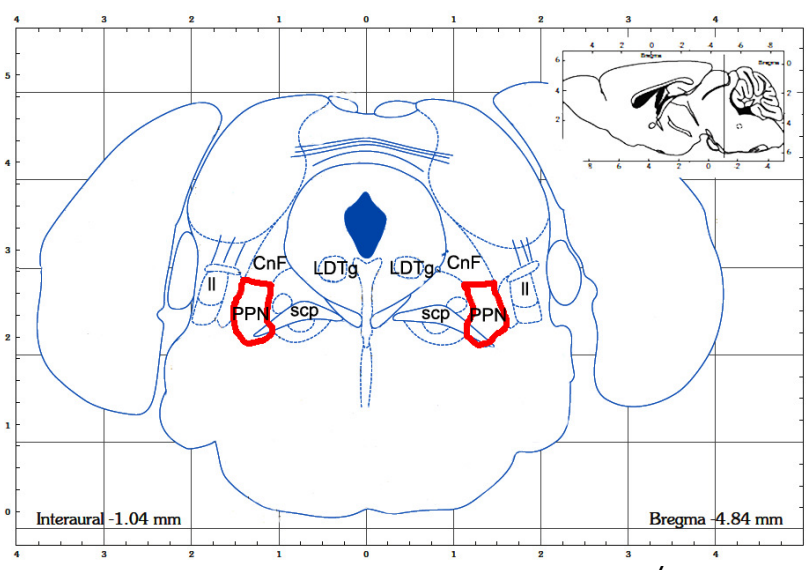
OGB	Oregon Green BAPTA-1 AM
OptoXR	fényaktiválható G protein kapcsolt metabotróp receptor
OX1	1-es típusú orexin receptor
P2X	purinerg 2-es típusú receptor
PB	foszfát puffer
PBS	foszfát puffer só (phosphate-buffered saline)
PIP ₂	foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PPN	nucleus pedunculopontinus (pedunculopontine nucleus)
PPR	páros pulzus arány (paired pulse ratio)
RAS	retikuláris aktivációs rendszer (reticular activating system)
REM	gyors szemmozgás (rapid eye movement)
RMP	nyugalmi membránpotenciál (resting membrane potential)
sAHP	lassú utóhiperpolarizáció (slow afterhyperpolarization)
sEPSC	spontán serkentő posztszinaptikus áram
SIC	lassú befelé irányuló áram (slow inward current)
sIPSC	spontán inhibitorikus posztszinaptikus áram
SOC	lassú kifelé irányuló áram (slow outward current)
STD	rövid távú gátlás (short-term depression)
TNF α	tumor nekrosis faktor α
TTX	tetrodotoxin
VGAT	vezikuláris GABA transzporter
VGLUT2	2-es típusú vezikuláris glutamát transzporter
VTA	ventralis tegmentális area
XE991	10,10bis(4-Pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone dihydrochloride
WIN55,212-2	(R)-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3[(4-morfolinil)metil]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinil]-(1-naftalenil)methanone mesylat

3. Bevezetés és irodalmi áttekintés

3.1. A nucleus pedunculopontinus

A nucleus pedunculopontinus (PPN) a középagyban, a mezopontin tegmentumban elhelyezkedő kolinerg struktúra. A magcsoport a középagyban pedunculus cerebellaris superiorától lateralisán és a lemniscus lateralistól medialis irányban helyezkedik el. Rostralisán a substantia nigra posterolateralis része határolja (Garcia-Rill és Skinner, 1991), míg dorsalisán a nucleus cuneiformis és a subcuneiformis. A középagyban ez a magcsoport alkotja az egyik fő kolinerg sejtcsoportosulást a nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT) mellett (1. ábra). A PPN nem homogén, ugyanis különböző méretű szómával, dendritfával és többféle neurokémiai fenotípussal rendelkező neuronok találhatók benne. A PPN-t klasszikusan két részre osztják a kolinerg neuronok sűrűsége alapján, ez a két rész a pars dissipata és a pars compacta (Olszewski és Baxter, 1982). Későbbi tanulmányok sagittális irányú metszetekben próbálták topográfiailag meghatározni a PPN-en belül elhelyezkedő különböző típusú neuronok helyzetét, amely korrelált a korábbi, csak a kolinerg sejtek sűrűségét figyelembe vevő felosztással (Martinez-Gonzalez és mtsai., 2011).

A PPN-t a retikuláris aktivációs rendszer (RAS) részeként tartják számon.



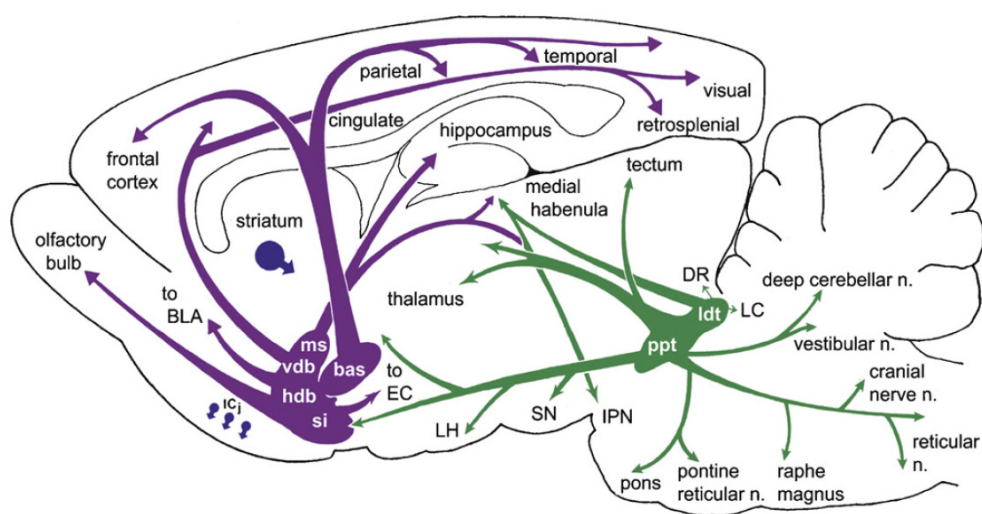
1. ábra. A PPN elhelyezkedése coronalis síkban. A PPN határait piros szín jelöli. CnF= nucleus cuneiformis; LDTg= nucleus laterodorsalis tegmentalis, ll= lemniscus lateralis, scp= pedunculus cerebellaris superior (Franklin és Paxinos, 2007).

3.1.1.A retikuláris aktivációs rendszer

A RAS az emlősökben az éberség és a figyelem szervezésében, irányításában játszik fontos szerepet. Ez egy agytörzsben elhelyezkedő diffúz, hálózatos rendszer, mely a szenzoros receptorok felől kap bemenetet és az agykéreg felé küld felszálló rostokat. Több agytörzsi mag tartozik a rendszerhez, mint például a nucleus parabrachialis, nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT), a PPN, locus coeruleus, a raphe magvak és a ventralis tegmentalis area (VTA). Ezeken kívül még a bazális előagyi kolinerg és egyes hypothalamikus magvak is hozzá tartoznak. A rendszer számos bemenettel rendelkezik, többek között a gerincvelőből felszálló szenzoros pályák felől (fájdalom-, tapintási-, hőingerek), a szemből érkező vizuális ingerek, impulzusok a hallópálya felől. A RAS aktiválódása a thalamuson keresztül a kéreg működését befolyásolja, de egyúttal aktiválhat leszálló pályákat is. Parancsot közvetíthet a testtartás megváltoztatására (pl. a startle reflexen keresztül), és az izomtónus szabályozásában is szerepet kap. A RAS a cortexet két fő útvonalon éri el, van egy dorzális és egy ventrális útvonala (Steriade és McCarley, 2003). A dorzális útvonal részeiként tartják számon a középagy, a híd, a medullaris formatio reticularis glutamaterg magjait (Cornwall és Philipson, 1988; Newman és Ginsberg, 1994.; Steriade és Glenn, 1982; Steriade és mtsai, 1988), illetve a nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT) és a PPN kolinerg projekcióit a thalamus felé (Hallanger és mtsai., 1987; Steriade és mtsai., 1988). Ezek a magok a thalamuson keresztül egymást átfedve érik el a neocortex területeit (Jasper, 1949; Jones és Leavitt, 1974; Lorente de No, 1938; Papez, 1956; Starzl és Magoun, 1951). Attól függően, hogy a cortex mely területére mennyi rostot küldenek, az egyes magcsoportok projekcióinak száma eltér (Van der Werf és mtsai, 2002). A RAS ventrális útvonalához tartozó magvak kapcsolatot létesítenek a hypothalamus hátsó részének és a bazális előagy neuronjaival, ezeken keresztül érve el a cortexet. Ezen rendszerek szinapszist alkotnak lateralis hypothalamusban található glutamaterg, hisztaminerg és orexinerg neuronokkal. A bazális előagy kolinerg, GABAerg és glutamaterg sejteire is történik átkapcsolódás, ahonnan az agykéreg aktivációja történik. A rendszer egyik ága a rostralis bazális előagyi részt idegzi be. (Détári és mtsai, 1999; Dringenberg és Vanderwolf 1998; Jones 2003; Semba, 2000)

3.1.2. A középgagy és a bazális előagy kolinerg struktúrái

A PPN-t a RAS egyik kolinerg magjaként tartják számon, de emellett a magcsoport mellett más kolinerg struktúrák is léteznek. A nem motoros kolinerg magcsoportok a bazális előagyban és az agytörzs felső részében helyezkednek el, innen projiciálnak más agyi központok felé. Szokásos az agytörzsi és előagyi kolinerg struktúrákat Ch1-Ch6 jelöléssel is illetni (Mesulam és Mtsai., 1983).



2. ábra. Bazális előagyi és agytörzsi kolinerg magcsoportok. A bazális előagyi kolinerg magcsoportokat lila színnel jelölték (ms: nucleus septalis medialis; vdb: nucleus striae diagonalis verticalis; hdb: nucleus striae diagonalis horizontalis; si: substantia innominata). Zöld színnel a középgagy kolinerg struktúrákat jelölték (ppt: nucleus pedunculopontinus; ldt: nucleus laterodorsalis tegmentalis; cranial nerve n.: V., VII. és a XII. agyideg motoros magvai, nucleus spinalis n. V.; Woolf és Butcher, 2011).

A Ch1 és Ch2 csoportba tartozik a nucleus septalis medialis és a nucleus striae diagonalis verticalis, ezek a hippocampus legfontosabb kolinerg beidegző területeit képezik. A septum kolinerg magvai a Ch1-et, míg a nucleus striae diagonalis verticalis főágából kiinduló útvonal a Ch2-t alkotja, melyek a hippocampus kolinerg beidegzéséért felelősek. A Ch3-ba tartozik a nucleus striae diagonalis horizontalis főágának laterális része, a bulbus olfactorius legfőbb kolinerg bemeneteként tartják számon. A Ch4-es útvonal a cortexet és az amygdalát látja el

kolinerg beidegzéssel, mely a nucleus basalis magnocellularis kolinerg magjaiból indul (Johnston és mtsai., 1981). A patkány Ch4 útvonala egyéb magokból is származik a nucleus basalis mellett, melyek a substantia innominata (Bigl és mtsai 1982; Lehmann 1980; Wenk és mtsai, 1980; Henderson, 1981), nucleus striae diagonalis, nucleus ansa lenticularis (Bigl és mtsai 1982) és a nucleus preopticus magnocellularis magjaiból áll.

A Ch5-ös a PPN-t jelöli, amely a pontomesencephalicus formatio reticularisban helyezkedik el, és a Ch6 pedig a periventrikuláris area nucleus laterodorsalis tegmentalisát (LDT) foglalja magába. Ezek a kolinerg útvonalak a thalamus fő kolinerg bemenetét képezik (2. ábra; Woolf és Butcher, 2011).

3.1.4. A PPN anatómiája, kapcsolatai

A PPN-t, mint magot a kolinerg neuronok kimutatásával azonosították. Ezek a tanulmányok immunhisztokémiával, kolin-acetiltranszferáz enzim ellen termeltetett monoklonális antitest segítségével mutatták meg szelektíven a kolinerg neuronok elhelyezkedését (Eckstein és Sofroniew, 1986; Mesulam és mtsai, 1984; Satoh és Fibiger, 1986, Vincent és Reiner, 1987). A kolinerg sejtek ezen a területen 40%-kal nagyobbak mutatkoztak, mint a kolin-acetiltranszferáz immunonegatív sejtek (Rye és mtsai, 1987; Honda és Semba, 1995). Újabb kísérletek alapján megállapították, hogy a PPN-en belül különbözik a kolinerg sejtek eloszlása rostralis irányból caudalis irány felé haladva. A kolinerg sejtek száma és aránya növekszik a PPN caudalis része felé (Mena-Segovia és mtsai, 2009).

Felszálló projekcióit több módszerrel is kutatták, így a PPN-nek egyre több struktúrával való kapcsolatára derült fény. A PPN-be triciált aminosavakat injektálva anterográd jelölést kapott számos rostralisán elhelyezkedő struktúra, mint például a substantia nigra, globus pallidus, hypothalamus lateralis része, bazális előagy, frontális cortex (Lavoie and Parent, 1994b, 1994c Saper és Loewy, 1982 Sugimoto és Hattori, 1984). Más kutatásokban búzacsíra agglutinin-torma peroxidázt injektáltak a PPN területére, amely szintén anterográd módon jelölt meg még több struktúrát az előbbieket kiegészítve, például a gerincevelő köztes lamináit cervicalis és thoracalis

szinteken (Canteras és mtsai., 1990; Goldsmith és van der Kooy, 1988; Jackson és Crossman, 1981, 1983; Redgrave és mtsai., 1987).

A PPN fontos kapcsolatainak egyike a bazális ganglionokkal való reciprok kommunikáció (Jackson és Crossman, 1983; Moon Edley és Graybiel, 1983; Nauta és Mehler, 1969; Sugimoto és Hattori, 1984). Különböző funkciójú PPN neuronok idegzik be a bazális ganglionokat, és a bazális ganglionok rostokat küldenek a PPN-be, ahol egy másik neuronpopulációt látnak el bemenettel (Pahapill és Lozano, 2000; Mena-Segovia és mtsai., 2004); ez a tény egyben példát is szolgáltat a PPN heterogenitására.

A substantia nigra és a PPN között lévő reciprok kapcsolatot anatómiai és elektrofiziológiai vizsgálatokkal támasztották alá, (Beninato és Spencer, 1987; Clarke és mtsai., 1987) illetve elektronmikroszkópos megfigyeléssel kimutatták a substantia nigra felől érkező szinaptikus végződéseket néhány PPN neuron dendritjein (Spann és Grofova, 1990).

A két fő mezopontin kolinerg mag -a PPN és a LDT- számos részen átfed projekcióikban, de az LDT inkább a középvonal illetve a limbikus struktúrák felé projiciál, míg a PPN a lateralisán elhelyezkedő motoros struktúrák (mint pl. a substantia nigra és a dorsomedialis striatum) és a colliculus superior felé (Woolf és Butcher, 1986). A leszálló útvonalak végpontjaiként tartják számon a mély cerebellaris magvakat (Dellovade és mtsai., 1988; Newman és Ginsberg, 1992), a pontomedullaris formatio reticularis magvait (Mitani és mtsai., 1988; Rye és mtsai., 1988), a medioventralis medulla oblongatát (Garcia- Rill és Skinner, 1987a, b; Rye és mtsai., 1987; Spann és Grofova, 1989), és a gerincvelő felé is tart néhány kisebb útvonal, amit patkányban figyeltek meg (Goldsmith és van der Kooy, 1988; Spann és Grofova, 1989). A PPN és az LDT anatómiailag részleges átfedést mutat néhány más magcsoporttal, a substantia nigrával (SN) és a locus coeruleussal (LC; Beckstead és mtsai., 1979; Moore és Bloom, 1979). Kimutatták, hogy egyes projekcióik is egymással párhuzamosan futnak. Ezek a kolinerg és katekolaminerg (LC-ra jellemző) beidegzések egyensúlyban vannak egyes területek szabályozásánál (DeFeudis, 1974), ilyenek a striatum (Barbeau, 1962), a mezopontin régió (Hobson és mtsai., 1986) és a gerincvelő (Jones és mtsai., 1986) felé történő projekciók. A kolinerg és kolinoceptív struktúrák között oda-vissza kommunikáció, beidegzés létezik. Ehhez hasonló, reciprok irányú kommunikáció ismert

még a szerotoninerg raphe magvak esetén is (Jackson és Grossman, 1981; Moon-Edley és Graybiel, 1983; Sugimoto és Hattori, 1984; Pickel és mtsai., 1977; Baraban és Aghajanian, 1981; Phillipson, 1979; Jones és Yang, 1985; Nauta, 1958; Sakai és mtsai., 1977; Leonard és Llinas, 1990; Jones, 1989; Reiner és Vincent, 1987).

A PPN leszálló kapcsolatai közé tartozik a tractus reticulospinalis, és ennek aktivációján keresztül a PPN ismétlődő aktivációja képes a motoros aktivitást befolyásolni. Leszálló kolinerg (és feltehetően glutamaterg) rostok innerválják a nucleus pontis oralist és nucleus pontis caudalist; valamint a nucleus gigantocellularist és a gerincvelőt (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Martinez-Gonzalez és mtsai, 2014; Spann és Grofova, 1989). A PPN részt vesz startle reflexben és annak ún. prepulzus gátlásában (Mori és mtsai 1989). A mozgást számos más idegi útvonal képes befolyásolni, így azt a PPN léziója nem képes teljesen megszüntetni (Swerdlow és Koob, 1987). Érdekes megfigyelés, hogy a PPN-be kolinerg agonistát injektálva szintén csökkent a motoros aktivitás. Ez egy gátló, valószínűleg muszkarinos kolinerg receptor létezését feltételezi a PPN-ben (Brudzynski és mtsai., 1988), és egy kolinerg feedback gátló rendszer jelenlétét valószínűsíti.

3.1.5. A PPN sejttípusai, markerei

3.1.5.1. Morfológiai markerek

Ahogy már feljebb említésre került, a PPN-t különböző méretű, eltérő neurokémiai fenotípussal és különböző kapcsolati rendszerrel bíró neuronok alkotják. A kolinerg neuronok mellett GABAerg és glutamaterg neuronok fordulnak elő nagy számban, melyek rostro-caudalis sűrűsége eltérő (Mena-Segovia és mtsai 2009; Wang és Morales, 2009). Parasagittalis irányban, a kolinerg és a glutamaterg neuronokhoz képest a GABAerg neuronok sűrűbben helyezkednek el a PPN rostralis részén, és arányuk csökken a PPN caudalis része felé (Mena-Segovia és mtsai 2009). Ezzel szemben a glutamaterg sejtek nagy számban találhatók a PPN caudalis részén (Wang és Morales, 2009). Ezt a három fő sejttípust találták a PPN-ben; de más neurokémiai markerek alapján különböző alpopulációk definiálhatóak ezeken a neuroncsoportokon belül is. A PPN-ben többféle kalciumkötő fehérje létezéséről számoltak be (Fortin és Parent, 1999; Dun és mtsai., 1995). A patkány PPN-ben a calbindin és calretinin kalciumkötő fehérjét nagyszámú

neuron fejezi ki, míg parvalbumin csak elvétve fordul elő (Martinez-Gonzalez és mtsai., 2009). Leginkább GABAerg és glutamaterg sejtekben mutatták ki ezen fehérjét, míg a kolinerg sejteken belül a calretinin ritkán, a calbindin soha nem fordul elő. A GABAerg sejtek, melyek a kalciumkötő fehérjét kifejezik, nagyobb számban találhatók meg a PPN rostralis részében, míg a calbindin és calretinin fehérjét expresszáló glutamaterg sejtek leginkább a PPN caudalis részén figyelhetők meg (Martinez-Gonzalez és mtsai., 2012).

A PPN neuronok szómájának mérete 15-80 μm közötti, alakjuk változatos (orsó alakú, sokszögű, háromszög alakú, de ritkán ovális vagy kerek). 2-5 dendrittel rendelkeznek, amelyek gyakran túlnyúlnak a mag határain túlra, a szomszédos struktúrákba (ld. Reese és mtsai, 1995). A kolinerg és nem-kolinerg neuronok között jelentős különbséget nem mutattak ki a szóma és a dendritek mérete szerint. Saját, nem közölt adataink alapján a kolinerg neuronok egy része rendelkezik dendrittüskékkel, míg a glutamaterg neuronok közül valamennyi rendelkezik morfológiailag változatos dendrittüskékkel. A kolinerg és nem-kolinerg neuronok közt jelentős különbség van azonban az axonjaik lefutásában és projekcióikban. A kolinerg neuronok axonjai átlagosan 5 kollaterálissal rendelkeznek, amelyek egy része a dorsalis, más része a ventralis felszálló pályát követi (a thalamus több magjáig, valamint a hypothalamushoz és bazális előagyhoz). Emellett ugyanazon neuron gyakran rendelkezik egy vagy több leszálló axonkollaterálissal is. Ezzel szemben, a nem-kolinerg neuronok axonhálózata sokkal egyszerűbb, kevésbé kiterjedt, és zömmel a substantia nigrát, ventralis tegmentalis areát és a hypothalamust innerválják. A magon belül a kolinerg neuronok axonjai számos varikozitást alkotnak, míg a nem-kolinerg neuronok esetében ritkábban lehet lokális kollaterálisokat találni (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Mena-Segovia és Bolam, 2017).

3.1.5.2. Membrántulajdonságok és tüzelési mintázat

A PPN-ben membrántulajdonságaik alapján a klasszikus leírások szerint háromféle neurontípust találtak. Kang és Kitai (1990) alapján, az alábbi három neurontípus különíthető el membrántulajdonságaik alapján: az A-árammal (tranziens kifelé irányuló áram, amely egy hiperpolarizáló impulzus után a kiindulási membránpotenciálra történő visszatérést késlelteti) rendelkező I. típus, az alacsony küszöbű kalciumtüskékkel bíró II. típus, és a két csoportba

egyértelműen nem beosztható III. csoport, amely egyik jellemzővel sem rendelkezett (Kang és Kitai, 1990; Saitoh és mtsai, 2003). A membránsajátságok szerint felállított csoportok nem feleltethetők meg határozottan egy neurokémiai tulajdonsággal bíró sejtcsoportnak sem: az I. és III. csoportban nem találtak kolinerg (ChAT-pozitív) neuronokat, míg a II. csoport 50%-a kolinergnek bizonyult (Kang és Kitai, 1990). Leonard és Llinas (1994) az I. csoportban 3%, a II. csoportban 75%, a III.-ban 22% kolinerg neuront talált.

Leonard és Llinas (1988) szintén háromféle sejtcsoportot azonosított a PPN-en belül elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján. Az első PPN neuron osztályra az volt jellemző, hogy nem volt képes önállóan spontán tüzelni, viszont depolarizáló áramimpulzusok hatására hosszú akciós potenciál sorozatot volt képes létrehozni. Ugyanezen neuronokon előzetes hiperpolarizációt követő depolarizáció TTX-rezisztens kalciumkonduktanciát aktivált, kalcium által létrehozott tetrodotoxin-szenzitív konduktanciával rendelkeztek elegendő mértékű hiperpolarizáció hatására, ami alacsony küszöbű kalciumtűskéket és burst tüzelési mintázatot hozott létre. Ezek a neuronok gátló bemenetet igényelnek ahhoz, hogy „burst” típusú tüzelést mutassanak. Ehhez hasonló, alacsony küszöbű kalciumtűskékel rendelkező neurontípust írtak le a nucleus laterodorsalisban is (Wilcox és mtsai, 1987). A második osztályban található neuronokra szintén jellemző az alacsony küszöbű kalciumtűskék megléte, valamint A-árammal is rendelkeznek. Ez az áram a felelős azért, hogy nem alakul ki visszacsapó ("rebound") aktiváció ezeken a sejteken. A harmadik osztályba olyan neuronok tartoznak, melyeknek van A-áramuk, de nem mutatnak alacsony küszöbű kalciumtűskéket. Ezek a sejtek szintén később kerülnek alapállapotba egy hiperpolarizáló impulzus után, és rendelkeznek áraminjekciók hatására kialakuló ismétlődő tüzeléssel. Az A-áram inaktíválódik a nyugalmi potenciál alatt és az akciós potenciál utóhiperpolarizáció szakasza alatt aktiválódik, így ez egy aránylag lassú de tónusos ismétlődő tüzelési mintázatot hoz létre, míg az első két típusra jellemző a burst típusú tüzelési mintázat (Steriade and McCarley, 1990). Leonard és Llinas (1994) az általuk felállított I. csoportban 3%, a II. csoportban 75%, a III.-ban 22% kolinerg neuront talált.

3.1.5.3. *In vivo* sajátosságok, kapcsolatok a kérgi oszcillációkkal

A PPN kolinerg és nem-kolinerg neuronjait *in vivo* tüzelési tulajdonságaik szerint is csoportosíthatjuk. Altatott patkányon, a fizioiógias lassú hullámú aktivitásra hasonlító szinkronizált kérgi aktivitás alatt a PPN kolinerg sejtjei kétféle tüzelési mintázatot mutattak. A nagyobb populációt a lassan tüzelő kolinerg neuronok alkották, melyek a kérgi lassú oszcillációk alatt az oszcillációk aktív, "up state" fázisával szinkron működnek. Létezett emellett egy kisebb csoport: a gyorsan tüzelő kolinerg neuronok, melyek a lassú oszcillációk alatt a passzív "down state" állapotával egy időben voltak aktívak (Mena-Segovia és mtsai, 2008). Ezeknél a neuronoknál nem találtak neurokémiai markert, ami alapján szét lehetne választani őket. Egyes nem-kolinerg neuronok, melyek valószínűleg glutamaterg neuronok, szintén két csoportba sorolhatók: az egyik csoport neuronjai gyorsan tüzelnek és a kérgi lassú oszcillációk "down state" állapotával szinkronitást mutatnak (Mena-Segovia és mtsai, 2008); a másik neuroncsoport vagy lassan (vagy nem) tüzelő neuronokból áll, melyek tüzelése független az agykéreg lassú oszcillációitól (Ros és mtsai, 2010). Felfedeztek egyéb nem-kolinerg, tónusosan vagy szabálytalanul tüzelő neuronokat is a PPN-ben, viszont ezeket nem választották külön neurokémiai markereik alapján (ti. hogy melyik a GABAerg és melyik a glutamaterg neuron; Ros és mtsai., 2010).

A PPN nemcsak a kortikális oszcillációs aktivitást szabályozza, hanem maga is mérhető extracelluláris oszcillációkat produkál (Brown, 2003). A PPN-ben fizioiógiai fontosságú a nagy amplitúdójú alfa oszcillációk (8-13 Hz) jelenléte. Ezeknek az oszcillációknak az amplitúdója csökken Parkinson-kór kialakulása esetén (Thevathasan és mtsai, 2012). Az alfa oszcillációk főképp a PPN caudalis részén voltak jelen. Béta oszcillációkat (14-30 Hz) is mértek a PPN sejtjein, melyek főképpen a PPN rostralis részén jelentek meg. A béta oszcillációk túlsúlyba kerülése együtt jelentkezett a Parkinson-kórban megfigyelt akinesióval (Thevathasan és mtsai, 2012; ld. Li és Zhang, 2015).

Egy *in vitro* megközelítést alkalmazó tanulmány kimutatta, hogy majdnem minden PPN neuron képes gamma frekvenciájú membránpotenciál-oszcillációkat létrehozni, ha depolarizáljuk őket. A cikk szerzőinek feltételezése alapján az oszcillációk a maximális tüzelési frekvenciát állítják be (Simon és mtsai, 2010). Ez a maximális tüzelési frekvencia P/Q kalcium csatornák jelenléte

miatt marad adott mértékű, mely így megállítja a tüzelési frekvencia további emelkedését a gamma frekvencia tartományban. Ezen a 40-60 Hz-es frekvencián ingerelve a PPN-t, mozgás válasz váltható ki decerebrált állatban (Garcia-Rill és mtsai, 2011).

A PPN esetében (csakúgy, mint a RAS más magjainál) a REM alvással szinkronban megfigyelt tüzelési aktivitás szerint lehetséges még csoportosítani a neuronokat. Ennek alapján elkülöníthetők a tüzelési frekvenciájukat a REM alvás alatt emelő (ún. REM-on) vagy azt csökkentő (ún. REM-off) neuronok (Steriade és mtsai, 1990a,b; ld. Garcia-Rill, 1991).

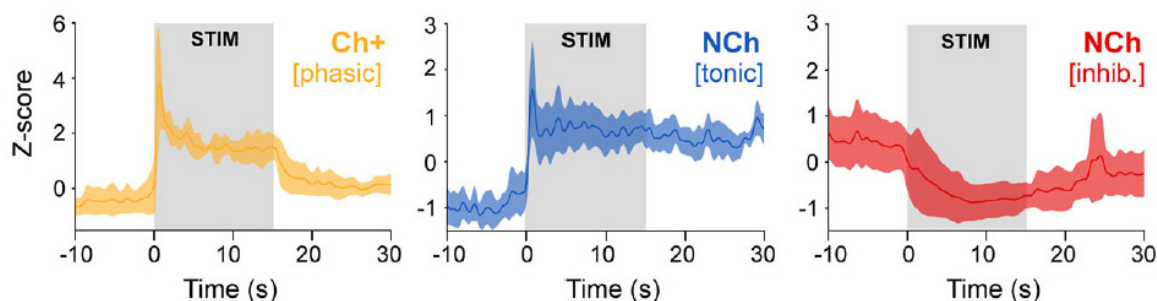
3.1.6. A PPN szerepe az alvás-ébrenlét szabályozásában

A PPN, mint a RAS egyik kolinerg magja, részt vesz az alvás-ébrenlét ciklusok szabályozásában (Moruzzi és Magoun, 1949; Steriade és mtsai, 1991). A klasszikus leírás szerint a PPN neuronok növelik tüzelési frekvenciájukat a REM (gyors szemmozgásokkal járó alvás – "rapid eye movement") alvás és ébrenlét alatt, viszont csökkentik tüzelési frekvenciájukat a lassú hullámú alvás alatt (Sakai és mtsai, 1990; Steriade és mtsai, 1990a,b; 1991; Datta és Siwek 2002).

A RAS és a PPN funkcióit leíró klasszikus megfigyeléseket részben támogatták, részben árnyalták az újabb, kombinált elektrofiziológia, képalkotó és opto-, kemogenetikai megközelítést alkalmazó újabb tanulmányok (ld. Mena-Segovia és Bolam, 2017). Az éber patkány PPN-jéből történő elvezetések megerősítették, hogy az ébrenlét és a REM alvás alatt a kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája megnő (aktív ébrenlét alatt 2, nyugodt ébrenlét alatt 1 Hz-re; Boucetta és mtsai, 2014; Cox és mtsai, 2016). Fontos azonban megjegyezni, hogy a kolinerg neuronok aktivációja átmenetinek bizonyult; a kortikális deszinkronizáció elején megnőtt a tüzelési frekvenciájuk, de ezt a frekvencia visszaesése követte akkor is, ha a kortikális deszinkronizáció fennmaradt (3. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a kolinerg neuronok aktivitása a kérgi aktivitás átmeneteivel egyidőben érhetőek tetten (Boucetta és mtsai, 2014; Petzold és mtsai, 2015). REM alvás alatt ugyancsak emelkedik a kolinerg neuronok tüzelési frekvenciája (3 Hz körüli értékre; Boucetta és mtsai, 2014). Bár a REM alvás spontán kialakulásához nem feltétlenül szükségesek kolinerg neuronok (Grace és mtsai, 2014), a már alvó állatban a PPN

kolinerg neuronok optogenetikai aktivációja REM alvást indukált (Van Dort és mtsai, 2015). Más tanulmányban, hasonló stimuláció a kortikális gamma oszcillációk rövid idejű kialakulása volt megfigyelhető (Furman és mtsai, 2015).

A kolinerg neuronokhoz hasonlóan, a GABAerg és glutamaterg neuronok ébrenlét és REM alvás alatt ugyancsak nagyobb frekvenciával tüzelnek. A kolinerg neuronokkal szemben azonban ez a frekvenciaemelkedés tartósan fennáll (Boucetta és mtsai, 2014; Cox és mtsai, 2016). A PPN glutamaterg neuronok kemogenetikai aktivációja az ébren töltött idő meghosszabbodásához vezet (Kroeger és mtsai, 2017).



3. ábra. A PPN kolinerg neuronok fázisos, a nem-kolinerg neuronok tónusos változásokat mutatnak szomatoszenzoros stimuláció hatására. A. A szomatoszenzoros stimuláció (szürke) a kolinerg neuronok relatív tüzelési frekvenciáját az impulzus elején emelik, amely a stimuláció végén teljesen lecseng. B-C. A nem-kolinerg (glutamaterg vagy GABAerg) neuronok a stimulusra a tüzelési frekvencia emelkedésével (B) vagy csökkenésével (C) reagálnak, és a tapasztalt változás tartósan fennmarad (Petzold és mtsai, 2015).

3.1.7. A PPN-t befolyásoló neuromodulációs hatások

A PPN, mint a középagy egyik legfőbb kolinerg magja, nemcsak számos agyterületet lát el bemenettel, viszont ő maga is számos neuromodulációs mechanizmus célpontja. A retikuláris aktivációs rendszer tagjaként, a rendszer más magjaitól nagyszámú bemenetet kap, emellett még egyéb neuromodulációs faktorok is hatnak rá, melyeknek az alvás homeosztatikus szabályozásában van fontos szerepük.

In vivo vizsgálatok kimutatták, hogy ha glutamátot injektálnak a PPN területére, az növeli a paradox alvás idejét és ébrenlétet produkál (Datta és mtsai 2001a). Az NMDA beinjektálása az ébrenlétet fokozza a kísérleti állatban (Datta és mtsai, 2001b). Ha kainát receptor agonistát inkejtálnak a PPN-be, az viszont csak a paradox alvás idejét növeli (Datta és mtsai, 2002). Ha az altatásban lévő állat PPN-jébe az acetilkolin receptor agonista karbakolt injektáltak, aminek hatására az állatról elvezetett kérgi EEG regisztrátumon gamma oszcillációk alakultak ki (Kinney és mtsai, 1998; Mena-Segovia és mtsai, 2008). Ismert továbbá, hogy a hippocampusban ébrenlét és REM alvás alatt úgynevezett theta hullámok generálódnak (4-7 Hz; Bland és mtsai, 1994; Brazhnik és mtsai, 1985; McNaughton és Sedgwick, 1978; Nowacka és mtsai, 2002; Vertes, 1980; Vertes, 1981), amelyeknek a kialakulását serkenti a PPN NMDA és GABA_A receptorainak blokkolása (Nowacka és Trojniar, 2000), míg a procain nevű helyi érzéstelenítő beinjektálása a PPN-be blokkolja a theta hullámok kialakulását (Nowacka és mtsai, 2002), így a PPN bizonyítottan kapcsolatban áll a hippocampalis theta hullámok létrejöttével.

A medialis és a dorsalis raphe magvak kapcsolatban állnak a PPN-el, illetve számos egyéb magcsoport szerotoninerget beidegzéssel látnak el. A szerotonin az 5-HT₁, 5-HT₂ és az 5-HT₇ receptor altípusokon keresztül képes módosítani a PPN neuronok aktivitását (Fay és Kubin, 2000; Fay és Kubin, 2001; Morilak és Ciaranello, 1993; Tohyama és Takatsuji, 1998). A szerotonin receptor stimuláció az ébrenlétet fokozza, míg a REM alvást gátolja, poszt-szinaptikus támadásponton keresztül gátolja a PPN neuronok REM-on neuronjainak, azaz a kolinerg sejtjeinek aktivitását (Monti, 2011). *In vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy a szerotonin agonistákkal való receptor aktiváció hiperpolarizálja a PPN kolinerg neuronokat és csökkenti aktivitásukat (Leonard és Llinas, 1990; Leonard és Llinas, 1994). Egyéb kísérletek is kimutatták, hogy az egyik 5-HT receptor agonista a PPN neuronjainak nagy részét hiperpolarizálja, és ezek a neuronok feltehetően kolinerg neuronok, mivel kolinerg sejtekre jellemző elektrofiziológiai sajátságokat sikerült kimutatni rajtuk (Kobayashi és mtsai, 2003).

Az orexin nevű neuropeptid, ami a táplálékfelvétel szabályozásában is fontos szerepet tölt be, szintén hatással van a PPN sejtjeire, mivel azokon az orexin receptor mindkét altípusa megtalálható. Az orexinről kimutatták, hogy képes gátolni mind a REM, mind a NREM alvást, emellett az ébrenlétet támogató hatása van (Mieda és mtsai, 2011).

Az orexin-A PPN-be történő injekciója a REM alvás időtartamát és az izom atónia kialakulását gátolták. A PPN GABAerg neuronjai a kolinerg neuronok gátlásán keresztül a REM alvás alatti izom atónia kialakulását védtek ki (Takakusaki és mtsai, 2005). Az orexin ugyanakkor a REM és non-REM alvás időtartamát csökkenti az ébrenlét rovására; aktiválja a kolinerg neuronok egyik csoportját, azt amelyik az ébrenlét és a REM alvásért felelős. A hatásért mind OX1, mind OX2 receptorok felelősek; az előbbieket a kolinerg, utóbbiak a GABAerg neuronokon helyezkednek el (Mieda és mtsai, 2011).

A táplálkozásban szintén fontos szerepet betöltő ghrelin is képes hatni a PPN kolinerg neuronjaira, mégpedig ugyanazon neuronok depolarizálódnak hatására, melyek orexin hatására is aktiválódnak (Kim és mtsai., 2009a,b). Az *in vitro* elektrofiziológiai kísérletek azt mutatták, hogy a depolarizáció a K^+ konduktancia csökkenése és nem-szelektív kationcsatorna konduktanciájának növekedésének eredménye (Kim és mtsai., 2009a,b).

3.2. Az M-áram

A PPN nemcsak forrása a kolinerg rostoknak, de rajta is jelentős kolinerg hatások érvényesülnek (Kezunovic és mtsai, 2013; Semba és Fibiger, 1992). Ezek egyik feltételezhető hatása az M-áram modulációján keresztül valósul meg. Az M-áram egy feszültségfüggő, alacsony küszöbű, lassan aktiválódó, nem inaktiválódó káliumáram. Ez az áram képes szabályozni a különböző központi régiókban és a periférián elhelyezkedő neuronok ingerelhetőségét (Brown, 1988; Marrion, 1997). Fontos tulajdonsága, hogy többféle receptor aktivációja képes gátolni, melyek szubsztátja például az acetilkolin, egyes peptidek, mint LHRH hormon, az angiotenzin, a bradikinin és a P-anyag (Brown, 1988). A béta-adrenerg, a purinerg, a szerotoninerg (Colino és Halliwell, 1987), az opioid (Moore és mtsai, 1994) és a metabotróp glutamát receptorok (Charpak és mtsai, 1990) aktivációja is gátolja az M-áramot. Ha például acetilkolin szabadul fel egy kolinerg végződésből, az M-áram gátlás alá kerül és ez lassú depolarizációt eredményez, mely alatt megnövekszik az AP tüzelés esélye (Adams és Brown, 1982; Brown és Selyanko, 1985). Az áram a nevét onnan kapta, hogy a felfedezésekor a kecskebéka szimpatikus idegeiben történő kísérletek alatt a muszkarinos receptor aktivációja gátolta ezt az áramot.

Az M-áramért felelős csatorna (M-csatorna) a KCNQ vagy más nómenklatúrával Kv7 kálium csatorna család alegységeiből áll (Wang és mtsai, 1998; Selyanko és mtsai, 2002; Jentsch, 2000). Kv7.1-Kv7.5 elnevezéssel illették a Kv7 csatorna család 5 tagját. A Kv7.1-en kívül mindegyik kimutatható az idegrendszerben (Shah és mtsai, 2002; Yus-Najera és mtsai, 2003), illetve a hátsó gyöki ganglionjaiban is kimutathatók (Passmore és mtsai, 2003). Régebbi feltételezések szerint a Kv7 csatornák csupán a szomato-dendritikus régióban voltak kimutathatók. Újabb adatok szerint ezek a csatornák a szomato-dendritikus régió kívül megtalálhatók az axon iniciális szegmensénél, axondombon és az axonterminálisokon is (Devaux és mtsai, 2004; Martire és mtsai, 2004).

Mivel számos receptor aktivációja képes az M-csatorna zárását előidézni, így ehhez egy vagy több közös másodlagos hírvivő molekula közbenjárása szükséges. Az M-csatornát gátló receptorok főképp G fehérjéhez kapcsolt receptorok, melyek a $G_{q/11}$ fehérjét képesek aktiválni (Pfaffinger, 1988; Brown és mtsai, 1989; Lopez és Adams, 1989). A G_q proteinnek az α -alegysége domináns szerepet játszik ebben a folyamatban (Caulfield és mtsai, 1994; Haley és mtsai, 1998, 2000).

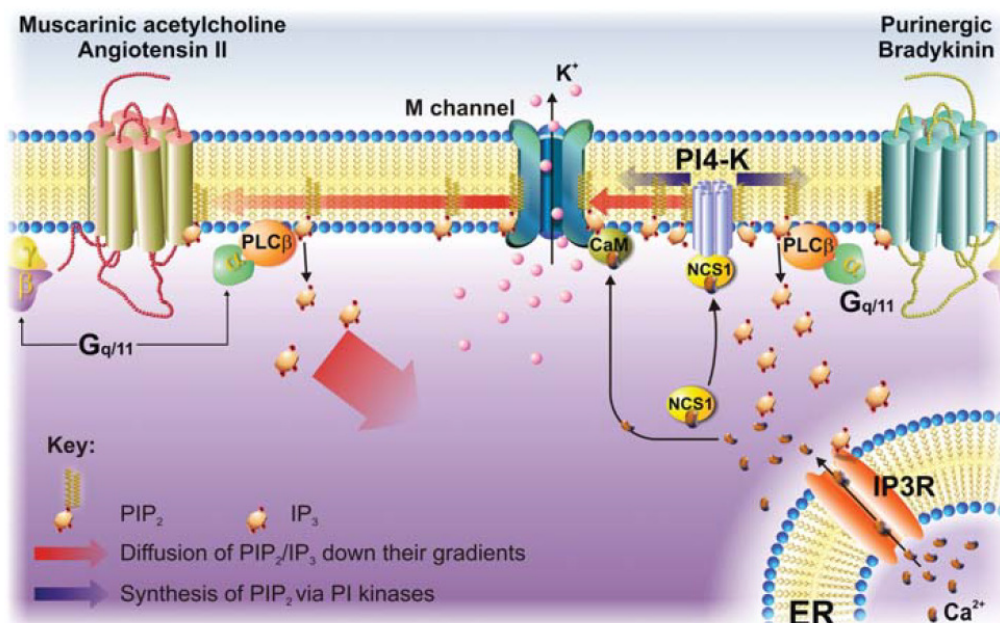
A G_q protein aktiválja a membránhoz kötött foszfolipáz $C\beta$ enzimet, amely a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2) hidrolíziséhez vezet. Ezek az inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP_3), és a diacilglicerol (DAG), amelyek intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedéséhez és a protein kináz C enzim aktivációjához vezetnek.

Az M-áram aktiválhatóságához szükséges egy bizonyos PIP_2 szint a membránban (Suh és Hille, 2002). A G_q protein aktivációval kiváltott PIP_2 hidrolízise maga az a mechanizmus, amely kiváltja az M-áram gátlását, és nem pedig másodlagos hírvivő útvonalak aktivációja miatt történik meg a gátlás. Ez alól kivételt jelent, hogy például az M-áram gátlását előidéző β -adrenerg receptor aktiváció esetén más G fehérje szerepel másodlagos hírvivőként (Akasu, 1988), de a PIP_2 depléciójának meghatározó szerepe van az M-áram gátlásában. Kimutatták, hogy gyors és azonnali PIP_2 depléciót okoz a muszkarinos acetyl-kolin receptor aktivációja. Ez mintegy 90-95%-ban csökkenti a PIP_2 szintet, és így vezet az M-áram gátlásához (Zhang és mtsai, 2003a,b; Suh és mtsai, 2004; 4. ábra).

A PIP_2 deplécióján kívül annak hidrolízisével elindított folyamat által aktivált és képződött hírvivő anyagok is hatnak az M-csatornára. A G_q receptor aktivációja által az intracelluláris kalciumszint megnövekszik, mivel a PIP_2 hidrolízise által keletkezett IP_3 az intracelluláris kalcium raktárból felszabadítja a kalciumot. A Ca^{2+} is az M-csatorna záródásához járul hozzá (Marrion, 1997), mint az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő anyag, amely gátolja az M-áramot. A Ca^{2+} indirekt módon, ATP felhasználás nélkül képes gátolni az M-csatorna nyitását. Ehhez a gátláshoz elegendő egy kismértékű Ca^{2+} koncentráció növekedés is (Selyanko és Brown, 1996). A kalciumnak a sejtben található endogén kalmodulinnal való interakciónak van szerepe a gátlásban (Gamper és Saphiro, 2003).

A protein kináz C (PKC) is befolyásolja az M-áramot. A PKC-t a Kv csatornához kapcsolódó AKAP 150 kináz A horgonyzó fehérje köti meg, és ez elősegíti a PKC általi Kv7.2 csatornafehérjék foszforilációját, amely így a szimpatikus neuronokban megfigyelt M-áram muszkarinos acetilkolin receptoron történő gátlásához járul hozzá (Hoshi és mtsai., 2003). Ez a jelenség azon alapul, hogy a PKC növeli a muszkarinos M-áram gátlás érzékenységét.

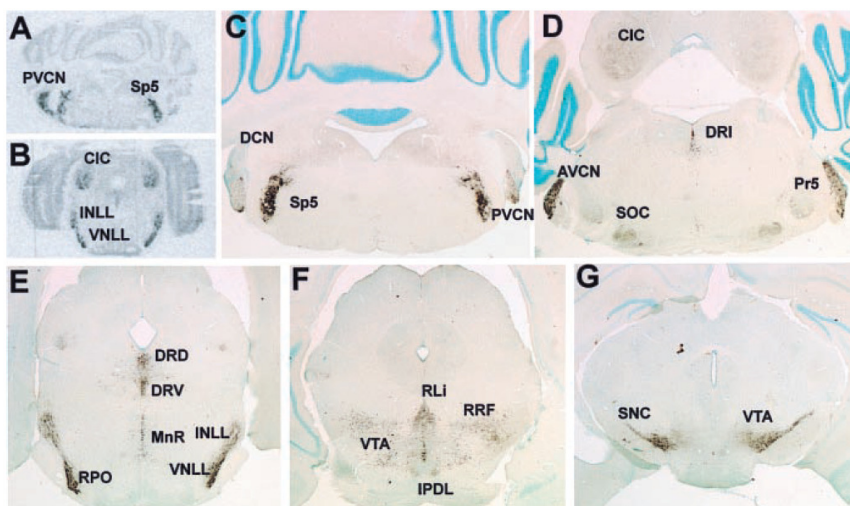
Az M-áram nyitásától vagy gátlásától a neuronok különböző elektrofiziológiai sajátosságai megváltozhatnak: a bemenő ellenállás és a nyugalmi membránpotenciál változtatása miatt az M-áram képes jelentősen szabályozni az ingerelhetőséget. A neuronok depolarizáló impulzusok hatására kialakított tüzelési frekvenciáját is meghatározza, illetve hozzájárul az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia adaptáció jelenségéhez, és az utóhiperpolarizáció közepes és késői szakaszának alakulásában is szerepe van (Koyama és Appel, 2006; Tzingounis és Nicoll, 2008; Navarro-López és mtsai, 2009; Tzingounis és mtsai, 2010; Mateos-Aparicio és mtsai, 2014; Nigro és mtsai, 2014). Az M-áramnak preszinaptikus szerepe is van, a cortex és az agytörzs szinapszisaiban is képes szabályozni a neurotranszmitter felszabadulást (Luisi és mtsai, 2009; Huang és Trussell, 2011).



4. ábra. Az M-áram szabályozásának útvonalai. A szabályozás egyik módja (balra), hogy a foszfolipáz C β (PLC β) aktivációja a PIP₂ szint csökkenésén keresztül zárja az M-áramot. A másik lehetőség, hogy a PLC β aktivációja az intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedéséhez vezet (jobbra). A kalcium részben kalmodulinhoz (CaM) kötődik, ami az M-áramot gátolja. A kalcium további része a "neuronal Ca²⁺-sensor-1" (NCS-1) fehérjéhez kötődik. Az NCS-1 a PI4-kináz (PI4-K) aktiváción keresztül a PIP₂ szintet stabilizálja a membránban a PLC β aktivitásával szemben (Hernandez és mtsai, 2008).

Mivel az M-áram gátlásával növekszik a neuronok ingerelhetősége, így ez epilepszia kialakulásához hozzájárulhat. Ennek orvoslására szükségessé válhat egy M-áram serkentését elősegítő farmakon alkalmazása, mely így az excitabilitás csökkentését célozza meg. Ezt a hatást sikerült elérni a retigabin nevű gyógyszer alkalmazásával. A retigabin fő hatása az, hogy képes eltolni az áram-feszültség görbét balra, ami azt jelenti, hogy a csatornák már egy hiperpolarizáltabb membránpotenciálon képesek megnyílni, viszont ezzel együtt nő a maximális nyitás valószínűsége is (Tatulian és mtsai, 2001; Tatulian és Brown, 2003; Wuttke és mtsai, 2005; Schenzer és mtsai, 2005). A retigabinon kívül a szomatosztatin, a kortikoszatin és a

dynorphin is képes serkenteni az M-áramot a hippocampus neuronjain (Moore és mtsai., 1988; Madamba és mtsai., 1999; de Lecea és mtsai.,1996).



5. ábra. A KCNQ4 alegység eloszlása az agytörzsben. A-B. *In situ* hibridizáció. PVCN: nucleus cochlearis posteroventralis, Sp5: nucleus trigeminalis spinalis, CIC: colliculus inferior centrális magja, INLL: nucleus intermedius lemnisci lateralis, VNLL: nucleus ventralis lemnisci lateralis. C-G Immunhisztokémia. DCN: nucleus cochlearis dorsalis, AVCN: nucleus cochlearis anteroventralis, SOC: oliva superior complex, Pr5: nucleus trigeminalis principalis, DRI, DRD, DRV: raphe dorsalis intermedius, dorsalis és ventralis, MnR: median raphe, RPO: rostralis periolivaris régió, VTA: ventralis tegmentalis area, RLi: nucleus raphe rostralis linearis, IPDL: nucleus interpeduncularis, dorsalis subnucleus, RRF: retrorubralis area, SNC: substantia nigra, pars compacta.

Az M-áramért felelős csatornák a korábbiakban említettek szerint többféle alegységből áll, és az alegységek alkothatnak homo- vagy heterotetramereket. Az idegrendszerben főképpen Kv7.2/7.3 heteromerek alkotják az M-csatornákat, és valamivel kisebb valószínűséggel a Kv7.4/7.5 heteromerek is léteznek (Wang és mtsai., 1998; Cooper és mtsai., 2001; Roche és mtsai., 2002; Pan és mtsai.,2006).

Az egyik M-csatorna alegységet, a KCNQ4-et az egér cochlea külső szőrsejtjeinek bazális membránjában mutatták ki, így ezen sejtek excitabilitásának alakításában fontos szereppel bír. Az alegységet kódoló génben előforduló defektus egy autoszómális domináns progresszív hallásromlással járó kórképet okoz emberben (DFNA2; nem-szindrómás 2-es típusú szenzoros

süketség; Kharkovets és mtsai, 2006). A cochleán kívül még a központi hallópálya egyéb területein is kimutatható a KCNQ4 alegység, például a lemniscus lateralisban és a colliculus inferiorban (Kubisch és mtsai, 1999; Coucke és mtsai, 1999), a nucleus cochlearisban, az oliva superior complexben; továbbá a retikuláris aktivációs rendszer egyes elemeiben (raphe magvak és a ventralis tegmentalis area; Kharkovets és mtsai, 2000; 5. ábra). A KCNQ4-es alegység funkcionális szerepét kimutatták a középagy dopaminerg sejtjeiben, mely sejtek többféle tüzelési mintázattal rendelkeznek, mint a tónusos pacemaker, a szabálytalan, vagy burst-típusú tüzelés (Hansen és mtsai., 2006). *In vivo* és *in vitro* kísérletekkel is megerősítették, hogy az M-áram szerepet játszik a dopaminerg sejtek burst-típusú tüzelési mintázatának megváltoztatásában, mindezt oly módon, hogy a rájuk jellemző alacsony frekvenciájú pacemaker tüzelést nem befolyásolja (Drion és mtsai., 2010).

3.3. Az endokannabinoid rendszer

Az endokannabinoidok szerepe az alvás-ébrenlét szabályozásában jól ismert. A CB1 receptor különböző agonistáinak és antagonistáinak a hatása jól ismert *in vivo* kísérletekből. Alvásmegvonás alatt a liquor endokannabinoid (anadamid, oleamid) koncentrációja megemelkedik. Akár intrathecalisan, akár lokálisan a PPN-be adva CB1 receptor agonistákat, mind a REM-alvás, mind a non-REM-alvás időtartama megnő az ébrenlét rovására (Murillo-Rodriguez és mtsai, 2001; 2008; Herrera-Solis és mtsai, 2010; Bolla és mtsai, 2008; Feinberg és mtsai, 1975).

Az utóbbi évtizedekben nagy figyelem fordult az agyban előforduló endokannabinoidok, mint a neurotranszmisszió fontos regulátorait felé. Az endokannabinoidok G fehérjéhez kötött receptorokon keresztül fejtik ki a hatásukat. A klasszikus leírás szerint az 1-es típusú kannabinoid (CB1) receptor a neuronokon preszinaptikusan helyezkedik el. Az endokannabinoidok receptorhoz való kötődésekor $G_{i/o}$ fehérje aktiválódik, ami másodlagos hírvivő molekulákon keresztül különböző hatásokat közvetít (Howlett és mtsai., 1986; Matsuda és mtsai., 1990). A $G_{i/o}$ fehérje a szinaptikus neurotranszmisszió gátlását az adenilát-cikláz gátlásán, a vezikulák membránfúziójának gátlásán, feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásán és a káliumcsatornák nyitásától segíti elő (Clapham és Neer, 1997; Freund és mtsai., 2003; Davis és mtsai., 2003; Wartmann és mtsai., 1995).

Az endokannabinoidok szerkezetileg membránlipid származékok, és a nevüket onnan kapták, hogy ugyanahhoz a G-fehérje kapcsolt receptorhoz képes kötődni a *Cannabis sativa* nevű növény egyik hatóanyaga, a Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) is. Az agyban és a periférián az arachidonoil etanolamide (AEA vagy más néven anandamid) és a 2-arachidonoilglicerol (2-AG) nevű endokannabinoid található leginkább (Mechoulam és mtsai., 1995; Sugiura és mtsai., 1995). Az anandamid volt a legelső leírt endokannabinoid (Devane és mtsai., 1992), amely képes a szinaptikus neurotranszmisszió szabályozására (DiMarzo és mtsai., 1994; Giuffrida és mtsai., 1999; Chevalere és mtsai., 2006; Ralevic, 2003).

A kannabinoidok klasszikusan kétféle receptoron képesek hatni, ezek a kannabinoid-1 (CB1) és a kannabinoid-2 (CB2) típusú receptorok. A klasszikus receptorok mellett "novel" receptorok (mint a GPR55 és a GPR119) is ismertek (ld. Brown, 2007). Az endokannabinoidok az idegrendszerben főképpen a CB1 receptor aktiváció által fejtik ki hatásukat (Freund és mtsai., 2003; Mackie, 2005; Matsuda és mtsai., 1990), de az utóbbi években bizonyítást nyert, hogy az endokannabinoid hatások közvetítésében a CB2 receptorok is kimutathatók gliasejteken és néhány agyterület neuronjain (Gong és mtsai., 2006; Van Sickle és mtsai., 2005). A CB2 receptorok gyakoriságukat tekintve leginkább a periférián fordulnak elő. Először az immunsejtekben mutatták ki őket (Munro és mtsai., 1993). A CB1 receptorok főképpen a neuronok preszinaptikus végződéseiben találhatók a központi idegrendszerben (Freund és mtsai., 2003; Mackie, 2006), viszont egyes agyi területeken ritkán előfordulhatnak posztiszinaptikus CB1 receptorok is (Tsou és mtsai., 1997; Bacci és mtsai., 2004). A receptorok aktivációja által létrehozott legfőbb változások magukba foglalják a legfontosabb neurotranszmitterek (acetilkolin, glutamát, GABA, noradrenalin) felszabadításának gátlását a központi és a perifériás idegrendszerben (Alger, 2002; Mackie, 2006; Szabo és Schlicker, 2005).

A legtöbb neurotranszmitter vezikulákba csomagolva várja a felszabadulást okozó jelet, viszont az endokannabinoidok nem tárolódnak vezikulákban, emiatt nem vezikuláris mechanizmussal kerülnek az extracelluláris térbe. Ehelyett prekursor formájukban a plazmamembránban tárolódnak, így itt szintetizálódnak, majd szabadulnak fel (Piomelli és mtsai., 2007). A 2-AG felszabadulásának klasszikus útvonala az I-es csoportú mGluR, foszfolipáz C- β és diacilglicerol

lipáz- α aktiváción keresztül. Az anandamid szintézisében az N-arachidonoil-foszfatidiletanolamin (NAPE) játszik kulcsszerepet (Wang és Ueda, 2009).

Az endokannabinoidok fontos funkcionális szereppel bírnak, a szinapszisok működésén keresztül létrejövő retrográd szabályozó mechanizmusokban. A kannabinoid receptorok elsősorban a preszinaptikus neuronokon helyezkednek el. A posztzinaptikus depolarizáció hatására felszabaduló endokannabinoidok az extracelluláris térben a preszinaptikus neuron receptorain kötődve, annak neurotranszmitter felszabadulását gátolják (Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Wilson és Nicoll, 2001; Kano és mtsai., 2009). Ez a gátlás lehet rövid távú (short-term depression – STD), illetve lehet hosszú távú is (long-term depression – LTD), így a rövid távú és a hosszú távú szinaptikus plaszticitásban is szerepük van. A gátlás érvényesülhet a gátló (DSI: a gátlás depolarizáció-indukált csökkentése) és a serkentő (DSE: a serkentés depolarizáció-indukált csökkentése) szinapszisokon. Az egyik mechanizmus az úgynevezett Ca^{2+} vezérelt endokannabinoid felszabadulás (Kano és mtsai., 2009; Ohno-Shosaku és mtsai., 2001). Ez a mechanizmus úgy okozza a DSI és DSE jelenségét, hogy a sejtben megnő a Ca^{2+} koncentráció az NMDA receptorok és feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák megnyílása miatt (Kreitzer és Regehr, 2001; Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Ohno-Shosaku és mtsai., 2007). A kalcium szint közvetlen megemelkedése mellett még egyes receptorok aktivációja is képes előidézni endokannabinoid felszabadulást, amely posztzinaptikus Ca^{2+} felszabadulás nélkül is végbe megy. Ilyen receptorok például az M1 és M3 muszkarinos, az orexin, az oxitocin, illetve 5-HT₂ szerotonin, és egyéb Gq/11 protein kapcsolt receptorok (Kano és mtsai, 2009; Ohno-Shosaku és mtsai., 2003; Ohno-Shosaku és mtsai., 2012; Katona és Freund, 2012). Egy harmadik, endokannabinoid felszabadulást előidéző mechanizmus az előbbi kettő ötvözte: egy gyenge Ca^{2+} koncentráció növekedés és kismértékű Gq/11 fehérje kapcsolt receptor ezzel egyidejű aktivációja okozza a felszabadulást (Kim és mtsai., 2002; Safo és Regehr, 2005; Hashimoto-dani és mtsai., 2007). mGluR-függő mechanizmusok is képesek endokannabinoid felszabadulást okozni. Egy serkentő szinapszisban ismétlődő stimulusok által felszabadult glutamát képes posztzinaptikus depolarizációt létrehozni az AMPA receptorok aktiválásával így a Ca^{2+} koncentráció növekedésével, és ezzel egyidőben metabotróp glutamát receptorok aktiválásával, így ezek a mechanizmusok vezetnek az endokannabinoid felszabaduláshoz (Ohno-Shosaku és mtsai, 2002). Az endokannabinoidok által okozott rövid távú gátlás (STD) idejét meghatározza az, hogy

milyen gyorsan bomlik le az adott endokannabinoid a szinaptikus végződés helyén. A 2-AG lebontását a monoacilglicerol lipáz enzim végzi, mely arachidonsavra és glicerolra bontja le azt. Ennek az enzimnek a jelenléte fontos egyes szinaptikus végzésekben, máshol viszont nincs jelen. Ezt az enzimet asztrocitákban is kimutatták (Blankman és mtsai., 2007; Tanimura és mtsai., 2012). Az anandamid lebontását a zsírsavamid-hidroláz ("fatty acid amide hydrolase") végzi, limitálva annak időbeli jelenlétét (Gaetani és mtsai, 2009).

Újabb kutatások bizonyították, hogy a neuronok mellett az asztrociták is rendelkeznek funkcionális CB1 receptorral. Nemcsak asztrocita tenyészeteken (Molina-Holgado és mtsai, 2003; Stella, 2004), hanem számos agyterületen (nucleus accumbens, gyrus cinguli, medialis előagyi köteg, amygdala, hippocampus, gerincvelő (Rodriguez és mtsai, 2001; Moldrich és Wenger, 2000; Salio és mtsai, 2002; Navarrete és Araque, 2008; Hegyi és mtsai, 2009) előfordul CB1 receptor az asztrocitákon. A hippocampus és a barrel cortex esetén bemutatásra került ezen receptorok szerepe a hosszú távú szinaptikus plaszticitásban (Navarrete és Araque 2008, 2010; Min és Nevian 2012; Han és mtsai, 2012; Coiret és mtsai, 2012; Castillo és mtsai, 2012). A hetero- vagy homoszinaptikus hosszú távú depresszió a legismertebb jelenség (Min és Nevian 2012; Castillo és mtsai, 2012), de a hippocampusban leírásra került a serkentő szinapszisok heteroszínaptikus stimulációja (Navarrete és Araque, 2010). Munkacsoportunk szintén felvetette az asztrociták CB1 receptorának a szerepét a PPN endokannabinoid szignalizációban (Kőszeghy és mtsai, 2015).

3.4. Asztrocita-neuron kommunikáció

3.4.1. Általános megfontolások

Az utóbbi időben nagy tudományos figyelem övezi az eddig sokáig mellőzött gliasejtek valódi szerepét az idegrendszerben. Az első leírások alapján feltételezték, hogy ezek a sejtek csupán térkitöltő szerepet töltenek be a neuronok között, illetve, hogy a gliasejtek formálják az idegsejtek által elfoglalt teret és összetartják őket. Cajal volt az, aki az elsők között tulajdonított fontosabb szerepet a gliasejteknek (Cajal, 1913; García-Marín és mtsai., 2007). Ezek a sejtek

rendkívül sokrétű módon, aktív résztvevőként szerepelnek neuronális folyamatban, illetve viselkedési mintázatokban.

A gliasejteken belül elkülöníthetünk különböző típusokat. A központi idegrendszerben makroglia, mint asztrociták, oligodendrociták és ependyma sejtek, valamint mikroglia léteznek, míg a periférián találjuk még a Schwann-sejteket és a szatellita sejteket.

Az oligodendrociták és a Schwann-sejtek az axonok körül myelinréteget hoznak létre, mely gyorsabb ingerületterjedést tesz lehetővé az axon hosszában keresztül annak elektromos szigetelése által. A szigetelő tulajdonságukon kívül rendelkeznek neurotranszmitter receptorokkal, melyekkel érzékelik környezetük változását.

Az asztrociták a neuronok megfelelő működéséhez elengedhetetlenek. Homeosztatikus hatásokat közvetítenek, mint az extracelluláris folyadéktér összetételének és mennyiségének szabályozása. Az extracelluláris tér szabályozásán belül az asztrociták fontos szerepet töltenek be az ionok, főképp a K^+ koncentrációjának szabályozásában, a neurotranszmitterek (legfőképpen a glutamát, de az endokannabinoidok) felvételében és eliminálásában.

Az asztrociták a központi idegrendszer működésében a szinapszisokon keresztül is fontos regulátor hatásokat érvényesítenek. A szinapszisok kialakításában is szerepet játszanak. Azok erősségét is befolyásolják, így a szinaptikus plaszticitásban szerepet kapnak. Részt vesznek a szinapszisok működésében, úgynevezett háromoldalú szinapszist ("tripartite synapse") alkotnak a pre- és posztzinaptikus neuronnal (Araque és mtsai., 1999). Kimutatták, hogy az asztrociták szinapszisközei nyúlványain számos neurotranszmitter receptor található (Kettenman és mtsai., 1984; Verkhratsky és Steinhauser, 2000), így érzékelni, illetve szabályozni tudja a szinapszisban folyó eseményeket, így gyors reguláló szerepet lát el a szinapszis aktív működésének pillanatában is. A szinapszisban résztvevő neuronokkal aktív feedback kapcsolatban áll, őket szabályozó gliotranszmittereket szabadít fel, vagy éppen neurotranszmittereket vesz fel a szinaptikus részből (Volterra és Meldolesi, 2005; Pankratov és mtsai., 2006; Tzingounis és Wadiche, 2007).

A háromoldalú szinapszis működésében fontos szerepet játszik a sejtek egymástól való távolsága is. A szinapszisban résztvevő preszinaptikus neuron által felszabadított neurotranszmitter a szinaptikus résben hamar eléri a posztzinaptikus neuronon lévő receptorokat. Ahhoz azonban, hogy eljusson az asztrocitán található receptorokhoz, nagyobb távolságot kell megtennie, így a neurotranszmitter koncentráció az asztrocita felé közelítve egyre csökken a nagyobb távolság miatt. Kimutatták, hogy az asztrocitákon nagy affinitású neurotranszmitter receptorok helyezkednek el (például CB1, metabotróp glutamát receptorok, GABA_B, muszkarinos receptorok), melyek lassan deszenzitizálódnak, így a periszinaptikusan létrejött alacsony neurotranszmitter koncentráció elegendő ezek aktiválásához (Rusakov és Kullmann, 1998; Araque és mtsai., 2002; Panatier és mtsai., 2011) .

Az asztrociták elektromosan nem excitábilisak, nem képesek akciós potenciált létrehozni, de jellemző rájuk egy intrinsic celluláris ingerelhetőség, melyet a Ca²⁺ koncentráció intracelluláris változása jellemez (az ún. kalcium excitabilitás). Az asztrociták között a jelátvitel Ca²⁺ hullám formában történhet, mely egy spontán intracelluláris Ca²⁺ koncentrációváltozás (Verkhratsky és Kettenman, 1996; Verkhratsky és mtsai., 1998; Cornell Bell és mtsai., 1990). A kalcium hullámok válaszképpen jelennek meg a szinaptikus történések jellege szerint. Nem csupán a jel meglétét érzékelik az asztrociták, hanem a neurotranszmitterek által hordozott jelek mintázatát és kinetikáját is, illetve a beérkező jelek frekvenciája is fontos információval bírhat az adott szinaptikus rendszer működésében, így a Ca²⁺ jelek, amelyek megjelennek az asztrocitában, neuronális információkat képesek érzékenyen kódolni (Pasti és mtsai., 1997; Perea és Araque, 2005).

A Ca²⁺ hullámok kialakulása gliotranszmitterek (pl. glutamát) felszabadulását teszik lehetővé, melyek különböző módon befolyásolhatják az asztrociták környezetében található szinapszisok működését (Verkhratsky és Kettenman, 1996; Verkhratsky és mtsai., 1998; Cornell Bell és mtsai., 1990). A gliotranszmitterek asztrocita-mediált szinaptikus jelátvitelét különböző megfontolások szerint jellemezhetjük. Egy gliotranszmitter képes különböző receptorokon hatni. Például a glutamát preszinaptikus NMDA vagy kainát receptorokat is képes aktiválni, illetve metabotróp glutamát receptorokat is, mellyel serkentő hatást képes létrehozni (Navarrete és Araque, 2010; Navarrete és mtsai, 2012; Perea és Araque, 2007). Egy asztrocita képes különböző

gliotranszmittereket is felszabadítani. A legjellemzőbb gliotranszmitterek a glutamát mellett a GABA, a taurin, az adenosin, illetve még adenosin-trifoszfátot (ATP) és D-serint is felszabadíthatnak (Zhang és mtsai., 2003a,b; Henneberger és mtsai., 2010), valamint még tumor nekrosis faktor α -t, (TNF α) prosztaglandinokat és interleukin-1-et (IL-1) is képesek felszabadítani, így egyszerre több hatást is képesek kifejteni. Neuronhálózatok és több szinapszis működését is képesek módosítani az asztrociták. Magas frekvenciájú szinaptikus aktivitás és több környező szinapszis együttes aktivációja esetén a Ca^{2+} jelek képesek továbbtódni a kialakulásuk helyétől. A jel képes az asztrocita távolabbi nyúlványaiba eljutni, és egymástól távolabb eső részeken szabadulhatnak fel gliotranszmitterek. Ezzel akár több hálózat és szinapszis működésébe képes beleszólni egy asztrocita. A neuronok által felszabadított endokannabinoidok által aktivált asztrociták képesek olyan távoli szinapszisok működését befolyásolni, amelyek akár több tíz mikrométeres távolságban vannak az endokannabinoid jel forrásától. Az asztrociták endokannabinoidok általi aktiválásával glutamátot szabadítanak fel, ami a neuronális metabotróp glutamátreceptorokon hatva serkenti azok működését. Ez a mechanizmus az asztrociták közbeiktatásával egy endokannabinoidok általi közvetett aktivációt idéz elő, ellentétben azok közvetlen hatásával (Navarrete és Araque, 2010). A hippocampusban a hosszú távú potencírozás (LTP) egyik formáját posztzinaptikus aktivitás és az asztrociták emelkedett Ca^{2+} szintje miatti glutamát felszabadítása okozza, így az LTP ezen formája preszinaptikus metabotróp glutamát receptor aktivációt igényel (Perea és Araque, 2007). Egy másik hatást is megfigyeltek, melynek alapja az a tény, hogy egy gliotranszmitter képes többféle hatást kialakítani egy neuronhálózatban attól függően, hogy milyen típusúak a hatásban részt vevő receptorok és ezeknek milyen az elhelyezkedése. A neocortexben figyelték meg azt, hogy a stimulált asztrocitákból felszabaduló glutamát a serkentő jelátvitelben szabályozza a hosszú távú depressziót (LTD) a preszinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorok aktivációja által (Min és Nevian, 2012).

Viselkedésre és agyi aktivitásra vonatkozó *in vivo* eredményeket is találunk az *in vitro* tanulmányok mellett. Tanulmányozták az asztrociták alvásban és az agykérgi lassú hullámú oszcillációk alakulásában való szerepét. Kimutatták, hogy a gliotranszmisszió gátlásával csökken mind a lassú hullámú aktivitás, mind az alvás időtartama, így ezzel romlanak a kognitív funkciók is (Fellin és mtsai., 2009; Halassa és mtsai., 2009; Yoo és mtsai., 2007). Az asztrociták fontos

szerepet játszanak az agyi mikrocirkulációban is, azzal, hogy képesek eliminálni a neuronális működés által létrehozott melléktermékeket. Ez a folyadékcseré fokozottabb alvás során (Iadecola és Nedergaard, 2007; Xie és mtsai., 2013).

A glutamát felvételét különböző serkentő aminosav transzporter (EAAT1-3) végzi. A glutamát felszabadulását a felvétel blokkolásával is elérhetjük. Ilyen blokkolószer a TBOA, mely specifikusan blokkolja ezeket az aminosav transzportereket, így befelé irányuló áramok jöhetnek létre (Angulo és mtsai, 2004; Jambaudon és mtsai, 1999; Le Meur és mtsai, 2007). Az extraszinaptikus glutamát a GluN2B alegységet tartalmazó, extraszinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorokat is képes aktiválni (Kozlov és mtsai, 2006; Angulo és mtsai, 2004; D'Ascenso és mtsai, 2007; Fellin és mtsai, 2004).

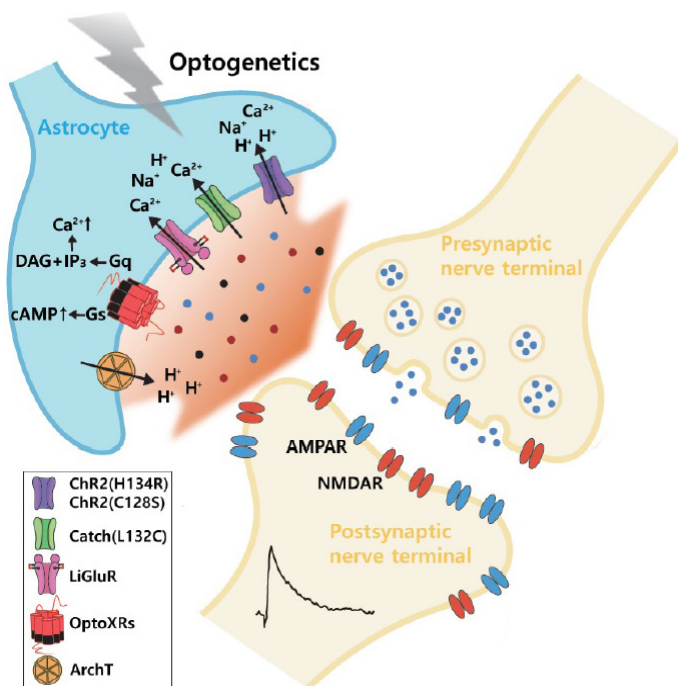
A tónusos kifelé irányuló áramokra is hatással van az asztrocita aktiváció, illetve képes is kiváltani: taurin és GABA-mediált tónusos klorid áramot már írtak le (Belluzzi és mtsai, 2004; Lee és mtsai, 2010). Hasonló esetet írtak le a nucleus laterodorsalis tegmentalisban is, ahol a WIN55,212-2 kifelé irányuló áramot hozott létre, melyhez hasonlót mi is megfigyeltünk (Soni és mtsai, 2014).

3.4.2. Az asztrociták optogenetikai aktivációja

Új felfedezésnek számít az utóbbi évtizedben kifejlesztett technika, az optogenetika. A kísérleti megközelítés lényege, hogy fény által kapuzott ioncsatornákat vagy –transzportereket egyes sejtvonalakkal szelektíven fejeztetnek ki. Az asztrociták optogenetikai aktivációjában a channelrhodopsin-2 (ChR2) prototípusos fényaktivált ioncsatornát használják a legszélesebb körben. Ezt a csatornát a *Chlamydomonas reinhardtii* alga fejezi ki eredetileg, és 470 nm-es kék fénnel aktiválható. A ChR2 egy kationcsatorna, mely kék fény hatására nyílik, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} és H^+ ionokra permeábilis. Ezt a kationcsatornát aktiválva a neuronok depolarizálódnak, ami akcióspotenciál-tüzeléshez vezet. Emellett ismert jelenség az aktivált sejtek intracelluláris pH-jának a csökkenése is (Bang és mtsai, 2016; Boyden és mtsai, 2005; Hegemann és Nagel, 2013). Az asztrociták aktivációja részben a depolarizáció, részben a kalciumbeáramlás és az

intracelluláris acidózis (valamint feltehetően az asztrociták duzzadása) révén valósul meg (Beppu és mtsai, 2014). A kalciumhullámok kialakulását és a gliotranszmitterek felszabadulását a ChR2 aktivációja feltehetően nagyrészt csak triggereli. A kalciumbeáramlás további intracelluláris kalciumfelszabadulást hoz létre, valamint a szomszédos asztrociták egymást képesek aktiválni gliotranszmitterek felszabadításával. A Na^+ -beáramlás a Na^+ - Ca^{2+} cseremechanizmus megfordulásával további kalciumszint-emelkedéshez vezet (Figueiredo és mtsai, 2014). Az optogenetika segítségével szelektíven tudjuk fény segítségével stimulálni az asztrocitákat, így az aktiváció következményeit kontrollált körülmények között közvetlenül tudjuk vizsgálni (Deisseroth és mtsai, 2006; Gourine és mtsai, 2010; Fenno és mtsai., 2011; Sasaki és mtsai., 2012; Chen és mtsai., 2012, 2013; Perea és mtsai., 2014; Tang és mtsai., 2014). Az első in situ asztrocita optogenetikai kísérletet az agytörzsi centrális kemoreceptor áréában végezték el. Azt találták, hogy az asztrociták szelektív aktivációja ATP-n keresztül képes aktiválni a környező asztrocitákat és neuronokat (Gourine és mtsai, 2010). A cerebellaris Bergmann-glia optogenetikai aktivációja a Purkinje-sejtek AMPA receptorainak aktivációján át hosszú távú depressziót indukált (Sasaki és mtsai, 2012). Perea és munkatársai (2014) ChR2-t fejeztettek ki az asztrocitákkal a látókéregben. Az asztrociták aktivációja során glutamát szabadult fel, és a preszinaptikus metabotróp glutamát receptorok aktivációja által az asztrociták képesek voltak szabályozni a gátló és serkentő transzmissziót. Egyes neuronok depolarizálódtak, míg mások depolarizációt vagy hiperpolarizációt egyaránt mutattak.

Érdemes megemlíteni, hogy ChR2 mellett további optogenetikai aktivátorokat is használtak asztrociták aktiválásához. Ilyen a CatCh, ami a ChR2 fokozott kalciumpermeabilitású variánsa (Li és mtsai, 2012; Figueiredo és mtsai, 2014; Id.Bang és mtsai, 2016), a LiGluR, ami egy ionotróp glutamátreceptor mutáns (a ligandja egy fényérzékeny maleimid-azobenzén "karon" át a fehérjéhez horgonyzott glutamát; Figueiredo és mtsai, 2014), vagy az optoXR fényaktiválható G-protein kapcsolt receptor, ami az $\alpha 1$ vagy $\alpha 2$ adrenerg receptor és az emlős rodopszin fúziójával lett előállítva (6. ábra; Bang és mtsai, 2016)



6. ábra. Az asztrociták optogenetikai aktivációjának lehetőségei. (ChR2: channelrhodopsin-2 fényaktiválható kationcsatorna; CatCh: nagy kalciumpermeabilitású channelrhodopsin, LiGluR: fényaktiválható ionotróp glutamát receptor; OptoXR: fényaktiválható G-protein kapcsolt metabotróp receptor; ArchT: archaerhodopsin protonpumpa, amely az asztrocitákból történő glutamát felszabadulását gátolja; Beppu és mtsai, 2014; Bang és mtsai, 2016)

3.4.3. Asztrociták által aktivált neuronális áramok

Az asztrociták által keltett neuronális extraszinaptikus áramok nagyságuk, kinetikájuk, irányuk, az őket kiváltó neurotranszmitterek illetve gliotranszmitterek típusa és azok receptorai szerint csoportosíthatóak. Az extraszinaptikus áramokat irányuk és időtartamuk szerint csoportosítva elkülöníthetünk lassú kifelé és befelé irányuló, tónusos serkentő és gátló áramokat (7. ábra).

A lassú befelé irányuló áramok ("slow inward current", SIC) fázisos befelé irányuló áramok, melyeket jól el tudunk különíteni a serkentő posztiszinaptikus áramoktól (EPSC), mert a SIC-ek különböznek az áram nagyságában és kinetikájában is. Nagyobb amplitúdóval, lassabb felszálló- és leszállószárral jellemezhetők. (Fellin és mtsai., 2004; Shigetomi és mtsai., 2008; Bardoni és mtsai., 2010; Reyes-Haro és mtsai., 2010). Kialakulásukban bizonyítottan részt vesz extraszinaptikus NMDA receptorok aktivációja, glutamát és az NMDA receptor koaktivátor D-serin által (Angulo és mtsai., 2004; Fellin és mtsai., 2004; Nie és mtsai., 2010). A vezikulafúzió és akcióspotenciál-tüzelés blokkolása nem okozta a SIC-ek frekvenciacsökkenését (Fellin és mtsai., 2004). Több központi idegrendszeri területen is kimutatták jelenlétüket, többek között a gerincevelő dorzális szarvában, a szaglóközpontban, a hippocampusban és látókéregben

(Bardoni és mtsai., 2010; Fellin és mtsai., 2004; Kozlov és mtsai., 2011; ld. Pál, 2015). A SIC-ek valószínűsíthető szerepe egy adott asztrocita-doménen belül levő neuronok szinkronizációja.

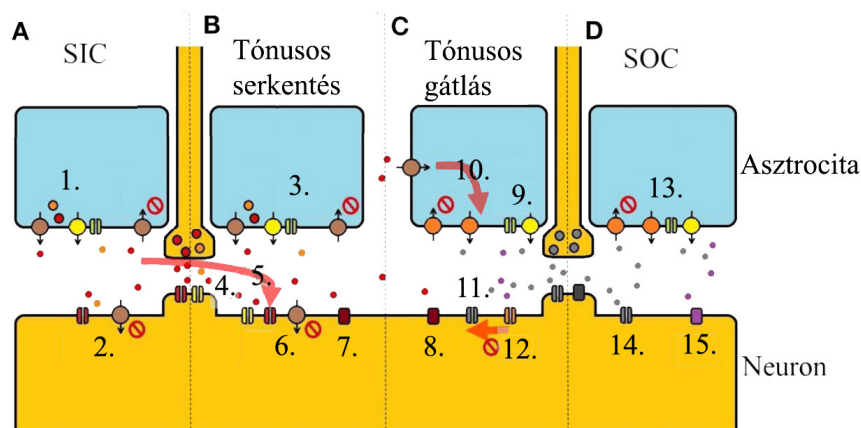
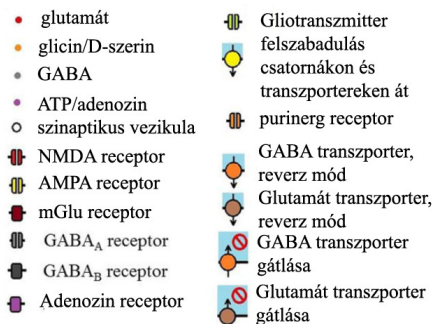
A lassú kifelé irányuló áramok ("slow outward current", SOC) ritkább események a központi idegrendszerben, mint a SIC-ek. A gátló posztszinaptikus áramoktól (IPSC) nehezebben különíthető el. Kimutatták, hogy a SOC-okat a GABA_A receptorok aktivációja váltja ki (Kozlov és mtsai., 2006; Le Meur és mtsai., 2012; Pirttimäki és mtsai., 2013). Szintén nem védte ki megjelenésüket a vezikulaürülés és a neuronális aktivitás blokkolása. A lassú kifelé irányuló áramokat a hippocampusban és a bulbus olfactoriusban mutatták ki; egyes sejteken a SIC-ekkel együtt is előfordult (Le Meur és mtsai., 2012; Kozlov és mtsai., 2006).

Tónusos serkentő áramokat is kimutattak több agyi struktúrában is (nucleus supraopticus, Fleming és mtsai., 2011; hippocampus, Papouin és mtsai., 2012; cerebellum, Sasaki és mtsai., 2012; PPN, Kőszeghy és mtsai., 2015; gerincvelő hátsó szarva, Nie és mtsai., 2010). Asztrocita eredetük nem olyan kizárólagos, mint a SIC-ek esetén; hiszen neuronális forrásokból származó glutamát éppen úgy okozhat tónusos serkentő áramokat. Az asztrociták hozzájárulását ehhez a neuronális áramhoz az asztrociták optogenetikai aktivációjával bizonyították (ld. fent, Sasaki és mtsai., 2012; Beppu és mtsai., 2014; Figueiredo és mtsai., 2011; Perea és mtsai., 2014). A tónusos serkentő áramok az extraszinaptikus glutamát és az NMDA receptor koaktivátor glicin hatására alakulnak ki (Le Meur és mtsai., 2007). A glutamát eredhet a szinaptikus részből történő szóródásból, illetve asztrocita eredetű is lehet. A glutamát szintjét az EAAT ("excitatory amino acid transporter") transzporterek képesek csökkenteni: az asztrocitákra az EAAT1 és EAAT2 glutamát transzporterek, a neuronokra az EAAT3 és 4 jellemző főként (Zhou és Danbolt, 2013). Az áramokhoz legfőképpen NMDA receptorok aktiválása járul hozzá (Angulo és mtsai., 2004; Fellin és mtsai., 2006; Le Meur és mtsai., 2007; Fleming és mtsai., 2011; Papouin és mtsai., 2012) de AMPA receptorok és II-es csoportú metabotróp glutamát receptorok is részt vesznek kialakításukban (Sasaki és mtsai., 2012; Beppu és mtsai., 2014; Kőszeghy és mtsai., 2015). A tónusos serkentő áramok a glutamáttranszporterek blokkolásának hatására a SIC-ekkel együtt jelennek meg. Az őket kiváltó transzmitterek és az aktivált receptorok átfedést mutatnak, az időbeli lefutásukban levő különbség feltehetően a glutamát felszabadulásának és hatásának helye

közi távolság és az eltérő diffúziós sajátságok számlájára írható (Jabaudon és mtsai, 1999; Angulo és mtsai, 2004).

A tónusos gátló áramok extraszinaptikusan elhelyezkedő GABA_A receptorok aktiváció eredményeképpen jönnek létre (Semyanov és mtsai., 2004; Cellot és Cherubini, 2013; Connelly és mtsai., 2013). Több agyterületben is kimutatták, például a thalamusban, a kisagyban, agytörzsben, agykéregben és a hippocampusban is. Valószínűleg más alegységet tartalmazó GABA_A receptor aktivációja felelős ezért a tónusos áramért, mint amely az IPSC-t alakítja ki: az extraszinaptikus GABA_A receptor γ és δ alegységeket tartalmaz. A GABA nemcsak asztrocita eredetű lehet, hanem származhat a szinaptikus részből történő szóródásból és volumen transzmisszióból is. A GABÁ-n kívül a glicin is létrehozhat tónusos gátló áramokat (Bradaña és mtsai., 2004). A tónusos kifelé irányuló áram funkciói között szerepel sejtproliferáció és -migráció szabályozásában való részvétel. Hozzájárul továbbá a neuronhálózatok oszcillációinak kialakításához, illetve a neuronok ingerelhetőségének beállításához (Semyanov et al., 2004; Connelly és mtsai., 2013; Lee és Maguire, 2014).

Jelmagyarázat



7. ábra. Asztrocita-aktivált neuronális áramok típusai. **A. Lassú inward áram.** ("slow inward current", SIC). 1. Glutamát- és D-szerin release az asztrocitákból (gliotranszmitter-tartalmú vezikulákból, volumenregulált anioincsatornákon (VRAC) keresztül, az EAAT1 és -2 transzporterek reverz működésén keresztül, szerves aniontranszportereken át, connexon hemichannel-en keresztül, ionotróp purinoreceptorokon át vagy a glutamáttranszporterek gátlásán át. 2. A glutamát (és a D-szerin) egy közeli neuronhoz diffundál és extraszinaptikus NMDA-receptorhoz kötődik. Ezen receptor aktivációja SIC-et alakít ki. A neuronális EAAT-2 gátlása szintén hozzájárulhat SIC kialakulásához. **B. Tónusos serkentő áram.** 3. Glutamát (és D-szerin) felszabadulás (l. 2. pont). 4. A szinaptikus részből történő glutamát felszabadulás és a volumentranszmisszió szintén emeli az extraszinaptikus glutamát koncentrációját. 5. A SIC-eket kialakító glutamát felszabadulás távolabbi receptorokon tónusos inward áramot aktiválhat. 6. Az extraszinaptikus NMDA, AMPA vagy II-es csoportú metabotróp glutamát receptorok (mGluR, 7.) tónusos serkentő áramok kialakulásához vezet. **C. Tónusos gátló áram.** 8. Más mGluR-okon hatva a glutamát tónusos gátló áramot is kialakíthat. 9. GABA felszabadulás a GABA transzporterek reverz módú működésével vagy a normál mód gátlásával, VRAC-on vagy szerves anion transzportereken keresztül. Az ATP connexon hemichannel-en keresztül szabadulhat fel. 10. Az extraszinaptikus glutamát koncentrációjának növekedése a glutamát felvételt és a következményes GABA felszabadulást facilitálja. 11. Az asztrocitákból felszabaduló, volumentranszmisszióval vagy szinaptikus szóródással a neuronokból származó GABA extraszinaptikus GABA_A receptorokat aktivál. 12. Az ATP által aktivált P2X₄ receptor a GABA_A receptorok számát csökkenti. **D. Lassú outward áram** ("slow outward current", SOC). 13. GABA, ATP vagy adenozin felszabadulás (l. 9. pont). 14. Az extraszinaptikus GABA_A receptor aktiváció SOC-okat hoz létre. 15. SOC-szerű hiperpolarizáló eseményeket A1 adenozin receptor aktiváció is létre tud hozni. Az adenozin eredete valószínűleg nem neuronális (ld. Pál, 2015).

4. Célkitűzések

A jelen PhD disszertáció arra a kérdésre keres választ, hogy milyen, egymástól független vagy egymással összefüggő mechanizmusok vesznek részt a PPN neuromodulációs szabályozásában; léteznek-e a közvetlenül neuronokat érintő szabályozó hatások mellett asztrocitán keresztül érvényesülő mechanizmusok is.

A következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Van-e a PPN neuronokon M-típusú káliumáram? Függ-e az M-áram jelenléte sejttípusoktól?
2. Milyen hatást gyakorol az M-áram a neuronok elektrofiziológiai tulajdonságaira?
3. A PPN neuronok CB1 receptor stimuláció hatására bekövetkező tónusos serkentésében vagy gátlásában milyen szerep jut az asztrocitáknak és a metabotróp glutamátreceptoroknak?
4. A preszinaptikus CB1 receptor aktiváció kifejt-e gátló hatást a PPN szinaptikus neurotranszmissziójára? Módosítják-e asztrocita-függő hatások a preszinaptikus CB1 receptor aktivációjának hatását?

5. Eszközök és módszerek

5.1. Oldatok

A kísérleteinkhez mesterséges agy-gerincvelői folyadékot („arteficial cerebrospinal fluid”; aCSF) használtunk, melyet a következő összetételben készítettünk: 125 mmol/l NaCl; 2,5 mmol/l KCl; 26 mmol/l NaHCO₃; 10 mmol/l glükóz; 1,25 mmol/l NaH₂PO₄; 2 mmol/l CaCl₂; 1 mmol/l MgCl₂; 3 mmol/l myo-inositol; 0,5 mmol/l aszkorbinsav; 2 mmol/l nátrium piruvát. A preparálás alatt az agyszeletek készítéséhez jéghideg alacsony nátrium tartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (low Na aCSF) használtunk, melyben 100 mmol/l NaCl-ot lecseréltünk 130 mmol/l szacharózra és 60 mmol/l glicerolra. Az oldat ozmolaritása 290 mOsm/l; pH-ja 7,4 volt. Az oldatokhoz a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) vegyszereit használtuk; kivéve azoknál az eseteknél, ahol a forrás külön említésre kerül.

A mérésekhez használt mikropipetta oldat (belső oldat), mely a mérés során a sejtet intracellulárisan dializálja, a következőket tartalmazta: 120 mmol/l kálium-glükonát; 5 mmol/l NaCl; 10 mmol/l 4-(2-hidroxietil)-1-piperzeinetán-szulfonsav (HEPES); 2 mmol/l EGTA; 0,1 mmol/l CaCl₂; 5 mmol/l Mg-ATP; 0,3 mmol/l Na₃-GTP; 10 mmol/l Na₂-foszfokreatinin; és 8 mmol/l biocytin, melyet közvetlenül a mérések előtt mértünk az oldatba. Az oldat ozmolaritása 280-290 mOsm/l; pH-ja 7,3 volt.

A kalcium koncentráció mérése Oregon Green 488 1,2-bis(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav (BAPTA-1) acetoxi-metilészter (AM) formájának, ezáltal sejtbe bejutó fluoreszcens indikátorfesték használatával történt (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

5.2. Állatok, preparálás

Az állatkísérletek elvégzése a nemzetközi, magyar és intézményi törvények, protokollok által meghatározott módon történt. Az általunk használt kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem

Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta, és engedélyezte (6/2011/DEMÁB és 5/2015/DEMÁB számokon)

Kísérleteinkhez 9-16 napos egereket használtunk fel, mindkét nemből. Egyes kísérletekhez olyan törzseket alkalmaztunk, amelyek GAD2- (glutamát dekarboxiláz) vagy ChAT- (kolin acetil-transzferáz) függő módon fejeztek ki egy tdTomato nevű fluoreszcens fehérjét (mely 554 nm excitációs maximummal és 581 nm emissziós maximummal rendelkezik). Ezen egerek tenyésztéséhez a cre-lox rendszert használtuk, ahol az egyik szülő promoter-specifikusan fejezi ki a cre rekombinázt, a másik szülő genomjában megtalálható a kifejeztetni kívánt fehérje génje, de annak átíródását egy lox-P site-okkal határolt stop kodon akadályozza meg. Az utódokat keresztezve, a stop kodon kihasítása megtörténik és a kifejeztetni kívánt fehérje promoter-specifikusan jelenik meg. A homozigóta lox-tdTomato (Madisen és mtsai., 2010; JAX mice azonosító szám: 007905), a GAD2-cre (Taniguchi és mtsai., 2011; JAX azonosító: 010802) és a ChAT-cre (<http://informatics.jax.org/reference/J:114556>; JAX azonosító: 006410) egereket a Jackson Laboratories-től szereztük be (Bar Harbor, ME, USA), melyek keresztezését az Élettani Intézet állatházában végeztük. A homozigóta törzsek keresztezéséből származó utódok mindkét génre heterozigóták voltak, így a tdTomato fluoreszcens protein átíródhatott GAD2- vagy ChAT-függő módon.

Másrészt további kísérleteinkhez channelrhodopsin-2-t (ChR2) gliális fibrilláris savas fehérje („glial fibrillary acidic protein”; GFAP)-függő módon kifejező egérre volt szükségünk. A homozigóta lox-channelrhodopsin2 (B6; 129S-Gt(ROSA)26Sortm32^{1(CAG-COP4*H13H134R/EYFP)}Hze/J) és a GFAP-cre (B6.Cg-Tg(Gfap-cre)73.12Mvs/J) törzseket szintén a Jackson Laboratories-től vásároltuk. Ezen törzsek keresztezését a fent leírtakhoz hasonlóan szintén az Élettani Intézet állatházában végeztük. Néhány kísérletben konstitucionális CB1 receptor knockout egereket is felhasználtunk, melyeket Andreas Zimmertől kaptunk (Bonn, Németország; Zimmer és mtsai. 1999).

Bizonyos esetekben 9-16 napos C3H (n=7) és C57Bl6 (B6) egereket (n=5) is használtunk, melyek során mindkét nemből használtunk fel állatokat. Szintén ezeket az állatokat használtuk a vad típusú egereket igénylő kísérleteinknél. A két egértörzs között nem találtunk különbséget az endokannabinoid hatások létrejöttében (Köszeghy és mtsai, 2015).

Az állatokat dekapitáltuk, majd az agyat óvatosan eltávolítottuk a koponyatető körültekintő körbevágása után. A középagyat minél gyorsabban kipreparálva abból 200 mikrométeres coronalis szeleteket készítettünk alacsony nátrium tartalmú jéghideg mesterséges agy-gerincvelői folyadékban; Microm HM 650V típusú vibratóm (Microm International GmbH, Walldorf, Németország) segítségével; miközben folyamatosan oxigenizáltattuk 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével (karbogén gázkeverék). A szeleteket 37 °C-on, normál aCSF-ben tartottuk 60 percen át a mérés kezdetéig, mindeközben folyamatosan karbogénnel buborékolattuk a szeleteket tartalmazó kamrát.

5.3. Elektrofiziológiai mérések

A mérőrendszerünk része egy Zeiss Axioskop mikroszkóp (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) melyet a szeletek láthatóvá tételéhez használtunk. A mikroszkóphoz egy fluoreszcens képalkotó rendszert kapcsolunk (Till Photonics GmbH, Grafeling, Németország), amely magában foglal egy xenonégő alapú Polychrome V-ös fényforrást (Till Photonics GmbH, Grafeling, Németország), egy CCD kamerát (SensiCam, PCO AG, Kelheim, Németország), egy képalkotószabályozó egységet („imaging control unit”; ICU), és a Till Vision szoftvert (4.0.1.3. verzió). Ez a rendszer lehetővé teszi a fluoreszcencia intenzitás időben való változásának megfigyelését. A teljes sejtes elrendezésű patch-clamp mérésekhez Axopatch 200A erősítőt (Molecular Devices, Union City, CA, USA) használtunk mind feszültség-clamp, mind áram-clamp üzemmódban. Az adatok feldolgozását, felvételét Clampex 10.0 szoftverrel végeztük (Molecular Devices, Union City, CA, Amerikai Egyesült Államok), míg az adatok elemzését a Clampfit 10.0 (Molecular Devices) programmal.

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A szeleteket a mérés során folyamatosan oxigenizált normál aCSF-el perfundáltattuk 1 ml/perc sebességgel, Gilson Minipuls 3 perisztaltikus pumpa segítségével (Gilson Inc., Middleton, WI, USA)

Az 5-6 M Ω rezisztenciájú patch pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból készítettük Narishige PC-10 pipettahúzó segítségével (Narishige Group, Tokyo, Japán), melyet az „Oldatok” alpontban részletezett, kálium-glükonát alapú belső oldattal töltöttünk meg. Az M-áram

mérésekor a neuronokat 1 $\mu\text{mol/l}$ tetrodotoxinnal kezeltük, és -20 mV tartófeszültségen tartottuk, majd 1 másodperces repolarizáló lépcsőket alkalmaztunk -60-tól -30 mV-ig (Brown és Adams, 1980). Az M-áram farmakológiai elkülönítéséhez XE991-et (10,10-bis(4-piridinilmetil)-9(10H)-anthracenon dihidroklorid; Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK) használtunk, ami az M-áram specifikus blokkolószere.

Az áram-clamp méréseket 1 s hosszúságú, -30 - +120 pA nagyságú hiper- és depolarizáló lépcsők alkalmazásával végeztük. A felvételekből, amelyek legalább 8 darab akciós potenciált tartalmaztak a következő képlet alapján úgynevezett adaptációs indexet (AI) számoltunk: $AI = 1 - (F_{\text{utolsó}}/F_{\text{első}})$, ahol az $F_{\text{utolsó}}$ az utolsó két akciós potenciál frekvenciáját, az $F_{\text{első}}$ pedig az első három akciós potenciál frekvenciáját jelenti (Nigro és mtsai, 2014). A gyors utóhiperpolarizációt (fAHP) az akciós potenciál küszöbértéke után 50 ms-on belül mért maximális negatív potenciálváltozásként határoztuk meg, a közepes utóhiperpolarizáció (mAHP) a csúcstól 100 ms-ra mért amplitúdó, a lassú utóhiperpolarizáció (sAHP) pedig a csúcstól 300 ms-ra mért feszültség amplitúdója (ld. Koyama és Appel, 2006). Az oszcillációs aktivitás mérésére egy 2 másodperc hosszú úgynevezett rámpa protokollt alkalmaztunk, mely egy lineárisan emelkedő nagyságú áraminjekciót jelent és melynek maximális áramértéke 800 pA volt. Ezeket a méréseket TTX jelenlétében végeztük, annak érdekében, hogy az akciós potenciálok jelenléte ne fedje el az oszcillációs aktivitást a feszültségfelvételen.

Tónusos áramok, spontán és miniatűr excitatórikus posztszinaptikus áramok (EPSC-k) és inhibitorikus posztszinaptikus áramok (IPSC-k) mérésekor, voltage-clamp üzemmódban a tartó potenciált -60 mV-ra állítottuk, a szerhatás illetve az optogenetikai stimuláció előtt és után is. Mindegyik állapotot 5 percig tartottuk fenn. A posztszinaptikus áramok méréséhez a Synaptosoft MiniAnalysis szoftvert (Synaptosoft Inc., Fort Lee, NJ, USA) használtuk. Az előbbi mérésekhez használt pipetta oldaton kívül még egy módosított összetételű pipetta oldatot is felhasználtunk, melyben a kálium-glükonátot lecseréltük kálium-kloridra. Ezt az oldatot spontán IPSC-k (sIPSC-k) és miniatűr IPSC-k (mIPSC-k) mérésekor használtuk.

A tónusos áram változását hisztogram szerkesztésével határoztuk meg, melynek készítésekor a felvétel utolsó percében mért áramértékeket használtuk fel. A kontroll és a szerhatás alatt mért felvételekből készített hisztogram csúcsértékeinek különbségéből állapítottuk meg a különböző

hatások által kiváltott tónusos áram nagyságát. 10 perces felvételt készítettünk kontroll körülmények között a tartó áram spontán változásának meghatározására, melyet az előbbi protokollok használatával elemeztünk ki, annak az első és utolsó percében készült méréseket felhasználva.

Néhány kísérlet esetében elektromosan stimuláltuk a vizsgált neuront beidegző szinaptikus rostokat, melyhez monopoláris elektródot használtunk, amit a szómától 50-100 μm -re helyeztük el. A stimuláló elektródot BioStim STC-7a stimulátor készülékhez csatlakoztattuk (Supertech, Pécs, Magyarország). Miután elhelyeztük a stimuláló elektródot, olyan értékre állítottuk a stimulust, amelyen nem maradtak ki posztszinaptikus áramok a stimulációt követően (nem voltak "failure"-ök; a stimuláció amplitúdója körülbelül 1,5-ször volt nagyobb a minimális stimulációnál). A páros stimulusok 50 Hz-es frekvenciával rendelkeztek, és az egymást követő kísérletek között 10 másodperc telt el. A tartófeszültség 10 másodpercig tartó, 0 mV-ra való változtatásával a neuronok posztszinaptikus depolarizációját hoztuk létre

Optogenetikai stimulációt végeztünk GFAP-ChR2 egérből származó mintákon, a teljes látótér epifluoreszcens stimulációjával ($480 \pm 5 \text{ nm}$), egy xenon égő alapú Polychrome V-ös fényforrást (Till Photonics GmbH, Gräfeling, Németország) és a Till Vision szoftvert (4.0.1.3. verzió) használva. Egy 1 perc hosszú folyamatos stimuláció, vagy 10 ms-os megvilágítási periódusokból álló 10 Hz frekvenciával pulzáló 1 percen át tartó stimulációt alkalmaztunk ezeknél a kísérleteknél.

5.4. Farmakológia

Egyes kísérletekhez szükségünk volt tetrodotoxinra (TTX; Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael), melyet a feszültség-függő Na-csatornák blokkolására, illetve az akciós potenciál tüzelés gátlására használtunk 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban. Az M-áram specifikus gátlószerét, az XE991-et 20 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk, melyet az áram farmakológiai elkülönítésére használtunk.

További kísérleteinkhez az 1-es típusú kannabinoid (CB1) receptor agonista WIN55,212-2-t 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk, míg a szintén CB1 receptor agonista arachidonil-2'-

kloroethylamidot (ACEA) 5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban. Néhány kísérlethez 10 $\mu\text{mol/l}$ 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]kinoxalin-2,3-diont (NBQX), 50 $\mu\text{mol/l}$ D-2-amino-5-fosfonopentanoátot (D-AP5), 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichnint, és 10 $\mu\text{mol/l}$ bikukullint használtunk az ionotróp glutamát-, glicin- és GABA-receptorok gátlására. A spontán akciós potenciálokat 1 $\mu\text{mol/l}$ TTX-el gátoltuk.

Egyes kísérleteknél 1 $\mu\text{mol/l}$ thapsigarginban inkubáltuk a szeleteket 45 percig, hogy ezáltal csökkentsük az asztrociták aktivitását (Kőszeghy és mtsai. 2015).

Az I-es és II-es típusú metabotróp glutamát receptorokat (I-es csoportú mGluR receptorok) 100 $\mu\text{mol/l}$ 7-(hydroxiimino)cyclopropal[b]króm-n-1a-karboxilát etilésztert (CPCCOEt) és 10 $\mu\text{mol/l}$ 2-metil-6-(feniletinil)piridin hidrokloridot (MPEP) használtunk. A II-es csoportú metabotróp glutamát receptorokat (mGluR II) pedig 10 $\mu\text{mol/l}$ LY341495-el (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK) blokkoltuk.

5.5. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérése

Ahhoz, hogy a GFAP-ChR2 egérben történő optogenetikai stimuláció esetén bekövetkező asztrocita aktivációt megerősítsük, „calcium imaging”-et végeztünk. A mérés előtt a szeleteket 45 percig 33 $\mu\text{mol/l}$ Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB)-ben inkubáltuk, illetve 20 $\mu\text{mol/l}$ Rhod-2 AM-et is használtunk egyes kísérleteinkhez (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Akárcsak a felfebb részletezett kísérletek esetén; itt is ugyanazt a fluoreszcens képalkotó rendszert használtuk. Az OGB excitációs hullámhosszát 480 nm-re állítottuk a rendszerben a mérések idejére. A fluoreszcens szűrő készlet dikroikus tükörből (Omega XF2031 505DRLPXR; Omega Drive, Battleboro, VT, USA) és egy emissziós szűrőből (LP 515, Till Photonics) áll. A méréseket 344 x 260 pixeles felbontásban és 10 Hz-es mintavételi frekvenciával végeztük. Az általunk használt OGB excitációs hullámhossz egyaránt stimulálja a ChR2 megnyílást, a GFAP-ChR2 egérből származó adatokat össze tudtuk hasonlítani a vad típusú egerekből származó adatokkal.

A Rhod-2 festéket alkalmazó képalkotást hasonlóképp végeztük, mint ahogyan az OGB-vel, de annyiban különbözött, hogy az excitációs hullámhosszat 550 nm hosszúságúra állítottuk és más szűrő készletet használtunk (dikroikus tükör: Omega XF2019 590DRLP, emissziós szűrő: Omega 3RD590LP; Omega Drive, Battleboro, VT, USA). Ezeknél a kísérleteknél a ChR2 optogenetikai stimulációját egy külső, irányított LED fényforrással (Thorlabs, Newton, NJ, USA) végeztük 470 nm-es hullámhosszon.

A kalcium jeleket a kalcium indikátorral feltöltött sejt szómájából vettük fel. A fluoreszcencia változását a CCD kamerával rögzítettük, majd a Till Vision szoftverrel elemeztük a felvett jeleket. A kalcium hullámok területeit az azonos időtartamhoz tartozó adatpontok numerikus integrálásával számoltuk ki.

5.6. A biocitinnel jelölt neuronok láthatóvá tétele

A pipettaoldatba biocitint (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tettünk, mely a mérés során a sejt belsejébe jutott. A mérés után a szeleteket fixáltuk egy éjszakán keresztül 4 °C-on, amelyhez 4%-os paraformaldehid oldatot használtunk (0,1 mol/l foszfát pufferben; pH 7,4). Ezután a feltárást 60 percen keresztül Tris-pufferolt sóoldattal végeztük (8 mmol/l Tris bázis, 42 mmol/l Trizma HCl, 150 mmol/l NaCl, pH 7,4), melyet 0,1% Triton-X-el és 10% szarvasmarha szérummal egészítettünk ki. Ezután a szeleteket Alexa 488 konjugált streptavidinnel (1:300; Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) foszfát pufferben inkubáltuk 90 percen keresztül. Azokban a szeletekben, melyben nem volt tdTomato fluoreszcens jelölés (vad típusú C3H és B6 egerek), kolin acetiltranszferáz (ChAT) immunjelölést végeztünk erre specifikus kecske antitesttel (1:75 arányban; Millipore, Temecula, CA, USA) és 1:1000 arányban használt Texas Red-del jelölt nyúlban termeltetett anti-kecske másodlagos antitesttel (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). A sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóp (Carl Zeiss AG) segítségével készítettünk felvételeket azok rekonstruálása és dokumentálása miatt.

5.7. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai kísérletek az Anatómiai, Szövet. és Fejlődéstani Intézettel kollaborációban készültek. A kísérleteinkhez három vad típusú B6 egeret használtunk fel. Az állatokat túlaltattuk nátrium pentobarbitállal (50 mg/kg, intraperitoneálisan), majd transzkardiális perefúziót hajtottunk végre Tyrode oldattal (melyet karbogénnel oxigenizáltunk), melyet 4%-os paraformaldehides (0,1 mol/l foszfát pufferben oldva, pH 7,4) fixálás követett. A transzkardiális fixálás után a mesencephalont eltávolítottuk, utófixáltuk 4%-os paraformaldehidben 4 órán keresztül, majd 10 illetve 20%-os szacharózba (0,1 mol/l foszfát pufferben oldva) tettük, míg le nem süllyedt. Az immunreagensek bejutásának fokozására a mesencephalont fagyasztottuk majd felolvasztottuk. 50 µm-es vastagságú transzverzális szeleteket készítettünk vibratómmal, majd a szeleteket alaposan mostuk 0,1 mol/l-es foszfát pufferben (PB).

A szabadon úszó szeleteket először egy antitestkeverékkel inkubáltuk, amely tartalmazott egy nyúl anti-CB1-receptor (1:2000 hígításban, Cayman Chemical), egy kecske anti-ChAT (1:500 hígításban, Millipore) antitestet és egyet a következő antitestekből: tengerimalac anti-VGLUT2 (1:2000 hígításban, Millipore), tengerimalac anti-VGAT (1:500 hígításban, Synaptic Systems) vagy egér anti-GFAP (1:1000 hígításban, Millipore). A szeleteket először az elsődleges antitest oldatokkal inkubáltuk 2 napon keresztül 4 °C-on, majd ezt egy a megfelelő másodlagos antitestek keverékével való inkubálás követte, ami tartalmazott számarban termeltetett nyúl elleni IgG antitestet Alexa Fluor 555-el konjugálva (1:1000 hígításban; Invitrogen, Eugene, OR, USA), számarban termeltetett kecske elleni IgG-t Alexa Fluor 488-al konjugálva (1:1000 hígításban; Invitrogen, Eugene, OR, USA), számarban termeltetett tengerimalac elleni IgG-t Alexa Fluor 647-el konjugálva (1:1000 hígításban; Invitrogen, Eugene, OR, USA) és számarban termeltetett egér elleni IgG-t Alexa Fluor 647-el konjugálva (1:1000 hígításban; Invitrogen, Eugene, OR, USA). A CB1 receptor immunreaktív pontjaival való kolokalizációt a glutamaterg (VGLUT2-IR), vagy GABAerg (VGAT-IR) axonterminálisokra és az asztrocita-markerre (GFAP-IR) nézve kvantitatív analízist hajtottunk végre ezeken a többszörösen megfestett szeleteken. Az antitesteket PBS-ben hígítottuk (pH 7,4), mely 1% normál kecske szérumot (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) tartalmazott. A szeleteket üveg tárgylemezre terítettük, majd Vectashield lefedőanyaggal (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) fedtük le.

Az általunk alkalmazott CB1 receptor ellen termeltetett elsődleges antitest (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) specificitása előzetesen meghatározásra került (Hegyi és mtsai., 2009). Az immunfestés protokoll specificitásának ellenőrzésére a szabadon úszó szeleteket az előbb leírt protokoll szerint inkubálták, de az elsődleges antitestet kihagyták, vagy azt lecserélték 1% normál kecske szérumra. Nem figyeltek meg immunpozitivitást ezekben a mintákban.

Kollaborációs partnereink Olympus FV1000 konfokális mikroszkóp segítségével z tengely irányban 500 nm-nyi távolságra egymástól 1 μ m-es optikai szeleteket készítettek a mintákról. A szkenneléshez 60x-os PlanApo N olajimmerziós mikroszkóp objektívet (NA: 1,42) és az Olympus FV10-ASW szoftverét használták. A szkennelt képek feldolgozását Adobe Photoshop CS6 szoftver segítségével végeztük. A mikroszkóp beállítása (konfokális apertúra, lézer erősség, erősítés, offset, pixelméret) azonos volt minden minta felvételekor. A felüáteresztő szűrő küszöbértékeket azonos módon állítottuk be a háttérfestés kiszűréséhez mind a CB1 receptorra mind a többi jelöléshez.

A kvantitatív analízishez egy szabványos 10 x 10-es beosztású négyzetrácsos hálót helyeztünk a konfokális képeinken szereplő PPN területére. A rács 50 μ m x 50 μ m méretű volt, és benne egy négyzet 5 μ m nagyságú. Ezzel a szabványos ráccsal jelöltük ki illetve ebben vizsgáltuk a CB1 receptor immunpozitivitását és ennek egybefedését az axonok és gliasejtek markereivel. A kvantitatív analízis során három állatból véletlenszerűen választott három-három metszetből dolgoztunk. A mennyiségi analízis alatt számolt átlagértékek és standard eltérések (SEM) összesen kilenc metszetből származnak.

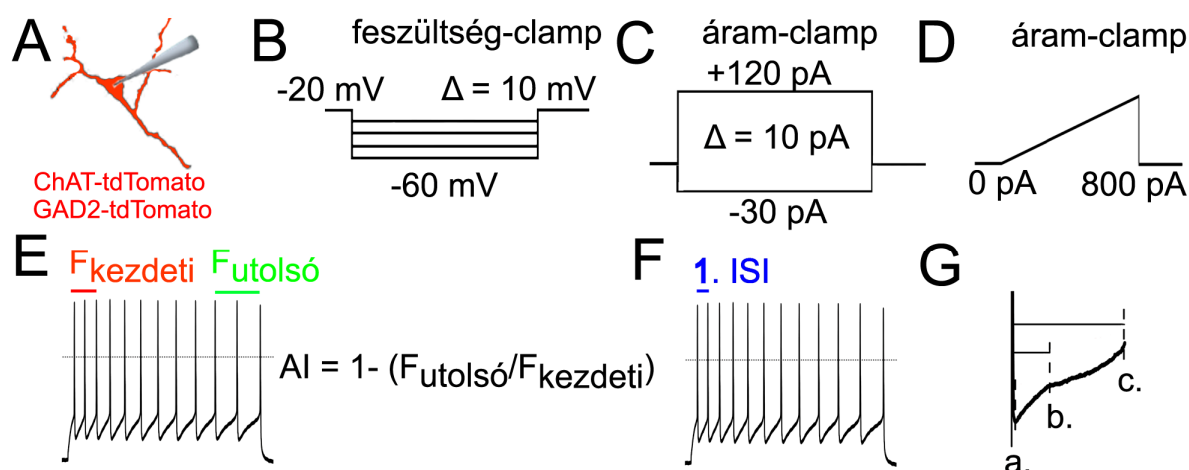
5.8. Statisztikai analízis

Az adatokat az átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A statisztikai szignifikanciát általában a Student-féle kétmintás t-próba segítségével határoztuk meg. A szignifikancia szintje $p < 0,05$.

6. Eredmények

6.1. Direkt neuronális neuromodulációs mechanizmusok vizsgálata

Kísérleteink első felében a PPN neuronjain érvényesülő direkt neuronális mechanizmusok egyikét, az ún. M-áramot vizsgáltuk. A vizsgálatok során választ kerestünk az M-áram sejttípus-specifikus jelenlétének a kérdésére. Azt is megvizsgáltuk, hogy milyen elektrofiziológiai sajátosságokat befolyásol az M-áram jelenléte vagy hiánya. Azt találtuk, hogy az M-áram a PPN kolinerg neuronjain van jelen, és hiányzik a nem-kolinerg, beleértve a GABAerg neuronpopulációk esetében. Az M-áram a közepes utóhiperpolarizáció és a tüzelési frekvencia adaptáció kialakításában játszik szerepet, valamint a magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkat modulálja (Bordás és mtsai, 2015).



8. ábra. Az M-áram vizsgálatának kísérleti elrendezése. **A.** A kísérletek genetikailag azonosított kolinerg (ChAT-tdTomato) és GABAerg (GAD2-tdTomato) neuronokon, teljes sejtes patch-clamp elrendezésben történtek. **B.** M-áram relaxációs protokoll. Feszültség-clamp üzemmódban, -20 mV-os tartópotenciálról 10 mV-os lépcsőkkel -60 és -30 mV közötti, 1 s hosszúságú repolarizáló lépcsőket alkalmaztunk. **C.** Az akcióspotenciál-tüzelést áram-clamp üzemmódban, -30 és +120 pA közötti, 1 s hosszúságú áramlépcsők alkalmazásával vizsgáltuk. **D.** Az oszcillációkat áram-clamp üzemmódban, 2 s hosszúságú, maximálisan 800 pA nagyságú áraminjekcióval váltottuk ki. **E.** Az adaptációs index (AI) meghatározása. **F.** Az első "interspike interval" meghatározása. **G.** Az utóhiperpolarizáció amplitúdója: (a) korai utóhiperpolarizáció, (b) közepes utóhiperpolarizáció (100 ms-mal az akciós potenciál csúcsa után), (c) késői utóhiperpolarizáció (300 ms-mal az akciós potenciál után).

6.1.1. A kolinerg neuronok rendelkeznek M-árammal, míg a GABAerg neuronok nem

A PPN-ben az M-áram kimutatását célzó kísérleteinkhez egy tdTomato nevű fluoreszcens fehérjét GAD2- vagy ChAT-promóter-függő módon kifejező egértörzseket használtunk fel. Az előbbi esetekben a GABAerg, míg az utóbbiakban a kolinerg neuronok szelektíven fejezték ki a fluoreszcens markert. A tdTomato-t kifejező neuronokba a mérés során a patch pipettával biocytint juttattunk be, majd ezután előhívtuk őket Alexa488 fluoreszcens fehérjével konjugált streptavidinnel, mely képes kapcsolódni a biocytinnel. Konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk, hogy megállapítsuk a mérésben résztvevő neuronok elhelyezkedését az agyszeletben, és hogy ezek GAD2- vagy ChAT-pozitivitása dokumentálva legyen **(8. ábra, A; 9. ábra, A-C, I-K)**.

Az M-áramot az ún. M-áram relaxációs protokoll segítségével mértük, illetve az áram specifikus blokkoló szerét, az XE991-et használva mutattuk ki az arra érzékeny áramot. Az M-áram relaxációs protokoll alkalmazásával -20 mV-ról -30 és -60 mV közötti, egyre negatívabb feszültségértékekre léptettük a membránpotenciált és ennek hatására történt az M-áramért felelős csatornák záródása. Az M-áram nagyságát az 1 s hosszúságú repolarizáló lépcsők elején mért azonnali és a feszültséglépcső végén kialakult steady-state áramok közötti különbségeként határoztuk meg **(8. ábra, B; 9. ábra, E)**. A genetikailag azonosított kolinerg neuronokon való méréseknél, a feszültséget -20 mV-ról egyre negatívabb értékek felé léptetve, különböző M-áram amplitúdókat kaptunk **(9. ábra, D, F)**. Egyéb agyi struktúrákon is megfigyelhető volt ez a jelenség (Brown és Adams, 1980; Shah és mtsai, 2002; Koyama és Appel, 2006). A feszültséget -40 mV-ra léptetve mértük az M-áram legnagyobb amplitúdóját, amely $-49,7 \pm 5,1$ pA volt ($n=23$). A számolt amplitúdók átlagát csökkentette az, hogy találtunk két sejtet, amelyeknél nem láttunk M-áramot. E két neuront leszámítva, az M-áram átlagos amplitúdója $-53,9 \pm 4,8$ pA volt. Az M-áramok amplitúdója -25 pA-tól egészen -160 pA-ig terjedt. A relaxációt egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illesztettünk meg **(9. ábra, E)**. A -40 mV-os feszültséglépcsőnél az M-áram relaxációja $162,8 \pm 19,2$ ms-os csökkenési időállandót ("decay tau") mutatott. Ez az időállandó kevésbé függött az alkalmazott repolarizáló feszültséglépcső nagyságától. A -60 mV-nál mért csökkenési időállandó ("decay tau") átlagértéke $150,8 \pm 26,3$ ms volt, de ez az érték

alacsonyabb repolarizáló feszültséglépcsők alkalmazásával egyre nagyobb volt ($161,1 \pm 14,8$ -50 mV-nál és $162,7 \pm 17$ ms -30 mV-nál).

Az M-áram egy másik módszerrel is meghatározható, mégpedig szelektív blokkoló szere, az XE991 segítségével, amelyet $20 \mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztunk a mérések során. A kontroll és az XE991-rezisztens áramok különbségének meghatározásával egy alternatív, farmakológiai módszerét alkalmaztuk az M-áram kimutatásának ($n = 11$). Amikor a szeleteket ezzel a szerrel mostuk át, a -20 mV-on mért tartóáram és a feszültséglépcsők alkalmazásával kapott azonnali és steady-state áramok közötti különbség egyaránt csökkent. A -20 mV-nál jelentkező tartóáram csökkenése átlagosan $-39,7 \pm 7,5$ pA volt a kolinerg sejteken. A kapott értékek -19 pA és -65 pA között mozogtak (**9. ábra, G, H**).

Ellentétben a kolinerg sejtekkel, a PPN GABAerg sejtjei nem rendelkeztek az M-áramhoz hasonló árammal (**9. ábra L, M**). Ugyanazokat a kísérleti módszereket alkalmaztuk az M-áram mérésére, mint a kolinerg sejteknél, de csakis egészen alacsony amplitúdókat mértünk a GABAerg neuronokról minden egyes esetben ($-1,27 \pm 1,29$ pA-t -40 mV-nál; +8 pA-tól -7 pA-ig; $n = 13$; **9. ábra, N**). Az XE991 alkalmazásával a GABAerg neuronoknál nem láttunk változást a felvett áramokban. A -20 mV feszültség hatására kialakult tartóáram átlagos változása csupán $-3,33 \pm 1,8$ pA volt (0-tól -6 pA-ig, $n = 8$; **9. ábra, O, P**).

Annak kiderítésére, hogy akad-e bármi különbség az egértörzsek között, illetve azért, hogy kizárjuk annak a lehetőség, hogy a tdTomato vagy a cre-rekombináz tehető felelőssé a megfigyelt jelenségek létrejöttében, vad típusú C3H és B6 egereken is végrehajtottunk ezeket a kísérleteket. Ezeknél a méréseknél a vizsgált neuronok kolinerg mivoltát *post hoc* kolin-acetiltranszferáz immunhisztokémiával derítettük ki. A B6 egértörzs esetében azoknál a sejteknél, melyek kolinergnek bizonyultak, az azonnali és a steady-state áramkomponensek közötti különbségből meghatározott M-áram amplitúdója -40 mV-on $64,7 \pm 17,6$ pA volt. Az XE991-érzékeny áramból számolt M-áram amplitúdója pedig -20 mV tartófeszültségen $60,3 \pm 14,8$ pA volt ($n = 4$). A nem-kolinerg neuronok áramai, az előzőek szerint számítva $4,06 \pm 2,64$ pA illetve $2,8 \pm 1,65$ pA volt ($n = 5$). Hasonlóan a B6 egértörzsön végrehajtott kísérletekhez, a C3H egerek ChAT-pozitív sejtjein is láttunk M-áramot $48,8 \pm 10,1$ pA amplitúdóval -40 mV-on,

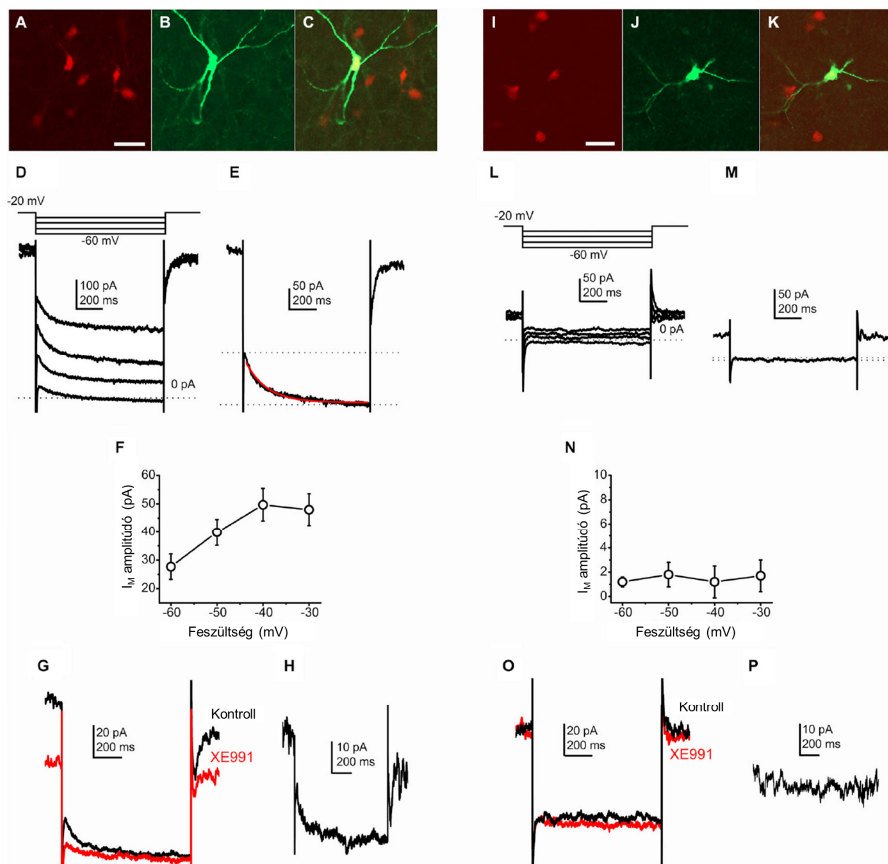
illetve az XE991-érzékeny áramból számolva $37,75 \pm 0,8$ pA volt az M-áram amplitúdójának mértéke -20 mV-os tartófeszültségen. A nem-kolinerg sejteken a vad típusú állatoknál sem jelentkezett M-áram ($1,66 \pm 0,8$ pA -40 mV-on; $-0,2 \pm 0,48$ pA -20 mV-on, az XE991-érzékeny összetevőt tekintve; $n = 7$). Szintén nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a transzgénikus és a vad típusú törzsek között, illetve a nem-kolinerg és a GABAerg sejtek között sem volt szignifikáns különbség a mért adatok tekintetében.

Kísérleteink azt mutatták, hogy a PPN genetikailag azonosított kolinerg ChAT-tdTomato neuronjainak többségén (23-ból 21 db sejt) mérhető M-áram, míg egyik GABAerg neuron sem rendelkezik vele ($n = 13$).

6.1.2. Az M-áram jeleléte vagy hiánya hozzájárul a kolinerg és a GABAerg neuronok közötti elektrofiziológiai különbségekhez

Következő kísérleteinkben arra kerestünk bizonyítékot, hogy az M-áram jelenléte vagy hiánya okoz-e bármilyen elektrofiziológiai különbséget a PPN kolinerg illetve a GABAerg sejtei között.

Ennek vizsgálatára szintén a genetikailag módosított egértörzseinket használtuk (GAD2-, ChAT-tdTomato). A kísérletek végrehajtásához 28 kolinerg és 17 GABAerg neuronon végeztünk patch clamp kísérletet, és rajtuk olyan paramétereket vizsgáltunk, melyek az M-áramtól függenek, mint például a neuronok tüzelési frekvenciája, az első két akciós potenciál közti időintervallum, az akcióspotenciál-sorozat adaptációs indexe, illetve az utóhiperpolarizáció gyors, közepes és lassú szakaszának amplitúdói. Áram-clamp üzemmódot és teljes sejttes elrendezést használtunk ezek méréséhez. A mérések során 1 másodperces négyszög áramimpulzusokat alkalmaztunk 50 illetve 100 pA-es amplitúdóval, miközben a membránpotenciált manuálisan -60 mV-ra állítottuk (8. ábra, C; 10. ábra, A, B). A méréseinkből az derült ki, hogy az 50 vagy 100 pA-es áraminjekció $7,1 \pm 0,83$ Hz és $12,89 \pm 1,28$ Hz frekvenciájú akcióspotenciál-sorozatot váltott ki a kolinerg neuronokban, míg a GABAerg neuronokban $10,28 \pm 0,95$ Hz és $20,81 \pm 1,89$ Hz frekvenciájú akciós potenciál sorozatot láttunk.



9. ábra *A kolinerg neuronok rendelkeznek M-árammal, míg a GABAerg neuronok nem. A-C. Egy azonosított kolinerg neuron. Kalibrációs egyenes = 50 μ m. A. ChAT függő tdTomato expresszió (piros). B. Biocytin jelölt sejt (zöld). C. Egyesített kép. D. Áramfelvétel egy kolinerg neuronról, az alkalmazott feszültség protokoll a panel felső részén látható. E. Áramfelvétel -40 mV repolarizáló lépcső hatására. A pontozott vonalak az azonnali (felső pontozott vonal) és a steady state (alsó pontozott vonal) áram komponenseket mutatják. Az M-áramot ezen áramkomponensek különbségéből állapítottuk meg. A pirossal jelzett felvétel az áram illesztett csökkenő fázisát mutatja. F. Az M-áram amplitúdó feszültségfüggése (X tengely: a repolarizáló áramlépcsők amplitúdója) G. Az M-áram farmakológiai meghatározása. (fekete=kontroll; piros = 20 μ M XE991). H. Az XE991-érzékeny áram; amit a kontroll és az XE991 jelenlétében mért áram kivonásával számítható ki. I-K. Egy azonosított GABAerg neuron. I. GAD2-függő tdTomato expresszió (piros). J. Biocytin jelölt neuron (zöld). K. Egyesített kép. L. Áramfelvételek egy GABAerg sejtről, mely a D panelen bemutatott feszültségprotokoll hatására alakult ki. M. Áramfelvétel -40 mV-os repolarizáló lépcső hatására. Itt csak minimális különbség fedezhető fel az azonnali és steady state áramok között. N. Nem látható M-áram egyik repolarizáló lépcső hatására sem. O. A GABAerg sejteken mért áramok nem voltak érzékenyek az XE991-re. P. Kontroll és XE991 mellett mért áramgörbék különbsége.*

A két sejttípus között megfigyelt frekvenciakülönbség szignifikáns ($p = 0,01$ és $0,001$; **10. ábra, C**). A mért adatokat megerősíti az, hogy a 100 pA -es áraminjekció hatására kialakult akcióspotenciál-sorozatokban mért első két akciós potenciál közti időintervallum értéke szintén szignifikáns különbséget mutatott a kolinerg és a GABAerg sejtek között, miszerint az intervallum ideje a kolinerg sejteknél $55,2 \pm 4,2 \text{ ms}$, míg a GABAerg sejteknél $39,4 \pm 3,8 \text{ ms}$ volt ($p = 0,007$; **10. ábra, D**). Az adaptációs index (AI) egy olyan jellemző, melyből az derül ki, hogy milyen mértékben csökken az akciós potenciálok frekvenciája egy akciós potenciál sorozaton belül, a sejt hogyan adaptálódik egy depolarizáló stimulus hatására. Ez a funkcionális jellemző szintén az M-áram jelenlétével függ össze a szakirodalom szerint (Madison és Nicoll, 1984; Nigro és mtsai., 2014). A kolinerg neuronoknál nagy mértékű adaptációt láttunk, az adaptációs index értéke $0,4 \pm 0,02$ (mely $0,15$ -től $0,68$ -ig tartó tartományból kapott átlag), míg a GABAerg neuronok szignifikánsan kisebb AI értékkel rendelkeznek ($0,23 \pm 0,03$; $0,05$ -től $0,52$ -ig; $p = 0,0002$; **8. ábra, E-F**; **10. ábra, E**).

Az utóhiperpolarizáció közepes és lassú szakaszairól úgy tartják, hogy az M-áram hatással van nagyságukra (Madison és Nicoll, 1984; Storm, 1989; Koyama és Appel, 2006; Tzingounis és Nicoll, 2008; Mateos-Aparicio és mtsai., 2014). Mivel az irodalom nem egységes a gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció meghatározási módjában, mi úgy adtuk meg az utóhiperpolarizációk maximális amplitúdóit, hogy az akciós potenciál csúcsától 50 ms -on belül lévő amplitúdó a gyors utóhiperpolarizációt (fAHP), a csúcstól 100 ms -ra mért amplitúdó a közepes utóhiperpolarizációt (mAHP), a csúcstól 300 ms -ra lévő amplitúdó pedig a lassú utóhiperpolarizációt (sAHP) jelentette. Az amplitúdókat az akciós potenciál küszöbértéke és az előzőleg meghatározott pontok közötti különbségből kaptuk meg (**8. ábra G**, **10. ábra, F**). A mért eredményekből azt láttuk, hogy az utóhiperpolarizációk minden esetben szignifikánsan nagyobbak voltak a kolinerg sejteken, mint a GABAerg sejteken. Számszerűsítve; a gyors utóhiperpolarizáció a kolinerg sejteken $-18,5 \pm 0,8 \text{ mV}$, a GABAerg sejteken $-12,7 \pm 0,8 \text{ mV}$ ($p = 0,0002$), a közepes utóhiperpolarizáció $-10,4 \pm 1$ és $-3,6 \pm 1,1 \text{ mV}$ ($p = 0,0001$), míg a lassú utóhiperpolarizáció $-3,52 \pm 0,7$ és $-1,34 \pm 0,68 \text{ mV}$ ($p = 0,016$) volt (**10. ábra, G**).

A kolinerg és GABAerg sejtek nyugalmi menbránpotenciálját is összehasonlítottuk, de ebben nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két sejttípus között. A nyugalmi

membránpotenciál $-56,48 \pm 1$ mV volt a kolinerg neuronokon, $-56,72 \pm 0,83$ mV volt a GABAerg neuronokon ($p = 0,44$).

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a szóban forgó sejttípusok közötti eltéréseknek az M-áram az okozója, az M-áram specifikus gátlószerét, az XE991-et alkalmaztuk 7 kolinerg és 5 GABAerg sejten, az előbbi paramétereket mérve (**10. ábra, H, I**). A kolinerg neuronokon az M-áram blokkolása az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia csökkenését okozta az azonos áraminjekciók hatására. 50 pA áraminjekció hatására kontroll körülmények között $5,1 \pm 1,3$ Hz, XE991 hozzáadásával pedig $8,2 \pm 1,3$ Hz-re növekedett a tüzelési frekvencia. 100 pA áraminjekció hatására kontroll körülmények között $9,2 \pm 1,6$ Hz-ről $13,5 \pm 1,6$ Hz-re növekedett XE991 hozzáadásával ($p = 0,05$ és $0,04$; **10. ábra, J**).

Összehasonlítottuk a kontroll körülmények között és az XE991 jelenlétében mért időintervallumot az első két akciós potenciál között. Ez a paraméter csökkenő tendenciát mutatott XE991 hatására, viszont ez a csökkenés nem volt statisztikailag szignifikáns. Az intervallum $75,6 \pm 17,7$ ms volt kontroll körülmények között és $65,4 \pm 14,4$ ms volt XE991 jelenlétében ($p = 0,31$; **10. ábra, K**). Az adaptációs index viszont jól látható csökkenést mutatott az XE991 hatására. Kontroll körülmények között az AI értéke $0,37 \pm 0,07$ volt, XE991 hozzáadása után ez az érték lecsökkent $0,2 \pm 0,04$ -re ($p = 0,033$; **10. ábra, L**).

Az M-áram blokkolásával valamennyi utóhiperpolarizációs amplitúdó csökkent, viszont statisztikailag szignifikánsnak csak a közepes utóhiperpolarizáció amplitúdócsökkenése mutatkozott. Kontroll körülmények között $-18 \pm 2,4$ mV-ot, XE991 hatására $-10,9 \pm 2,1$ mV-ot mértünk ($p = 0,035$; **10. ábra, M, N**).

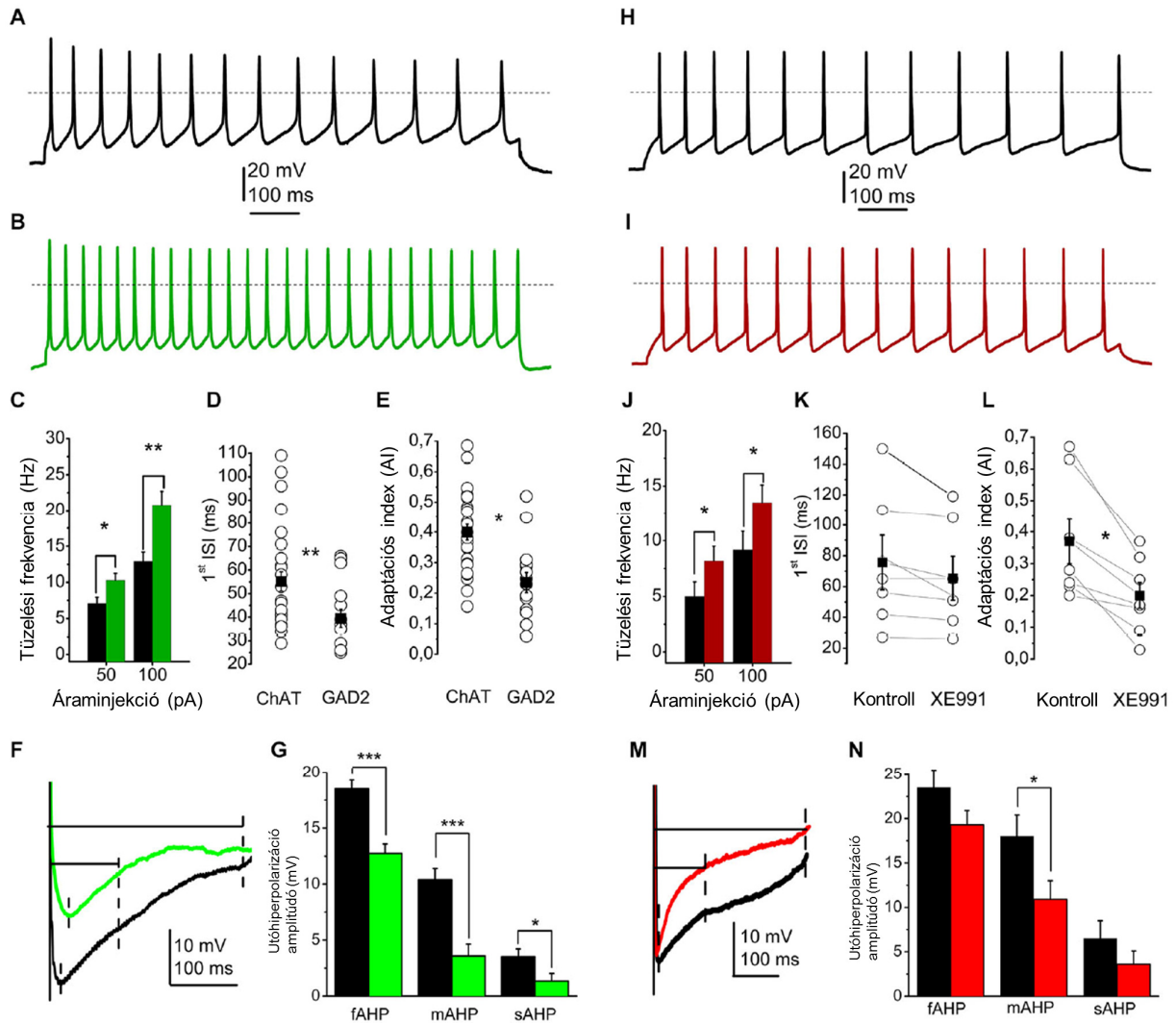
Bár a nyugalmi membránpotenciál számszerű különbséget mutatott XE991 hatására, viszont ez a különbség nem volt szignifikáns ($-56,71 \pm 2,68$ mV kontroll körülmények között, $-52,18 \pm 3,7$ mV XE991 hozzáadása után; $p = 0,17$).

A vizsgált elektrofiziológiai paramétereket tekintve az XE991 alkalmazása nem okozott szignifikáns különbségeket a GABAerg sejteken ($n = 5$). Az első két akciós potenciál közti időintervallum ebben a GABAerg sejtpopulációban $39,1 \pm 8,3$ ms volt kontroll körülmények

között és $41,5 \pm 8,4$ ms-ra változott XE991 hozzáadásával, ami nem jelentett szignifikáns változást. Az adaptációs index, amely kontroll körülmények között $0,18 \pm 0,04$ volt, XE991 hatására $0,17 \pm 0,05$ -re csökkent. Szintén nem láttunk változást az utóhiperpolarizáció különböző szakaszainak amplitúdóiban sem (fAHP: $13,4 \pm 3$ mV kontroll körülmények között, $12,8 \pm 2,5$ mV XE991 jelenlétében; mAHP: $8,2 \pm 2,2$ mV és 8 ± 2 mV; sAHP: $2,2 \pm 1,2$ mV és $3 \pm 0,8$ mV). A nyugalmi membránpotenciál sem változott ($-58,1 \pm 1,5$ mV kontroll esetben, $-57,6 \pm 1,8$ mV XE991 mellett).

Annak érdekében, hogy felderítsük az M-áram szerepét a kolinerg és GABAerg neuronok között lévő elektrofiziológiai különbségek létrejöttében, a kontroll körülmények között vizsgált GABAerg sejtekről és a XE991-kezelt kolinerg sejtekről kapott olyan paramétereket hasonlítottuk össze, mint a tüzelési frekvencia 50 és 100 pA áraminjekció hatására, adaptációs index és az utóhiperpolarizációk amplitúdója. Érdekes módon, amikor a kolinerg neuronok M-áramát blokkoltuk, az adaptációs index és az 50 pA-es depolarizáló áraminjekció hatására létrejött akciós potenciál sorozat frekvenciája nem különbözött szignifikánsan a két csoport között, míg az XE991 hozzáadása előtt ezek a paraméterek szignifikáns különbséget mutattak. Azonban a 100 pA áraminjekció hatására létrejött akciós potenciál sorozat frekvenciája és a gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizáció szignifikánsan különbözött az XE991 hozzáadása után is.

A kapott adatok azt mutatják, hogy a kolinerg neuronok M-áramának jelenléte fontos szerepet játszik a kolinerg és GABAerg neuronok között a tüzelési frekvenciában illetve ennek adaptációjában. Ellentétben ezzel, habár az M-áram hozzájárul az utóhiperpolarizáció alakulásához, nem ez az egyetlen áramtípus, amely meghatározza az általunk megfigyelt különbségeket a két neuroncsoportban.



10. ábra Az M-áram jelenléte vagy hiánya elektrofiziológiai különbségeket okoz a kolinerg és GABAerg neuronok közt. **A.** Akciós potenciál sorozat felvétel egy kolinerg neuronról, 100 pA áraminjekció hatására (fekete). **B.** Akciós potenciál sorozat felvétel egy GABAerg neuronról, ugyanazon stimulus hatására (zöld). **C-E.** Kolinerg (fekete) és GABAerg (zöld) neuronok elektrofiziológiai sajátosságainak statisztikai összehasonlítása. **C.** Az áraminjekciók hatására a GABAerg sejteknek nagyobb az akciós potenciál frekvenciája. **D.** Az első és második AP közötti intervallum (az ábrán ISI rövidítéssel szerepel) sejttípus függése (üres karikák: egyedi adatpontok; fekete négyzetek: átlag $\pm$ SEM). **E.** Az adaptációs index sejttípus-függő változása (üres karikák: egyedi adatpontok; fekete négyzetek: átlag $\pm$ SEM). **F-G.** Az utóhiperpolarizáció sejttípus-függése. **F.** Feszültség felvételek kolinerg (fekete) és

GABAerg (zöld) neuronok esetében. A szaggatott vonalak jelölik a gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizációt. **G.** A gyors (fAHP), a közepes (mAHP) és a lassú (sAHP) utóhiperpolarizációk statisztikai összehasonlítása. Fekete: kolinerg; zöld: GABAerg. **H.** Akcióspotenciál-sorozat felvétel egy másik kolinerg neuronról, kontroll körülmények között (fekete). **I.** Akcióspotenciál-sorozat a kolinerg neuronról, 20 μ M XE991 jelenlétében (piros). **J-L.** Kolinerg neuronok kontroll (fekete) és 20 μ M XE991 jelenlétében (piros) mért elektrofiziológiai paraméterek statisztikai összehasonlítása. **J.** XE991 jelenlétében megnő az 50 és 100 pA nagyságú áraminjekciók hatására kialakuló akcióspotenciál-tüzelés frekvenciája. **K.** Az első és második AP közötti intervallumban mért változások XE991 hatására (üres karikák: egyedi adatpontok; fekete négyzetek: átlag $\pm$ SEM). **L.** XE991 hatására történt változások az adaptációs indexben (üres karikák: egyedi adatpontok; fekete négyzetek: átlag $\pm$ SEM). **M-N.** A XE991 hatása az utóhiperpolarizációk amplitúdójára. **M.** Feszültség felvételek egy kolinerg neuronról kontroll körülmények (fekete) és XE991 jelenlétében (piros). A szaggatott vonalak jelölik a gyors, közepes és lassú utóhiperpolarizációt. **N.** A gyors (fAHP), a közepes (mAHP) és a lassú (sAHP) utóhiperpolarizációk statisztikai összehasonlítása. Fekete: kolinerg; piros: XE991.

6.1.3. A magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkra hatással van az M-áram jelenléte

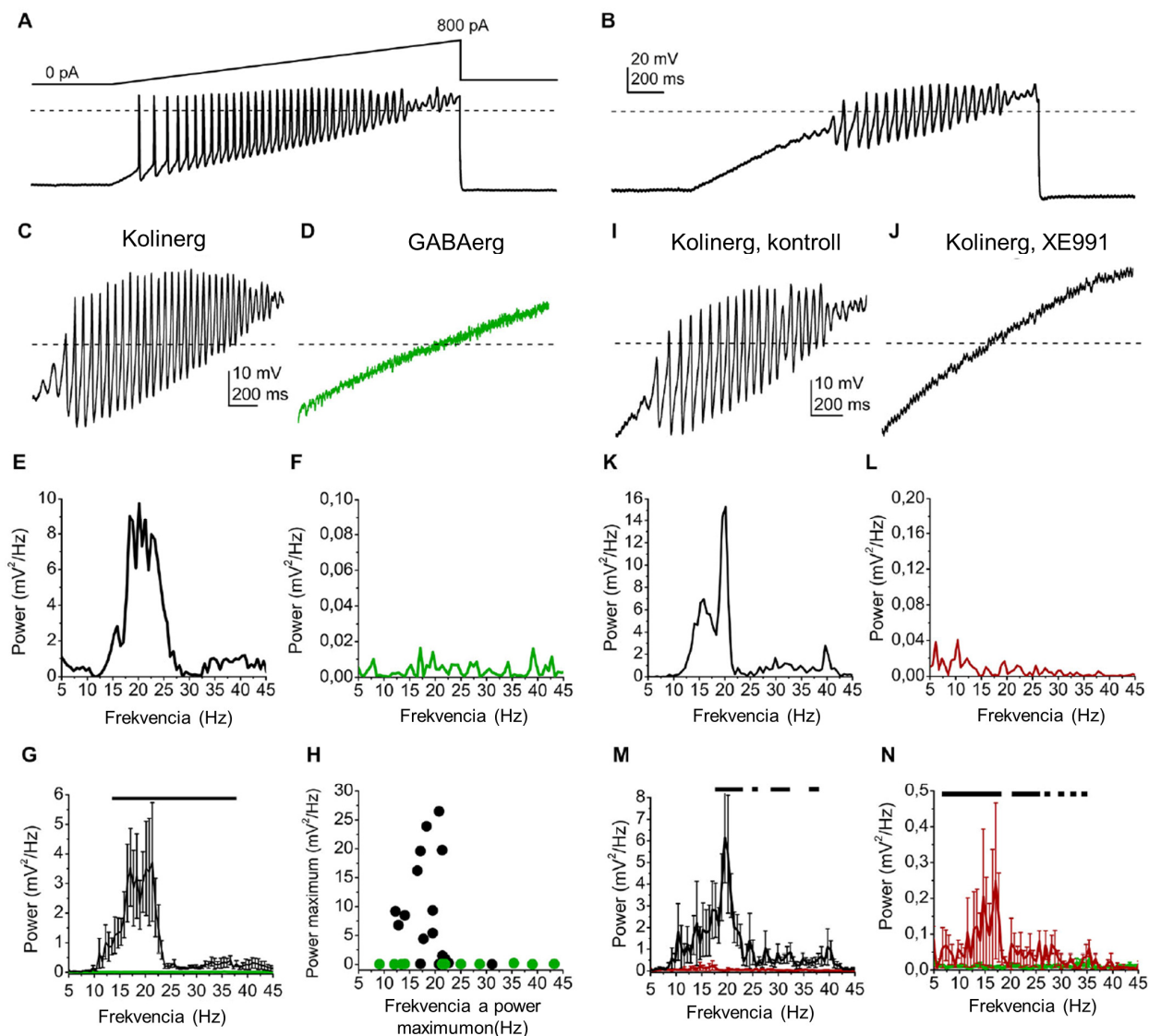
A következő kísérletsorozatban a magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkat vizsgáltuk. Irodalmi adatok alapján ezek a membránpotenciál változások TTX-rezisztensek, kialakulásukban P/Q- és N-típusú kalcium csatornák és kálium csatornák játszanak szerepet. Ha úgynevezett rámpa áramimpulzusokat alkalmaztunk a négyzet impulzusok helyett, nagyobb amplitúdójú oszcillációkat mértünk (Kezunovic és mtsai., 2011, 2013; Garcia-Rill és mtsai., 2014). Ahhoz, hogy létrehozzuk az oszcillációkat, 1 s hosszúságú rámpa áraminjekciót alkalmaztunk 800 pA-es áramerősség maximummal (**8. ábra, D; 11. ábra, A**). Az oszcillációkat elfedő akciós potenciálok gátlása miatt a rendszerhez 1 μ mol/l TTX-et adtunk, így csak a TTX-rezisztens magas küszöbű oszcillációk látszottak a felvételeken (**11. ábra, B**). Az oszcillációk 10-45 Hz-es frekvenciával rendelkeztek.

A mérések során azt láttuk, hogy a kolinerg neuronok nagy része rendelkezett magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkkal, míg a GABAerg neuronok esetében egyiknél sem tapasztaltunk nagy amplitúdójú oszcillációkat (**11. ábra, C-F**). Felvettük a GABAerg és kolinerg

sejtek oszcillációs aktivitásának power spektrumát, melyekből azt láttuk, hogy a 13 és 38 Hz közé eső oszcillációkat tekintve szignifikánsan különbözött a két sejttípus ($p = 0,05 - 0,0001$; **11. ábra, G**). Az oszcillációk power csúcsa $0,5 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ alatt volt 17-ből 4 kolinerg neuronról származó felvételből, míg ezt az értéket nem haladta meg a 11 GABAerg neuronról származó adatok közül egyik sem. A kolinerg neuronok átlagos power csúcsa $8,97 \pm 2,17 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ volt, melyhez képest szignifikánsan kisebb volt a GABAerg neuronok átlagos power csúcsa ($0,06 \pm 0,02 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ volt ; $p = 0,001$). A kolinerg sejtek oszcillációinak frekvenciája a power maximum értékénél $19,9 \pm 1,07 \text{ Hz}$ volt (12,2-től 31,1 Hz-ig), a GABAerg sejtek oszcillációs frekvenciája pedig $23,93 \pm 3,49 \text{ Hz}$ volt (9,1- től 39,6 Hz-ig; $p = 0,06$; **11. ábra, H**).

A kolinerg neuronok oszcillációs aktivitását az M-áramot blokkoló XE991 jelenléte alatt is vizsgáltuk, melyet $20 \text{ } \mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztunk. A szer hatására az oszcillációk power-je nagymértékben csökkent (**11. ábra, I-L**). A power spektrum számos pontja szignifikáns különbségeket mutatott a 18-23, 28-32 és 37-40 Hz frekvenciáknál kontroll körülmények és az XE991 kezelés között ($p = 0,05 - 0,01$; **11. ábra, M**).

Habár az XE991 az oszcillációkat szignifikánsan csökkentette, a blokkoló szer alkalmazása mellett kapott power spektrum nem fed egybe a GABAerg neuronok power spektrumával. Az M-áram blokkolása után a kolinerg sejteken mért oszcilláció power-je szignifikánsan nagyobb a 6-19 és 21-24 Hz frekvenciáknál. Érdekes viszont megemlíteni, hogy a GABAerg sejteknél hiányzó, 20 Hz-nél lévő oszcillációkat majdnem teljesen eltüntette az M-áram blokkoló XE991 a kolinerg neuronokról (**11. ábra, N**).



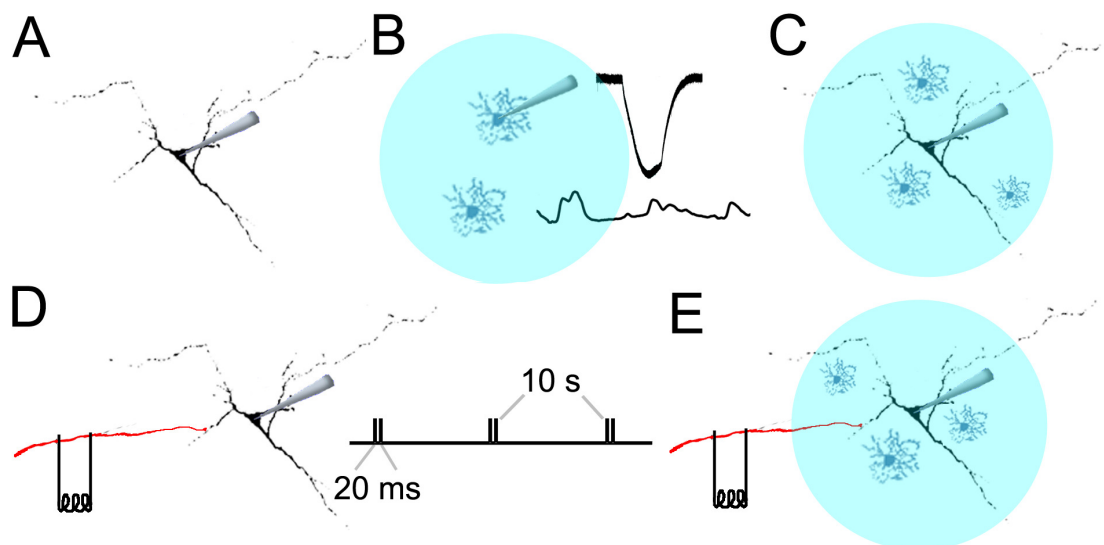
11. ábra *A magas küszöbű membránpotenciál oszcillációra hatással van az M-áram. A. Egy reprezentatív feszültség felvétel egy kolinerg sejtről emelkedő amplitúdójú áraminjekció hatására, kontroll körülmények között. B. Feszültség felvétel ugyanarról a neuronról TTX jelenlétében. C. Kolinerg neuronról készült magas küszöbű oszcilláció felvétele TTX jelenlétében. D. GABAerg neuronról készült magas küszöbű oszcilláció felvétele TTX jelenlétében. E. A C. panelen látható kolinerg neuron oszcillációs aktivitásának power spektruma. F. A D panelen látható GABAerg neuron oszcillációs aktivitásának power spektruma. G. Az összes neuron power spektrumának statisztikai összegzése (átlag ± SEM). Fekete: kolinerg; zöld: GABAerg. A fekete vonal azt a frekvenciatartományt jelzi, ahol*

szignifikáns volt a különbség. **H.** A power csúcsok láthatók a power maximum frekvenciák függvényében (fekete: kolinerg; zöld: GABAerg neuronok). **I.** Egy másik neuron magas küszöbű oszcillációja TTX jelenlétében. **J.** Ugyanezen neuron felvétele 20 μ M XE991 jelenlétében. **K.** Az I panelen látható neuron oszcillációs aktivitásának power spektruma. **L.** A J panelen látható XE991 mellett látott oszcillációs aktivitás power spektruma. **M.** Az összes kolinerg neuron kontroll körülmények között (fekete) és XE991 mellett (piros; átlag $\pm$ SEM) mért power spektrumok statisztikai összegzése. **N.** GABAerg neuronok (zöld; átlag $\pm$ SEM) és kolinerg neuronok XE991 mellett (piros) látható power spektrumának összehasonlítása. Az M és N panelek fekete vonalai azokat a frekvenciatartományokat jelzik melyek statisztikailag különböztek a két vizsgált adatpopulációban.

6.2. A PPN neuronokon érvényesülő indirekt, asztrocita-függő neuromodulációs hatások vizsgálata

A direkt neuronális hatások mellett a neuromodulációs mechanizmusok -korábbi kísérleteink alapján- feltehetően egy asztrocita-függő komponenssel is rendelkeznek. A CB1 receptoron érvényesülő kannabinoid hatások asztrocita-függő komponens részben egy korábbi munkában írtuk le (Kőszeghy és mtsai, 2015), majd a jelen munkában azokra a kérdésekre kerestük a választ, hogy milyen részben neuronális, milyen részben asztrocita-függő a megfigyelt hatás (Kovács és mtsai, 2017).

Azt tapasztaltuk, hogy az asztrociták aktivációja képes a PPN neuronokon mGluR-függő depolarizációt és hiperpolarizációt is kiváltani; így megerősítést nyert korábbi elméletünk, hogy a CB1 receptor agonisták az asztrociták aktivációján keresztül képesek a neuronális excitabilitást befolyásolni. Kimutattuk továbbá, hogy a más struktúrákon jól ismert, CB1 receptor függő preszinaptikus gátlás is létezik a PPN szinaptikus kapcsolatain (Kovács és mtsai, 2017)



12. ábra Az indirekt, asztrocitafüggető neuromodulációs mechanizmusok vizsgálatának kísérleti elrendezése. **A.** Tartóáram vizsgálata CB1 receptor agonista hatására. Neuronon történő teljes-sejtes patch clamp mérés. **B.** GFAP-ChR2 egér asztrocitáin végzett optogenetikai aktiváció. Az asztrocitákon teljes sejtes patch-clamp mérések és kalcium imaging történt. **C.** Az asztrocita-aktiváció neuronális következményeinek vizsgálata. Az asztrociták optogenetikai aktivációja mellett neuronokon történt patch-clamp mérés. **D.** A kiváltott EPSC-k vizsgálata. A preszinaptikus rostok stimulációja 50 Hz frekvenciájú kettős stimulációt 10 s-onként ismétlő protokollal történt. **E.** Az asztrocita-aktiváció preszinaptikus hatásainak vizsgálata. A D. panel elrendezése mellett történt optogenetikai asztrocita-aktiváció.

6.2.1. A PPN neuronjain lévő CB1 receptorok stimulációjának szinaptikus és extraszinaptikus hatásai

Munkacsoportunk egyik korábbi munkájában a neuronok extraszinaptikus áramaira kifejtett kannabinoid hatásokat mutatta be (Kőszeghy és mtsai, 2015). A CB1 receptor agonisták hatására a neuronok többféle módon reagáltak: egyes neuronok depolarizálódtak, mások hiperpolarizálódtak, míg voltak, amelyek nem reagáltak. Úgy tűnik, hogy ezek a hatások nem függenek neuronális hálózati aktivitástól, mert a gyors szinaptikus neurotranszmisszió blokkolása, vagy a tetrodotoxin alkalmazása sem fejtett ki hatást ezekre a membránpotenciál változásokra (Kőszeghy és mtsai., 2015). Ez az eredmény látszólag cáfolja azt a széles körben elfogadott tényt, miszerint a CB1 receptorok főképp preszinaptikus hatásokat fejtenek ki (Lovinger, 2008; Kano, 2014; Katona és Freund, 2012). Hogy megvilágítsuk, ez valóban így van-e, jelen munkában célunk volt a kannabinoid receptor stimuláció posztzinaptikus áramokra

és a tónusos áramokra kifejtett hatását is megfigyelni, hogy külön tudjuk választani a különböző kannabinoid hatásokat. 17 neuronon végeztünk árammérést feszültség-clamp üzemmódban, -60 mV-os tartó feszültségen. A CB1 agonista WIN55,212-2-t (1 $\mu\text{mol/l}$) adva a rendszerhez, tónusos áramok keletkeztek +22 és -22 pA közötti áramerősséggel (12. ábra, A; **13. ábra, A-F**). Hét esetben azt láttuk, hogy a befelé irányuló áram értéke meghaladja a -3,5 pA-t, míg három neuronon +3,5 pA-t meghaladó kifelé irányuló áramot jelentkezett. A többi hét esetben a tartóáram változása nem haladta meg a 3,5 pA-t (**13. ábra, I**). Ezek a tartóáram változások csak kismértékben korrelálnak azzal, hogy a sejtestek hol helyezkednek el a rostro-caudalis irányú tengely mentén. Ahhoz, hogy kiderítsük, hogy a WIN55,212-2-nek más támadáspontjai is lehetnek-e a CB1 receptoron kívül, a kísérleteket CB1 receptor knockout egerek PPN neuronjain is végrehajtottuk. Ezen mérések eredményeképpen 9 sejt adatait összegeztük (**13. ábra, G-I**). Azt mutatták a kísérletek, hogy a WIN55,212-2 alkalmazásával a tartóáram változása 8 esetben nem haladta meg a 3,5 pA-t, és ezen túl mindössze egy esetben alakult ki -4 pA-nyi befelé irányuló áram. A tartóáram változásának átlagos abszolút értéke szignifikánsan magasabb volt a vad típusú mintákban, mint a CB1 knockout mintákban ($7,54 \pm 1,8$ pA a vad típusúban, a CB1 knockoutban pedig $1,49 \pm 0,37$ pA volt; $p = 0,01$; 4. ábra, I). Ezeket az adatokat összehasonlítottuk a tartóáramnak a vad típusú állat esetében megfigyelt spontán fluktuációival is. A fluktuációk abszolút értéke $1,41 \pm 0,25$ pA volt, mely nem különbözött szignifikánsan a CB1 knockout egérnél megfigyelt változásoktól ($n = 18$; $p = 0,41$), míg a WIN55,212-2 szignifikánsan nagyobb változásokat okozott a vad-típusú állatokban. A fluktuációk maximális értéke -2,8 és +3,2 pA volt ($n = 18$; $p = 0,002$; **13. ábra, I**).

A következő kísérletünkben megpróbáltuk elkülöníteni a CB1 receptor stimuláció által létrejött direkt neuronális hatásokat az indirekt, asztrocita-függő mechanizmusoktól. A szeleteket 45 percen keresztül előinkubáltuk 1 $\mu\text{mol/l}$ thapsigarginnal a mérésekig, hogy a belső kalcium raktárak kiürüljenek addigra. Ez az eljárás leginkább az asztrociták aktivitását képes gátolni, és a neuronális működéseket kevésbé érinti (Navarrete és Araque, 2008, 2010; Perea és mtsai., 2014; Kőszeghy és mtsai., 2015). A thapsigargin kezelés után a tartóáram spontán fluktuációja szignifikánsan megnőtt ($n = 8$) a kezeletlen mintákhoz hasonlítva ($5,24 \pm 1,32$ pA thapsigarginnal és $1,41 \pm 0,25$ pA kontroll esetben; $p = 0,0001$; **13. ábra, I, M**, piros színű szimbólumai és oszlopai). Amikor a WIN55,212-2-t alkalmaztuk a thapsigarginnal kezelt

mintákon, a neuronoknak tónusos áramai nem különböznek szignifikánsan a tartóáram spontán fluktuációitól ($5,81 \pm 1,02$ pA; $p = 0,25$; **13. ábra, K-M**).

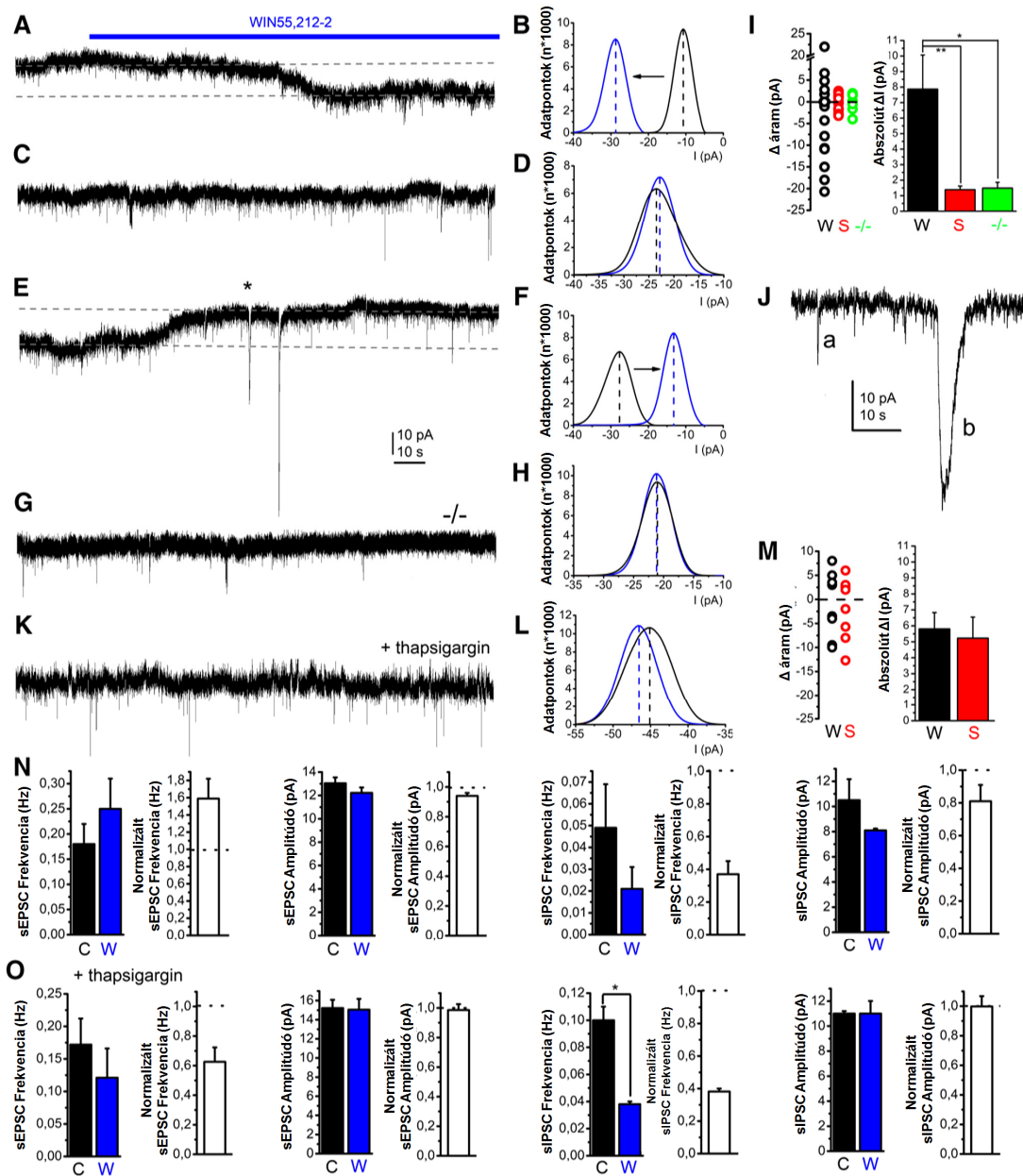
A 17 PPN neuronról felvett mérésből 3 esetben a CB1 receptor agonista hozzáadásakor lassú befelé irányuló áramot láttunk ("slow inward current", SIC; **13. ábra, E, J**). Ezek az áramok nem voltak jelen kontroll körülmények között, de a WIN55,212-2 hozzáadására $0,23 \pm 0,17$ /perces frekvenciával megjelentek. Ezek átlagos amplitúdója ($35,6 \pm 11,4$ pA), felszállószárának időtartama ($69,8 \pm 18,3$ ms), decay tau-ja (201 ± 39 ms; egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illesztve) tisztán elkülöníthetővé teszi őket a sEPSC-ktől (melyek amplitúdója $13,04 \pm 0,54$ pA; felszállószárának időtartama $5,35 \pm 0,72$ ms; decay tau $\tau_1 = 6,93 \pm 1,06$ ms; $\tau_2 = 15,5 \pm 3,19$ ms; két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illesztve; $p = 0,0001$ minden számadatra). Mindezek az adatok támogatják korábbi megfigyeléseinket (Kőszeghy és mtsai, 2015).

Kísérleteink további részében a posztszinaptikus áramokra gyakorolt kannabinoid hatásokat figyeltük meg. A tartópotenciált -60 mV-ra állítottuk be az áramok mérése közben. A mérés során mind sEPSC-ket, mind sIPSC-ket is láttunk. Az sEPSC-k átlagos frekvenciája kontroll körülmények között $0,18 \pm 0,04$ Hz volt, $13,04 \pm 0,54$ pA-es átlagos amplitúdóval. A frekvencia $0,25 \pm 0,06$ Hz-re, az amplitúdó pedig $12,22 \pm 0,47$ pA-re változott a WIN55,212-2 hozzáadására. Ezen változások egyike sem szignifikáns a kontroll körülmények között mért értékekhez képest az adatok nagy variabilitása miatt, viszont ha a kontroll értékekre normalizáltuk a CB1 receptor agonista mellett mért értékeket, akkor $59 \pm 23\%$ -os frekvencianövekedést és $5,6 \pm 2,1$ %-os amplitúdócsökkenést láttunk ($n = 17$; **13. ábra, N**). 17-ből 5 neuronról származó felvételen láttunk spontán IPSC-ket. Az IPSC-k csupán $0,05 \pm 0,02$ Hz-es frekvenciával jelentkeztek, és $10,5 \pm 1,67$ pA-es amplitúdóval. CB1 receptor agonista hozzáadásával ez a frekvencia tovább csökkent $0,02 \pm 0,01$ Hz-re (ez $37,6 \pm 8$ %-os csökkenés a kontrollhoz képest; $p < 0,001$), az átlagos amplitúdó pedig $8,1 \pm 0,15$ pA volt (ez 19 ± 7 %-os csökkenést jelent; $p = 0,07$; **13. ábra, N**).

A thapsigarginnal való előinkubáció befolyásolta a sEPSC-k frekvenciájának változását kannabinoid agonisták hatására. A sEPSC-k frekvenciájának növekedése helyett szignifikáns

csökkenést láttunk ($0,17 \pm 0,04$ Hz a WIN55,212-2 alkalmazása előtt, és $0,12 \pm 0,04$ Hz a CB1 receptor agonista alkalmazása mellett; $p = 0,045$; $62,6 \pm 9,7$ %-a a kontrollnak; **13. ábra, O**). A sEPSC-k amplitúdója nem mutatott szignifikáns változást a kontrollhoz képest ($15,22 \pm 0,86$ pA a kontroll és $15,05 \pm 1,13$ pA a WIN55,212-2 alkalmazása mellett; $99 \pm 0,04$ %-a a kontroll értékeknek; **13. ábra, O**). Egyes thapsigarginnal kezelt neuronokon sIPSC-k is mérhetőek voltak (8-ból 3 sejten). Ezek a neuronok hasonló frekvenciaváltozást mutattak, mint amelyet WIN55,212-2 alkalmazása mellett láttunk thapsigargin előinkubáció nélkül ($0,1 \pm 0,001$ Hz kontroll esetben és $0,038 \pm 0,002$ Hz a CB1 receptor agonista jelenlétében; $p = 0,013$; $38,2 \pm 1,8$ %-a a kontrollnak). A sIPSC-k amplitúdói, hasonlóan a thapsigarginos előinkubálás nélkül látottakhoz, nem változtak ($11 \pm 0,2$ pA kontroll esetben, $11 \pm 1,01$ pA WIN55,212-2 alkalmazásával; 100 ± 7 %-a a kontroll esetnek; **13. ábra, O**).

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a szinaptikus eseményeket érintő kannabinoid hatások egy CB1 receptoron keresztül létrejött direkt preszinaptikus gátló hatás és egy serkentő neurotranszmissziót fokozó indirekt asztrocita hatás keveréke.



13. ábra A PPN neuronjain lévő **CB1** receptorok összetett hatásai. **A-F**. A **CB1** receptor agonista WIN55,212-2 (1 μ mol/l) tónusos befelé és kifelé irányuló áramokat hoz létre a PPN neuronokon. **A**. Egy tónusos befelé irányuló áram kialakulásának reprezentatív felvétele. A szaggatott vonalak a kontroll körülmények között és a szerhatás alatt mért tartóáramot jelölik. **B**. A kontroll felvételek (fekete) és a WIN hozzáadásával mért tartóáram felvételeinek (kék) hisztogramjai. A WIN55,212-2-t egyidőben alkalmaztuk az **A**, **C** és **E** panelen látható felvétellel. **C,D**. Áram felvétel és hisztogram egy olyan neuronról melynek tartó áramán nem

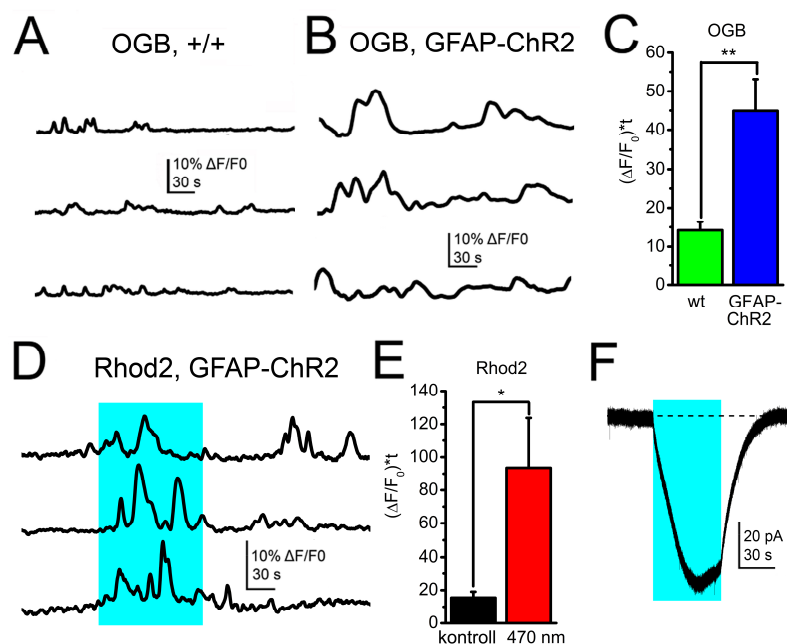
fejtett ki hatást a CB1 receptor agonista. **E,F.** Áram felvétel és hisztogram egy olyan neuronról melyen tónusos kifelé irányuló áramot hozott létre a WIN. A csillaggal jelölt szakaszon lassú befelé irányuló áramok (SIC) is láthatók a felvételen. **G,H.** Reprezentatív áram felvétel és hisztogram egy CB1 knockout egérből származó mintáról. **I.** A WIN által okozott esetenkénti változások (üres karikák) statisztikai összegzése, és az áram változásainak (oszlopok) abszolút értékeinek átlaga $\pm$ SEM a vad típusú mintákból (W, fekete), a tartó áram spontán fluktuációja (S, piros), a tartó áram változásai CB1 knockout egér mintáiból WIN jelenlétében (-/-, zöld). **J.** Az E panelen látható SIC (b) és egy EPSC-ről (a) készült felvétel felnagyítva. **K,L.** Áram felvétel és hisztogram egy thapsigarginnal előinkubált mintáról, melyen látható, hogy bár a spontán fluktuáció megnőtt de a WIN alkalmazása nem váltott ki tónusos áramokat. **M.** A WIN által okozott esetenkénti tartó áram változások statisztikai összegzése és átlag $\pm$ SEM értéke az áram változásoknak (oszlopok) thapsigarginnal előinkubált vad típusú egérből származó mintákból (W, fekete) és ugyanazon minták tartó áramának spontán fluktuációja (S, piros). **N.** A sEPSC-k és sIPSC-k változásainak statisztikai összegzése kontroll körülmények között (C, fekete), WIN jelenlétében (W, kék) és a kontrollra normalizált adatok (üres). Az EPSC-k frekvenciája kismértékben növekedett, míg az IPSC-k frekvenciája csökkent. **O.** Az sEPSC-k és sIPSC-k paramétereinek WIN hatására történő változásának statisztikai összegzése thapsigarginnal előinkubált mintákon. A sEPSC-k és a sIPSC-k frekvenciája csökkent.

6.2.2. Az asztrociták optogenetikai aktivációjának hatása a PPN neuronjain

Az asztrocita-függő hatásokat a direkt neuronális CB1 receptor stimulációtól való jobb elkülönítés érdekében optogenetikai eljárást alkalmaztunk, amellyel szelektíven tudtuk aktiválni a PPN asztrocitáit. Ezekhez a kísérletekhez homozigóta cre rekombinázt gliális fibrilláris savas fehérje ("glial fibrillary acidic protein", GFAP)-függő módon kifejező egereket kereszteztünk lox-channelrhodopsin-2 (ChR2) egértörzsszel. Az utóbbi törzs esetében a channelrhodopsin-2-t kódoló gén előtt két lox-P hasítási hellyel határolt stop kodon helyezkedett el. A két törzs keresztezésének eredményeként olyan egerek jöttek létre, melyek a ChR2 fényaktivált ioncsatornát GFAP-függő módon fejezték ki.

Kontroll kísérletként kétféle kalcium imaging kísérletsorozatot hajtottunk végre ahhoz, hogy kiderítsük, hogy az asztrocitákat tudjuk-e aktiválni fotostimulációval (470-480 nm-es

tartományban). Először is vad típusú és GFAP-ChR2 egerekből készítettünk szeletpreparátumokat, melyeket azután Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB) fluoreszcens kalciumfestékkel inkubáltunk. Azokról a sejtekről készítettünk felvételt, amelyek lassú kalcium hullámokkal rendelkeztek, ismerte azt a tényt, hogy az asztrocitáknak nincsenek gyors kalcium hullámai (Nimmerjahn és mtsai., 2004; Kőszeghy és mtsai., 2012; 2015). Azokat a sejteket szintén kizártuk az értékelésből, melyek nem rendelkeztek spontán kalcium hullámokkal. Mivel az OGB excitációs hullámhossza egyben a ChR2-t is nyitja, így a vad típusú és a GFAP-ChR2 mintákon mért kalcium hullámok területeinek összehasonlítása igazolta, hogy a kalcium imaginghez használt pulzáló fény a GFAP-ChR2 egér asztrocitáit stimulálta (10 ms-os megvilágítás 10 Hz-es frekvenciával), míg a vad típusú egér asztrocitáin nem hatott ($14,2 \pm 2,2$ %*s a vad típusban és $44,93 \pm 8,2$ %*s a GFAP-ChR2 egérben; $p = 0,0028$; $n = 17$ és 20 , 4 és 3 egérből; **12. ábra, B; 14. ábra, A-C**). Ahhoz, hogy különválasszuk az asztrociták stimulációjhoz és a kalcium imaginghez használt megvilágítást, a következő kísérletekben Rhod2 fluorofór kalcium indikátor festéket használtunk, melynek az excitációs hullámhossza távol esik a ChR2 excitációs hullámhosszától. Ezekben a kísérletekben, először felvettük a kalcium hullámokat kontroll körülmények között, majd utána az egész látóteret megvilágítottuk folyamatos 470 nm hullámhosszúságú kék fénnel 1 percen keresztül egy LED fényforrást használva (**14. ábra, D**). Ebben a kísérletben a kalcium események területe szignifikánsan megnőtt a megvilágítás ideje alatt ($15,5 \pm 3,6$ %*s előtte majd $93,5 \pm 30,3$ %*s a fotostimuláció ideje alatt; $p = 0,012$; $n = 16$, 3 egér mintájából; **14. ábra, E**). Annak bizonyítására, hogy keletkezett fotóáram az asztrocitában a ChR2 megnyitásának hatására, a lassú hullámú kalcium hullámokkal rendelkező sejteken patch clamp kísérletet végeztünk, és -80 mV-os tartófeszültségen mértük a kialakuló áramokat. A vártaknak megfelelően a megvilágítás hatására befelé irányuló áram keletkezett $65,7 \pm 2,6$ pA-es amplitúdóval, majd el is tűnt a megvilágítás végeztével ($n = 4$; **14. ábra, F**). A következő kísérlet során a neuronok asztrocita-stimulációra adott válaszát figyeltük meg. Teljes-sejtes patch clamp méréseket végeztünk a neuronokon, míg az azonos látómezőben lévő asztrocitákat epifluoreszcens megvilágítással aktiváltuk 40x-es objektíven át, 480 nm-es hullámhosszal 1 percen át.



14. ábra. Az *asztrociták optogenetikai módszerrel aktiválhatóak*. **A.** Spontán lassú kalcium hullám felvétel Oregon Green 488 BAPTA 1 (OGB) - vel egy vad típusú mintáról. **B.** Lassú kalciumhullámok GFAP-függő módon channelrhodopsin2-t kifejező (GFAP-ChR2) mintáról ugyanazt az indikátorfestéket használva. **C.** OGB használatával megfigyelt kalciumhullámok területeinek statisztikai összesítése (zöld oszlop: vad típusú mintákról, kék oszlop: GFAP-ChR2 mintákról származó adatok). **D.** Rhod-2 kalcium indikátor festékekkel feltöltött GFAP-ChR2 minták kalciumhullámjai, 1 percig tartó 470 nm-es hullámhosszú folyamatos fényvel való megvilágítás előtt, közben és után. **E.** Rhod-2 használatával megfigyelt kalciumhullámok területeinek statisztikai összesítése (fekete: kontroll GFAP-ChR2 minták megvilágítás előtti adatai, piros: 470 nm-es folyamatos megvilágítás alatt kapott adatok ugyanazon mintákról). **F.** -80 mV-os tartófeszültségen mért fotóáram, a D panelen középen látható kalciumhullámot adó sejtről.

Áram-clamp üzemmódban mérve 9-ből 8 esetben a neuronok depolarizálódtak, és következményesen megnövelték az akciós potenciál tüzelési frekvenciájukat (**12. ábra, C; 15. ábra, A**). A tüzelési frekvencia növekedése $1,42 \pm 0,54$ Hz volt, az átlagos depolarizáció pedig $5,07 \pm 1,4$ mV (**15. ábra, A-C**). Hiperpolarizációt egy esetben láttunk.

A feszültség-clamp üzemmódban végzett kísérletekben, 1 perces folyamatos megvilágítást használva tónusos áramok jöttek létre majdnem minden neuronban. Az esetek többségében ez a tónusos áram befelé irányuló volt ($n = 9$ esetnél a 12-ből), míg kifelé irányuló áramot csak egy esetben láttunk, valamint a maradék két esetben nem láttunk tónusos áramokat. A tónusos áramok abszolút változása $11,45 \pm 3,39$ pA volt (**15. ábra, D-F**).

Az asztrociták pulzáló fénnel (10 Hz frekvenciájú, 10 ms-os megvilágítások) való optogenetikai stimulációja hasonló változásokat okozott a neuronok tartó áramában, mégpedig 5 esetben befelé irányuló, 1 esetben kifelé irányuló áram jött létre, és a maradék két esetben nem hozott létre áramot. A tartó áram abszolút változása $7,86 \pm 2,36$ pA volt. Nem volt szignifikáns a változás a tartó áram változásában a pulzáló és a folytonos fotostimuláció között ($p = 0,19$; **15. ábra, E-F**).

Munkacsoportunk előzőleg kimutatta (Kőszeghy és mtsai., 2015), hogy a neuronok asztrociták által okozott tónusos árama a metabotróp glutamát receptorok (mGluR) aktivációjától függ. Hogy ezt a tényt megerősítsük, az asztrociták optogenetikai aktivációját megelőzően és az alatt a szeleteket a mérés során folyamatosan 100 $\mu\text{mol/l}$ CPCCOEt-el és 10 $\mu\text{mol/l}$ MPEP-el (I-es csoportú metabotróp glutamát receptor blokkolók; $n = 6$) vagy 10 $\mu\text{mol/l}$ LY341495-el (II-es csoportú metabotróp glutamát receptor blokkolók; $n = 7$) kezeltük. Az I-es csoportú mGluR blokkolászerei nem voltak hatással az optogenetikai asztrocita-aktivációval kiváltott tónusos áram abszolút amplitúdójára ($12,8 \pm 4,67$ pA; $p = 0,35$; **15. ábra, E-F**), bár kifelé irányuló áramot nem láttunk. A II-es csoportú mGluR-ok blokkolása csökkentette a befelé irányuló áramok nagyságát. A tartóáramban bekövetkezett változás mértéke $3,66 \pm 1,9$ pA volt, mely szignifikánsan különbözik a kontroll körülmények között látottaktól ($p = 0,04$).

Az asztrociták optogenetikai stimulációja a spontán szinaptikus eseményekre is hatott. A neuronokon mért sEPSC-k amplitúdója megnövekedett a folytonos megvilágítás hatására $14,6 \pm 1,2$ pA-ról $15,18 \pm 0,79$ pA-re (117 ± 10 %-a a kontrollnak; $p = 0,049$), és jelentősen megemelte a sEPSC-k frekvenciáját is $0,13 \pm 0,02$ Hz-ről $0,25 \pm 0,64$ Hz-re (320 ± 116 %-a a kontrollnak; $n = 8$). A pulzáló megvilágítás hasonlóan növelte a sEPSC-k frekvenciáját $0,13 \pm 0,02$ Hz-ről $0,27 \pm 0,07$ Hz-re (224 ± 28 %-a a kontrollnak). A CPCCOEt és az MPEP I-es típusú mGluR blokkolók jelenléte kevésbé gátolta meg a frekvencia változásokat ($0,18 \pm 0,02$ -ről $0,29 \pm 0,08$ Hz-re emelkedett a megvilágítás alatt, mely 189 ± 30 %-a a kontrollnak; $n = 6$). A II-es típusú mGluR blokkolószer LY341495 viszont majdnem teljesen kivédte az asztrocita aktivációval kiváltott sEPSC-k frekvenciaváltozását ($0,22 \pm 0,04$ -ről $0,26 \pm 0,04$ Hz-re növekedett; csupán 104 ± 6 %-a a kontrollnak; $n = 7$; **15. ábra, G**). A sIPSC-k kisebb frekvenciával jelentek meg a felvételeken és nem mutattak szignifikáns változást sem amplitúdójukban, sem frekvenciájukban a fotoaktiváció ideje alatt. Az amplitúdó $11,25 \pm 1,24$ pA-ról $13,5 \pm 3,1$ pA-re változott a

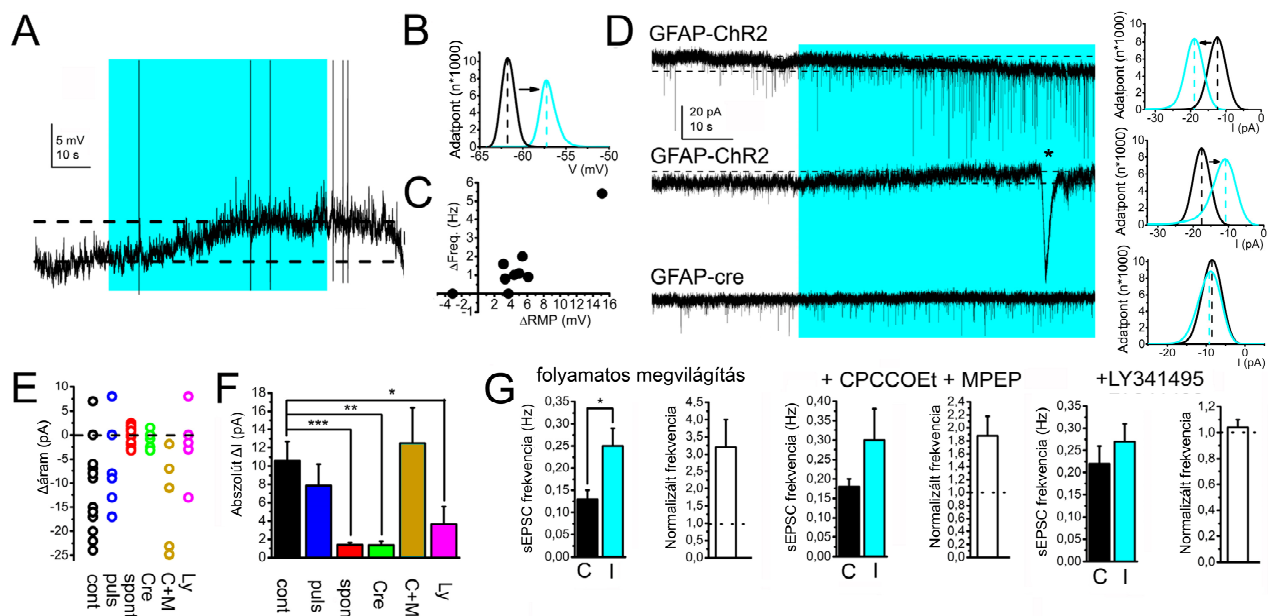
megvilágítás alatt, ami 118 ± 14 %-a a kontrollnak ($p = 0,16$), a frekvencia pedig $0,175 \pm 0,075$ Hz-ről $0,11 \pm 0,01$ Hz-re változott, ami 74 ± 26 %-a a kontrollnak ($p = 0,21$; $n = 3$).

Amikor az asztrocitákat aktiváltuk, a megvilágítás alatt 7 neuronból 4-nél lassú befelé irányuló áramot (SIC) figyeltünk meg (**15. ábra, D**; csillaggal jelölve a felvételen). Ezek nem jelentek meg kontroll körülmények között, viszont a megvilágítás alatt igen. Ezek frekvenciája $0,93 \pm 0,28$ /perc volt.

A kontroll kísérleteket GFAP-cre állatokon végeztük el ugyanolyan körülmények között, mint a GFAP-ChR2 állatok esetében, viszont a megvilágítás ezekre a mintákra nem gyakorolt hatást. A tartóáram abszolút változása $1,36 \pm 0,45$ pA volt, amely érték nem különbözik szignifikánsan a tartóáram spontán fluktuációjához képest, ami $1,41 \pm 0,25$ pA (**15. ábra, D-F**). Ehhez hasonlóan nem láttunk változást a posztzinaptikus áramok frekvenciájában illetve amplitúdójában és a lassú befelé irányuló áramok megjelenésében. A sEPSC-knek $0,53 \pm 0,12$ Hz volt a frekvenciája és $14,8 \pm 0,65$ pA volt az amplitúdója a megvilágítást megelőzően, $0,56 \pm 0,12$ Hz volt a frekvenciája illetve $14,6 \pm 0,87$ pA volt az amplitúdója a fénystimuláció alatt. 3 neuronon jelent meg sIPSC a GFAP-cre mintákban. Ezek frekvenciája $0,07 \pm 0,04$ Hz, az amplitúdójuk pedig $13,5 \pm 3,5$ pA volt. A megvilágítás alatt a frekvencia $0,04 \pm 0,002$ Hz-re változott, az amplitúdó pedig $14,56 \pm 1,8$ pA-re. A GFAP-cre mintákról nem sikerült lassú befelé irányuló áramot felvenni.

6.2.3. A CB1 receptor stimuláció által kiváltott direkt szinaptikus hatások

A következő kísérletsorozatban a preszinaptikusan elhelyezkedő CB1 receptor aktiváció hatását vizsgáltuk a serkentő posztzinaptikus áramokra (EPSC). Ehhez páros pulzust alkalmazó, 50 Hz-es frekvenciájú stimulációval ingereltük a magon belüli preszinaptikus rostokat. A kísérlet során a stimulációs elektródát körülbelül 50-100 μm -re helyeztük el a vizsgált neuron szómájától (**10. ábra, D**; **16. ábra, A, B**). Az első EPSC átlagos amplitúdója $46,28 \pm 1,54$ pA és a második és az első EPSC aránya ("paired pulse ratio"; PPR) kismértékű facilitációt mutatott ($1,17 \pm 0,04$).

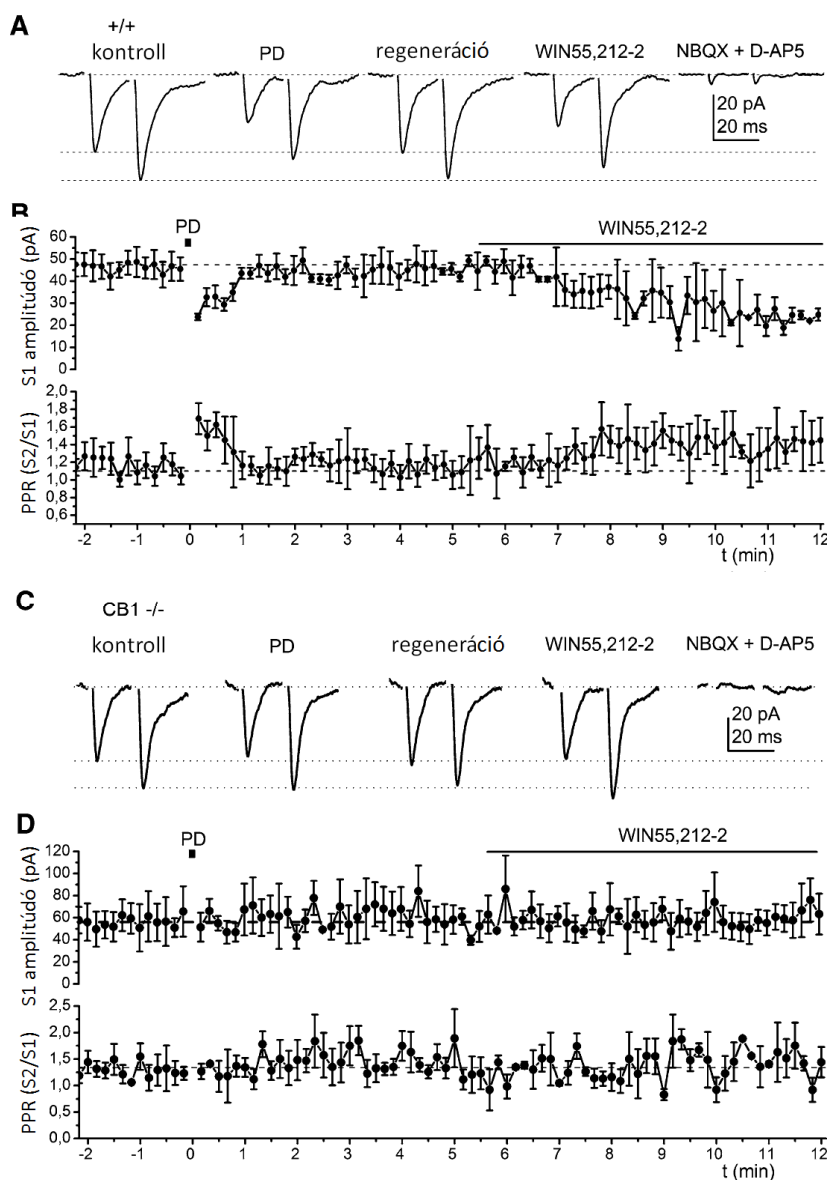


15. ábra. Az asztrociták optogenetikai aktivációja változásokat idéz elő a neuronok tartóáramában és a sEPSC-k frekvenciájában II-es csoportú mGluR függő módon. **A.** Reprezentatív áram clamp felvétel egy GFAP-ChR2 mintából származó neuronról. A kék négyzet jelöli a 480 nm-es fénnel való megvilágítás időtartamát, a szaggatott vonal a megvilágítást megelőzően és közben mért membránpotenciált jelölik. **B.** A G panelen látható áram clamp felvételtől készült histogram (a fekete a kontroll, a kék a fotostimulációval kapott adatokat jelzi). **C.** A nyugalmi membránpotenciál (ΔRMP) és a tüzelési frekvencia ($\Delta Freq$) változásai a fotostimuláció után. **D.** A GFAP-ChR2 mintákból és a GFAP-cre (ami nem fejez ki ChR2-t) mintákból származó neuronok tartó áramának változása. Befelé irányuló tónusos áramok, kifelé irányuló tónusos áramok és a SIC-ek (lassú befelé irányuló áramok, csillaggal jelölve) jelentek meg a fotostimuláció alatt. A panel jobb oldalán láthatók a reprezentatív áramfelvételekről készített histogramok (a fekete jelöli a kontrollt, a kék pedig a fotostimulációt). **E.** A GFAP-ChR2 mintákból származó neuronok tartó áramának egyedi változásai a fotostimuláció ideje alatt. (cont = folyamatos 1 perces tartó fotostimuláció, puls = pulzáló fotostimuláció, mely 10 ms-os időtartammal, 10 Hz-en történik, spont = spontán membránpotenciál változások; Cre = GFAP-cre minta, mint negatív kontroll, C + M = 100 $\mu\text{mol/l}$ CPCCOEt és 10 $\mu\text{mol/l}$ MPEP - mGluR I antagonisták, Ly = 10 $\mu\text{mol/l}$ LY341495 - mGluR II antagonista). **F.** A tartóáram-változások abszolút értékeinek statisztikai összehasonlítása különböző körülmények között (lásd a J panelt). **G.** A spontán EPSC-k frekvenciájának változása a fotostimuláció ideje alatt (a C

jelű fekete oszlopok a kontrollt, az I jelű kék oszlopok a 480 nm-es fénnel való megvilágítást jelölik, az üres oszlopok pedig az adatok normalizált értékei a kontrollhoz képest). A bal oldali oszlopok a blokkolók használata előtti adatokat jelölik, a középsők az mGluR I blokkolók, a CPCCOEt és az MPEP használatával kapott, míg a jobb oldali oszlopok az mGluR II blokkoló LY341495 használatával kapott adatokat.

A kontroll EPSC mérések követően a posztszinaptikus sejtet 0 mV-ra depolarizáltuk 10 másodpercre és az EPSC-ket folyamatosan detektáltuk, hogy kiderítsük, hogy létezik-e a PPN-ben az excitáció depolarizáció által kiváltott csökkentése ("depolarization-induced suppression of excitation"; DSE) (Ohno-Shosaku és mtsai., 2002). A depolarizációt követő 60 másodperces időszakban az első EPSC amplitúdója szignifikánsan csökkent $30,83 \pm 1,69$ pA-re ($p = 0,0001$), és a PPR is növekedett $1,49 \pm 0,08$ -ra ($p < 0,001$). 4 perc elteltével az első EPSC amplitúdó közelített az eredeti értékhez ($44,63 \pm 1,36$ pA), illetve a PPR értéke ($1,17 \pm 0,03$) is visszatért az eredetihez ($n = 11$). Ezután WIN55,212-2-t adtunk a rendszerhez 1 μ mol/l-es koncentrációban. Ez a CB1 receptor agonista hasonló változást okozott, mint előzőleg: az amplitúdó csökkenését ($31 \pm 1,56$ pA), illetve a PPR növekedését ($1,42 \pm 0,05$) váltotta ki ($n = 11$; $p < 0,001$ mindkét paraméterre; **16. ábra, A, B**). Egy másik CB1 receptor agonista, az ACEA 5 μ mol/l-es koncentrációban való alkalmazásával is hasonló változás jött létre, az amplitúdó csökkent $33,6 \pm 1,85$ pA-re, így a PPR $1,48 \pm 0,17$ lett ($n = 6$; $p = 0,002$ az amplitúdóra, és 0,03 a PPR-re).

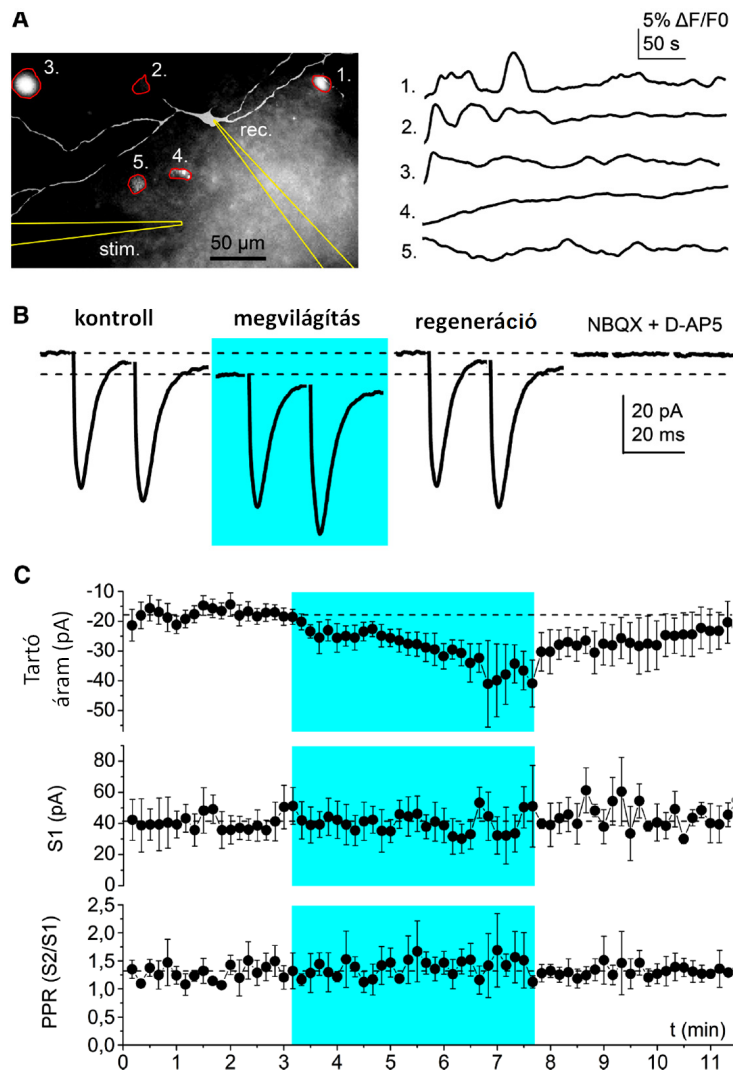
Ezek a kannabinoid hatások hiányoztak a CB1 knockout állatokban ($n = 6$). Kontroll körülmények között az első EPSC amplitúdója $56 \pm 1,17$ pA volt, $1,23 \pm 0,04$ PPR értékkel. A posztszinaptikus depolarizáció után az első EPSC amplitúdója $55,6 \pm 3,5$ pA-re változott, $1,4 \pm 0,12$ PPR értékkel. A WIN55,212-2 alkalmazásával az első amplitúdó $58,6 \pm 1,2$ pA, $1,29 \pm 0,05$ PPR értékkel. Ezek a változások nem mutatnak szignifikanciát (**16. ábra, C, D**).



16. ábra A posztszinaptikus depolarizáció és a CB1 receptor agonista WIN55,212-2 egyaránt képesek a kiváltott EPSC-k preszinaptikus gátlására CB1 receptor függő módon. A. Preszinaptikus rostok 50 Hz-es páros stimulálásával kapott reprezentatív EPSC áramfelvételek kontroll körülmények között, a neuron 10 s ideig történő 0 mV-ra való depolarizálásával (posztszinaptikus depolarizáció, PD), a posztszinaptikus depolarizáció utáni regenerálódás WIN55-212,2 és két ionotróp glutamátreceptor-blokkoló, az NBQX és a D-AP5 használata mellett. A tartóáramot nullához igazítottuk és minden áramfelvétel 10 egymás utáni felvétel átlagaként szerepel. A stimulációs artefaktumokat eltávolítottuk a

felvételek jobb láthatóságának érdekében. B. Az első EPSC (S1) amplitúdójának változásai és a PPR a posztzinaptikus depolarizáció és a WIN55,212-2 hatására. C., D. CB1 knockout mintáról származó felvétel, amelyet az A és B panelen látható elrendezésben mértünk.

Az amplitúdó csökkenése a PPR növekedésével preszinaptikus gátlás létezését sejteti (lásd pl. Zucker és Regehr, 2002). Ez a megfigyelés összhangban van a spontán EPSC-kről thapsigargin jelenlétében kapott, korábban részletezett adatainkkal (**13. ábra, O**), de ellentétben van a kontroll körülmények között spontán EPSC-ken végzett kísérleteinkből kapott adatainkkal, ahol azt láttuk, hogy ezen események frekvenciája megnövekedett (**13. ábra, N**). Ez az eredmény azt a lehetőséget vetette fel, miszerint az asztrociták aktivációja facilitálja a serkentő szinaptikus transzmissziót. Ezen lehetőséget körbejárva a következő kísérletsorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy létezik-e a PPN-ben egy asztrocita-függő indirekt preszinaptikus kannabinoid hatás. Ehhez GFAP-ChR2 egerekből preparáltunk agyszeletet használtunk, majd OGB-vel inkubáltuk. A neuronokról teljes-sejtes elrendezésben mértünk ($n = 7$), mindeközben a serkentő bemenetet 50 Hz-es frekvenciájú páros pulzussal stimuláltuk (**12. ábra, E; 17. ábra, A**). A kialakult EPSC-eket felvettük kontroll körülmények között, a pulzáló megvilágítás ideje alatt (eközben a környező asztrocitákon kialakult lassú kalcium hullámokról is készítettünk felvételt) és a fotostimuláció hatásának lecsengését követően (**17. ábra, B, C**). Némileg váratlanul, sem az első EPSC-ben, sem a PPR-ben nem tapasztaltunk változást. Az amplitúdó $37,3 \pm 9,4$ pA volt a megvilágítás előtt, közben pedig $36,4 \pm 9,8$ pA, míg a PPR $1,48 \pm 0,3$ a megvilágítás előtt, az asztrocita fotostimuláció közben pedig $1,59 \pm 0,33$ ($p = 0,47$ és $0,41$). Az egyetlen változás, amit megfigyeltünk az asztrociták fotostimulációjakor, hogy tónusos befelé irányuló áram jelent meg ($-11,14 \pm 4,8$ pA) 6 esetben, egy esetben pedig ezt nem láttuk (**17. ábra, C, D**). A kiváltott EPSC-k vizsgálata után, az IPSP-ken érvényesülő direkt és indirekt endokannabinoid hatásokra voltunk kíváncsiak. A 17 esetből, mikor a kiváltott posztzinaptikus potenciálokat vizsgáltuk, csupán egy esetben láttunk IPSP-t. Ahhoz, hogy a kísérletet hatékonyabbá tegyük, mIPSC vizsgáltunk, KCl-tartalmú belső oldat, tetrodotoxin (TTX), és ionotróp glutamát receptorok blokkolószerke (D-AP5 és NBQX) használatával (**18. ábra, A-F, M**). Ezekkel a kísérletekkel a sIPSC-kkel kapcsolatos eredményeket sikerült megerősíteni, miszerint a posztzinaptikus neuron 10 s-on keresztüli 0 mV-ra való depolarizálása és a WIN55,212-2 alkalmazása csökkentette a mIPSC-k frekvenciáját, míg az amplitúdóra nem volt hatással (**13. ábra, N, O**).



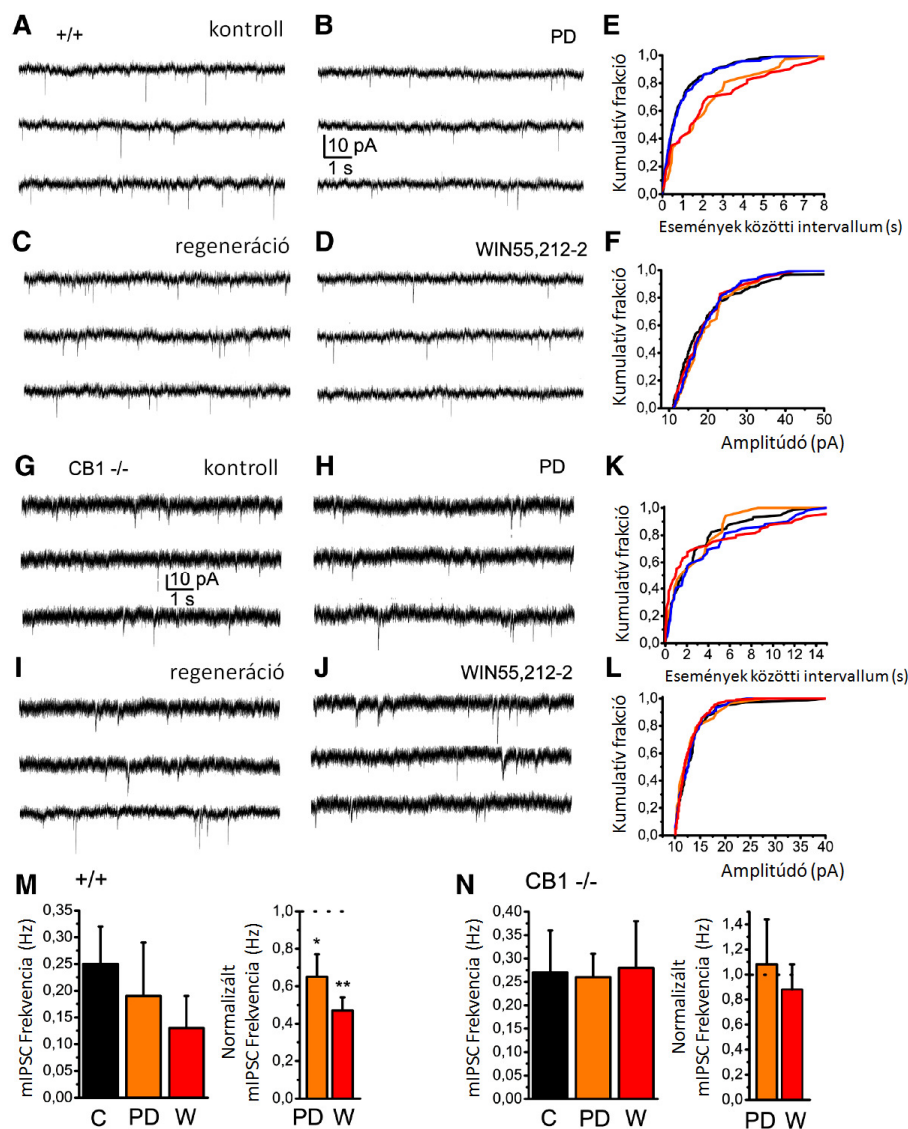
17. ábra Az asztrociták optogenetikai aktivációja nem hat a kiváltott EPSC-k amplitúdójára és PPR-jükre. **A.** Az általunk használt kísérleti elrendezés. A GFAP-ChR2 egerekből származó szeleteket Oregon Green BAPTA 1 AM fluoreszcens festékkel töltöttük meg (1-5. számozású világos foltok, piros vonallal kontúrozva), egy neuronon patch clamp kísérletet végeztünk (rec), a stimuláló elektródát (stim) pedig a szómától körülbelül 100 μm -re helyeztük el. **B.** Az A panelen látható számozott területekről származó kalcium hullámok fotostimuláció alatt. **C.** 50 Hz-es páros stimuláció által kiváltott EPSC felvételek kontroll körülmények között, a fotostimulációs megvilágítás alatt (kékkel jelölve), és a fotostimuláció hatásának elmúltával ionotróp glutamát receptor antagonisták, az NBQX és D-AP5 mellett

mért felvétel. A bemutatott áramgörbék 10 egymást követő felvétel átlagai, a tartóáram az eredeti értéken látható. D. A tartóáram, az első kiváltott EPSC amplitúdó és a PPR változása a fotostimuláció előtt, közben és után. Befelé irányuló áram alakult ki a megvilágítás alatt az EPSC paramétereinek változása nélkül. Az adatok az átlag $\pm$ SEM-ként szerepelnek.

A mIPSC-k frekvenciája $0,249 \pm 0,075$ Hz volt kontroll körülmények között, majd lecsökkent $0,188 \pm 0,089$ Hz-re (a kontroll $64,5 \pm 2,2$ %-a; $p = 0,02$) a posztiszinaptikus depolarizáció után és $0,128 \pm 0,059$ Hz-re (a kontroll $46,7 \pm 7,8$ %-a; $p = 0,004$) a CB1 receptor agonista hatására ($n = 7$). CB1 receptor knockout egereken ezek a hatások elmaradtak ($n = 5$). Kontroll körülmények között a mIPSC-k frekvenciája $0,27 \pm 0,09$ Hz volt, mely $0,26 \pm 0,06$ Hz (a kontroll 107 ± 36 %-a; $p = 0,43$) lett a posztiszinaptikus depolarizáció után és $0,27 \pm 0,15$ Hz (a kontroll 89 ± 20 %-a; $p = 0,49$) lett WIN55,212-2 hatására. A CB1 receptor agonista hatására és a posztiszinaptikus depolarizáció után a mIPSC-k amplitúdója nem változott szignifikánsan. Az amplitúdó $20,35 \pm 1,8$ pA volt kontroll körülmények között a vad típusú állatban, $18,3 \pm 2,9$ pA (91 ± 5 %; $p = 0,09$) volt a posztiszinaptikus depolarizáció után és $19,99 \pm 2,2$ pA volt (a kontroll $99,1 \pm 9,5$ %-a; $p = 0,13$) a WIN55,212-2 hatására (**18. ábra, F**). A CB1 receptor knockout egérben az amplitúdó sem változott ($21,5 \pm 1,8$ pA kontroll körülmények között, $17,9 \pm 0,3$ pA posztiszinaptikus depolarizáció után és $18,5 \pm 3$ pA WIN55,212-2 alkalmazására; $n = 5$; **18. ábra, L**).

6.2.4. A CB1 receptor preszinaptikus és asztrocitán való elhelyezkedése

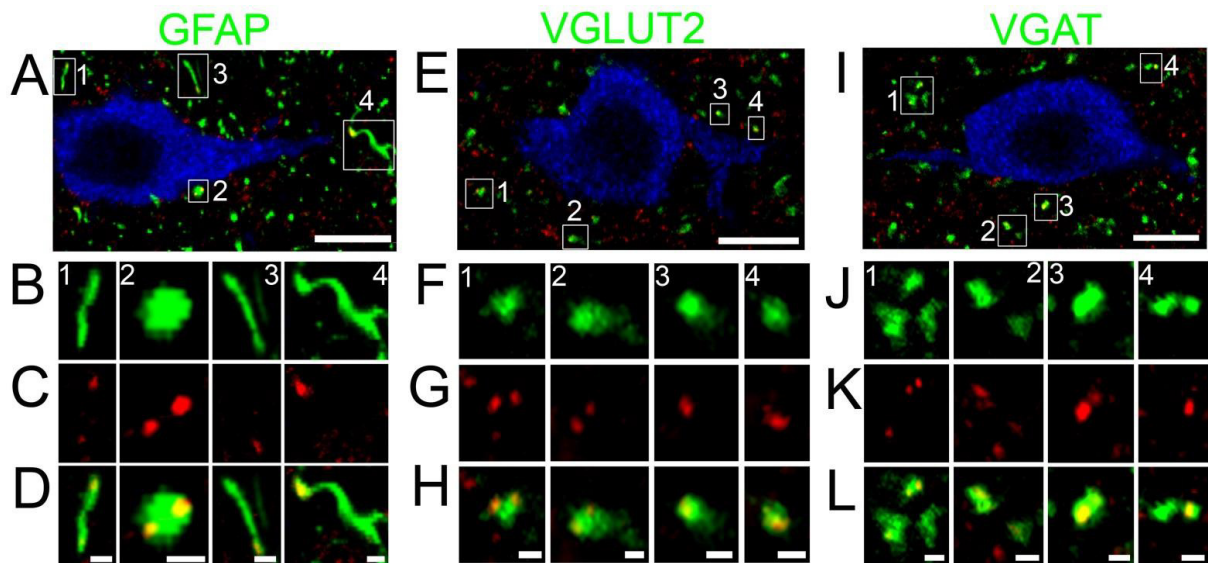
Az előbbi funkcionális kísérleteink szerint a CB1 receptoroknak van egy indirekt asztrocitán keresztüli és egy direkt preszinaptikus hatása is. Ahhoz, hogy ezeket az eredményeket megerősítsük, a CB1 receptor elhelyezkedését asztrocitán illetve preszinaptikusan; kollaborációs partnereink segítségével (Prof. Antal Miklós, Dr. Hegyi Zoltán), immunhisztokémia segítségével derítettük fel (**19. ábra**). A CB1 receptort és a kolin-acetiltranszferázt jelöltünk meg GFAP (asztrocita marker) és VGLUT2-vel (glutamaterg végződés), illetve VGAT-tal (GABAerg végződés) alkalmazott többszörös jelöléssel.



18. ábra A WIN55,212-2 alkalmazása és a posztzinaptikus depolarizáció csökkenti a miniatűr IPSC-k frekvenciáját. A-D. Áramfelvételek egy vad típusú egérből származó mintáról kontroll körülmények között (A), a neuron 10 másodpercig tartó 0 mV-ra való depolarizációjakor (B), a posztzinaptikus depolarizáció utáni regenerációról (C) és WIN55,212-2 jelenlétekor (D). E. A reprezentatív áramfelvételeken (A-D) mért események közti időintervallum kumulatív histogramja kontroll körülmények között (fekete), posztzinaptikus depolarizáció után (narancssárga), regeneráció után (kék) és WIN55,212-2 jelenlétében (piros). F. Az amplitúdók kumulatív histogramja, az E panelen részletezett szinkódot használva. G-J. CB1 knockout egérből származó mintákról származó reprezentatív

áramfelvételek. A kísérleti elrendezés megegyezik az A-D paneleken láthatóval. K-L. A G-J paneleken látható áramfelvételekről készült kumulatív hisztogramok az események közti időintervallumokról és az amplitúdókról. A színek a feljebb szereplő panelekével megegyeznek. M. A miniatűr IPSC-k frekvenciájában talált változások statisztikai összegzése kontroll körülmények között (C, fekete), posztzinaptikus depolarizáció (PD, narancssárga) és WIN55,212-2 jelenlétében (W, piros). A jobb oldalon lévő panel adatait a kontrollra normalizáltuk. N. A miniatűr EPSC-k frekvenciáinak statisztikai összegzése, mely CB1 knockout mintájából származik. Az elrendezés az M panelen szereplővel megegyezik.

A CB1 receptor immunpozitivitás mutatott kolokalizációt a GFAP-vel, VGLUT2-vel és VGAT-tal, de alig láttunk kolokalizációt a ChAT-tal. Összességében a 624 CB1 receptor pozitív pont $21,28 \pm 1,91$ %-a kolokalizált a GFAP-jelöléssel, míg 684 CB1 receptor pozitív pont $33,18 \pm 1,88$ %-a kolokalizált a VGLUT2 jelöléssel. A CB1 receptor pozitív foltok $13,49 \pm 0,82$ %-a a kolokalizált a VGAT-pozitív pontokkal (n = 614).



19. ábra A CB1 receptor immunopozitivitás kolokalizációt mutat a GFAP, VGLUT2 és VGAT-immunjelölésekkel. **A-D.** A GFAP és a CB1 receptor immunjelölésének kolokalizációja. **A.** A GFAP (zöld), a CB1 receptor (piros) és a ChAT (kék) immunjelölés átnézeti képe. A számozott területek a B-D paneleken szereplő négyzetekben láthatók kinagyítva. A kalibrációs egyenes 10 μm . **B.** Az A panel GFAP-pozitív területei. **C.** CB1 receptor immunopozitivitást mutató területek. **D.** Átnézeti képek. A kalibrációs egyenes a kinagyított területeken 1 μm . **E-H.** A VGLUT2 (zöld) és CB1 receptor (piros) immunopozitivitásának kolokalizációja a ChAT (kék) immunjelöléssel. **E.** VGLUT2 (zöld), CB1 receptor (piros) és a ChAT (kék) immunopozitivitása. A számozott területek az F-G paneleken szereplő négyzetekben láthatók kinagyítva. A kalibrációs egyenes itt is 10 μm . **F.** Az E panelen szereplő számozott területek VGLUT2 immunopozitivitása. **G.** Ugyanazon területek CB1 receptor immunopozitivitása. **H.** Az F és G panelek átnézeti képe. Ezeken a nagyított paneleken a kalibrációs egyenes 1 μm . **I-L.** A VGAT (zöld), a CB1 receptor (piros) és a ChAT (kék) immunopozitivitású területek kolokalizációja. **I.** A VGAT (zöld), a CB1 receptor (piros) és a ChAT (kék) immunopozitivitás. A számozott területek a J-L paneleken láthatók kinagyítva. A kalibrációs egyenes 10 μm . **J.** Az I panelen látható számozott területek VGAT immunopozitivitása. **K.** Ugyanezen területek CB1 receptor immunopozitivitása. **L.** A J és K panelek átnézeti képe. A kalibrációs egyenes 1 μm .

7. Megbeszélés

A PPN-en, mint az alvás-ébrenlétet szabályozó agytörzsi magvak egyikén, jelentős neuromodulációs szabályozó mechanizmusok érvényesülnek. Ezek a mechanizmusok tudottan vagy valószínűsíthetően hozzájárulnak a homeosztatis alvásszabályozáshoz. A fenti eredményeink alapján valószínűnek látszik, hogy a neuromodulációs mechanizmusok hatásainak csak egy része érvényesül közvetlenül a neuronokon, más részük asztrocita-aktiváción keresztül fejt ki hatását.

7.1. A neuromodulációs hatások egyik neuronális extraszinaptikus komponense

Munkám első felében a neuronokon közvetlenül érvényesülő neuromodulációs mechanizmusok egyik célpontjával, az úgynevezett M-árammal foglalkoztam. A PPN kolinerg sejtjein kimutattuk az M-áram jelenlétét, mely sejttypusfüggő tulajdonság ebben a magban, mivel a vizsgált GABAerg sejtekről hiányzott ez a káliumáram. Azt láttuk, hogy a kolinerg sejteken lévő M-áramnak szerepe volt a kolinerg és GABAerg sejtek közötti funkcionális különbségek kialakításában (mint a tüzelési frekvencia, a tüzelési frekvencia adaptáció, illetve a közepes és késői utóhiperpolarizáció). Mindezek mellett a kolinerg neuronok spontán magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációját is befolyásolta az M-áram megléte. Az áram gátlása az oszcillációk amplitúdóját csökkenti, illetve a 20 Hz-es frekvenciájú oszcillációkat teljesen megszünteti.

7.1.1. Az M-áram mint a PPN neuronok egy funkcionális markere

A PPN a retikuláris aktivációs rendszer kolinerg ágaként ismert, de a PPN-t GABAerg és glutamaterg neuronok is alkotják (Garcia-Rill, 1991; Reese et al., 1995; Maloney et al., 1999; Jenkinson et al., 2009; Garcia-Rill et al., 2011). A PPN neuronjai többféle szempontból is heterogenitást mutatnak, így csoportosíthatók morfológiai, neurokémiai tulajdonságaik szerint, a sejtekre jellemző elektrofiziológiai tulajdonságok illetve a globális agyi állapotokban betöltött szerepük alapján (Kang and Kitai, 1990; Garcia-Rill, 1991; Leonard és Llinás, 1994; Datta és

Siwek, 2002; Steriade és McCarley, 2005; Mena-Segovia és mtsai., 2008, 2009; Ros és mtsai., 2010; Garcia-Rill és mtsai., 2011, 2014; Martinez-Gonzalez és mtsai., 2011).

Jelen munkával hozzájárultunk a kolinerg és GABAerg/nem-kolinerg neuronok elkülönítését segítő funkcionális markerek megismeréséhez. Kimutattuk, hogy a kolinerg sejtek az M-áram jelenléte vagy hiánya alapján nagy valószínűséggel azonosíthatók, mivel a kolinerg sejtek 91%-án sikerült kimutatni az M-áramot. A GAD65 pozitív GABAerg neuronokon egyáltalán nem láttunk M-áramot. A magas küszöbű oszcillációkat tekintve a $0,3 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ power-rel rendelkező oszcillációkról kísérleteink azt mutatták, hogy ez a tulajdonság szintén a kolinerg neuronok egyik funkcionális markerének tekinthető, mivel a kolinerg neuronok 82%-ában sikerült kimutatnunk, míg ilyen amplitúdójú oszcillációkat nem láttunk GABAerg sejteken.

Glutamaterg PPN neuronokat nem vizsgáltuk, mivel a vizsgálat időpontjában nem rendelkezünk olyan állatmodellel, amely, hasonlóan a GAD65- és ChAT-tdTomato törzsekhez, azonnal felismerhetővé tette volna a glutamaterg sejteket a mérés során. Korábbi kísérleteinkben a kolinerg sejteket *post hoc* kolin-acetiltranszferáz immunhisztokémiával azonosítottuk, és azok a sejtek, melyek nem mutattak ChAT-pozitivitást, nem rendelkeztek sem M-árammal, sem magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkkal. Ennek alapján valószínűsítettük, hogy a glutamaterg neuronok sem rendelkeznek M-árammal és magas küszöbű oszcillációkkal. Továbbá, egy jelenleg folyamatban levő munkában megtörtént a glutamaterg neuronok elektrofiziológiai karakterizálása, amely eddig megerősíteni látszik az M-áram kolinerg neuronokra való specificitását.

7.1.2. Az M-áram hatása a PPN kolinerg neuronok tüzelési mintázatára

Az M-áramot az agy számos területén kimutatták, az agytörzsben is megtalálható (Kharkovets és mtsai, 2000; Koyama és Appel, 2006; Hansen és mtsai, 2008; Navarro-López és mtsai, 2009). Az M-áram nagyobb amplitúdóval rendelkezik az agykéreg és a hippocampus sejtjeiben, mely így eléri a 100-200 pA-t is (Shah és mtsai, 2002; Nigro és mtsai, 2014), míg a PPN 54 pA-es amplitúdójú M-áramához hasonló amplitúdójú M-áramot mértek a ventrális tegmentális area (VTA) dopaminerg sejtjein (az áram amplitúdója 65 pA volt a VTA sejtjein; Koyama és Appel, 2006).

Kísérleteink során azt láttuk, hogy ugyanakkora amplitúdójú áraminjekció hatására különböző frekvenciával tüzeltek a GABAerg és a kolinerg neuronok. A kétféle sejttypusnak statisztikailag különböző az első két akciós potenciál közti időintervalluma, a tüzelési frekvencia adaptációja és az utóhiperpolarizáció közepes és késői szakaszának amplitúdója. Mivel az M-áram tudottan hozzájárul ezen paraméterek meghatározásához, a szelektív blokkolószerének, az XE991-nek segítségével alátámasztottuk, hogy az M-áram jelentősen hozzájárul a vizsgált sejttypusok közötti különbségekhez. A mérésekből kiderült, hogy az M-áram valóban szerepet kap a tüzelési frekvencia csökkenésében és adaptációjában, valamint a közepes utóhiperpolarizáció amplitúdójának kialakításában. A GABAerg sejtek adatait és a kolinerg sejtekről XE991 mellett mért adatokat összehasonlítva azt kaptuk, hogy az adaptációs indexben, az alacsony frekvencián történő tüzelésben nem látható szignifikáns különbség, viszont a magasabb depolarizáló feszültséglépcsők hatására létrejövő tüzelési frekvenciában és az utóhiperpolarizáció amplitúdójában szignifikáns különbséget találtunk. Ez az eredmény azt jelzi, hogy az M-áramnak a PPN kolinerg neuronjain a tüzelési frekvencia adaptációban fontos szerepe van, viszont a tüzelési frekvencia és az utóhiperpolarizáció alakulásának tekintetében csak részben járul hozzá ezek megváltozásához az M-áram megléte vagy hiánya. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy más áramok (kalciumáramok, A-áram) is befolyással vannak a PPN sejttypusai között megfigyelt elektrofiziológiai különbségek létrejöttére (Kang és Kitai, 1990; Leonard és Llinás, 1994).

Más irodalmi források is azt közlik, hogy az M-áram más agyi struktúrákban is szerepet játszik az adaptációs index, az első két akciós potenciál közti időintervalluma, a tüzelési frekvencia és az utóhiperpolarizáció alakulásában (Koyama és Appel, 2006; Tzingounis és Nicoll, 2008; Navarro-López és mtsai, 2009; Mateos-Aparicio és mtsai, 2014; Nigro és mtsai, 2014).

7.1.3. Az M-áram hatása a PPN kolinerg neuronok tüzelési mintázatára

A hippocampus neuronjainak M-árama azok rezonancia aktivitásához is hozzájárul. A sinusfüggvény alakú, emelkedő frekvenciájú áraminjekció hatására létrejövő

feszültségrezonancia amplitúdójának maximuma a theta frekvenciatartományban volt. Bizonyították, hogy ezek kialakulása függ az M-áram meglététől (Hu és mtsai, 2012).

A PPN sejtjein fiziológiásan jelenlévő oszcillációs aktivitás mérhető. Egyes szerzők szerint ez az aktivitás béta-gamma tartományú frekvencián történik (Kezunovic és mtsai, 2011; Urbano és mtsai, 2012), míg *in vivo* humán adatok az alfa-béta frekvenciatartományt támasztották alá (ld. Li és Zhang, 2015). A jelenségért kálium, P/Q és N típusú kalcium csatornák a felelősek (Kezunovic és mtsai, 2011; Urbano és mtsai, 2012). Az oszcillációk fontos szerepet játszanak a kolinerg neuromodulációban, mint annak egyik célpontja (Kezunovic és mtsai, 2011; 2013). Az oszcillációk jelenlétét sikerült nekünk is bizonyítani, a PPN kolinerg neuronjain kimutatható volt a TTX-rezisztens, magas küszöbű oszcillációs aktivitás. A GABAerg sejteken csak egészen kis amplitúdóval jelentek meg az oszcillációk vagy nem voltak kimutathatók. Az ezzel kapcsolatos kísérleti eredményeink csak részben hasonlítanak Kezunovic és mtsai (2011, 2013) által végzett kísérletek eredményeihez. Ehhez hozzájárulhat, hogy különböző kísérleti elrendezést használtak, melyben a modell állat patkány volt és a méréseket 37 °C-on végezték, míg mi egéren és szobahőmérsékleten.

Kísérleteinkkel bemutattuk, hogy a magas küszöbű oszcillációk a kolinerg neuronokra jellemző sajátosság, melyre nagy befolyással van az M-áram jelenléte. Az XE991-et, az M-áram blokkolószerét használva a kolinerg sejtek oszcillációs aktivitását szignifikánsan csökkentette. A csökkent amplitúdójú oszcillációk még mindig nagyobbak voltak a GABAerg sejteken mért oszcillációk amplitúdójánál. Érdekes tény az, hogy a legmagasabb amplitúdójú oszcillációk 20 Hz-es frekvenciájúak voltak kontroll esetben, és az M-áram blokkolásának következményeként ezek az oszcillációk teljesen eltűntek.

Az XE991 egy egyszerű, egy komponensű gátlást okozott az oszcillációs aktivitásra nézve. A karbakol hatása ettől különbözik: a kezdeti gátlást regeneráció és az oszcillációs frekvencia emelkedése jellemezte hosszan tartó karbakol alkalmazás alatt (Kezunovic és mtsai, 2013).

Az eredményeink és a karbakol irodalomból ismert, oszcillációt gátló hatása megerősíti azt a megfigyelést, miszerint a muszkarinos neuromodulációnak több célpontja van, az M-áram csupán egy elemet alkot ezek közül (Picciotto és mtsai, 2012). A karbakol alkalmazása az M2

receptoron keresztül blokkolja az oszcillációt, és ebben a jelenségben az M1 receptor nem játszik szerepet (Kezunovic és mtsai, 2013). Emiatt valószínű, hogy az általunk megfigyelt jelenségekben csupán kis szerepe van az M1 receptor aktiváció által kiváltott M-áram gátlásnak. Úgy tűnik, hogy a megfigyelt M-áram függő oszcilláció szabályozási mechanizmusban más, G_q fehérjéhez kötött receptorok is részt vehetnek. Ilyenek lehetnek az M3, mGluR1, vagy mGluR5, α_1 adrenerg vagy H1 hisztamin receptor. Ezek jelenléte ismert a PPN sejtjeiben immunhisztokémiával, mRNS szintjén vagy funkcionális mérésekkel (Khateb és mtsai, 1990; Vilaró és mtsai, 1994; Zaika és mtsai, 2006; Kőszeghy és mtsai, 2015). Az M-áramot rajtuk kívül még az angiotenzin II, szerotonin és egyéb peptid receptorok is képesek az M-áram gátlására (Brown és Passmore, 2009; Oldfield és mtsai, 2009; Filippov és Brown, 2013). Az irodalom szerint az intracelluláris kalcium szint emelkedése is gátló hatással van az M-áramra, így minden olyan hatás, ami az intracelluláris kalcium szintjére bármiféle hatással van, az az M-áramra is hatást gyakorol (Marrion, 1997; Hernandez és mtsai, 2008; Brown és Passmore, 2009). Az M-áram érzékeny az intracelluláris kalciumszint változására, egy kis változás is képes jelentősen szabályozni az M-csatorna vezetőképességét. Egyéb szignalizációs útvonalak is befolyásolhatják az M-áramot. Kimutatták, hogy a cAMP intracelluláris szintjének emelkedése az M-áramot serkenti, illetve a PKA aktiváció is serkentő hatással van rá (Selyanko és Brown, 1996; Gamper és Shapiro, 2003; Chambard és Ashmore, 2005; Linley és mtsai, 2012).

Az M-áramot számos G protein kapcsolt receptor aktivációja képes szabályozni különböző jelátviteli útvonalakon keresztül, így az M-áram számos neuromodulációs hatáshoz hozzájárulhat. A PPN-en számos neuromodulációs hatás átfedéseket mutat egymással. Az orexin és a ghrelin (Kim és mtsai, 2009a) vagy az endokannabinoid és kolinerg hatások ugyanazon neuronpopuláción fejtenek ki depolarizációt (Kovács és mtsai, 2015). Az M-áramra gyakorolt hasonló szabályozási folyamatoknak szerepe lehet abban, hogy a PPN-en a neuromodulációs hatások átfedést mutatnak.

7.1.4. Funkcionális jelentőség

Amellett, hogy a PPN kolinerg rostokat küld számos terület felé, ő maga is kap kolinerg beidegzést az ellenoldali PPN-ből, illetve a nucleus laterodorsalis tegmentalis kolinerg sejtjeitől (Semba és Fibiger, 1992). Ez a kolinerg hatás nagymértékben képes szabályozni a magot, és így ezzel együtt annak célpontjaira is hatással van. Kimutattuk az M-áram jelenlétét a kolinerg sejteken és ennek hozzájárulását a kolinerg és GABAerg sejtek közötti különbségek létrejöttében. A kolinerg és nem-kolinerg sejtek közötti különbségek lehetséges jelentősége *in vivo* abban rejlik, hogy különböző agyi állapotokban játszanak szerepet ezek a sejtek. A PPN kolinerg sejtjei a lassú hullámú alvás "up state" fázisában tüzelnek illetve az agykérgi gamma oszcillációkkal növelik aktivitásukat. A nem-kolinerg sejtek három altípust alkotnak, így megkülönböztetünk csendes neuronokat, melyek a kérgi aktivitással párhuzamosan növelik a tüzelési aktivitásukat; tónusos neuronokat, melyeknek aktivitása nem mutat korrelációt a kérgi aktivitással; és a szabálytalanul tüzelő neuronok melyek a kérgi deszinkronizációval együtt képesek növelni vagy csökkenteni a tüzelési frekvenciájukat (Mena-Segovia és mtsai, 2008; Ros és mtsai, 2010). A frekvencia adaptáció, a tüzelési frekvencia és oszcillációs aktivitás kolinerg neuronokban kolinerg hatásra történő megváltozása és GABAerg sejtek esetében megmaradó változatlansága feltehetően hozzájárul az agykéreg deszinkronizációjához és a REM alvásra jellemző EEG válaszok megjelenéséhez (Kinney és mtsai, 1998), továbbá a karbakol injekció hatására létrejövő kérgi gamma oszcillációk amplitúdójának emelkedéséhez, és az alvási orsók amplitúdójának csökkenéséhez (Valencia és mtsai, 2013).

Mindent egybevetve az M-áram a PPN kolinerg sejtjeinek sajátos jellemzőjének tűnik, mely nem mutatható ki a GABAerg sejteken. Az M-áram blokkolásával a membrán potenciál oszcillációk csökkentek, mely így egy a PPN kolinerg neuronjain érvényesülő neuromodulációs hatások egy potenciális mechanizmusa; aminek jelentős hatása lehet az alvás és az ébrenlét szabályozásában.

7.2. A neuromodulációs hatások preszinaptikus és asztrocita-függő komponensei

A neuromodulációs hatások -legalábbis részben- eredményeink alapján asztrociták közvetítésével is létrejöhetnek. Munkám második felében a PPN neuronokon érvényesülő

endokannabinoid hatások neuronális preszinaptikus és asztrocita-függő extraszinaptikus komponenseit választottuk ketté.

A kannabinoid jelátvitel részben direkt preszinaptikus részben indirekt, asztrocitán keresztüli hatásokat közvetít a PPN neuronjain. Az asztrociták specifikus optogenetikai aktivációjával laboratóriumunk korábbi eredményeit sikerült igazolni: az asztrocita aktiváció mGluR függő, tónusos neuronális depolarizációt és hiperpolarizációt okoz. A neuronok ingerlékenységében történt tónusos változások mellett a CB1 receptor aktivációnak enyhe serkentő hatása van a serkentő neurotranszmisszióra, gátló hatása van a gátló neurotranszmisszióra. Ez utóbbi valószínűleg a preszinaptikusan elhelyezkedő CB1 receptorok aktivációja miatt történik, míg a serkentő neurotranszmisszióra történő hatásban két tényező szerepel: a serkentő axonvégződéseken elhelyezkedő CB1 receptorokon történő preszinaptikus gátlás, és a neuronok aktivitásának növekedése az asztrociták glutamát felszabadításának serkentése.

7.2.1. Asztrociták aktivációja által kiváltott neuronális tónusos áramok

Az asztrociták aktivációjának eredményeképpen tónusos neuronális befelé irányuló és kifelé irányuló áramokat figyeltünk meg. A munkacsoportunk korábbi eredményei szerint (Kőszeghy és mtsai, 2015), a CB1 receptoron keresztüli asztrocita aktiváció által kiváltott depolarizáció a II-es csoportú mGluR receptorok blokkolásával gátolható, míg a hiperpolarizációt az I-es csoportú mGluR receptorok blokkolásával lehet gátolni. Az asztrociták vezikuláris exocitózissal, különböző csatornák és transzporterek segítségével szabadítják fel a glutamátot, és képesek szabályozni az extraszinaptikus glutamát szintjét (Parpura és mtsai, 1994; Szatkowski és mtsai, 1990; Warr és mtsai, 1999; Cotrina és mtsai, 1998; Ye és mtsai, 2003; Duan és mtsai, 2003; Rosenberg és mtsai, 1994; Pasantés Morales és Schousboe, 1988). Az asztrociták által felszabadított glutamát a környező neuronokon, azok különböző mGluR, AMPA vagy NMDA receptorain képes hatni. Az irodalomban leírták, hogy az extraszinaptikusan található mGluR-k képesek a neuronok membránpotenciálját és tónusos áramaik megváltozását előidézni. Az I-es csoportú mGluR receptorok aktivációjának a neuronális depolarizációban van szerepe, mely az L típusú kalciumáram vagy nem-szelektív kationcsatornák konduktanciájának növekedése miatt

jön létre (Libri és mtsai, 1997; Partridge és mtsai, 2014; Kato és mtsai, 2012; Smith és mtsai, 2009). A II-es csoportú mGluR stimuláció viszont gátolja az L-típusú kalciumáramot vagy a káliumáramot aktiválja (Chavis és mtsai, 1994, 1995; Irie és mtsai, 2006; Hermes és Renaud, 2011). A mi megfigyeléseinkkel összhangban, az I-es és II-es csoportú mGluR aktiváció fentiekkel ellentétes hatását is kimutatták; mégpedig azt, hogy az I-es csoportú mGluR stimulációja kálium áram aktivációt okoz (Jian és mtsai, 2010; Rainnie és mtsai, 1994; Kohlmeier és mtsai, 2013), és hogy a II-es csoportú mGluR aktiváció gátolja a kálium konduktanciát és a kevert kation konduktanciát fokozza (Ster és mtsai, 2011). Ezen túl a tónusos áramokat más neuronális célpontok aktivációja és más gliotranszmitterek felszabadulása is létrehozhatja.

Munkacsoportunk korábbi eredményeit sikerült megerősíteni a tónusos depolarizációval és hiperpolarizációval kapcsolatban, mégpedig azzal, hogy kimutattunk kannabinoid hatásokat a tónusos befelé irányuló és kifelé irányuló áramokra.

7.2.2. Az asztrociták optogenetikai aktivációja

Az asztrociták optogenetikai aktivációjával kapcsolatos kísérletek alátámasztották azt az elméletünket, miszerint a PPN neuronok ingerlékenységének tónusos változásai asztrocita eredetű folyamat következményei. Ezek az optogenetikai eredmények összhangban vannak a munkacsoportunk által a PPN neuronjain megfigyelt régebbi eredményekkel (Kőszeghy és mtsai, 2015) és ezen munka eredményeivel a CB1 receptor agonisták hatásával kapcsolatosan. Az optogenetikai aktiváció által kiváltott hatások és az endokannabinoid hatások hasonlóságot mutatnak, így ez a jelenség azt az elméletet erősíti meg, miszerint az endokannabinoid hatásoknak a PPN-ben van egy indirekt, asztrocita-függő összetevője is. A depolarizációt és neuronális tónusos befelé irányuló áramot kiváltja mind a CB1 receptor agonisták alkalmazása, mind az asztrociták optogenetikai aktivációja, ezek hasonló jelentőségűek, és a hatás kivédhető a II-es csoportú mGluR receptorok blokkolásával.

Az asztrociták optogenetikai aktivációjának neuronális hatása és az asztrocita-függő endokannabinoid hatások mutattak különbözőséget is: az optogenetikai módszerekkel kisebb gyakorisággal tudunk kiváltani tónusos kifelé irányuló áramot. Ez a jelenség felveti a lehetőségét annak, hogy a tónusos kifelé irányuló áram létrejötte egy olyan összetett jelenség melyben neuronális jelenségek, hálózati kapcsolatok is szerepet játszanak. Továbbá, az optogenetikai asztrocita-aktiváció módjai feltehetően nem-fiziológiás asztrocita-aktivációhoz vezetnek és a gliotranszmitter-felszabadulás eltérhet a fiziológiástól.

7.2.3. A szinaptikus áramokra gyakorolt endokannabinoid és asztrocita-függő szabályozó hatások

Azon túl, hogy előzetes adatainkat alátámasztottuk az asztrocita-függő tónusos aktivációval és gátlással kapcsolatban a PPN neuronokon; megmutattuk, hogy a szinaptikus neurotranszmissziót is direkt és indirekt endokannabinoid hatások modulálják a PPN-ben.

Kimutattuk, hogy a PPN-ben is előfordul preszinaptikus és asztrocita- CB1 receptor. Jól ismert, hogy a CB1 receptorok preszinaptikusan helyezkednek el, mind serkentő, mind gátló szinapszisokban (Katona és mtsai, 1999; 2006; Kreitzer és Regehr, 2001; Katona és Freund, 2012). Egyre több a bizonyíték arra is, hogy a CB1 receptor preszinaptikus elhelyezkedése mellett az asztrocitákon szintén megtalálható a receptor a különböző agyterületeken, mint például a nucleus accumbens, gyrus cinguli, fasciculus medialis telencephali, amygdala, gerincvelő, hippocampus (Rodriguez és mtsai, 2001; Moldrich és Wenger, 2000; Salio és mtsai, 2002; Navarrete és Araque, 2008; Hegyi és mtsai, 2009).

A gátló (Llano és mtsai, 1991; Katona és mtsai, 1999) és a serkentő (Ohno-Shosaku és mtsai, 2002) neurotranszmisszió CB1 receptor által történő preszinaptikus gátlását először a kisagyban és a hippocampusban írták le, majd később egyéb struktúrákban, mint az agykéreg (Trettel és Levine, 2003) és substantia nigra (Yanovsky és mtsai, 2003). Jelen munkában elsőként mutattuk be, hogy a PPN-ben létezik a DSE és a DSI jelensége. A CB1 receptor agonistái minden esetben csökkentették a sIPSC-k és mIPSC-k frekvenciáját, de nem változtatták meg a amplitúdójukat. Ezzel szemben, a sEPSC-k frekvenciáját nem csökkentették a kannabinoidok; a sEPSC-k frekvenciája növekedett a CB1 receptor agonista WIN55,212-2 alkalmazására. A nucleus laterodorsalis tegmentalisban hasonló jelenséget figyeltek meg a spontán és a miniatűr IPSC-k

esetében, amelyek frekvenciája csökkent, viszont az amplitúdójuk nem változott. Az EPSC-k frekvenciája viszont csak az esetek kis részében változott (Soni és mtsai, 2014; Soni és Kohlmeier, 2015).

A preszinaptikus rostok stimulációja által kiváltott EPSC-k esetén, mind a posztzinaptikus depolarizáció, mind a CB1 receptor agonisták preszinaptikus gátlást okoztak az esetek többségében. Ez a jelenség látszólag ellentétben áll azzal a megfigyeléssel, miszerint a spontán EPSC-knek kismértékben emelkedik a frekvenciája. Az EPSC-k preszinaptikus facilitációját a hippocampus CA1 piramissejtjein megfigyelték, mely jelenséghez az asztrociták hozzájárulnak (Navarrete és Araque, 2008; 2010; Han és mtsai, 2012; Coiret és mtsai, 2012; CAstillo és mtsai, 2012). Kimutatták azt is, hogy a fokozott neuronális aktivitás, mely endokannabinoid felszabadulást eredményez, asztrocita-eredetű glutamát felszabadulást okoz. Ez a glutamát, a glutamaterg szinapszisokat képes facilitálni, vagy NMDA receptoron keresztül hosszú távú depressziót okozni. Nem csak a glutamát szerepel itt neurotranszmitterként, az ATP és a D-szerin felszabadulás is képes hozzájárulni a hosszú távú szinaptikus plaszticitáshoz (Rasooli-Nejad és mtsai, 2014).

Thapsigarginnal inkubált szeleteken azt láttuk, hogy a CB1 receptor agonista WIN55,212-2 hatására a spontán EPSC-k frekvenciája csökkent. Munkacsoportunk korábbi munkájában kimutattuk, hogy a thapsigarginnal való előinkubálás kivédte az asztrocita aktivációt, de nem gátolta a glutamát által kiváltott neuronális depolarizációt (Kőszeghy és mtsai, 2015). Úgy tűnik, hogy az sEPSC-k asztrocita aktiváció általi frekvencianövekedése és a direkt preszinaptikus gátlás általi sEPSC-k frekvenciacsökkenése együttesen játszik szerepet az endokannabinoid hatás kialakulásában a PPN serkentő neurotranszmissziós folyamataiban.

A serkentő neurotranszmisszióval kapcsolatos asztrocita-függő serkentő hatások további bizonyítékként kimutattuk még hogy az asztrociták optogenetikai stimulációja növelte az sEPSC-k frekvenciáját a II-es csoportú mGluR receptorok aktivációja által, de nem volt hatással az sIPSC-kre.

Az akár optogenetikai, akár farmakológiai módszerekkel történő asztrocita stimuláció esetén az asztrocitákból felszabaduló glutamát a preszinaptikus I-es csoportú mGluR receptoron hat és

serkenti a hippocampus CA3-CA1 szinapszisait (Navarrete és Araque, 2010), mely LTP-t indukál (Navarrete és mtsai, 2012), növeli a serkentő és a gátló neurotranszmissziót a látókéregben (Perea és mtsai, 2014), vagy LTP-t indukál a kisagyi parallel rost-Purkinje sejt szinapszisokban (Sasaki és mtsai, 2012). Megfigyeltük, hogy a PPN-ben létezik egy asztrocita-függő, EPSC-k frekvenciáját növelő hatás, és ez képes elfedni a preszinaptikus CB1 receptorok gátló hatását. Továbbá, az asztrociták optogenetikai aktivációja növelte az sEPSC-k frekvenciáját II-es csoportú mGluR receptorokon keresztül. Ezek a megfigyelések felvetették azt a tényt, hogy a preszinaptikus mGluR receptor-függő jelenségek képesek szabályozni a szinapszis erősségét a PPN-ben. Azonban, amikor a preszinaptikus serkentő rostok stimulálásával EPSC-eket váltottunk ki, és ezzel egyidőben optogenetikailag aktiváltuk az asztrocitákat, csak egy befelé irányuló tónusos áram létrejöttét tapasztaltuk, de a posztzinaptikus áramok nem változtak. Nem zárjuk ki annak a lehetőségét, hogy a preszinaptikusan elhelyezkedő mGluR receptorok is szerepet játszhatsanak a PPN szinapszisainak szabályozásában, de jelen eredményeink arra a megállapításra vezettek, hogy az excitatórikus neurotranszmisszió serkentése a PPN-ben inkább a serkentő neuronok excitabilitás fokozódásának, mintsem a szinaptikus vezikulákra gyakorolt hatásnak a következménye. Az, hogy az sEPSC-k frekvencianövekedése a szeletpreparátumokban a glutamaterg neuronok aktivációja miatt történik, azt sugallja, hogy az asztrocita-függő serkentő mechanizmusok fontos célpontjai a PPN glutamaterg, nem-kolinerg neuronjai. Habár a sejteket neurokémiai szempontból (hogy kolinerg, GABAerg vagy glutamaterg sejtről volt-e szó) nem vizsgáltuk ebben a munkában, munkacsoportunk korábbi eredményei a fenti hipotézist erősítik meg. A korábbi tanulmányokban munkacsoportunk kimutatta, hogy a nem-kolinerg sejtek (GABAerg és glutamaterg sejtek) CB1 receptor agonisták hatására depolarizálódnak, míg a kolinerg sejtekre háromféle hatás jellemző, mégpedig azok depolarizálódhatnak, hiperpolarizálódhatnak, vagy nem látunk változást a CB1 agonista hatására (Kőszeghy és mtsai, 2015). Az, hogy a gátló neurotranszmissziót nem serkentik az indirekt kannabinoid hatások, felveti a lehetőségét annak, hogy egy coronalis szeletpreparátumban a helyi GABAerg kollaterálisokból kevesebb van, mint a glutamaterg kollaterálisokból. Ezt a jelenséget morfológiai megfigyelések is megerősítik, miszerint a feltehetőleg glutamaterg neuronokon lokális axon kollaterálisokat hoznak létre, míg a feltehetőleg GABAerg sejteknek nincsenek

helyi varikozításai, és azt tartják róluk, hogy ezek inkább projekciós neuronokként funkcionálnak a PPN-ben (Ros és mtsai, 2010).

7.2.4. Funkcionális jelentőség

Jelen munka eredményei és a munkacsoport korábbi eredményei megmutatták, hogy a PPN neuronjain a kannabinoidok egy egyedi aktivációs mintázatot hoznak létre. A hiperpolarizáció, a válaszhiány és a depolarizáció, és ezek háttérben álló befelé vagy kifelé irányuló tónusos áramok, nem függetlenek a neuronok neurokémiai sajátosságaitól (Kőszeghy és mtsai, 2015), de csak kismértékben függ a sejtestek rostro-caudalis elhelyezkedésétől.

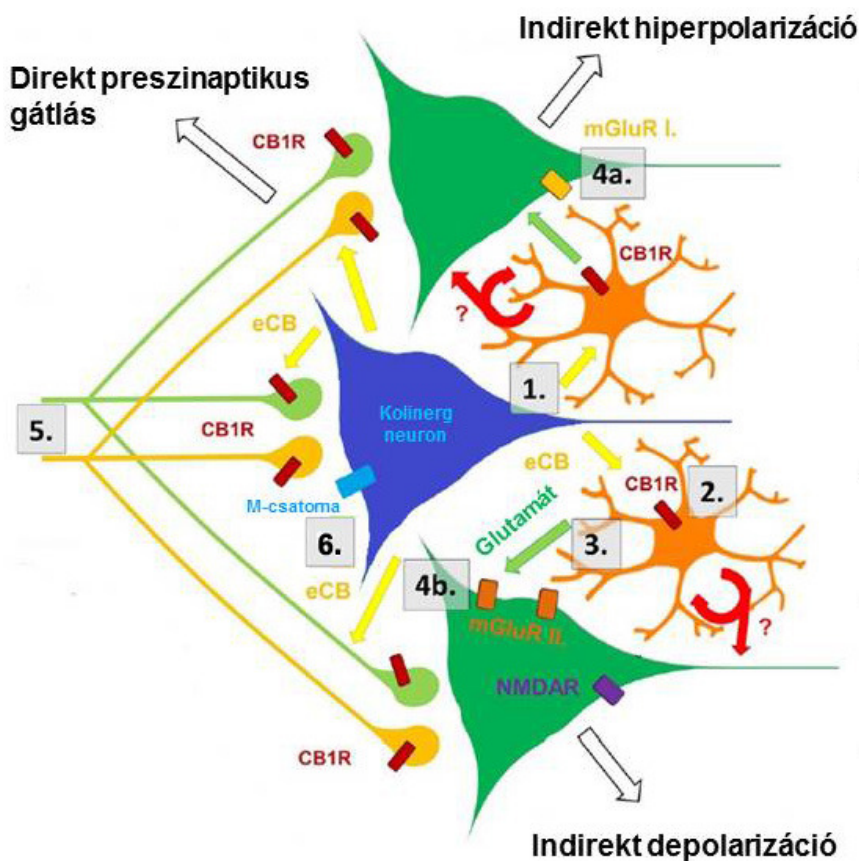
Kimutatták, hogy az exogén kannabinoidok növelik a lassú hullámú és a REM alvás időtartamát (Murillo-Rodriguez és mtsai, 2008; Herrera-Solís és mtsai, 2010), és az endokannabinoid felszabadulásnak fontos szerepe van az alvás homeosztatikus szabályozásában (Murillo-Rodriguez, 2008). Az *ex vivo* kísérleteinkben CB1 agonista alkalmazásával megfigyelt változások hasonlóak lehetnek, mint a PPN neuronok kannabinoid indukált REM vagy lassú hullámú alvás alatt megfigyelhető aktivitása.

Korábbi irodalmi adatok szerint a PPN neuronjai, neurokémiai tulajdonságuktól függetlenül, a gamma tartományban tüzelnek és oszcillálnak, és ezzel az aktivitással az aktív állapotok fenntartásához járulnak hozzá, mint az ébrenlét és REM alvás (Urbano és mtsai, 2012; Garcia-Rill és mtsai, 2013). A jelen munka eredményei részben ellentétben állnak ezekkel az eredményekkel, mivel azt mutattuk ki, hogy egy sejtípus-specifikus heterogenitás jellemző a neuromodulációs hatásokra, és nem figyeltünk meg az összes neuronra egységesen jellemző változásokat. Ezen túl a PPN neuronokra jellemző gamma tartományú aktivitás, melyet a serkentő bemenetek tartanak fenn, facilitálhatják a depolarizáció-indukált endokannabinoid felszabadulást. A depolarizált, gamma frekvenciatartományban tüzelő neuronok stimuláló bemeneteinek endokannabinoidok általi szuppressziója kivédheti a hosszú ideig magas frekvencián történő tüzelést.

Ugyanakkor eredményeink csupán a lokális változásokat mutatják be, mivel a PPN-t a preparáció során eltávolítjuk távolabbi összeköttetéseinek megszakításával, így ez limitálja az *in vivo* eredmények és saját eredményeink összehasonlítását. Ezen túl a kannabinoid szabályozás kétféle természetét mutattuk be, azaz a serkentő bemenetek preszinaptikus gátlását ellensúlyozni tudja az asztrocita-függő sEPSC frekvenciafokozódás.

A PPN neuronális válaszainak heterogenitása -akár neuromodulációs stimulusok hatására, akár a globális agyi állapotok közötti átmenetekkel párhuzamosan alakulnak ki- a mag általános jellemzőjének tűnik. A PPN-en karbakol alkalmazása heterogén válaszokat hoz létre: befelé irányuló, kifelé irányuló vagy kétfázisú áram jön létre, vagy nem látunk változást (Ye és mtsai, 2010). Ezen túl a legtöbb PPN neuron aktivitása a cortex lassú hullámú aktivitásához szinkronizált, de ez a kapcsolat csökken deszinkronizáció alatt. Az agykérgi lassú hullámú aktivitás és a deszinkronizáció közötti átmeneteket kolinerg és nem-kolinerg neuronok fázisos serkentése, tónusos serkentése és tónusos gátlása kíséri (Petzold és mtsai, 2015). Habár spekulatívnak tűnhet a különböző kísérleti megközelítések által kapott adatok összehasonlítása, az eredményeink a PPN neuronok aktivitásmintázatának ehhez hasonló változását mutatják be, amely a kérgi aktivitás kannabinoid-indukált átmenetei alatt látható PPN működésnek felel meg.

7.2.5. A direkt és indirekt neuromodulációs hatások sémás összefoglalása



17. ábra Az általunk vizsgált neuromodulációs mechanizmusok összefoglalása .

1. A depolarizált neuronokból (valószínűleg neurokémiai markerektől, sejtípusoktól függetlenül) endokannabinoidok szabadulnak fel.
2. Ezek az endokannabinoidok az asztrociták CB1 receptorain keresztül aktiválják azokat.
3. Az aktivált asztrocitákból glutamát szabadul fel (vagy a glutamátfelvétel csökken).
4. A glutamát metabotróp glutamátreceptorokon keresztül fejti ki hatását. I-es csoportú mGluR aktiváció neuronális hiperpolarizációhoz (4a), II-es csoportú mGluR aktiváció neuronális depolarizációhoz vezet (4b).
5. Az asztrociták aktivációjával párhuzamosan az endokannabinoidok a preszinaptikus CB1 receptorok aktivációján keresztül mind a serkentő, mind a gátló szinaptikus neurotranszmisszió gátlás alá kerül.
6. Az M-áram megléte a kolinerg neuronok sajátosága, így a kolinerg hatások az M-áram gátlásán keresztül csak a kolinerg neuronokat depolarizálják.

8. Összefoglalás

A nucleus pedunculo pontinus (PPN) a retikuláris aktivációs rendszer egyik kolinerg magja, ami a mezopontin régióban helyezkedik el, és főbb élettani funkciói közé az alvás-ébrenlét és a mozgás szabályozása tartozik. Az alvásszabályozás homeosztatikus és cirkadián komponenseiként többféle neuromodulációs hatás érvényesül a PPN neuronjain; ismertek a kolinerg, szerotoninerg, endokannabinoid, orexin- és ghrelin-mediált hatások. Bár az *in vivo* és az *ex vivo*, neuronokon érvényesülő hatások ismertek a PPN neuronokon, a részletes hatásmechanizmusaik nincsenek teljesen feltérképezve. Vizsgálataink célja az volt, hogy a PPN neuronokon érvényesülő kolinerg és endokannabinoid hatások közvetlenül neuronokon vagy közvetve, asztrocita-aktiváción keresztül megvalósuló komponenseit egymástól szétválasszuk.

Megállapítottuk, hogy a kolinerg hatások egyik fontos, közvetlenül a neuronokon érvényesülő hatása az M-áram gátlásán keresztül érvényesül. Ezt az alacsony küszöbű, lassan aktiválódó káliumáramot csak a kolinerg neuronokon találtuk meg, és a nem-kolinerg vagy az azonosított GABAerg neuronok nem rendelkeztek vele. Az M-áram felelősnek bizonyult a tüzelési frekvencia adaptáció és a közepes utóhiperpolarizáció kialakításáért, valamint effektíven modulálta a kalciumáram-függő magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációkat.

Az endokannabinoid szignalizáció PPN-en érvényesülő direkt neuronális és indirekt, asztrocita-függő komponenseit is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a CB1 receptor aktiváció során létrejövő tónusos serkentő vagy gátló neuronális áramokat asztrocita-aktiváció váltja ki, metabotróp glutamát receptor-függő módon. A CB1 receptor aktiváció hatásához hasonló neuronális hatásokat láttunk az asztrociták optogenetikai aktivációjával. Az asztrocita-aktiváción keresztül érvényesülő, indirekt hatás mellett közvetlenül a serkentő és gátló szinapszisokon megvalósuló preszinaptikus gátlást is láttunk, amit az asztrocita-függő mechanizmus csak közvetve, a glutamaterg neuronok általános serkentésén keresztül módosít.

Tárgyszavak: nucleus pedunculo pontinus, neuromoduláció, M-áram, acetilkolin, CB1 receptor, asztrocita

9. Summary

The pedunculopontine nucleus (PPN) is a cholinergic member of the reticular activating system. It is located in the mesopontine region, and its main physiological functions are the regulation of sleep-wakefulness cycles and movement. Several neuromodulatory actions target the PPN, being parts of homeostatic and circadian sleep regulations. Cholinergic, serotonergic, endocannabinoid, orexin- and ghrelin-mediated actions are known in the PPN. Although *in vivo* and *ex vivo* actions of these substances are documented on PPN neurons, the mechanisms of action are not known in details. The aim of our investigation was to separate direct neuronal and indirect, astrocyte-mediated actions of neuromodulatory mechanisms.

We found that cholinergic neuromodulation partially influences the neurons via blockade of neuronal M-current. This low-threshold-, slowly activating potassium current was only recorded on cholinergic neurons and was not found on GABAergic or non-cholinergic ones. The M-current was proved to be responsible for spike frequency adaptation and medium afterhyperpolarization. Furthermore, it effectively modulated calcium current dependent high threshold membrane potential oscillations.

Direct neuronal and indirect, astrocyte-dependent components of endocannabinoid signaling were also investigated in the PPN. We found that the metabotropic glutamate receptor dependent tonic excitatory or inhibitory currents elicited by CB1 receptor stimulation are generated via astrocyte activation. Actions of the optogenetic astrocyte stimulation on neurons resembled to neuronal actions elicited by CB1 receptor stimulation. Besides the astrocyte-mediated tonic currents, presynaptic inhibition of excitatory and inhibitory synapses was also demonstrated. This action was only influenced by astrocytic activity via the general increase of excitability of glutamatergic neurons.

Keywords: pedunculopontine nucleus, neuromodulation, M-current, acetylcholine, CB1 receptor, optogenetics, astrocyte

10. Köszönetnyilvánítás

A fenti munkát a Nemzeti Agykutató Program (KTIA_13_NAP-A_I/10) és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2/A-11/1-KONV-2012-0025 és a TÁMOP-4.2.2B-15/1/KONV-2015-0001 támogatták.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Csernoch Lászlónak, hogy lehetővé tette számomra, hogy a DE ÁOK Élettani Intézetében, a Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola keretein belül végezhessem munkámat. Köszönetet szeretnék továbbá mondani Dr. Szücs Péternek (DE ÁOK Anatómiai Intézet); témavezetőmnek Dr. Pál Balázsnak, továbbá Dr. Kőszeghy Áronnak, Dr. Vincze Jánosnak, Dr. Szentesi Péternek és Dr. Kovács Adriennek (DE ÁOK Élettani Intézet) szakmai segítségükért a kísérletek elvégzésében, elemzésében és interpretálásában. Köszönetet mondok továbbá Prof. Dr. Bíró Tamásnak (DE ÁOK Immunológiai Intézet), Dr. Hegyi Zoltánnak és Prof. Dr. Antal Miklósnak (DE ÁOK Anatómiai Intézet) egyes kísérletek elvégzésében nyújtott segítségükért.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani családomnak és páromnak, hogy biztosították számomra a nyugodt, biztos hátteret munkám során, illetve a PhD védésre való felkészülés alatt.

11. Hivatkozásjegyzék

Adams, P. R., Brown, D. A. (1982) Synaptic inhibition of the M-current: slow excitatory post-synaptic potential mechanism in bullfrog sympathetic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 332, 263–272.

Akasu, T. (1988) Adrenaline depolarization in paravertebral sympathetic neurones of bullfrogs. *Pflügers Arch.* 411:80–87

Alger, B. E. (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68:247–86

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

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215

Araque, A., Martin, E. D., Perea, G., Arellano, J. I., and Buño, W. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22, 2443–2450.

Bacci, A., Huguenard, J. R., Prince, D. A. (2004) Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature* 431(7006):312–16

Bang J, Kim HY, Lee H. (2016) Optogenetic and chemogenetic approaches for studying astrocytes and gliotransmitters. *Exp Neurobiol.* 25(5):205-221.

Baraban, J. H., Aghajanian, G. K. (1981) Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: Demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 204, 1-11.

- Barbeau, A. (1962) The pathogenesis of Parkinson's disease; a new hypothesis. *Can. med. Ass. J.* 87, 802-807.
- Bardoni, R., Ghirri, A., Zonta, M., Betelli, C., Vitale, G., Ruggieri, V., et al. (2010). Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J.Physiol.* 588(Pt5),831–846.
- Beckstead, R. M., Domesick, V. B., Nauta, W. J. H. (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.* 175, 191-217.
- Belluzzi O, Puopolo M, Benedusi M, Kratskin I. (2004) Selective neuroinhibitory effects of taurine in slices of rat main olfactory bulb. *Neuroscience.* 2004;124(4):929-44.
- Beninato, M., Spencer, R. F. (1987) A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Res.* 412, 169-174.
- Beppu, K., Sasaki,T., Tanaka, K. F., Yamanaka, A., Fukazawa,Y., Shigemoto, R., et al. (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81,314–320.
- 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
- Bland, B. H., Oddie, S.D., Colom, L.V., Vertes, R.P. (1994) The extrinsic modulation of medial septal cell discharges by the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathwa., *Hippocampus* 4 649–660.
- Blankman, J. L., Simon, G. M., Cravatt, B.F. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* 14, 1347–1356.
- Bolla KI, Lesage SR, Gamaldo CE, Neubauer DN, Funderburk FR, Cadet JL, David PM, Verdejo-Garcia A, Benbrook AR. (2008) Sleep disturbance in heavy marijuana users. *Sleep*;31(6):901-8.

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 pedunculopontine nucleus of mice. *Front Cell Neurosci.* 9:121.

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.

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 8(9):1263-8.

Bradaïa, A., Schlichter, R., Trouslard, J. (2004). Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *J. Physiol.* 559(Pt1),169–186. Erratum in: *J.Physiol.* 559(Pt3),985.

Brazhnik, E. S., Vinogradova, O. S., Karano, A. M. (1985) Frequency modulation of neuronal theta-bursts in rabbit's septum by low frequency repetitive stimulation of the afferent pathways, *Neuroscience* 14 501–508.

Brown, D. A. (1988) *Ion Channels Vol. 1* (ed. Narahashi, T.) 55–99 (Plenum, New York).

Brown, D. A., Adams, P. R. (1980) Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature.* 283(5748):673-6.

Brown, D. A., Selyanko, A. A. (1985) Membrane currents underlying the cholinergic slow excitatory post-synaptic potential in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol. (Lond.)* 365, 365–387.

Brown, D. A., Marrion, N. V., Smart, T. H. (1989) On the transduction mechanisms for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 413, 469–488

Brown, D. A., Passmore, G. M. (2009) Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol.* 156(8):1185-95.

Brown, P. (2003). Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 18, 357–363.

Brudzynski, S. M., Wu, M., Mogenson, J. (1988) Modulation of locomotor activity induced by injections of carbachol into the tegmental pedunculopontine nucleus and adjacent areas in the rat. *Brain Res.* 451, 119-125.

Canteras, N. S., Shammah-Lagnado, S. J., Silva, B. A., Ricardo, J. A. (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res.* 513(1):43-59.

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

Caulfield, M. P., Jones, S., Vallis, Y., Buckley, N. J., Kim, G. D., Milligan, G., Brown, D. A. (1994) Muscarinic M-current inhibition via G alpha q/11 and alpha-adrenoceptor inhibition of Ca²⁺ current via G alpha o in rat sympathetic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 477, 415–422.

Cajal, S. Ramón (1913) Un nuevo proceder para la impregnación de la neuroglía. *Bol. Soc. Esp. Biol., II*, 104-108.

Cellot, G., Cherubini, E. (2013). Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Front. NeuralCircuits* 7:136.

Chambard J. M., Ashmore, J. F. (2005) Regulation of the voltage-gated potassium channel KCNQ4 in the auditory pathway. *Pflugers Arch.* 450(1):34-44.

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., 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):7067–7076

Chavis, P., Fagni, L., Bockaert, J., Lansman, J. B. (1995) Modulation of calcium channels by metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 34(8):929–937

Chen, N., Sugihara, H., Sharma, J., Perea, G., Petravic, 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, J., Tan, Z., Zeng, L., Zhang, X., He, Y., Gao, W., et al. (2013). Heterosynaptic long-term depression mediated by ATP released from astrocytes. *Glia* 61, 178–191.

Chevalier, V., Takahashi, K. A., Castillo, P. E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Ann Rev Neurosci* 29:37–76

Clapham, D. E., Neer, E. J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167–203

Clarke, P. B., Hommer, D. W., Pert, A., Skirboll, L. R. (1987) Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from the pedunculopontine nucleus in the rat. Neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience* 23, 1011–1019.

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.

Colino, A., Halliwell, J. V. (1987) Differential modulation of three separate K conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature* 327:73–77

Connelly, W. M., Errington, A. C., Di Giovanni, G., and Crunelli, V. (2013). Metabotropic regulation of extrasynaptic GABA_A 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.

Cotrina, M. L., Lin, J. H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C. C., Nedergaard, M. (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95(26):15735–15740

Coucke, P. J., Hauwe, P. V., Kelley, P. M., Kunst, H., Schatteman, I., Velzen, D. V., Meyers, J., Ensink, R. J., Verstreken, M., Declau, F., et al. (1999) Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1321–1328

Cornell Bell, A.H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., Smith, S. J. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long- range glial signaling. *Science* 247, 470–473

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.

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

D’Ascenzo, M., Fellin, T., Terunuma, M., Revilla-Sanchez, R., Meaney, D. F., Auberson, Y. P., Moss, S. J., Haydon, P. G. (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(6):1995–2000

Datta, S., Siwek, D. F. (2002) Single cell activity patterns of pdenculopontine tegmentum neurons across the sleep-wake cycle in the freely moving rats. *J Neurosci Res* 70: 611– 621.

Datta, S., Spoley, E. E., Patterson, E. H. (2001a) Microinjection of glutamate into the pedunculopontine tegmentum induces REM sleep and wakefulness in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R752–R759

- Datta, S., Patterson, E. H., Spoley, E. E. (2001b) Excitation of the pedunculopontine tegmental NMDA receptors induces wakefulness and cortical activation in the rat. *J Neurosci Res* 66:109–116
- Datta, S., Spoley, E. E., Mavanji, V. K., Patterson, E. H. (2002) A novel role of pedunculopontine tegmental kainate receptors: a mechanism of rapid eye movement sleep generation in the rat. *Neuroscience* 114:157–164
- Davis, M. I., Ronesi, J., Lovinger, D. M. (2003) A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/ protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 278 (49):48973–80
- De Lecea, L., Criado, J. R., Prospero-Garcia, O., Gautvik, K. M., Schweitzer, P., Danielson, P. E., Dunlop, C. L., Siggins, G. R., Henriksen, S. J., Sutcliffe, J. G. (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381, 242–245.
- Defeuadis, F. V. (1974) Central cholinergic systems and behavior. Academic Press: New York.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A. K., Miesenböck, G., Ting, A., Schnitzer, M. J. (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci.* 26(41):10380-6.
- Dellovade, T. L., Martin, L. J., Koliatsos, V. E., Price, D. L. (1988) Cholinergic innervation of deep cerebellar nuclei from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14, 632.
- Delmas, P., Brown, D. A. (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci.* 6(11):850-62.
- Detari, L., Rasmusson, D.D., Semba, K. (1999) The role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex. *Prog Neurobiol* 58: 249–277.

- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., 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* 258:1946–9
- Devaux, J. J., Kleopa, K. A., Cooper, E. C., Scherer, S. S. (2004) KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J. Neurosci.* 24, 1236–1244.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686–91
- Dringenberg, H. C., Vanderwolf, C. H. (1998) Involvement of direct and indirect pathways in electrocorticographic activation. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 243–257.
- Drion, G., Bonjean, M., Waroux, O., Scuvée-Moreau, J., Liégeois, J. F., Sejnowski, T. J., Sepulchre, R., Seutin, V. (2010). M-type channels selectively control bursting in rat dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci.* 31(5): 827-835.
- Duan, S., Anderson, C. M., Keung, E. C., Chen, Y., Chen, Y., Swanson, R. A. (2003) P2X₇ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 23(4):1320–1328
- Dun, N. J., Dun, S. L., Hwang, L. L., Forstermann, U. (1995). Infrequent co-existence of nitric oxide synthase and parvalbumin, calbindin and calretinin immunoreactivity in rat pontine neurons. *Neurosci. Lett.* 191, 165–168.
- Eckenstein, F., Sofroniew, M. V. (1986) Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J. Neurosci.* 11, 2286-2291.
- Fay R., Kubin L. (2000) Pontomedullary distribution of 5-HT_{2A} receptor-like protein in the rat, *J. Comp. Neurol.* 418 323–345.

Fay R., Kubin L. (2001) 5-HT_{2A} 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., Halassa, M. M., Terunuma, M., Succol, F., Takano, H., Frank, M., et al. (2009) Endogenous non neuronal modulators of synaptic transmission control cortical slow oscillations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15037–15042.

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

Fellin, T., Pozzan, T., Carmignoto, G. (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 281,4274–4284.

Fenno, L., Yizhar, O., Deisseroth, K. (2011) The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 389–412.

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.

Figueiredo M, Lane S, Stout RF Jr, Liu B, Parpura V, Teschemacher AG, Kasparov S. (2014) Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium.* 56(3):208-14.

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. *Exp Physiol.*;96(1):40-50.

Filippov, A. K., Brown, D. A. (2013) A mechanism for nerve cell excitation by norepinephrine via α -1 adrenoceptors: inhibition of potassium M-current. *Cell Mol Neurobiol.* 33(1):1-4.

Fleming, T. M., Scott, V., Naskar, K., Joe, N., Brown, C. H., Stern, J. E. (2011) State-dependent changes in astrocyte regulation of extrasynaptic NMDA receptor signalling in neurosecretory neurons. *J. Physiol.* 589,3929–3941.

Fortin, M., Parent, A. (1999) Calretinin-immunoreactive neurons in primate pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neuroscience* 88, 535–547.

Franklin KBJ, Paxinos G (2007) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 3rd ed. Elsevier.

Freund, T. F., Katona, I., Piomelli, D. (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017–66

Furman, M., Zhan, Q., McCafferty, C., Lerner, B. A., Motelow, J. E., Meng, J., Ma, C., Buchanan, G. F., Witten, I. B., Deisseroth, K., Cardin, J. A., Blumenfeld, H. (2015) Optogenetic stimulation of cholinergic brainstem neurons during focal limbic seizures: Effects on cortical physiology. *Epilepsia*. 56(12):e198-202.

Gaetani, Silvana; Dipasquale, Pasqua; Romano, Adele; Righetti, Laura; Cassano, Tommaso; Piomelli, Daniele; Cuomo, Vincenzo (2009) The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic and antidepressant drugs. *International review of neurobiology*. *International Review of Neurobiology*. 85: 57–72.

Gamper, N., Shapiro, M. S. (2003) Calmodulin mediates Ca²⁺- dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 122, 17–31.

García-Marín, V., García-López, P., Freire, M. (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci*, 30:479-487.

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

Garcia-Rill, E., Skinner, R. D. (1987a) The mesencephalic locomotor region. I. Activation of a medullary projection site. *Brain Res.* 411, 1-12.

Garcia-Rill, E., Skinner, R. D. (1987b) The mesencephalic locomotor region. II. Projections to reticulospinal neurons. *Brain Res.* 411, 13-20.

Garcia-Rill, E., Skinner, R. D. (1991) Modulation of rhythmic functions by the brainstem. In: *Neurobiological Basis of Human Locomotion*, pp. 137-158, Eds. M. Shimamura, S. Grillner and V. R. Edgerton. Japan Scientific Societies Press: Tokyo.

Garcia-Rill, E., Simon, C., Smith, K., Kezunovic, N., Hyde, J. (2011) The pedunculopontine tegmental nucleus: from basic neuroscience to neurosurgical applications: Arousal from slices to humans: implications for DBS. *J Neural Transm.* 118(10): 1397–1407.

Garcia-Rill, E., Kezunovic, N., D'Onofrio, S., Luster, B., Hyde, J., Bisagno, V., Urbano, F. J. (2014) Gamma band activity in the RAS-intracellular mechanisms. *Exp Brain Res.* 232(5):1509-22.

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.

Giuffrida, A., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2:358–63

Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., Uhl, G. R. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Br Res* 1071(1):10–23

Goldsmith, M., Van Der Kooy, D. (1988) Separate non-cholinergic descending projections and cholinergic ascending projections from the nucleus tegmenti pedunculopontinus. *Brain Res.* 445, 386-391.

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(43):14198–209.

Halassa, M. M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J. R., Lee, S. Y., Abel, T., et al. (2009) Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213–219.

Haley, J. E., Haley, J. E., Abogadie, F. C., Delmas, P., Dayrell, M., Vallis, Y., Milligan, G., Caulfield, M. P., Brown, D. A., Buckley, N. J. (1998) The alpha subunit of Gq contributes to muscarinic inhibition of the M-type potassium current in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 4521–4531

Haley, J. E., Delmas, P., Offermanns, S., Abogadie, F. C., Simon, M. I., Buckley, N. J., Brown, D. A. (2000) Muscarinic inhibition of calcium current and M current in Galpha q-deficient mice. *J. Neurosci.* 20, 3973–3979

Hallanger, A. E., Levey, A. I., Lee, H. J., Rye, D. B., Wainer, B. H. (1987) The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 262: 105–124,

Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Kano, M. (2007) Ca^{2+} -assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 360–365.

Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., Koehl, M., Abrous, D. N., 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):1039–1050

Hansen, H. H., Ebbesen, C., Mathiesen, C., Weikop, P., Ronn, L. C., Waroux, O., Scuvée-Moreau, J., Seutin, V., Mikkelsen, J. D. (2006) The KCNQ channel opener retigabine inhibits the activity of mesencephalic dopaminergic systems of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:1006–1019.

Hansen HH, Waroux O, Seutin V, Jentsch TJ, Aznar S, Mikkelsen JD. (2008) Kv7 channels: interaction with dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the CNS. *J Physiol.* 586(7):1823-32.

Hegemann P, Nagel G. (2013) From channelrhodopsins to optogenetics. *EMBO Mol Med.* 5(2):173-6.

Hegyí, 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):251–262

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

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

Hermes, M. L., Renaud, L. P. (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):840–849

Hernandez CC, Zaika O, Tolstykh GP, Shapiro MS. (2008) Regulation of neural KCNQ channels: signalling pathways, structural motifs and functional implications. *J Physiol.* 586(7):1811-21.

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

Hobson, J. A., Lydic, R., Baghdoyan, H. A. (1986) Evolving concepts of sleep cycle generation: from brain centers to neuronal populations. *Behav. Brain Sci.* 9, 371-448.

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.

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.

Howlett, A. C., Qualy, J. M., Khachatrian, L. L. (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29(3):307–13

Hu H, Vervaeke K, Storm JF. (2002) Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.* 545(Pt 3):783-805.

Huang, H., Trussell, L. O. (2011) KCNQ5 channels control resting properties and release probability of a synapse. *Nat Neurosci.* 14(7):840-7.

Iadecola, C., Nedergaard, M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369–1376.

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):2633–2644

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

Jackson, A., Crossman, A. R. (1983) Nucleus tegmenti pedunculo-pontinus: Efferent connections with special reference to the basal ganglia, studies in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 10, 725-765.

Jasper, H. H. (1949) Diffuse projection systems: the integrative action of the thalamic reticular system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1: 405–419.

Jentsch, T. J. (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature Rev. Neurosci.* 1, 21–30.

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

Johnston, M. V., McKinney, M., Coyle, J. T. (1981) Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res* 43:159–172

Jones, B. E. (1989) The relationship among acetylcholine, norepinephrine and GABA neurons within the pons of the rat. *Anat. Rec.* 223, 57a.

Jones, B. E. (2003) Arousal systems. *Front Biosci* 8: s438 –s451.

Jones, B. E., Page, M., Beaudet, A. (1986) Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of (3H) choline into the rat spinal cord, *Neuroscience* 18, 901-916.

Jones, B. E., Yang, T. Z. (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. comp. Neurol.* 242, 56-92.

Jones, E. G., Leavitt, R.Y. (1974) Retrograde axonal transport and the demonstration of nonspecific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol* 154: 349–377.

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.

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., Watanabe, M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.

Kano M. (2014) Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling.

Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 90(7):235-50.

Kato, H. K., Kassai, H., Watabe, A. M., Aiba, A., Manabe, T. (2012) Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP3 receptor and L-type Ca²⁺ channel in mouse CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 590 (Pt 13):3019–3034

Katona, I., Freund, T.F. (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 529–558.

Katona, I., Sperl gh, B., S k, A., K falvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., Freund, T. F. (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci.*; 19:4544–4558

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

Kettenmann, H., Backus, K. H., Schachner, M. (1984) Aspartate, glutamate and g-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci. Lett.* 52, 25–29

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

Kezunovic, N., Urbano, F. J., Simon, C., Hyde, J., Smith, K., Garcia-Rill, E. (2011) Mechanism behind gamma band activity in the pedunclopontine 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., Jentsch, T. J. (2006) Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *EMBO J.* 25(3):642-52.

Kharkovets, T., Hardelin, J. P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., Jentsch, T. J. (2000) KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(8):4333-8.

Khateb, A., Serafin, M., Mühlethaler, M. (1990) Histamine excites pedunculopontine neurones in guinea pig brainstem slices. *Neurosci Lett.* 112(2-3):257-62.

Kim, J., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J., Sasaki, K. (2009a) Orexin-A and ghrelin depolarize the same pedunculopontine tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides.* 2009 Jul;30(7):1328-35.

Kim, J., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J., Sasaki, K. (2009b) Electrophysiological effects of ghrelin on pedunculopontine tegmental neurons in rats: An in vitro study. *Peptides.* 30(4):745-57

Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., Alger, B. E. (2002) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 10182–10191.

Kinney, G. G., Vogel, G. W., Feng, P. (1998) Brainstem carbachol injections in the urethane anesthetized rat produce hippocampal theta rhythm and cortical desynchronization: a comparison of pedunculopontine tegmental versus nucleus pontis oralis injections. *Brain Res.* 809(2):307-13.

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.

Kohlmeier, K. A., Christensen, M. H., Kristensen, M. P., Kristiansen, U. (2013) Pharmacological evidence of functional inhibitory metabotropic glutamate receptors on mouse arousal-related cholinergic laterodorsal tegmental neurons. *Neuropharmacology* 66:99–113

Kovács, A., Pál, B. (2017) Astrocyte-Dependent Slow Inward Currents (SICs) Participate in Neuromodulatory Mechanisms in the Pedunculopontine Nucleus (PPN). *Front Cell Neurosci.* 11:16.

Kovács, A., Bordás, C., Pál, B. (2015) Cholinergic and endocannabinoid neuromodulatory effects overlap on neurons of the pedunculopontine nucleus of mice. *Neuroreport.* 26(5):273-8.

Kozlov, A. S., Angulo, M.C., Audinat, E., Charpak, S. (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103,10058–10063.doi:10.1073/pnas.0603741103

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

Kőszeghy, Á., Kovács, A., Bíró, T., Szücs, P., Vincze, J., Hegyi, Z., et al. (2015). Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunculopontine nucleus (PPN) via astrocytes. *BrainStruct. Funct.* 220,3023–3041.

Kőszeghy, Á., Vincze, J., Rusznák, Z., Fu, Y., Paxinos, G., Csernoch, L., Szücs, G. (2012) Activation of muscarinic receptors increases the activity of the granule neurons of the rat dorsal cochlear nucleus—a calcium imaging study. *Pflugers Arch.*; 463(6):829–844

Kreitzer, A.C., Regehr, W.G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29, 717–727.

Kroeger, D., Ferrari, L. L., Petit, G., Mahoney, C. E., Fuller, P. M., Arrigoni, E., Scammell, T. E. (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.

Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C. & Jentsch, T. J. (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437–446.

Lavoie, B., Parent, A. (1994) Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: Projections to basal ganglia as revealed by anterograde tract-tracking methods. *J. comp. Nemo/.* 344, 21&231.

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

- Le Meur, K., Galante, M., Angulo, M. C., and Audinat, E. (2007) Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate of non-synaptic origin in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 580(Pt2),373–383.
- Lee, V., Maguire, J. (2014) The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell. *Front Neural Circuits* 8:3.
- 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):790-6.
- Lehmann, J., Nagy, J. I., Atmadia, S., Fibiger, H. C. (1980) The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neuroscience* 5:1161– 1174
- Leonard, C. S., Llinas, R. R. (1990) Serotonin inhibits mesopontine cholinergic neurons in vitro. *Neurosci. Abstr.* 16, 1233.
- 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., Llinás, R. (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*; 59:309–330.
- Li, M., Zhang W. (2015) Oscillations in pedunculo pontine nucleus in Parkinson's disease and its relationship with deep brain stimulation. *Front Neural Circuits.* 2015; 9: 47.
- Li D, Héroult K, Isacoff EY, Oheim M, Ropert N. (2012) Optogenetic activation of LiGluR-expressing astrocytes evokes anion channel-mediated glutamate release. *J Physiol.* 590(4):855-73.
- 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):1083–1095

Linley JE, Pettinger L, Huang D, Gamper N. (2012) M channel enhancers and physiological M channel block. *J Physiol.* 590(4):793-807.

Llano I, Leresche N, Marty A. (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron.* 6(4):565-74.

Lopez, H. S., Adams, P. R. (1989) A G protein mediates the inhibition of the voltage-dependent potassium M current by muscarine, LHRH, substance P and UTP in bullfrog sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 5, 529–542

Lorente de No, R. (1938) Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. In: *Physiology of the Nervous System*, edited by J. Fulton. London: Oxford Univ. Press, p. 291–340.

Lovinger, D. M. (2008) Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*;184: 435–477

Luisi R, Panza E, Barrese V, Iannotti FA, Viggiano D, Secondo A, Canzoniero LM, Martire M, Annunziato L, Taglialatela M. (2009) Activation of pre-synaptic M-type K⁺ channels inhibits [3H]D-aspartate release by reducing Ca²⁺ entry through P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Neurochem.* 109(1):168-81.

Mackie, K. (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook Exper Pharmacol* 168:299–325

Mackie, K. (2006) Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int. J. Obes. (Lond.)* 30 Suppl 1:S19–23

Madamba, S. G., Schweitzer, P., Siggins, G. R. (1999) Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *J. Neurophysiol.* 82, 1768–1775

Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., Zeng, H. (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci.*;13(1):133-40.

Madison, D. V., Nicoll, R. A. (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol.* 354:319-31.

Marrion, N. V. (1997) Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 488–504

Martinez-Gonzalez, C., Bolam, J. P., Mena-Segovia, J. (2011) Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Front. Neuroanat.* 2011. 5:22.

Martinez-Gonzalez, C., Micklem, B. R., Bolam, J. P., and Mena-Segovia, J. (2009). Neurons containing calcium-binding proteins are topographically organized in the pedunculopontine nucleus. Program No. 845.17. 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2009. Online.

Martinez-Gonzalez, C., Wang, H. L., Micklem, B. R., Bolam, J. P., 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, pp. 723–734.

Martinez-Gonzalez, C., van Andel, J., Bolam, J. P., Mena-Segovia, J. (2014) Divergent motor projections from the pedunculopontine nucleus are differentially regulated in Parkinsonism. *Brain Struct Funct.* Jul;219(4):1451-62.

Martire, M., Castaldo, P., D'Amico, M., Preziosi, P., Annunziato, L., Taglialatela, 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, J. F. (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(4):669-93.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–4
- McNaughton, N., Sedgwick, E. M. (1978) Reticular stimulation and hippocampal theta rhythm in rats: effects of drugs, *Neuroscience* 3 629–632.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R., Pertwee, R. G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83–90
- 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.
- Mena-Segovia, J., Micklem, B. R., Nair-Roberts, R. G., Ungless, M. A., Bolam, J. P. (2009) GABAergic neuron distribution in the pedunclopontine nucleus defines functional subterritories. *J. Comp. Neurol.* 515, 397–408.
- Mena-Segovia, J., Bolam, J. P., Magill, P. J. (2004) Pedunclopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci.* 27, 585–588.
- Mena-Segovia, J., Bolam, J. P. (2017) Rethinking the pedunclopontine nucleus: from cellular organization to function. *Neuron.* 94(1):7-18.
- Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Levey, A. I., Wainer, B. H. (1984) Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brain stem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 12, 669-686.

- 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.
- Mieda, M., Hasegawa, E., Kisanuki, Y. Y., Sinton, C. M., Yanagisawa, M., Sakurai, T. (2011) Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci*. 31(17):6518-26.
- Min, R., Nevian, T. (2012) Astrocyte signaling controls spike timingdependent depression at neocortical synapses. *Nat. Neurosci*. 15, 746–753.
- Mitani, A., Ito, K., Mitani, V., Mccarley, R. W. (1988) Descending projections from the gigantocellular field in the cat: Cells of origin and their brain stem and spinal cord trajectories. *J. comp. Neurol*. 268, 546-566.
- Monti, J. M. (2011) Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews* 15 269-281.
- Moon-Edley, S., Graybiel, A. M. (1983) The afferent and efferent connections of the feline tegmenti pedunculopontinus, pars compacta. *J. comp. Neurol*. 217, 187--215.
- Moore, R. Y., Bloom, F. E. (1979) Central catecholamine neuron system: Anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine system. *A. Rev. Neurosci*. 2, 113-168.
- 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
- Moore, S. D., Madamba, S. G., Joels, M., Siggins, G. R. (1988) Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* 239, 278–280
- Moldrich, G., Wenger, T. (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*;21(11):1735–1742

- Molina-Holgado, F., Pinteaux, E., Moore, J. D., Molina-Holgado, E., Guaza, C., Gibson, R. M., Rothwell, N. J. (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neuroscience*; 23(16):6470–6474
- Mori, S., Sakamoto, T., Ohta, Y., Takakusaki, K., Matsuyama, K. (1989) Site-specific postural and locomotor changes evoked in awake, freely moving intact cats by stimulating the brainstem. *Brain Res.* 505, 65-74.
- 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.
- Moruzzi, G., Magoun, H. W. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1(4):455-73.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.
- Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz M, Navarro L, Prospéro-García O. (2001) Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and by U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport*; 12(10):2131-6.
- Murillo-Rodriguez, E. (2008) The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*; 32:1420–1427.
- Murillo-Rodriguez, 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*; 157:1–11
- Nauta, W. J. H. (1958) Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain Res.* 81, 319-340.

- Nauta, W. J. H., Mehler, W. R. (1969) Fiber connections of the basal ganglia. In: Psychotropic Drugs and Dysfunction of the Basal Ganglia, pp. 68-74. Eds. G. E. CRANE and R. GARDNER. USPHS: Washington.
- 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, E. D., Araque, A. (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10(2):e1001259
- Navarro-López, J., Jiménez-Díaz, L., Géranton, S. M., Ashmore, J. F. (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.
- Newman, D. B., Ginsberg, C. Y. (1988) Nuclear origins of projections from the brain stem reticular formation to the cerebellum in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14, 337.
- 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
- Nie, H., Zhang, H., Weng, H. R. (2010) Bidirectional neuron-glia interactions triggered by deficiency of glutamate uptake at spinal sensory synapses. *J. Neurophysiol.* 104,713–725.
- 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.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N., Helmchen, F. (2004) Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1:31–37

Nowacka, A., Jurkowlaniec, E., Trojnar, W. (2002) Microinjection of procaine into the pedunculopontine tegmental nucleus suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats, *Brain Res. Bull.* 58 377–384.

Nowacka A., W. Trojnar, Influence of GABA-ergic and glutaminergic transmission in the pedunculopontine tegmental nucleus on hippocampal theta activity, *Eur. J. Neurosci.* 12 (11) (2000) 80.

Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Kano, M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29, 729– 738.

Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Ano, M., Takeda, S., Tsubokawa, H., Kano, M. (2007) Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 584, 407–418.

Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M. M., Manabe, T., Kano, M. (2003) Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 18, 109–116.

Ohno-Shosaku, T., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Kano, M. (2002) Cooperative endocannabinoid production by neuronal depolarization and group I metabotropic glutamate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* 15, 953–961.

Ohno-Shosaku, T., Tanimura, A., Hashimotodani, Y., Kano, M. (2012) Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist* 18, 119–132.

Oldfield, S., Hancock, J., Mason, A., Hobson, S. A., Wynick, D., Kelly, E., Randall, A. D., Marrion, N. V. (2009) Receptor-mediated suppression of potassium currents requires colocalization within lipid rafts. *Mol Pharmacol.* 76(6):1279-89.

Olszewski, J., Baxter, D. (1982) *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem*. Basel: S Karger AG.

- Pahapill, P. A., Lozano, A. M. (2000) The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123(Pt 9), 1767–1783.
- Pál, B. (2015) Astrocytic Actions on Extrasynaptic Neuronal Currents. *Front Cell Neurosci.* 9:474. doi: 10.3389/fncel.2015.00474. eCollection 2015.
- 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.
- Panatier, A., Vallée, J., Haber, M., Murai, K.K., Lacaille, J.C., Robitaille, R. (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146, 785–798.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., North, R. A. (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589–597
- Papez, J. W. (1956) Path for projection of non-specific diffuse impulses to cortex for EEG, related to consciousness. *Dis Nerv Syst* 17: 103–108
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., et al. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150, 633–646.
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jętrinija, K., Jętrinija, S., Haydon, P. G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*; 369(6483):744–747
- Partridge, J. G., Lewin, A. E., Yasko, J. R., Vicini, S. (2014) Contrasting actions of Group I metabotropic glutamate receptors in distinct mouse striatal neurones. *J Physiol* 592(13):2721–33.
- Pasantes-Morales, H., Schousboe, A. (1988) Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res* 20(4):503–509

- Passmore, G. M., Selyanko, A. A., Mistry, M., Al-Qatari, M., Marsh, S. J., Matthews, E. A., Dickenson, A. H., Brown, T. A., Burbidge, S. A., Main, M., Brown, D. A. (2003) KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J. Neurosci.* 23, 7227–7236.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G. (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 17, 7817–7830.
- Perea, G., Araque, A. (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* 25, 2192–2203.
- Perea, G., Araque, A. (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083–1086
- Perea, G., Yang, A., Boyden, E. S., Sur, M. (2014) Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat. Commun.* 5:3262.
- Petzold, A., Valencia, M., Pál, B., Mena-Segovia, J. (2015) Decoding brain state transitions in the pedunculo-pontine nucleus: cooperative phasic and tonic mechanisms. *Front Neural Circuits.* 2015 Oct 31;9:68.
- Pfaffinger, P. J. (1988) Muscarine and t-LHRH suppress M-current by activating an IAP-insensitive G-protein. *J. Neurosci.* 8, 3343–3353
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., Mineur, Y. S. (2012) Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron.* 76(1):116-29.
- Pickel, V. M., Joh, T. H., Plets, D. J. (1977) A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: Demonstration of immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res.* 131, 197-214.

- Pillipson, O. T. (1979) Afferent projections to the central tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus; A horseradish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 117-144.
- Piomelli, D., Astarita, G., Rapaka, R. (2007) A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 743–754.
- Pirttimäki, T., Parri, H. R., Crunelli, V. (2013) Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *J. Physiol.* 591,823–833.
- Rainnie, D. G., Holmes, K. H., Shinnick-Gallagher, P. (1994) Activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors by trans-ACPD hyperpolarizes neurons of the basolateral amygdala. *J Neurosci* 14:7208–7220
- Ralevic, V. (2003) Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 472(1–2):1–21
- Rasooli-Nejad, S., Palygin, O., Lalo, U., Pankratov, Y. (2014) Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca^{2+} -signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369(1654):20140077.
- Redgrave, P., Mitchell, I. J., Dean, P. (1987) Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. *Exp Brain Res.* 68(1):147-67.
- Reiner, P. B., Vincent S. R. (1987) Topographic relations of cholinergic and noradrenergic neurons in the feline pontomesencephalic tegmentum: an immunohistochemical study. *Brain Res. Bull.* 19, 705-714.
- Reyes-Haro, D., Müller, J., Boresch, M., Pivneva, T., Benedetti, B., Scheller, A., et al. (2010). Neuron-astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *J.Gen.Physiol.* 135,583–594.

- 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⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 137:1173–1186.
- Rodriguez, J. J., Mackie, K., Pickel, V. M. (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neuroscience*; 21(3):823–833
- Ros, H., Magill, P. J., Moss, J., Bolam, J. P., Mena-Segovia, J. (2010) Distinct types of non-cholinergic pedunculopontine neurons are differentially modulated during global brain states. *Neuroscience* 170, 78–91.
- Rosenberg, P. A., Knowles, R., Knowles, K. P., Li, Y. (1994) Beta adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J. Neuroscience*; 14(5 Pt 2):2953–2965
- Rusakov, D.A., Kullmann, D.M. (1998) Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J. Neurosci.* 18, 3158–3170.
- Rye, D. B., Saper, C. B., Lee, H. J., Wainer, B. H. (1987) Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: Cytoarchitecture, cytochemistry and some extrapyramidal connections of the pontine tegmentum. *J. Comp. Neurol.* 259, 483-528.
- Rye, D. B., Lee, H. J., Saper, C. B., Wainer, B. H. (1988) Medullary and spinal efferents of the pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J. comp. Neurol.* 269, 315-341.
- 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.
- Safo, P.K., Regehr, W.G. (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron* 48, 647–659.

- Sakai, K., Salvert, D., Touret, M., Jouvet, M. (1972) Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res.* 137, 11-35.
- Sakai, K., El Mansari, M., Jouvet, M. (1990) Inhibition by carbachol microinjections of presumptive cholinergic PGO-on neurons in freely moving cats. *Brain Res* 527: 213–223
- Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M. F., Conrath, M. (2002) Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*;110(4):755-64.
- 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. USA* 109, 20720–20725.
- Saper, C. B., Loewy, A. D. (1982) Projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: Evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res.* 252, 367-372.
- Satoh, K., Fibiger, H. C. (1986) Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: Efferent and afferent connections. *J. Comp. Neurol.* 253, 277-302.
- Schenzer, A., Friedrich, T., Pusch, M., Saftig, P., Jentsch, T. J., Grötzinger, J., Schwake, M. (2005) Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J. Neurosci.* 25, 5051–5060
- Selyanko, A. A., Delmas, P., Hadley, J. K., Tatulian, L., Wood, I. C., Mistry, M., London, B., Brown, D.A. (2002) Dominant-negative subunits reveal potassium channel families that contribute to M-like potassium currents. *J. Neurosci.* 22, RC212; 1–5
- Selyanko, A. A., Brown, D. A. (1996) Intracellular calcium directly inhibits potassium M channels in excised membrane patches from rat sympathetic neurons. *Neuron* 16, 151–162
- Semba, K. (2000) Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav Brain Res* 115: 117–141

- Semba, K., Fibiger, H. C. (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 323(3):387-410.
- Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., Silver, R. A. (2004) Tonically active GABAA receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci.* 27,262–269.doi:10.1016/j.tins.2004.03.005
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., Delmas, P. (2002) Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 544, 29–37
- 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, 6659–6663.
- Simon, C., Kezunovic, N., Ye, M., Hyde, J., Hayar, A., Williams, D. K., Garcia-Rill, E. (2010) Gamma band unit activity and population responses in the pedunculopontine nucleus. *J Neurophysiol* 104:463–474
- Smith, R. S., Weitz, C. J., Araneda, R. C. (2009) Excitatory actions of noradrenaline and metabotropic glutamate receptor activation in granule cells of the accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol* 102(2):1103–1114
- Soni, N., Kohlmeier, K. A. (2016) Endocannabinoid CB1 receptor-mediated rises in Ca(2+) and depolarization-induced suppression of inhibition within the laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Struct Funct.* 221(3):1255-77.
- Soni, N., Satpathy, S., Kohlmeier, K. A. (2014) Neurophysiological evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in the laterodorsal tegmental nucleus. *Eur J Neurosci.* 40(11):3635-52. doi: 10.1111/ejn.12730. Epub 2014 Sep 23.
- 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.

- Spann, B., Grofova, I. (1990) Ultrastructure of cholinergic neurons of the nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *Neurosci. Abstr.* 16, 238.
- Starzl, T. E., Magoun, H. W. (1951) Organization of the diffuse thalamic projection system. *J Neurophysiol* 14: 133–146
- Stella, N. (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*; 48 (4):267–277
- Ster, J., Mateos, J. M., Grewe, B. F., 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 USA* 108(24):9993–9997
- Steriade, M., McCarley, R. W. (2005) *Brain Control of Wakefulness and Sleep*. New York: Plenum
- 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., 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
- Steriade, M. M., McCarley, R. W. (1990a) *Brain control of wakefulness and sleep*. New York, NY: Springer.
- Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G., Curro Dossi, R. (1990b) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10: 2541–2559
- Steriade M, Paré D, Datta S, Oakson G, Curró Dossi R. (1990) Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci.* 10(8):2560-79.

Steriade M, Dossi RC, Paré D, Oakson G. (1991) Fast oscillations (20-40 Hz) in thalamocortical systems and their potentiation by mesopontine cholinergic nuclei in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(10):4396-400.

Sugimoto, T., Hattori, T. (1984) Organization and efferent projections of nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta with special reference to cholinergic aspects. *Neuroscience* 11, 931-946.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1):89–97

Suh, B. C., Horowitz, L. F., Hirdes, W., Mackie, K., Hille, B. (2004) Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by Gq. *J. Gen. Physiol.* 123, 663–683

Suh, B. C., Hille, B. (2002) Recovery from muscarinic modulation of M-current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35, 507–520

Sverdlow, N. R., Koob, G. F. (1987) Lesions of the dorsomedial nucleus of the thalamus, medial prefrontal cortex and pedunculopontine nucleus. Effects on locomotor activity mediated by nucleus accumbens-ventral pallidal pathway. *Brain Res.* 412, 233-243

Szabo, B., Schlicker, E. (2005) Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handbook Exper Pharmacol* (168): 327–65

Szatkowski, M., Barbour, B., Attwell, D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348(6300):443–446

Takakusaki, K., Takahashi, K., Saitoh, K., Harada, H., Okumura, T., Kayama, Y., Koyama, Y. (2005) Orexinergic projections to the cat midbrain mediate alternation of emotional behavioural states from locomotion to cataplexy. *J Physiol* 568:1003–1020.

- Tanimura, A., Uchigashima, M., Yamazaki, M., Uesaka, N., Mikuni, T., Abe, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Kano, M. (2012) Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 12195–12200.
- Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J. F., Gourine, A. V., Kasparov, S., et al. (2014) Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat. Commun.* 5:3284. doi:10.1038/ncomms4284
- Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., et al. (2011) A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71, 995–1013.
- Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F. C., Brown, D. A. (2001) Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anticonvulsant drug retigabine. *J. Neurosci.* 21, 5535–5545
- Tatulian, L., Brown, D. A. (2003) Effect of the KCNQ potassium channel opener retigabine on single KCNQ2/3 channels expressed in CHO cells. *J. Physiol. (Lond.)* 549, 57–63
- Thevathasan, W., Pogosyan, A., Hyam, J. A., Jenkinson, N., Foltynie, T., Limousin, P., et al. (2012) Alpha oscillations in the pedunculopontine nucleus correlate with gait performance in parkinsonism. *Brain* 135, 148–160. doi:10. 1093/brain/awr315
- Tohyama, M., Takatsuji, K. (Eds.) (1998) *Atlas of Neuroactive Substances and Their Receptors in the Rat*, Oxford University Press, New York, pp. 1–337.
- Trettel, J., Levine, E. S. (2003) Endocannabinoids mediate rapid retrograde signaling at interneuron right-arrow pyramidal neuron synapses of the neocortex. *J Neurophysiol.* 89(4):2334-8.

- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., Walker, J. M. (1997) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci* 83(2):393–411
- Tzingounis, A. V., Heidenreich, M., Kharkovets, T., Spitzmaul, G., Jensen, H. S., Nicoll, R. A., Jentsch, T. J. (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, A. V., Nicoll, R. A. (2008) Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(50):19974-9.
- Tzingounis, A. V., Wadiche, J. I. (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 935–947
- Urbano, F. J., Kezunovic, N., Hyde, J., Simon, C., Beck, P., Garcia-Rill, E. (2012) Gamma band activity in the reticular activating system. *Front Neurol.* 3:6. doi: 10.3389/fneur.2012.00006. eCollection 2012.
- Valencia M, Artieda J, Bolam JP, Mena-Segovia J. (2013) Dynamic interaction of spindles and gamma activity during cortical slow oscillations and its modulation by subcortical afferents. *PLoS One*. 8(7):e67540.
- Van der Werf, Y. D., Witter, M. P., Groenewegen, H. J. (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res* 39: 107–140
- Van Dort, C. J., Zachs, D.P., Kenny, J. D., Zheng, S., Goldblum, R. R., Gelwan, N. A., Ramos, D. M., Nolan, M. A., Wang, K., Weng, F. J., Lin, Y., Wilson, M. A., Brown, E. N. (2015) Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(2):584-9. doi: 10.1073/pnas.1423136112. Epub 2014 Dec 29.

- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., Sharkey, K. A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310(5746):329–32
- Verkhratsky, A., Kettenmann, H. (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci.* 19, 346–352
- Verkhratsky, A., Orkand, R. K., Kettenmann, H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78, 99–141
- Verkhratsky, A., Steinhauser, C. (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32, 380–412
- Vertes, R.P. (1980) Brain stem activation of the hippocampus: a role for the magnocellular reticular formation and the MLF. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 50 48–58.
- Vertes, R.P. (1981) An analysis of ascending brain stem system involved in hippocampal synchronization and desynchronization, *J. Neurophysiol.* 46 1140–1159.
- Vilaró, M. T., Palacios, J. M., Mengod, G. (1994) Multiplicity of muscarinic autoreceptor subtypes? Comparison of the distribution of cholinergic cells and cells containing mRNA for five subtypes of muscarinic receptors in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 21(1-2):30-46.
- Vincent, S. R., Reiner, P. B. (1987) The immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the cat brain. *Brain Res. Bull.* 18, 371-415.
- Volterra, A., Meldolesi, J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 626–640
- 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, H.S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B.S., Wymore, R.S., Cohen, I.S., Dixon, J.E., McKinnon, D. (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*. 282:1890–1893.
- Wang, H. L., Morales, M. (2009) Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci*. 29, 340–358.
- Wang, J.; Ueda, N. (2009) Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 89 (3–4): 112–119.
- 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):78
- Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S. H., Davis, R. J. (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 359(2–3):133–6
- 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
- Wilcox, K. S., Grant, S. J. Chgostophe, G. G. (1987) Electrophysiological properties of lateral dorsal tegmental neurons in vitro. *Neurosci. Abstr*. 13, 57.
- Wilson, R. I., Nicoll, R. A. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.
- Woolf, N. J. (1997) A possible role for cholinergic neurons of the basal forebrain and pontomesencephalon in consciousness. *Conscious Cogn*. 6(4):574-96.
- Woolf, N. J., Butcher, L. L. (2011) Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behav Brain Res*. 221(2):488-98.

Woolf, N. J., Butcher, L. L. (1986) Cholinergic systems in the rat brain. III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglion and basal forebrain. *Brain Res. Bull.* 16, 603-637.

Wuttke, T. V., Seeböhm, G., Bail, S., Maljevic, S., Lerche, H. (2005) The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Mol. Pharmacol.* 67, 1009–1017

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiagarajan, M., et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342, 373–377.

Yanovsky, Y., Mades, S., Misgeld, U. (2003) Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra. *Neuroscience.* 122(2):317-28.

Ye, M., Hayar, A., Strotman, B., Garcia-Rill, E. (2010) Cholinergic modulation of fast inhibitory and excitatory transmission to pedunclopontine thalamic projecting neurons. *J Neurophysiol* 2010; 103:2417–2432.

Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S., Ransom, B. R. (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neuroscience*; 23(9):3588–3596

Yoo, S. S., Hu, P. T., Gujar, N., Jolesz, F. A., Walker, M. P. (2007) A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nat. Neurosci.* 10, 385–392.

Yus-Najera, E., Muñoz, A., Salvador, N., Jensen, B. S., Rasmussen, H. B., Defelipe, J., Villarreal, A. (2003) Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation. *Neuroscience* 120, 353–364

Zaika, O., Lara, L. S., Gamper, N., Hilgemann, D. W., Jaffe, D. B., Shapiro, M. S. (2006) Angiotensin II regulates neuronal excitability via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent modulation of Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J Physiol.* 575(Pt 1):49-67.

Zhang, H. Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M., Jin, T., Logothetis, D. E. (2003a) PIP2 activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963–975

Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z.L., Wu, C.P., Poo, M.M., Duan, S. (2003b) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971–982.

Zhou, Y., Danbolt, N. C. (2013) GABA and glutamate transporters in brain. *Front. Endocrinol.* 4:165.

Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., Bonner, T. I. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5780–5785.

Zucker, R.S., Regehr, W. G. (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol.* 64:355-405.



Nyilvántartási szám: DEENK/172/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bordás Csilla
Neptun kód: DRV36B
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, A., **Bordás, C.**, Bíró, T., Hegyi, Z., Antal, M., Szűcs, P., Pál, B.: Direct presynaptic and indirect astrocyte-mediated mechanisms both contribute to endocannabinoid signaling in the pedunculopontine nucleus of mice.
Brain Struct. Funct. 222 (1), 247-266, 2017.
IF: 5.811 (2015)
2. **Bordás, C.**, Kovács, A., Pál, B.: The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell type-specific way in the pedunculopontine nucleus of mice.
Front. Cell. Neurosci. 9, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00121>
IF: 4.609





További közlemények

3. Kovács, A., **Bordás, C.**, Pál, B.: Cholinergic and endocannabinoid neuromodulatory effects overlap on neurons of the pedunclopontine nucleus of mice.
Neuroreport. 26 (5), 273-278, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/doi: 10.1097/WNR.0000000000000342>
IF: 1.343
4. Simándi, Z., Czipa, E., Horváth, A., Kőszeghy, Á., **Bordás, C.**, Póliska, S., Juhász, I., Imre, L., Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., Hutóczki, G., Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B. L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology.
Stem Cells. 33 (3), 726-741, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1894>
IF: 5.902

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,665

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,42

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.07.

