

**Fiziológiás és patológias agyi állapotok  
celluláris és hálózati mechanizmusai**

Doktori értekezés

**Horváth-Furdan Szabina**

Témavezető:

Dr. Lőrincz László Magor

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



2021

Szeged

# **Tartalomjegyzék**

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
<b>Neuronális szinkronizáció.....</b>	<b>7</b>
<b>Talamo-kortiko-talamikus hálózat .....</b>	<b>7</b>
<b>Fiziológiás agyi állapot: alvás-ébrenlét ciklus .....</b>	<b>10</b>
A neuromoduláció szerepe az alvás-ébrenlét szabályozásában .....	11
Szerotonerg rendszer .....	11
A szerotonerg rendszer neuroanatómiája .....	12
A raphé mag heterogenitása .....	13
Szerotonerg rendszer hatása az alvás-ébrenlét ciklusra .....	14
Laterális hipotalamusz.....	14
<b>Patológias agyi állapot: epilepszia .....</b>	<b>16</b>
Absence epilepszia .....	17
HCN csatornák és a hiperpolarizáció által aktivált ionáram .....	19
<b>Célkitűzések.....</b>	<b>22</b>
<b>Közreműködések.....</b>	<b>23</b>
<b>Anyagok és módszerek.....</b>	<b>24</b>
<b>Állatok .....</b>	<b>24</b>
Alkalmazott genetikailag módosított egértörzsek .....	24
Vgat-ires-Cre egértörzs .....	24
GAD67-GFP egértörzs .....	24
Stargazer egértörzs .....	25
<b>Műtét/fertőzés menete.....</b>	<b>25</b>
Alkalmazott vírusok .....	26
AAV2-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP .....	26
AAV2-EF1a-DIO-eYFP.....	26
AAV1-CAG-ChR2-venus-WPRE-SV40 .....	26
AAV1-CAGS-flex-ChR2-tdTomato-WPRE-SV40 .....	26

HCN2 csatorna génjét csendesítő shRNS-t tartalmazó vírus .....	27
<b>Túlélő agyszelet készítése <i>in vitro</i> elektrofiziológiai kísérlethez .....</b>	<b>29</b>
<b><i>In vitro</i> elektrofiziológia .....</b>	<b>29</b>
<b>Farmakológia .....</b>	<b>30</b>
<b><i>In vivo</i> elektrofiziológia és juxtacelluláris jelölés .....</b>	<b>31</b>
<b>EEG regisztrálás és műtéti eljárás .....</b>	<b>32</b>
<b>Perfúzió .....</b>	<b>32</b>
<b>Immunhisztokémia .....</b>	<b>33</b>
<i>In vitro</i> és <i>in vivo</i> méréseink során elvezetett DRM sejtek neurokémiai azonosítása..	33
HCN2 csatornák jelölése csendesítő és kontroll shRNS-el fertőzött agyszövetekben.	33
<b>Adatértékelés .....</b>	<b>34</b>
<b>Statisztikai analízis .....</b>	<b>35</b>
<b>Eredmények.....</b>	<b>36</b>
<b>Fiziológiás agyi állapot: alvás-ébrenlét ciklus .....</b>	<b>36</b>
LH axonok lokális fotostimulációjának hatása a DRM neuronokra <i>in vitro</i> .....	36
A poszt-szinaptikus potenciálok farmakológiai jellemzése és az azokat fogadó sejtek neurokémiai azonosítása .....	38
A LH és a DRM funkcionális kapcsolatának vizsgálata <i>in vivo</i> .....	42
Altatott állatokból végzet egysejt elvezetés és juxtacelluláris jelölés .....	42
Éber, fejrögzített egerekből végzet egysejt elvezetés.....	43
A DRM-be vetítő LH-ből érkező GABAerg projekciók hatásának vizsgálata az alvás-ébrenlét ciklus alatt.....	44
<b>Patofiziológiás agyi állapot: epilepszia .....</b>	<b>46</b>
STG egértörzs absence rohamainak vizsgálata a HCN2 csatorna csendesítését követően .....	46
A HCN2 génjét csendesítő shRNS celluláris hatásának vizsgálata .....	48
Genetikai inaktiváció utáni HCN2 csatorna expresszió vizsgálata .....	50
<b>Megbeszélés .....</b>	<b>52</b>
LH-DRM projekció funkcionális kapcsolatának vizsgálata.....	52
A hiperpolarizáció által aktivált ionáram és az absence rohamok közötti kapcsolat .....	54

<b>Összefoglalás.....</b>	<b>57</b>
<b>Summary.....</b>	<b>58</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>60</b>
<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>61</b>

## Rövidítések jegyzéke

4-AP	4-aminopiridin
5-HT	5-hidroxitriptamin (szerotonin)
AE	absence epilepszia
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
ChR2	channelrhodopsin2
DIC	differenciál interferencia kontraszt
DPP	depolarizáló posztszinaptikus potenciál
DRM	dorzális raphé mag
EEG	elektroencefalogram
EMG	elektromiogram
EPSP	excitatórikus posztszinaptikus potenciál
GABA	gamma-amino-vaajsav
GAD	gamma-amino-vaajsavat szintetizáló glutaminsav dekarboxiláz
GBZ	6-Imino-3-(4-methoxyphenil)-1(6H)-piridazinbután-sav-hidrobromid (gabazin)
GAERS	genetic absence epilepsy rats from strasbourg - strasbourgi, genetikailag AE-ra hajlamos patkány
GFP	green fluorescent protein – zölden fluoreszkáló fehérje
GHB	gamma-Hydroxybutyric-acid – gamma-hidroxi-vaajsav
HCN	hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid által kapuzott
HPP	hiperpolarizáló posztszinaptikus potenciál

I <sub>h</sub>	hiperpolarizáció által aktivált ionáram
IPSP	inhibitorikus posztszinaptikus potenciál
LA	lassú hullámú alvás
LH	laterális hipotalamusz
MCH	melanin-koncentráló hormon
MRM	mediális raphé mag
MW U-teszt	Mann-Whitney U-teszt
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo-[f]quinoxalin-7 szulfonamid
NMDG	N-metil-D-glutamin
nRT	<i>nucleus reticularis thalami</i>
PA	paradox alvás
PPA	páros pulzus arány
PSP	posztszinaptikus potenciál
PSTH	peri stimulus idő-hisztogram
RM	raphé mag
STG	Stargazer
SWD	spike and wave discharge - túske-hullám kisülés
TTX	tetrodotoxin
VB	ventrobazális
Vgat	vezikuláris GABA tarszporter
Vglut	vezikuláris glutamát transzporter
VT	vad típusú
WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo/Rijswijk

## **Bevezetés**

Doktori értekezésemben kettő kutatási témával foglalkozom: mind fiziológiás (alvás-ébrenlét ciklus) mind pedig patológiás (epilepszia) agyi állapotok celluláris és hálózati mechanizmusainak feltárásával.

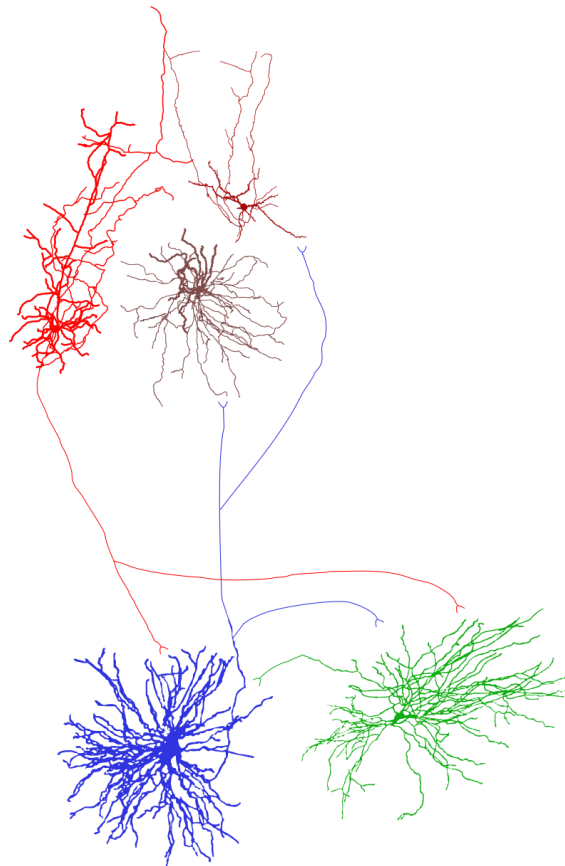
## **Neuronális szinkronizáció**

A neuronális működés egyik legfontosabb feladata a különböző eredetű szignálok temporális doménben történő rendszerezése, amelynek egyik formája a ritmikus neuronális aktivitás, ami egyedi sejtek, lokális neuronhálózatok vagy akár távoli idegsejtek működését is befolyásolhatja. A szinkron aktivitás rendkívül hatékony stratégia különböző rendszerek esetén (Néda és mtsai., 2000). A ritmikus neuronális aktivitás alapjai egyrészt a neuronok intrinszik konduktanciái, másrészt a hálózat különböző komponenseinek szinkronizált működése. Szinkronizált oszcillációk kísérik a különböző szenzoros modalitásokból származó információk feldolgozását, a motoros válasz megtervezését és kivitelezését, különböző kognitív funkciókat és patológiás működéseket. Az oszcillációk mintázatát és domináns frekvenciáit specifikus mechanizmusok és az agy funkcionális állapota határozza meg (McGinley és mtsai., 2015). A legszembetűnőbb agyi állapot változás az alvás-ébrenlét átmenetnél figyelhető meg, mélyalvás során kis frekvenciájú, nagy amplitúdójú elektroencefalogram (EEG) aktivitás detektálható, amely alapja a neuronok szinkron működése, így ezt az agyi állapotot szinkronizált állapotnak is nevezzük. Bizonyos patológiás esetekben, mint például az epilepszia, hiperszinkron agyi állapotok alakulhatnak ki, amelyek tudatvesztéssel is járhatnak. A deszinkronizált állapotot, amely intenzívebb agyi aktivitáskor (ébrenlét) detektálható, nagy frekvenciájú, kis amplitúdójú EEG hullámok jellemzik (Lee és Dan, 2012). A különböző fiziológiás és patológiás szinkronizációk nagy része a talamo-kortiko-talamikus hálózatban keletkezik (Crunelli és mtsai., 2018), azonban ezeket számos kéreg alatti régióból, mint például az agytörzsből és a hipotalamuszból érkező bemenetek finomhangolják, ritmikus oszcillációkat eredményezve (Lőrincz és Adamantidis, 2017).

## **Talamo-kortiko-talamikus hálózat**

A talamusz agyunk legfontosabb relé állomása, amely reciprok kapcsolatban áll az agykéreggel, kialakítva így a talamo-kortiko-talamikus hálózatot. A rendszer épsége minden magasabb rendű

idegi működés alapvető feltétele. A thalamusz területe számos sejtcsoportra (magra) osztható fel. A szaglász kivételével minden perifériáról érkező szenzoros információ a primer szenzoros relémagok thalamokortikális neuronjaitól az illető szenzoros modalitás primer kérgi területére vetül. Ezek a serkentő projekciók dominánsan a granuláris réteg tüskés csillagsejtjein, piramissejtjein és kosársejtjein végződnek (1. ábra). Az infragranuláris kortiko-thalamikus serkentő projekciók által a kérgi információ visszajut a thalamuszba (Guillery és Sherman, 2002, Cruikshank és mtsai., 2007).



**1. ábra: A thalamo-kortiko-thalamikus hálózatot alkotó idegsejtek.** A kéreg területén elhelyezkedő serkentő kortiko-thalamikus piramis sejt (piros), csillagsejt (bordó) és a gátló kosársejt (barna), valamint a thalamusz területén található serkentő thalamokortikális relé sejt (kék) és a gátló *nucleus reticularis thalami* sejt (zöld) a thalamo-kortiko-thalamikus hálózat esszenciális alkotó elemei (Crunelli és mtsai., 2020).

A thalamo-kortiko-thalamikus hálózat egyik fő sejtípusa a glutamáterg thalamokortikális relé sejt. A primer szenzoros thalamusz thalamokortikális relé sejtjei serkentő bemenetet kapnak a szenzoros perifériáról, illetve különböző agykérgi területekről, gátló bemeneteik pedig elsősorban a thalamuszt hagymahéjszerűen körülvevő *nucleus reticularis thalami*-ból (nRT) erednek. Az nRT sejtek szintén kulcs elemei a thalamo-kortiko-thalamikus hálózatnak.



Axonkollaterálisok által serkentő bemenetet kapnak mind a talamokortikális relé, mind a kortiko-talamikus neuronoktól. A talamokortikális relé sejtektől eltérően, az nRT neuronjai nem vetítenek a kéregbe, csupán a talamokortikális relé sejtekhez küldenek gátló bemeneteket (Cox és mtsai., 1997). Ez a reciprok serkentés és gátlás, illetve a talamo-kortiko-talamikus hálózatot alkotó sejtek intrinszik tulajdonságai teszik lehetővé, hogy a serkentő és a gátló ciklusok ritmikusan váltakozzanak, ami a különböző talamo-kortiko-talamikus oszcillációk létrejöttének kedvez (Crunelli és mtsai., 2020). Mind a talamokortikális relé, mind az nRT sejteknek két membránpotenciál függő tüzelési módja ismert: fokozott membrán polarizációra ( $<-60$  mV) a kisüléssorozatos tüzelés, mérsékelt membrán polarizációra ( $>-60$  mV) a tónusos tüzelés jellemző (McCormick és Bal, 1997). A talamikus neuronok membránpotenciálja állapotfüggő. Ébrenlétre és paradox alvásra (PA) mérsékelt membrán polarizáció és ennek következtében tónusos tüzelés, lassú hullámú alvásra (LA) hiperpolarizált membrán és kisüléssorozatos tüzelés jellemző (Hirsch és mtsai., 1983, Urbain és mtsai., 2019). Az agyi állapotok a neuromodulátor rendszerek (noradrenerg, hisztaminerg, szerotonerg, kolinerg) által befolyásolják a talamokortikális relé és nRT neuronok membránpotenciálját és ezáltal tüzelési módjukat (Bal és McCormick, 1993). A kisüléssorozatos tüzelés alapját az alacsony küszöbű T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornákon beáramló  $Ca^{2+}$  ionok általi membrán depolarizáció alkotja, amely nagy frekvenciájú  $Na^{+}$  akciós potenciál sorozatot is okozhat. A membrán polaritásának csökkenése következtében a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák inaktíválnak és a megnyílt  $K^{+}$  csatornák a membránt repolarizálják. Hiperpolarizált membránpotenciál értékek mellett a talamokortikális relé sejtek HCN csatornái megnyílnak. A csatornákon beáramló kationok által kialakított hiperpolarizáció által aktivált ionáram ( $I_h$ ) hatására a membrán hiperpolarizációja csökken, ami a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák nyitásához vezet. Az nRT sejtek esetében a  $Na^{+}$  akciós potenciál sorozat lecsengését követően egy  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^{+}$  áram indukálja a hiperpolarizációt. Ezekre a sejtekre nem jellemző az  $I_h$  jelenléte (Bal és McCormick, 1993, Pape, 1996). A felsorolt ionáramok közötti interakció ritmikusan ismétlődő kisüléssorozatos tüzelési mintázatot eredményez (Leresche és mtsai., 1990). A HCN csatornák vagy a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák farmakológiai blokkolása a ritmikus oszcillációt megállítja, bizonyítva így a sejtek intrinszik tulajdonságainak ritmikus oszcillációk kialakításában és fenntartásában betöltött nélkülözhetetlen szerepét (Luthi és McCormick, 1998a).

## **Fiziológiás agyi állapot: alvás-ébrenlét ciklus**

Az alvás életünk jelentős részét kitöltő, látszólag nem produktív agyi állapot. Azonban a nem megfelelő minőségű vagy mennyiségű alvás kognitív teljesítményünket rontja és a hosszú távú alváshiány egészségügyi problémához vezethet, mint például szív és érrendszeri megbetegedések, elhízás és egyes neurológia betegségek (Alzheimer kór, Parkinson kór) (Weber és Dan, 2016, Mander és mtsai., 2017). Az agyi állapotok közötti különbség ébrenlét és alvás között a legegységesebb (Zagha és McCormick, 2014). Ébrenlét alatt, nagy frekvenciájú, alacsony amplitúdójú alfa hullám (8–15 Hz) és béta (15-30 Hz) EEG hullámok figyelhetőek meg. A szendregés alatt theta hullámok (4-7 Hz), az elalvást követően 14-16 Hz frekvenciájú alvási orsó, illetve az LA mély fázisaiban (LA2-LA3) nagyobb amplitúdójú, kisebb frekvenciájú (0,5-4,5 Hz) lassú és delta hullámok regisztrálhatók az EEG-on. A nagy amplitúdójú lassú hullámok okozója az idegsejtek szinkron aktivitása. A kérgi és talamikus neuronok aktivitása ilyenkor aktív (depolarizált) és inaktív (hiperpolarizált) állapotok között oszcillál (Steriade és mtsai., 1993a, Steriade és mtsai., 1993b, Steriade és mtsai., 1993c). Depolarizált állapotban a kérgi és talamokortikális relé sejtekben intenzív szinaptikus aktivitás és az éber állapotra jellemző, fokozott akciós potenciál leadás figyelhető meg, míg a hiperpolarizált állapot jellemzője a neuronális aktivitás hiánya. A lassú oszcillációból az aktivált állapotba való átmenetet a kérgi, a talamokortikális és az nRT neuronok együttesen szabályozzák. LA alatt az izomtónus csökken, de nem szűnik meg (Siegel, 2004, Gent és mtsai., 2018). A PA szakaszára az ébrenlét alatt megfigyelt deszinkronizált EEG jellemző, azonban az erős motoros gátlás következtében az izomtónus hiánya figyelhető meg az elektromiogram (EMG) felvételeken (Brown és mtsai., 2012). Láthatjuk, hogy az alvás valójában egy olyan dinamikus állapot, amely az LA különböző szakaszai és a paradox alvások közötti gyors átmenetektől tevődik össze. Az elmúlt időszakban megjelent számos új technológiai innováció, mint például az optogenetika (Boyden és mtsai., 2005),  $Ca^{2+}$  indikátorokon alapuló képalkotó módszerek (Gobel és Helmchen, 2007) és a virális vektorokkal való jelölés (Lanciego és Wouterlood, 2020) lehetővé tette az alvás-ébrenlét sejt szintű mechanizmusainak vizsgálatát (Weber és Dan, 2016). Jól ismert, hogy az alvás fázisai, illetve az alvás és ébrenlét állapot közötti átmenetek mechanizmusai nagyon összetettek, kevésbé feltártak (Brown és mtsai., 2012). Az agyi állapotok mechanisztikus feltárásának fő akadály a résztvevő sejtes elemek heterogenitása, amelyek szelektív vizsgálatát tovább nehezíti, hogy az elalvást és az ébrenlétet facilitáló idegsejtek gyakran azonos agyi régiókban találhatóak (Weber és Dan, 2016). Továbbá egyre több, egymással kölcsönhatásban lévő agyi területről és azok neuromodulátoros

rendszeréről fedezik fel, hogy dinamikus interakciójuk szabályozza az agyi állapotok változását (Lőrincz és Adamantidis, 2017).

### **A neuromoduláció szerepe az alvás-ébrenlét szabályozásában**

A különböző magatartási állapotok alatt számos agyi régió belül módosul a neuronok aktivitása, azonban a legfeltűnőbb változások az alvás-ébrenlét fázisai során figyelhetők meg. Az állapotok közötti átmenet létfontosságú, ennek neuronális kontrollja a neuromodulátor (kolinerg, noradrenerg, szerotonerg és hisztaminerg) rendszerek egyik fő feladata (Lee és Dan, 2012). Az 1930-as években Frederic Bremer macskák agytörzsi léziós kísérletének eredményei mérföldkövet jelentettek az alvás-ébrenlét ciklus kutatásában. Kísérleteiben a középagy átmetszése az alváshoz hasonló állapotot váltott ki, ezért feltételezte, hogy az éber állapotért felelős agyi struktúra a nyúltvelő és a középagy közötti területen helyezkedik el (Kerkhofs és Lavie, 2000). 1949-ben Giuseppe Moruzzi és Horace Magoun a híd és a középagy határán talált rá arra a területre, amely fokozza az éber állapotot. A terület stimulációja az előagyban ébrenlétre jellemző EEG deszinkronizációt eredményezett, míg eltávolítása folyamatos alvásszerű állapotot idézett elő. A terület a felszálló retikuláris aktiváló rendszer elnevezést kapta (Moruzzi és Magoun, 1949).

A szerotonin alvásszabályozásban játszott szerepére az 1900-évek közepén, macskákon végzett kísérletek hívták fel a figyelmet. Egyes kísérletek a szerotonin hipnogén hatását bizonyították. A vizsgálatok során a macskák intraventriculáris szerotonin (5-hidroxitriptamin; 5-HT) injekcióra alvástöbblettel reagáltak (Koella és Czicman, 1966). Ugyanakkor, a szerotonin szintézist gátló p-klorofenilalanin beadását és a raphé magok (RM) lézióját álmatlanság követte (Jouvet, 1969). Ezek a mérföldkövek alapozták meg az alvás-ébrenlét ciklus szabályzásának és az abban résztvevő neuromodulátorok szerepének feltérképezését.

### **Szerotonerg rendszer**

A szerotonerg rendszer egy evolúciósan konzervált, komplex neuromodulátor rendszer, amely közel az összes agyi régióba projektál. Az 5-HT az agytörzsben lévő RM-ban elhelyezkedő szerotonerg neuronok axon terminálisaiból szabadul fel és számos agyi funkciót befolyásol. Az alvás-ébrenlét szabályzásában betöltött szerepe mellett az 5-HT részt vesz az egyes szenzoros, motoros és kognitív funkciók finomhangolásában, diszfunkciója viszont olyan kóros állapotokkal hozható összefüggésbe, mint például schizofrénia, depresszió, autizmus, szorongás (Jacobs és Azmitia, 1992, Monti, 2011). Korábbi farmakológiai tanulmányok a szerotonerg rendszer órás-napos időskálán történő moduláló funkciójára fókuszáltak, újabban

a rendszer tranziens aktivitásának hatásait is vizsgálják optogenetikai, fiziológiai és magatartás vizsgálatok kombinációjával (Ranade és Mainen, 2009, Nakamura és Wong-Lin, 2014, Lottem és mtsai., 2016).

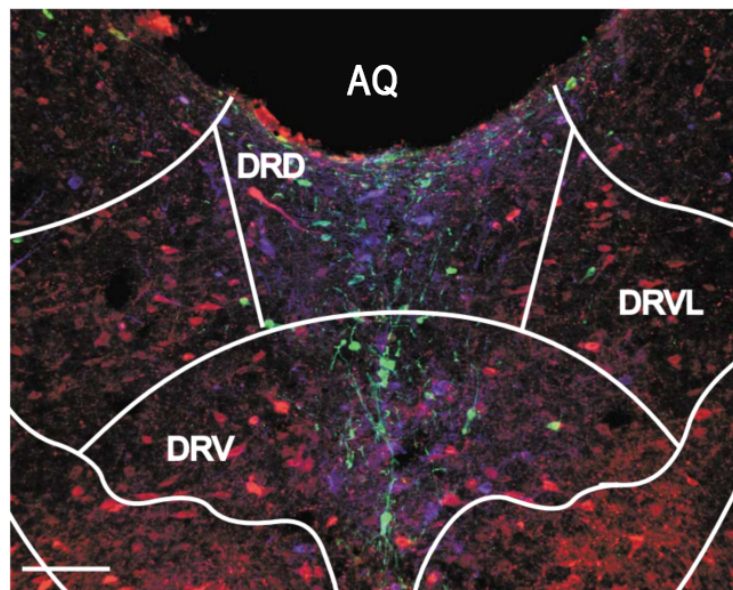
### **A szerotonerg rendszer neuroanatómiája**

A RM szerotonerg sejttestei az agytörzs középvonalában szuperior (felszálló) és inferior (leszálló) csoportra különülve helyezkednek el. Hagyományos osztályozás szerint B1-B9 magcsoportokat különböztethetünk meg (Steinbusch, 1981). A nyúltvelő területén elhelyezkedő inferior csoport neuronjai (B1-B4) a nyúltvelő területeire illetve a gerincvelőbe projektálnak, ezáltal a fájdalom, termoreguláció, kardiovaszkuláris szabályzás és a légzés koordinálásában vesznek részt. A szuperior idegsejt csoport a híd és a középagy területéről az előagyba küldi axonjait, ahol az alvás-ébrenlét, a hangulat és különböző kognitív funkciók szabályzásához járul hozzá (Jacobs és Azmitia, 1992).

A RM neuronjai rendkívüli módon kiterjedt hálózatot építenek ki mind rostrális mind pedig kaudális irányba. Projekciókat küldenek a laterális hipotalamusz (LH), a talamusz, az amygdala, a striátum, a szeptum, a hippokampusz és a kéreg számos területe felé (Vertes és Kocsis, 1994). A RM afferensei több forrásból származnak: a vestibuláris mag kolinerg sejtjeiből, a dorzális nyúltvelő adrenalint termelő sejtjeiből, a *locus coeruleus* noradrenerg sejtjeiből, a *substantia nigra* és a ventrális tegmentális terület dopaminerg neuronjaiból, a periaqueductális szürkeállomány peptiderg sejtjeiből és a laterális habenula glutamaterg sejtjeiből egyaránt érkeznek afferens bemenetek a mediális raphé mag (MRM) és a dorzális raphé mag (DRM) területére (Jacobs és Azmitia, 1992). Sert-Cre és GAD2-Cre egértörzsek retrográd transz-szinaptikus vírussal való fertőzése lehetővé tette a magcsoporton belül elhelyezkedő két fő sejtcsoport (5-HT-t, gamma-amino-vajsavat (GABA) szintetizáló) preszinaptikus partnereinek azonosítását. Bizonyították, hogy mind a szerotonerg, mind a GABAerg neuronok fő preszinaptikus partnerei a LH, a habenula, az amygdala és a prefrontális kéreg. Azonban a DRM szerotonerg neuronjaira jelentősebb számú kérgi bemenet érkezik, mint a DRM GABAerg neuronjaira. A fertőzést követően a LH-ban különösen sok jelölt neuront mutattak ki. DRM fertőzés után hozzávetőleg dupla annyi sejt jelölődött a LH-ban, mint amikor a fertőzést a MRM-ban végezték (Weissbourd és mtsai., 2014). További vizsgálatok azt bizonyították, hogy a LH területéről DRM-ba vetítő idegsejtek jelentős része GABAerg interneuron (Gervasoni és mtsai., 2000), amely alapján valószínű, hogy a DRM-ba projektáló LH GABAerg neuronok aktivitása jelentős hatással van a DRM funkcióira.

## A raphé mag heterogenitása

Kombinált fiziológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a DRM és MRM területén található idegsejteket nagymértékű heterogenitás jellemzi (Allers és Sharp, 2003, Sos és mtsai., 2017). A DRM laterális régiójában elhelyezkedő gyors tüzelésű neuronok többsége magas spontán tüzelési frekvenciával (>12 Hz) jellemezhető és gamma-aminovajsavat szintetizáló glutaminsav dekarboxiláz (GAD) immunreaktívak. A regisztrált neuronok másik csoportjára alacsony spontán aktivitás, illetve 5-HT és/vagy triptofán-hidroxiláz immunreaktivitás jellemző (Jacobs és Azmitia, 1992, Li és mtsai., 2001). További kísérletek hármas immunjelölés alkalmazásával (szerotonin, GAD, tirozin-hidroxiláz) kimutatták, hogy a különböző neurokémiai identitású neuronok eltérően oszlanak el a RM-on belül (2. ábra). A tirozin-hidroxiláz pozitív neuronok leginkább az *aqueductus cerebri* alatt helyezkednek el, a GAD pozitív sejtek főleg a RM laterális részén találhatók, míg a szerotonin pozitív sejtek a RM középvonalában lokalizálódnak (2. ábra) (Allers és Sharp, 2003).



**2. ábra:** A raphé mag heterogenitása. A különböző neurokémiai identitású neuronok eltérően oszlanak el a RM-en belül (szerotonerg-kék, dopaminerg-zöld, GABAerg-piros) (Allers és Sharp, 2003).

A RM-on belül a GABA-n és 5-HT-on kívül más neurotranszmitterek jelenlétét is bizonyították az utóbbi években, mint például glutamát és egyéb peptid transzmitterek. A RM rostrális része dopaminerg neuronokat a DRM kaudális és rostrális része neuropeptidY-t termelő neuronokat tartalmaz. Az RM legkaudálisabb részében találhatóak aolecisztokinint termelő neuronok (Huang és mtsai., 2019). Az MRM-ban található 5-HT pozitív sejtek egy részében Vglut3 expresszió is megfigyelhető (Sos és mtsai., 2017). A heterogenitást tovább fokozza, hogy e

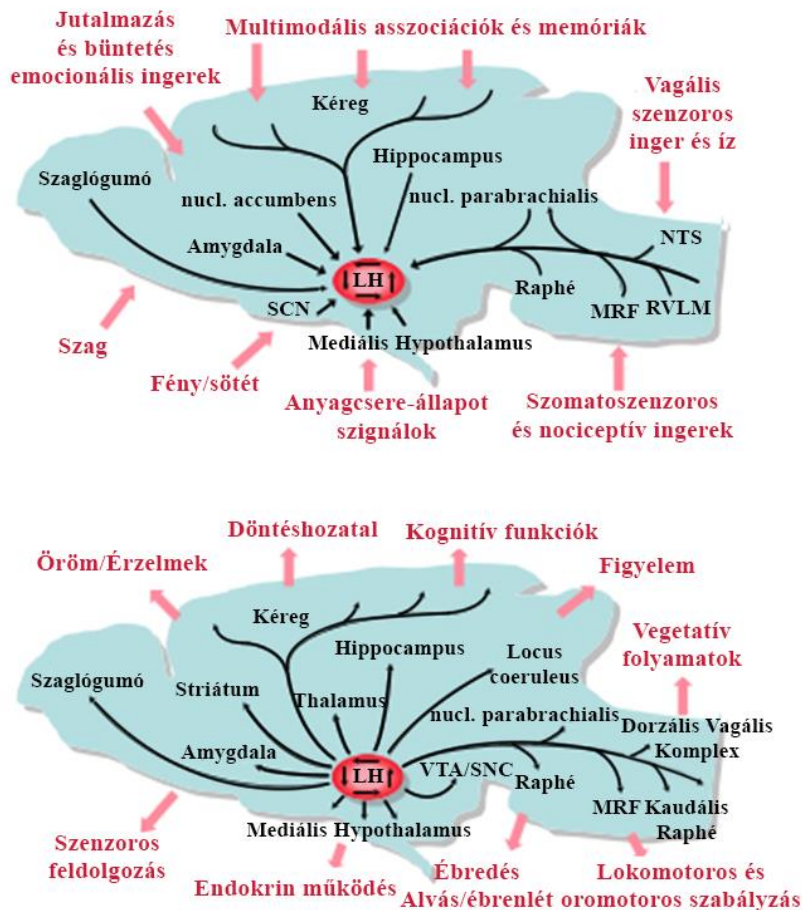
sejttípusok önmagukban is heterogenitást mutathatnak bemeneteik, kimeneteik, receptor expressziójuk, illetve fiziológiai tulajdonságaik tekintetében.

### **Szerotonerg rendszer hatása az alvás-ébrenlét ciklusra**

A többi neuromodulátor rendszertől eltérően, amelyekről bebizonyosodott, hogy ébresztő hatásúak (kolinerg, orexinerg, hisztaminerg, dopaminerg, noradrenerg); (Lőrincz és Adamantidis, 2017), a DRM szerotonerg neuronjainak alvás-ébrenlét ciklus szabályzásában betöltött szerepéről ellentmondásos kísérleti eredmények születtek. Korai tanulmányok eredményei alapján az 5-HT hipnogén hatású (Torda, 1967, Jouvet, 1969, Idzikowski és mtsai., 1986), azonban az elektrofiziológiai tanulmányok leírták, hogy a vélhetően szerotonerg neuronok aktivitása az ébrenlét alatt a legmagasabb, az LA alvás alatt csökken és PA alatt szinte teljesen megszűnik (Trulson és Jacobs, 1979). Ennek megfelelően az előagyi 5-HT extracelluláris koncentrációja ébrenlét alatt a legkifejezettebb (Portas és mtsai., 2000). Az 5-HT<sub>2</sub> receptorok aktiválása kísérleti állatokban ébrenlétet (Portas és mtsai., 2000, Monti, 2011), emberekben alvást váltott ki (Idzikowski és mtsai., 1986). További farmakológiai vizsgálatok szerint az 5-HT szint csökkenése akár insomniát is eredményezhet (Murray és mtsai., 2015). A szelektív szerotonin visszavételt gátló antidepresszánsok megjelenése és vizsgálatuk alátámasztotta, hogy a szerotonin-transzmisszió fokozása nem hipnogén, hanem ébresztő hatású és gátló hatással van a PA-ra (Wilson és Argyropoulos, 2005). Érdekes módon, még az újabb kutatások eredményeiben is találunk ellentmondásokat. Az 5-HT neuronok optogenetikai stimulációja egyes esetekben ébredést idézett elő és csökkentette az alvással töltött időt (Ito és mtsai., 2013), míg más vizsgálatok szerint hipnogén hatású volt (Oikonomou és mtsai., 2019). A részben egymásnak ellentmondó eredmények oka a DRM és MRM heterogén sejttípusai, illetve az alkalmazott stimulációs protokollok közötti különbségekben keresendő.

### **Laterális hipotalamusz**

A LH és DRM közötti kölcsönös anatómiai kapcsolat ismert (Weissbourd és mtsai., 2014), azonban ennek funkcionális jelentősége még nem tisztázott. A LH nagy kiterjedésű, neurokémiai heterogén struktúra, amely több, jól megkülönböztethető magból épül fel és számos folyamat szabályzásában vesz részt (3. ábra). Jelentős szerepet tölt be az alvás-ébrenlét ciklus szabályzásában, részt vesz az emóciók szabályzásában, a célorientált magatartásokban, mint például evés, ivás, agresszió és bizonyos kognitív funkciók szabályzásához is hozzájárul (Saper és mtsai., 2010, Stuber és Wise, 2016, Weber és Dan, 2016).



**3. ábra:** A laterális hipotalamusz kapcsolatrendszere. Sematikus kép a LH fő bemeneteiről (fent) és kimeneteiről (lent) (Berthoud és Munzberg, 2011).

A LH-on belül két olyan neuropeptidet szintetizáló sejtpopuláció is található, amelyeknek jelentős szerepük van az alvás-ébredés ciklus szabályzásában. Az egyik ilyen populációt az orexint (orexin-A és orexin-B, más néven hipokretin 1 és 2) termelő idegsejtek alkotják (Berthoud és Munzberg, 2011). Egyes orexint szintetizáló idegsejtek axon terminálisaiban orexin és Vglut ko-lokalizáció figyelhető meg. Azonban génexpressziós vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a glutamát termelés mellett bizonyos orexint termelő idegsejtekben a gátló neurotranszmitter, GABA felszabadulása is tetten érhető (Bonnavion és mtsai., 2016). Ezek a sejtek az agy számos területére projektálnak, mint például a kéregbe, az agytörzsbe és a bazális előagyba, valamint az alvás-ébredés ciklus szabályozása szempontjából fontos monoaminerg, elsősorban a *nucleus tuberomammillaris* hisztaminerg és a *locus coeruleus* noradrenerg sejtjeihez. Csekélyebb számú innervációjuk a thalamusz területén is megfigyelhető. Számos olyan területről fogadnak bemeneteket, amelyek részei a felszálló aktiváló rendszernek, mint például a *locus coeruleus*, DRM és a parabrachiális mag (Yoshida és mtsai., 2006). Ébredés alatti aktivitásuk kifejezett. Jelentős szerepük van az alvásból ébredési állapotba történő

átmenet szabályzásában. Optogenetikai módszerekkel történő szelektív aktivációjuk alvó egerek spontán ébredését eredményezi (Adamantidis és mtsai., 2007), továbbá genetikai csendesítésük alvászavart, narkolepsiát idéz elő (Hara és mtsai., 2001).

A LH-ban található másik jelentős sejtpopulációt a melanin-koncentráló hormont (MCH) expresszáló sejtek alkotják. Efferens és afferens kapcsolataik nagyrészt megegyeznek az orexint termelő sejtekével. Az MCH idegsejtekre általában úgy tekintünk, mint a LH GABAerg sejtjeire, hiszen immunpozitívak GAD65-re és GAD67-re, amelyek a GABA szintézis kulcs elemei. Optogenetikai aktivációjuk pedig gátló hatást fejt ki a *nucleus tuberomamillaris* hisztaminerg sejtjein (Jones és Hassani, 2013, Bonnavion és mtsai., 2016). Az orexinerg sejtekkel ellentétben a PA és LA folyamatában játszanak fontos szerepet. Verret és munkatársai kimutatták, hogy az MCH intracerebroventrikuláris adagolása koncentráció-függő módon növeli a vizsgált patkányok PA időtartamát (Verret és mtsai., 2003). Az MCH neuronok optogenetikai stimulációja rávilágított arra, hogy mind a LA mind a PA kialakulásában szerepük van, továbbá aktivitásuk a PA időtartamát növeli. Mindemellett, a MCH sejtek csendesítése következtében a PA théta hullámainak amplitúdója és frekvenciája csökkent (Jego és mtsai., 2013). Az MCH neuronok aktivitása alvás alatt emelkedett és tüzelési frekvenciájuk maximuma PA alatt detektálható, míg ébrenlét alatt aktivitásuk lecsökken (Hassani és mtsai., 2009b).

Az orexint és MCH-t szintetizáló neuronok mellett a LH-ban található vezikuláris GABA tarszportert ( $V_{gat}$ ) expresszáló idegsejtekről ( $LH_{V_{gat}}$ ) is bebizonyosodott, hogy fontos szabályzó funkciót töltenek be az alvás-ébrenlét ciklus során. Az  $LH_{V_{gat}}$  idegsejtek specifikus ingerlése megnövelte az ébrenlét időtartamát, valamint nRT sejtek gátlása által ébredést eredményezett LA-ból (Herrera és mtsai., 2016). Az  $LH_{V_{gat}}$  sejtek szelektív csendesítése hipnogén hatású, alátámasztva így korábbi kutatások eredményét, miszerint a  $LH_{V_{gat}}$  idegsejtek hozzájárulnak az ébrenlét fenntartásához (Venner és mtsai., 2019). Az  $LH_{V_{gat}}$  sejtek nyúlványainak *locus coeruleus* területén történő optogenetikai stimulációja LA-ból és PA-ból egyaránt ébredést eredményez (Herrera és mtsai., 2016). Az  $LH_{V_{gat}}$  idegsejtek funkcionális kapcsolata egyéb agytörzsi neuromodulátor rendszerekkel nem ismert.

## **Patológiás agyi állapot: epilepszia**

Az epilepszia a második leggyakoribb neurológiai kór. Fő tünete a betegek életminőségét alapvetően meghatározó epilepsziás roham. Epilepsziás megbetegedésről akkor beszélünk, ha



a betegnek legalább egy olyan rohama zajlott, ami összefüggésbe hozható az idegrendszer olyan tartós elváltozásával, amelyről feltételezhető, hogy az további rohamokat idéz elő (Fisher és mtsai., 2005). A Nemzetközi Epilepsziaellenes Liga alapvető célja a rohamok több szempontból történő precíz osztályozása elektrográfias, képalkotó és genetikai vizsgálatok alapján (Pack, 2019). Az epilepsziás rohamokat két fő csoportra osztják:

1. Fokális (parciális) rohamok gócpontjai jól detektálhatóak és lehetnek egyszerűek vagy összetettek, attól függően, hogy tudatzavar is társul-e a rohamhoz. Az egyszerű fokális roham esetében nem figyelhető meg tudatvesztés, azonban a komplex (másodlagosan generalizált) rohamok tudatvesztéssel járnak.

2. Generalizált rohamok estében mindkét agyfélteke érintett. A roham egyszerre indul mindkét oldalon, majd az agy további területeire is kiterjed. Az összes altípusára (absence rohamok, mioklonusos rohamok, atóniás rohamok, tónusos-klónusos rohamok) jellemző a tudatvesztés (Scheffer és mtsai., 2017, Falco-Walter és mtsai., 2018).

### **Absence epilepszia**

Az absence epilepszia (AE) a leggyakoribb epilepszia típus gyerekkorban, amely a generalizált epilepsziák csoportjába sorolható (Chung és mtsai., 2009). Fő tünetei a hirtelen fellépő és rövid ideig tartó tudatvesztés, pillanatnyi cselekvésképtelenség, illetve az EEG regisztrátumon jelentkező 2,5-4 Hz-es túske-hullám kisülés (az angol spike and wave discharge elnevezéséből származó rövidítés: SWD, (Guilhoto, 2017)). A spontán absence rohamok mind emberben mind genetikai állatmodellekben a megváltozott talamo-kortiko-talamikus hálózati működésre vezethetők vissza. Az AE állatmodelljeiben, az SWD túske szakaszaiban a szomatoszenzoros kéreg infragranuláris piramis sejtjeire ritmikus szinkron aktivitás jellemző, azonban a hullám során aktivitásuk lecsökken (Polack és mtsai., 2007). Annak ellenére, hogy a ventrobazális (VB) talamusz szerepét a roham kialakulásában számos tanulmány igazolja (Moeller és mtsai., 2008, Tenney és mtsai., 2013) jelenleg nincs pontos egyetértés abban, hogy mely kérgi és talamikus régiók (vagy esetleg más agyi területek) döntő jelentőségűek az SWD generalizálódása szempontjából (Crunelli és mtsai., 2020).

A gyermekkori AE 3-10 éves, míg a serdülőkori 10-13 éves korosztályra jellemző. A gyermekkori AE a lány gyermekek körében gyakoribb és naponta több, akár 200 roham/nap figyelhető meg, azonban egyéb patológiai elváltozás hiányában a betegek kb. 70%-nál felnőttkorra a rohamok gyakorisága lecsökken (Crunelli és Leresche, 2002, Pack, 2019). Annak ellenére, hogy általában benignusnak vélték, az absence rohamok tanulási nehézségekkel és

egyéb magatartászavarokkal társulhatnak (Crunelli és mtsai., 2020). Mindemellett az érintettek nagyobb valószínűséggel válnak tónusos-klónusos epilepsziás betegekkel (Caplan és mtsai., 2008, Vega és mtsai., 2011). Az AE betegek 30%-a nem lesz rohammentes etosuximid, valproát vagy lamotrigin gyógyszeres monoterápiára (Glauser és mtsai., 2013). A hatásosabb gyógyszeres kezelések kidolgozásának előfeltétele az AE létrejöttének sejtes és hálózati mechanizmusainak feltárása. A jelenlegi tudományos vélemény az, hogy a gyermekkori AE egy komplex genotípusú familiáris betegség, hiszen az esetek jelentős részénél a családi anamnézisben szerepel. Kevésbé ismert azonban, hogy pontosan milyen faktorok játszanak szerepet az absence roham alatt megfigyelhető SWD kialakulásában (Verrotti és mtsai., 2017). Az elmúlt években egyre több kutatás fókuszává vált a különböző feszültség-függő ioncsatornákat és a hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid által kapuzott (HCN) csatornákat kódoló gének diszfunkciója (Ludwig és mtsai., 2003, Zamponi és mtsai., 2015).

AE betegeknel a rohamra jellemző SWD-ok nyugodt ébrenlét és szendergés során jelennek meg a talamo-kortiko-talamikus hálózat oszcillációiban (Blumenfeld, 2005). Azonban az, hogy a kérgi vagy a talamikus területeknek van jelentősebb szerepe az SWD kialakulásában és generalizálásában, a mai napig vitatott. Polack és munkatársai az AE egyik állatmodelljében, az úgynevezett strasbourgi, genetikailag AE-ra hajlamos patkányokon (**genetic absence epilepsy rats from Strasbourg, GAERS**) végzett kísérletei során egy másodpercnél rövidebb kis amplitúdójú SWD-kat figyeltek meg a szomatoszenzoros kéreg területén, azonban ezt nem kísérte talamikus aktivitásváltozás. Ez arra enged következtetni, hogy azok a talamikus régió(k) felelnek a rohamok generalizálásáért, amelyekre a szomatoszenzoros kéregből nagyszámú bemenet érkezik (Polack és mtsai., 2007). Nem csak a kritikus területek, de az absence roham celluláris mechanizmusainak esetében is ellentétes nézetek uralkodnak, amelyek gyakran az eltérő kísérleti felállás eredményeinek interpretációjából fakadnak. A korai, agyszeleteken végzett kísérletek, amelyekben többnyire farmakológiai módon váltottak ki absence rohamokra jellemző kisülési tüzelési mintázatot, azt sugallták, hogy a glutamaterg talamokortikális relé sejtekre és a GABA-t szintetizáló, gátló nRT sejtekre minden egyes SWD ciklus alatt a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák által mediált kisüléssorozat tüzelési mintázat jellemző (von Krosigk és mtsai., 1993, Bal és mtsai., 1995). Elméletük alapján a talamokortikális relé és nRT sejtek hiperserkenthetősége lehet a kulcs elem az absence roham alatti SWD-ok kialakulásában (von Krosigk és mtsai., 1993, Bal és mtsai., 1995). Altatott GAERS patkányok absence rohamai alatt, az nRT és kérgi neuronok (szabályosan tüzelő piramis sejtek, kosársejtek) erőteljes nagy frekvenciás tüzelése ugyan megfigyelhető volt (Polack és mtsai., 2007), azonban több vizsgált

talamokortikális sejtekben nem alakult ki a T-típusú csatorna indukált kisüléssorozatos tüzelési mintázat, sőt a talamokortikális sejtek iktális aktivitása meg is szűnhet (Contreras és mtsai., 1993, Pinault és mtsai., 1998). A technikai innovációknak köszönhetően lehetőség nyílt elektrofiziológiai, valamint  $\text{Ca}^{2+}$  indikátorokon alapuló képalkotó eljárások alkalmazásával egyedi sejtek szintjén vizsgálni a talamo-kortiko-talamikus hálózat roham alatti aktivitását, fejrögzített és szabadon mozgó epilepsziás állatmodellekben (GAERS patkány, Stargazer (STG) egér) (Crunelli és mtsai., 2020). Az említett módszereket alkalmazva két kutatócsoport is arra a következtetésre jutott, hogy mind a talamokortikális relé sejtek, mind pedig a kérgi kortiko-talamikus idegsejtek aktivitása iktális csökkenést mutat (McCafferty és mtsai., 2018, Meyer és mtsai., 2018). Az nRT neuronok egy részét csökkent, míg a másik részét emelkedett iktális aktivitás jellemzi. Az utóbbi neuronok iktális aktivitását T-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák által mediált kisüléssorozatos tüzelés alkotja. Az egymást követő SWD ciklusok során mind tónusos mind pedig kisüléssorozatos tüzelési mintázat megfigyelhető a talamikus sejtek esetén. Továbbá, minden esetben szoros összefüggés figyelhető meg a sejtek tüzelése és a SWD között, függetlenül attól, hogy az adott SWD alatt tónusos vagy kisüléssorozatos módban tüzel-e a vizsgált sejt (McCafferty és mtsai., 2018). Egyértelműen megállapítható, hogy ellentétben a talamokortikális relé és kortiko-talamikus sejtekkel, az nRT neuronjai szinte az összes SWD ciklus során tüzelnek (McCafferty és mtsai., 2018, Meyer és mtsai., 2018). Ez az emelkedett iktális nRT aktivitás nagymértékű  $\text{GABA}_A$  receptor mediált fázikus és tónusos gátlást eredményez a talamokortikális relé sejtekben (Cope és mtsai., 2005, Cope és mtsai., 2009), amely megmagyarázza a relé sejtek csökkent iktális aktivitását. A szövetszelet kísérletek eredményeinek interpretációja, miszerint az absence rohamok oka a csökkent gátlás okozta hiperexcitabilitás, nem támasztható alá éber állatokon végzett kísérletekkel (Crunelli és mtsai., 2020).

Az eltérő kutatási eredmények ellenére is nyilvánvaló, hogy az SWD-ok megjelenését a talamo-kortiko-talamikus hálózatban megjelenő fokozott ritmikus aktivitás és neuronális szinkronitás eredményezi. Újabban számos kutatás foglalkozik a ritmikus folyamatokban fontos szerepet játszó ioncsatornák diszfunkciójával (Blumenfeld, 2005), mint például a HCN csatornákkal és az általuk létrehozott  $I_h$  szerepével (Kanyshkova és mtsai., 2012, Cain és mtsai., 2015).

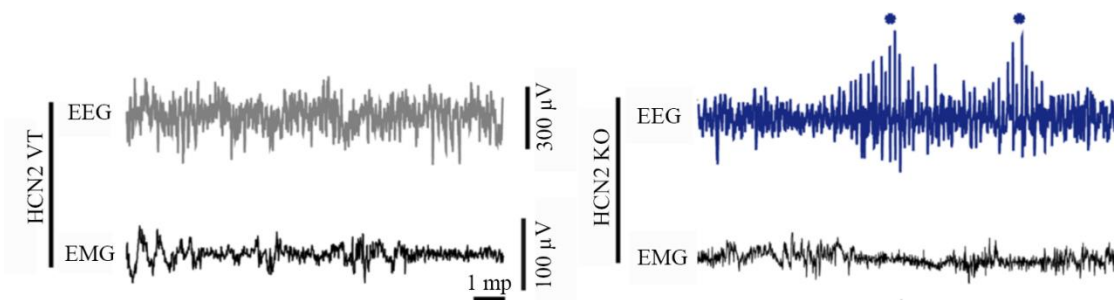
### **HCN csatornák és a hiperpolarizáció által aktivált ionáram**

A HCN csatornákat emlősökben négy gén kódolja (HCN1-NCN4). Mind a négy HCN csatorna izoforma hiperpolarizáció hatására nyílik (tipikusan  $-50$  mV-nál fokozottabb membránpotenciál polarizáció), azonban a különböző izoformák aktivációs kinetikája kisebb

eltéréseket mutat. A HCN1 csatornák jellemzője a gyors és viszonylag kevésbé hiperpolarizált membránpotenciál általi nyitás, míg a HCN4 a leglassabb és aktivációjuk feltétele a fokozottan polarizált membrán. Továbbá minden HCN csatorna képes közvetlen módon ciklikus adenzin-monofoszfátot (cAMP) kötni, azonban az, hogy milyen mértékben modulálja a cAMP a csatorna nyitását, szintén eltérő az izoformák között (Shah, 2014, Lee és MacKinnon, 2019). A HCN csatornák agyi expressziója regionális szinten eltéréseket mutat. A HCN1 a kéregben, hippokampuszban, kisagyban és az agytörzsben található, míg a HCN2 a központi idegrendszer valamennyi régiójában megtalálható, azonban nagyobb mennyiségben a talamuszban és az agytörzsi magvakban fejeződik ki. A HCN3 izoforma alacsony szinten, de a központi idegrendszer valamennyi régiójában megtalálható, míg a HCN4 szelektíven, csak bizonyos agyi régiókban található meg, mint például a szaglógumó (Notomi és Shigemoto, 2004, Shah, 2014). Mind expressziójukban, mind biofizikai tulajdonságaikban nemcsak agyi régiók között, hanem egyetlen idegsejt különböző régióiban (axon, dendrit, szoma) is eltérés figyelhető meg (Lőrincz és mtsai., 2002, Roth és Hu, 2020). A HCN csatornák működését és funkcióját a különböző agyi régiókban a felsorolt tulajdonságok együttesen határozzák meg (Benarroch, 2013).

Az  $I_h$ -nak jelentős szerepei vannak a neuronális működésben. Először is szabályozza a nyugalmi membránpotenciált és a membrán ellenállást. A membrán depolarizációja által pozitívan hat az akciós potenciál kialakulására (Benarroch, 2013). Továbbá inhibitorikus poszt-szinaptikus potenciálok (IPSP) időtartamának befolyásolása révén hatással van a sejtek neuronális válaszára és jelentős szerepet tölt be a ritmikus oszcillációk kialakításában (Luthi és McCormick, 1998b). Azáltal, hogy a HCN csatornák az idegi hálózat serkenthetőségét, a szinaptikus válaszokat és a hálózati aktivitást befolyásolják, fontos szerepet játszanak számos fiziológias folyamatban, mint például tanulás és memória. Megváltozott expressziójuk és működésük olyan patofiziológias állapotokkal hozható összefüggésbe, mint például az epilepsziás rohamok (Huang és mtsai., 2009, Reid és mtsai., 2012). Patológias működésben betöltött szerepüket alátámasztja, hogy temporális lebeny epilepsziával vagy AE-val diagnosztizált betegek esetében HCN csatorna mutációkat, valamint megváltozott HCN1 vagy HCN2 expressziót figyeltek meg (Wierschke és mtsai., 2010, DiFrancesco és mtsai., 2011). A HCN csatornák patológias folyamatokban történő megváltozott eloszlása és szabályozása összetett folyamat. Kísérleti eredmények utalnak arra, hogy mind a csatornák túlszabályozása, mind pedig az alulszabályozása epilepsziás rohamok megjelenésével hozható összefüggésbe (Noam és mtsai., 2011). HCN2 csatorna génkiütött egereken végzett elektrofiziológiai kísérletek azt bizonyítják, hogy a csatorna jelenléte nélkülözhetetlen a talamikus  $I_h$

megjelenésében, hiányában változik a talamokortikális relé sejtek nyugalmi membránpotenciálja és a serkentő szinaptikus bemenet hatására gyakoribb a kisüléssorozatos tüzelés. Ez, a HCN2 csatorna hiányában megjelenő megváltozott talamikus tüzelés detektálható SWD megjelenésekor is, az absence roham lefolyása alatt (Pape, 1996, Ludwig és mtsai., 2003, Ludwig és mtsai., 2008). Mindemellett a HCN2 csatorna funkció veszteses mutációja a vizsgált transzgén egereket a generalizált AE-ra hajlamosítja (4. ábra) (Chung és mtsai., 2009, Hammelmann és mtsai., 2019). WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk), AE állatmodelljében végzett kísérletek kimutatták, hogy a kérgi neuronok  $I_h$  amplitúdója kisebb az epilepsziás patkányokban, mint a nem epileptikus állatokban (Strauss és mtsai., 2004, Kole és mtsai., 2007). Ennek következtében fokozottabb az excitatórikus posztzinaptikus potenciálok (EPSP) időbeni összegződése, valamint a kérgi neuronok emelkedett kisüléssorozatos tüzelése figyelhető meg az AE-ás patkányokban (Strauss és mtsai., 2004). Ezzel szemben a talamokortikális relé sejtekben detektálható  $I_h$  nagyobb vagy változatlan nagyságú az epilepsziás állatokban (Kuisle és mtsai., 2006, Kanyshkova és mtsai., 2012) és a kisüléssorozatos tüzelésre való képesség is csökkent (Cain és mtsai., 2015).



**4. ábra:** HCN2 csatorna génkiütött egerekben detektálható absence epilepsziás roham. Absence roham alatti elektroencefalogram és elektromiogram regisztrátumok egy kontroll (bal) és egy HCN2 csatorna génkiütött egérben. Az ábrán a csillagok jelölik az oszcillációban megjelenő SWD-okat (Hammelmann és mtsai., 2019).

Epilepsziás állatmodelleken végzet *in vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai kísérletek eredményei alapján elmondható, hogy a HCN2 csatornák működése epilepsziában megváltozik, de a talamikus HCN2 csatornák iktogenezisben betöltött pontos szerepe tisztázatlan maradt.

## Célkitűzések

Egy komplex és dinamikus környezethez való állandó alkalmazkodás során az élőlények magatartása folyamatosan változik. A legfeltűnőbb változás az alvás-ébrenlét átmenetkor figyelhető meg. Ennek az átmenetnek a precíz neuronális kontrollja létfontosságú és ez a neuromodulátor rendszerek egyik fő feladata. Azonban a különböző agyi állapotok közötti átmenetek precíz szabályzása nagyon összetett és ennek megfelelően aktívan kutatott. Kísérleteink során a LH és DRM neuronjainak szinaptikus kapcsolatait és azok alvás-ébrenlét ciklusra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

### Munkám során célul tűztem ki:

- Feltárni a LH területéről a különböző DRM célsejtekre érkező szinaptikus hatások mechanizmusait *in vitro* whole-cell patch clamp technika és optogenetika szimultán alkalmazásával.
- A DRM-ban található célsejtek neurokémiai identitásának immunhisztokémiai módszerekkel történő meghatározását.
- Intakt állatokban feltárni a DRM-ba projektáló LH GABAerg rostok specifikus stimulációjának hatását azonosított DRM neuronokra.

Figyelembe véve a HCN csatornák sokoldalú celluláris és szinaptikus hatását, a csatornák működése és a rohamok iktogenezeise közötti ok-okozati összefüggés meghatározása nem egyszerű feladat. Különböző AE állatmodellekben (GAERS (Depaulis és mtsai., 2016), gamma-hidroxi-vajsavval (GHB) injektált Wistar patkányok (Venzi és mtsai., 2015) és STG egértörzsben (Noebels és mtsai., 1990)) azt vizsgáltuk meg, hogy a VB talamusz talamokortikális sejtjeiben farmakológiai és genetikai úton történő HCN2 csatorna csendesítés milyen hatással van az epilepsziás rohamokra.

### Munkám során célul tűztem ki:

- A HCN2 csatornák genetikai csendesítésének sejtszintű hatásának feltárását a VB talamuszban található talamokortikális relé neuronokban *in vitro* elektrofiziológiát alkalmazva, STG egértörzsben.
- Az általunk használt genetikai HCN2 csatorna csendesítés immunhisztokémiai módszerrel történő validálását.

## **Közreműködések**

A disszertációm első feléhez (fiziológias agyi állapot: alvás-ébrenlét ciklus) tartozó kísérleteket Lőrincz László Magor, Antoine Adamantidis, Mary Gazea és én terveztem. Az állatok fertőzését, az immunhisztokémiai festéseket, a konfokális mikroszkópiás felvételeket, az *in vitro* elektrofiziológiai kísérleteket, illetve az *in vivo* altatott állatok regisztrálását én végeztem. Az éber állatokból származó *in vivo* méréseket Molnár Benedekkel közösen végeztük. Az adatelemzéseket én végeztem, témavezetőm segítségével. Az alvás-ébrenlét ciklus monitorozása (EEG, EMG) és az adatok kiértékelése Mary Gazea munkájának eredménye.

A disszertációm második feléhez (patológias agyi állapot: epilepszia) tartozó kísérleteket Francois David, Lőrincz László Magor és Vincenzo Crunelli tervezte. A kísérletekhez felhasznált STG állatokba a vírus injektálást Francois David, a vad típusú egerekbe jómagam végeztem. Az EEG felvételek rögzítését Mészáros Ádám és Francois David kivitelezte. Az *in vitro* whole-cell patch clamp elvezetések, az immunhisztokémiai kísérleteket és a konfokális mikroszkópiás felvételeket én készítettem. Az adatok kiértékelését Francois David, Lőrincz László Magor és én végeztem.

## Anyagok és módszerek

### Állatok

A kísérleteink során az állatok gondozása és laboratóriumi felhasználása a Magyar Egészségügyi Bizottság által elfogadott állatgondozási protokoll (1998) és az Európai Közösségek Tanácsának rendelete alapján (86/609/EEC) történt. Kísérleteinkhez 25-35 g-os felnőtt (>P40) C57BL/6 vad típusú, ((VT) Charles River, Németország), GAD67-GFP (Jackson Laboratory, Amerikai Egyesült Államok (AEÁ)), Vgat-ires-Cre (*Slc32a1<sup>tm2(cre)Lowl</sup>*/J, Jackson Laboratory, AEÁ) és Stargazer (B6C3Fe *a/a-Cacng2<sup>stg</sup>*/J, Jackson Laboratory, AEÁ) hím és nőtény egereket használtunk, amelyek *ad libitum* juthattak standard rágcsáló táphoz és csapvízhez. Az állatházban állandó hőmérsékletet (22-25°C), páratartalmat és 12 óras mesterséges megvilágítást biztosítottunk.

### **Alkalmazott genetikailag módosított egértörzsek**

#### Vgat-ires-Cre egértörzs

A Vgat-ires-Cre egértörzsben a Cre rekombinááz expresszió, olyan endogén Vgat gének által vezérelt, amelyeket stop kodonok elé beillesztett ires-Cre-kazetták termelnek. Ennek eredményeként ebben az egértörzsben a Cre rekombinááz közvetlenül a Vgat-t expresszáló interneuronokban fejeződik ki, nem zavarva az endogén vezikuláris GABA transzporter expresszióját, így lehetővé téve azt, hogy specifikusan a GABAerg idegsejtekbe Cre-dependens módon jutassunk fluorofórt és chanelrhodopszin2-t (ChR2) hordozó virális vektorokat, lehetővé téve így a gátló idegsejtek specifikus vizsgálatát (Vong és mtsai., 2011)

#### GAD67-GFP egértörzs

Az élő szövetben történő idegsejt-vizualizálás egyik legelterjedtebb módja az, amikor a medúzából nyert zöld fluoreszkáló fehérje (GFP, **green fluorescent protein**) cDNS-ét jutatják be a vizsgálni kívánt szervezet sejtjeibe. A GAD67-GFP egértörzsbe beültetett bakteriális mesterséges kromoszóma tartalmazza a GFP fehérje cDNS-ét, az átírás pedig a GAD67 promotor által valósul meg, így a GFP kizárólag GABAerg sejtekben expresszálódik. (Tamamaki és mtsai., 2003)



## Stargazer egértörzs

A STG egerekben egyetlen, a 15-ös kromoszómát érintő recesszív mutáció található. Ennek hatására a *Cacng2* génbe egy transzpozon ékelődik be, aminek eredménye a csökkent *Cacng2* expresszió (Chung és mtsai., 2009). A *Cacng2* a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák  $\gamma 2$  alegységét kódolja, valamint a stargazin fehérje termelésért felelős. A stargazin fehérje fontos szerepet játszik például az 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptor *trafficking*-ben. Azáltal, hogy a STG-ben nem megfelelő a *trafficking*, sérül a serkentő szinapszisok ultrastruktúrája, valamint hozzájárul az STG egerek ataxiás fenotípusához. A *Cacng2* gén mutációjának következtében a talamikus feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák működése megváltozik, ami hozzájárul az EEG-ben megjelenő tüske-hullám kisülések generálásához. Az STG egerekben sokkal gyakoribb és hosszabb rohamok figyelhetőek meg, mint más transzgenikus egértörzsekben (Noebels és mtsai., 1990, Letts, 2005). A STG egerek az AE egyik széles körben elterjedt modellállatai.

## Műtét/fertőzés menete

Műteteink során az egereket intraperitoneálisan (i.p.) beadott ketamin (80 mg/ttkg) és xylazin (8 mg/ttkg) elegy keverékével altattuk. Az állatok fejét sztereotaxiás készülékbe rögzítettük (Model 900, David Kopf Instruments, AEÁ). A koponyán 1-1,5 mm átmérőjű bilaterális lyukat fúrtunk a Bregmától számított koordináták alapján (1. táblázat, Paxinos és Watson, 2007). A szükséges mennyiségű vírust mikroinjektor (Nanoliter 2010, World Precision Instruments, Sarasota, FL) segítségével jutattuk a célterületekbe (1. táblázat). A mikropipettát (átmérő: ~20 $\mu$ m, hegyezett profil a roncsolás minimalizálása érdekében) anyagbeadáskövetően minimum 5 percig az agyállományban tartottuk. Az altatott és éber *in vivo* elektrofiziológiai kísérletek során az állatok részlegesen immobilizált állapotban voltak, amelyet a műtétek során a koponyacsontához cementtel rögzített (Super-Bond, EK) *head-post* tett lehetővé. Posztoperatív fájdalomcsillapítóként Rimadylt (15 mg/ml; i.p.) alkalmaztunk. Továbbá minden állat intramusculáris injekció formájában antiszeptikumot, gentamicint kapott. A légutak váladéktermelésének mérséklése érdekében szükség esetén a műtét közben szubkután atropint adagoltunk.

## **Alkalmazott vírusok**

### AAV2-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP

A vírus konstruktban található hChR2 kifejezése az EF1a promoter által valósul meg, ami egy 1,2 Kb nagyságú általánosan használt konstitutív promoter. A konstruktban megtalálható hChR2, a fény-aktivált ioncsatornák olyan altípusa, amely emlős sejtekben is képes megfelelő módon expresszálni. A vad típusú változatában néhány mutáció biztosítja a gyors gerjeszthetőséget. A késleltetett csatorna zárását a H134R típusban egy funkcionyeréses mutációval valósították meg, aminek következménye a vad típusnál nagyobb fényáram. A DIO virális vektorokban a vizsgálni kívánt transzgen a promoter 5' végéhez fordított orientációban helyezkedik el, így a transzgen kifejeződése csak Cre expresszió esetén valósul meg (titer:  $1 \times 10^{13}$  gc/ml; származási hely: UPENN Vector core, AEÁ; (Viney és mtsai., 2018)).

### AAV2-EF1a-DIO-eYFP

A kontrollként használt AAV2-EF1a-DIO-eYFP vírus konstrukt az AAV2-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP vírushoz hasonló módon teszi lehetővé a transzgen Cre függő kifejeződését, azonban nem tartalmaz fény indukálható ion csatornát (titer:  $1 \times 10^{13}$  gc/ml; származási hely: UPENN Vector core, AEÁ).

### AAV1-CAG-ChR2-venus-WPRE-SV40

Műteteink során olyan adeno-asszociált vírust, AAV2/1-CAG-ChR2-Venus injektáltunk az agyszövetbe, amelyben a Venus fluorofórhoz kapcsolt ChR2 egy CAG promotert tartalmazó adeno-asszociált vírus kazettába (2/1 szerotípus) van klónozva. Ily módon a DNS konstrukt specifikusan csak idegsejtekbe jut és a fertőzött neuronokban ChR2 expressziót eredményez (titer:  $5 \times 10^{12}$  gc/ml; származási hely: UPENN Vector core, AEÁ; (Petreanu és mtsai., 2009)).

### AAV1-CAGS-flex-ChR2-tdTomato-WPRE-SV40

Kísérleteinkhez Vgat-ires-Cre egerekbe, olyan adeno-asszociált vírust (AAV1-CAGS-flex-ChR2-tdTomato-WPRE-SV40) jutattunk, amely a ChR2 expressziót Cre függő módon teszi lehetővé. A vírus konstruktban a LoxP hely, a FLEX plazmidban a DNS amplifikáció és a virális vektor termelődése során rekombinálódik. A FLEX virális vektor által a génkifejeződés csak olyan sejtekben valósul meg, ahol a Cre rekombináz is megtalálható. A Cre dependens ChR2 fehérjét kódoló gén egy CAG szintetikus promotert tartalmazó AAV kazettába van

kódolva, amelyhez tdTomato fluorofórt fúzionáltattak (titer:  $5 \times 10^{12}$  gc/ml; UPENN Vector core, AEÁ; (Kim és mtsai., 2012)).

#### HCN2 csatorna génjét csendesítő shRNS-t tartalmazó vírus

A HCN2 csatorna génjét csendesítő shRNS szekvencia (CAGGAGAAGTACAAGCAAGTAGA), úgy lett kiválasztva, hogy a célterülete egy olyan konzervált régió legyen, amely az egér és patkány HCN1-4 nyitott olvasási keretén belül található. Kontrollként olyan shRNS szekvenciát (GAGGATCAAATTGATAGTAAACC) alkalmaznak, ami hasonló hosszúságú, de egyetlen ismert génnel sem mutat homológiát.

A génszekvenciák homológia vizsgálata során ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) meggyőződnek arról, hogy a szekvenciák nem tartalmaznak immunválaszt indukáló motívumokat. A kiválasztott szekvenciát Flox kazettával együtt egy „CreOff” AAV vectorba klónozzák. A vektor tartalmaz egy U6 polimeráz III promotert, amely lehetővé teszi a shRNS kifejeződését. A szintén beépített CMV promoter a GFP kifejeződését teszi lehetővé, így a fertőzött sejtek könnyen azonosíthatók (csendesítő shRNS: AAV9-CreOff-GFP-HCN-shRN, titer:  $1,145 \times 10^{13}$  gc/ml; kontroll shRNS: AAV9-floxed-U6-CreOff-CMV-eGFP titer:  $2,18 \times 10^{13}$  gc/ml; származási hely: kollaborációs partnerünk; Savio Chan; (Chavez és mtsai., 2014)).

<u>Egértörzs</u>	<u>Fertőzött agyterület</u>	<u>Koordináták (Bregmához viszonyítva)</u>	<u>Injektált vírus</u>	<u>Vírus térfogata</u>
C57BL/6 (n=10)	LH	AP: -0,94 mm; ML: ±1.00 mm; DV: -5,2 mm és -5,4 mm	AAV2/1-CAG-ChR2-Venus	25-25 nl/DV koordináta; 50 nl/hemiszféra
GAD67-GFP (n=2)	LH	AP: -0,94 mm; ML: ±1.00 mm; DV: -5,2 mm és 5,4 mm	AAV2/1-CAG-ChR2-Venus	25-25 nl/DV koordináta; 50 nl/hemiszféra
Vgat-ires-Cre (n=14)	LH	AP: -0,94 mm; ML: ±1.00 mm; DV: -5,2 mm és 5,4 mm	AAV-FLEX-ChR2-tdTomato	75-75 nl/DV koordináta; 150 nl/hemiszféra
Vgat-ires-Cre (n=6)	LH	AP: -0,94 mm; ML: ±1.00 mm; DV: -5,2 mm és 5,4 mm	AAV2-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP	100-100 nl/DV koordináta; 200 nl/hemiszféra
Vgat-ires-Cre (n=5)	LH	AP: -0,94 mm; ML: ±1.00 mm; DV: -5,2 mm és 5,4 mm	AAV2-EF1a-DIO-eYFP	100-100 nl/DV koordináta; 200 nl/hemiszféra
Stargazer (n=9)	VB talamusz	AP: -1,8mm; ML: ±1,5 mm; DV:-3.0 mm	HCN2 csatorna génjét csendesítő shRNS vírus	500 nl/hemiszféra
Stargazer (n=9)	VB talamusz	AP: -1,8mm; ML: ±1,5 mm; DV:-3.0 mm	HCN2 csatorna génjét nem csendesítő shRNS vírus	500 nl/hemiszféra
C57BL/6 (n=3)	VB talamusz	AP: -1,8mm; ML: ±1,5 mm; DV:-3.0 mm	HCN2 csatorna génjét csendesítő shRNS vírus	500 nl/hemiszféra
C57BL/6 (n=3)	VB talamusz	AP: -1,8mm; ML: ±1,5 mm; DV:-3.0 mm	HCN2 csatorna génjét nem csendesítő shRNS vírus	500 nl/hemiszféra

**1. táblázat:** Összegző táblázat a vírus injektálás során alkalmazott egértörzsekről, vírusokról és a fertőzött területekről.

## **Túlélő agyszelet készítése *in vitro* elektrofiziológiai kísérlethez**

A LH fertőzés után legalább 30 nap elteltével, a VB talamusz területéről 28-36 nappal a vírus injektálást követően, túlélő agyszeleteket készítettünk a vizsgálni kívánt területekből (agytörzs, VB talamusz). A túlélő agyszelet készítésének egyik limitáló tényezője, hogy különösen nehéz felnőtt állatokból megfelelő, egészséges agyszeletet készíteni. Továbbá a szeletkészítés során az agy erősen mielinizált területein nehezebb az idegsejtek integritását megőrizni. A szeletkészítés során az idegsejtek épségének megőrzése céljából kritikus lépés a Na<sup>2+</sup> megfelelő helyettesítése, valamint az idegsejtek védelme az ödémásodással szemben. Az általunk használt vágóoldat N-metil-D-glukamin-t (NMDG) tartalmaz, amely egy Na<sup>+</sup> csatorna blokkoló, valamint helyettesíti a Na<sup>+</sup>-ionokat a szeletelés során úgy, hogy az oldat ozmolaritása változatlan marad. A tároló oldatunk HEPES-t tartalmazott, ami az ödémásodástól védi a neuronokat (Ting és mtsai., 2014).

Az állatokat ketamin (80 mg/ttkg) és xylazin (8 mg/ttkg) elegy keverékével altattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk 4-5 ml 4 °C-os, karbogénnel (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) buborékoltatott NMDG vágóoldattal. A vágóoldat összetétele a következő volt: 93 mM NMDG, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, 25 mM glükóz, 5 mM N-acetil-L-cisztein, 5 mM Na-aszkorbát, 3 mM Na-piruvát, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> és 4 mM MgSO<sub>4</sub>. A CaCl<sub>2</sub> hozzáadása előtt 10-20 percig jégen buborékoltattuk az oldatot, hogy a CO<sub>2</sub> beoldódásával, következképp a pH csökkentésével elkerüljük a CaCO<sub>3</sub> és kalcium-foszfátok kicsapódását. A perfúzió után az állatokat dekapitáltuk, majd az agy kipreparálását hűtött, buborékoltatott vágóoldatban végeztük. Microm HM650 (Thermo Scientific, AEÁ) vibrotómmal 320 µm vastag koronális metszeteket készítettünk. A szeleteket 12 percen át 32-34 °C-os karbogénnel buborékoltatott NMDG vágóoldatban inkubáltuk, majd a 12 perc elteltével a szeleteket 17 °C-os HEPES tárolóoldatba helyeztük át, aminek összetétele: 92 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 20 mM HEPES; 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM glükóz; 1,30 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5 mM N-acetil-L-cisztein; 5 mM nátrium-aszkorbát, 5 mM nátrium-piruvát, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> és 3 mM MgSO<sub>4</sub>. A szeletek készítését megelőzően mind az NMDG, mind a HEPES oldat pH-ját 7,3-7,4-re állítottuk be.

## ***In vitro* elektrofiziológia**

Elvezetéseinket whole-cell patch clamp technikával végeztük VT (n=10) és GAD67-GFP állatok (n=2) DRM és STG (n=8) valamint VT egerek (n=6) VB talamuszának neuronjaiból. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 37 °C-os elvezetőkamrába helyeztük, amelyen

folyamatosan oxigentáltatott mesterséges cerebrospinális folyadékot (mCSF) áramoltattunk át. Ennek összetétele a következő volt: 130 mM NaCl; 3,5 mM KCl, 1 mM NaHPO<sub>4</sub>; 24 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM D(+) glükóz, 3 mM CaCl<sub>2</sub> és 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>. A kísérlet során a mikorpipettákat (5-7 MOhm) intracelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7,25, 275 mOsm), amelynek összetétele a következő volt: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na<sup>2+</sup>, 10 mM HEPES, 10 mM kreatin-foszfát és a sejtek jelöléséhez 8 mM Biocytin (N-biotinilált lizin). A jeleket HEKA (EPC 9/2, Németország) erősítővel rögzítettük, 5 kHz-es felülvágó szűrővel szűrtük, és Patch Master nevű programmal (HEKA, Németország) 10 kHz-es mintavételi frekvencián digitalizáltuk.

A vizsgálni kívánt DRM és VB talamusz neuronokat infravörös DIC (differenciál interferencia kontraszt) optikával vizualizáltuk. A GFP-t expresszáló sejtek (VB talamusz esetében a fertőzött talamokortikális relé neuronok, DRM esetében a GAD67-GFP GABAerg neuronok) azonosítását az elvezetés megkezdése előtt, az epifluoreszcens megvilágításuk tette lehetővé. A membránpotenciál válaszokat áram-zár üzemmódban először negatív (VB talamusz: -100 pA vagy DRM: -80 pA), majd egyre pozitívabb (+20 pA lépésenként) áramlépcsőket injektálva regisztráltuk. A DRM-ot a szeletekben az *aqueductus cerebri* helyzete alapján lokalizáltuk. Posztszinaptikus potenciálok (PSP) vizsgálata során a sejteket nyugalmi membránpotenciál értéken tartottuk és a mérés folyamán a LH-ből ide érkező, ChR2-t expresszáló axonokat lokálisan fotostimuláltuk. A fotostimulációt az objektíven keresztüli kék fényvel (475 nm; 0,5-0,8 mW) végeztük, a fényforrást egy TTL-vezérelhető LED fényforrás biztosította (Thorlabs, Németország). Minden stimulus-sorozat 5 darab 10 ms-os, 20 Hz-es fényfelvillanást tartalmazott, amelyet 20 másodpercenként ismételtünk. DRM és a VB talamusz neuronjainak regisztrálása során folyamatosan monitoroztuk a neuronok soros ellenállását, ha az érték változása 20%-nál nagyobb volt, a felvételt kizártuk.

## **Farmakológia**

*In vitro* kísérleteink során bizonyos esetekben a depolarizáló posztszinaptikus potenciálok jelenlétekor 50 µM AMPA-/kainátreceptor-blokkolót, 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo-[f]quinoxalin-7-szulfonamidot (NBQX; Tocris, Egyesült Királyság (EK)) vagy a hiperpolarizáló posztszinaptikus potenciálok detektálásakor 10 µM 6-Imino-3-(4-methoxyphenil)-1(6H)-piridazinbután-sav-hidrobromidot (gabazin, (GBZ) Tocris, EK)

tartalmazó mCSF-et mostunk a szeletekre annak érdekében, hogy a GABA<sub>A</sub> receptorokat blokkoljuk.

### **In vivo elektrofiziológia és juxtacelluláris jelölés**

Annak érdekében, hogy a DRM neuronok aktivitását intakt állatban is vizsgálni tudjuk az egereket a vírusfertőzést követően minimum egy hónap elteltével újra sztereotaxiás készülékbe helyeztük (Model 900, David Kopf Instruments, AEÁ). Az elvezetések alatt a Vgat-ires- Cre egereket (n=10) 1-1,5% (v/v) Isofluránnal (Forane; Magyarország) altattuk és az állandó testhőmérséklet érdekében fűtőpadra fektettük őket (Supertech, Magyarország). A koponyán 1 mm átmérőjű lyukat fűrtünk a DRM fölött (AP: -4,75 mm, ML: 0,2 mm, DV: -3,1 mm). A DRM neuronok *in vivo* egysejt aktivitásának vizsgálatát és jelölését 0,5 M NaCl és 1,5%-os Biocytin (Sigma Aldrich, Magyarország) oldattal töltött, 5-25 MOhm impedanciájú mikroelektrodák segítségével végeztük. Az elektródát 15 fokos, mediolaterális szögben döntöttük meg a mérések során, annak érdekében, hogy a szagittális szinuszt elkerüljük. Spontán akciós potenciálok megjelenését követően az elektródát nem mozgattuk, a regisztráció a stabil jel (minimum 3:1 jel/zaj arány) detektálásakor indult. A DRM neuronjainak aktivitását MultiClamp 700B (Molecular Devices, AEÁ) erősítővel rögzítettük és 1 Hz-es alulvágó szűrőt, valamint 5 kHz-es felülvágó szűrőt alkalmaztunk. Az analóg-digitális konverziót Axon Digidata 1440a (Molecular Devices, AEÁ) segítségével végeztük 30 kHz-es mintavételi frekvenciával. Az elvezetett sejtek jelölése 2-10 percig tartó 0,5-4 nA 500 ms áram impulzusok (juxtacelluláris jelölési technika; (Pinault, 1996)) segítségével történt. Annak érdekében, hogy a DRM GABAerg neuronjainak aktivitását regisztráljuk, a DRM laterális részét céloztuk meg, ahol a GABAerg neuronok nagy számban vannak jelen (Allers és Sharp, 2003). Ezek a neuronok kisméretű ( $\leq 15 \mu\text{m}$ ) ovális szómával rendelkeznek és az átlag spontán tüzelési rátájuk nagyobb, mint 6 Hz (Allers és Sharp, 2003).

A DRM sejtek regisztrálása során a LH területéről érkező GABAerg axonokat lokálisan fotostimuláltuk. A lézerdíóda (LD Fiber Light Source, Doric Lenses, Kanada) fényintenzitását 5 mW-ra állítottuk be. Ebben a kísérletsorozatban, az *in vitro* kísérletekhez hasonlóan minden stimulus-sorozat 5 darab 10 ms-os, 20 Hz-es fény pulzust tartalmazott. A stimulus-sorozatokat 10-20 másodpercenként ismételtük.

Éber, fejrögzített egerekben a LH projekciók funkcionális vizsgálata során (Vgat-ires-Cre n=4) a jeleket Axoclamp 900A (Molecular Devices, AEÁ) erősítővel rögzítettük és az analóg-digitális konverziót CED 1401 (Cambridge Electronic Devices, EK) segítségével végeztük. A

méréseket megelőzően az állakat 4-6 napon keresztül a mérőhelyhez szoktattuk. Minden más kísérleti paraméter az altatott mérések során alkalmazottakkal azonos volt.

Mind az éber, mind az altatott méréseinket követően a fertőzött LH-t tartalmazó blokkot immerziósan fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldatban. A blokkokból 80  $\mu\text{m}$  vastagságú koronális metszeteket készítettünk vibratóm (Leica VT 1000S, Németország) segítségével, annak érdekében, hogy ellenőrizzük a fertőzés sikerességét.

## **EEG regisztrálás és műtéti eljárás**

A STG állatok virális fertőzését követően (n=9/csoport) a koponyára frontális (AP: 2,0 mm ML: 2,0 mm) és parietális (AP: 1,8 és ML: 5,0 mm) EEG csavarokat helyeztünk fel. Az EEG jeleket a fertőzést követően egy hónapon keresztül, minden negyedik napon regisztráltuk 3-4 órán keresztül szimultán video monitoring mellett. Az EEG jeleket SBA4-v/BioAmp erősítő (SuperTech, Magyarország) segítségével rögzítettük és 1 kHz-en digitalizáltuk (CED 1401, Cambridge Electronic Devices, EK). A regisztrátumok analízisét CED Spike2 7.3-as verziójával és Matlab (R2011b; MathWorks, AEÁ) programok segítségével végeztük.

Vgat-ires-Cre egerek alvás-ébrenlét ciklusa alatti EEG jeleinek detektálását, a LH fertőzést (AAV2-EF1a-DIO-eYFP (kontroll) vagy AAV2-EF1a-DIO-hChR2(H134R)) követő négy EEG csavar (2 frontális és két parietális) epidurális rögzítése tette lehetővé. A műtétet követően az EEG jelek regisztrálása AM 3500 erősítő (AM Systems, AEÁ) és SleepScore software (View Point, Franciaország) használatával történt, 512 Hz mintavételezési frekvenciával. A felvételeket minden kísérlet esetében 10 és 14 óra között rögzítettük. Az EEG jelek regisztrálása alatt, a DRM területére érkező LH<sub>Vgat</sub> axonok fotostimulálását 5 ms 5 vagy 20 Hz-es fényimpulzusokkal valósítottuk meg.

## **Perfúzió**

Az egereket ketamin (200 mg/ttkg) és xylazin (20 mg/ttkg) elegy keverékével túlaltattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk 50 ml 4 °C-os standard fiziológiás sóoldattal és 50 ml 4°C-os 4%-os paraformaldehid oldattal. Az agyakat eltávolítottuk, majd 24 órán keresztül paraformaldehid oldatban utófixáltuk. Végül 5%-os nátrium-azidot tartalmazó 0,1 M-os foszfát-pufferben tároltuk azokat.



## Immunhisztokémia

### *In vitro* és *in vivo* méréseink során elvezetett DRM sejtek neurokémiai azonosítása

Az *in vitro* elvezetések alatt az elvezető pipettából a Biocytin a sejtekbe diffundált, ami megfelelő feltöltést eredményezett. A szeleteket egy éjszakán át inkubáltuk 4%-os paraformaldehid oldatban, majd a feldolgozás megkezdéséig 5%-os nátrium-azidot tartalmazó 0,1 M-os foszfát-pufferben tároltuk azokat.

A 10%-os zselatinba ágyazott, 320 µm-es raphé szeleteket vibratómmal (Leica VT 1000S) 50 µm vastagságú sorozatmetszetekre szeltek vissza. A Biocytinnel feltöltött sejteket Cy3-Streptavidin (1:500; Jackson Laboratory, AEÁ) segítségével tettük láthatóvá. Ugyanezek a metszeteken további szerotonin vagy GABA immunhisztokémiát végeztünk. A szerotonin immunfestés során elsődleges antitestként az anti-5-HT-Rb antitestet (1:1000; Invitrogen, AEÁ) használtuk, míg a GABA immunfestés esetén pedig anti-GABA-Rb (1:1000; Jackson Laboratory, AEÁ) elsődleges antitestet alkalmaztunk. Mind a szerotonin, mind a GABA immunhisztokémia során másodlagos antitestként a Dylight649-DARb antitestet (1:400, Jackson Laboratory, AEÁ) választottuk.

*In vivo* elvezetések során a juxtacelluláris módszer alkalmazásának köszönhetően, az injektált áram hatására az üvegpipettában lévő Biocytin a sejtbe jutott, lehetőséget teremtve a sejt pontos elhelyezkedésének meghatározására. Jelölés után maximum egy óra elteltével az állatokat túlaltattuk és transzkardiálisan perfundáltuk. A Biocytinnel feltöltött sejteket Cy3- vagy Alexa488- konjugált Streptavidin (1:500; Jackson Laboratory, AEÁ) segítségével tettük láthatóvá. A fertőzésekről és az immunhisztokémiai eredményekről fluoreszcens mikroszkópiát (Olympus BX60 epifluoreszcens mikroszkóp, illetve Olympus FV1000 konfokális mikroszkóp, Japán) alkalmazva képeket készítettünk.

### HCN2 csatornák jelölése csendesítő és kontroll shRNS-el fertőzött agyszövetekben

A 10%-os zselatinba ágyazott, 320 µm-es VB talamuszt tartalmazó szeleteket vibratómmal (Leica VT 1000S) 40 µm vastagságú sorozatmetszetekre szeltek vissza. Egy óra blokkolás (5% normál ló szérum) után a szeleteket 0,1 M Triss pufferben + 0,1% triton oldott anti-HCN2-Rb (Alomene Lab; 1:200) primer antitestben inkubáltattuk egy éjszakán át, szobahőmérsékleten. Ezt követte a másodlagos antitesttel, számarban termeltetett anti-Rb Cy3-mal (1:500; Jackson Laboratory, AEÁ) való 2 órás inkubáció. Az idegsejtek azonosítása érdekében DAPI (1:200; Millipore, AEÁ) festést alkalmaztunk.

A fertőzésekről és az immunhisztokémiai eredményekről fluoreszcens mikroszkópiát (Olympus BX60 epifluoreszcens mikroszkóp, illetve Olympus FV1000 konfokális mikroszkóp, Japán) alkalmazva képeket készítettünk.

## Adatértékelés

Az *in vitro* eredményeket (DRM, VB talamusz idegsejtekből történő elvezetés) FitMaster (Heka, Németország), OriginPro 8.5 (MicroCal, AEÁ) és Igor (WaveMetrics, AEÁ) programokkal analizáltuk. A PSP-ok detektálásának küszöbértékét az alapvonalról 2x-es standard szórásértéknyire állítottuk a fotostimulus előtti és utáni 50 ms-os ablakokban. A látenciát a négyszögjel kezdetétől a vizsgált sejtben detektált szinaptikus esemény (EPSP, IPSP) kezdetéig eltelt időként (ms) határoztuk meg. A szinaptikus események amplitúdóját (mV) az alapvonal és a hullámcsúcs, (EPSP esetén) illetve hullámvölgy (IPSP esetén) közötti különbségként határoztuk meg. Az általunk számolt páros pulzus arány (PPA) a második detektált posztszinaptikus esemény amplitúdójának és az első detektált posztszinaptikus esemény amplitúdójának a hányadosa.

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a HCN2 csatorna aktivitás indukált depolarizáció méretét, számszerűsítettük a regisztrált neuron bemenő ellenállását a feszültségválasz elején (csúcsnál- $R_{be-csúcs}$ ), a feszültséglépcső végén, (egyensúlyi állapotban,  $R_{be-eá}$ ) és ezek egymáshoz viszonyított arányát ( $R_{be-eá}/R_{be-csúcs}$ ). Az akciós potenciálok amplitúdóját a küszöbpotenciál és az akciós potenciálok csúcsa között mértük. SWD analízis során a HCN2 csendesített állatokból regisztrált paramétereket a kontroll értékek %-ában fejeztük ki.

Az *in vivo* kísérletekből nyert adatokat Spike2 (Cambridge Electronic Design, EK), program segítségével analizáltuk. A regisztráció alatti extracelluláris akciós potenciálokat egyedi sejtek aktivitásává választottuk szét. Az akciós potenciálok stimulus körüli eloszlását peristimulus idő hisztogrammal (PSTH), valamint „raster plot”-tal ábrázoltuk. Az átlagos tüzelési ráta megállapításához a sejtek tüzelési rátáját a fotostimulus előtti és utáni 500 ms-os időablakban átlagoltuk. A modulációs indexet (MI) az alábbi képlet alapján határoztuk meg:  $TR_{FS} - TR_{KON} / TR_{FS} + TR_{KON}$  (TR: tüzelési ráta, KON: kontroll, FS: fotostimuláció), így az 1-es MI érték a lehetséges legerősebb serkentésnek, a -1-es MI érték pedig a lehetséges legerősebb gátlásnak felel meg.

A HCN2 és GFP expresszió kvantitatív analízisét ImageJ softwarrel végeztük. Manuálisan kijelöltük a vizsgálandó neuronokat, majd az intenzitásokat a megfelelő hullámhosszban (anti-

HCN2:  $\lambda=594$  nm (piros)), GFP:  $\lambda=488$  nm (zöld)) mértük. A GFP jel a fertőzés indikátora volt és így a fertőzött sejtekben vizsgáltuk az anti-HCN2 antitest fluoreszcencia intenzitását.

### **Statisztikai analízis**

Az adatok normalitását Shapiro-Wilk és Kolmogorov-Smirnov tesz alkalmazásával állapítottuk meg. A normál eloszlástól eltérő adatok esetében két csoport közti szignifikáns eltérést Wilcoxon teszt (páros minta), valamint Mann-Whitney U-teszt (független minta; (MW U-teszt)) segítségével vizsgáltuk. Abban az esetben ahol normál eloszlásúak voltak az adataink és több mint két paramétert hasonlítottunk össze, három-utas ANOVA tesztet alkalmaztunk. HCN2 csatornát jelölő antitest fluorofórjának és a GFP jel intenzitásának korrelációját lineáris regresszióval állapítottuk meg. Az eredményeket  $\leq 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak. A mért értékek átlagait $\pm$ S.E.M adtuk meg.

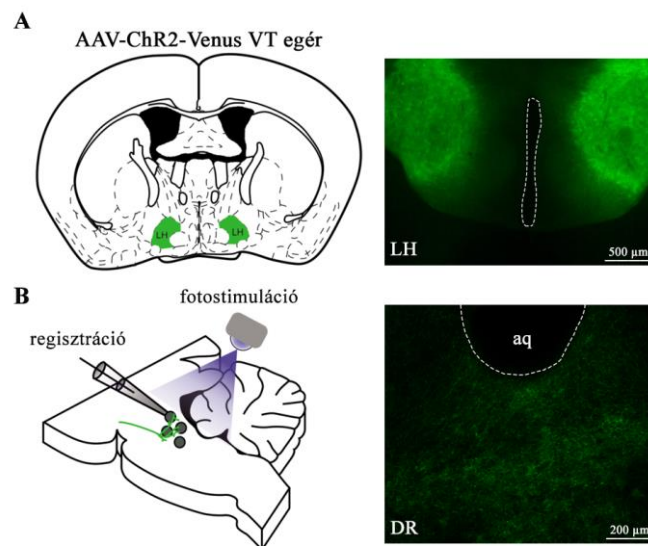
## Eredmények

### Fiziológias agyi állapot: alvás-ébrenlét ciklus

Korábbi irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy az agy egyes régióin belül a LH<sub>Vgat</sub> neuronok szelektív ingerlése ébresztő hatású (Herrera és mtsai., 2016, Venner és mtsai., 2019). Azonban az, hogy az LH<sub>Vgat</sub> idegsejtek hogyan modulálják különböző agytörzsi neuromodulátor rendszerek aktivitását még nem feltárt. Kísérleteinkben az LH és a DRM funkcionális kapcsolatait és azok alvás-ébrenlét ciklus szabályzásban betöltött szerepét vizsgáltuk.

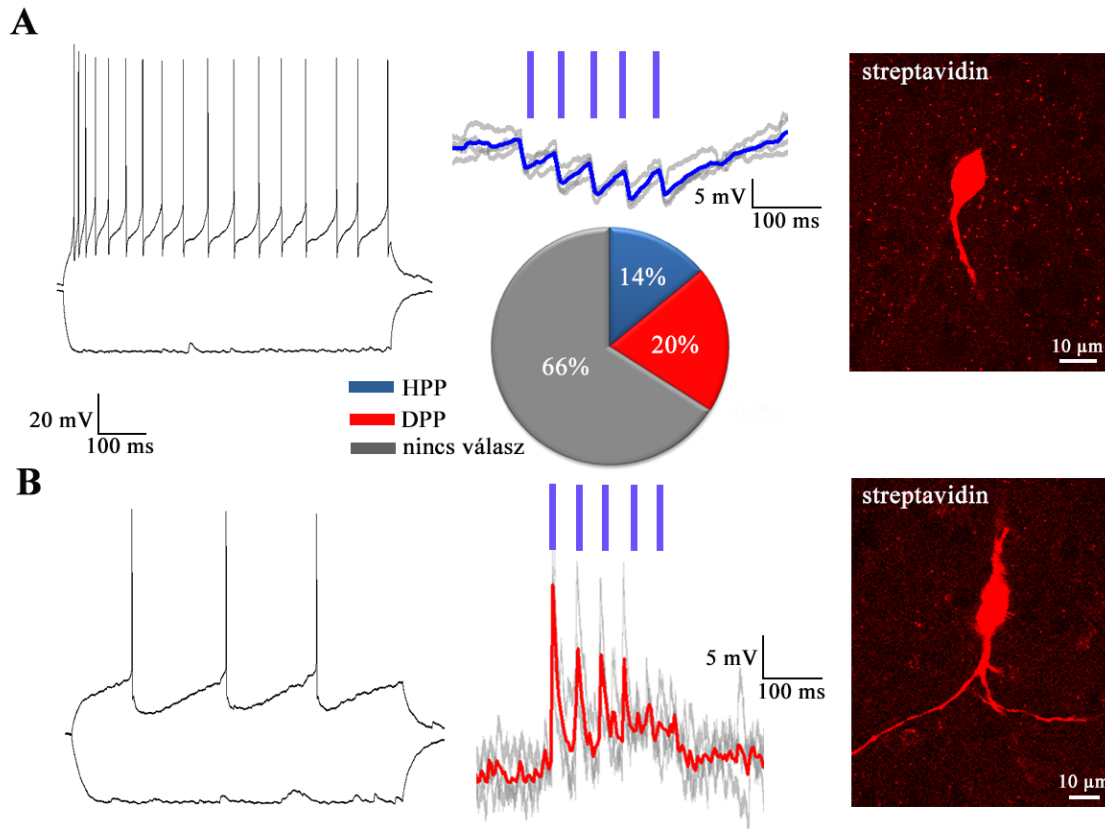
### **LH axonok lokális fotostimulációjának hatása a DRM neuronokra *in vitro***

Adeno-asszociált vírus konstrukt (AAV2/1-CAG-ChR2-Venus) sztereotaxiás hipotalamikusan injekciójával ChR2 fehérjét expresszáltattunk VT (n=10) és GAD-GFP (n=2) egerek LH neuronjaiban (5. ábra: A). A fertőzést követően, minimum egy hónap elteltével az állatok agytörzséből túlélő agyszeleteket készítettünk, majd *in vitro* whole-cell patch clamp elvezetéseket végeztünk a lokális agytörzsi ChR2-t expresszáló LH axonok szimultán fotostimulációjával (5. ábra: B).



**5. ábra: ChR2 expresszió a LH és a DRM területén. A:** Az egerek AAV-Chr2 vírussal való hipotalamikusan fertőzését követően erőteljes ChR2 expresszió figyelhető meg a LH területén. **B:** Sematikus ábra az *in vitro* kísérleti felállásról (bal). A dorzális raphéból készült koronális metszeten jól láthatóak a LH-ből a DRM területére érkező GFP-t és ChR2-t expresszáló axonok (jobb), amelyeket a DRM neuronok elvezetése közben fotostimuláltunk.

Az 51 regisztrált DRM idegsejt közül 17 sejt (33, 33%) esetében figyeltünk meg LH axonok fotostimulációját követő PSP-okat. A fotostimulációra válaszoló sejtek 42%-án (n=7/17) hiperpolarizáló posztszinaptikus potenciálokat (HPP) (első HPP amplitúdó:  $7,484 \pm 0,285$  mV; második HPP amplitúdó:  $6,464 \pm 0,422$  mV; PPA:  $0,839 \pm 0,173$ ; látencia:  $0,014 \pm 0,002$  ms; 10. 6. ábra: A) és 58%-án (n=10/17) depolarizáló posztszinaptikus potenciálokat (DPP) (első DPP amplitúdó:  $5,097 \pm 0,973$  mV; második DPP amplitúdó:  $4,973 \pm 1,177$  mV; PPA:  $1,960 \pm 0,602$ ; látencia:  $0,889 \pm 0,003$  ms; 6. ábra: B) váltott ki a ChR2-t expresszáló axonok fotostimulációja.

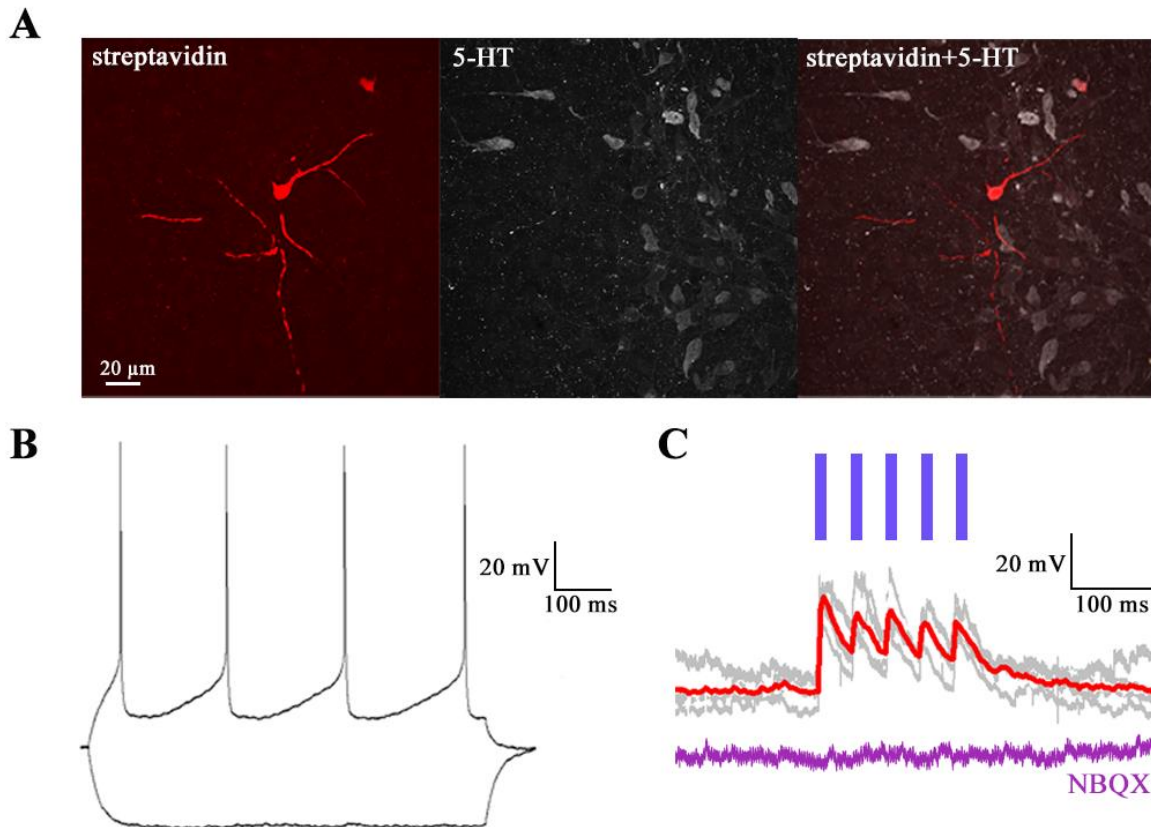


**6. ábra:** LH-ből érkező projekciók lokális fotostimulációja bizonyos DRM neuronokban excitatorikus, másokban inhibitorikus posztszinaptikus potenciálokat váltott ki. Kördiagram: A LH-ből érkező, ChR2-t expresszáló axonok lokális fotostimulációja a DRM-ban a vizsgált idegsejtek 14%-án hiperpolarizáló, míg 20%-án depolarizáló posztszinaptikus potenciálokat váltott ki. **A:** Reprezentatív felvétel egy regisztrált DRM idegsejt membránválaszáról hiperpolarizáló és depolarizáló áramlépcsőkre (bal). ChR2-t expresszáló LH axonok fotostimulációjának hatására HPP-ok detektálhatók (közép). A szürke szín jelöli az egyes átfutásokat, a piros színnel pedig ezek átlaga van feltüntetve. A kék színű téglalapok jelzik a fotostimuláció (5 darab 10 ms-os, 20 Hz) időzítését. Streptavidinnel előhívott, patch clamp elvezetés alatt a pipettából a sejtbe diffundált Biocytinnel feltöltött idegsejt (jobb). **B:** Whole-cell patch clamp technikával regisztrált idegsejt válasza a hiperpolarizáló és a depolarizáló áramlépcsőkre (bal). A fénystimulus kiváltotta gyors depolarizáló posztszinaptikus potenciálokat (közép). Streptavidinnel előhívott sejt, amely a patch clamp elvezetés alatt Biocytinnel lett feltöltve (jobb).

## **A posztzinaptikus potenciálok farmakológiai jellemzése és az azokat fogadó sejtek neurokémiai azonosítása**

A fotostimuláció hatására jelentkező PSP-okat generáló szinaptikus mechanizmusokat farmakológiai módszerekkel vizsgáltuk, majd a regisztrációt követően a vizsgált sejtek neurokémiai identitását immunhisztológiai festésekkel azonosítottuk. Az NBQX alkalmazás minden esetben blokkolta a fénystimulus kiváltotta DPP-okat (kontroll:  $9,776 \pm 1,821$  mV, NBQX:  $0,794 \pm 0,228$  mV;  $n=4/4$   $p=0,058$ , MW U-teszt; 7. ábra: C). Így elmondható, hogy a látott hatás a LH-ből érkező glutamáterg projekció következménye.

A DRM GABA immunpozitív idegsejtjei nagyobb tüzelési rátával, kisebb amplitúdó félszélességgel, csekélyebb mértékű utóhiperpolarizációval és gyorsabb adaptációval jellemezhetőek, mint a DRM szerotonerg neuronjai (Yang és Brown, 2014). A regisztrációk során megfigyeltük, hogy a fiziológiai paramétereik által feltételezhetően 5-HT neuronok (akciós potenciálok közötti intervallum:  $66,28 \pm 4,922$  ms; amplitúdó félszélesség:  $0,68 \pm 0,08$  ms; utóhiperpolarizáció:  $21,66 \pm 5,721$  mV) a LH axonok fotostimulációjára DPP-okkal, a feltételezhetően GABAerg neuronok (akciós potenciálok közötti intervallum:  $17,63 \pm 2,483$  ms; amplitúdó félszélesség:  $1,35 \pm 0,19$  ms; utóhiperpolarizáció:  $20,66 \pm 6,763$  mV) HPP-okkal válaszoltak. Ennek megfelelően korábbi elektrofiziológiai megfigyelésünket a regisztrált neuronokon elvégzett immunhisztokémiával támasztottuk alá. A whole-cell patch clamp elvezetés során Biocytinnel feltöltött és később Streptavidinnel előhívott EPSP-os sejteken 5-HT immunhisztokémiát ( $n=5$ ) végeztünk. A LH fotostimulációra EPSP-okkal válaszoló öt általunk immunhisztokémiával vizsgált sejt 5-HT-immunreaktív volt (7. ábra: A; 8. ábra: D)



**7. ábra: NBQX hatása a regisztrált depolarizáló posztzinaptikus potenciálokra.** **A:** Az elvezetés során Biocytinnel feltöltött, majd Streptavidinnel előhívott sejt 5-HT-pozitív. **B:** A vizsgált sejt membránválasza hiperpolarizáló és depolarizáló áramlépcsőkre. **C:** A fotostimuláció hatására jelentkező DPP-okat az AMPA-/kainát receptor-antagonista, NBQX (lila) blokkolta. Az ábrán a szürke szín jelöli az egyes átfutásokat, a piros színnel pedig ezek átlaga van feltüntetve. A kék színű téglalapok jelzik a fotostimuláció (5 darab 10 ms-os, 20 Hz) időzítését.

Kísérleteinkben az NBQX alkalmazása nem tüntette el a HPP-okat (kontroll:  $7,207 \pm 1,094$  mV, NBQX:  $7,087 \pm 1,076$  mV,  $n=5/5$ ,  $p=0,180$ , MW U-teszt; 8. ábra: B), azonban a GABA<sub>A</sub> receptor blokkoló, gabazin szeletekre mosásával minden alkalommal blokkolni tudtuk a fénystimulus kiváltotta HPP-okat (kontroll:  $7,207 \pm 1,094$  mV, GBZ:  $0,962 \pm 0,276$  mV,  $n=5/5$ ,  $p=0,043$ , MW U-teszt, 8. ábra: B, bal). Továbbá az LH axonális fotostimulációja gátolta a spontán módon aktív neuronok elektromos aktivitását (kontroll:  $12,66 \pm 6,65$  Hz illetve fotostimuláció: 0 Hz, MI -1.0,  $n=3$ , 8. ábra B, bal).

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a LH és a DRM neuronjai közötti gátlás egy közvetlen, monoszínaptikus GABAerg projekció eredménye és kizárható az, hogy a regisztrált IPSP-ok lokális GABAerg interneuron közvetítésével történő glutamaterg projekciók eredményei, ugyanis ez esetben a válaszokat a glutamát receptorok blokkolása megszüntette volna. Megfigyeléseinket azok a kísérletek is alátámasztják, amelyek során az LH

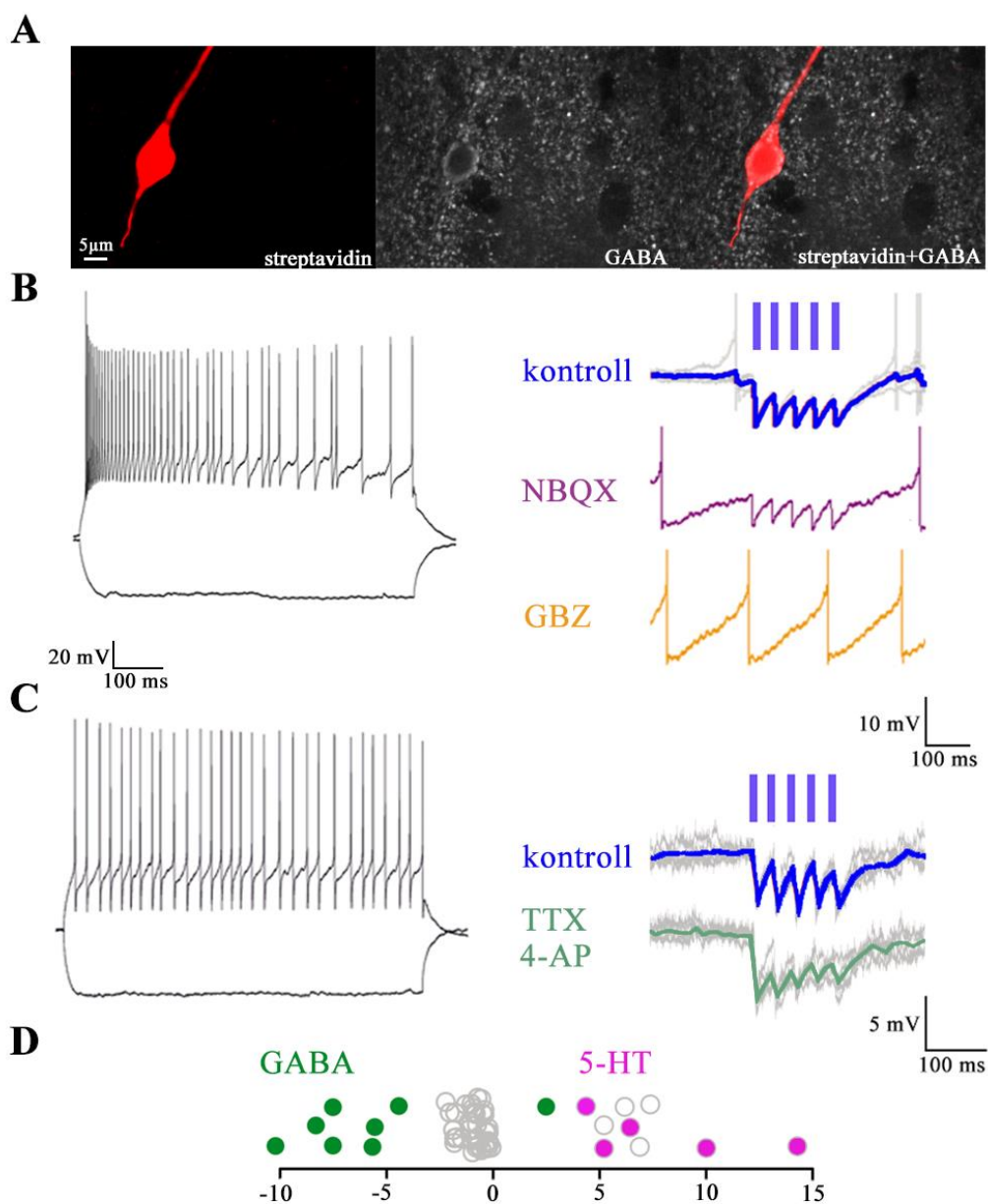
axonok fotostimulálásakor TTX-et (tetrodotoxin, Na<sup>+</sup> csatorna blokkoló) és 4-AP (4-aminopiridin, K<sup>+</sup> csatorna blokkoló) mostunk a szeletekre. A GABA<sub>A</sub> receptor mediált IPSP-ok TTX és 4-AP rámosását követően is jól detektálhatóak voltak (PSP amplitúdó: kontroll: 6,5±0,6 mV, TTX/4-AP: 6,8±0,7 mV, n=6; 8. ábra: C).

Elvezetéseink során IPSP-al válaszoló sejtek egy részén GABA immunhisztokémiát (n=5) végeztünk. A LH fotostimulációra IPSP-okkal válaszoló öt általunk immunhisztokémiával vizsgált sejt mindegyike GABA immunreaktív volt (8. ábra: A, D). Fontos megjegyezni, hogy GAD67-GFP egerekből végzet elvezetések során csakis a GFP pozitív, azaz GABAerg sejtekből (n=3) vezettük el. A három regisztrált GFP pozitív sejt közül kettő válaszolt IPSP-al és egy EPSP-al a fotostimulációra.

Mindezeket figyelembe véve elmondható, hogy az általunk vizsgált összes olyan sejt, amely a LH-ból érkező axonok fotostimulálására IPSP-al válaszolt GABAerg interneuron és a DRM GABA neuronok jelentős részénél az LH axonális fotostimulációra IPSP-ált váltott ki (8. ábra: D).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a LH-ból érkező ChR2-t expresszáló axonok lokális fotostimulációja bizonyos DRM neuronokban AMPA-/kainát receptor mediált excitatorikus, míg más sejtekben GABA<sub>A</sub> receptor mediált inhibitorikus PSP-okat váltott ki és a PSP-ok polaritása jól korrelál a DRM neuronok neurokémiai identitásával.



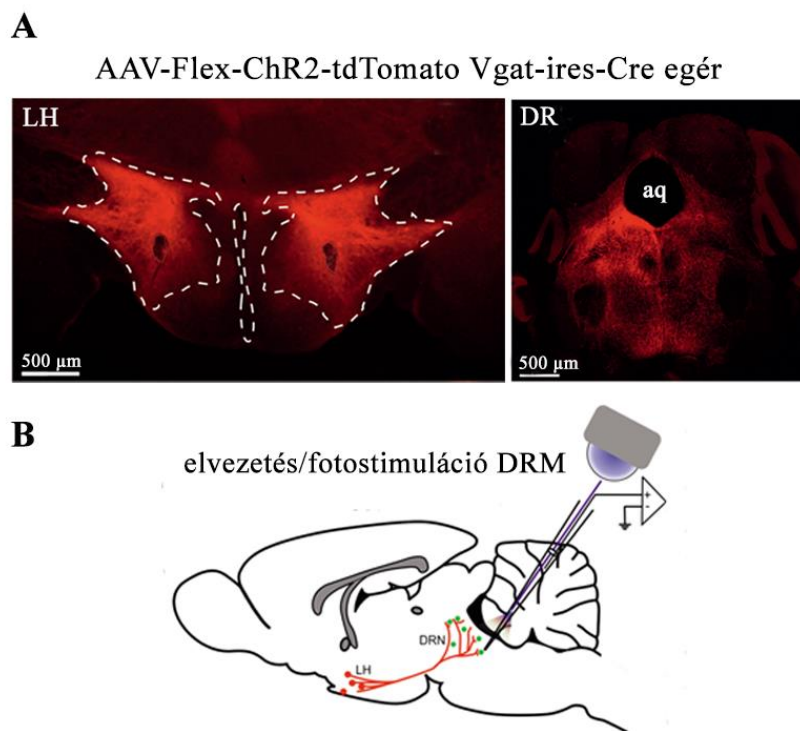


**8. ábra: A regisztrált hiperpolarizáló posztszinaptikus potenciálok farmakológiai vizsgálata. A:** Az elvezetés során Biocytinnel feltöltött, majd Streptavidinnel előhívott sejt GABA immunreaktív. **B:** A regisztrált idegsejt membránválasza hiperpolarizáló és depolarizáló áramlépcsőkre (bal). Az NBQX alkalmazása nem blokkolta a fotostimuláció kiváltotta IPSP-okat (lila, jobb), azonban GBZ rámosásával blokkolni tudtuk a detektált eseményeket (narancssárga; jobb). **C:** A regisztrált idegsejt membránválasza hiperpolarizáló és depolarizáló áramlépcsőkre (bal). A fotostimuláció indukálta IPSP-ok jól detektálhatóak voltak 4-AP és TTX (zöld, jobb) jelenlétében is. **D:** Az összes elvezetett DRM neuronon (n=51) detektált PSP amplitúdó eloszlása. Zöld körök: azonosított GABAerg neuronok (n=5 immunhisztokémia, n=3 GFP pozitív GABAerg sejt GAD67-GFP egérből), ciklámen körök: 5-HT immunpozitív idegsejtek, szürke körök: azonosítatlan idegsejtek.

## A LH és a DRM funkcionális kapcsolatának vizsgálata *in vivo*

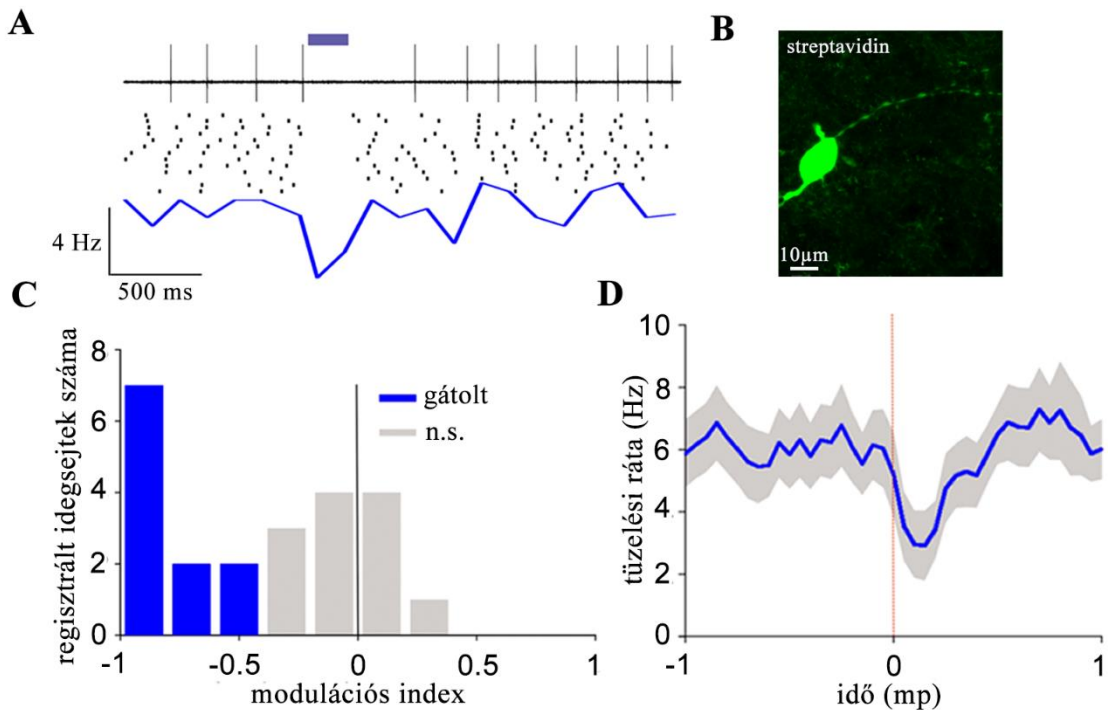
### Altatózott állatokból végzett egység elvezetés és juxtacelluláris jelölés

*In vitro* kísérleti eredményeinket követően azt vizsgáltuk, hogy intakt állatban milyen hatással van a vírussal fertőzött LH GABAerg axonok fotostimulációja a DRM neuronok spontán elektromos aktivitására. A specifikus GABAerg kapcsolatok vizsgálata érdekében Vgat-ires-Cre egerek LH-át (n=10) AAV1-CAGGS-FLEX-CHR2-tdTOM-SV40 vírussal fertőztük (9. ábra: A). A fertőzést követően extracelluláris egység elvezetést végeztünk altatózott egerek DRM neuronjaiból, mialatt a LH ChR2-t expresszáló axonjait lokálisan fotostimuláltuk (9. ábra: B).



**9. ábra: ChR2-tdTomato expresszió a LH és a DRM területén.** A: A Vgat-ires-Cre egerek LH-ba történő AAV-Flex-ChR2-tdTomato vírus injektálását követően erőteljes ChR2 expresszió figyelhető meg a fertőzött területen (bal), valamint a DRM területére projektáló axonokban (jobb). B: Sematikus ábra az *in vivo* kísérleti felállásról.

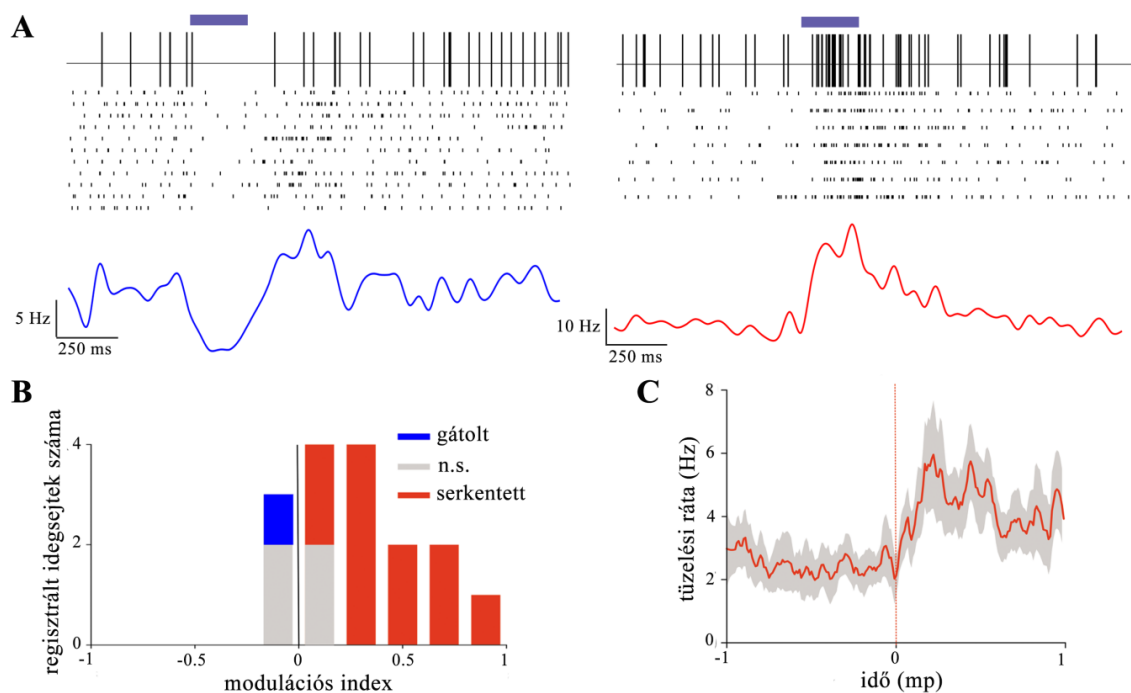
Méréseink során a DRM területére vetítő LH<sub>Vgat</sub> axonok lokális fotostimulációja gyors aktivitás csökkenést (a kontroll  $42,37 \pm 5,94\%$ -a; 10. ábra: A) eredményezett a vizsgált DRM neuronok spontán aktivitásában (kontroll:  $7,72 \pm 6,43$  Hz, fotostimuláció:  $5,37 \pm 3,77$  Hz,  $p < 0,001$  MW U-teszt, n=25; 10. ábra: C, D). A elvezetések során nyolc DRM neuront jelöltünk juxtacelluláris technikával, amelyek a DRM-on belüli elhelyezkedésük, morfológiájuk és spontán tüzelési rátájuk  $\geq 6$  Hz alapján vélhetően GABAerg interneuronok (Allers és Sharp, 2003).



**10. ábra: A LH-ból érkező GABAerg projekciók hatása a DRM idegsejtek spontán neuronális aktivitására *in vivo*.** **A:** A LH-ból a DRM területére projektáló axonok fotostimulációja (5 darab 10 ms-os, 20 Hz, kék téglalap) a regisztrált DRM neuron spontán aktivitását csökkentette. Az ábra közepén lévő „raster plot”-on minden egyes fekete vonal egy önálló akciós potenciált jelöl, míg a sorok az egyes átfutásokat ábrázolják. A PSTH (kék vonal) a regisztrált neuron átlag tüzelési rátáját ábrázolja. **B:** A regisztrált idegsejtet juxtacelluláris technika segítségével Biocytinnel feltöltöttük, majd Streptavidin festéssel láthatóvá tettük. **C:** Az altatott VGAT-ires-Cre egerekből (n=10) regisztrált DRM idegsejtek (n=25) modulációs indexe (kék: fotostimuláció által gátolt sejtek, szürke: szignifikáns változást nem mutató sejtek). **D:** Az összes regisztrált neuron (n=25) átlagolt PSTH-ja (kék: átlag, szürke sáv:  $\pm$ SEM).

### Éber, fejrögzített egerekből végzett elvezetés

Éber, fejrögzített állatokból (n=4) való elvezetések során a regisztrált DRM sejtek 17 %-nál (2/12) fotostimulációt követő aktivitás csökkenést figyeltünk meg (kontroll:  $6,52 \pm 4,26$  Hz, fotostimuláció:  $4,32 \pm 3,16$  Hz;  $p < 0,001$ , Wilcoxon teszt; 11. ábra: A-B). A többi vizsgált DRM neuron esetén (10/12, 83%) fotostimulációt követően emelkedett aktivitást tapasztaltunk (kontroll:  $7,67 \pm 6,87$  Hz, fotostimuláció:  $10,98 \pm 8,920$  Hz, n=12,  $p < 0,001$ , Wilcoxon teszt; 11. ábra: A-B). Az aktivitásváltozás látenciája viszonylag lassú ( $\sim 200$  ms), de körülbelül 1 mp-ig emelkedett maradt.



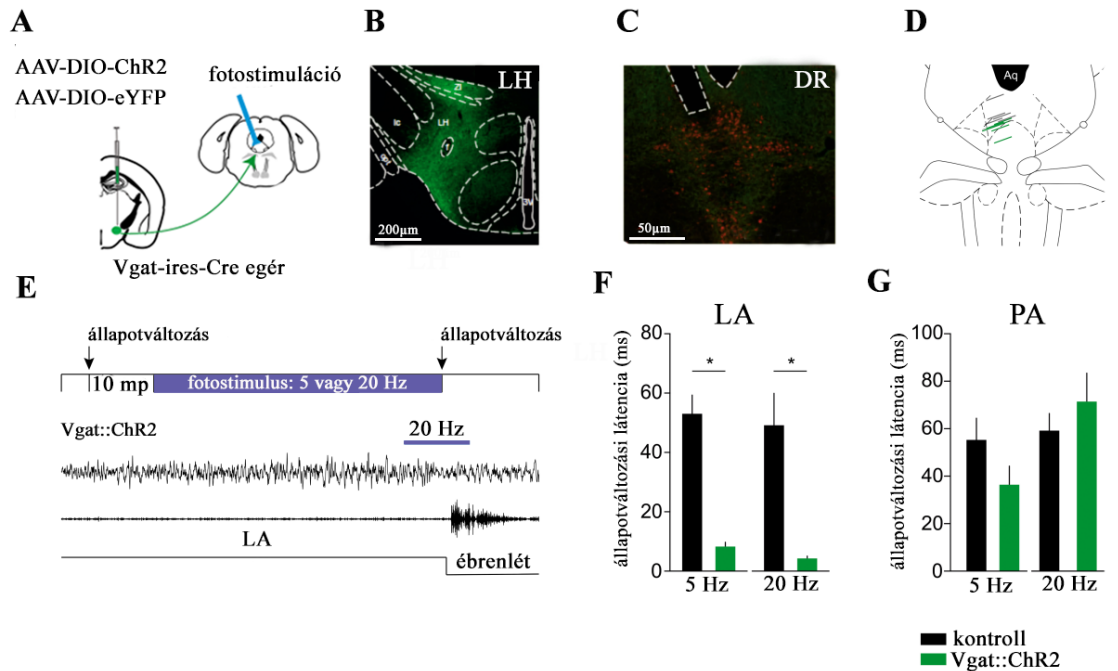
**11. ábra:** Az LH axonok fotostimulációjának hatása a DRM neuronok spontán aktivitására éber állatokban. **A:** A LH fotostimuláció hatására (5 darab 10 ms-os, 20 Hz, kék téglalap) egyes DRM neuronok aktivitása csökkent (bal), más sejtéké emelkedett (jobb). Az ábra tetején lévő „raster plot”-on minden egyes fekete vonal egy önálló akciós potenciált jelöl, míg a sorok az egyes átfutásokat ábrázolják. Alul: PSTH. **B:** Az éber egerekből (n=4) elvezetett DRM idegsejtek (n=12) modulációs index eloszlása (kék: gátolt, piros: serkentett, szürke: nem szignifikáns;  $p < 0,001$  MW U-teszt) **C:** Az összes regisztrált neuron (n=12) átlagolt PSTH-ja (piros: átlag, szürke sáv:  $\pm$ SEM).

*In vivo* eredményeink jól reprezentálják a LH és a DRM közötti funkcionális kapcsolatot. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a  $LH_{Vgat}$  neuronjai gátló hatást fejtenek ki a DRM feltételezhetően GABAerg sejtjeire, aminek következménye a DRM nem GABAerg neuronjainak feltételezett diszinhibíciója.

### A DRM-be vetítő LH-ből érkező GABAerg projekciók hatásának vizsgálata az alvás-ébrenlét ciklus alatt

További kísérleteinkben a  $LH_{Vgat}$ -DRM projekciók hatását vizsgáltuk az alvás-ébrenlét ciklusra. Annak érdekében, hogy kifejezetten a LH gátló bemenetek hatását vizsgáljuk  $Vgat$ -ires-Cre egereket fertőztünk AAV2-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP (ChR2-EYFP) vírussal (n=6). A kontroll csoport egereinek LH-ba pedig AAV2-EF1a-DIO-eYFP vírust injektáltunk (n=5) (12. ábra: A, B). A alvás-ébrenlét ciklus szakaszait EEG és EMG szimultán regisztrálásával különítettük el. Az  $LH_{Vgat}$  axonok fotostimulációját (5 vagy 20 Hz-es 5 ms-os fényfelvillanás, 473 nm kék fény) a DRM fölé helyezett optikai szál tette lehetővé (12. ábra: C, D). Minimum 10 másodperc stabil alvási állapot beállta után (LA vagy PA) stimuláltuk a DRM-

ba vetítő LH<sub>Vgat</sub> rostokat mindaddig, amíg állapotváltozást észleltünk (12. ábra: E). A fotostimuláció gyors (<7 mp) ébredést idézett elő LA állapotból (p<0,0001, három-utas ANOVA; 12. ábra: F), azonban a PA fázisban történt fotostimuláció nem vezetett állapotváltozáshoz (12. ábra, G).



**12. ábra: A GABAerg LH-DRM projekciók hatása az alvás-ébredési ciklus állapotváltozásaira.**  
**A:** A kísérleti felállás sematikus ábrázolása. **B:** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópiás felvétel a LH területén megfigyelhető ChR2-eYFP expresszióról. **C:** Az agytörzs területére helyezett optikai szál pozíciója a DRM fölött; zöld: Chr2-t expresszáló LH-ból DRM-ba vetítő axonok, piros: DRM szerotonerg (triptofán-hidroxiláz immunpozitív) neuronok lokalizációja. **D:** Az implantált optikai szálak pozíciója a 11 vizsgált állat esetében. **E:** A kísérletek során alkalmazott fotostimuláció időzítésének sematikus ábrázolása (fent). Reprezentatív EEG/EMG felvétel, amely az optogenetikai stimuláció hatására bekövetkezett állapotváltozást szemlélteti (közép). Jól megfigyelhető a fotostimulus hatására bekövetkező EEG deszinkronizáció, valamint az intenzívebb EMG aktivitás. **F:** A LA → ébredés állapotváltás latenciája. **G:** A PA → ébredés állapotváltás latenciája.

Az általunk vizsgált LH<sub>Vgat</sub>-DRM projekcióknak jelentős szerepük van az alvásból ébredési állapotba való átmenetbe. Eredményeink tehát kiegészítik, egy új gátló projekció azonosítása által, azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint a LH<sub>Vgat</sub> neuronok az alvás-ébredési ciklus fontos szabályozói.

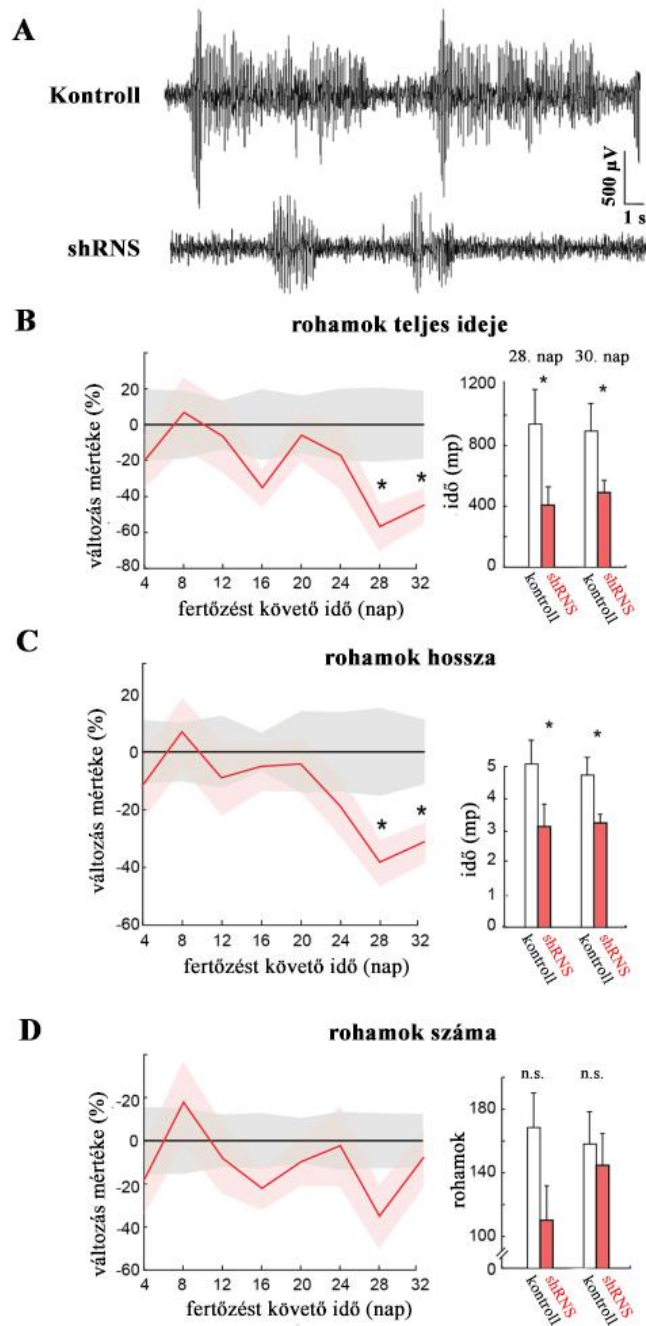
## **Patofiziológias agyi állapot: epilepszia**

### **STG egértörzs absence rohamainak vizsgálata a HCN2 csatorna csendesítését követően**

Az AE-ás rohamok a talamo-kortiko-talamikus hálózat osszillációiban keletkeznek, így a rohamok generálásában közrejátszó mechanizmusok jelentős része közvetlen módon köthető össze a hálózat működésével (Blumenfeld, 2005, Crunelli és mtsai., 2020). A rohamok patofiziológiájában a kérgi és talamokortikális relé sejtek többségében megtalálható HCN csatornák diszfunkciójának jelentős szerepe van (Di Pasquale és mtsai., 1997, Ludwig és mtsai., 2003), de a tüske-hullámok keletkezésében betöltött pontos szerepük tisztázatlan. Munkák során az AE egyik széles körben elterjedt modelljében, a STG egértörzsben vizsgáltuk a talamik HCN2 csatornák csökkent expressziójának hatását az absence rohamokra. Ennek érdekében szabadon mozgó STG egerek EEG aktivitását regisztráltuk (13. ábra: A). A monitorozást a fertőzést követően egy hónapon keresztül, minden negyedik napon végeztük. A HCN2 csatornák genetikai csendesítését virális fertőzés segítségével értük el. A STG egerek (n=9) VB talamuszába HCN2 gént csendesítő shRNS-t tartalmazó virális vektort juttatunk (14. ábra, fent). Kontroll csoportként pedig a HCN2 gént nem csendesítő shRNS-t kódoló vírussal injektált STG egereket (n=9) alkalmaztuk.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a rohamok teljes ideje szignifikánsan csökkent a csendesítő shRNS-el fertőzött STG egerekben a kontroll csoporthoz képest ( $57\pm 12$  és  $45\pm 9\%$ ,  $p=0,036$  és  $p=0,029$ , MW U-teszt, n=9/ csoport, 13. ábra: B), a fertőzést követő 28. és 32. napon. Ezekon a napokon az egyedi rohamok hosszában szintén szignifikáns eltérést detektáltunk (kontroll:  $38\pm 7\%$ ; csendesítő sRNS:  $31\pm 6\%$ ,  $p=0,035$  és  $p=0,043$ , MW U-teszt, 13. ábra: C). A HCN csatornák genetikai csendesítése a rohamok gyakoriságában is csökkenést eredményezett, azonban ez nem volt szignifikáns ( $35\pm 14$  és  $8\pm 12\%$   $p=0,056$  és  $p=0,42$ , MW U-teszt), (13. ábra: D).

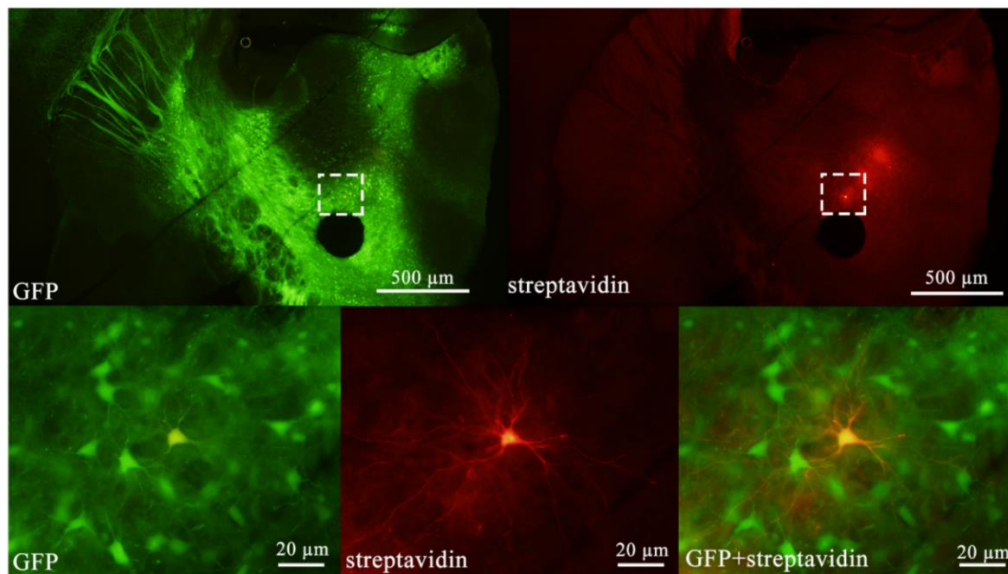
Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a talamokortikális relé sejtek HCN2 csatornái és az általuk kialakított  $I_h$  jelentős mértékben befolyásolja az absence roham alatt megfigyelhető SWD-ok megjelenését és hosszát.



**13. ábra:** A HCN2 csatorna gént csendesítő shRNS bilaterális injektálásának hatása a szabadon mozgó STG egerek absence rohamaira. **A:** Reprezentatív EEG felvétel egy kontroll (fent) és HCN2 csendesítést (lent) követő spontán SWD-ről. **B-D:** A HCN2-t csendesítő shRNS hatása a rohamokkal töltött teljes időre (**B**), az egyedi rohamok hosszára (**C**) és a rohamok számára (**D**). A fekete vonal a kontroll vírussal fertőzött egerekből (n=9) származó eredményeket, míg a piros vonal a csendesítő shRNS-el injektált állatok (n=9) eredményeit jelöli. A jobb oldalon látható oszlopdiagramok reprezentálják a 28. és 32. napon mért rohammal töltött teljes idő, egyedi rohamok hosszának és a rohamok számának abszolút értékeit. Az adatok átlagai $\pm$ SEM lett feltüntetve és a szignifikanciát a \* ( $p < 0.05$ ) jelöli; n.s.: nem szignifikáns.

## A HCN2 gént csendesítő shRNS celluláris hatásának vizsgálata

EEG/EMG kísérleteinket követően az általunk alkalmazott kontroll és HCN2 gént csendesítő shRNS celluláris, funkcionális hatását vizsgáltuk. Ennek érdekében a fertőzést követően 28-36 nap elteltével csoportonként 4-4 STG egér VB talamuszát tartalmazó túlélő agyszletelekből végeztünk *in vitro* whole-cell patch clamp elvezetéseket. Annak érdekében, hogy még biztosabb képet kapjunk az általunk alkalmazott genetikai csendesítés talamokortikális relé neuronokra gyakorolt sejtszintű hatásáról, VT egerek VB magját is megfertőztük a HCN2 gént csendesítő (n=3) és nem csendesítő (n=3) shRNS-t tartalmazó vírussal (14. ábra, fent). A HCN2 csatorna gént csendesítő és nem csendesítő shRNS-el fertőzött sejtek azonosítását a vírushoz kapcsolt GFP fluorofór tette lehetővé. Elvezetéseinket minden esetben ezekből a GFP pozitív VB talamusz területén található talamokortikális relé sejtekből végeztük (14. ábra, lent). A regisztrálás során a sejtek különféle elektrofiziológiai tulajdonságait monitoroztuk. A VT és az STG egerekből hasonló eredményeket kaptunk, így a két törzs elektrofiziológiai adatait összesítve értékeltük.

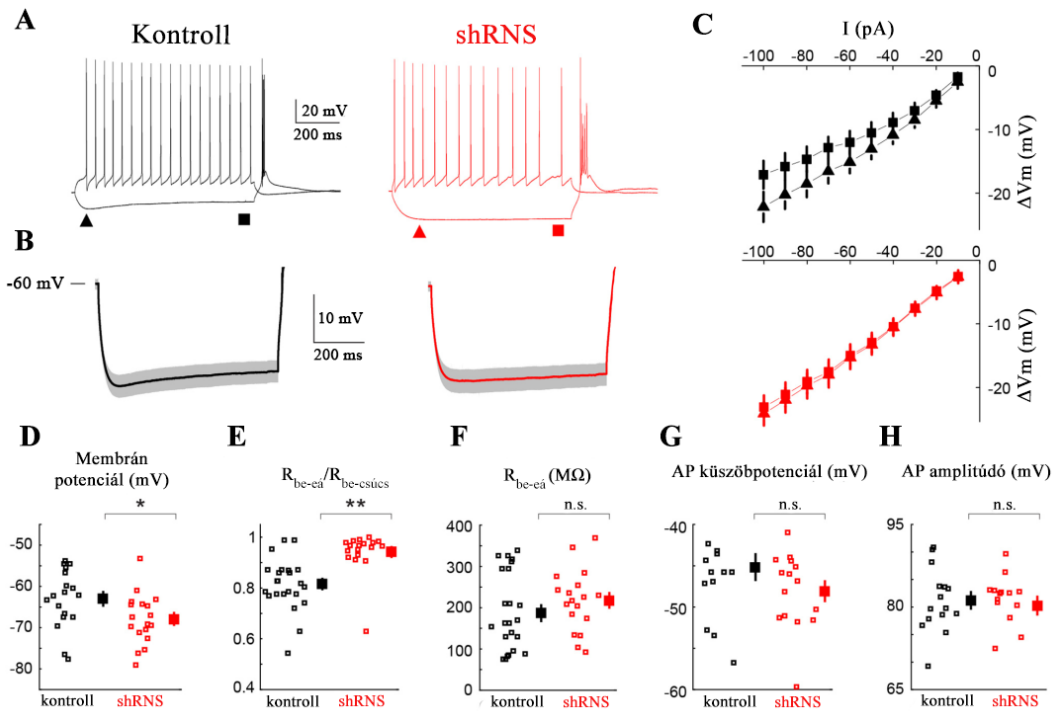


**14. ábra:** HCN2 csatornát csendesítő shRNS fertőzés a VB talamusz területén. Az elvezetéseink során a GFP pozitív (zöld), shRNS-el fertőzött talamokortikális relé sejteket Byocitinnel töltöttük fel, amely lehetővé tette a későbbi azonosításukat Streptavidin immunfestést (piros) követően. A fehér szaggatott téglalap jelöli a felnagyított területet.



A HCN2 csatorna gént csendesítő shRNS-sel fertőzött talamokortikális relé neuronok nyugalmi membránpotenciálja a kontroll (HCN2 csatorna gént nem csendesítő shRNS-sel fertőzött) neuronokénál hiperpolarizáltabb volt ( $-68 \pm 6$  mV;  $n=18$ , illetve:  $-63 \pm 7$  mV,  $n=18$ ,  $p=0,032$ , MW U-teszt; 15. ábra: D). Továbbá a hiperpolarizáló áramlépcső hatására megfigyelhető HCN2 csatorna mediált depolarizáció szinte teljes mértékben megszűnt a HCN2 csatorna csendesített sejtekben, míg a kontroll vírussal fertőzött sejtek esetén megfigyelhető volt (15. ábra: A-B). Minél negatívabb áramlépcsőt injektáltunk a regisztrált sejtbe, annál nagyobb feszültség különbséget mértünk a feszültségválasz eleje és vége között, amelyet a HCN csatornák aktivációja eredményezett (15. ábra: C, fent), de ez a különbség a HCN2 csendesített neuronok esetén nem volt kimutatható (15. ábra: C, lent). Az elvezetett sejtek bemenő ellenállása, amelyet a hiperpolarizáló áramlépcsőre adott feszültség válasz kezdeti pontján mértünk hasonló volt a két csoport esetében ( $217 \pm 75$  MOhm  $n=18$ , és  $186 \pm 73417$  MOhm  $n=18$ ,  $p=0,56$ ; MW U-teszt; 15. ábra: F). Azonban a kezdeti és a végpontban mért bemenő ellenállás ( $R_{be}$ ) aránya ( $R_{be-eá}/R_{be-csúcs}$ ) szignifikánsan nagyobb volt a HCN2 csatorna gén csendesített talamokortikális relé sejtekben, mint a HCN2 csatornát továbbra is kifejező relé neuronokban ( $0,94 \pm 0,08$  és  $0,82 \pm 0,01$ ,  $n=18$ ,  $p=6,2,10^{-5}$ ; MW U-teszt; 15. ábra: E). Mindez arra utal, hogy a hiperpolarizáló lépcső okozta depolarizáció csökkenése a HCN2 csatorna gén csendesített talamokortikális relé sejtekben nem a bemenő ellenállások eltéréseiből fakad.

A HCN2 csatornák genetikai csendesítése nem volt hatással a talamokortikális relé sejtek akciós potenciáljainak tulajdonságaira (küszöbpotenciál: kontroll:  $-45 \pm 6$  mV; HCN2 csendesített:  $-48 \pm 5$  mV; amplitúdó:  $82 \pm 2$  mV és  $80 \pm 2$  mV,  $n=18$ ,  $p=0,17$  és  $p=0,46$ ; MW U-teszt, 15. ábra: G-H), ami a beavatkozás HCN2 csatornákra gyakorolt szelektív hatására utal.

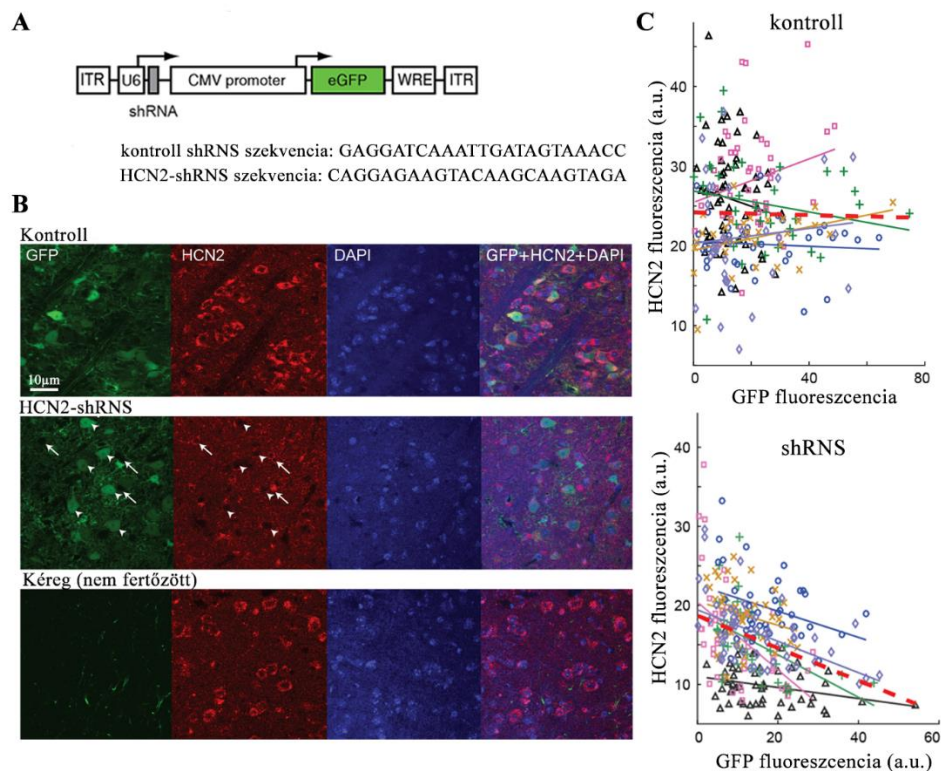


**15. ábra: HCN2 csatorna génjét csendesítő shRNS hatása a talamokortikális relé sejtek membrántulajdonságaira *in vitro*.** **A:** Kontroll (fekete) és a HCN2 csatorna gén csendesített (piros) talamokortikális relé neuronok reprezentatív feszültség válaszai a hiperpolarizáló (-100 pA) és a depolarizáló (50pA) áramlépcsőkre. A membránpotenciál mindkét esetben: -60 mV. A háromszögek a kezdeti, a négyzetek a hiperpolarizáló áramlépcsőre adott membránválaszok végénél mért értékeket jelölik. **B:** Az átlagolt hiperpolarizáló áramlépcsőre adott membránválaszokon (folyamatos vonal: átlag; szürke sáv:  $\pm$ SEM) jól látható a kontroll (n=18) és HCN2 csendesített (n=18) neuronok közötti különbség. **C:** Az összes regisztrált idegsejt feszültség-áram diagramján megfigyelhető a befelé rektifikáló membránválasz hiánya a HCN2 csatorna csendesített csoport esetén. A nyugalmi membránpotenciál (**D**), a  $R_{be-eá}$  és a  $R_{be-csúcs}$  arány (**E**), az egyensúlyban mért membrán ellenállás ( $R_{be-eá}$ ), (**F**), az akciós potenciál küszöbértékének (**G**) és az amplitúdójának (**H**) értékei a két csoport esetén. A grafikonokon az üres négyszögek (fekete-kontroll, piros-shRNS) az egyes neuronok adatait, a nagy szimbólumok pedig azok átlagát $\pm$ SEM-t jelölik. A szignifikáns eltéréseket a \* ( $p < 0.05$ ) és a \*\* ( $p < 0.01$ ) jelölés mutatja, n.s.: nem szignifikáns.

### Genetikai inaktiváció utáni HCN2 csatorna expresszió vizsgálata

Az EEG vizsgálat és az *in vitro* elektrofiziológiai méréseket követően anti-HCN2 és DAPI immunfestést (16. ábra: B) végeztünk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az általunk alkalmazott genetikai csendesítés hatását a HCN2 csatorna expresszióra. Mind a kontroll, mind pedig a csendesítő shRNS-el fertőzött csoportból 6-6 egérből származó 1-1 szelet fluorofór intenzitását vizsgáltuk. A HCN2 immunfestés sejtenkénti intenzitását korreláltattuk a GFP jel sejtenkénti intenzitásával. Megállapítottuk, hogy a csendesítő shRNS-el fertőzött szeletek esetében negatív korreláció figyelhető meg a két jel között (lineáris regresszió az összes adatpont összevonásával:  $R^2=0,12$ ,  $p=3,82 \times 10^{-9}$ ; metszetenként:  $p=0,041$ ,  $0,0006$ ,  $0,001$ ,  $0,03$ ,

0,17 és 0,0001; 16. ábra: C, lent). Továbbá a GFP pozitív, csendesítő shRNS-sel fertőzött talamokortikális relé neuronok anti-HCN2 immunreakciója jelentősen kisebb volt (16. ábra: B, közép), mint a kontroll shRNS-el fertőzött relé sejtek esetén (16. ábra: B, fent), ugyanis a kontroll, nem csendesítő shRNS-el fertőzött minták esetében nem találtunk korrelációt a GFP és a HCN2 szignálok között (lineáris regresszió az összes adatpont összevonásával:  $R^2=0,0004$ ,  $p=0.77$ ; metszetenként:  $p=0,31$ ,  $0,14$ ,  $0,23$ ,  $0,67$ ,  $0,051$ , és  $0,59$ ; 16. ábra: C, fent). Az agykérgi területeken GFP expressziót kizárólag axonokban detektáltunk, tehát a HCN2 csendesítés a talamikus területekre korlátozódott. Ennek megfelelően a kérgi HCN2 expresszió erőteljes maradt (16. ábra, B alul).



**16. ábra: A HCN2 csendesítés hatása a csatornák talamikus és kortikális expressziójára. A:** Az alkalmazott AAV vírus konstrukciók szekvenciái. **B:** DAPI (kék), GFP (zöld) és HCN2 (piros) jelölés konfokális felvételei kontroll (felső sor), HCN2 csatorna csendesített állatok talamikus (középső sor) és kérgi területéről (alsó sor). A fehér nyílhegyek az erősen GFP pozitív, a nyilak az erősen HCN2 pozitív sejtek helyét mutatják **C:** A GFP és HCN2 pozitív fluoreszcencia-intenzitások sejtenkénti korrelációja kontroll (felül) és HCN2 csendesített (alul) esetekben. Egy-egy szimbólum egy-egy vizsgált idegsejtet jelöl. A hasonló színű szimbólumok egyetlen metszeten származnak. A metszetenkénti lineáris regressziót az adott szín, a piros szaggatott vonal a teljes vizsgált populáció lineáris regresszió eredményét ábrázolja.

Immunhisztokémiai vizsgálataink alátámasztják az általunk alkalmazott HCN2 csatornák genetikai csendesítésének hatékonyságát, amely lehetővé tette a csatorna-diszfunkciók agyterület-specifikus vizsgálatát.

## Megbeszélés

### **LH-DRM projekció funkcionális kapcsolatának vizsgálata**

Az alvás-ébrenlét ciklus váltakozása egyike a legalapvetőbb biológiai ritmusoknak. Mind az alvásért, mind az ébrenlétért különböző idegrendszeri struktúrák felelősek. A legfontosabb agyi régiók, amelyek részt vesznek a napi periodicitás és az éberség kialakításában a hipotalamusz és az agytörzs (Fuller és mtsai., 2006). A LH-on belül mind az orexinerg, mind pedig a MCH neuronok fontos szerepet játszanak az alvás-ébrenlét ciklus szabályzásában (Jones, 2020). Az orexinerg neuronok elektromos aktivitása ébrenlét alatt a legkifejezettebb, továbbá optogenetikai aktiválásuk ébresztő hatású (Adamantidis és mtsai., 2007). Az MCH idegsejtek aktivitása viszont a LA fázisában emelkedett és tüzelési frekvenciájuk maximumát a PA alatt éri el. Optogenetikai kísérletek bizonyítják, hogy jelentős szerepet töltenek be mind az LA, mind pedig a PA kialakulásában (Hassani és mtsai., 2009b). Újabb vizsgálatok szerint a LH<sub>Vgat</sub> idegsejtek szintén jelentős szerepet játszanak az alvás-ébrenlét fázisainak koordinálásában. Tüzelési aktivitásuk az ébrenlėti és a PA fázisban emelkedett (Venner és mtsai., 2016, Venner és mtsai., 2019), szelektív stimulációjuk ébresztő hatású (Herrera és mtsai., 2016, Venner és mtsai., 2019). Az agytörzs területén elhelyezkedő DRM szerotonerg neuronjainak specifikus stimulációja egyes kísérleti eredmények alapján ébresztő (Ito és mtsai., 2013), míg más vizsgálatok alapján hipnogén hatású (Oikonomou és mtsai., 2019). A DRM neuronok aktivitása ébrenlét alatt fokozódik, LA alvás alatt jelentősen csökken és szinte teljes mértékben megszűnik PA alatt (Lőrincz és Adamantidis, 2017). A LH és DRM közötti kölcsönös kapcsolat bizonyított (Gervasoni és mtsai., 2000, Weissbourd és mtsai., 2014), azonban ennek funkcionális jelentősége még nem tisztázott.

*In vitro* elektrofiziológiai eredményeink alapján elmondható, hogy LH-ból érkező Chr2-t expresszáló axonok lokális fotostimulációja bizonyos DRM neuronokban AMPA-/kainát receptor mediált excitatorikus, míg más sejtekben GABA<sub>A</sub> receptor mediált inhibitorikus PSP-okat váltott ki és a PSP-ok polaritása jól korrelál a DRM neuronok neurokémiai identitásával. Farmakológiai vizsgálataink eredményei monoszinaptikus serkentő és gátló kapcsolatokat bizonyítanak. *In vivo* elektrofiziológia eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az LH→DRN projekciók hatása számottevő, ugyanis a LH fotostimulációja mind altatott, mind pedig éber állatok DRM neuronjainak spontán elektromos aktivitását nagymértékben képes befolyásolni.

Immunhisztokémia vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy *in vitro* elvezetéseink során az általunk vizsgált összes olyan sejt, amely a LH-ból érkező axonok fotostimulálására IPSP-al válaszolt GABAerg interneuron és a DRM GABA neuronok jelentős részénél az LH axonális fotostimulációra IPSP-t váltott ki. Mindemellett altatott állatokból származó méréseink során a GABAerg LH axonok lokális fotostimulációja gyors aktivitás csökkenést eredményezett feltételezett DRM GABAerg neuronokban. Közismert, hogy a GABAerg idegsejtek az agy minden területén megtalálhatóak, nem meglepő tehát, hogy a GABA-t szintetizáló gátló idegsejtek bizonyos populációinak jelentős szerepe van az alvás-ébrenlét ciklus szabályzásában. Egyes gátló idegsejtek jelentős szerepet töltenek be az ébrenléti állapot kialakításában és fenntartásában (Brown és mtsai., 2012). A bazális előagy és a ventrális tegmentális terület GABAerg neuronjai szerepet játszanak az ébrenléti állapotra jellemző EEG deszinkronizáció kialakításában. Továbbá, ezeken a területeken a GABAerg idegsejtek aktivitása PA és ébrenlét alatt is emelkedett (Korotkova és mtsai., 2003, Hassani és mtsai., 2009a). A glutamaterg talamokortikális relé neuronok és a gátló nRT sejtek bizonyítottan nélkülözhetetlenek az alvás-ébrenlét során megfigyelhető talamikus oszcilláció kialakításában (Brown és mtsai., 2012). A striátum GABAerg tüskés sejtjei a *substantia nigra pars reticulata* diszinhibíciója által képesek befolyásolni a talamokortikális relé neuronok aktivitását. Továbbá a LA-ból ébrenléti állapotba való átmenet során tüzelési módjuk megváltozik. Ez a megváltozott komplex aktivitás az ébrenlétre jellemző deszinkronizált EEG aktivitással társul (Mahon és mtsai., 2006). Bizonyított, hogy az LH<sub>Vgat</sub> neuronjai monoszínaptikus kapcsolatokon keresztül gátolják az nRT sejteket, ébredést eredményezve LA-ból, azonban PA-ból nem (Herrera és mtsai., 2016). Az LH<sub>Vgat</sub> sejtjei a ventrolaterális preoptikus terület hipnogén sejtjeit monoszínaptikus kapcsolatok által gátolják, ez által szintén az ébrenléti állapotot támogatják (Venner és mtsai., 2019). Az LH<sub>Vgat</sub> idegsejtek a talamusz és a ventrolaterális preoptikus terület mellett, számos olyan agyi régióba projektálnak, amelyek ébrenlétet támogató hatása közismert, ilyen például a *locus coeruleus*, a *nucleus tuberomamillaris*, a periaqueductális szürkeállomány és a DRM (Venner és mtsai., 2016). Azonban ezeknek a kapcsolatoknak az ébrenléti állapothoz való hozzájárulása még nem teljesen tisztázott.

A DRM területére vetítő LH<sub>Vgat</sub> projekciók funkcionális vizsgálata során kimutattuk, hogy lokális optogenetikai aktivációjuk ébredést idéz elő LA-ból, azonban PA-ból nem. Eredményeink alátámasztják és kiegészítik az említett korábbi tanulmányok megfigyelését, miszerint az LH<sub>Vgat</sub> neuronok jelentős mértékben szabályozzák az alvásból ébrenléti állapotba való átmenetet. Figyelembe véve, hogy a LH-on belül több gátló sejtpopuláció ismert (Mickelsen és mtsai., 2017), további kísérletek szükségesek annak érdekében, hogy

meghatározzuk az említett folyamatok háttérében álló LH<sub>Vgat</sub> idegsejtek pontos neurokémiai identitását.

Altatót és éber állatokból származó vizsgálataink során megfigyeltük, hogy az LH<sub>Vgat</sub> neuronjai gyors és erőteljes gátlást fejtenek ki a DRM feltételezhetően GABAerg sejtjeire, aminek következménye a DRM nem GABAerg neuronjaink diszinhibíciója. A diszinhibíció sejtes elemeinek pontos meghatározásához – figyelembe véve az RM nagyfokú neurokémiai és fiziológiai heterogenitását (Szonyi és mtsai., 2016, Sos és mtsai., 2017) – további kísérletek szükségesek. Ismert, hogy az 5-HT idegsejtek aktivitásának fokozódása gyorsan és erőteljesen befolyásolja a kérgi idegsejtek aktivitását (Lottem és mtsai., 2016) és ez által az agyi állapotok változásához vezethet. Újabb kutatási eredmények kimutatták, hogy a DRM 5-HT pozitív idegsejtjeinek tónusos aktivitása alvást idéz elő, míg a kisüléssorozat tüzelési aktivitásuk ébrenléti állapotot idéz elő (Oikonomou és mtsai., 2019). Eredményeinket figyelembe véve lehetséges, hogy a korábban megfigyelt DRM neuronok fázikus aktivitás változásai és ezek kérgi hatásai részben a LH<sub>Vgat</sub> neuronok megváltozott aktivitásából származnak.

Összegzésképpen elmondható, hogy a LH és DRM neuronok közötti gátló kapcsolat fontos szerepet játszik az alvás és ébrenlét közötti állapotváltásban (Gazea, Furdan és mtsai., 2021).

### **A hiperpolarizáció által aktivált ionáram és az absence rohamok közötti kapcsolat**

Ismert, hogy az absence rohamok során a talamo-kortiko-talamikus hálózatot alkotó idegsejtek hiperszinkronizált állapotba kerülnek (Crunelli és mtsai., 2020). A T-típusú Ca<sup>2+</sup> és a HCN csatornák működése alapozza meg az nRT és talamokortikális relé sejtek azon intrinszik tulajdonságait, amelyek hozzájárulnak a normál ritmikus oszcillációk kialakításához és fenntartásához (Luthi és McCormick, 1998a). Alul vagy túlműködésük az absence rohamok során hozzájárul a talamo-kortiko-talamikus hálózat oszcillációiban megjelenő SWD-hoz (Blumenfeld, 2005). Azonban a mai napig vitatott, hogy pontosan mely celluláris elem(ek) diszfunkciója felelős az SWD-ok kialakulásáért és generalizálásáért. Napjainkban intenzíven kutatják a talamokortikális relé sejtek HCN csatornáit által generált I<sub>h</sub> és az SWD-ok megjelenése közötti összefüggést, azonban e témát boncolgató tudományos publikációkban gyakran ellentmondásos eredmények születnek. Egyes *in vitro* elektrofiziológiai elvezetések során emelkedett I<sub>h</sub> amplitúdót detektáltak GAERS és WAG/Rij AE-ás patkányok talamokortikális relé neuronjaiban (Kanyshkova és mtsai., 2012, Cain és mtsai., 2015), amelynek oka a HCN1, 2 és 4 csatornák emelkedett sűrűségének következménye lehet (Kanyshkova és mtsai., 2012). Így a nagyobb mértékű I<sub>h</sub> okozhatja a talamokortikális relé sejtek

emelkedett tüzelési aktivitását az SDW ciklusok alatt. Más tanulmányok ellenben arra a megállapításra jutottak, hogy a talamokortikális relé sejtek cAMP kötő hatékonysága mindkét AE állatmodellben lecsökkent (Budde és mtsai., 2005, Kuisle és mtsai., 2006) és ez a megváltozott mértékű cAMP kötés okozhatja a HCN csatornák alulműködését. Ennek következtében az absence rohamok során a csatorna nem tudja megfelelően szabályozni a kisüléssorozatos tüzelések megjelenését és lecsengését. Azonban szabadon mozgó GAERS és GHB AE állatmodellek vizsgálata bizonyította, hogy a talamokortikális relé neuronok tüzelési aktivitása lecsökken, vagy akár teljesen megszűnik az absence rohamok alatt (McCafferty és mtsai., 2018). Ezekben az állatmodellekben a neuronokat csekély aktivitásuk során tónusos tüzelés jellemzi, mi több a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatorna mediált kisüléssorozatos tüzelés is csak ritkán detektálható. Megállapítást nyert az is, hogy a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák talamikus blokkolása nem befolyásolja az absence rohamokat, viszont a nRT és a szomatoszenzoros kéregbe juttatott T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkoló megszünteti a rohamokat (McCafferty és mtsai., 2018).

Saját eredményeink alapján, miszerint az STG egértörzsben a HCN2 csatorna csendesítése csökkenti a rohamok össz-időtartamát és azok hosszát, elmondható hogy a talamikus HCN csatornák sokkal nagyobb mértékben járulnak hozzá az absence rohamokhoz, mint a T-típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák. A talamikus HCN2 csatornák blokkolása következtében a talamokortikális neuronok hiperpolarizációja fokozódik, ennek hatására csökken a talamusz és az agykéreg közötti szinkronizáció és a kérgi sejtek ismételt aktivációja. A felsorolt folyamatok együttesen járulnak hozzá ahhoz, hogy csökkenést tapasztalunk az absence rohamok gyakoriságában és időbeli lefolyásában is. Korábbi, HCN1 és HCN2 génkiütött egerekben végzett tanulmányok nem figyeltek meg csökkenést az absence rohamok számában, sőt úgy találták, hogy a csatorna mutációja hajlamosítja a vizsgált transzgén egereket a generalizált AE-ra (Ludwig és mtsai., 2003, Chung és mtsai., 2009, Hammelmann és mtsai., 2019). Az ellentmondásos kísérleti eredmények valószínűleg a génkiütött állattörzsek kérgi  $I_h$  hozzájárulásának és/vagy egyéb kompenzációs mechanizmusok következményei lehetnek.

*In vitro* elektrofiziológiai kísérleti eredményeink azt bizonyítják, hogy az általunk alkalmazott genetikai csendesítés szelektív hatást gyakorol a talamokortikális sejtek HCN2 csatornáinak funkciójára, egyéb neuronális működést nem befolyásol.

Továbbá, immunhisztológiai vizsgálataink eredményei alátámasztják, hogy a HCN2 csatornát csendesítő shRNS-t tartalmazó virális vektor kizárólag a VB talamusz sejteiben csökkentette a HCN2 csatornák expresszióját, az agykéregben nem, így lehetővé téve a csatornadeфекtus régió specifikus vizsgálatát.

Eredményeink megerősítik azt a tudományos nézetet, amely szerint a talamokortikális relé neuronok  $I_h$  növekedése súlyosbítja az AE-ás rohamokat és nem csupán egy rohamokkal összefüggő kompenzációs mechanizmus (David, Carcak és mtsai, 2018)



## Összefoglalás

Szenzoros bemenetek hiányában az emlős agyra az állapotfüggő spontán aktivitások széles skálája jellemző. Ilyen spontán agyi állapotok és a köztük lévő átmenetek detektálhatóak mind fiziológiás (pl. alvás-ébrenlét ciklus), mind pedig patológiás (pl. epilepszia) körülmények között. Az agykéreg állapotfüggő aktivitását az idegsejtek intrinszik tulajdonságai, a talamo-kortiko-talamikus hálózatból érkező projekciók dinamikája és a neuromodulátor rendszerek együttesen szabályozzák.

Az agyi állapotokat a talamo-kortiko-talamikus hálózaton kívüli más agyi struktúrák is jelentős mértékben befolyásolják. Ismert, hogy a LH jelentős szerepet tölt be az alvás-ébrenlét ciklus szabályzásában, továbbá koordinálja az emóciók és bizonyos célorientált magatartások (evés, ivás) szabályzását. Kevésbé ismertek azonban a LH és a különböző neuromodulátor-rendszerek közötti szinaptikus interakciók, illetve ezek agyi állapotokra gyakorolt hatásai. Kísérleteinkben vírusos pályakövetés, optogenetika, *in vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai módszerek kombinációját alkalmazva vizsgáltuk a LH hatását a szerotonerg rendszerre, amely fontos szerepet játszik olyan (pato)fiziológiás folyamatok szabályzásában, mint például az alvás-ébrenlét ciklus, a hangulat, a jutalmazás és szenzoros információ feldolgozás. *In vitro* elektrofiziológiai és immunhisztológiai vizsgálataink alapján elmondható, hogy a DRM 5-HT neuronjai AMPA/KA mediált serkentő posztzinaptikus potenciálokkal, GABAerg neuronjai pedig GABA<sub>A</sub> mediált gátló posztzinaptikus potenciálokkal reagálnak a Chr2-t expresszáló LH területéről érkező axonok lokális fotostimulációjára. *In vivo* elektrofiziológiai eredményeink bizonyítják, hogy a DRM-ba vetítő LH GABAerg projekciók GABA<sub>A</sub> receptor mediált gátláson keresztül a vizsgált egerekben gyors ébredési állapotot idéznek elő LA-ból, azonban ez PA esetén nem figyelhető meg. Eredményeink tehát egy új ébredést moduláló gátló projekciót azonosítanak.

A HCN csatornák és az általuk generált I<sub>h</sub> nélkülözhetetlen a fiziológiás talamik oszcillációk kialakításában, azonban pontos szerepük az AE-ra jellemző tüske-hullám kisülés generálásában még nem tisztázott. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a HCN2 csatorna expressziójának csendesítése a VB talamusz területén képes-e gátolni az absence rohamokat. Vizsgálatainkat megelőzően VT és STG egerek VB talamuszának neuronjait fertőztük HCN2 csatornát csendesítő shRNS-t tartalmazó vírussal. Kontroll csoportként a csatorna génjét nem csendesítő vírussal fertőzött állatokat alkalmaztuk. Eredményeink bizonyítják, hogy a VB talamokortikális relé neuronok HCN2 csatornáinak gátlása csökkenti az absence rohamok gyakoriságát és idejét.

*In vitro* whole-cell patch clamp elvezetések során vizsgáltuk a fertőzött VB talamokortikális relé neuronok elektrofiziológiai tulajdonságait. Eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk alkalmazott HCN2 csatorna csendesítése szelektív hatást gyakorolt az  $I_h$  függő membrán tulajdonságokra, anélkül, hogy befolyásolta volna a vizsgált sejtek egyéb tulajdonságait. Kísérleteink végeztével immunhisztokémiai vizsgálatokkal alátámasztottuk, hogy a csendesítő shRNS-el fertőzött talamokortikális neuronok HCN2 expresszója jelentősen kisebb volt, mint a kontroll vírussal fertőzött idegsejtekben.

## **Summary**

In the absence of sensory input the mammalian brain exhibits a wide array of structured brain state dependent spontaneous activity as happens during relaxed wakefulness, sleep and epilepsy. In cortical areas brain state dependent neuronal activity is determined by both intrinsic and thalamo-cortico-thalamic network interactions fine tuned by neuromodulation.

In addition to the intrinsic properties of neurons in a given network contributing to its output long-range synaptic inputs may also play a major role. The lateral hypothalamus is a brain area involved in energy balance and control of arousal via influencing the thalamocortical circuit, but whether and how it can impact the activity of neuromodulatory circuits and the downstream consequences of this modulation have remained elusive. Using a combination of anterograde viral tracing, optogenetics, *in vitro* and *in vivo* electrophysiology we investigated the effect of LH on the serotonergic system, a major neuromodulatory hub implicated in many (patho)physiological functions like the regulation of brain states, mood, reward and sensory processing. Using a combination of local photostimulation of ChR2 expressing LH axons in the DRN, patch clamp recordings and post hoc immunohistochemistry in the recorded neurons we show that glutamatergic LH projections monosynaptically target identified 5-HT neurons via AMPA/KA receptors. Identified DRN GABAergic neurons, on the other hand, receive monosynaptic GABA<sub>A</sub> mediated inhibitory inputs from the LH. Our *in vivo* results show that LH GABAergic projections promote arousal from NREM but not REM sleep by selectively inhibiting DRN GABAergic neurons via GABA<sub>A</sub> receptors resulting in a prominent disinhibition of DRN output neurons. Our results identify a novel long range inhibitory projection implicated in the control of arousal.

HCN channel mediated  $I_h$  is one of the major intrinsic drivers of physiological thalamic oscillations, but its role in generating spike and wave discharges of absence epilepsy has remained elusive. We investigated whether and how shRNA mediated silencing of thalamic

HCN2 channels affects absence seizures. Control and Stargazer mice were injected with either HCN2-targeting or non-targeting shRNA, their thalamic  $I_h$  dependent membrane properties scrutinized and their EEG recorded. Our findings show that block of VB neuron HCN2 channels prevents absence seizures *in vivo*. Using whole cell patch clamp recordings we examined the electrophysiological properties of VB neurons *in vitro* and demonstrated, that our HCN2-targeting shRNA does selectively affect  $I_h$  dependent membrane properties of VB neurons while leaving other physiological properties intact. Post hoc immunohistochemical reactions revealed that VB neurons infected by HCN2-targeting shRNA had a lower HCN expression compared to non-targeting shRNA-infected neurons.

## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Lőrincz László Magornak szakmai tanácsait és segítőkészségét. Hálás vagyok, hogy irányítása alatt elsajátíthattam a tudományos kutatás elvi és gyakorlati alapjait.

Külön köszönet illeti kollaborációs partnereinket, Dr. Mary Gazeat, Dr. Francois Davidet, Dr. Nihan Carcakot, Prof. Dr. Vincenzo Crunellit és Prof. Dr. Antoine Adamantidist munkájukért, szakmai tanácsaikért, amelyek jelentős mértékben támogatták doktori disszertációm.

Köszönettel tartozom, Molnár Benedeknek, Mészáros Ádámnak és Sere Péternek, hogy munkájukkal hozzájárultak doktori disszertációmhoz.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Tamás Gábornak, valamint csoportja volt és jelenlegi munkatársainak, kiemelten Averkin Róbertnek, Boldog Eszternek, Bordé Sándornak, Horváth Jánosnak, Dr. Molnár Gábornak, Oláh Gáspárnak, Dr. Ozsvár Attilának, Dr. Rózsa Mártonnak és Szemenyeiné Mikite Katalinnak, hogy szakmai kérdések esetén bármikor számíthattam rájuk.

Köszönöm Prof. Dr. Sály Gyulának az építő jellegű, részletes előbírálását.

Hálával tartozom Dr. Karri Lämsänak és csoportjának a disszertáció írása során tanúsított türelmükért és megértésükért.

Szeretném megköszönni édesanyámnak és barátaimnak a türelmüket, támogatásuk és szeretetüket, amivel munkámat segítették. Kifejezett hálával tartozom férjemnek, aki nem csak szakmai tanácsaival, de mérhetetlen türelmével és szeretetével támogatott egyetemi tanulmányaim és doktori munkásságom folyamán.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi munkatársának a barátságos légkört.

## Irodalomjegyzék

1. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420-424.
2. Allers KA, Sharp T (2003) Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience* 122:193-204.
3. Bal T, McCormick DA (1993) Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *J Physiol* 468:669-691.
4. Bal T, von Krosigk M, McCormick DA (1995) Synaptic and membrane mechanisms underlying synchronized oscillations in the ferret lateral geniculate nucleus in vitro. *J Physiol* 483 ( Pt 3):641-663.
5. Benarroch EE (2013) HCN channels: function and clinical implications. *Neurology* 80:304-310.
6. Berthoud HR, Münzberg H (2011) The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol Behav* 104:29-39.
7. Blumenfeld H (2005) Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 46 Suppl 9:21-33.
8. Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, de Lecea L, Jackson AC (2016) Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol* 594:6443-6462.
9. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263-1268.
10. Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW (2012) Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev* 92:1087-1187.
11. Budde T, Caputi L, Kanyshkova T, Staak R, Abrahamczik C, Munsch T, Pape HC (2005) Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *J Neurosci* 25:9871-9882.
12. Cain SM, Tyson JR, Jones KL, Snutch TP (2015) Thalamocortical neurons display suppressed burst-firing due to an enhanced I<sub>h</sub> current in a genetic model of absence epilepsy. *Pflugers Arch* 467:1367-1382.

13. Caplan R, Siddarth P, Stahl L, Lanphier E, Vona P, Gurbani S, Koh S, Sankar R, Shields WD (2008) Childhood absence epilepsy: behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia* 49:1838-1846.
14. Chavez AE, Hernandez VM, Rodenas-Ruano A, Chan CS, Castillo PE (2014) Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *J Neurosci* 34:16621-16629.
15. Chung WK, Shin M, Jaramillo TC, Leibel RL, LeDuc CA, Fischer SG, Tzilianos E, Gheith AA, Lewis AS, Chetkovich DM (2009) Absence epilepsy in apathetic, a spontaneous mutant mouse lacking the h channel subunit, HCN2. *Neurobiol Dis* 33:499-508.
16. Contreras D, Curro Dossi R, Steriade M (1993) Electrophysiological properties of cat reticular thalamic neurones in vivo. *J Physiol* 470:273-294.
17. Cope DW, Hughes SW, Crunelli V (2005) GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci* 25:11553-11563.
18. Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orban G, Errington AC, Lőrincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V (2009) Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* 15:1392-1398.
19. Cox CL, Huguenard JR, Prince DA (1997) Nucleus reticularis neurons mediate diverse inhibitory effects in thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8854-8859.
20. Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW (2007) Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci* 10:462-468.
21. Crunelli V, Leresche N (2002) Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* 3:371-382.
22. Crunelli, V., Lőrincz, M.L., Connelly, W.M., David, F., Hughes, S.W., Lambert, R.C., Leresche, N., and Errington, A.C. (2018). Dual function of thalamic low-vigilance state oscillations: rhythm-regulation and plasticity. *Nat Rev Neurosci* 19, 107-118.
23. Crunelli V, Lőrincz ML, McCafferty C, Lambert RC, Leresche N, Di Giovanni G, David F (2020) Clinical and experimental insight into pathophysiology, comorbidity and therapy of absence seizures. *Brain* 143:2341-2368.
24. David, F., Carcak, N., Furdan, S., Onat, F., Gould, T., Meszaros, A., Di Giovanni, G., Hernandez, V.M., Chan, C.S., Lorincz, M.L., et al. (2018). Suppression of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Function in

- Thalamocortical Neurons Prevents Genetically Determined and Pharmacologically Induced Absence Seizures. *J Neurosci* 38, 6615-6627.
25. Depaulis A, David O, Charpier S (2016) The genetic absence epilepsy rat from Strasbourg as a model to decipher the neuronal and network mechanisms of generalized idiopathic epilepsies. *J Neurosci Methods* 260:159-174.
  26. Di Pasquale E, Keegan KD, Noebels JL (1997) Increased excitability and inward rectification in layer V cortical pyramidal neurons in the epileptic mutant mouse Stargazer. *J Neurophysiol* 77:621-631.
  27. DiFrancesco JC, Barbuti A, Milanesi R, Coco S, Bucchi A, Bottelli G, Ferrarese C, Franceschetti S, Terragni B, Baruscotti M, DiFrancesco D (2011) Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy. *J Neurosci* 31:17327-17337.
  28. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS (2018) The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res* 139:73-79.
  29. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46:470-472.
  30. Fuller PM, Gooley JJ, Saper CB (2006) Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. *J Biol Rhythms* 21:482-493.
  31. Gent TC, Bandarabadi M, Herrera CG, Adamantidis AR (2018) Thalamic dual control of sleep and wakefulness. *Nat Neurosci* 21:974-984.
  32. Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20:4217-4225.
  33. Glauser TA, Cnaan A, Shinnar S, Hirtz DG, Dlugos D, Masur D, Clark PO, Adamson PC, Childhood Absence Epilepsy Study T (2013) Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy: initial monotherapy outcomes at 12 months. *Epilepsia* 54:141-155.
  34. Gazea M, Furdan S, Sere P, Oetsch L, Molnár B, Di Giovanni G, Fenno L, Ramakrishnan C, Mattis J, Deisseroth K, Dymecki S, Adamantidis A, Lőrincz ML (2021) Reciprocal lateral hypothalamic and raphé GABAergic projections promote wakefulness. *J Neurosci*; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2850-20.2021>

35. Gobel W, Helmchen F (2007) In vivo calcium imaging of neural network function. *Physiology (Bethesda)* 22:358-365.
36. Guilhoto LM (2017) Absence epilepsy: Continuum of clinical presentation and epigenetics? *Seizure* 44:53-57.
37. Guillery RW, Sherman SM (2002) Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system. *Neuron* 33:163-175.
38. Hammelmann V, Stieglitz MS, Hulle H, Le Meur K, Kass J, Brummer M, Gruner C, Rotzer RD, Fenske S, Hartmann J, Zott B, Luthi A, Spahn S, Moser M, Isbrandt D, Ludwig A, Konnerth A, Wahl-Schott C, Biel M (2019) Abolishing cAMP sensitivity in HCN2 pacemaker channels induces generalized seizures. *JCI Insight* 4.
39. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345-354.
40. Hassani OK, Lee MG, Henny P, Jones BE (2009a) Discharge profiles of identified GABAergic in comparison to cholinergic and putative glutamatergic basal forebrain neurons across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* 29:11828-11840.
41. Hassani OK, Lee MG, Jones BE (2009b) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2418-2422.
42. Herrera CG, Cadavieco MC, Jego S, Ponomarenko A, Korotkova T, Adamantidis A (2016) Hypothalamic feedforward inhibition of thalamocortical network controls arousal and consciousness. *Nat Neurosci* 19:290-298.
43. Hirsch JC, Fourment A, Marc ME (1983) Sleep-related variations of membrane potential in the lateral geniculate body relay neurons of the cat. *Brain Res* 259:308-312.
44. Huang KW, Ochandarena NE, Philson AC, Hyun M, Birnbaum JE, Cicconet M, Sabatini BL (2019) Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife* 8.
45. Huang Z, Walker MC, Shah MM (2009) Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci* 29:10979-10988.
46. Huguenard JR, Prince DA (1992) A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 12:3804-3817.



47. Idzikowski C, Mills FJ, Glennard R (1986) 5-Hydroxytryptamine-2 antagonist increases human slow wave sleep. *Brain Res* 378:164-168.
48. Ito H, Yanase M, Yamashita A, Kitabatake C, Hamada A, Suhara Y, Narita M, Ikegami D, Sakai H, Yamazaki M, Narita M (2013) Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. *Mol Brain* 6:59.
49. Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.
50. Jogo S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR (2013) Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat Neurosci* 16:1637-1643.
51. Jones BE (2020) Arousal and sleep circuits. *Neuropsychopharmacology* 45:6-20.
52. Jones BE, Hassani OK (2013) The role of Hcr/Orx and MCH neurons in sleep-wake state regulation. *Sleep* 36:1769-1772.
53. Jouvet M (1969) Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163:32-41.
54. Kanyshkova T, Meuth P, Bista P, Liu Z, Ehling P, Caputi L, Doengi M, Chetkovich DM, Pape HC, Budde T (2012) Differential regulation of HCN channel isoform expression in thalamic neurons of epileptic and non-epileptic rat strains. *Neurobiol Dis* 45:450-461.
55. Kerkhofs M, Lavie P (2000) Frederic Bremer 1892-1982: a pioneer in sleep research. *Sleep Med Rev* 4:505-514.
56. Kim KM, Baratta MV, Yang A, Lee D, Boyden ES, Fiorillo CD (2012) Optogenetic mimicry of the transient activation of dopamine neurons by natural reward is sufficient for operant reinforcement. *PLoS One* 7:e33612.
57. Koella WP, Czicman J (1966) Mechanism of the EEG-synchronizing action of serotonin. *Am J Physiol* 211:926-934.
58. Kole MH, Brauer AU, Stuart GJ (2007) Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. *J Physiol* 578:507-525.
59. Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J Neurosci* 23:7-11.

60. Kuisle M, Wanaverbecq N, Brewster AL, Frere SG, Pinault D, Baram TZ, Luthi A (2006) Functional stabilization of weakened thalamic pacemaker channel regulation in rat absence epilepsy. *J Physiol* 575:83-100.
61. Lanciego JL, Wouterlood FG (2020) Neuroanatomical tract-tracing techniques that did go viral. *Brain Struct Funct* 225:1193-1224.
62. Lee CH, MacKinnon R (2019) Voltage Sensor Movements during Hyperpolarization in the HCN Channel. *Cell* 179:1582-1589 e1587.
63. Lee SH, Dan Y (2012) Neuromodulation of brain states. *Neuron* 76:209-222.
64. Leresche N, Jassik-Gerschenfeld D, Haby M, Soltesz I, Crunelli V (1990) Pacemaker-like and other types of spontaneous membrane potential oscillations of thalamocortical cells. *Neurosci Lett* 113:72-77.
65. Letts VA (2005) Stargazer--a mouse to seize! *Epilepsy Curr* 5:161-165.
66. Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N (2001) Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices. *Brain Res* 900:110-118.
67. Lőrincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* 5:1185-1193.
68. Lőrincz ML, Adamantidis AR (2017) Monoaminergic control of brain states and sensory processing: Existing knowledge and recent insights obtained with optogenetics. *Prog Neurobiol* 151:237-253.
69. Lottem E, Lőrincz ML, Mainen ZF (2016) Optogenetic Activation of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Rapidly Inhibits Spontaneous But Not Odor-Evoked Activity in Olfactory Cortex. *J Neurosci* 36:7-18.
70. Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J* 22:216-224.
71. Ludwig A, Herrmann S, Hoesl E, Stieber J (2008) Mouse models for studying pacemaker channel function and sinus node arrhythmia. *Prog Biophys Mol Biol* 98:179-185.
72. Luthi A, McCormick DA (1998a) H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21:9-12.

73. Luthi A, McCormick DA (1998b) Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca<sup>2+</sup>-mediated upregulation of I<sub>h</sub>. *Neuron* 20:553-563.
74. Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S (2006) Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *J Neurosci* 26:12587-12595.
75. Mander BA, Winer JR, Walker MP (2017) Sleep and Human Aging. *Neuron* 94:19-36.
76. McCafferty C, David F, Venzi M, Lőrincz ML, Delicata F, Atherton Z, Recchia G, Orban G, Lambert RC, Di Giovanni G, Leresche N, Crunelli V (2018) Cortical drive and thalamic feed-forward inhibition control thalamic output synchrony during absence seizures. *Nat Neurosci* 21:744-756.
77. McCormick DA, Bal T (1997) Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20:185-215.
78. McGinley, M.J., David, S.V., and McCormick, D.A. (2015). Cortical Membrane Potential Signature of Optimal States for Sensory Signal Detection. *Neuron* 87, 179-192.
79. Meyer J, Maheshwari A, Noebels J, Smirnakis S (2018) Asynchronous suppression of visual cortex during absence seizures in stargazer mice. *Nat Commun* 9:1938.
80. Mickelsen LE, Kolling FWt, Chimileski BR, Fujita A, Norris C, Chen K, Nelson CE, Jackson AC (2017) Neurochemical Heterogeneity Among Lateral Hypothalamic Hypocretin/Orexin and Melanin-Concentrating Hormone Neurons Identified Through Single-Cell Gene Expression Analysis. *eNeuro* 4.
81. Moeller F, Siebner HR, Wolff S, Muhle H, Granert O, Jansen O, Stephani U, Siniatchkin M (2008) Simultaneous EEG-fMRI in drug-naive children with newly diagnosed absence epilepsy. *Epilepsia* 49:1510-1519.
82. Monti JM (2011) Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev* 15:269-281.
83. Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:455-473.
84. Murray NM, Buchanan GF, Richerson GB (2015) Insomnia Caused by Serotonin Depletion is Due to Hypothermia. *Sleep* 38:1985-1993.
85. Nakamura K, Wong-Lin K (2014) Functions and computational principles of serotonergic and related systems at multiple scales. *Front Integr Neurosci* 8:23.
86. Neda, Z., Ravasz, E., Brechet, Y., Vicsek, T., and Barabasi, A.L. (2000). The sound of many hands clapping. *Nature* 403, 849-850.

87. Noam Y, Bernard C, Baram TZ (2011) Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol* 21:873-879.
88. Noebels JL, Qiao X, Bronson RT, Spencer C, Davisson MT (1990) Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res* 7:129-135.
89. Notomi T, Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471:241-276.
90. Oikonomou G, Altermatt M, Zhang RW, Coughlin GM, Montz C, Gradinaru V, Prober DA (2019) The Serotonergic Raphe Promote Sleep in Zebrafish and Mice. *Neuron* 103:686-701 e688.
91. Pack AM (2019) Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Continuum (Minneapolis)* 25:306-321.
92. Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299-327.
93. Paxinos G, Watson C (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Academic Press.
94. Petreanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K (2009) The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 457:1142-1145.
95. Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113-136.
96. Pinault D, Leresche N, Charpier S, Deniau JM, Marescaux C, Vergnes M, Crunelli V (1998) Intracellular recordings in thalamic neurones during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy. *J Physiol* 509 ( Pt 2):449-456.
97. Polack PO, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S (2007) Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 27:6590-6599.
98. Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R (2000) Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol* 60:13-35.
99. Ranade SP, Mainen ZF (2009) Transient firing of dorsal raphe neurons encodes diverse and specific sensory, motor, and reward events. *J Neurophysiol* 102:3026-3037.
100. Reid CA, Phillips AM, Petrou S (2012) HCN channelopathies: pathophysiology in genetic epilepsy and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165:49-56.

101. Roth FC, Hu H (2020) An axon-specific expression of HCN channels catalyzes fast action potential signaling in GABAergic interneurons. *Nat Commun* 11:2248.
102. Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE (2010) Sleep state switching. *Neuron* 68:1023-1042.
103. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshe SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM (2017) ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58:512-521.
104. Shah MM (2014) Cortical HCN channels: function, trafficking and plasticity. *J Physiol* 592:2711-2719.
105. Siegel J (2004) Brain mechanisms that control sleep and waking. *Naturwissenschaften* 91:355-365.
106. Sos KE, Mayer MI, Cserep C, Takacs FS, Szonyi A, Freund TF, Nyiri G (2017) Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region. *Brain Struct Funct* 222:287-299.
107. Steinbusch HW (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6:557-618.
108. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993a) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-685.
109. Steriade M, Nunez A, Amzica F (1993b) Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *J Neurosci* 13:3266-3283.
110. Steriade M, Nunez A, Amzica F (1993c) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci* 13:3252-3265.
111. Strauss U, Kole MH, Brauer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA (2004) An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19:3048-3058.
112. Stuber GD, Wise RA (2016) Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19:198-205.
113. Szonyi A, Mayer MI, Cserep C, Takacs VT, Watanabe M, Freund TF, Nyiri G (2016) The ascending median raphe projections are mainly glutamatergic in the mouse forebrain. *Brain Struct Funct* 221:735-751.

114. Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60-79.
115. Tenney JR, Fujiwara H, Horn PS, Jacobson SE, Glauser TA, Rose DF (2013) Focal corticothalamic sources during generalized absence seizures: a MEG study. *Epilepsy Res* 106:113-122.
116. Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G (2014) Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods Mol Biol* 1183:221-242.
117. Torda C (1967) Effect of brain serotonin depletion on sleep in rats. *Brain Res* 6:375-377.
118. Trulson ME, Jacobs BL (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* 163:135-150.
119. Urbain N, Fourcaud-Trocme N, Laheux S, Salin PA, Gentet LJ (2019) Brain-State-Dependent Modulation of Neuronal Firing and Membrane Potential Dynamics in the Somatosensory Thalamus during Natural Sleep. *Cell Rep* 26:1443-1457 e1445.
120. Vega C, Guo J, Killory B, Danielson N, Vestal M, Berman R, Martin L, Gonzalez JL, Blumenfeld H, Spann MN (2011) Symptoms of anxiety and depression in childhood absence epilepsy. *Epilepsia* 52:e70-74.
121. Venner A, Anacleit C, Broadhurst RY, Saper CB, Fuller PM (2016) A Novel Population of Wake-Promoting GABAergic Neurons in the Ventral Lateral Hypothalamus. *Curr Biol* 26:2137-2143.
122. Venner A, De Luca R, Sohn LT, Bandaru SS, Verstegen AMJ, Arrigoni E, Fuller PM (2019) An Inhibitory Lateral Hypothalamic-Preoptic Circuit Mediates Rapid Arousals from Sleep. *Curr Biol* 29:4155-4168 e4155.
123. Venzi M, Di Giovanni G, Crunelli V (2015) A critical evaluation of the gamma-hydroxybutyrate (GHB) model of absence seizures. *CNS Neurosci Ther* 21:123-140.
124. Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4:19.
125. Verrotti A, D'Alonzo R, Rinaldi VE, Casciato S, D'Aniello A, Di Gennaro G (2017) Childhood absence epilepsy and benign epilepsy with centro-temporal spikes: a narrative review analysis. *World J Pediatr* 13:106-111.

126. Vertes RP, Kocsis B (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* 340:11-26.
127. Viney TJ, Salib M, Joshi A, Unal G, Berry N, Somogyi P (2018) Shared rhythmic subcortical GABAergic input to the entorhinal cortex and presubiculum. *Elife* 7.
128. von Krosigk M, Bal T, McCormick DA (1993) Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus. *Science* 261:361-364.
129. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Jr., Lowell BB (2011) Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71:142-154.
130. Weber F, Dan Y (2016) Circuit-based interrogation of sleep control. *Nature* 538:51-59.
131. Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L (2014) Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron* 83:645-662.
132. Wierschke S, Lehmann TN, Dehnicke C, Horn P, Nitsch R, Deisz RA (2010) Hyperpolarization-activated cation currents in human epileptogenic neocortex. *Epilepsia* 51:404-414.
133. Wilson S, Argyropoulos S (2005) Antidepressants and sleep: a qualitative review of the literature. *Drugs* 65:927-947.
134. Yang C, Brown RE (2014) The cholinergic agonist carbachol increases the frequency of spontaneous GABAergic synaptic currents in dorsal raphe serotonergic neurons in the mouse. *Neuroscience* 258:62-73.
135. Yoshida K, McCormack S, Espana RA, Crocker A, Scammell TE (2006) Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol* 494:845-861.
136. Zagha E, McCormick DA (2014) Neural control of brain state. *Curr Opin Neurobiol* 29:178-186.
137. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67:821-870.