

# **Retroaxonális akciós potenciálok vizsgálata az ember és a rágcsáló agykéregben**

Doktori értekezés

**Tóth Martin**

Témavezetők:

Dr. Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.  
egyetemi tanár

Dr. Molnár Gábor, Ph.D.  
tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola  
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Szegedi Tudományegyetem



2024

Szeged

# Tartalomjegyzék

---

Rövidítések jegyzéke .....	3
Ábrajegyzék .....	4
1. Bevezetés .....	5
Az agykéreg idegsejtjei .....	5
Neurogliaform interneuronok.....	7
Agykérgi lassú oszcillációk.....	9
Retroaxonális akciós potenciálok.....	10
2. Célkitűzések.....	12
3. Közreműködések .....	13
4. Anyagok és módszerek .....	14
Túlélő agyszelet preparáció.....	14
In vitro elektrofiziológia .....	15
In vitro elvezető kamrák.....	15
Stimulációs protokoll .....	16
Farmakológia.....	16
Axonális-bleb elektrofiziológiai elvezetések .....	17
In vitro oszcilláció.....	17
Post hoc morfológiai sejtípus meghatározás .....	17
In vivo elektrofiziológia.....	18
In vivo regisztrált sejtek post-hoc anatómiai analízise .....	19
Adatelemzés .....	19
Retroaxonális tüzelési mintázat analízise.....	19
Akciós potenciálok időzítésének analízise.....	20
Statisztika .....	21

5. Eredmények .....	22
Retroaxonális tüzelési mintázatok az ember agykéregben.....	22
Ritmikus retroaxonális tüzelés a rágcsáló agykéregben.....	26
Retroaxonális tüzelést mutató elsőrétegi interneuronok morfológiai osztályozása ....	28
Sejt-autonóm ritmikus retroaxonális tüzelés .....	31
HCN-csatornák és az extracelluláris kálium ionok szerepe a retroaxonális tüzelés kialakulásában .....	35
Spontán retroaxonális akciós potenciálok in vitro .....	40
Retroaxonális akciós potenciálok in vivo .....	45
6. Diskusszió .....	49
7. Összefoglaló.....	54
8. Summary.....	59
9. Köszönetnyilvánítás.....	64
10. Irodalomjegyzék .....	65

## Rövidítések jegyzéke

---

**AIS-AP** axon iniciális szegmentumon kialakult akciós potenciál

**AMPA**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionát

**AP** akciós potenciál

**DAB** 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid

**GABA** gamma-aminovajsav

**HCN-csatornák** hiperpolarizációval aktivált ciklikus nukleotid-kapuzott csatornák

**L1** az agykéreg első rétege (layer 1)

**L5** az agykéreg ötödik rétege (layer 5)

**LFP** lokális mezőpotenciál (Local Field Potential)

**MCSF** mesterséges agy-gerincvelői (cerebrospinalis) folyadék

**NGF sejt** neurogliaform sejt

**NMDA** N-metil-D-aszpartát

**PB** foszfát puffer oldat

**RA-AP** retroaxonális akciós potenciál

**RAT** retroaxonális tüzelés

**SCH23390** (R)-(+)-7-Chloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepin hidroklorid

**TBS** tris puffer oldat

**V<sub>m</sub>** membránpotenciál (Voltage of membrane)

**ZD7288** N-etil-1,6-dihidro-1,2-dimetil-6-(metil-imino)-N-fenil-4-pirimidinamin

# Ábrajegyzék

---

1. ábra Retroaxonális tüzelési mintázatok az ember agykéregben .....	24
2. ábra A szómán és a bleb-en regisztrált akciós potenciálok .....	25
3. ábra Retroaxonális tüzelési mintázatok a rágcsáló agykéregben .....	27
4. ábra Retroaxonális tüzelést mutató interneuronok morfológiai csoportosítása .....	30
5. ábra Szinaptikus transzmisszió független retroaxonális tüzelés .....	32
6. ábra Szomatikus membránpotenciál-függő retroaxonális tüzelés .....	33
7. ábra A HCN-csatornák és a megnövekedett lokális kálium ion koncentráció hozzájárulása a RAT kialakulásához .....	38
8. ábra Retroaxonális akciós potenciálok megnövekedett hálózati aktivitás során in vitro .....	43
9. ábra Megnövekedett hálózati aktivitás farmakológiai moduláció nélkül .....	45
10. ábra Retroaxonális akciós potenciálok in vivo .....	47

# 1. Bevezetés

---

## Az agykéreg idegsejtjei

Az emlős agy legnagyobb és legfejlettebb struktúrája az agykéreg, melyben a komplex, magasabb idegi funkciók zajlanak. A magasabb idegi funkciók közé tartozik az érzékelés, generált motoros parancsok szervezése, emocionális és kognitív folyamatok, térbeli gondolkodás, beszéd, tanulás, memória és a tudatos magatartás (Kandel és mtsai., 2000). Ezek alapján az agykéreg felosztható több funkcionális részterületre, melyek között strukturális és sejt összetételi különbségek vannak (Brodmann, 1909; Cadwell és mtsai., 2019). Az agykéregben található körülbelül 20 milliárd idegsejt (Herculano-Houzel, 2009), kisebb neuronpopulációkat, funkcionális mikrohálózatokat alkotva járulnak hozzá a külső és belső információk feldolgozásához, a párhuzamos és a szekvenciális események időzítéséhez, valamint az agyi plaszticitás kialakításához (Carrillo-Reid és mtsai., 2016). A neocortex az agykéreg evolúciójának legújabb terméke (Rakic, 2009), benne az idegsejtek jól elkülöníthető rétegekbe szerveződnek (Shipp, 2007). A tudomány jelenlegi állása szerint egy agykérgi terület körülbelül száz különböző típusú sejttypusból épül fel génextpressziós mintázata alapján (Tasic és mtsai., 2018).

A klasszikus csoportosítás szerint két fő csoportba sorolhatjuk az agykérgi idegsejteket: a serkentő piramis sejtek és a gátló interneuronok csoportjába. A glutamát neurotranszmittert felszabadító serkentő piramis sejtek képezik az agykérgi idegsejtek nagyobb hányadát, körülbelül négyötöd részét. Jellemző morfológiával rendelkeznek, elnevezésük a piramis alakú szómájukra utal. Vastag, egyenes apikális dendritjük a szómából ered és az agyfelszín felé mutat. Az apikális és a bazális dendritjeik is sűrűn tüskézettek. Axonjuk az apikális dendrittel ellentétes irányba, a fehérállomány felé projektál (García-López és mtsai., 2006). A piramis sejtek altípusait lamináris elhelyezkedésük és projekciós célterületeik szerint különíthetjük el, ami egyes esetekben összhangban van az újgenerációs transzkriptomikai csoportosítással is (Berg és mtsai., 2021; Economo és mtsai., 2018).

Az agykérgi neuronok másik fő csoportját a GABA ( $\gamma$ -amino-vajsav) neurotranszmittert felszabadító gátló interneuronok alkotják. A GABAerg sejtek fontos feladatot látnak el az emlős agykéreg embrionális fejlődésében, továbbá különböző mechanizmusokon keresztül alakítják a hálózat nagy részét képező serkentő piramis sejtek

aktivitását, valamint az idegi plaszticitást (Le Magueresse és Monyer, 2013). A gátló helyi interneuronok az agykérgi neuronok kisebb részét képezik, körülbelül egyötödét, de ennek ellenére a serkentő többséggel szemben rendkívül változatos morfológiai és funkcionális jellemzőkkel rendelkeznek (Ascoli és mtsai., 2008; Boldog és mtsai., 2018; Hodge és mtsai., 2019). Csoportosításuk az elektrofiziológiai tulajdonságaik, neurokémiai markereik, génexpressziós mintázatuk, morfológiájuk, valamint axonterminálisaik posztszinaptikus sejt felszíni eloszlása alapján történhet (DeFelipe és mtsai., 2013). Az elektrofiziológiai tulajdonságok alapján történő csoportosítás esetén számos aktív és passzív paramétert határozhatunk meg az idegsejt hiperpolarizáló és depolarizáló áramlépcsőre adott válasza alapján. Ezek közül az egyik fő paraméter a stimuláció hatására kialakuló akciós potenciál-sorozat frekvenciája.

A kosársejtek és az axo-axonikus sejtek magas frekvenciájú akciós potenciál sorozatot adnak le a stimuláció hatására, ezért ezeket a sejteket összefoglaló néven gyorsan tüzelő interneuronoknak nevezzük. A kosársejtek képezik az agykérgi GABAerg interneuronok körülbelül felét (Markram és mtsai., 2004), elkülönítésük jól definiált, mivel a posztszinaptikus sejtet kosárként veszi körül, axon terminálisa a piramis sejt szómáján vagy a proximális dendritjein végződnek (Somogyi és mtsai., 1983). Ezzel ellentétben az axo-axonikus sejtek, más néven kandeláber sejtek, axonjait a piramis sejt axon iniciális szegmentumára projektálják (Somogyi és mtsai., 1985; Szabadics és mtsai., 2006). A klasszikusan idegsejtek csoportosítására használt neurokémiai markerek alapján is elkülönülnek a többi interneuron csoporttól, mivel a kosársejtek és az axo-axonikus sejtek is expresszálnak egy szelekciós markerként használható kalciumkötő fehérjét, a parvalbumint (Tremblay és mtsai., 2016). Továbbá a parvalbumint kifejező csoporton belül, a Pvalb–Vipr2 marker az axo-axonikus sejtekre jellemző, ezáltal a génexpresszió alapján is elkülöníthetők a kosársejtektől (Tasic és mtsai., 2018). A parvalbumint expresszáló interneuronok funkciójukat tekintve fontos szerepet játszanak a neuronpopulációk aktivitási mintázatainak kialakításában, az agykérgi oszcillációk modulációjában (Niethard és mtsai., 2018), valamint a deszinkronizáció szabályozásában (Agetsuma és mtsai., 2018).

A gátló interneuronok egy másik nagy csoportja a piramissejtek szómától távolabbi dendrit szakaszait célzó sejtek, melyek rendkívül változatos elektrofiziológiai, morfológiai paraméterekkel és génexpressziós mintázattal rendelkeznek (Chartrand és mtsai., 2023; Peng és mtsai., 2021; Tamás és mtsai., 1997). Ebbe a csoportba tartoznak a

szomatosztatin neuropeptidet expresszáló interneuronok is, például a Martinotti-sejtek (Tremblay és mtsai., 2016). A negyedik, valamint az ötödik rétegben elhelyezkedő szomatosztatin-pozitív interneuronok az axonarborizációjuk szerint kategorizálhatók, mivel a Martinotti-neuronok az első rétegbe, míg a nem Martinotti-neuronok a negyedik rétegbe vetítik axonarborizációjukat (Maximiliano és mtsai., 2018). Eddigi ismereteink szerint a szomatosztatin-pozitív interneuronok fontos szerepet töltenek be az alvás lassúhullámú, gyors szemmozgás nélküli (NREM) periódusának kialakításában (Funk és mtsai., 2017).

Egy másik gátló interneuron csoport a szerotonin 3a receptort (5HT<sub>3aR</sub>) expresszáló neuronok, melyek a vazóaktív intesztinális peptid (VIP) expressziójuk alapján választhatók szét további két alcsoportra. A VIP-pozitív interneuronokat klasszifikálhatjuk morfológiai polaritásuk szerint, bipoláris, valamint multipoláris típusokra. Az utóbbi csoport tagjai eltérő tüzelési mintázatokat mutathatnak, úgy, mint a folyamatosan adaptálódó, a nem szabályos, valamint a burst (magas frekvenciájú akciós potenciál sorozat)-öt mutató típusok (Prönneke és mtsai., 2015). A 5HT<sub>3a</sub> receptorral rendelkező sejtek másik alcsoportja, a VIP-et nem expresszáló interneuronok populációja, melyet tovább oszthatunk három csoportra. Az egyik ilyen populáció a kolecisztokinint expresszáló kosársejtek, melyek tüzelési mintázatára jellemző az akkomodáció, és az alacsonyabb frekvencia, ellentétben a parvalbumin-pozitív gyorsan tüzelő kosársejtekkel (Bartos és Elgueta, 2012). A másik elkülönülő csoport tagjai a single bouquet sejtek, melyek sejtteste jellemzően az első rétegben található (Lee és mtsai., 2015). A harmadik csoport tagjai a neurogliaform sejtek, melyek részletes jellemzése a következő alfejezetben található.

## **Neurogliaform interneuronok**

A neurogliaform néven ismert interneuronok morfológiai jellemzőit elsőként Ramon y Cajal határozta meg (Cajal, 1995). Leírása szerint ezek a sejtek pókháló struktúrára emlékeztetnek, mivel a kis térfogatú szómájuk körül sűrűn hálózott dendritikus, axonális arborizáció figyelhető meg. Axonja elágazásokban gazdag, felületén a kis méretű preszinaptikus boutonok sűrűn megfigyelhetők. Ez a típusú interneuron axonarborizációja jellemzően a sejttest közvetlen közelében található. A neurogliaform interneuronok arborizációs komplexitása, térfogati kiterjedése, különös tekintettel az axonjára, meglehetősen specifikus jelleget mutat, ezért az axonmorfológiájuk alapján jól



azonosíthatók (Tamás és mtsai., 2003). A neurogliaform interneuronok jelen vannak a hippocampus CA1-es régióban, valamint a neocortex számos régiójában is (Barnstable és mtsai., 1992; Kawaguchi és Kubota, 1996; Overstreet-Wadiche és McBain, 2015; Schuman és mtsai., 2019). Az agykéreg mind a hat rétegében megtalálhatóak, azonban a szupragranuláris rétegekben, főként az első rétegben nagyobb arányban vannak jelen (Gentet, 2012; Ma és mtsai., 2014). Neurokémiai markereik szerint is elkülöníthetjük őket a többi GABAerg interneurontól (Schuman és mtsai., 2019), a neuropeptid Y (NPY) majdnem minden neurogliaform sejtben expresszálódik, az agykéregben és a hippocampusban is, így ezt a markert az egyik fő szelekciós komponensként alkalmazhatjuk (Overstreet-Wadiche és McBain, 2015; Schuman és mtsai., 2019). Ezen kívül számos más markert is kifejezhetnek, mint a Neuron Derived Neurotrophic Factor (NDNF) gént, a COUPTF2 és a Lamp5 transzkripciós faktort, a nitrogénoxid-szintáz, a reelin glikoproteint, valamint a 5HT3 receptort (Tasic és mtsai., 2018; Tremblay és mtsai., 2016). A neurogliaform interneuron morfológiával rendelkező neuronokra jellemző a késői akciós potenciál tüzelési mintázat, a gyors időálló, a küszöbpotenciál közelében kialakuló lassú depolarizáció, a nagy utóhiperpolarizáció, valamint a kis bemenő ellenállás (Kawaguchi és Kubota, 1996; Overstreet-Wadiche és McBain, 2015). Szerepüket tekintve, egy univerzális gátló interneuron csoport, amely GABA térfigati transzmisszió révén képes a környező idegsejtek és gliák, vagy akár egész mikrohálózatok inhibíciójára (Oláh és mtsai., 2007, 2009; Ozsvár és mtsai., 2021; Rózsa és mtsai., 2017; Tamás és mtsai., 2003), ezenfelül hatékonyságukat növeli az elektromos szinapszisaikkal kialakított funkcionális szincícium (Anna Simon és mtsai., 2005). Bár sokat tudunk ennek a sejttypusnak a celluláris tulajdonságairól, azonban funkciójuk viselkedő állatokban, valamint a különböző agykérgi oszcillációkban betöltött szerepük nem teljesen tisztázott. Újabb kutatások rávilágítottak arra, hogy a neurogliaform sejtek a lassúhullámú alvás alatt kialakuló aktív állapotok terminációjában kulcs szerepet játszanak (Hay és mtsai., 2021). Továbbá a piramis sejtekkel és a többi interneuron típusal ellentétben aktívak lehetnek a lassú hullámú oszcilláció nyugalmi szakaszában, ezáltal akciós potenciálokat adhatnak le a csendes, hiperpolarizált hálózati állapot alatt is (Valero és mtsai., 2021).

## Agykérgi lassú oszcillációk

Az alvás és az ébrenlét váltakozása, a különböző kognitív, szenzoros, vagy a motoros feladatok végzése közben az agykéreg felszínéről különböző frekvenciájú ritmikus aktivitás vezethető el (Cannon és mtsai., 2014; Kahana, 2006; Saleh és mtsai., 2010). Ezek az úgynevezett neurális oszcillációk széles spektrumú frekvenciatartományban, 0.1-500 Hz között jelennek meg, és az agykéreg működésében kulcsfontosságú szerepet töltenek be (Buzsáki és mtsai., 2012; Buzsáki és Draguhn, 2004). A legközismertebb példa a neurális oszcillációra az alvás non-REM (a gyors szemmozgásokkal nem járó) fázisában kialakuló lassúhullámú, 0.5-4 Hz körüli oszcilláció. Az alvás lassúhullámú oszcillációjának kialakításában a thalamokortikális hálózat döntő szerepet játszik (Neske, 2016), azonban az agykéreg a thalamustól függetlenül is képes a lassú oszcilláció kialakítására (Sanchez-Vives és McCormick, 2000). Extracelluláris elvezetésekkel kimutatták, hogy az agykéreg ötödik rétegében kialakuló aktív állapot (Lörincz és mtsai., 2015) vertikálisan a felsőbb rétegekre, valamint horizontálisan a környező oszlopokra terjedhet (Sanchez-Vives és McCormick, 2000). A lassú oszcilláció kétfázisú, az aktív UP és az inaktív DOWN állapot váltakozásából áll. Az UP állapot alatt az idegsejteken serkentő posztszinaptikus potenciálok és akciós potenciálok figyelhetők meg, míg a DOWN állapot alatt az idegsejtek túlnyomó többsége nyugalmi állapotban van (Holcman és Tsodyks, 2006). Továbbá az agykérgi idegsejtek membránpotenciálja szinkron módon változik depolarizált UP és hiperpolarizált DOWN állapot között (Massimini és Amzica, 2001; Saleem és mtsai., 2010). A depolarizált UP állapot az aktivált piramis sejteknek köszönhető, melyek glutamáterg szinaptikus bemeneteikkel kölcsönösen serkentik egymás és a környező interneuronok szomatodendritikus régióját (Neske, 2016). A serkentő posztszinaptikus potenciálok szummációja eredményezi az UP állapotra jellemző depolarizációt, mely végső soron akciós potenciálok kialakulásához vezet az axon iniciális szegmentumon (Stuart és mtsai., 1997). A hiperpolarizált DOWN állapot ezzel szemben a serkentő bemenetek hiányában alakul ki, ilyenkor az idegsejtek membránpotenciálja jellemzően jóval negatívabb az akciós potenciál küszöbértékénél, így nem figyelhetők meg akciós potenciálok. A DOWN-állapot kialakulása létrejöhet az UP állapot terminációját követően, amiben a gátló idegsejtek játszhatnak kulcsszerepet (Hay és mtsai., 2021; Neske, 2016; Zucca és mtsai., 2017). Az UP és DOWN állapot meghatározott időbeli váltakozásához, tehát az oszcilláció fenntartásához elengedhetetlen az idegsejtek térben és időben összehangolt működése (Buzsáki és mtsai., 2012). Az

akciós potenciálok időzítése függ az oszcilláció frekvenciájától és az idegsejtek típusától. Ezáltal az egyes hálózati állapotok során a különböző interneuronok típusokra eltérő akciós potenciál időzítés jellemző (Klausberger és Somogyi, 2008). Azonban az agykérgi interneuronok, különös tekintettel a neurogliaform sejtek lassú oszcilláció alatt betöltött szerepükről tudásunk még nem teljes, valamint a DOWN állapotok kialakulási mechanizmusa sem teljesen ismert (Craig és McBain, 2014).

## **Retroaxonális akciós potenciálok**

A modern agykutatást alapvetően meghatározta a Santiago Ramón y Cajal nevéhez köthető dinamikus polarizációs törvény (Barberis, 2018; Cajal, 1995), amely szerint az idegsejtek két anatómiailag jól elkülöníthető résszel rendelkeznek: szomato-dendritikus, valamint az axonális régióval, melyek különböző funkciót látnak el. A szomato-dendritikus rész a többi idegsejtől kémiai és elektromos szinapszisokon keresztül információt kap, depolarizálódik, majd a különböző dendritek membránpotenciál változása a sejtesten összegződik. Az összegződés folytán az axon inicális szegmentum (AIS) depolarizációjának hatására kialakul az akciós potenciál (AIS-AP), mely az axonon mindkét irányba képes terjedni, így retrográd irányba visszaterjed a szomato-dendritikus régióba (Stuart és mtsai., 1997; Stuart és mtsai., 1997; Telenczuk és mtsai., 2017), anterográd módon pedig az axonon végigfutva jut a preszinaptikus terminálisokig (Li és mtsai., 2014). Az AIS kulcsszerepet játszik a szinaptikus bemenetek által vezérelt akciós potenciál iniciációban és az akciós potenciáltól függő kimenetben (Hu és mtsai., 2014; Stuart és mtsai., 1997). Tehát, a konvencionális információáramlási paradigma szerint az axon híven továbbítja a szomato-dendritikus régió által összegzett információt és nem képes önálló jelfeldolgozásra. Az agykéreg interneuronjai nem kapnak szinaptikus bemeneteket az axon nyúlványaikra (Peters és mtsai., 1991), azonban újabb kutatások rámutattak arra, hogy a striatum dopaminerg axonjai kolinerg receptorokat tartalmazhatnak, amelyeken keresztül kaphatnak serkentő kolinerg bemenetet (Kramer és mtsai., 2022; Liu és mtsai., 2022). Továbbá egyes esetekben az inicális szegmentumon kívül az axon disztálisabb régiói is részt vehetnek az akciós potenciálok iniciációjában (Bucher és Goillard, 2011; Egorov és mtsai., 2002; Major és Tank, 2004; Pinault, 1995; Thuault és mtsai., 2013). Az utóbbi évtizedben hippocampális és agykérgi interneuronokban figyeltek meg megbízhatóan kialakítható hosszantartó autonóm tüzelést, amely során az idegsejtek nagy frekvenciás akciós potenciál-sorozatokat adnak le

a szomato-dendritikus régió depolarizációja nélkül (Elgueta és mtsai., 2015; Sheffield és mtsai., 2011; Suzuki és mtsai., 2014). A tüzelés alatt kialakult akciós potenciálok kinetikája eltér a szomatikusan kiváltott akciós potenciáloktól. Ezek az akciós potenciálok anti-dromikus, retro-axonális irányban (RA-AP) az axon disztálisabb részeiről érkeznek, ellentétben az axon iniciális szegmentumon inicializálódott akciós potenciáloktól. Az akciós potenciál sorozat (retroaxonális tüzelés, RAT) kialakítható szomatikus depolarizáló stimulusok nélkül is, a sejt körül elhelyezkedő asztrociták depolarizációjával (Deemyad és mtsai., 2018), vagy direkt módon az axon stimulációjával a szomatodendritikus régió hiperpolarizálása közben (Sheffield és mtsai., 2011). Ezek alapján egyes interneuronok axonjában a szomato-dendritikus régiótól független, sejt-intrinzik mechanizmus játszhat szerepet a retroaxonális akciós potenciálok generálásában (Chittajallu és mtsai., 2020; Deemyad és mtsai., 2018; Egorov és mtsai., 2002; Elgueta és mtsai., 2015; Knauer és mtsai., 2013; Krook-Magnuson és mtsai., 2011; Michalikova és mtsai., 2019; Sasaki és mtsai., 2011; Sheffield és mtsai., 2011, 2013; Thuault és mtsai., 2013). A retroaxonális tüzelés alapján azt feltételezhetjük, hogy nem csak a szomato-dendritikus régió, de egyes idegsejtek axonja is képes lehet az információk fogadására és összegzésére.

## 2. Célkitűzések

---

A konvencionális információ-áramlási paradigma szerint az idegsejtek szomato-dendritikus régiója felel a bejövő jelek integrációjáért, majd továbbításáért az axon nyúlvány felé. Az összegződés folytán az axon iniciális szegmentum depolarizációjának hatására kialakul az akciós potenciál, mely az axonon anterográd irányba terjed egészen a preszinaptikus terminálisokig. Azonban egyes GABAerg interneuronokon, főként neurogliaform sejteken akciós potenciál-sorozatok figyeltek meg, amely során az akciós potenciálok nem az axon iniciális szegmentumon, hanem az axon távoli, disztálisabb részén inicializálódtak és retrográd irányba terjedtek a szomato-dendritikus régió felé. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a retroaxonális akciós potenciálok kialakulási mechanizmusáról és előfordulásukról az agykérgi neuronhálózatokban, ezért kísérleteinkkel a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A retroaxonális tüzelés egy evolúciósan konzervált jelenség és megjelenik több emlős fajban is?
- Milyen mintázatban jelenhet meg a retroaxonális tüzelés?
- Milyen külső és sejt-intrinzik tulajdonságok befolyásolják a retroaxonális tüzelés kialakulását?
- Előfordulnak-e retroaxonális akciós potenciálok in vivo?
- Milyen hálózati állapot során alakulhatnak ki retroaxonális akciós potenciálok?

### **3. Közreműködések**

---

A kísérleteket Dr. Tamás Gábor, Dr. Rózsa Márton, Dr. Molnár Gábor és Tóth Martin tervezte.

Az emberi agyszövet műtéti eltávolítását Dr. Barzó Pál végezte.

Az in vitro agyszelet elektrofiziológiai méréseket Tóth Martin és Dr. Rózsa Márton végezte.

Az in vitro axonális bleb elvezetéseket Lákovics Rajmund és Tóth Martin végezte.

Az in vivo kísérleteket Dr. Rózsa Márton és Dr. Oláh Gáspár végezte.

A hisztológiai munkát Dr. Baka Judith, Dr. Kocsis Ágnes Katalin és Mezei Leona végezték.

A sejtek fénymikroszkópos morfológiai vizsgálatát Dr. Baka Judith, Dr. Kocsis Ágnes Katalin, Bakos Emőke, Törteli Anna és Tóth Martin végezték.

A háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukciókat Dr. Baka Judith, Bakos Emőke, Szóts Ildikó és Lehóczki Bettina végezte.

Az adatok kiértékelését és ábrázolását Tóth Martin végezte.

## 4. Anyagok és módszerek

---

### Túlélő agyszelet preparáció

Kísérleteinket a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük el. Kísérleteink egy részéhez fiatal (18-44,  $22 \pm 5$  napos) Wistar patkányok neokortikális agyszeleteit használtuk. Az állatokat halotán anesztézia alatt (inhalált 2-brom,2-klór,1,1,1-trifluoretán) dekapitáltuk, majd hűtött ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mesterséges cerebrospinalis folyadékban (MCSF) preparáltuk. Az MCSF összetétele mM-ban kifejezve: 130 NaCl; 3,5 KCl; 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 24  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,5  $\text{CaCl}_2$ ; 4  $\text{MgSO}_4$ ; 10 D(+) glükóz. Az oldatot jégen tartva telítettük karbogénnel (95%  $\text{O}_2$ ; 5%  $\text{CO}_2$ ), majd 10-20 perc után hozzáadtuk a  $\text{CaCl}_2$ -t, hogy a  $\text{CO}_2$  beoldódásával, ezzel a pH csökkentésével elkerüljük a  $\text{CaCO}_3$  és kalcium-foszfátok kicsapódását. A dekapitálást követően szikével szagittális bemetszést ejtettünk a fejtetőn, majd a foramen magnumtól kétoldali vágással elvágtuk a rágóizmokat. A foramen magnumtól a szagittális varrat mentén apró vágásokkal felnyitottuk a koponyát. A kisagy eltávolítása után az agyat óvatosan átemeltük egy hűtött MCSF-fel feltöltött Petri csészébe. 350-400  $\mu\text{m}$  vastag koronális metszeteket készítettünk a szomatoszenzoros kéregből Microm HM650 V mikrotómmal. Az agyszeleteket  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fél óráig inkubáltuk a preparációhoz is használt oxigenált MCSF-ben, majd fél óráig  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on csökkentett  $\text{CaCl}_2$ -ot tartalmazó folyadékban tartottuk melynek összetétele: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 24  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\text{MgSO}_4$ , 10 D(+)-glükóz. Az inkubációt követően az előző oldatban  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a felhasználásig. Az elektrofiziológiai méréseknél használt oldat az inkubáláshoz használt oldattól eltérően 3 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot, és 1.5 mM  $\text{MgSO}_4$ -ot tartalmazott.

Kísérleteink másik részéhez emberi túlélő agyszelet preparátumokat használtunk a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével. Aneurizma, shunt és agytumor kezeléséhez elengedhetetlen, sebészeti úton eltávolított agykérgi blokkokat használtunk fel a betegek beleegyezésével ( $n=41$  kaukázusi nagyraszba tartozó nő és  $n=30$  kaukázusi nagyraszba tartozó férfi, életkor:  $50 \pm 20$  év). A műtétek a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történtek. Az anesztézia indukálása midazolam (0,03mg/kg) és fentanil (1-2 mg/kg) intravénás adagolásával, valamint intravénás propofollal (1-2 mg/kg) történt. Az endotracheális intubáció könnyítése érdekében a páciensek 0,5 mg/kg rocuroniumot kaptak. Az

intubáció 120 másodperccel ezt követően történt és a páciens  $O_2$  és  $N_2O$  1:2 arányú elegyével lélegeztették. Az eltávolított frontális (n=31), temporális (n=18), parietális (n=6), valamint okcipitális (n=5) agykérgi területekből származó szövettömböket 4-6 °C-os magas szukróz tartalmú MCSF oldatba helyeztük. 350-400  $\mu m$  vastag metszeteket készítettünk, ugyanazon oldatok és módszerek alkalmazásával, mint a patkány agyszeletek esetében.

## **In vitro elektrofiziológia**

Kísérleteinkben szomatikus whole-cell patch-clamp technikával végeztünk elvezetések 36 °C-on hagyományos alámerített vagy kettős átfolyású in vitro elvezető kamrában. Infravörös DIC (differenciál interferencia kontraszt) videomikroszkópia segítségével vizualizáltuk az elsőrégi interneuronokat az agyszelet felszínétől 60-130  $\mu m$  mélyen (Olympus BX61WI mikroszkóp, Olympus XLUMPlanFI objektív, Hamamatsu CCD kamera, Luigs és Neumann manipulátor rendszer). A whole-cell patch-clamp kísérleteknél intracelluláris oldattal (pH 7,5; 300 mOsm: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP- $Na_2$ , 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát, a sejtek jelöléséhez 8 mM biocytin (N-biotinilált lizin)) töltöttük fel a mikropipettákat (3-5  $M\Omega$ ). Az extracelluláris elvezetéseknel kalcium-mentes MCSF-kal töltöttük fel a mikropipettákat (1-2  $M\Omega$ ). Az elektrofiziológiai elvezetések HEKA EPC 10 erősítővel végeztük, 10 kHz-en (Bessel szűrő) szűrtük és 50 kHz-el digitalizáltuk Patchmaster szoftverrel (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht). A whole-cell mérések esetében current-clamp módban vezettünk el, tehát különböző áramlépcsőket injektáltunk a sejtekbe, és a sejtek membránpotenciál változását mértük. Az extracelluláris méréseknel is current-clamp módot használtunk, ahol stimulusokat nem alkalmaztunk, tehát nem injektáltunk áramot, csak a lokálisan kialakuló mezőpotenciálokat vezettük el.

## **In vitro elvezető kamrák**

Méréseink során két eltérő in vitro agyszelet tartó kamrát használtunk, amelyek a whole-cell patch-clamp konfiguráció kialakításához ideálisak. Hagyományos, úgynevezett alámerített elvezető kamrát, valamint kettős-átfolyású elvezető kamrát használtunk (Hájos és Mody, 2009). Az előző esetén a minta egy üveglapon fekszik, így optikai szempontból kedvező feltételeket biztosít. A kamra egy bemeneti és egy kimeneti folyadék csövet tartalmaz, amelyek funkciója a perfúzió megvalósítása, így a túlélő



agyszelet preparátum folyamatosan oxigénnel telített 36 °C hőmérsékletű MCSF-ben lehet. Az agyszövet az oldatból oxigénhez, energiához juthat, ezért a sejtek órákig életben maradhatnak. A kettős-átfolyású elvezető kamra optimálisabb oxigénellátottságot biztosít, valamint whole-cell patch-clamp konfiguráció kialakítása is lehetséges benne. A minta ebben az esetben egy rácson helyezkedik el, a folyadék ellepi a preparátumot, az alsó és a felső része is közvetlenül érintkezik a beáramló folyadékkal, mivel a kamra az előzővel ellentétben egy felső és egy alsó bemeneti, valamint egy kimeneti MCSF csövet tartalmaz. A nagyobb folyadékáramlási ráta (Ivanov és Zilberter, 2011), valamint az, hogy az agyszelet preparátum felül és alul is érintkezik a MCSF-al, jobb oxigén ellátottságot eredményez. Ennek köszönhetően nagyobb eséllyel inicializálódnak komplexebb aktivitási mintázatok, oszcillációk (Hájos és Mody, 2009). Ennélfogva a kettős-átfolyású elvezető kamra segítségével hatékonyabban monitorozhatjuk a természetes neurális aktivitást túlélő agyszelet preparátumokon (Hájos és mtsai., 2009).

## **Stimulációs protokoll**

Whole-cell current-clamp kísérleteink során a szakirodalomban leírt stimulációs protokollhoz hasonlóan (Sheffield és mtsai., 2011), egymást követő depolarizáló áramlépcsőket (50-500 pA, 300 ms inter-stimulus intervallum) injektálunk elsőrégegi interneuronokba. Az áramlépcső mértékét a sejt válasza szerint paramétereztük, miszerint egy stimulusra legalább négy akciós potenciál kialakulását vártuk el. A négyszögjelek között megjelenő spontán, stimulus nélküli akciós potenciálok jelentették számunkra a retroaxonális tüzelés sikeres indukcióját. Ekkor a depolarizáló áramlépcsők injektálását megállítottuk, majd folyamatos elvezetést végeztünk a sejteket nyugalmi membránpotenciálon tartva.

## **Farmakológia**

A kísérleteinkhez használt farmakonokat az elvezető oldatba beoldva extracellulárisan alkalmaztuk. A következő hatóanyagokat használtuk: ZD7288 (HCN-csatorna blokkoló, 30  $\mu$ M), karbamilkolin-klorid (kolinerg agonista, 2  $\mu$ M) és SCH23390 (D1 receptor antagonist, 10  $\mu$ M). Minden felhasznált farmakont a Sigma-Aldrich vagy a Tocris Bioscience forgalmazótól szereztünk be.

## **Axonális-bleb elektrofiziológiai elvezetések**

A bleb elvezetésekhez használt agyszeleteket ugyanazon preparációs és inkubációs protokollal készítettük, mint az előző in vitro kísérleteknél. Az axon-bleb vizualizálása érdekében a szomatikus whole-cell elvezetéshez használt mikropipettába (3-5 M $\Omega$ ) fluoreszcens festékkel (Alexa Fluor 594 (30  $\mu$ M)) kiegészített intracelluláris oldatot töltöttünk. A sikeres whole-cell konfiguráció kialakítása után ~15 percet vártunk a festék szétterjedésére, majd a blebeket két-foton mikroszkóp (Zeiss Axio Examiner LSM7; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany, 40 $\times$  víz-immersiós objektív 1,0 NA; Carl Zeiss AG, 15 Oberkochen, Germany, Mai Tai DeepSee [Spectra-Physics, Santa Clara, CA] femtoszekundumos Ti:zafír lézer, 800 nm hullámhossz) segítségével vizualizáltuk és Alexa Fluor 488 (20  $\mu$ M)-ot tartalmazó, intracelluláris oldattal feltöltött mikropipettákkal (20-25 M $\Omega$ ) közelítettük meg. Kísérleteink során hiperpolarizáló áramlépcsőket injektáltunk felváltva a szómába és a bleb-be. Depolarizáló áramlépcsőket csak a szómába injektáltunk.

## **In vitro oszcilláció**

A komplexebb aktivitási mintázatok, oszcillációk indukálásához kettős-átfolyású kamrát (Hájos és Mody, 2009), valamint az eddigiektől eltérő MCSF-ot használtunk, amely 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> és 1 mM MgSO<sub>4</sub>-ot tartalmazott (Sanchez-Vives és McCormick, 2000). A lassúhullámú, delta frekvenciatartományú (0.5-4 Hz) oszcilláció kialakításához kolinerg agonistát (karbakol, 2  $\mu$ M) és dopamin receptor 1 antagonistát (SCH23390, 10  $\mu$ M) adtunk a MCSF-hoz (Carracedo és mtsai., 2013). A lokális mezőpotenciálokat (LFP) CaCl<sub>2</sub> mentes MCSF-fel feltöltött mikropipettákkal (1-2 M $\Omega$ ) regisztráltuk az agykéreg ötödik rétegében.

## **Post hoc morfológiai sejtípus meghatározás**

A whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai méréseinknél a mikropipettákba töltött intracelluláris folyadékot biocytin-nel egészítettük ki, amely lehetővé teszi a sejtek jelölését és előhívását DAB reakcióval. Az előhívás után a sikeresen feltöltött, azonosítható elsőrégi interneuronokat hagyományos fénymikroszkóp segítségével vizualizáltuk, majd a sejteket három különböző morfológiai csoportba soroltuk: neurogliaform, nem neurogliaform, valamint csipkebogyó sejtek (Boldog és mtsai., 2018). A neurogliaform sejtekre jellemző a relatívan kisméretű, kerek szóma, a sűrű és

lokális axonarborizáció, valamint a nagyszámban megtalálható preszinaptikus boutonok (Oláh és mtsai., 2009). Ezzel ellentétben a nem neurogliaform típusú elsőrégi interneuronok nagyobb számával és ritkább axon arborizációval rendelkeznek, valamint axon-nyúlványukat gyakran az elsőréteget elhagyva mélyebb rétegekbe is projektálják. A csipkebogyó sejteket az axonon nagyszámban megtalálható csipkebogyó szerű boutonok, valamint a kompakt, bokor szerű axon-arborizáció szerint azonosítottuk (Boldog és mtsai., 2018).

## **In vivo elektrofiziológia**

Kísérleteinket a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük el. In vivo méréseinkhez felnőtt nőstény és hím egereket használtunk (GAD67-GFP line G42 n=37, Ai9 n=5, C56/B6J n=3, vGAT-AI9 n=75). Az állatokat izofluránnal (2,5% altatásra, 1,5% az alvás fenntartására a műtét alatt) altattuk el, majd egy saját készítésű fejbefogó fémkeretet rögzítettünk a koponyára. A teljes felépülést követően az állatokat vízmegvonás mellett a mérőhelyhez szoktattuk és kizárólag csak a mérőhelyen jutottak vízhez. Egy hét beszoktatás után az állatokat izofluránnal vagy ketamin-xylazin (0,1 mg ketamin és 0,008 mg xylazin, vagy 0,4 mg klorálhidrát g/testtömeg) elegyével altattuk majd egy 2-3 mm átmérőjű kraniotómiát készítettünk. A durotómia elkészítése után a kraniotómiát feltöltöttük 1.5%-os agarózzal és egy fedőlemezt rögzítettünk, amely mérsékli az agy mozgását, valamint hozzáférést biztosít az intra- és extracelluláris elektródák bejuttatásához. A műtét után az indukált alvás közbeni elvezetésekhez az állatokat áthelyeztük a mérőhelyre. Az éber állapotban történt elvezetéseknel legalább 1-2 órával a műtét után kezdtük csak el az elvezetéseket. Az állatok az elektrofiziológiai mérés közben nem végeztek semmilyen feladatot, kényelemben feküdtek, tisztálkodtak és időnként elaludtak. Az extracelluláris elektródákat (1-3 M $\Omega$ ) CaCl<sub>2</sub> mentes MCSF-fel töltöttük fel és mélyebb agykérgi rétegekbe juttattuk le (548,06  $\pm$  348,26  $\mu$ m mélyen). A whole-cell elvezetéshez használt mikropipettákat (3-5 M $\Omega$ ) intracelluláris oldattal (mM-ban kifejezve: 126 kálium-glükonát, 4 KCl, 4 ATP-Mg, 0,3 GTP-Na<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 keratin-foszfát és 8 biocytin (pH 7,20; 300 mOsm) és fluoreszcens festékkel (10  $\mu$ M Alexa Fluor 594 vagy Alexa Fluor 488) töltöttük fel. Az agykéreg első rétegében alakítottuk ki a whole-cell konfigurációt 20-120  $\mu$ m mélyen az agyfelszíntől, és ~1000  $\mu$ m (806,7  $\pm$  506  $\mu$ m) távolságra az extracelluláris elektródától. A sejtek vizualizálásához két-foton

mikroszkópot használtunk (Femtonics galvo-galvo két-foton rendszer, Olympus BX61WI upright mikroszkóp, Mai Tai DeepSee [Spectra-Physics, Santa Clara, CA] femtoszekundomos Ti:zafír lézer, 800-850 nm hullámhossz). A kraniotómián felmelegített fiziológias sóoldatot (35-37 °C) keringettünk, annak érdekében, hogy az agykéreg hőmérsékletét fiziológias értéken tartsuk. Az elektrofiziológiai elvezetéseket HEKA EPC 10 erősítőkkel végeztük, 10 kHz-en (Bessel szűrő) szűrtük és 50 kHz-el digitalizáltuk Patchmaster szoftverrel (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht).

### **In vivo regisztrált sejtek post-hoc anatómiai analízise**

A sikeres kísérleteket követően az állatokat ketamin-xylozinnal (0,1 mg ketamin és 0,008 mg xylozin g/testtömeg) elaltattuk, majd transzkardiálisan perfundáltuk először 0,1 M PB-vel, ezt követően ismét PB-vel, amely 4%-os paraformaldehidet és 0,15%-os glutáraldehidet tartalmazott. A perfundálás után az agyat eltávolítottuk és a perfundáláshoz is használt oldatba helyeztük egy napig. A kraniotómia részén 50 µm vastag koronális metszeteket készítettünk. Az agyszeleteket folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, majd 0,1 M PB-vel olvasztottuk fel. A neurobiotint tartalmazó sejtek vizualizálásához az agyszeletekre Streptavidin konjugált Alexa Fluor 488 vagy Cy3-t (Jackson ImmunoResearch) és 1:400 TBS hígítási sort használtunk, valamint Vectashield-ben (Vector Laboratories) tartottuk őket. Konfokális Z-sorozatképeket készítettünk a mintákról ZEISS LSM 880 konfokális mikroszkóppal, 40x olaj immerziós objektívvel (1,4 NA).

### **Adatelemzés**

Az elektrofiziológiai adatok analízisét Fitmaster (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht), Origin 9 (OriginLab) és MATLAB (The Math Works, Inc.) szoftver segítségével végeztük el.

### **Retroaxonális tüzelési mintázat analízise**

Az akciós potenciálokat a szűretlen, nyers whole-cell current-clamp elvezetésekből detektáltuk. Az akciós potenciálok küszöbpotenciálját a csúcs előtti szakasz idő szerinti deriváltja alapján határoztuk meg. A kezdeti pontot arra a pontra helyeztük, ahol a derivált meghaladta az 5 mV/ms-ot. Az AP-t megelőző szakasz depolarizációs rátáját a kezdeti pont előtti 1 ms-os részre illesztett egyenes meredekségéből számítottuk. A

küszöbpotenciál és a depolarizációs ráta alapján elkülönítettük az AIS-AP és RA-AP-kat, valamint az AP idő szerinti elsőrendű deriváltja alapján bizonyosodtunk meg a sikeres szétválasztásról. Azoknál az elvezetésekénél, ahol sikeresen kialakítottuk a retroaxonális tüzelést, a következő paramétereket határoztuk meg: stimuláció alatt kiváltott AIS-AP-k száma, a kialakult RA-AP-ok száma a folyamatos elvezetés alatt, a retroaxonális tüzelés időtartama (első és utolsó RA-AP között eltelt idő), retroaxonális tüzelés frekvenciája (RA-AP-ok száma elosztva az időtartammal), belső tüzelési frekvencia (RA-AP-ok közötti intervallum reciprokjainak a maximuma). Az előző paraméterek alapján három különböző csoportba soroltuk a retroaxonális tüzelést: sporadikus, tónikus és a ritmikus mintázat.

### **Akciós potenciálok időzítésének analízise**

Az *in vitro* és *in vivo* lassúhullámú oszcillációk közben elvezetett akciós potenciálokat a fentiekhez hasonlóan kategorizáltuk RA-AP és AIS-AP csoportokba. Az extracelluláris LFP elvezetésből 4 másodperc hosszúságú szakaszokat vágunk ki az AP-ok körül. A gyors Fourier transzformációval meghatároztuk a teljesítmény spektrum denzitást (PSD) a LFP mérésre, majd a frekvenciaértékekkel besoroztuk a teljesítmény értékeket a PSD függvény reciprok természetének kiküszöbölésére. Meghatároztuk a delta frekvenciatartományú (0,5-4 Hz) oszcilláció teljesítmény hányadát a teljes frekvenciatartományhoz képest (0,5-45 Hz) (Kim és mtsai., 2021). A továbbiakban azokat az LFP részeket használtuk, ahol ez a hányad nagyobb volt mint 0,1. A kiválasztott LFP szakaszokat Butterworth módszerrel szűrtük 0,5-4 Hz-es tartományra és a Hilbert transzformáció osztottuk fel 0-360° tartományra. A 0° és a 360° jelentette az LFP negatív csúcsokat (UP-állapot), 180° a pozitív csúcsokat (DOWN-állapot). Elsőként meghatároztuk az akciós potenciálok csúcsait és hozzá társítottuk az adott időpillanatban jelentkező LFP fázist. Meghatároztuk az átlag irányvektor hosszát és irányát a MATLAB Circular Statistics Toolbox-al (Berens, 2009), ezzel az AIS-AP és a RA-AP-ok esetleges fázispreferenciáját. A polár grafikonokon szereplő fázisértékekre 10°-os hisztogram felosztást használtunk, ezt követően 30°-os mozgó átlaggal simítottuk. A fázispreferenciák egyenletes eloszlását Rayleigh teszttel (Berens, 2009) határoztuk meg.

## **Statisztika**

A szövegben feltüntetett adatok a következő formában szerepelnek: medián  $\pm$  standard deviáció. A statisztikai tesztek a MATLAB Statistics and Machine Learning Toolbox-szal végeztük el. A statisztikai különbségeket  $p < 0,05$  szignifikanciaszintnél határoztuk meg (jelmagyarázat: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Az elvégzett statisztikai teszteként elsőként a Kolmogorov-Smirnov teszttel az adatok normál eloszlását vizsgáltuk meg. Normál eloszlás esetén a páros vagy a két mintás t-tesztet, ellenben a Mann-Whitney-U tesztet használtuk.

## 5. Eredmények

---

### Retroaxonális tüzelési mintázatok az ember agykéregben

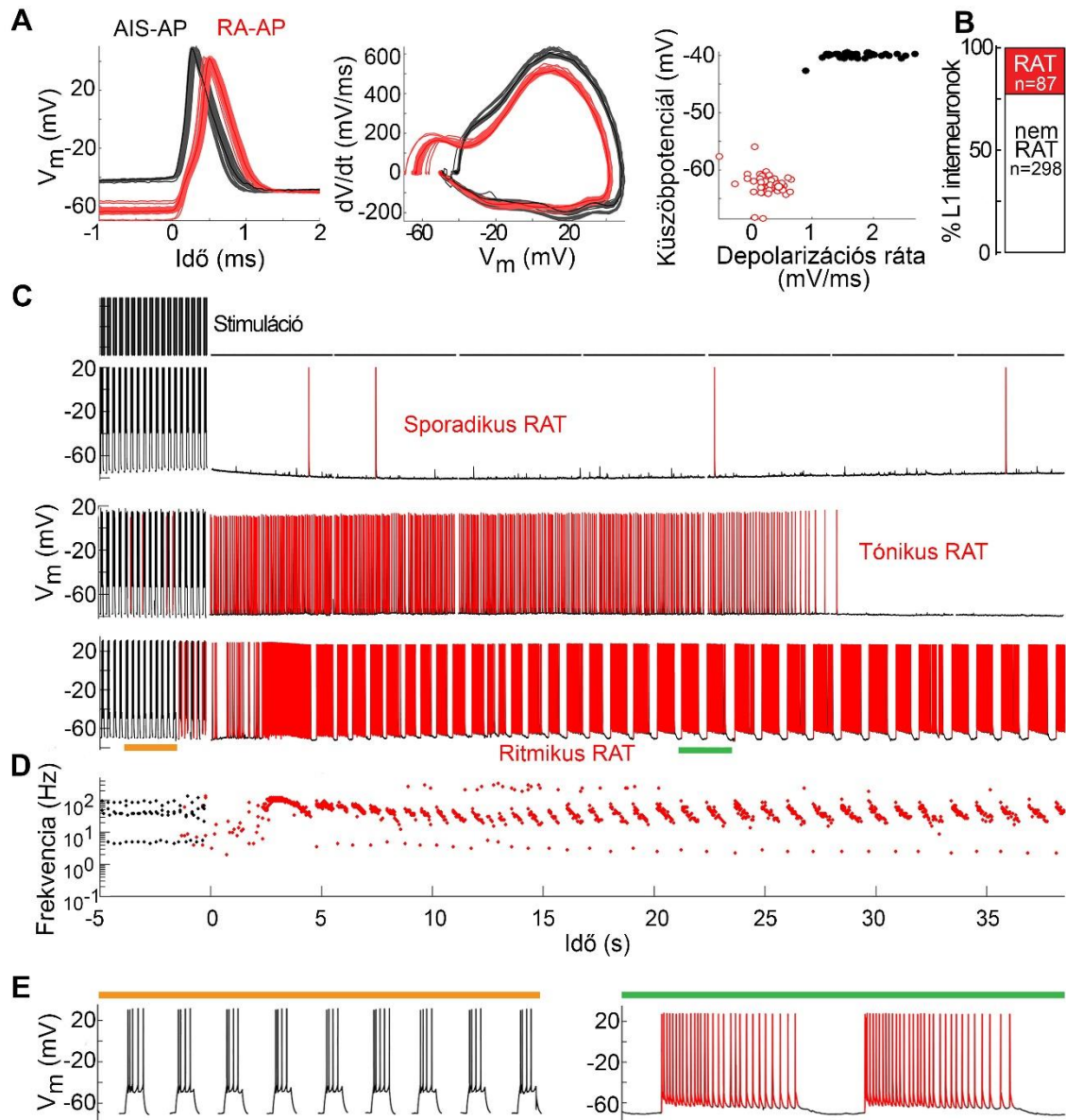
Első kísérleteink során a szakirodalomban már ismertetett tónikus retroaxonális tüzelést (Sheffield és mtsai., 2011) vizsgáltuk az ember agykéregében. Az idegsebészeti úton eltávolított agykérgi szövetblokkokból túlélő agyszelet preparátumokat készítettünk, majd ezt követően szomatikus whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki elsőrégégi interneuronokon. Az általunk használt patch-clamp módszer előnye, hogy nyomon követhetjük az idegsejt membránpotenciálját és ezzel egy időben stimulálhatjuk is az elvezetett sejteket. A stimulációs protokollunk során küszöbfeletti depolarizáló áramlépcsőket injektáltunk, aminek eredményeként az idegsejteken akciós potenciálok jelentek meg. A stimulációt a retroaxonális tüzelés (RAT) megjelenéséig ismételtük (**1. A, C ábra**). Ezt követően a szomatikus stimuláció közvetlen hatására megjelenő és a stimuláció befejezése után kialakult akciós potenciálok tulajdonságait vizsgáltuk meg. A szomatikus stimuláció hatására, az axon iniciális szegmentumon kialakult akciós potenciálok (AIS-AP) elkülöníthetőek a RAT alatt kialakuló, az axon távolabbi szakaszából a szómába visszaterjedő retroaxonális akciós potenciáloktól (RA-AP). Negatívabb küszöbpotenciál, kisebb küszöbalatti depolarizációs ráta és kétkomponensű fázisgörbe jellemző a RA-AP-okra (**1. A ábra**). 385 elvezetett elsőrégégi interneuronból 87-nél sikeresen ki tudtuk alakítani a RAT-t az ember agykéregében (**1. B ábra**), amely összhangban van a szakirodalmi eredményekkel (Chittajallu és mtsai., 2020). Azonban az eddig ismert tónikus RAT-tól különböző, további két új tüzelési mintázatot is azonosítottunk (**1. C ábra**). A tüzelési frekvencia alapján három különböző csoportot határoztunk meg: sporadikus, tónikus és a ritmikus RAT-t. A sporadikus RAT esetén csak néhány akciós potenciál ( $8 \pm 6$ ) alakul ki, továbbá a tüzelési frekvencia is alacsony ( $0,31 \pm 1,5$  Hz). Ezzel ellentétben a tónikus RAT-re magasabb tüzelési frekvencia jellemző ( $18 \pm 22$  Hz), valamint sokkal több akciós potenciál ( $56 \pm 416$ ) figyelhető meg (Chittajallu és mtsai., 2020; Deemyad és mtsai., 2018; Imbrosci és mtsai., 2015; Krook-Magnuson és mtsai., 2011; Sheffield és mtsai., 2011, 2013; Suzuki és mtsai., 2014). A ritmikus RAT esetén alacsonyabb a tüzelési frekvencia ( $9,6 \pm 9,3$  Hz) a tónikushoz képest, azonban az akciós potenciál sorozatok magas tüzelési frekvenciájú csoportokba rendeződve (burst), periodikusan jelennek meg (burst időtartam:  $0,6 \pm 0,8$  s, burst frekvencia:  $0,3 \pm 0,2$  Hz) (**1. D ábra**). A ritmikus RAT közben kialakult bimodális váltakozás nem éri el a

szomatikus küszöbpotenciált (**1. E ábra**), kizárólag RA-AP-ok jelennek meg, tehát feltételezhető, hogy a lassú oszcilláció axonális eredetű és független a szomatodendritikus integrációtól.

Kísérleteinkben az AIS-AP és az RA-AP elkülönítése a szomatikus elvezetés alapján történt. Habár számos korábbi kísérlet fellelhető a szakirodalomban, ahol az axon extracelluláris stimulációjával bizonyították már (Elgueta és mtsai., 2015; Sheffield és mtsai., 2011), hogy a retroaxonális és az axon iniciális szegmentumon kialakult AP-ok elkülöníthetők egymástól a szomatikus elvezetés alapján, ennek ellenére közvetlen módszerrel is szeretnénk volna megvizsgálni a RA-AP-okat. Az elsőrégi interneuronok axon nyúlványa lényegesen vékonyabb struktúra a szómához és a dendrithez viszonyítva, ezért az axonon történő whole-cell patch-clamp konfiguráció kialakítása nehézségekbe ütközik. Azonban az agyszelet metszése során az idegsejtek axon nyúlványa a szelet felszínén elvágódik és az axon nyúlványnál vastagabb, egy gömb formájú struktúra, úgynevezett bleb alakul ki, amely vizualizálható és az általunk használt patch-clamp mikropipettákkal is hozzáférhető (Hu és Shu, 2012). Meggyőződve arról, hogy a RA-AP-ok az axon iniciális szegmentumtól eltérő helyen inicializálódnak, szimultán szomatikus és axonális bleb patch-clamp elvezetéseket (**2. A ábra**) végeztünk elsőrégi neurogliaform sejteken (NGF) (n=2). Depolarizáló áramlépcsőket injektáltunk a szómába (**2. A ábra**), majd a kialakult akciós potenciálok mind a szomatikus mind az axonális bleb elvezetésen detektálhatóak voltak. Meghatároztuk a két csatornán egyidejűleg megjelenő akciós potenciálok közötti latenciát. AIS-AP esetén a szomatikus elvezetésen jelent meg először, a RA-AP esetén pedig fordítva, először a bleben detektáltuk az AP-okat (**2. B ábra**). A fentiekhez hasonlóan a szomatikus csatornán elvezetett AP-okat AIS-AP és RA-AP-ként kategorizáltuk. Azokra az AP-okra, amelyek a bleben jelentek meg először, negatívabb küszöbpotenciál, kétkomponensű fázisgörbe és kisebb depolarizációs ráta volt jellemző (**2. C, D ábra**), tehát a szomatikus elvezetés alapján is elkülöníthető a RA-AP és az AIS-AP. Első kísérletsorozatunk alapján elmondható, hogy az elsőrégi interneuronok egy alcsoportjában az akciós potenciálok nem csak az axon iniciális szegmentumon alakulhatnak ki, hanem az axon disztálisabb részein is. Ezen felül kísérleteink bizonyítják, hogy a szomatikus elvezetés alapján is elkülöníthetők egymástól a retroaxonális AP-ok az axon iniciális szegmentumon kialakult AP-októl. Továbbá, kísérleteink bemutatták, hogy a retroaxonális tüzelés megjelenik az elsőrégi interneuronokon az ember agykérgében. Tehát a RAT egy evolúciósan konzervált



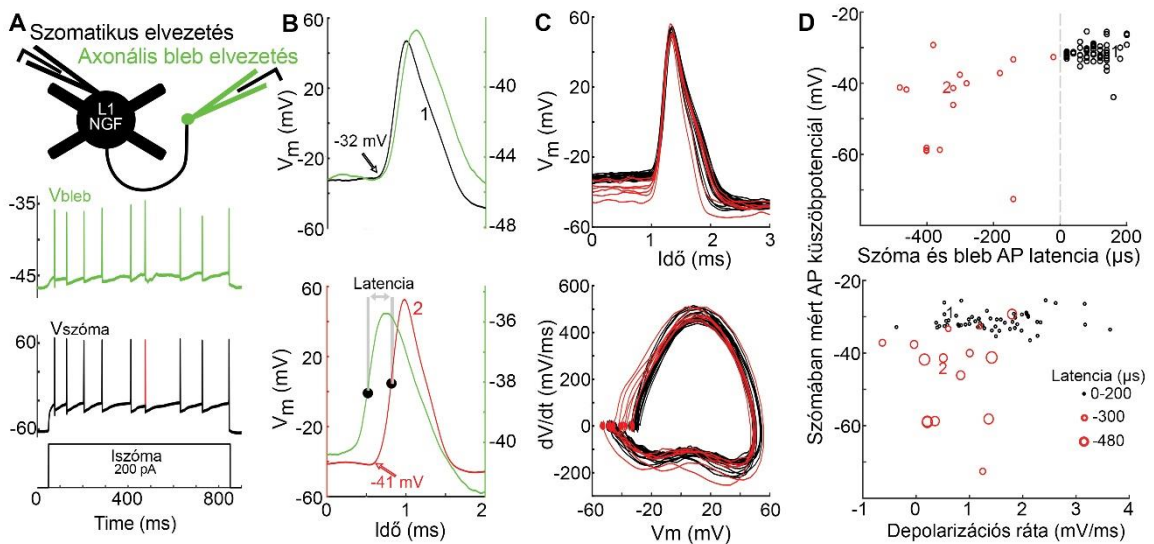
mechanizmus, amely előfordul rágcsálóban és emberben is. Azonban az eddig ismert tónikustól eltérően további két RAT mintázatot is azonosítottunk. Ez több kérdést is felvet, miszerint hogyan alakulnak ki a különböző RAT mintázatok, valamint azt, hogy a sporadikus és a ritmikus RAT kizárólag emberre jellemző, vagy előfordulhat rágcsáló agykéregben is.



### 1. ábra Retroaxonális tüzelési mintázatok az ember agykéregben

(A) Az akciós potenciálok kinetikai paraméterei alapján elkülöníthetjük egymástól a RA-AP-okat (pirossal jelölt AP-ok) és az AIS-AP-okat (feketével jelölt). Az AP küszöbpotenciáljához igazított AP-ok hullámformája látható (bal oldal). Az AP-ok idő szerinti elsőrendű deriváltja a membránpotenciál függvényében ábrázolva (középen). A

küszöbpotenciál és az AP-t megelőző 1ms-os szakasz depolarizációs rátája elkülöníti az AIS-AP-t és a RA-AP-t (jobb oldal). **(B)** A retroaxonális tüzelést mutató interneuronok aránya az agykéreg első rétegében. **(C)** Stimulációs protokoll utolsó 5 másodperce (fent). A három különböző retroaxonális tüzelési mintázat látható egymás alatt: sporadikus, tónikus és a ritmikus mintázat. **(D)** A fent látható ritmikus RAT frekvenciája, az AP-ok közötti időintervallumból számolva. **(E)** Három másodperces szakasz a stimuláció alatt (bal oldal, sárgával jelölt rész) és a ritmikus RAT közben (jobb oldal, zölddel jelölt rész). A ritmikus RAT közben a bimodális membránpotenciál váltakozás nem éri el a AIS-AP ok küszöbpotenciálját, így RA-AP-ok láthatók (jobb oldal).



## 2. ábra A szómán és a bleb-en regisztrált akciós potenciálok

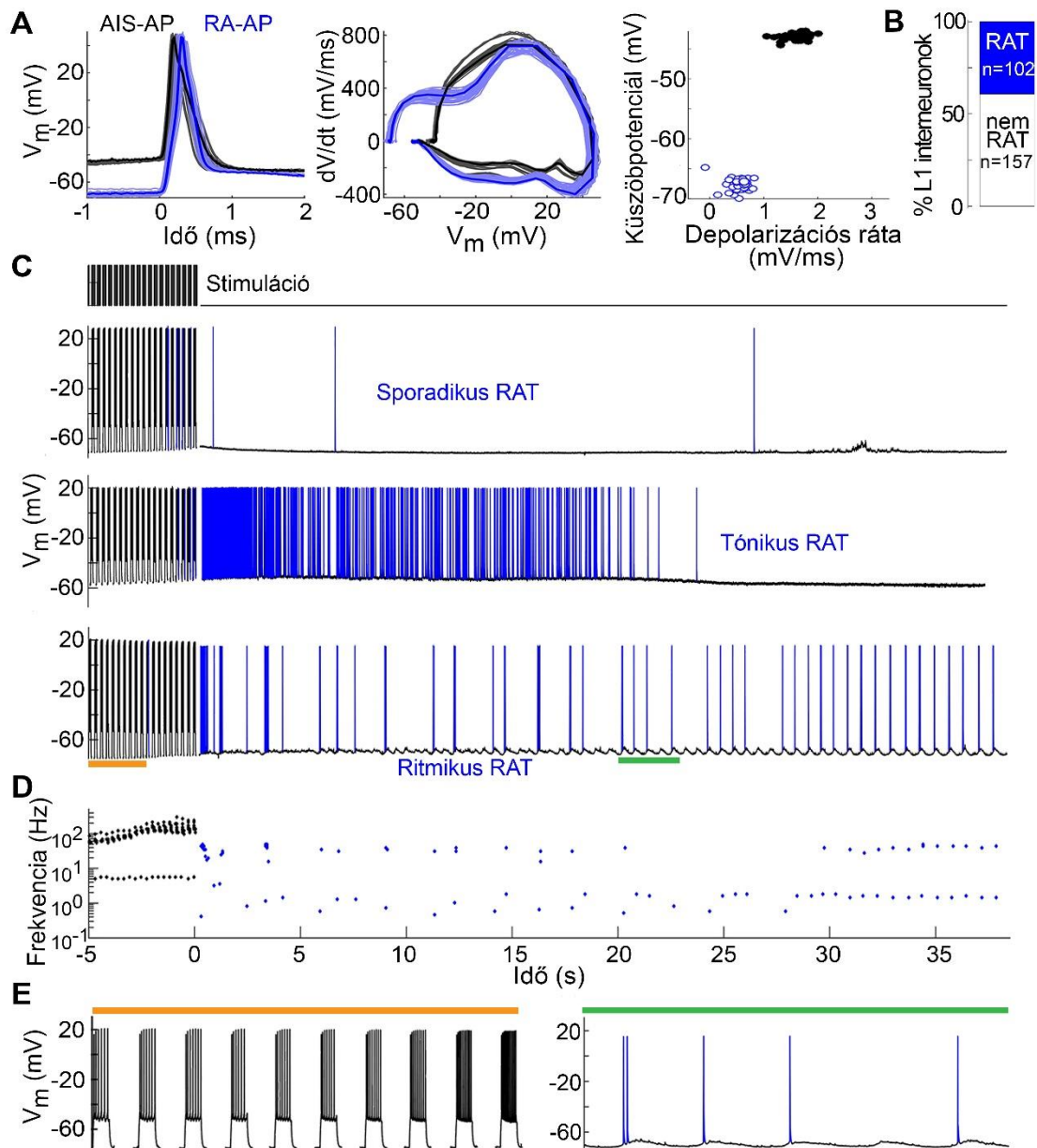
**(A)** Sematikus kísérleti felállás (fent). A szómán (feketével jelölt) és az axonális bleben (zölddel jelölt) regisztrált membránpotenciál változás (középen) a szómába injektált depolarizáló áramlépcső hatására (lent). **(B)** Az AIS-AP (fekete) esetén a szómában detektálható először az akciós potenciál, majd ezt követően a bleben (fent). Ezzel ellentétben a RA-AP (piros) esetén a bleben jelenik meg először az AP (lent). **(C)** A szomatikus elvezetésen regisztrált AIS-AP-ok (fekete) és RA-AP-ok (piros) egymásra illesztve (fent). A felül látható akciós potenciálok idő szerinti elsőrendű deriváltja a membránpotenciál függvényében ábrázolva (lent). Az AIS-AP és RA-AP-ok elkülöníthetők a derivált alapján is. **(D)** A szómában és a bleben detektált AP-ok közötti latencia értékek a szómában elvezetett AP küszöbpotenciál függvényében (fent). A piros színnel a RA-AP-hoz, a fekete színnel pedig az AIS-AP-hoz tartozó értékek. A

számában detektált AP küszöbpotenciálja a depolarizációs ráta függvényében. A latencia értékeket a körök mérete reprezentálja (lent).

## Ritmikus retroaxonális tüzelés a rágcsáló agykéregben

A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a ritmikus retroaxonális tüzelés kialakítható-e a rágcsáló agykéregben, vagy egy fajspecifikus jelenség, ami kizárólag az emberre jellemző. Túlélő agyszelet preparációkat készítettünk fiatal Wistar patkányok szomatoszenzoros agykérgéből, majd szomatikus whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki elsőrétégi interneuronokon. A humán agyszelet kísérleteinknél is használt stimulációs protokollt alkalmaztuk a rágcsáló kísérletek esetében is (**1, 3. C ábra**). A RA-AP és az AIS-AP elkülönítésére az előzőekben is használt paramétereket használtuk (**3. A ábra**). Az elsőrétégi interneuronok körülbelül 40 százalékánál ( $n=102/259$ ) ki tudtuk alakítani a sporadikus (RAT frekvencia:  $1 \pm 1,8$  Hz) vagy a tónikus (RAT frekvencia:  $7,5 \pm 15,3$  Hz) RAT-t a rágcsáló agykéregben (**3. B, C ábra**) a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan (Sheffield és mtsai., 2011). Azonban a humán kísérletekkel ellentétben nem sikerült ritmikus RAT-t kialakítanunk. Ezt az eredményt meglepőnek találtuk, mivel a neurális hálózatokban kialakuló ritmikus események, oszcillációk alapvető szerepet töltenek be az agy működésében (Buzsáki és Draguhn, 2004), ebből adódóan az idegszövetben megjelenő oszcilláció minden emlős fajra jellemző. Az agykérgi oszcillációk hosszú ideje az agykutatás középpontjában állnak, azonban vizsgálatuk túlélő agyszelet preparátumokban nehézségekbe ütközik. Az oszcillációk kialakításához az idegszövet kiváló energia- és oxigénellátottsága szükséges, mely a túlélő agyszelet preparátum esetében az általunk használt konvencionális alámerített elvezetőkamrában nem megfelelően biztosított (Hájos és mtsai., 2009). A humán agyszeletek életképessége jobb, mint a rágcsáló agyszeleteké (Ting és mtsai., 2018), ezért feltételeztük, hogy megfelelő oxigén ellátottságot (Hájos és Mody, 2009; Wu és mtsai., 2002, 2005; Zhang és mtsai., 2008) és a fiziológiás körülményekhez közelebb álló környezetet biztosítva elősegíthető a ritmikus RAT megjelenése a rágcsáló agykérgi elsőrétégi interneuronokon. Ennélfogva a további kísérleteinkhez a hagyományos alámerített elvezetőkamra helyett kettős-átfolyású elvezető kamrát (Hájos és Mody, 2009), valamint csökkentett kalcium és magnézium-ion koncentrációjú elvezető oldatot (Rasmussen és mtsai., 2020; Sanchez-Vives és McCormick, 2000) használtunk. Ennek eredményeként sikeresen ki tudtuk alakítani a ritmikus RAT-t a rágcsáló agykéregben is (**3. C ábra**). A humán kísérletekhez

hasonlóan a ritmikus RAT alacsonyabb tüzelési frekvenciát ( $5,5 \pm 6,6$  Hz) mutatott a tónikushoz képest, valamint a RA-AP sorozatok szintén csoportokba rendeződve (**3. D ábra**), periodikusan jelentek meg (burst időtartam:  $0,1 \pm 1,4$  s, burst frekvencia:  $0,7 \pm 0,4$  Hz). Továbbá, a ritmikus bimodális membránpotenciál váltakozás nem éri el az AIS-AP ok küszöbét (**3. E ábra**), kizárólag RA-AP-ok jelennek meg. Kísérleteink alapján a ritmikus retroaxonális tüzelés szintén egy evolúciósan konzervált jelenség, mivel előfordul emberben és patkányban is.



### 3. ábra Retroaxonális tüzelési mintázatok a rágszáló agykéregben

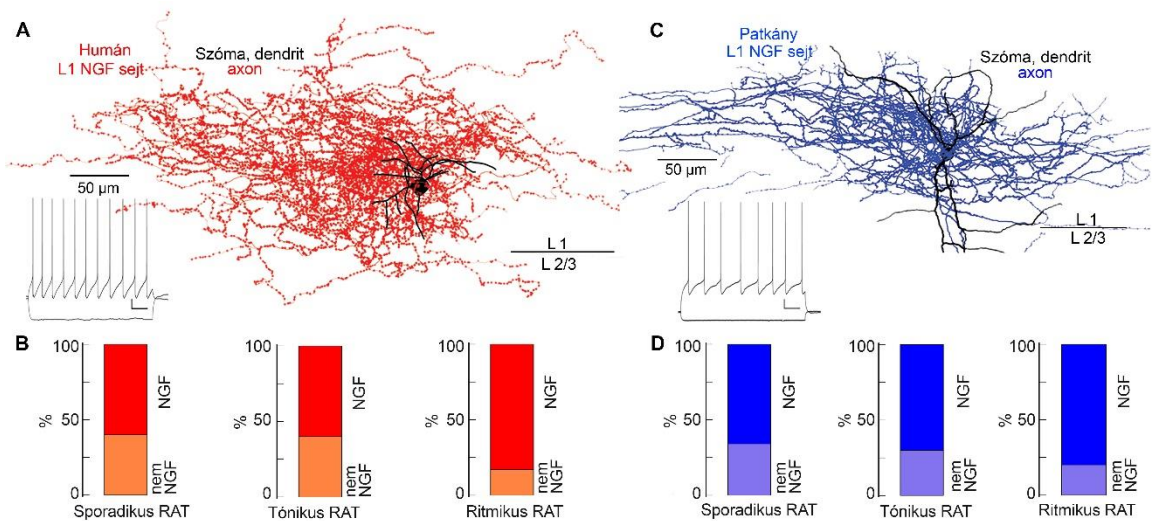
(A) RA-AP (kék színnel jelölt) és az AIS-AP (fekete színnel jelölt) elkülöníthetőek egymástól az akciós potenciál kinetikai paramétereinek alapján: az AP

küszöbpotenciáljához igazított AP-ok hullámformája (bal oldal), az AP-ok idő szerinti elsőrendű deriváltja a membránpotenciál függvényében (középen) ábrázolva. A küszöbpotenciál és az AP-t megelőző 1ms-os szakasz depolarizációs rátája alapján az AIS-AP-ok és a RA-AP-ok szétválaszthatók egymástól (jobb oldal). **(B)** Retroaxonális tüzelést mutató interneuronok aránya a patkány agykéreg első rétegében. **(C)** Stimulációs protokoll utolsó 5 másodperce (fent). Az ábrán a három különböző retroaxonális tüzelési mintázat látható: sporadikus, tónikus és ritmikus. **(D)** A **C** panelen látható ritmikus RAT tüzelési frekvencia. A frekvenciát az AP-ok csúcsa közötti időintervallumból határoztuk meg. **(E)** Három másodperces szakasz a stimuláció alatt (bal oldalon, sárga színnel jelölt rész) és a ritmikus RAT közben (jobb oldalon, zöld színnel jelölt rész). A ritmikus RAT közben a bimodális membránpotenciál változás nem éri el a szomatikus akciós potenciál küszöböt.

## **Retroaxonális tüzelést mutató elsőrétegi interneuronok morfológiai osztályozása**

Az eddigi tanulmányok alapján a RAT több agyterületre és sejtípusra is jellemző: Htr5b- szerotonin receptor pozitív interneuronok a szomatoszenzoros kéregben (Sheffield és mtsai., 2011), neuropeptid Y (NPY) pozitív NGF (neurogliaform) és Ivy sejtek a hippocampusban (Deemyad és mtsai., 2018; Krook-Magnuson és mtsai., 2011), valamint a NGF és a gyorsan tüzelő sejteken a piriform kéregben, a hippocampusban és az agykéregben (Suzuki és mtsai., 2014). Annak érdekében, hogy meghatározzuk a RAT sejtípus-specifikusságát emberben, post-hoc anatómiai módszereket alkalmaztunk és a biocitinnel feltöltött interneuronokat az axonális és dendritikus morfológiájuk alapján osztályoztuk. Három különböző csoportot határoztunk meg: NGF (**4. A ábra**), nem-NGF és a csipkebogyó sejtek (Boldog és mtsai., 2018). A RAT előfordul a NGF (n=21) és a nem-NGF sejtekben (n=9) (**4. B ábra**) is, azonban csipkebogyó (n=11) interneuronokban nem volt megfigyelhető. Továbbá a különböző RAT mintázatok sejtípus-specifitását is megvizsgáltuk. A RAT mindhárom mintázata megjelenik NGF és nem-NGF sejtben is, azonban gyakoribb a NGF morfológiát mutató sejtekben (**4. B ábra**). A patkány agykéregben biocitinnel feltöltött sejtek post hoc anatómiai osztályozását is elvégeztük. Az interneuronokat az axon és dendrit morfológia alapján NGF és nem-NGF sejt kategóriába soroltuk (**4. C ábra**). A RAT és a RAT különböző mintázatai egyaránt megjelenik a NGF (n=22) és a nem-NGF interneuronokon (n=10), de jellemzőbb a NGF

interneuron esetében (**4. C, D ábra**). Sporadikus, tónikus és a ritmikus RAT mind a NGF, mind a nem-NGF interneuronokban megjelenik a rágcsáló agykéregben. Összefoglalva az anatómiai osztályozást, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a RAT főleg NGF sejtekre jellemző, azonban előfordulhat az elsőrétegi interneuronok egyéb morfológiai csoportjaiban is.



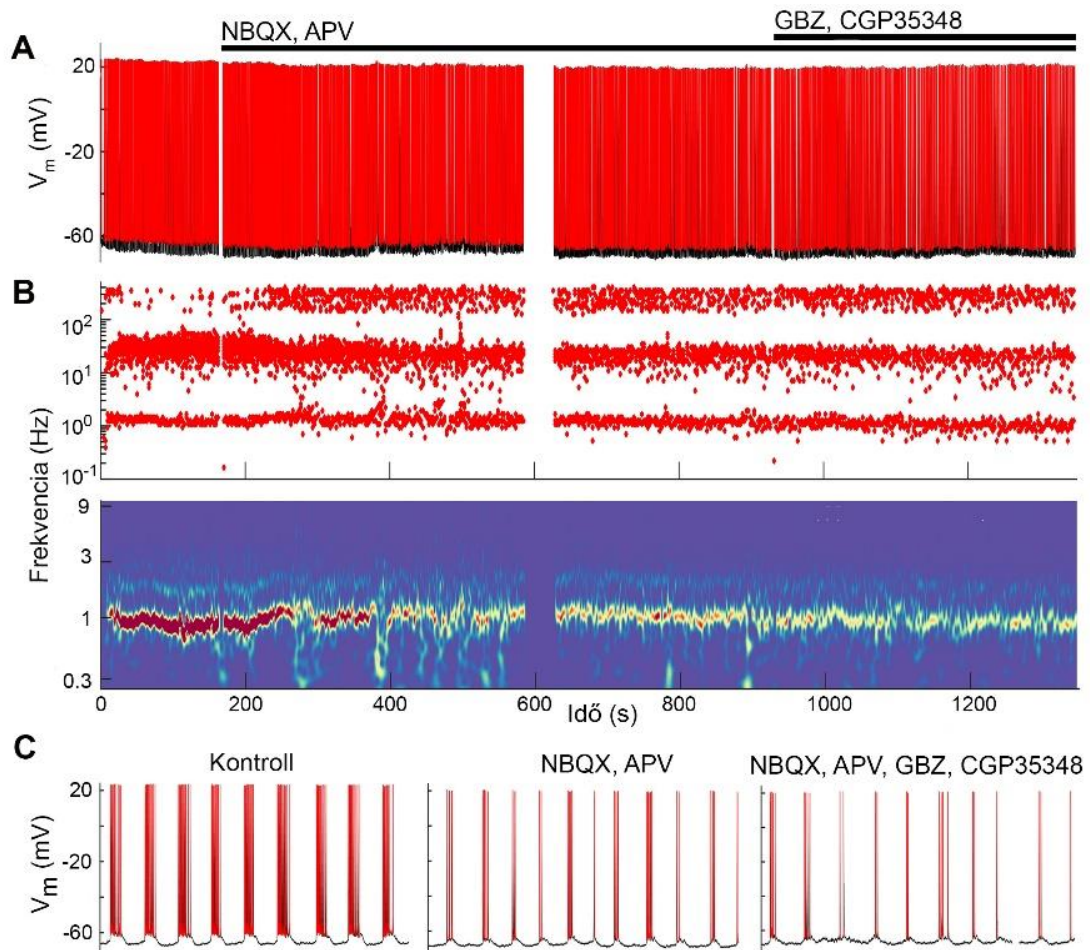
#### 4. ábra Retroaxonális tüzelést mutató interneuronok morfológiai csoportosítása

(A) Anatómiai rekonstrukció egy ritmikus retroaxonális tüzelést mutató humán elsőrégi neurogliaform interneuronról. Szóma és dendrit (feketével jelölve), axon (piros színnel). A bal sarokban az interneuron hiperpolarizáló és depolarizáló áramlépcsőre adott membránpotenciál válasza. (skála: 100 ms, 20 mV). (B) Azonosított neurogliaform és nem-neurogliaform sejtek aránya a különböző RAT mintázatoknál. A különböző RAT mintázatok főleg neurogliaform sejtekre jellemző. (NGF sejtek: n=21, nem-NGF sejtek: n=9). (C, D) RAT sejtek csoportosítása a patkány agykéregben hasonlóan az A, B panelhez (NGF sejtek: n=22, nem-NGF sejtek: n=10).

## Sejt-autonóm ritmikus retroaxonális tüzelés

Következő kísérleteinkben a ritmikus RAT mechanizmusát vizsgáltuk meg. Whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki az elsőregegi interneuronokon, majd az előző kísérleteknél is használt stimulációs protokollt és AP csoportosítást alkalmaztuk. A neurális oszcillációk kialakulásához az idegsejtek intrinzik elektrofiziológiai tulajdonságai (Kadala és mtsai., 2015), valamint a hálózatban lévő idegsejtek interakciói (Wu és mtsai., 2005) járulnak hozzá. Ezért elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a ritmikus RAT egy hálózati vagy egy sejt-autonóm jelenség. A neurális hálózatok megfelelő működéséhez, valamint a neurális oszcillációk kialakulásához elengedhetetlen a GABA<sub>A</sub> és a glutamáterg szinaptikus transzmisszió. GABA- és glutamát receptor-blokkolókat használtunk annak tesztelésére, hogy a ritmikus RAT egy hálózat függő jelenség-e. AMPA-, NMDA-, GABA<sub>A</sub>- és GABA<sub>B</sub>- receptor-antagonistákat alkalmaztunk, (**5. A ábra**) azonban ezek jelenlétében is sikeresen kitudtuk alakítani a RAT-t (n=2) továbbá nem voltak hatással a RAT időtartamára sem (**5. A, B, C ábra**). Eredményeink egyeznek a szakirodalomban ismertetett adatokkal, miszerint a szinaptikus transzmisszió és a vezikulák felszabadulása sem szükséges a RAT megjelenéséhez (Sheffield és mtsai., 2013).



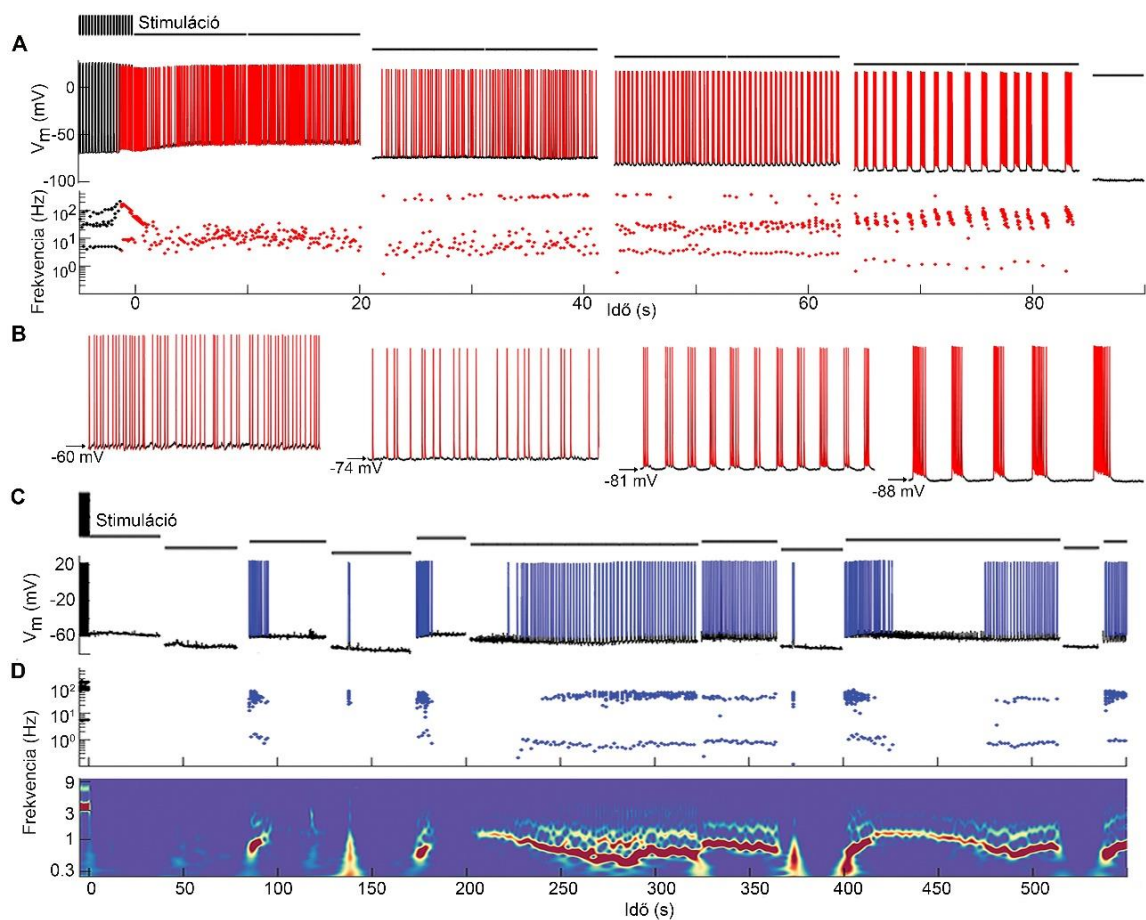


### 5. ábra Szinaptikus transzmisszió független retroaxonális tüzelés

(A) A ritmikus retroaxonális tüzelés nem függ a GABAerg és glutamáterg szinaptikus transzmissziótól. Ritmikus RAT kontroll, valamint NBQX, APV, Gabazine és CGP jelenlétében. (B) Akciós potenciálok között eltelt időből számolt tüzelési frekvencia (fent). Küszöbalatti lassú oszcilláció spektrális teljesítménysűrűsége (lent) (0,3-9 Hz). (C) 10 másodperces szakaszok a fenti elvezetésből kontroll, valamint a szinaptikus blokkolók jelenlétében.

Ritmusgeneráló, úgynevezett pacemaker sejteket számos agyterületen azonosítottak, amelyek sejt-autonóm membránpotenciál oszcillációt képesek kialakítani a hálózat működésétől függetlenül (Alonso és Llinás, 1989; Dossi és mtsai., 1992; Leresche és mtsai., 1991; Llinás és Yarom, 1986). Ezeknél az idegsejtekénél a szomatikus membránpotenciáltól függ az intrinzik oszcilláció frekvenciája (Alonso és Llinás, 1989; Dossi és mtsai., 1992; Leresche és mtsai., 1991; Llinás és Yarom, 1986; Wu és mtsai., 2005), egy közismert példa erre a thalamokortikális idegsejtek, amelyek intrinzik ritmusgeneráló tulajdonságukkal képesek a hálózati oszcillációkat szabályozni (Kasten és

Anderson, 2015). A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk a RAT szomatikus membránpotenciál függését. A RAT kialakítása után hosszantartó konstans áramokkal különböző hiperpolarizáltabb és depolarizáltabb értékeken tartottuk a sejtek szomatikus membránpotenciálját a humán (n=17) és a rágcsáló kísérleteink esetében is (n=6) (**6. A, C ábra**). Hasonlóan a ritmusgeneráló sejteknél leírtakhoz a RAT frekvenciája és mintázata modulálható: a hiperpolarizáltabb membránpotenciál csökkenti, a depolarizáltabb pedig növeli a tüzelési frekvenciát (**6. B, D ábra**). Ezenfelül elegendő mértékű membránpotenciál változtatással ki- és bekapcsolható a tüzelés. Eredményeink alapján a RAT nem függ a szinaptikus jelátviteltől, azonban a szomatikus membránpotenciál változtatásával modulálható az intrinzik oszcilláció frekvenciája, ezért arra következtetünk, hogy nem egy hálózati, hanem egy sejt-autonóm axonális ritmusgeneráló tulajdonsággal rendelkeznek egyes elsőrégi, főként neurogliaform interneuronok. Azonban a retroaxonális tüzelés kialakulása nem teljesen ismert, ezért további kísérletek szükségesek a teljes mechanizmus megismeréséhez.



**6. ábra Szomatikus membránpotenciál-függő retroaxonális tüzelés**

(A) A szomatikus membránpotenciál változtatásával modulálható a retroaxonális tüzelés oszcillációs frekvenciája az ember agykéregben. Stimulációs protokoll utolsó 5 másodperce, majd az azt követő konstans tartóáramok (fent). A retroaxonális tüzelést mutató interneuron membránpotenciálja (középen). Tüzelési frekvencia (alul). (B) Kinagyított öt másodperces szakaszok a fenti (A) elvezetésből. (C) A szomatikus membránpotenciál változtatásával modulálható a ritmikus retroaxonális tüzelés frekvenciája és az oszcilláció frekvenciája a rágcsáló agykéregben. Stimulációs protokoll utolsó 5 másodperce, majd az azt követő konstans tartóáramok (fent). A retroaxonális tüzelést mutató interneuron membránpotenciálja (lent). (D) RAT frekvencia és a küszöbalatti membránpotenciál változás spektrális teljesítménysűrűsége (0,3-9 Hz).

## **HCN-csatornák és az extracelluláris kálium ionok szerepe a retroaxonális tüzelés kialakulásában**

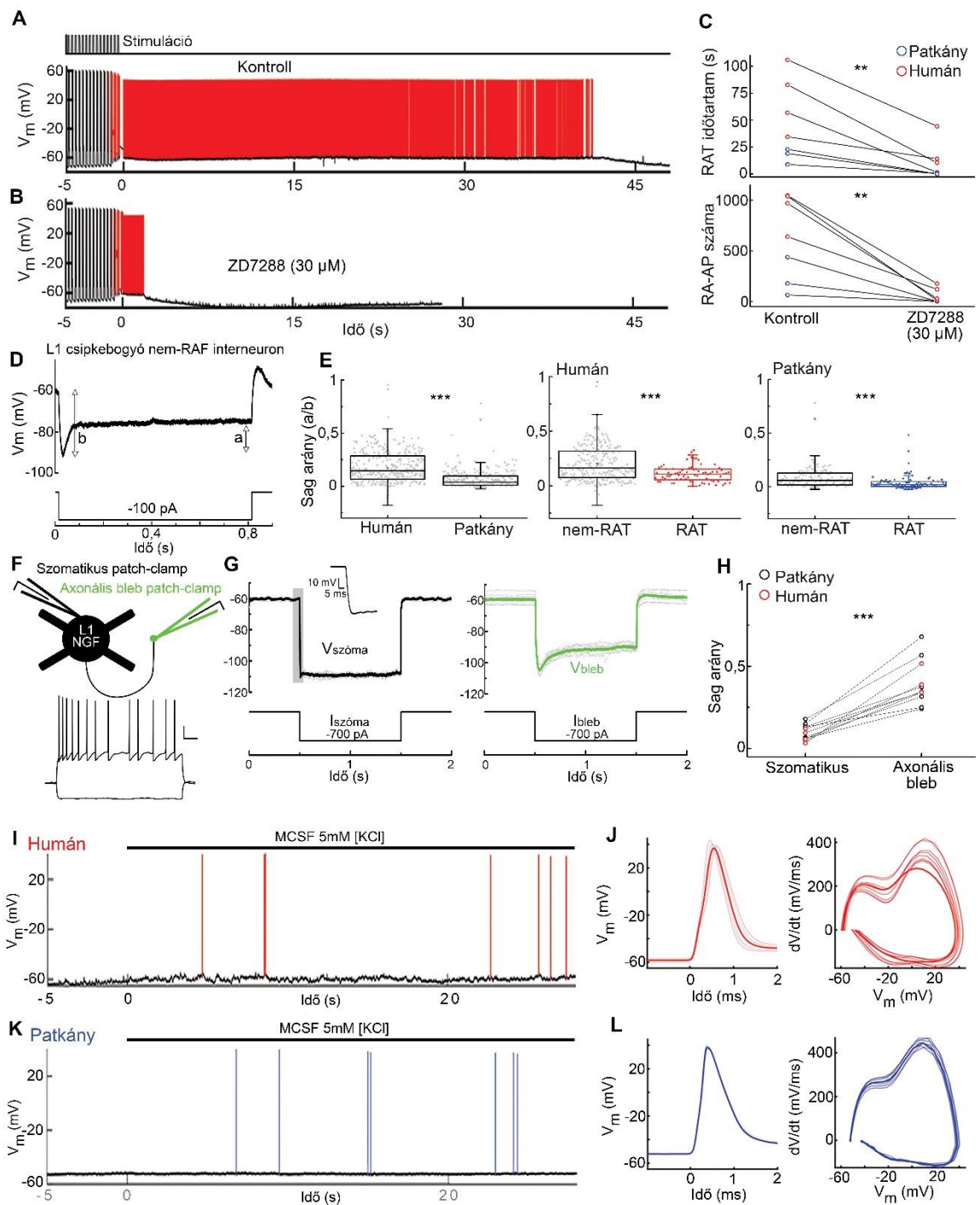
Előző kísérleteink (**5, 6. ábra**) és a szakirodalmi adatok alapján (Chittajallu és mtsai., 2020; Sheffield és mtsai., 2013) a retroaxonális tüzelés nem egy hálózati, hanem sokkal inkább egy sejt-autonóm jelenség, így számos ioncsatorna hozzájárulhat a retroaxonális akciós potenciálok kialakulásához. A hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott (HCN) csatornák fontos szerepet játszanak a nyugalmi membránpotenciál kialakításában (Thuault és mtsai., 2013), az akciós potenciálok inicializálásában és propagációjában (Roth és Hu, 2020; Shah, 2014). A HCN-csatornák aktivációja során egy  $I_h$  áram alakul ki ( $I_h$ ) (Byczkowicz és mtsai., 2019), amely a hiperpolarizáló áramlépcsőre adott válasz során egy lassú depolarizációs visszatérést (sag) eredményez. A HCN-csatornák száma és eloszlása sejttípus specifikus, továbbá újabb kutatások rávilágítottak arra is, hogy egyes gyorsan tüzelő interneuronokon a szómán kívül az axon nyúlványon is expresszáldhatnak (Elgueta és mtsai., 2015; Roth és Hu, 2020). Ebből adódóan arra voltunk kíváncsiak, hogy az axonon megtalálható HCN-csatornák hogyan járulhatnak hozzá a RA-AP-ok kialakulásához. Az előző kísérleteinkhez hasonlóan whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki elsőrégegi interneuronokon humán és rágcsáló agykéregben. A sikeres RAT indukció után HCN-csatornablokkolót (ZD7288, 30  $\mu\text{M}$ ) alkalmaztunk (**7. A, B ábra**). A HCN-csatornablokkoló hatására az elvezetett interneuronok nyugalmi membránpotenciálja hiperpolarizáltabb értéket vett fel (kontroll:  $-60 \pm 3,4$  mV; ZD7288:  $-67,6 \pm 6$  mV; páros t-próba  $p=0,075$ ), lecsökkent a sag arány (kontroll:  $0,04 \pm 0,04$ ; ZD7288:  $0,02 \pm 0,01$ ; páros t-próba  $p=0,057$ ), valamint megnőtt a bemenő ellenállás (kontroll:  $70,1 \pm 96,3$  M $\Omega$ ; ZD2788:  $98,9 \pm 132,3$  M $\Omega$ , páros t-próba  $p=0,01$ ), az elvárásainknak megfelelően (Lupica és mtsai., 2001; Szegedi és mtsai., 2023). Ezen felül a HCN-csatornablokkoló hatással volt a RAT-re is: lecsökkent a RAT időtartama (kontroll:  $47,2 \pm 36,1$ ; ZD7288:  $10,1 \pm 16$  (s); páros t-próba  $p=0,008$ ) és a megjelenő RA-AP-ok száma (kontroll:  $624 \pm 412$ ; ZD7288:  $48 \pm 71$ ) (**7. B, C ábra**) a humán ( $n=4$ ) és a patkány ( $n=3$ ) agykéregben is. Kísérleteink igazolták feltételezésünket, hiszen a HCN-csatornák aktívan részt vesznek a RAT kialakításában, valamint befolyásolhatják az axon serkenthetőségét és ezáltal a RA-AP-ok inicializálódását.

Az elektrofiziológiai jellemzők közül a sag paraméter egy funkcionális indikátor lehet annak az ellenőrzésére, hogy a HCN-csatornák megtalálhatóak-e egy idegsejtben

(Maccaferri és McBain, 1996). Ezért az előzőekben leírt RAT és HCN-csatornák kapcsolata alapján feltételezhető a sag markánsabb megjelenése a RAT-t mutató interneuronokban. Ennek vizsgálatához az elvezetett idegsejtekbe hiperpolarizáló áramlépcsőket injektáltunk, majd ezt követően meghatároztuk a sag jelenlétét és mértékét (7. D ábra). A piramis sejtekhez hasonlóan (Kalmbach és mtsai., 2018) a humán elsőrégi interneuronokon is magasabb sag aránnyal ( $n=358$ ,  $0,15 \pm 0,29$ , Mann-Whitney test,  $p<0,001$ ) rendelkeznek a patkány kísérletekhez képest ( $n=254$ ,  $0,04 \pm 0,4$ ) (7. E ábra). Azonban a detektált magas sag arány és a RAT sikeres kialakulása között nem találtunk összefüggést (7. E ábra) (humán RAT:  $n=83$ ,  $0,11 \pm 0,08$ , nem-RAT:  $n=275$ ,  $0,16 \pm 0,16$  Mann-Whitney próba,  $p<0,001$ ; patkány RAT:  $n=97$ ,  $0,02 \pm 0,07$ , nem-RAT:  $n=157$ ,  $0,06 \pm 0,11$ , Mann-Whitney próba,  $p<0,001$ ). Sőt azoknál a sejteknél, ahol markáns sag detektálható, például a csipkebogyó sejteknél (Boldog és mtsai., 2018) nem tudtuk kialakítani a RAT-t ( $n=11$ ). Ismerve a HCN-csatornák hozzájárulását a RAT-hez ezt az eredményt meglepőnek találtuk, mivel a sag megjelenését a HCN-csatornák szomatikus expressziója okozza. Kísérleteink során az idegsejtek szomatikus membránpotenciálját mértük, azonban immunhisztokémiai és elektrofiziológiai vizsgálatokkal bebizonyították, hogy HCN-csatornák expresszálódhatnak a gyorsan tüzelő interneuronok axon-nyúlványán és dendritjein is (Elgueta és mtsai., 2015; Roth és Hu, 2020; Szegedi és mtsai., 2023). Ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy az elsőrégi interneuronok esetében a szomatikus és az axonális HCN-csatorna expresszió aránya magyarázat lehet-e a RAT megjelenésére vagy hiányára. Szimultán szomatikus és axonális bleb whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki ( $106 \pm 56 \mu\text{m}$ , euklideszi szóma és bleb távolság) humán ( $n=5$ ) és patkány ( $n=6$ ) elsőrégi interneuronokon (7. F ábra), majd hiperpolarizáló áramlépcsőket injektáltunk felváltva a szómába és az axonális bleb-be (7. G ábra). Az elvezetett elsőrégi interneuronokon körülbelül négyszer nagyobb sag arány detektálható az axonban a szómához képest (szóma:  $0,1 \pm 0,05$  bleb:  $0,4 \pm 0,14$  kétmintás t-próba  $p<0,001$ ) (7. H ábra) humán és a patkány esetében is. Kísérleteink rámutattak arra, hogy a szomatikus és axonális csatorna expresszió eltérő lehet egymástól, valamint arra, hogy az axonális HCN-csatornák aktív szerepet játszhatnak a RA-AP-ok inicializálásában.

A RAT-t hosszantartó ismételt küszöbfeletti depolarizáló stimulációval lehet kialakítani, azonban a kialakulás mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Eddig egy tanulmány ismert, ahol a stimulációs protokoll nélkül, kizárólag az asztrociták

fotostimulációjával, glutamát felszabadulás hatására RA-AP-okat tudtak kialakítani a környező NGF sejteken (Deemyad és mtsai., 2018). Az asztrociták fontos szerepet játszanak az extracelluláris-ion homeosztázis fenntartásában, ezáltal a környező idegsejtek serkentetőségére is hatással vannak (Bellot-Saez és mtsai., 2017; Hertz és Chen, 2016). Az asztrociták fotostimulációja következtében a lokális kálium-ion koncentráció megnőhet (Octeau és mtsai., 2019), ezért hipotézisünk szerint ez megváltoztathatja az axon serkentetőségét, depolarizálhatja az axont és elősegítheti a RA-AP-ok kialakulását, így a HCN-csatornáktól egy eltérő mechanizmus, az extracelluláris kálium-ion koncentráció is szerepet játszhat a RAT kialakításában (Imbrosci és mtsai., 2015; Rasmussen és mtsai., 2020; Suzuki és mtsai., 2014). Ennek tesztelésére whole-cell konfigurációt alakítottunk ki elsőréggi interneuronokon, majd egy másik mikropipettába megnövelt kálium koncentrációt tartalmazó (5 mM [KCL]) elvezető oldatot töltöttünk és a sejtek közelében (szóma és a mikropipetta euklideszi távolsága: 40-60  $\mu\text{m}$ ) pozitív nyomással az extracelluláris térbe juttattuk és eközben nyomon követtük a sejtek membránpotenciálját (**7. I, K ábra**). Humán (n=4) és patkány (n=7) agykéregben sporadikusan előforduló RA-AP-okat figyeltünk meg, melyek kinetikai paraméterei megegyeznek a stimulációs protokoll utáni RAT közben megjelenő AP-okkal (**7. J, L ábra**). Kísérletsorozatunk alapján az elsőréggi interneuronokon megjelenő RAT-hez hozzájárulnak a sejt intrinzik tulajdonságai, különösképp az axonális HCN-csatornák, továbbá az extracelluláris térben megnövekedett kálium ion koncentráció is depolarizálhatja az axont és előidézhetheti a RA-AP-ok megjelenését.



### 7. ábra A HCN-csatornák és a megnövekedett lokális kálium ion koncentráció hozzájárulása a RAT kialakulásához

(A) A HCN-csatornák szerepet játszanak a RAT kialakulásában és fenntartásában. Tónikus retroaxonális tüzelés kontroll környezetben. (B) Az (A) panelen látható kontroll kísérlet után alkalmazott HCN-csatorna blokkoló (ZD7288, 30  $\mu$ M) hatása. Stimulációs protokoll (fent), tónikus retroaxonális tüzelés (lent). (C) A RAT időtartama (páros t-próba,  $p=0,0081$ ) és a RA-AP-ok száma (páros t-próba,  $p=0,00706$ ) a

kontrollhoz képest lecsökkent ZD7288 jelenlétében. **(D)** Elsőrégi csipkebogyó sejt membránpotenciál válasza (fent) hiperpolarizáló áramlépcsőre (lent). Sag-arány meghatározása (a/b). **(E)** Az elsőrégi interneuronok szomatikus elvezetésből meghatározott sag-arányának összehasonlítása. Nagyobb sag-arány jellemző a humán interneuronok esetében (Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ), valamint mindkét fajban kisebb a sag-arány a RAT-t mutató sejteknél (Humán: Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ , Patkány: Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ). **(F)** Szimultán szomatikus és axonális bleb elvezetés (fent). Tüzelési mintázat (lent). **(G)** Membránpotenciál válasz hiperpolarizáló áramlépcsőre a szómában (fekete, bal) és a bleben (zöld, jobb). **(H)** A bleben mért sag-arány nagyobb (kétmintás t-próba,  $p < 0,001$ ) a szómához viszonyítva humánban és patkányban is. **(I)** Humán elsőrégi interneuron szomatikus membránpotenciál változása a megnövelt kálium ion koncentrációt (5 mM [KCl]) tartalmazó elvezető oldat injektálása közben. **(J)** A kialakult akciós potenciálok a RA-AP-okra jellemző kinetikával rendelkeznek. **(K, L)** az **(I, J)** ábrával megegyező kísérlet patkány agykéregben.



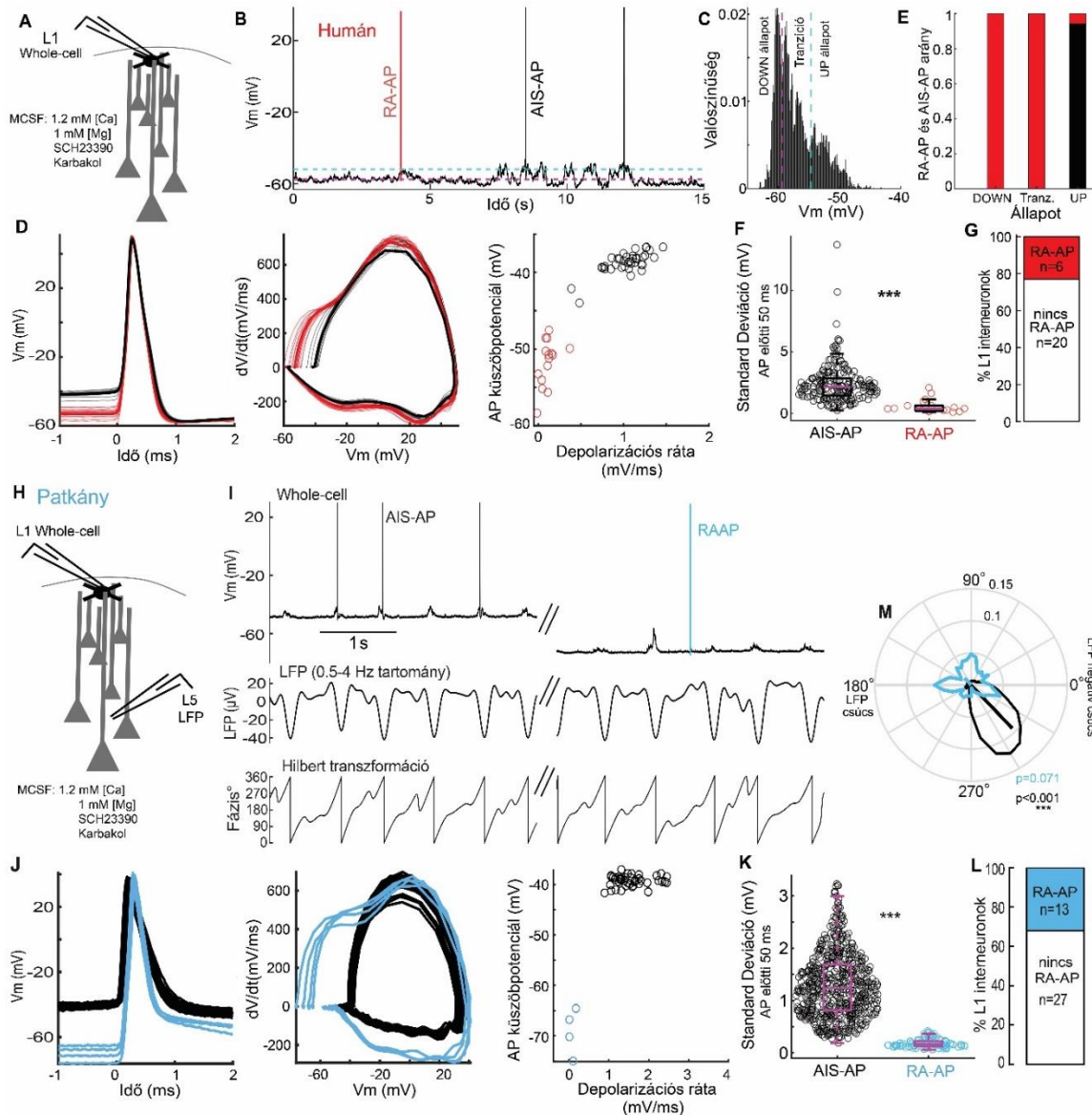
## Spontán retroaxonális akciós potenciálok in vitro

Előző kísérleteink rámutattak arra, hogy az extracelluláris kálium ion koncentráció megnövelése RA-AP-ok megjelenéséhez vezethet. Annak ismeretében, hogy a neurális aktivitás és az oszcillációk dinamikusan megváltoztatják az extracelluláris tér ionösszetételét (Amzica és Steriade, 2000), feltételeztük, hogy aktív agyszeletekben ez retroaxonális akciós potenciálok alakíthat ki a fentebb ismertetett stimulációs protokoll nélkül. Ennek teszteléséhez megnöveltük az agyszelet preparációk aktivitását a kettős-átfolyású kamra használatával (Hájos és Mody, 2009), továbbá csökkentett kalcium és magnézium koncentrációt tartalmazó in vivo-szerű elvezető oldatot használtunk (Sanchez-Vives és McCormick, 2000). Továbbá egyes neuromodulátorok alkalmasak arra, hogy megnöveljék az agyszelet alapaktivitását, valamint elősegíthetik az oszcillációk kialakulását is. Egy, a szakirodalomban már ismertetett módszert követve kolinerg agonistával és dopaminerg antagonistával egészítettük ki az elvezető oldatunkat (Carracedo és mtsai., 2013). Ennek köszönhetően sikeresen megnöveltük a hálózati aktivitást a humán agyszelet preparációkban. Elsőként whole-cell konfigurációt alakítottunk ki az első rétegi interneuronokon, majd stimuláció nélkül nyomon követtük az idegsejtek membránpotenciálját (**8. A ábra**). A megnövekedett hálózati aktivitás eredményeként membránpotenciál-oszcillációt, celluláris UP és DOWN-állapotokat, valamint akciós potenciálokat figyeltünk meg az elvezetett interneuronokon (n=26) (**8. B ábra**). A membránpotenciál alapján három különböző állapotot határoztunk meg (Saleem és mtsai., 2010): aktív-depolarizált UP, nyugalmi-hiperpolarizált DOWN, és tranzíciós állapotot (**8. B, C ábra**). Eddigi ismereteink szerint az aktív hálózati állapot során a szomato-dendritikus régióra érkező serkentő bemenetek depolarizálják az idegsejteket, amelyeken akciós potenciálok alakulhatnak ki (Stuart és Spruston, 2015), ezért az akciós potenciálok megjelenése a depolarizált membránpotenciál értékeken várható (Buzsáki és mtsai., 2012; Buzsáki és Draguhn, 2004; Klausberger és Somogyi, 2008; Steriade és mtsai., 1993). Azonban kísérleteinkben akciós potenciálokat figyeltünk meg a hiperpolarizált állapot során is, amikor az idegsejt nyugalmi membránpotenciál értéket vesz fel. Ezért az előzőekben is használt paraméterek, a küszöbpotenciál és depolarizációs ráta alapján csoportosítottuk az akciós potenciálokat. Az elvezett sejtek egy részénél AIS-AP-okat (n=7) és RA-AP-okat (n=6) is megfigyeltünk (**8. D, G ábra**). Az egyes akciós potenciálokat a küszöbpotenciál értéke alapján a különböző celluláris állapotokhoz társítottuk: az AIS-AP-ok kizárólag az UP állapotok során jelentek meg, míg a RA-AP-

ok főként a DOWN és a tranzíciós állapotban, de megfigyelhetőek voltak az UP állapot közben is (**8. E ábra**). Az UP állapot során a szinaptikus bemenetek gyakorisága megnő, így az AIS-AP-ok előtti szakaszon nagyobb szórást láthatunk a membránpotenciál értékekben ( $1,49 \text{ mV} \pm 1,76 \text{ mV}$ ), ellentétben a RA-AP-okat megelőző szakaszokkal szemben ( $0,78 \text{ mV} \pm 1,7 \text{ mV}$ , Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ), ahol a szomatodendritikus részre érkező szinaptikus bemenetek gyakorisága alacsonyabb (**8. F ábra**). Kísérleteink bemutatják, hogy a humán elsőrégégi interneuronok körülbelül 20 százalékánál spontán RA-AP-okat figyelhetünk meg (**8. G ábra**), amelyek inicializálódása független a szomato-dendritikus régióra érkező serkentő bemenetektől.

A stimulációval indukált RAT egy evolúciósan konzervált jelenség, amely emberre és rágcsálóra is jellemző. Hipotézisünk szerint a humán kísérleteinknél megfigyelhető spontán RA-AP-ok megjelenhetnek rágcsálóban is (Imbrosci és mtsai., 2015). A következő kísérleteinkben az elsőrégégi interneuronok aktivitását vizsgáltuk lassúhullámú oszcilláció alatt túlélő patkány agyszelet preparátumban. Az oszcilláció indukálására a humán kísérleteknél is alkalmazott módszereket és farmakonokat használtuk. Az első rétegben kialakított whole-cell elvezetést kiegészítve az ötödik rétegbe LFP (lokális mezőpotenciál) elektródát helyeztünk el, annak érdekében, hogy a hálózati aktivitást is nyomon követhessük (**8. H ábra**). Az LFP elvezetésen alacsony frekvenciájú ( $1,1 \pm 0,55 \text{ Hz}$ ) negatív irányú hullámokat figyeltünk meg (**8. I ábra**) a patkány agyszeletekben ( $n=22$ ). Ezek az LFP események jelentették számunkra a lassú oszcilláció sikeres indukálását, tehát az aktív hálózati állapotokat (UP-állapot). Az LFP elvezetésen regisztrált UP állapotokkal egyidejűleg serkentő posztszinaptikus potenciálok jelentek meg az elsőrégégi interneuronokon ( $n=40$ ), azonban a membránpotenciál nem érte el a tüzelési küszöböt, így nem alakultak ki AIS-AP-ok. Ezért kísérleteink egy részénél ( $n=16$ ) konstans áraminjekcióval depolarizáltabb membránpotenciál értéken, az akciós potenciál küszöbértékhez közel tartottuk az elvezett sejteket, aminek köszönhetően a serkentő bemenetek az LFP UP állapotokkal egyidejűleg AIS-AP-okat eredményeztek (**8. I ábra**). A humán kísérleteinkhez hasonlóan spontán AP-ok jelentek meg a sejtek nyugalmi membránpotenciáljáról ( $n=13$ ,  $n=5$  azonosított NGF interneuron) amelyek RA-AP-ra jellemző kinetikával rendelkeztek: hiperpolarizáltabb küszöbpotenciál, kétkomponensű fázisgörbe, és kisebb depolarizációs ráta (**8. J, L ábra**). Az AIS-AP-ok kialakulását a szomato-dendritikus régióra érkező serkentő bemenetek indukálják, így a membránpotenciál értékek szórása nagyobb ( $1,3 \pm$

0,81 mV) a RA-AP-okhoz viszonyítva ( $0,18 \pm 0,42$  mV, Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ) (**8. K ábra**). A következőkben megvizsgáltuk az akciós potenciálok kapcsoltságát a hálózati oszcillációhoz. Az LFP elvezetést 0,5-4 Hz-es tartományra szűrtük, Hilbert transzformációval fázisokra osztottuk, majd minden akciós potenciál időzítését meghatároztuk (**8. I, M ábra**). Az AIS-AP-ok fáziskapcsoltak a lassú oszcillációhoz (átlag vektor hossz: 0,093, fázis:  $314^\circ$ ,  $p < 0,001$  Rayleigh uniformitás próba), az LFP negatív csúcsokhoz időben közel alakultak ki, tehát a hálózati UP állapotok alatt. Ezzel ellentétben a RA-AP-ok nem mutattak fáziskapcsoltságot, tehát az oszcilláció bármely fázisában előfordulhatnak ( $p = 0,07$  Rayleigh uniformitás próba). Kísérletsorozatunk alapján a RA-AP-ok spontán, a stimulációs protokoll nélkül is előfordulnak az elsőrégi humán és patkány interneuronokban egyaránt.

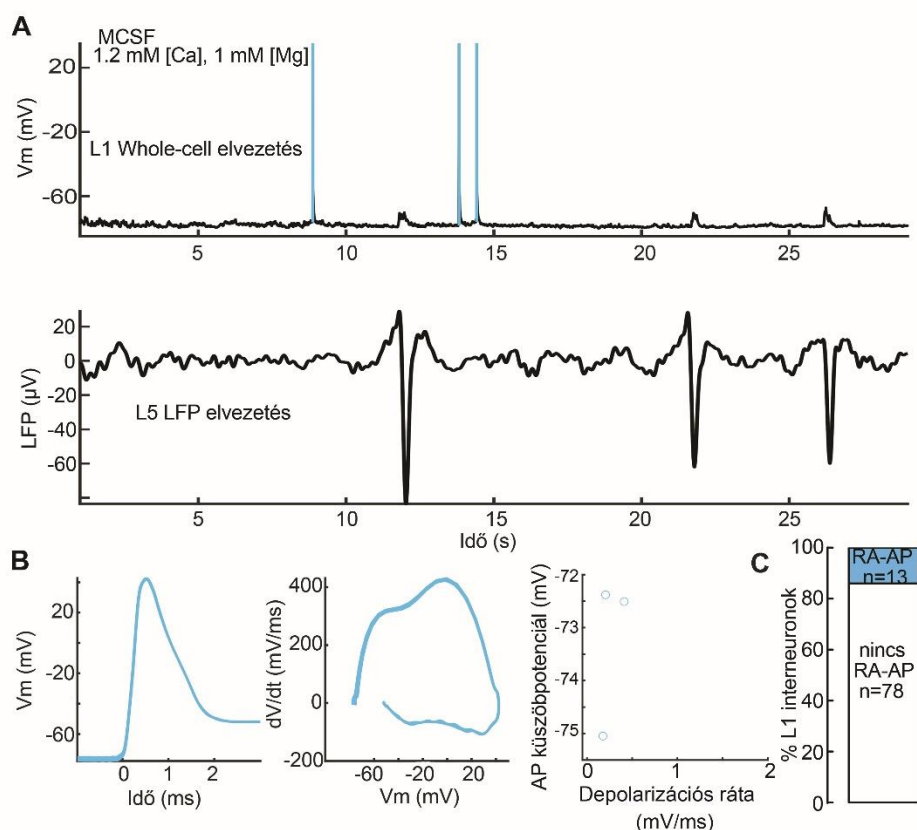


## 8. ábra Retroaxonális akciós potenciálok megnövekedett hálózati aktivitás során in vitro

(A) Sematikus kísérleti felállás. (B) Humán elsőrégi interneuron membránpotenciál változása megnövelt hálózati aktivitás során. UP-állapot alatt kialakuló AIS-AP-ok (feketével jelölt), valamint a bemenet független RA-AP-ok (pirossal jelölt). (C) Aktív és nyugalmi állapotok azonosítása a membránpotenciál értékek hisztogramja alapján. (D) RA-AP (piros) és az AIS-AP (fekete) elkülöníthetők egymástól. A kezdeti pontra illesztett AP-ok (bal oldalon). Az AP-ok idő szerinti elsőrendű deriváltja a membránpotenciál függvényében (középen). A küszöbpotenciál és az AP-t megelőző 1ms-os szakasz depolarizációs rátája elkülöníti az AIS-AP és a RA-AP-t (jobb oldalon). (E) AIS-AP és a RA-AP-ok aránya a különböző aktivitási állapotokban (UP, tranzíció és DOWN állapot). (F) A membránpotenciál értékek standard deviációja az akciós

potenciálok előtti 50 ms-os szakaszon (Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ) **(G)** Spontán RA-AP megjelenésének aránya az elvezetett humán elsőrégi interneuronokon. **(H)** Kísérleti felállás. Szimultán whole-cell és LFP elvezetések in vitro patkány agyszeletben. **(I)** In vitro lassú oszcilláció a patkány agykéregben. Whole-cell patch-clamp elvezetés (fent), az elsőrégi interneuronon megjelenő AIS-AP (bal, fekete) és RA-AP (jobb, kék). Az ötödik rétegben elvezetett lokális mezőpotenciálok (LFP) (középen), az LFP fázisfelosztása Hilbert transzformációval (lent). UP-állapot:  $0^\circ$  és  $360^\circ$ , DOWN-állapot:  $180^\circ$ . **(J)** A megjelenő akciós potenciálok csoportosíthatóak AIS-AP és RA-AP-ként. Az AP küszöbpotenciálhoz igazított AP-ok (bal) hullámformája. Az AP-ok idő szerinti elsőrendű deriváltja a membránpotenciál függvényében (középen). A küszöbpotenciál és az AP-t megelőző 1ms-os szakasz depolarizációs rátája (bal) elkülöníti az AIS-AP (fekete) és a RA-AP-t (kék). **(K)** A membránpotenciál értékek standard deviációja az akciós potenciálok előtti 50 ms-os szakaszon (Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ). **(L)** Spontán RA-AP megjelenésének aránya az elvezetett elsőrégi interneuronokon patkány agykéregben. **(M)** Az oszcilláció UP fázisához kapcsolt AIS-AP-ok (fekete) és a hálózati aktív állapottól független RA-AP-ok (kék). Cirkuláris ábra az akciós potenciál valószínűségekről az LFP fázisokhoz viszonyítva. (AIS-AP-ok: Rayleigh uniformitás próba  $p < 0,001$ ; RA-AP-ok: Rayleigh uniformitás próba  $p = 0,071$ ).

Azonban a kialakult lassú oszcilláció és a megnövelt hálózati aktivitáshoz kolinerg és dopaminerg neuromodulációt alkalmaztunk, ezért kísérletsorozatunk utolsó lépéseként meggyőződünk arról, hogy farmakológiai moduláció nélkül indukált hálózati aktivitás során kialakulnak-e a spontán RA-AP-ok. In vivo szerű elvezető oldat és a kettős-átfolyású elvezető kamrával, farmakológiai manipuláció nélkül is sikerült megnövelnünk a hálózati aktivitást patkány agyszeletekben (**9. A ábra**). Hasonlóan az előzőekhez, spontán RA-AP-okat detektáltunk (**9. B ábra**) az elvezetett elsőrégi interneuronok egy részénél (**9. C ábra**,  $n=13$ ). Eredményeink alapján a fiziológias állapothoz legközelebb álló környezetben is előfordulnak spontán RA-AP-ok in vitro. A megnövekedett hálózati aktivitás megváltoztathatja az extracelluláris ion-összetételt, ami depolarizálhatja az axont, így akciós potenciálok alakulhatnak ki a szomato-dendritikus régió aktivációja nélkül. Ebből adódóan a RA-AP-ok nem mutatnak fáziskapcsoltságot az oszcillációhoz és ellentétben az UP állapotban megjelenő AIS-AP-okkal, az oszcilláció bármely fázisban előfordulhatnak, még a hiperpolarizált DOWN állapot során is.



### 9. ábra Megnövekedett hálózati aktivitás farmakológiai moduláció nélkül

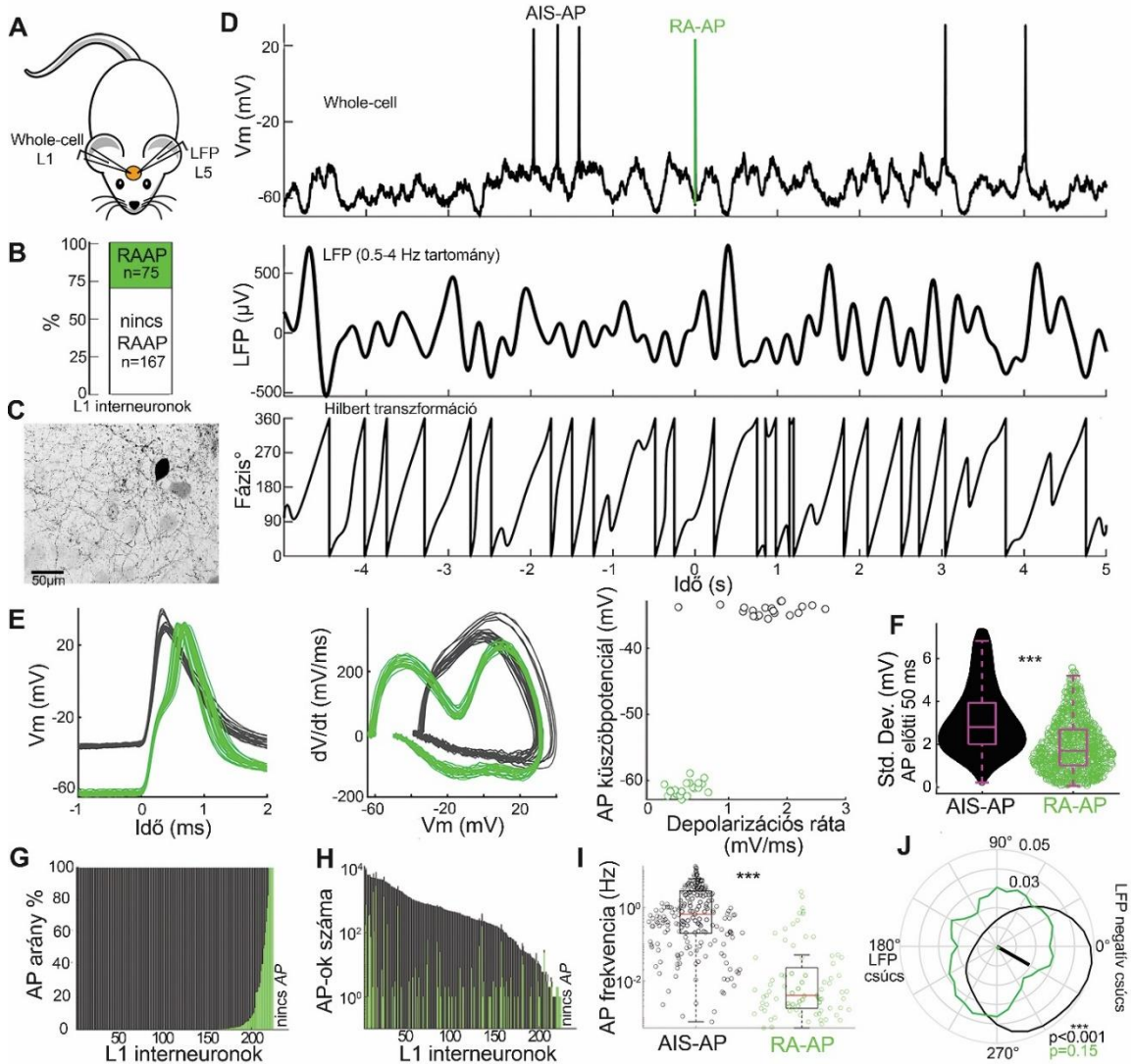
(A) Szimultán whole-cell patch-clamp elvezetés egy elsőrégi interneuronon (fent), valamint az ötödik rétegben elvezetett lokális mezőpotenciálok (LFP). Az elsőrégi interneuronon RA-AP-ok (kék) jelennek meg a hálózati UP állapotoktól eltérő időzítéssel. (B) Az AP küszöbpotenciálhoz igazított AP-ok (bal) hullámformája. Az AP-ok idő szerinti elsőrendű deriváltja a membránpotenciál függvényében (középen). A küszöbpotenciál és az AP-t megelőző 1ms-os szakasz depolarizációs rátája (bal). (C) Spontán RA-AP megjelenésének aránya az elvezetett elsőrégi interneuronokon patkány agykéregben farmakológiai moduláció nélkül.

### Retroaxonális akciós potenciálok in vivo

In vitro kísérleteink bemutatták, hogy a RA-AP-ok spontán megjelenhetnek stimuláció nélkül, fiziológias környezetben a humán és patkány elsőrégi interneuronokon. Azonban ismerve az in vitro agyszeletekben végzett kísérletek korlátait, megvizsgáltuk, hogy a RA-AP kialakulása agyszelet preparációs műtermék, vagy megjelenik normál, fiziológias környezetben is in vivo körülmények között. Whole-cell

konfigurációt alakítottunk ki az első rétegben, valamint egyidejűleg LFP-t regisztráltunk az ötödik rétegben éber, altatott, valamint természetes alvásban lévő egerekben in vivo (**10. A ábra**). Az elvezetett interneuronokra (n=242, **10. B ábra**) az LFP-n megjelenő UP állapotokkal egyidejűleg serkentő bemenetek érkeznek, amik időnként megfelelő mértékű membránpotenciál depolarizációt okoznak, ezáltal elősegítik az akciós potenciálok kialakulását (**10. D ábra**). Az in vitro méréseinkhez hasonlóan akciós potenciálokra figyeltünk meg hiperpolarizált membránpotenciál értékről, amikor a hálózat és a sejt is nyugalmi DOWN állapotban volt. A RA-AP és az AIS-AP elkülönítésére az előzőekben is használt küszöbpotenciál és depolarizációs ráta paramétereket használtuk (**10. E ábra**). Az elvezetett elsőrétegi interneuronok körülbelül 25 százalékánál (n=75 sejt, **10. B ábra**) figyeltünk meg spontán RA-AP-okat. Az összes in vivo regisztrált akciós potenciál egy kisebb hányada (3.4%) RA-AP, azonban az egy sejten belüli RA-AP és AIS-AP arány a 0-tól (n=162 sejt) a 100 százalékig (n=6 sejt) változott (**10. G ábra**). Összehasonlítva az akciós potenciálok számát, a RA-AP-ok kisebb arányban vannak jelen (átlag:  $17 \pm 30\%$ , n=75 RA-AP interneuron) (**10. G, H ábra**), valamint a RA-AP-ok frekvenciája ( $0,004 \pm 0,4$  Hz) alacsonyabb, az AIS-AP-hoz viszonyítva ( $0,65 \pm 2,4$  Hz; Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ; **10. I ábra**). Azonban megjelenése számottevő, így a spontán megjelenő RA-AP is egy evolúciósan konzervált jelenség lehet. A továbbiakban megvizsgáltuk az akciós potenciálok időzítését a hálózati oszcillációhoz képest, hasonlóan az in vitro agyszelet kísérleteinkhez. Az AIS-AP-ok a bemenetektől függően alakulnak ki, így nagyobb a membránpotenciál értékek szórása az akciós potenciált közvetlenül megelőző 50 ms-os szakaszon ( $2,9 \pm 1,9$  mV), ellentétben a RA-AP-okkal ( $1,8 \pm 1,5$  mV; Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ). Az LFP méréseinket 0,5-4 Hz frekvenciatartományra szűrtük és Hilbert transzformációval fázisokra osztottuk (**10. D ábra**). A szakirodalom alapján a lassú oszcilláció alatti UP és DOWN állapot közötti átmenet az elsőrétegi NGF sejtek segítik, ugyanis az UP állapot alatt kialakuló akciós potenciálok egy GABA<sub>B</sub> modulált lassú gátlást okoznak a posztzinaptikus sejteken (Hay és mtsai., 2021). Eredményeink ezzel összhangban vannak, ugyanis az elsőrétegi interneuronokon az AIS-AP-ok fázispreferenciát mutattak és a hálózati UP állapotok során jelentek meg (átlag fázisvektor hossza=0,019, fázis=330°;  $p < 0,001$ , Rayleigh-uniformitás próba; **10. J ábra**). Ezzel ellentétben a RA-AP-ok a hálózati aktivitástól függetlenül, az oszcilláció bármely fázisában előfordultak. In vivo kísérleteink bemutatták, hogy a retroaxonális akciós potenciálok megjelennek az indukciós protokoll nélkül, fiziológias környezetben is. Továbbá igazolják, hogy egyes elsőrétegi interneuronok egyszerre képesek a hálózattól

függő, jól időzített AIS-AP-ok leadására, valamint a hálózati aktivitástól független, spontán RA-AP-ok leadására. Ez a jelenség alapján egyetlen sejt képes lehet időben szétválasztva, eltérő módon hozzájárulni az in vivo hálózati aktivitáshoz.



### 10. ábra Retroaxonális akciós potenciálok in vivo

(A) Sematikus kísérleti felállítás. (B) Spontán RA-AP megjelenésének aránya az elvezetett egér elsőrégégi agykérgi interneuronokon in vivo. (C) Konfokális kép egy in vivo elvezetett elsőrégégi neurogliaform interneuronról, amelyen megjelentek a spontán RA-AP-ok. (D) In vivo lassú oszcilláció az egér agykéregben. Whole-cell patch-clamp elvezetés (fent), az elsőrégégi interneuronon megjelenő AIS-AP (bal, fekete) és RA-AP (jobb, zöld). Az ötödik rétegben elvezetett lokális mezőpotenciálok (LFP) (középen), az LFP fázisfelosztása Hilbert transzformációval (lent). UP-állapot:  $0^\circ$  és  $360^\circ$ , DOWN-állapot:  $180^\circ$ . (E) A megjelenő akciós potenciálok csoportosíthatóak AIS-AP és RA-AP-ként. A küszöbpotenciálhoz illesztett AP-ok (bal). Az AP-ok idő szerinti elsőrendű



deriváltja a membránpotenciál függvényében (középen). A küszöbpotenciál és az AP-t megelőző 1ms-os szakasz depolarizációs rátája (bal) elkülöníti az AIS-AP (fekete) és a RA-AP-t (zöld). **(F)** A membránpotenciál értékek standard deviációja az akciós potenciálok előtti 50 ms-os szakaszon (Mann-Whitney próba  $p < 0,001$ ). **(G, H, I)** AIS-AP (fekete) és a RA-AP(zöld) aránya, száma és a frekvenciája az egyes elvezetett sejteknél. **(J)** Fázis kapcsolt AIS-AP-ok (fekete) és hálózat független RA-AP-ok (zöld). Cirkuláris ábra az akciós potenciál valószínűségekről az LFP fázisokhoz viszonyítva. (AIS-AP-ok: Rayleigh uniformitás próba  $p < 0,001$ ; RA-AP-ok: Rayleigh uniformitás próba  $p = 0,15$ ).

## 6. Diszkusszió

---

Kísérleteink során egy az elmúlt évtizedben felfedezett jelenséget, a retroaxonális tüzelést (Sheffield és mtsai., 2011) vizsgáltuk elsőréggi interneuronokon a rágcsáló és az ember agykérgében. Elsőként meggyőződünk róla, hogy a retroaxonális tüzelés kialakítható-e az ember agykérgi idegsejtjein (Chittajallu és mtsai., 2020) és egy evolúciósan konzervált jelenség, amely megfigyelhető emberben és rágcsálókban is. A szakirodalmi eredményekhez hasonlóan sikeresen ki tudtuk alakítani a hosszantartó tónikus RAT-t az ember agykérgében. Azonban az eddig leírt tónikus mintázattól eltérően további két formáját azonosítottuk a RAT-nek: sporadikus és ritmikus (**1. ábra**). A szomatikus stimuláció közben kiváltott (AIS-AP) és a retroaxonális tüzelés alatt kialakult akciós potenciálok (RA-AP) kinetikai paramétereit alapján elkülöníthetőek egymástól mind a három RAT mintázat esetében. Extracelluláris stimulációs kísérletek már bemutatták (Sheffield és mtsai., 2011), hogy az akciós potenciálok nem csak az axon-iniciális szegmentumon (AIS), hanem az axon távoli szakaszán is kialakulhatnak, majd antidromikus irányban terjednek a szóma felé. Tudomásunk szerint a szimultán szomatikus és axonális elvezetések elsőként igazolják, hogy GABAerg interneuron axonon számos akciós potenciál iniciációs hely is lehet (**2. ábra**). Valamint bemutatja, hogy az axon iniciális szegmentumon és az axon disztálisabb részén kialakuló akciós potenciálokat a szomatikus elvezetés alapján is el tudjuk különíteni egymástól, mivel kinetikai paramétereik eltérőek.

A patkány agyszeletekben végzett kísérleteink bemutatták, hogy az újonnan megfigyelt sporadikus és a ritmikus RAT evolúciósan konzervált mechanizmus a tónikushoz hasonlóan, mivel előidézhető különböző fajok agykérgi interneuronjain is. Eredményeink szintén rávilágítottak arra, hogy a humán és a rágcsáló agyszelet preparációk közötti tűrőképesség eltérő lehet, ugyanis a ritmikus RAT-t kizárólag a magasabb oxigénellátottságot biztosító kettős átfolyású elvezető kamra (Hájos és Mody, 2009) alkalmazásával sikerült kialakítani a patkány agyszeletekben (**3. ábra**). Továbbá rávilágít arra is, hogy a jobb oxigénellátottságot, így fiziológiás állapotához közelebbi környezetet biztosító elvezető kamra nemcsak a hálózati, de a sejt intrinzik jelenségekre is hatással lehet.

A retroaxonális tüzelés megfigyelhető számos agyterületen és sejtípusban is (Chittajallu és mtsai., 2020; Deemyad és mtsai., 2018; Elgueta és mtsai., 2015; Imbrosci

és mtsai., 2015; Krook-Magnuson és mtsai., 2011; Sheffield és mtsai., 2011, 2013; Suzuki és mtsai., 2014). Az elvezetett sejtek intracelluláris feltöltésével, majd anatómiai vizsgálatával bemutattuk, hogy a retroaxonális tüzelés főleg neurogliaform idegsejtekre jellemző a rágcsáló és az ember agykéreg első rétegében (**4. ábra**). A neurogliaform sejt egy konzervált sejtípus, több fajban is megtalálható, hasonló funkcionális és morfofiziológiai tulajdonságokkal (Boldog és mtsai., 2018; Hodge és mtsai., 2019; Oláh és mtsai., 2007, 2009; Overstreet-Wadiche és McBain, 2015; Tamás és mtsai., 2003), így a retroaxonális tüzelés is egy konzervált tulajdonság lehet, ami erre a sejtípusra jellemző és megjelenhet több fajban is.

Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján a tónikus RAT érzéketlen a szinaptikus blokkolókra (Sheffield és mtsai., 2011, 2013; Suzuki és mtsai., 2014), ezért megvizsgáltuk, hogy az általunk leírt ritmikus RAT-t befolyásolják-e a különböző szinaptikus blokkolók. Kísérleteinkben a GABA és a glutamát receptor antagonisták nem voltak hatással a kialakult ritmikus RAT-re (**5. ábra**). Ez arra utal, hogy a ritmikus axonális jelenség háttérében egy hálózattól független sejt-autonóm mechanizmus állhat. Ezt a feltételezést alátámasztja az a megfigyelésünk is, hogy a szomatikus membránpotenciál változtatásával modulálható a ritmikus RAT frekvenciája (**6. ábra**), hasonlóan az inrinzik ritmusgeneráló talamokortikális sejtekhez (Dossi és mtsai., 1992; Kasten és Anderson, 2015). Eredményeink nem példa nélküliek a szakirodalomban, ugyanis az emberi agykéreg ötödik rétegében intrinzik módon ritmus generálásra képes piramis sejteket azonosítottak (Tryba és mtsai., 2011), továbbá ehhez hasonlóan, szinaptikus bemenetek hiányában is ritmikus tüzelő idegsejteket figyeltek meg a rágcsálók agykérgének ötödik rétegében (Mao és mtsai., 2001), azonban ezeket az jelenségeket nem sikerült egyértelműen jól definiált idegsejtcsoporthoz kötni. Eredményeink alapján az első rétegi neurogliaform interneuronok intrinzik ritmusgeneráló tulajdonsággal rendelkeznek (**5, 6. ábra**), hasonlóan más szubkortikális idegsejtekhez, amelyek hálózati oszcillációk kialakításában vesznek részt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az elsőrétegi neurogliaform interneuronokon megfigyelhető ritmikus RAT fontos szerepet játszhat az agykérgi oszcillációk kialakításában vagy modulációjában.

A szinaptikus transzmisszió nem szükséges a retroaxonális akciós potenciálok kialakulásához, azonban a háttérben lévő mechanizmus nem teljesen tisztázott (Deemyad és mtsai., 2018; Sheffield és mtsai., 2013). Hipotézisünk szerint azon mechanizmusok,

amely az axon membránpotenciálját depolarizálják hozzájárulhatnak a retroaxonális tüzelés kialakulásához. Ennek legalább két lehetséges forgatókönyvét képzeljük el: az adott sejttípus axonjain expresszáldó transzmembrán ioncsatornák közvetlenül depolarizálhatják az axont, vagy az extracelluláris ion koncentrációk változása közvetett módon megváltoztathatja a membrán serkentetőségét vagy a membránpotenciálját. Az előbbire példa a HCN-csatorna, amelyet a membránpotenciál (Thuault és mtsai., 2013) és az intracelluláris jelátviteli útvonalak modulálnak (Byczkowicz és mtsai., 2019). Kísérleteink bemutatták, hogy az axonális HCN-csatornák szükségesek a retroaxonális tüzelés kialakulásához és fenntartásához (7. ábra). Továbbá rávilágítottak arra, hogy a számában mért sag nem ad teljes képet a HCN-csatornák meglétéről vagy eloszlásáról egy adott sejttípusban (7. ábra). A retroaxonális tüzelés kialakulásához hozzájáruló másik mechanizmusra példa lehet az extracelluláris kalcium és kálium koncentráció változás (Imbrosci és mtsai., 2015; Sheffield és mtsai., 2011; Suzuki és mtsai., 2014), amelyet a neurális aktivitás modulál (Amzica és Steriade, 2000; Rasmussen és mtsai., 2020). Bemutattuk, hogy az extracelluláris kálium ion koncentráció kismértékű növekedése valóban megnövelheti a retroaxonális akciós potenciálok kialakulásának valószínűségét (7. ábra). A korábbi tanulmányok jelentős előrelépést hoztak a RAT mechanizmusának feltárásában (Chittajallu és mtsai., 2020; Deemyad és mtsai., 2018; Elgueta és mtsai., 2015; Sheffield és mtsai., 2013; Suzuki és mtsai., 2014), amely mechanizmusok összhangban vannak a mi eredményeinkkel. Feltételezhető, hogy az axonon passzívan anterográd irányba haladó szomatikus membránpotenciál-változások, a külső kálium ion koncentráció és a HCN-csatornák közötti kölcsönhatás fontos a RA-AP-ok kialakulásában. Azonban további vizsgálatokra van szükség annak megismerésére, hogy más feszültségfüggő ion csatornák hogyan lépnek kölcsönhatásba a szomatodendritikus és az AIS bemenetekkel, valamint az agykérgi neurogliaform interneuronok disztális axonjában megtalálható HCN-csatornák aktivációjával.

Kísérleteink rámutattak arra, hogy akciós potenciálok nem csak az AIS-ban, hanem az axon disztálisabb részein is kialakulhatnak elsőrétégi interneuronokon megnövekedett hálózati aktivitás során humán és patkány agyszeletben (8. és 9. ábra). In vivo kísérleteinkben meggyőződünk arról, hogy a RA-AP-ok fiziológias környezetben is előfordulnak, valamint az AIS-AP-októl eltérő fázisban jelennek meg. A periszomatikus és disztális axonális akciós potenciál iniciáció időpontja eltérő az agykérgi lassúhullámú oszcilláció során (10. ábra). Az UP-állapotok alatt a membránpotenciál depolarizációja

lehetővé teszi az AIS-AP kialakulását, azonban hiperpolarizált állapotban kizárólag RA-AP alakulhat ki. Az AIS-AP-k és a RA-AP-k eltérő időbeli megjelenése gazdagítja egyes sejtek funkcionális repertoárját. A klasszikus koncepcióknak megfelelően a kizárólag AIS-AP leadására képes sejtípusok szelektíven járulnak hozzá a populációs aktivitás bizonyos fázisaihoz (Buzsáki és mtsai., 2012; Klausberger és Somogyi, 2008), míg a RA-AP-ot is prezentáló sejtípusok képesek olyan kimenetet produkálni, amikor a szomato-dendritikus bemenet által indukált AIS-AP nem alakulhat ki. Ezáltal a RA-AP-okra képes GABAerg interneuronok GABA-t szabadíthatnak fel szinaptikus serkentő bemenetek nélkül. Erre jó példa az oszcillációk alatt megjelenő DOWN-állapotok, vagy a delta hullámok, amikor az agykérgi interneuronok nyugalmi állapotban vannak és nem generálnak akciós potenciálokat (Steriade és mtsai., 1993), így a RA-AP függő GABA felszabadulás elősegítheti a hiperpolarizált, nyugalmi állapot fenntartását. A RA-AP főként neurogliaform sejtekre jellemző, amelyek a lassúhullámú alvás során serkentő bemenetet kapnak a thalamusból a lassúhullámú oszcilláció UP állapot kezdetekor (Hay és mtsai., 2021), valamint akciós potenciálokat képesek leadni a nyugalmi, DOWN állapot alatt (Valero és mtsai., 2021). Eredményeink arra utalnak, hogy a RA-AP-ok hozzájárulhatnak a DOWN-állapot fenntartásához. Továbbá az akciós potenciál iniciációja a disztális axonokban nem korlátozódik a DOWN állapotokra, hanem a neurotranszmitterek felszabadulásával járó közvetlen axon depolarizációra adott válaszként is előfordulhat (Kramer és mtsai., 2022; Liu és mtsai., 2022). Amint azt korábban (Deemyad és mtsai., 2018; Elgueta és mtsai., 2015; Imbrosci és mtsai., 2015; Suzuki és mtsai., 2014) és itt is bemutatunk (7. ábra), az extracelluláris kálium koncentráció fiziológias tartományon belül megnövelt koncentrációja (Heinemann és mtsai., 1977; Massimini és Amzica, 2001) előidézhetheti a RA-AP megjelenését. Ez utalhat arra, hogy a magas kálium és alacsony kalcium koncentrációjú extracelluláris területeket sűrűn behálózó neurogliaform axon serkentett állapotba kerülhet és retroaxonális akciós potenciálok generálódhatnak az adott idegsejten. Ezáltal a neurogliaform sejtek a szomato-dendritikus régiójuk bemeneteitől függetlenül is képesek lehetnek szinaptikus és nem szinaptikus GABAerg gátló visszacsatolást (Oláh és mtsai., 2009; Ozsvár és mtsai., 2021) biztosítani az agykérgi mikrohálózat megnövekedett aktivitású régióiban. A RA-AP-ok sporadikus, alacsony frekvenciával fordulnak elő in vivo, azonban ez összhangban van a neurogliaform interneuronok működésével. Eddigi ismereteink szerint a neurogliaform sejteken kiváltott egyetlen akciós potenciál is képes GABA térfogati transzmisszió révén a környező neuronokra és gliasejtekre hatni (Oláh és mtsai., 2009;

Ozsvár és mtsai., 2021; Rózsa és mtsai., 2017). A gyakori tüzelés ennél a sejtípusnál a GABA receptorok deszenzitizációhoz vezethet (Karayannis és mtsai., 2010; Price és mtsai., 2008), ezért a ritkábban generált akciós potenciálok egy logikusabb működési mód, amely elősegítheti az extracelluláris térben lévő tónikus GABA szint fenntartását, valamint befolyásolhatja a környező piramis sejtek dendritikus régiójának aktivitását (Palmer és mtsai., 2012; Pérez-Garci és mtsai., 2006).

## 7. Összefoglaló

---

Az agykéreg a központi idegrendszer része, amely a magasabb idegi funkciókért felelős agyterület. Az agykutatás egyik fő kérdésköre az agykéreg funkcionális működése. A gátló interneuronok az agykérgi neuronok kisebb hányadát képezik, azonban rendkívül változatos morfológiai, elektrofiziológiai és funkcionális jellemzőkkel rendelkeznek. Az idegsejtek két anatómiailag jól elkülöníthető résszel rendelkeznek: szomato-dendritikus, valamint az axonális régióval, melyek különböző funkciót látnak el. A szomato-dendritikus rész a többi idegsejtől kémiai és elektromos szinapszisokon keresztül információt kap, depolarizálódik, majd a különböző dendrit nyúlványok membránpotenciál változása a sejtesten összegződik. Az összegződés folytán az axon iniciális szegmentum depolarizációjának hatására kialakul az akciós potenciál, mely az axonon mindkét irányba képes terjedni. Az utóbbi évtizedben hippocampális és agykérgi GABAerg interneuronokban figyeltek meg megbízhatóan kialakítható retroaxonális tüzelést, amely során az idegsejtek nagy frekvenciás akciós potenciál sorozatot adtak le a szomato-dendritikus régió depolarizációja nélkül. A retroaxonális tüzelés közben kialakult akciós potenciálok kinetikája eltér a szomatikusan kiváltott akciós potenciáloktól. Ezek az akciós potenciálok az axon disztálisabb részeiről érkeznek, antidromikus, retro-axonális irányba terjednek (RA-AP) a szóma irányába, ellentétben az axon iniciális szegmentumon inicializálódott akciós potenciáloktól (AIS-AP). Kutatómunkám során a retroaxonális akciós potenciálok megjelenésének formáit, mechanizmusát vizsgáltam az elsőrétegi GABAerg interneuronokon az ember és a rágcsálók agykérgében.

Kísérleteinkben ember és rágcsáló agykérgi interneuronokon végeztünk whole-cell patch-clamp intracelluláris elvezetések. Elsőként a szakirodalomban már ismertett retroaxonális tüzelést (RAT) vizsgáltuk humán túlélő agyszelet preparátumokon, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy egy evolúciósan konzervált jelenség, amely nem kizárólag rágcsálóknál fordulhat elő. A szómába injektált küszöb feletti depolarizációs stimulusokkal tónikus retroaxonális akciós potenciál sorozatot alakítottunk ki a humán elsőrétegi interneuronokon, amely az irodalmi adatoknak megfelelően több másodperc időtartamú magas frekvenciás tüzelés, amely során az akciós potenciálok az axon távoli szakaszain alakulnak ki és retrográd irányban terjednek a szóma felé. A stimuláció közben kialakult akciós potenciálok az axon iniciális szegmentumon alakulnak ki,

amelyek kinetikai paramétereit alapján jól elkülöníthetőek a RAT közben megjelenő akciós potenciáloktól. Az emberi agykéreg interneuronjain a kialakult retroaxonális tüzelés során az eddig már ismert tónikus tüzeléstől eltérő, sporadikus és ritmikus retroaxonális tüzelést is megfigyeltünk.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy az újonnan megfigyelt mintázatok előfordulnak-e a rágcsáló agykéregben. Kísérleteinkben a tónikus és a sporadikus RAT szintén megfigyelhető a patkány elsőrégégi interneuronokban, azonban a ritmikus mintázat megjelenéséhez a fiziológias körülményekhez közelebb álló környezetet kell biztosítani. A ritmikus retroaxonális tüzelés szintén egy evolúciósan konzervált jelenség, mivel megjelenik rágcsálóban és emberben is. Kísérleteinkben az agykéreg első rétegét vizsgáltuk, ahol több GABAerg interneuron típus is megtalálható. Ezért Post-hoc anatómiai vizsgálatokkal különböző csoportokba soroltuk az elvezett interneuronokat és megvizsgáltuk a retroaxonális tüzelés sejt típus specifikitását az ember és a rágcsáló agyszelet kísérletek esetében is. A retroaxonális tüzelés mintázatai egyaránt megjelenik a neurogliaform és a nem neurogliaform interneuronokon is, azonban gyakoribb a neurogliaform morfológiát mutató sejtekben.

Az eddigi szakirodalmi adatok alapján a tónikus RAT a szinaptikus bemenetektől független, tehát sejt-autonóm módon alakulhat ki. További kísérleteinknél megvizsgáltuk, hogy a ritmikus retroaxonális tüzelés egy hálózati vagy hasonlóan a tónikus mintázathoz egy sejt-autonóm jelenség. GABAerg és glutamaterg blokkolók jelenlétében is sikeresen ki tudtuk váltani a ritmikus RAT-t, valamint nem voltak hatással a RAT fenntartására, hasonlóan a szakirodalomban ismertetett adatokkal. Ritmusgeneráló, úgynevezett pacemaker sejteket számos agyterületen azonosítottak például egyes thalamokortikális sejteknél, amelyek sejt-intrinzik membránpotenciál oszcillációt képesek kialakítani a hálózattól függetlenül. Az intrinzik oszcilláció frekvenciája modulálható ezen sejtek szomatikus membránpotenciál változtatásával. A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk a retroaxonális tüzelés szomatikus membránpotenciál függését. Hasonlóan a ritmusgeneráló sejteknél leírtakhoz a tüzelés frekvenciája és mintázata modulálható a szomatikus membránpotenciál változtatásával. Ezek alapján egy intrinzik ritmusgeneráló képességgel rendelkezhetnek egyes elsőrégégi, főként neurogliaform interneuronok, amivel hozzájárulhatnak az agykérgi oszcillációk inicializálásához és fenntartásához.



Eredményeink és a megelőző szakirodalmi adatok alapján a RAT egy sejt-autonóm jelenség, ezért számos ioncsatorna hozzájárulhat a kialakulásához. A hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott (HCN) csatornák fontos szerepet játszanak a nyugalmi membránpotenciál kialakításában az akciós potenciálok inicializálásában és propagációjában. Következő kísérletsorozatunkban a HCN-csatornák szerepét vizsgáltuk meg a RAT kialakulásában. A sikeres RAT indukció után HCN-csatorna blokkolót alkalmaztunk, amely lecsökkentette a RAT időtartamát és a megjelenő retroaxonális akciós potenciálok számát. Tehát, a HCN-csatornák aktívan részt vesznek a RAT kialakításában, valamint befolyásolhatják az axon serkenthetőségét és ezáltal a RA-AP-ok inicializálódását. A HCN-csatornák aktivációja során egy h-áram alakul ki ( $I_h$ ), amely a hiperpolarizáló áramlépcsőre adott válasz során egy lassú depolarizációs visszatérést (sag) alakít ki. Az általunk vizsgált elsőrégi interneuronokba hiperpolarizáló áramlépcsőket injektáltunk, majd meghatároztuk a sag jelenlétét. A HCN-csatornák aktívan részt vesznek a RAT kialakulásában, ezért várakozásaink szerint a RAT-t mutató sejteknél magasabb sag-értékre számítottunk. Azoknál a sejteknél, ahol a RAT-t nem lehetett kialakítani magasabb sag-értéket láttunk, ellenben a RAT-t mutató sejteknél kisebb sag volt detektálható. Ezt az eredményt meglepőnek találtuk. Azonban újabb eredmények alapján a HCN-csatornák nem kizárólag a szomato-dendritikus régióban, hanem az axon nyúlványon is expresszálódhatnak. Ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy az elsőrégi interneuronok esetében a szomatikus és az axonális HCN-csatorna expresszió aránya magyarázat lehet-e a RAT megjelenésére vagy hiányára. A szimultán szomatikus és axonális bleb whole-cell patch-clamp méréseink alapján megbizonyosodtunk róla, hogy az elsőrégi neurogliaform sejtek körülbelül négyszer nagyobb sag detektálható az axonon a szómához viszonyítva a humán és a patkány minták esetében is. Kísérleteink rámutattak arra, hogy a szomatikus és axonális csatorna expresszió eltérő lehet egymástól, valamint arra, hogy az axonális HCN-csatornák aktív szerepet játszhatnak a retroaxonális akciós potenciálok inicializálódásában.

A retroaxonális akciós potenciálokat hosszantartó ismételt depolarizáló stimulációval lehet kialakítani, azonban a mechanizmus nem teljesen ismert. Egy újabb kutatás arról számolt be, hogy a stimulációs protokoll nélkül, kizárólag az asztrociták fotostimulációjával is kialakíthatók. Hipotézisünk szerint, az asztrociták fotostimulációja során az extracelluláris kálium koncentráció is megnövekedhet, ami közvetlen módon képes lehet az axon depolarizációjára és ezáltal akciós potenciálokat alakíthat ki. Ennek

teszteléséhez az első rétegben elvezett interneuronok közelében egy másik elektródát helyeztünk el, amit magasabb kálium ion koncentrációt tartalmazó elvezető oldattal töltöttünk fel, ezt követően pozitív nyomással az extracelluláris térbe juttattuk a tartalmát. A humán és a rágcsáló agykéregben is sporadikusan előforduló RA-AP jelentek meg, tehát az extracelluláris térben megnövekedett kálium ion koncentráció is depolarizálhatja az axont és előidézhetheti a RA-AP-ok kialakulását.

Annak ismeretében, hogy a neurális aktivitás és az oszcillációk dinamikusan megváltoztatják az extracelluláris tér ion összetételét, így a kálium-ion koncentráció is dinamikusan változhat, ezért feltételeztük, hogy aktív agyszeletekben ez retroaxonális akciós potenciálokat alakíthat ki a fentebb ismertetett stimulációs protokoll nélkül. Ennek teszteléséhez megnöveltük a neurális aktivitást a humán agyszelet preparációkban, majd whole-cell konfigurációt alakítottunk ki az első rétegi interneuronokon. A megnövekedett hálózati aktivitás eredményeként membránpotenciál oszcillációt, celluláris UP és DOWN-állapotokat, valamint akciós potenciálokat figyeltünk meg az elvezetett interneuronokon. Eddigi ismereteink szerint az aktív hálózati állapot során a szomato-dendritikus régióra érkező serkentő bemenetek depolarizálják az idegsejteket, amelyeken akciós potenciálok alakulhatnak ki. Azonban kísérleteinkben akciós potenciálokat figyeltünk meg hiperpolarizált, nyugalmi membránpotenciálról. Ezért az előzőekben is használt paraméterek, a küszöbpotenciál, a depolarizációs ráta és az elsőrendű derivált alapján csoportosítottuk az akciós potenciálokat. Az elvezetett sejtek egy részénél axon iniciális szegmentumon, valamint az axon távoli szakaszán kialakult akciós potenciálokat is azonosítottunk. Az akciós potenciálokat a különböző celluláris állapotokhoz társítottuk. Az előbbieket kizárólag az UP állapotok során jelentek meg, míg a retroaxonális AP-ok főként a DOWN és a tranzíciós állapotban, de megfigyelhetőek voltak az UP állapot alatt is. A stimulációval kiváltott RAT egy evolúciósan konzervált jelenség, amely előfordul emberben és rágcsálóban is, így hipotézisünk szerint a spontán megjelenő RA-AP a megnövekedett hálózati aktivitás során rágcsálóban is megjelenhet. Farmakológiai lassú oszcillációt indukáltunk patkány kortikális agyszeletekben majd az elsőrétegi interneuronok aktivitását vizsgáltuk, valamint szimultán lokális mezőpotenciált (LFP) regisztráltunk az ötödik rétegben. Az LFP elvezetésén megjelenő UP állapotokkal egyidejűleg serkentő posztszinaptikus potenciálok jelentek meg az elsőrétegi interneuronokon. A humán kísérleteinkhez hasonlóan spontán AP-ok jelentek meg a neurogliaform sejtek nyugalmi membránpotenciáljáról, amelyek RA-AP-ra jellemző

kinetikával rendelkeztek. A következőkben megvizsgáltuk az akciós potenciálok kapcsoltságát a hálózati oszcillációhoz. Az AIS-AP-ok fáziskapcsoltak a lassú oszcillációhoz, viszont a RA-AP-ok nem mutattak fáziskapcsoltságot, tehát az oszcilláció bármely fázisában előfordulhatnak. Kísérletsorozatunk alapján a RA-AP-ok spontán, a stimulációs protokoll nélkül is előfordulnak az elsőrétegi interneuronokon humánban és patkányban egyaránt.

Az *in vitro* agyszeletekben végzett kísérletek limitációit figyelembe véve, az utolsó kísérletsorozatunkban megbizonyosodtunk arról, hogy a spontán RA-AP kialakulása agyszelet preparációs műtermék, vagy megjelenik normál, fiziológias környezetben *in vivo*. Whole-cell konfigurációt alakítottunk ki az első rétegben, valamint szimultán LFP-t regisztráltunk az ötödik rétegben éber, altatott, valamint természetes alvásban lévő egerekben. Az elvezetett interneuronokra az LFP-n megjelenő UP állapotokkal egyidejűleg serkentő bemenetek érkeznek, amik időnként megfelelő mértékben depolarizálják a membránpotenciált, így akciós potenciálok is kialakulnak. Az *in vitro* méréseinkhez hasonlóan akciós potenciálokat figyeltünk meg hiperpolarizált membránpotenciál értékről, amikor a hálózat és a sejt is DOWN állapotban volt. A RA-AP és az AIS-AP elkülönítésére az előzőekben is használt küszöbpotenciál és depolarizációs ráta paramétereket használtuk. A továbbiakban megvizsgáltuk az akciós potenciálok időzítését a hálózati oszcillációhoz hasonlóan az *in vitro* agyszelet kísérletekhez. Az AIS-AP-ok a bemenetektől függően alakulnak ki, fázispreferenciát mutatnak és a hálózati UP állapotok alatt fordulnak elő. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban leírtakkal, mivel a lassú oszcilláció alatt kialakuló UP és DOWN állapot közötti tranzíciót az elsőrétegi NGF sejtek alakítják ki. Ezzel ellentétben a RA-AP a hálózattól függetlenül, az oszcilláció bármely fázisában előfordulhatnak. *In vivo* kísérleteinket összefoglalva egyes elsőrétegi interneuronok egyszerre képesek a hálózattól függő, jól időzített AIS-AP-ok leadására, valamint a hálózattól függetlenül RA-AP-ok leadására, így egyetlen sejt képes lehet időben szétválasztva máshogyan hozzájárulni az *in vivo* hálózati aktivitáshoz. Eredményeink szerint az elsőrétegi neurogliaform interneuronok a többi első rétegi interneurontól eltérő módon vehetnek részt az agykérgi lassúhullámú hálózati oszcillációkban. A neurogliaform sejtekre jellemző evolúciósan konzervált intrinzik axonális mechanizmus fontos szerepet tölthet be az agykérgi lassú oszcilláció kialakításában és szabályozásában.

## 8. Summary

---

The cerebral cortex is part of the central nervous system, the area of the brain responsible for higher order neural functions. One of the main topics of brain research is to investigate the mechanism of signal processing of the cerebral cortex. Inhibitory interneurons are smaller fraction of cortical neurons, but have highly diverse morphological, electrophysiological, and functional characteristics. The neurons have two anatomically distinct compartments: the somato-dendritic and the axonal regions, which have different functions. The somato-dendritic part receives information from the other neurons through chemical or electrical synapses, could be depolarized, and then the membrane potential changes of the different dendrites are summated in the cell body. As a result of the summation, the action potential (AIS-AP) is formed due to the depolarization of the axon in the initial segment (AIS), and then propagate in both directions along the axon. In the last decade, reliable retroaxonal firing (RAF) has been observed in hippocampal and cortical GABAergic interneurons, during neurons fire a high-frequency action potential series without depolarization of the somato-dendritic region. The kinetics of the action potentials generated during RAF are different from those of somatically evoked action potentials. These action potentials propagate in antidromic, retro-axonal manner (RA-AP) from the distal parts of the axon, in contrast to action potentials initiated at the initial segment of the axon. In my research, I investigated the formation and mechanism of retro-axonal action potentials of layer 1 GABAergic interneurons in human and rodent neocortex.

In our experiments, we performed whole cell patch clamp intracellular recordings on human and rodent cortical interneurons. First, we investigated retroaxonal firing in human brain slice preparations to confirm that it is an evolutionarily conserved phenomenon that is not restricted to rodents. As a results of injecting suprathreshold depolarization into the soma, we were able to evoke a series of retroaxonal action potentials on human interneurons. In line with previous studies under these epochs a high-frequency firing appears for several seconds long, when action potentials are generated in the distal parts of the axon and propagate retrogradely to the soma. The action potentials generated during stimulation are formed in the initial segment of the axon and are well distinguishable from the action potentials generated during retroaxonal firing by their kinetic parameters. In addition, we observed sporadic and rhythmic retroaxonal firing in

human cortical interneurons, which are quite different from the previously known tonic firing.

Next, we examined whether the new RAF patterns occur in the rodent cerebral cortex or it is a human specific phenomenon. Both tonic and sporadic RAF could be observed in rat layer 1 interneurons, but the rhythmic pattern requires a more specific circumstance closer to physiological conditions suggesting that rhythmic retroaxonal firing is also an evolutionarily conserved phenomenon.

In our experiments, we investigated the first layer of the neocortex, where several GABAergic interneuron types can be found. Therefore, we used post-hoc anatomical studies to classify interneurons into groups and identify the cell type specificity of retroaxonal firing in both human and rodent brain slice experiments. Different patterns of RAF and RAF appear in both NGFC (neurogliaform cell) and non-NGFC but are more prevalent in cells showing NGFC morphology.

Based on the literature, tonic retroaxonal firing is a cell-autonomous phenomenon and may be independent of synaptic inputs. In the following experiments, we investigated if rhythmic RAF is a network driven or rather a cell-autonomous phenomenon like the tonic pattern. We were able to induce rhythmic RAF in the presence of GABAergic and glutamatergic blockers and they had no effect on the maintenance of RAF, similar to data reported in the literature. Pacemaker cells with rhythm generating property have been identified in several brain regions, for example in some thalamocortical cells, which can generate cell-intrinsic membrane potential oscillations independently of the network. The frequency of the intrinsic oscillation can be modulated by changing the somatic membrane potential of these cells. Next, we investigated the somatic membrane potential dependence of RAF. Similar to how the rhythm generating cells operate, the frequency and pattern of RAF can be modulated by changing the somatic membrane potential. These suggest that a part of layer 1 interneurons, mainly neurogliaform interneurons may possess an intrinsic rhythm-generating property, which can contribute to the initiation and maintenance of cortical oscillations.

Our results and preliminary studies revealed that RAF is a cell-autonomous phenomenon suggesting the essential contribution of cell type specific ion channels. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels can modulate the resting membrane potential and play an important role in the initiation and propagation

of action potentials. In our next series of experiments, we investigated the role of HCN channels in RAF formation. After successful RAF induction, we applied HCN channel blocker, which reduced the duration of RAF and the number of retroaxonal action potentials. Thus, HCN-channels are actively involved in RAF and may influence axon excitability and RA-APs initiation. As a result of HCN channel activation, an h-current is formed ( $I_h$ ), which cause a slow depolarization return (sag) in response to the hyperpolarizing current step. We injected hyperpolarizing current steps into the layer 1 interneurons and determined the presence of sag potential. HCN channels are actively involved in the formation of RAF, and we expected to find higher sag in cells showing RAF. In cells where RAF could not be induced, we saw higher sag values, whereas lower sag was detectable in cells showing RAF. We found this result surprising. However, recent studies showed that HCN channels could be expressed not only in the somato-dendritic region but also in the axon. We therefore wondered whether the ratio of somatic to axonal HCN channel expression on layer 1 interneurons could explain the presence or absence of RAF. Based on our simultaneous somatic and axonal bleb whole-cell patch-clamp measurements, we confirmed that neurogliaform cells have approximately four times higher sag detectable on the axon compared to the soma in both human and rat tissues. Our experiments have revealed that somatic and axonal channel expression may differ. Moreover, axonal HCN channels can play an active role in the initiation of retroaxonal action potentials.

RAF can be induced by prolonged repetitive depolarizing stimulation, but the mechanism is not fully understood. A recent study reported that RAF can be induced without the stimulation protocol, by photostimulation of surrounding astrocytes alone. We hypothesize that photostimulation of astrocytes can increase extracellular potassium concentrations, which may directly depolarize the axon and thereby generate action potentials. To test our hypothesis, we placed another electrode near the first layer of recorded interneurons, filled with a recording solution containing a higher concentration of potassium ions, and then applied positive pressure to release the content into the extracellular space. We find sporadic RA-APs both in human and rodent neocortex, so higher potassium ion concentration in the extracellular space can also depolarize the axon and induce RA-AP.

Knowing that neuronal activity and oscillations dynamically change the ionic composition of the extracellular space, and thus potassium concentration can also change

dynamically, we hypothesized that in active brain slices this could initiate retroaxonal action potentials in the lack of stimulation protocol described above. To test this, we increased neuronal activity in human brain slice preparations and then performed whole-cell configurations on interneurons. As a result of the increased network activity, we observed membrane potential oscillations, cellular UP and DOWN states, and action potentials. Our current understanding of active network state, the somato-dendritic region receives excitatory inputs then depolarize neurons, which can trigger action potentials. However, in our experiments we observed action potentials from hyperpolarized resting membrane potentials. We therefore classified action potentials based on the previously used parameters such as: threshold potential, depolarization rate and first-order derivative. We identified AIS-APs and RA-APs in a subset of the recorded cells. Action potentials were associated to different cellular states, AIS-APs appeared exclusively during UP states, while RA-APs were mainly observed during DOWN and transient states but were also observed during UP state. Stimulation-induced RAF is an evolutionarily conserved phenomenon that occurs in humans and rodents, so we hypothesized that spontaneously appearing RA-AP during increased network activity may also occur in rodents. We induced pharmacological slow oscillations in rat cortical brain slices and then assessed the activity of layer 1 interneurons and recorded local field potential (LFP) in the layer 5. LFP deflections synchronized to single cell UP states with barrages of excitatory postsynaptic inputs on layer 1 interneurons. Similar to our human experiments, spontaneous APs come from resting membrane potentials of neurogliaform cells with kinetics characteristic of RA-AP. We next examined the relationship of action potentials to network oscillation. AIS-APs were phase-locked to the slow oscillation, whereas RA-APs showed no phase coupling, so they can occur in any phase of the oscillation. Our series of experiments showed that RA-APs occur spontaneously in both human and rat layer 1 cells in the lack of stimulation protocol.

Considering the limitations of *in vitro* experiments in brain slices, in our last experiments we verified whether spontaneous RA-AP is a brain slice preparation artifact or occurs in normal, physiological environments *in vivo*. We carried out whole-cell configuration in layer 1 and simultaneously monitoring the LFP in the layer 5 in awake, anesthetized, and naturally sleeping mice. Similar to our *in vitro* measurements, we observed action potentials from hyperpolarized membrane potential values when both the network and the cell were in DOWN states. To separate RA-AP from AIS-AP, we used

the threshold potential and depolarization rate parameters as in the previous. We further investigated the timing of action potentials for network oscillation. AIS-APs are input-dependent, show phase preferences and occur during network UP states. Our results are in line with the literature, as the transition between UP and DOWN states during slow oscillation is formed by layer 1 NGFC cells. In contrast, RA-AP can occur independently of the network states, and not phase locked to the oscillation. To summarize our in vivo experiments, a proportion of layer 1 interneurons are capable to fire network linked precise timed AIS-APs and network independent RA-APs, resulting that a single cell is able to contribute differently to in vivo network activity in a temporally disparate manner. Our results suggest that layer 1 neurogliaform interneurons may contribute to cortical slow-wave network oscillations in a different manner compared to other types of layer 1 interneurons. An evolutionarily conserved intrinsic axonal mechanism specific to neurogliaform cells may play an important role in the generation and modulation of cortical slow oscillations.



## 9. Köszönetnyilvánítás

---

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Tamás Gábornak és Dr. Molnár Gábornak a szakmai iránymutatást és a lehetőséget, hogy részt vehettem a kutatócsoport munkájában. Hálával tartozom Dr. Rózsa Mártonnak, Dr. Oláh Gáspárnak és Dr. Ozsvár Attilának a segítségnyújtásért és támogatásért. Köszönöm a labor jelenlegi és volt tagjainak a segítséget és a motiváló, baráti légkört: Dr. Kocsis Ágnes Katalin, Dr. Baka Judith, Dr. Barzó Pál, Mihut Norbert, Tóth Éva, Szóts Ildikó, Lákovics Rajmund, Lehóczki Bettina, Dr. Horváth-Furdan Szabina, Dr. Boldog Eszter, Dr. Kovács Balázs, Dr. Péterfi Zoltán, Sandle Joanna, Bakos Emőke, Averkin Róbert, Bordé Sándor, Horváth János, Bozsó Boglárka, Mezei Leóna, Törteli Anna, Veketyné Várad Margit. Továbbá köszönöm az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi tanszék munkatársainak is, hogy velük dolgozhattam. Hálás vagyok feleségemnek, Grétának, szüleimnek, nagyszüleimnek és barátaimnak a türelemért és segítségükért, valamint a támogatásukért.

## 10. Irodalomjegyzék

---

- Agetsuma, M., Hamm, J. P., Tao, K., Fujisawa, S., & Yuste, R. (2018). Parvalbumin-positive interneurons regulate neuronal ensembles in visual cortex. *Cerebral Cortex*, 28(5), 1831–1845. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx169>
- Alonso, A., & Llinás, R. R. (1989). Subthreshold Na<sup>+</sup>-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature*, 342(6246), 175–177. <https://doi.org/10.1038/342175a0>
- Amzica, F., & Steriade, M. (2000). Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. *Journal of Neuroscience*, 20(17), 6648–6665. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-17-06648.2000>
- Simon A., Olah Sz., Molnar G., Szabadics J., Tamas, G. (2005). Gap-Junctional Coupling between Neurogliaform Cells and Various Interneuron Types in the Neocortex. *Journal of Neuroscience*, 25(27), 6278–6285. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1431-05.2005>
- Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T. F., Gardner, D., Gardner, E. P., Goldberg, J. H., Helmstaedter, M., Hestrin, S., ... Yuste, R. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 557–568. <https://doi.org/10.1038/nrn2402>
- Barberis, S. (2018). Cajal's Law of Dynamic Polarization: Mechanism and Design. *Philosophies*, 3(2), 11. <https://doi.org/10.3390/philosophies3020011>
- Barnstable, C. J., Kosaka, T., Naegele, J. R., & Arimatsu, Y. (1992). Molecular properties of GABAergic local-circuit neurons in the mammalian visual cortex. *Progress in Brain Research*, 90(C), 503–522. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63628-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63628-6)
- Bartos, M., & Elgueta, C. (2012). Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *Journal of Physiology*, 590(4), 669–681. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226175>

- Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K<sup>+</sup> spatial buffering. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *77*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002>
- Berens, P. (2009). CircStat: A MATLAB Toolbox for Circular Statistics. *Journal of Statistical Software*, *31*(10).
- Berg, J., Sorensen, S. A., Ting, J. T., Miller, J. A., Chartrand, T., Buchin, A., Bakken, T. E., Budzillo, A., Dee, N., Ding, S. L., Gouwens, N. W., Hodge, R. D., Kalmbach, B., Lee, C., Lee, B. R., Alfiler, L., Baker, K., Barkan, E., Beller, A., ... Lein, E. S. (2021). Human neocortical expansion involves glutamatergic neuron diversification. *Nature*, *598*(7879), 151–158. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03813-8>
- Boldog, E., Bakken, T. E., Hodge, R. D., Novotny, M., Aevermann, B. D., Baka, J., Bordé, S., Close, J. L., Diez-Fuertes, F., Ding, S. L., Faragó, N., Kocsis, Á. K., Kovács, B., Maltzer, Z., McCorrison, J. M., Miller, J. A., Molnár, G., Oláh, G., Ozsvár, A., ... Tamás, G. (2018). Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nature Neuroscience*, *21*(9), 1185–1195. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0205-2>
- Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde*.
- Bucher, D., & Gozellard, J. M. (2011). Beyond faithful conduction: Short-term dynamics, neuromodulation, and long-term regulation of spike propagation in the axon. *Progress in Neurobiology*, *94*(4), 307–346. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.001>
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(6), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>
- Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5679), 1926–1929. <https://doi.org/10.1126/science.1099745>
- Byczkowicz, N., Eshra, A., Montanaro, J., Trevisiol, A., Hirrlinger, J., Kole, M. H. P., Shigemoto, R., & Hallermann, S. (2019). HCN channel-mediated neuromodulation can control action potential velocity and fidelity in central axons. *eLife*, *8*, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.42766>

- Cadwell, C. R., Bhaduri, A., Mostajo-Radji, M. A., Keefe, M. G., & Nowakowski, T. J. (2019). Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron*, *103*(6), 980–1004. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.009>
- Cannon, J., Mccarthy, M. M., Lee, S., Lee, J., Börgers, C., Whittington, M. A., & Kopell, N. (2014). Neurosystems: Brain rhythms and cognitive processing. *European Journal of Neuroscience*, *39*(5), 705–719. <https://doi.org/10.1111/ejn.12453>
- Carracedo, L. M., Kjeldsen, H., Cunnington, L., Jenkins, A., Schofield, I., Cunningham, M. O., Davies, C. H., Traub, R. D., & Whittington, M. a. (2013). A neocortical delta rhythm facilitates reciprocal interlaminar interactions via nested theta rhythms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *33*(26), 10750–10761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-13.2013>
- Carrillo-Reid, L., Yang, W., Bando, Y., Peterka, D. S., & Yuste, R. (2016). Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science*, *353*(6300), 691–694. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7560>
- Chartrand, T., Dalley, R., Close, J., Goriounova, N. A., Lee, B. R., Mann, R., Miller, J. A., Molnar, G., Mukora, A., Alfiler, L., Baker, K., Bakken, T. E., Berg, J., Bertagnolli, D., Braun, T., Brouner, K., Casper, T., Csajbok, E. A., Dee, N., ... Lein, E. S. (2023). Morphoelectric and transcriptomic divergence of the layer 1 interneuron repertoire in human versus mouse neocortex. *Science*, *382*(6667). <https://doi.org/10.1126/science.adf0805>
- Chittajallu, R., Auville, K., Mahadevan, V., Lai, M., Hunt, S., Calvigioni, D., Pelkey, K. A., Zaghoul, K. A., & McBain, C. J. (2020). Activity-dependent tuning of intrinsic excitability in mouse and human neurogliaform cells. *eLife*, *9*(9), 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.57571>
- Craig, M. T., & McBain, C. J. (2014). The emerging role of GABAB receptors as regulators of network dynamics: fast actions from a ‘slow’ receptor? *Current Opinion in Neurobiology*, *26*(7), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.10.002>
- Deemyad, T., Lüthi, J., & Spruston, N. (2018). Astrocytes integrate and drive action potential firing in inhibitory subnetworks. *Nature Communications*, *9*(1), 4336. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06338-3>

- DeFelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T. F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P. R., Huang, J., Jones, E. G., ... Ascoli, G. A. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(3), 202–216. <https://doi.org/10.1038/nrn3444>
- Dossi, R. C., Nunez, A., & Steriade, M. (1992). ELECTROPHYSIOLOGY OF A SLOW (0.5-4 Hz) INTRINSIC OSCILLATION OF CAT THALAMOCORTICAL NEURONES IN VIVO. *Physiology*, 215–234.
- Economo, M. N., Viswanathan, S., Tasic, B., Bas, E., Winnubst, J., Menon, V., Graybiel, L. T., Nguyen, T. N., Smith, K. A., Yao, Z., Wang, L., Gerfen, C. R., Chandrashekar, J., Zeng, H., Looger, L. L., & Svoboda, K. (2018). Distinct descending motor cortex pathways and their roles in movement. *Nature*, *563*(7729), 79–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0642-9>
- Egorov, A. V., Hamam, B. N., Fransén, E., Hasselmo, M. E., & Alonso, A. A. (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature*, *420*(6912), 173–178. <https://doi.org/10.1038/nature01171>
- Elgueta, C., Kohler, J., & Bartos, M. (2015). Persistent Discharges in Dentate Gyrus Perisoma-Inhibiting Interneurons Require Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Activation. *Journal of Neuroscience*, *35*(10), 4131–4139. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3671-14.2015>
- Funk, C. M., Peelman, K., Bellesi, M., Marshall, W., Cirelli, C., & Tononi, G. (2017). Role of somatostatin-positive cortical interneurons in the generation of sleep slow waves. *The Journal of Neuroscience*, *37*(38), 1303–1317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1303-17.2017>
- García-López, P., García-Marín, V., & Freire, M. (2006). Three-dimensional reconstruction and quantitative study of a pyramidal cell of a Cajal histological preparation. *Journal of Neuroscience*, *26*(44), 11249–11252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3543-06.2006>

- Gentet, L. J. (2012). Functional diversity of supragranular GABAergic neurons in the barrel cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00052>
- Hajos, N., Ellender, T. J., Zemankovics, R., Mann, E. O., Exley, R., Cragg, S. J., Freund, T. F., Paulsen, O., & Hájos, N. (2009). Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *The European journal of neuroscience*, 29(2), 319–327. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06577.x>
- Hájos, N., & Mody, I. (2009). Establishing a physiological environment for visualized in vitro brain slice recordings by increasing oxygen supply and modifying aCSF content. *Journal of neuroscience methods*, 183(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.06.005>
- Hay, Y. A., Deperrois, N., Fuchsberger, T., Quarrell, T. M., Koerling, A. L., & Paulsen, O. (2021). Thalamus mediates neocortical Down state transition via GABAB-receptor-targeting interneurons. *Neuron*, 109(17), 2682-2690.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.030>
- Heinemann, U., Lux, H. D., & Gutnick, M. J. (1977). Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Experimental Brain Research*, 27(3–4), 237–243. <https://doi.org/10.1007/BF00235500>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3(November), 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Hertz, L., & Chen, Y. (2016). Importance of astrocytes for potassium ion (K<sup>+</sup>) homeostasis in brain and glial effects of K<sup>+</sup> and its transporters on learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 484–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.018>
- Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., Close, J. L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B. P., Shehata, S. I., Aevermann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., ... Lein, E. S. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, 573(7772), 61–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1506-7>

- Holcman, D., & Tsodyks, M. (2006). The emergence of up and down states in cortical networks. *PLoS Computational Biology*, 2(3), 174–181. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020023>
- Hu, H., Gan, J., & Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, 345(6196). <https://doi.org/10.1126/science.1255263>
- Hu, W., & Shu, Y. (2012). Axonal bleb recording. *Neuroscience Bulletin*, 28(4), 342–350. <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1247-1>
- Imbrosci, B., Neitz, A., & Mittmann, T. (2015). Physiological properties of supragranular cortical inhibitory interneurons expressing retrograde persistent firing. *Neural Plasticity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/608141>
- Ivanov, A., & Zilberter, Y. (2011). Critical state of energy metabolism in brain slices: The principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Frontiers in Neuroenergetics*, 3(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnene.2011.00009>
- Kadala, A., Verdier, D., Morquette, P., & Kolta, A. (2015). Ion Homeostasis in Rhythmogenesis: The Interplay Between Neurons and Astroglia. *Physiology*, 30(5), 371–388. <https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2014>
- Kahana, M. J. (2006). The Cognitive Correlates of Human Brain Oscillations. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1669–1672. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3737-05c.2006>
- Kalmbach, B. E., Buchin, A., Miller, J. A., Bakken, T. E., Hodge, R. D., Chong, P., deFrates, R., Dai, K., Gwinn, R. P., Cobbs, C., Ko, A. L., Ojemann, J. G., Silbergeld, D. L., Koch, C., Anastassiou, C. A., Lein, E., & Ting, J. T. (2018). h-channels Contribute to Divergent Electrophysiological Properties of Supragranular Pyramidal Neurons in Human Versus Mouse Cerebral Cortex. *SSRN Electronic Journal*, 100(5), 1194–1208. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3188411>
- Kandel, E. R., Swartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). Principles of Neural Science. *McGraw-Hill Medical*.
- Karayannis, T., Elfant, D., Huerta-Ocampo, I., Teki, S., Scott, R. S., Rusakov, D. A., Jones, M. V., & Capogna, M. (2010). Slow GABA transient and receptor

- desensitization shape synaptic responses evoked by hippocampal neurogliaform cells. *Journal of Neuroscience*, 30(29), 9898–9909. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5883-09.2010>
- Kasten, M. R., & Anderson, M. P. (2015). Self-regulation of adult thalamocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, 114(1), 323–331. <https://doi.org/10.1152/jn.00800.2014>
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1996). S5-2 GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in neocortex. *Neuroscience Research*, 25(6), S11. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(96\)88582-8](https://doi.org/10.1016/0168-0102(96)88582-8)
- Kim, H. J., Chen, S., Eden, U. T., & Prerau, M. J. (2021). *A Quantitative Representation of Continuous Brain State During Sleep*. 103–106.
- Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5885), 53–57. <https://doi.org/10.1126/science.1149381>
- Knauer, B., Jochems, A., Valero-Aracama, M. J., & Yoshida, M. (2013). Long-lasting intrinsic persistent firing in rat CA1 pyramidal cells: A possible mechanism for active maintenance of memory. *Hippocampus*, 23(9), 820–831. <https://doi.org/10.1002/hipo.22136>
- Kramer, P. F., Brill-Weil, S. G., Cummins, A. C., Zhang, R., Camacho-Hernandez, G. A., Newman, A. H., Eldridge, M. A. G., Averbeck, B. B., & Khaliq, Z. M. (2022). Synaptic-like axo-axonal transmission from striatal cholinergic interneurons onto dopaminergic fibers. *Neuron*, 110(18), 2949-2960.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.011>
- Krook-Magnuson, E., Luu, L., Lee, S.-H., Varga, C., & Soltesz, I. (2011). Ivy and neurogliaform interneurons are a major target of  $\mu$ -opioid receptor modulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(42), 14861–14870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2269-11.2011>
- Le Magueresse, C., & Monyer, H. (2013). GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex. *Neuron*, 77(3), 388–405. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.011>



- Lee, A. J., Wang, G., Jiang, X., Johnson, S. M., Hoang, E. T., Lanté, F., Stornetta, R. L., Beenhakker, M. P., Shen, Y., & Julius Zhu, J. (2015). Canonical Organization of Layer 1 Neuron-Led Cortical Inhibitory and Disinhibitory Interneuronal Circuits. *Cerebral Cortex*, 25(8), 2114–2126. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu020>
- Leresche, N., Lightowler, S., Soltesz, I., Jassik-Gerschenfeld, D., & Crunelli, V. (1991). Low-frequency oscillatory activities intrinsic to rat and cat thalamocortical cells. *The Journal of Physiology*, 441(1), 155–174. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018744>
- Li, T., Tian, C., Wu, S., Shu, Y., Scalmani, P., Frassoni, C., Mantegazza, M., Yang, M., Li, T., & Wang, Y. (2014). Action Potential Initiation in Neocortical Inhibitory Interneurons. *PLoS Biology*, 12(9), e1001944. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001944>
- Liu, C., Cai, X., Ritzau-Jost, A., Kramer, P. F., Li, Y., Khaliq, Z. M., Hallermann, S., & Kaeser, P. S. (2022). An action potential initiation mechanism in distal axons for the control of dopamine release. *Science*, 375(6587), 1378–1385. <https://doi.org/10.1126/science.abn0532>
- Llinás, R., & Yarom, Y. (1986). Oscillatory properties of guinea-pig inferior olivary neurones and their pharmacological modulation: an in vitro study. *The Journal of Physiology*, 376(1), 163–182. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016147>
- Lörincz, M. L., Gunner, D., Bao, Y., Connelly, W. M., Isaac, J. T. R., Hughes, S. W., & Crunelli, V. (2015). A Distinct Class of Slow (0.2-2 Hz) Intrinsically Bursting Layer 5 Pyramidal Neurons Determines UP/DOWN State Dynamics in the Neocortex. *Journal of Neuroscience*, 35(14), 5442–5458. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3603-14.2015>
- Lupica, C. R., Bell, J. A., Hoffman, A. F., & Watson, P. L. (2001). Contribution of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 86(1), 261–268. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.261>
- Ma, J., Yao, X. H., Fu, Y., & Yu, Y. C. (2014). Development of layer 1 neurons in the mouse neocortex. *Cerebral Cortex*, 24(10), 2604–2618. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht114>

- Maccaferri, G., & McBain, C. J. (1996). The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *Journal of Physiology*, 497(1), 119–130. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021754>
- Major, G., & Tank, D. (2004). Persistent neural activity: Prevalence and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(6), 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.10.017>
- Mao, B. Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R. C., & Yuste, R. (2001). Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron*, 32(5), 883–898. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00518-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00518-9)
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Massimini, M., & Amzica, F. (2001). Extracellular calcium fluctuations and intracellular potentials in the cortex during the slow sleep oscillation. *Journal of Neurophysiology*, 85(3), 1346–1350. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.3.1346>
- Maximiliano José, N., Hashikawa, Y., & Rudy, B. (2018). Diversity and connectivity of layer 5 somatostatin-expressing interneurons in the mouse barrel cortex. *The Journal of Neuroscience*, 38(7), 2415–2417. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2415-17.2017>
- Michalikova, M., Remme, M. W. H., Schmitz, D., Schreiber, S., & Kempster, R. (2019). Spikelets in pyramidal neurons: Generating mechanisms, distinguishing properties, and functional implications. *Reviews in the Neurosciences*, 31(1), 101–119. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0044>
- Neske, G. T. (2016). The Slow Oscillation in Cortical and Thalamic Networks: Mechanisms and Functions. *Frontiers in Neural Circuits*, 9(January), 88. <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00088>
- Niethard, N., Ngo, H.-V. V., Ehrlich, I., & Born, J. (2018). Cortical circuit activity underlying sleep slow oscillations and spindles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1805517115>

- Octeau, J. C., Gangwani, M. R., Allam, S. L., Tran, D., Huang, S., Hoang-Trong, T. M., Golshani, P., Rumbell, T. H., Kozloski, J. R., & Khakh, B. S. (2019). Transient, Consequential Increases in Extracellular Potassium Ions Accompany Channelrhodopsin2 Excitation. *Cell Reports*, 27(8), 2249-2261.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.078>
- Oláh, S., Füle, M., Komlósi, G., Varga, C., Báldi, R., Barzó, P., & Tamás, G. (2009). Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature*, 461(7268), 1278–1281. <https://doi.org/10.1038/nature08503>
- Oláh, S., Komlósi, G., Szabadics, J., Varga, C., Tóth, E., Barzó, P., & Tamás, G. (2007). Output of neurogliaform cells to various neuron types in the human and rat cerebral cortex. *Frontiers in neural circuits*, 1(November), 4. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.004.2007>
- Overstreet-Wadiche, L., & McBain, C. J. (2015). Neurogliaform cells in cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), 458–468. <https://doi.org/10.1038/nrn3969>
- Ozsvár, A., Komlósi, G., Oláh, G., Baka, J., Molnár, G., & Tamás, G. (2021). Predominantly linear summation of metabotropic postsynaptic potentials follows coactivation of neurogliaform interneurons. *eLife*, 10, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.65634>
- Palmer, L., Murayama, M., & Larkum, M. (2012). Inhibitory regulation of dendritic activity in vivo. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(MAY2012), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00026>
- Peng, H., Xie, P., Liu, L., Kuang, X., Wang, Y., Qu, L., Gong, H., Jiang, S., Li, A., Ruan, Z., Ding, L., Yao, Z., Chen, C., Chen, M., Daigle, T. L., Dalley, R., Ding, Z., Duan, Y., Feiner, A., ... Zeng, H. (2021). Morphological diversity of single neurons in molecularly defined cell types. *Nature*, 598(7879), 174–181. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03941-1>
- Pérez-Garci, E., Gassmann, M., Bettler, B., & Larkum, M. E. (2006). The GABAB1b Isoform Mediates Long-Lasting Inhibition of Dendritic Ca<sup>2+</sup> Spikes in Layer 5 Somatosensory Pyramidal Neurons. *Neuron*, 50(4), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.019>

- Peters, A., Palay, S. L., & Webster, H. deF. (1991). *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells. Oxford University Press, 494.*
- Pinault, D. (1995). Backpropagation of action potentials generated at ectopic axonal loci: hypothesis that axon terminals integrate local environmental signals. *Brain Research Reviews, 21*(1), 42–92. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(95\)00004-M](https://doi.org/10.1016/0165-0173(95)00004-M)
- Price, C. J., Scott, R., Rusakov, D. A., & Capogna, M. (2008). GABAB receptor modulation of feedforward inhibition through hippocampal neurogliaform cells. *Journal of Neuroscience, 28*(27), 6974–6982. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-07.2008>
- Prönneke, A., Scheuer, B., Wagener, R. J., Möck, M., Witte, M., & Staiger, J. F. (2015). Characterizing VIP neurons in the barrel cortex of VIPcre/tdTomato mice reveals layer-specific differences. *Cerebral Cortex, 25*(12), 4854–4868. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv202>
- Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: A perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience, 10*(10), 724–735. <https://doi.org/10.1038/nrn2719>
- Ramon y Cajal, S. (1995). *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates. Oxford University Press, New York,.*
- Rasmussen, R., O'Donnell, J., Ding, F., & Nedergaard, M. (2020). Interstitial ions: A key regulator of state-dependent neural activity? *Progress in Neurobiology, March, 101802*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101802>
- Roth, F. C., & Hu, H. (2020). An axon-specific expression of HCN channels catalyzes fast action potential signaling in GABAergic interneurons. *Nature Communications, 11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15791-y>
- Rózsa, M., Baka, J., Bordé, S., Rózsa, B., Katona, G., & Tamás, G. (2017). Unitary GABAergic volume transmission from individual interneurons to astrocytes in the cerebral cortex. *Brain Structure and Function, 222*(1), 651–659. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1166-9>
- Saleem, A. B., Chadderton, P., Aperia-Schoute, J., Harris, K. D., & Schultz, S. R. (2010). Methods for predicting cortical UP and DOWN states from the phase of deep layer

- local field potentials. *Journal of Computational Neuroscience*, 29(1–2), 49–62.  
<https://doi.org/10.1007/s10827-010-0228-5>
- Saleh, M., Reimer, J., Penn, R., Ojakangas, C. L., & Hatsopoulos, N. G. (2010). Fast and Slow Oscillations in Human Primary Motor Cortex Predict Oncoming Behaviorally Relevant Cues. *Neuron*, 65(4), 461–471.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.02.001>
- Sanchez-Vives, M., & McCormick, D. (2000). Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nature neuroscience*, 3(10).
- Sasaki, T., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2011). Action-potential modulation during axonal conduction. *Science*, 331(6017), 599–601. <https://doi.org/10.1126/science.1197598>
- Schuman, B., Machold, R. P., Hashikawa, Y., Fuzik, J., Fishell, G. J., & Rudy, B. (2019). Four Unique Interneuron Populations Reside in Neocortical Layer 1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(1), 125–139.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1613-18.2018>
- Shah, M. M. (2014). Cortical HCN channels: function, trafficking and plasticity. *The Journal of Physiology*, 592(13), 2711–2719.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.270058>
- Sheffield, M. E. J., Best, T. K., Mensh, B. D., Kath, W. L., & Spruston, N. (2011). Slow integration leads to persistent action potential firing in distal axons of coupled interneurons. *Nature neuroscience*, 14(2), 200–207. <https://doi.org/10.1038/nn.2728>
- Sheffield, M. E. J., Edgerton, G. B., Heuermann, R. J., Deemyad, T., Mensh, B. D., & Spruston, N. (2013). Mechanisms of retroaxonal barrage firing in hippocampal interneurons. *Journal of Physiology*, 591(19), 4793–4805.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.258418>
- Shipp, S. (2007). Structure and function of the cerebral cortex. *Current biology : CB*, 17(12), R443–R449. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.044>
- Somogyi, P., Freund, T. F., Hodgson, A. J., Somogyi, J., Beroukas, D., & Chubb, I. W. (1985). Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus visual cortex of the cat. *Brain Research*, 332(1), 143–149.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90397-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90397-X)

- Somogyi, P., Kisvárdy, Z. F., Martin, K. A. C., & Whitteridge, D. (1983). Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience*, *10*(2), 261–294. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90133-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90133-1)
- Steriade, M., McCormick, D. A., & Sejnowski, T. J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, *262*(5134), 679–685. <https://doi.org/10.1126/science.8235588>
- Stuart, G. J., & Spruston, N. (2015). Dendritic integration: 60 years of progress. *Nature Neuroscience*, *18*(12), 1713–1721. <https://doi.org/10.1038/nn.4157>
- Stuart, G., Schiller, J., & Sakmann, B. (1997). Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *Journal of Physiology*, *505*(3), 617–632. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.617ba.x>
- Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B., & Häusser, M. (1997). Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences*, *20*(3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10075-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10075-8)
- Suzuki, N., Tang, C. S.-M., & Bekkers, J. M. (2014). Persistent barrage firing in cortical interneurons can be induced in vivo and may be important for the suppression of epileptiform activity. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*(March), 76. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00076>
- Szabadics, J., Varga, C., Molnár, G., Oláh, S., Barzó, P., & Tamás, G. (2006). Excitatory Effect of GABAergic Axo-Axonic Cells in Cortical Microcircuits. *Science*, *311*(5758), 233–235. <https://doi.org/10.1126/science.1121325>
- Szegedi, V., Bakos, E., Furdan, S., Kovács, B. H., Varga, D., Erdélyi, M., Barzó, P., Szücs, A., Tamás, G., & Lamsa, K. (2023). HCN channels at the cell soma ensure the rapid electrical reactivity of fast-spiking interneurons in human neocortex. In *PLoS Biology* (Köt. 21, Szám 2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002001>
- Tamás, G., Buhl, E. H., & Somogyi, P. (1997). Massive Autaptic Self-Innervation of GABAergic Neurons in Cat Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *17*(16), 6352–6364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06352.1997>

- Tamás, G., Lorincz, A., Simon, A., & Szabadics, J. (2003). Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5614), 1902–1905. <https://doi.org/10.1126/science.1082053>
- Tasic, B., Yao, Z., Graybiel, L. T., Smith, K. A., Nguyen, T. N., Bertagnolli, D., Goldy, J., Garren, E., Economo, M. N., Viswanathan, S., Penn, O., Bakken, T., Menon, V., Miller, J., Fong, O., Hirokawa, K. E., Lathia, K., Rimorin, C., Tieu, M., ... Zeng, H. (2018). Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature*, 563(7729), 72–78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0654-5>
- Telenczuk, M., Fontaine, B., & Brette, R. (2017). The basis of sharp spike onset in standard biophysical models. *PLOS ONE*, 12(4), e0175362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175362>
- Thuault, S. J., Malleret, G., Constantinople, C. M., Nicholls, R., Chen, I., Zhu, J., Panteleyev, A., Vronskaya, S., Nolan, M. F., Bruno, R., Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (2013). Prefrontal cortex HCN1 channels enable intrinsic persistent neural firing and executive memory function. *Journal of Neuroscience*, 33(34), 13583–13599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2427-12.2013>
- Ting, J. T., Kalmbach, B., Chong, P., De Frates, R., Keene, C. Di., Gwinn, R. P., Cobbs, C., Ko, A. L., Ojemann, J. G., Ellenbogen, R. G., Koch, C., & Lein, E. (2018). A robust ex vivo experimental platform for molecular-genetic dissection of adult human neocortical cell types and circuits. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26803-9>
- Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, 91(2), 260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
- Tryba, A. K., Kaczorowski, C. C., Ben-Mabrouk, F., Elsen, F. P., Lew, S. M., & Marcuccilli, C. J. (2011). Rhythmic intrinsic bursting neurons in human neocortex obtained from pediatric patients with epilepsy. *European Journal of Neuroscience*, 34(1), 31–44. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07746.x>
- Valero, M., Viney, T. J., Machold, R., Mederos, S., Zutshi, I., Schuman, B., Senzai, Y., Rudy, B., & Buzsáki, G. (2021). Sleep down state-active ID2/Nkx2.1 interneurons

- in the neocortex. *Nature Neuroscience*, 24(March). <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00797-6>
- Wu, C., Luk, W. P., Gillis, J., Skinner, F., & Zhang, L. (2005). Size does matter: Generation of intrinsic network rhythms in thick mouse hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 93(4), 2302–2317. <https://doi.org/10.1152/jn.00806.2004>
- Wu, C., Shen, H., Luk, W. P., & Zhang, L. (2002). A fundamental oscillatory state of isolated rodent hippocampus. *Journal of Physiology*, 540(2), 509–527. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013441>
- Zhang, L., He, J., Jugloff, D. G. M., & Eubanks, J. H. (2008). The MeCP2-null mouse hippocampus displays altered basal inhibitory rhythms and is prone to hyperexcitability. *Hippocampus*, 18(3), 294–309. <https://doi.org/10.1002/hipo.20389>
- Zucca, S., D’Urso, G., Pasquale, V., Vecchia, D., Pica, G., Bovetti, S., Moretti, C., Varani, S., Molano-Mazón, M., Chiappalone, M., Panzeri, S., & Fellin, T. (2017). An inhibitory gate for state transition in cortex. *eLife*, 6, 1–31. <https://doi.org/10.7554/elife.26177>