

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2067.

DOMONKOS ANDOR

Funkcionális Idegtudományok

című program

Programvezető: Dr. Vizi E. Szilveszter, professor emeritus

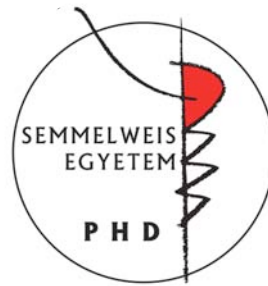
Témavezető: Dr. Varga Viktor, tudományos főmunkatárs

Glutamáterg komponens a raphe-hippocampalis kapcsolatban

Doktori értekezés

Dr. Domonkos Andor

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Viktor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, tudományos tanácsadó
Dr. Lőrincz László Magor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Majorossy Kálmán, CSc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hájos Norbert, az MTA doktora,
tudományos tanácsadó
Dr. Zelles Tibor, Ph.D., habilitált egyetemi
docens

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	7
1.1. A szerotoninerg rendszerről alkotott kép a kezdetektől napjainkig	7
1.2. Az agytörzs raphe magjai	10
<i>A raphe magok hagyományos csoportosítása</i>	<i>10</i>
<i>Eredet nyomonkövetésén alapuló csoportosítás</i>	<i>12</i>
1.3. A nucleus raphe medianus és dorsalis kapcsolatai	15
<i>A nucleus raphe medianus és dorsalis efferensei</i>	<i>15</i>
<i>A nucleus raphe medianus és dorsalis afferensei</i>	<i>21</i>
<i>Funkcionális különbségek a nucleus raphe medianus és dorsalis között – az</i> <i>eltérő kapcsolatok fényében</i>	<i>25</i>
1.4. A raphe-hippocampalis kapcsolat jelentősége	29
<i>Interneuronok szelektív beidegzése</i>	<i>29</i>
<i>A szerotonin sejt szintű hatásai</i>	<i>30</i>
<i>Hatás a hálózati aktivitásra</i>	<i>33</i>
1.5. A glutamáterg kotranszmisszió	37
<i>A glutamáterg transzmisszió alapvető feltételei</i>	<i>37</i>
<i>A vezikuláris glutamáttranszporterek komplementer előfordulása</i>	<i>37</i>
<i>Kotranszmisszió</i>	<i>41</i>
<i>Glutamáterg kotranszmisszió</i>	<i>43</i>
<i>VGluT3 a kotranszmisszióban</i>	<i>43</i>
2. Célkitűzések	48
3. Módszerek	50
<i>A kísérleti állatokkal végzett munka etikai vonatkozásai</i>	<i>50</i>
3.1. A MRR sejtjeinek elektrofiziológiai jellemzése	51
<i>Lokális mezőpotenciál regisztrálása a hippocampusban és a prefrontalis</i> <i>kéregben</i>	<i>51</i>
<i>Juxtacelluláris aktivitásmérés a MRR-ban</i>	<i>52</i>

<i>Szenzoros stimulálás</i>	52
<i>Sejtjelölés</i>	53
<i>Szövettani feldolgozás</i>	53
<i>Adatelemzés</i>	54
3.2. A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása.....	59
<i>Lokális mezőpotenciál regisztrálása a hippocampusban</i>	59
<i>A MRR elektromos ingerlése és a hippocampalis sejtek aktivitásának regisztrálása</i>	59
<i>Juxtacelluláris aktivitásmérés a hippocampusban</i>	60
<i>Farmakológiai tesztek</i>	61
<i>Sejtjelölés</i>	62
<i>Szövettani feldolgozás</i>	62
<i>Adatelemzés</i>	63
4. Eredmények	67
4.1. A MRR sejteinek elektrofiziológiai jellemzése	67
<i>Alapvető különbség a csoportok között az akcióspotenciálok hosszában</i>	68
<i>Különbség a tüzelési frekvenciában</i>	68
<i>A szenzoros ingerlés hatása a sejtaktivitásra</i>	73
4.2. A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása.....	76
5. Megbeszélés.....	86
5.2. A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása.....	92
6. Következtetések.....	98
Összefoglalás	100
Summary	101
Irodalomjegyzék	102
Saját publikációk jegyzéke	132
Köszönetnyilvánítás.....	133

Rövidítések jegyzéke

5-HT	5-hidroxitriptamin, szerotonin
ABC	avidin-biotin komplex
Am	amygdala
AMG	amygdala
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropánsav
Aq	aquaeductus cerebri
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BLA	amygdala basolateralis magcsoportja
BNST	nucleus interstitialis striae terminalis
BNPI	agyspecifikus nátrium-függő anorganikusfoszfát-transzporter
CA1	a hippocampus CA1 (cornu ammonis 1) régiója
CA3	a hippocampus CA3 (cornu ammonis 3) régiója
CB	kalbindin D28k
CCK	kolecisztokinin
Cd	nucleus caudatus
CeA	amygdala centralis magcsoportja
CeC	amygdala centralis magcsoportja
Cga	cortex cingularis anterior
COA	cortex amygdalaris
CP	nucleus caudatus – putamen
CPu	nucleus caudatus–putamen
CR	kalretinin
CTX	cortex
Cx	cortex
DB	Broca-féle diaganális köteg
DCN	kisagy mély magjai
DLGN	nucleus geniculatus lateralis dorsalis része

DNPI	differenciálódás-kapcsolt agyspecifikus nátrium-függő anorganikusfoszfát-transzporter
DR	nucleus raphe dorsalis
DTg	nucleus tegmentalis dorsalis
DW	nucleus raphe dorsalis dorsalis szárnya
eGFP	zöld fluoreszcens fehérje (enhanced green fluorescent protein)
GABA	γ -aminovajsav
GnRH	gonadotropinfelszabadító hormon
GP	globus pallidus
Hb	habenula
HF	formatio hippocampi
Hpc	hippocampus
Hyp	hypothalamus
IL	prefrontalis kéreg infralimbikus része
IP	nucleus interpeduncularis
IPN	nucleus interpeduncularis
IS	substantia innominata
LC	locus coeruleus
LFP	lokális mezőpotenciál
LGN	nucleus geniculatus lateralis
LHb	habenula lateralis
LPGC	nucleus paragigantocellularis lateralis
LS	nucleus septalis lateralis
mm	nucleus mamillaris
MS	nucleus septalis medialis
MR	nucleus raphe medianus
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
MRR	median raphe régió (együtt a nucleus raphe medianus és paramedianus)
MRtN	a középagy reticularis magja
NAc	nucleus accumbens

NBQX	dinátrium-2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalin-7-szulfonamid
OB	bulbus olfactorius
PAG	periaquaeductalis szürkeállomány
PB	nucleus parabrachialis
PFC	prefrontalis kéreg
Pir	cortex piriformis
PIR	cortex piriformis
PL	prefrontalis kéreg prelimbikus része
PO	preoptikus area
PV	parvalbumin
PVH	nucleus paraventricularis hypothalami
PvT	nucleus paraventricularis thalami
R1	első rhomboméra
R2	második rhomboméra
R3	harmadik rhomboméra
R5	ötödik rhomboméra
R6P	hatodik vagy caudalisabb rhomboméra
rDR	nucleus raphe dorsalis rostralis része
RM	nucleus retromamillaris, megegyezik a nucleus supramamillarisszal
RMg	nucleus raphe magnus
ROb	nucleus raphe obscurus
RPa	nucleus raphe pallidus
SC	colliculus superior
SCN	nucleus suprachiasmaticus
Se	septalis magok
SH	nucleus accumbens, shell
SN	substantia nigra
SNc	substantia nigra pars compacta
SNr	substantia nigra pars reticularis

TBS	tris(hidroximetil)aminometánt tartalmazó fiziológias sóoldat
Tg	Gudden-féle tegmentalis magok
Th	thalamus
thal	thalamus
TpH2	triptofán-hidroxiláz 2-es típusú izoenzime
VAcHT	vezikuláris acetilkolin-transzporter
VGAT	vezikuláris γ -aminovajsav-transzporter
VGluT	vezikuláris glutamáttranszporter (mindegyik izoformáját beleértve)
VGluT1	vezikuláris glutamáttranszporter 1-es izoformája
VGluT2	vezikuláris glutamáttranszporter 2-es izoformája
VGluT3	vezikuláris glutamáttranszporter 3-as izoformája
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid
VMAT2	vezikuláris monoamintranszporter 2-es izoformája
VP	ventralis pallidum
VTA	ventralis tegmentalis area
VW	nucleus raphe dorsalis ventralis szárnya

1. Bevezetés

1.1. A szerotoninerg rendszerről alkotott kép a kezdetektől napjainkig

Irvine Page laboratóriuma Maurice Rapport úttörő munkájával 1948-ban kimutatott egy vazokonstriktor hatású vegyületet a vérszérumban, amelyet szerotoninnak neveztek el, később pedig ennek kémiai szerkezetét 5-hidroxitriptaminként (5-HT) azonosították (Rapport és mtsai 1948a, Rapport és mtsai 1948b, Rapport 1949). Vittorio Erspamer bő egy évtizeddel korábban már izolálta enteramin néven az enterochromaffin sejtek simaizomkontrakciót okozó mediátorát (Erspamer és Vialli 1937), ám ennek kémiai szerkezetét csak később, 1952-ben tudta meghatározni megbizonyosodva arról, hogy az enteramin azonos a szerotoninnal (Erspamer és Asero 1952). A teljesség kedvéért megemlítendő, hogy az Erspamer kísérletei szerint készített enteramin-kivonat nem kizárólagosan 5-HT-t tartalmazott, annak biológiai hatásaiban a P-anyag is szerepet játszott, mint ahogyan azt később igazolták (Dalglish és mtsai 1952, Feldberg és Toh 1953). Az 5-HT jelenlétére a vérszérumban O'Connor régebben, 1912-ben közölt adatai is utaltak, azonban ő akkor nem próbálta a megfigyelt hatásért felelős anyagot izolálni, illetve azonosítani (O'Connor 1912, Erspamer 1954). Az 5-HT-nal kapcsolatos kutatások azután indultak be igazán, hogy 1951-ben laboratóriumi körülmények között szintetizálták, és mivel ez Rapport kollaborációinak eredményeképpen valósult meg, az általa használt szerotonin elnevezés honosodott meg a tudományos közéletben (Whitaker-Azmitia 1999).

A szerotonin idegrendszerben betöltött szerepének vizsgálata azután indulhatott el, miután Betty Twarog 1952-ben igazolta, hogy az ehető kékagyló (*Mytilus edulis*) simaizomzatát vezérlő idegrostok egyik neurotranszmittere a szerotonin (Twarog 1954), majd emlősök agyának homogenizátumában is kimutatták azt (Twarog és Page 1953, Bogdanski és mtsai 1956). Az 5-HT és a súlyos pszichiátriai zavarokat okozó D-lizergsav-dietilamid (Savage 1952) közti strukturális hasonlóságra (Woolley és Shaw 1953, Gaddum 1953) felfigyelve Dilworth Wayne Woolley mutatott rá elsőként a

serotonin fontosságára az agyi működésekben (Woolley és Shaw 1954, Whitaker-Azmitia 1999).

A Palkovits Miklós által kidolgozott mikrodisszekciós agymintavételi technikával (Palkovits 1973) a korábbiaknál nagyobb felbontással, az agytörzs magjainak szintjén is detektálták az 5-HT-t (Palkovits és mtsai 1974). Közben bizonyították az 5-HT bioszintézisében kulcsszereppel bíró enzim, az 5-hidroxitriptofán-dekarboxiláz jelenlétét a központi idegrendszerben (Bogdanski és mtsai 1957, Kuntzman és mtsai 1961), valamint az 5-HT kimutatására is a korábbiaknál érzékenyebb módszereket vezettek be (Saavedra és mtsai 1973, Holman és mtsai 1976). Mivel ezek a vizsgálatok mind szövethomogenizátumokkal dolgoztak, a szerotonintartalmú idegsejtestek és nyúlványaik precíz lokalizására nem adtak lehetőséget, ebben hozott nagy előrelépést Falck és Hillarp spektrofotometriás módszere (Falck és mtsai 1962). E technikával Annika Dahlström és Kjell Fuxe részletesen feltérképezte a patkány agyának szerotonintartalmú idegsejtjeit, melyek az agytörzs középvonali raphe magjaiban, illetve a középvonalhoz közeli struktúrákban kilenc sejtcsoportba tömörülnek, ezeket az azóta is használatos B1 – B9 jelzéssel illették (Dahlström és Fuxe 1964). A szerotonin lokalizációjára alkalmas, spektrofotometrián alapuló morfológiai vizsgálatokat sokan fejlesztették tovább (Fuxe és Jonsson 1967, Fuxe és Jonsson 1974, Aghajanian és Asher 1971, Aghajanian és mtsai 1973, Hökfelt és Ljungdahl 1972, Azmitia és Henriksen 1976, Lorén és mtsai 1976, Bloom és Battenberg 1976), viszont a specifikus, megbízható, érzékeny és ugyanakkor a reakciótermék instabilitásától kevésbé terhelt eljárást a szerotoninellenes antitest immunhisztokémiai alkalmazása hozta el (Steinbusch és mtsai 1978), mellyel megerősítették és pontosították a korábbi módszerekkel végzett agyi szerotoninkimutatást (Steinbusch és mtsai 1981, Steinbusch 1981). Később a szerotonin prekursorát, az 5-hidroxitriptofánt (Touret és mtsai 1987) és a szintézisét katalizáló triptofán-hidroxiláz enzim jelenlétét (Weissmann és mtsai 1987) is megerősítették immunhisztokémiával az 5-HT-tartalmú neuronokban.

Az érzékeny szerotonindetekciót követően világossá vált, hogy a raphe magok projekciónak egy jelentősebb része, a kezdeti eredmények alapján mintegy harmada, nem szerotoninerg (Descarries és mtsai 1982, Kosofsky és Molliver 1987). A raphe magok egységes szerotoninerg jelátviteléről alkotott képet végül a vezikuláris glutamáttranszporter harmadik izoformájának (VGluT3) felfedezése döntötte meg. A VGluT3 mRNS-ét a szerotoninerg sejtek túlnyomó többsége tartalmazza, és a fehérjét is nagy hányaduk termeli (Schäfer és mtsai 2002, Takamori és mtsai 2002, Fremeau és mtsai 2002, Gras és mtsai 2002). Később bizonyították a VGluT3 jelenlétét a vetítő raphe sejtekben, melyek egy része tartalmaz, másik részéből viszont hiányzik a szerotonin (Jackson és mtsai 2009, Hioki és mtsai 2010). Ezek alapján feltételezzük, hogy a raphe magok projekcióiban a szerotonin mellett glutamáterg komponens is jelen van.

Doktori munkám során ennek a feltételezett glutamáterg komponensnek jártam utána *in vivo* körülmények között végzett elektrofiziológiai kísérletekkel. Vizsgáltam, hogy mennyiben térnek el a VGluT3-at expresszáló – és ennek következtében glutamát ürítésére képes – raphe-sejteknek az alapvető elektrofiziológiai tulajdonságai a többi raphe-sejtétől. Vizsgáltam azt is, hogy a raphe magok efferenseinek egyik jelentős célterületére, a hippocampusra milyen sejtszintű hatással lehet a szerotoninerg rendszerben sokáig rejtőzködő glutamáterg komponens. Az esetleges elektrofiziológiai különbségek, valamint a glutamáterg komponenshez köthető hippocampalis hatások értelmezése előtt fontosnak tartom, hogy bemutassam eddigi ismereteinket a raphe-magok szerveződéséről, más agyterületekkel létesített kapcsolataikról, illetve az ebből következő funkcionális különbségekről. Továbbá, a dolgozatom bevezetőjében kitérek arra, hogy miért pont a raphe-hippocampalis kapcsolatban látom esélyét a glutamáterg komponens szerepének megértésére, valamint röviden áttekintem az eddigi bizonyítékokat a VGluT3-hoz kapcsolható glutamáterg transzmisszióról és kotranszmisszióról.

1.2. Az agytörzs raphe magjai

A raphe magok hagyományos csoportosítása

Hagyományosan a raphe magokat lokalizációjuk alapján csoportosítjuk, és mivel némelyik sejtcsoport kiterjedése nem követi a makroszkópos agyrégiók – a középagy, a híd és a nyúltvelő – határvonalait, nevezéktani bizonytalanságokkal találkozhatunk. A raphe magokat több esetben nem egyszerű elhatárolni az őket körülvevő struktúráktól sem, ami szintén bonyolítja definiálásukat és csoportosításukat a hagyományos neuroanatómia szerint (Harding és mtsai 2004), illetve annak revideált, a sejtek származását is figyelembe venni szándékozó (Alonso és mtsai 2013) megközelítése során.

A következőkben a raphe magok hagyományos anatómiájával foglalkozó legfontosabb összefoglaló közlemények és könyvfejezetek alapján áttekintem azok csoportosítását. A középagyhoz az alábbi raphe magokat sorolják:

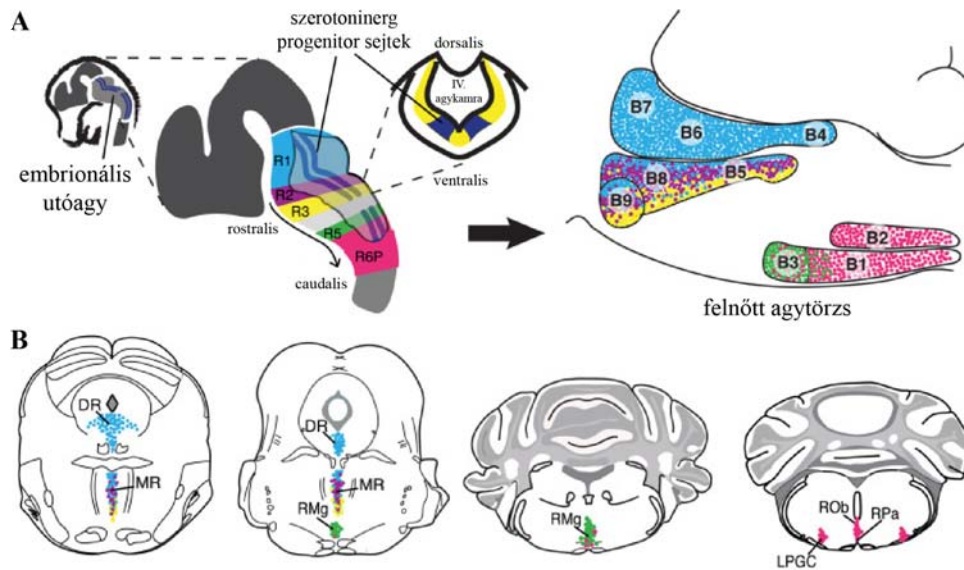
- a) *nucleus raphe dorsalis* (DR), amelyben helyet foglal a Dahlström és Fuxe által meghonosított alfanumerikus osztályozás szerinti B7 és B6 szerotoninerg sejtcsoport. Ez utóbbi a hagyományos makroszkópos neuroanatómia szerint már a hídhoz sorolandó, ezért egyes források használják a *nucleus raphe dorsalis pontinus* elnevezést rá. A DR tartalmazza az összes raphe mag közül a legtöbb szerotoninerg sejtet, rostralis és középső harmada lateralis irányban jelentősen kiterjed, caudalis része pedig hosszan elnyúlik. Három al régióra osztják: dorsomedialis DR, ventromedialis DR és a kétoldali lateralis szárnyak. Ventralisan a két fasciculus longitudinalis medialis közé benyúlik, amelyet némely forrás interfascicularis DR-ként említ, és ez tulajdonképpen kontinuumot képez a MR-val. Egyesek a DR-ban a sejtsűrűség alapján további al régiókat is megkülönböztetnek.
- b) *nucleus raphe medianus* (MR), amelyhez a B8 és a B5 sejtcsoport tartozik. A MR elnevezés helyett bizonyos források *nucleus raphe centralis superior*ot használnak. A

B5-öt pedig egyesek nucleus centralis inferiorként vagy nucleus raphe medianus pontinusként említik, mert a hídhhoz sorolják. A MR-t bizonytalan határvonallal két oldalról a szerotonintartalmú sejtektől mentes nucleus raphe paramedianus veszi körbe, amelyet a MR-val együtt egyre gyakrabban median raphe régió (MRR) elnevezéssel illetnek.

- c) *nucleus linearis caudalis*, amelybe a B8 legrostralisabb, kisszámú szerotoninerg sejtjei tartoznak, ebben a struktúrában már jelentősebb számban előfordulnak dopaminerg sejtjek is. A ventralis tegmentalis area részének tartják. A MR-tól a két pedunculus cerebelli superior kereszteződése választja el, a DR sejtjeihez is rokonítják.

A B9 neuronjai – amely a DR-t követően a második legnagyobb szerotoninerg populáció – nem a raphe magokban foglalnak helyet, hanem a lemniscus medialis rostjai között, illetve a középvonaltól távolabb, a ventrolateralis tegmentumban szétszórva, rostrocaudalisán hosszan elnyúlva – a középagyban és a hídban – terülnek el. Főemlősökben a B9-hez tartozó sejtek egyik része alkotja a nucleus supralemniscalist, ilyen struktúrát a rágcsálókban nem különítenek el.

A makroszkópos neuroanatómia alapján a hídhhoz tartozó raphe magok – mint ahogyan azt a fentiekben is bemutattam – lényegében a középagyi raphe magok caudalis folytatásai. A többi szerotoninerg sejtcsoport a nyúltvelőben helyezkedik el: a B3 sejtjeit a nucleus raphe magnusban (RMg), a B2 sejtjeit a nucleus raphe obscurusban (ROb), a B1 sejtjeit pedig a nucleus raphe pallidusban (RPa) találjuk. A RMg nehezen elkülöníthető a ROb, illetve a RPa rostralis részétől. A B4 sejtcsoportot a legtöbb forrás külön magba nem sorolja, hanem egyszerűen a periaquaeductalis szürkeállomány részének tartják. Mások viszont nucleus raphe supragenualis néven megkülönböztetik az ezeket a sejteket magába foglaló struktúrát (Paxinos és Watson 2005, Harding és mtsai 2004, Hioki és mtsai 2010, Crawford és mtsai 2010, Alonso és mtsai 2013, Hornung 2003, Vasudeva és mtsai 2011, Jacobs és Azmitia 1992).



1.2.1. ábra. Az agytörzs raphe magjainak felépítése. **A)** Az embrionális agy parasagittalis metszetén az egyes rhombomérákat (R1–R6P) különböző színek jelölik. Ezekből a rhombomérákból differenciálódó szerotonerg sejtek a felnőtt agytörzs raphe magjainak különböző részeibe vándorolnak. B1–B9 jelöli a szerotonerg sejtek Dahlström és Fuxe szerinti csoportjait. **B)** A felnőtt agy coronalis metszetein (a bal oldali rostralisabttól jobb felé egyre caudalisabb síkban) a különböző rhomboméraeredetű szerotonerg sejtcsoportok lokalizációja. A nucleus raphe medianust (B5 és B8 sejtcsoport) heterogén, három rhombomérából származó szerotonerg sejtek építik fel. (Okaty és mtsai 2015 alapján, módosítva).

Eredet nyomonkövetésén alapuló csoportosítás

Az 5-HT-termelő sejtek szerveződésének megértését nagyban segítette, hogy felfedezték a Pet-1 transzkripciós faktort, mely kizárólag a szerotonerg neuronokban, valamint azok prekursoraiban aktiválódik (Hendricks és mtsai 1999). Ez lehetővé tette, hogy genetikai megközelítéssel is megbízhatóan tanulmányozzák a raphe magok sejtösszetételét, azok kapcsolatait. Susan Dymecki munkacsoportja a kiválasztott sejtípusok eredetének nyomonkövetésére is használható, a Cre-loxP és az Flp-FRT rekombinááz-rendszerek ötvözésén alapuló technikát vezetett be (Awatramani és mtsai 2003), mellyel elkezdtek feltérképezni az egerek szerotonerg rendszerét (Jensen és mtsai 2008). Módszerük lényege, hogy csak azok a sejtek termelik a fluoreszcens fehérjét (például eGFP-t), amelyekben mind a Cre, mind az Flp rekombináázok kifejthették aktivitásukat. Az Flp expresszióját a Pet-1 transzkripciós faktorhoz, a Cre-t pedig rhomboméraspecifikus transzkripciós faktorokhoz kötötték, ezzel ki tudták

mutatni, hogy az 5-HT-termelő sejtek melyik halmaza fejlődik ki az egyes rhombomérákból, és azok később hogyan csoportosulnak.

Az első, legrostralisabb rhombomérából (R1) származnak a B4, B6 és B7 sejtcsoportok – azaz tulajdonképpen a DR –, továbbá a B5, B8 – vagyis a MR – és a B9 legdorsalisabb sejtjei. A második rhomboméra (R2) adja ugyanezeknek (tehát a B5, B8 és B9-nek) az előbbieknél mélyebben elhelyezkedő sejtjeit, a harmadik rhomboméra (R3) pedig szintén ugyanezeknek a legventralisabb sejtjeit. A negyedik szegmensből nem alakul ki szerotoninerg sejt. A RMg nagyrészt az ötödik rhombomérából (R5) származik, de benne elszórtan a hatodik vagy annál caudalisabb szelvények (R6P) sejtjei is előfordulhatnak. A RPa rostralis végében szintén keverten találhatóak az R5 és R6P-eredetű sejtek. A RPa hosszan elnyúló caudalis végét azonban, valamint a ROb-t teljes egészében a R6P szelvények építik fel, és ugyanígy a középvonaltól távolabb, ventralisan elhelyezkedő nucleus paragigantocellularis lateralis (LPGC) szerotoninerg sejtjeit is. A raphe magok eredet szerinti csoportosítása tehát némileg eltér a hagyományos osztályozástól. A leglényegesebb különbséget a MR esetében látjuk, amely sejtjei három rhombomérából differenciálódnak (lásd 1.2.1. ábra).

Mivel a különböző szelvényekből fejlődő neuronok között jelentős génexpressziós különbségeket találtak, ezek között a funkcionális eltérések is jelentősek, példaképpen a R2-eredetű sejtekre depolarizáltabb nyugalmi membránpotenciál jellemző, mint a MR más rhombomérából odavándorló sejtjeire. Továbbá, az egy rhombomérából differenciálódó sejtek esetében is találtak expressziós különbségeket egyes kulcsfontosságú – például metabotrop és ionotrop receptorokat, egyéb ioncsatornákat és a szinaptikus jelátvitelben részt vevő proteinek kódoló – gének aktivitásában. Az R1 azon sejtjei, amelyek a DR-t alakítják ki, élesen elkülönülnek a ventralisabb pozícióba, a MR-ba vándorló társaiktól. Többek között a VGluT3 génjének transzkripció fokában van különbség köztük: a MR-ba vándorló sejtek erőteljesen termelik, a DR-ba jutó sejtek viszont kisebb mennyiségben. A R2-ből származó sejtekre – csoportszinten – jónéhány gén nagyon variábilis expressziója jellemző. Ezek közé a gének közé tartozik

a VGluT3 génje is, amely szerint viszont két alcsoportra tudták osztani a R2-eredetű sejteket. A VGluT3-at nagymértékben termelő sejtekre a szerotoninerg fenotípus markereinek alacsonyszintű expressziója jellemző, és a másik alcsoportban a szerotonin szintézisét végző triptofán-hidroxiláz (TpH2) génjének magas aktivitása pedig alacsony VGluT3-expresszióval társult. Ezzel ellentétben, az R1-ből származó sejtek esetében a VGluT3 és a TpH2 expressziós szintje pozitívan korrelált egymással (Okaty és mtsai 2015). A MR-t tehát erősen heterogén sejtek építik fel, ám a DR sejtjeit is nagyfokú funkcionális különbségek jellemezhetik, hiszen G-fehérje-kapcsolt receptoraik, neuropeptideik expressziós mintázata, ingerlékenységük lényeges variabilitást mutat (Spaethling és mtsai 2014, Fu és mtsai 2010, Crawford és mtsai 2010, Andrade és Haj-Dahmane 2013).

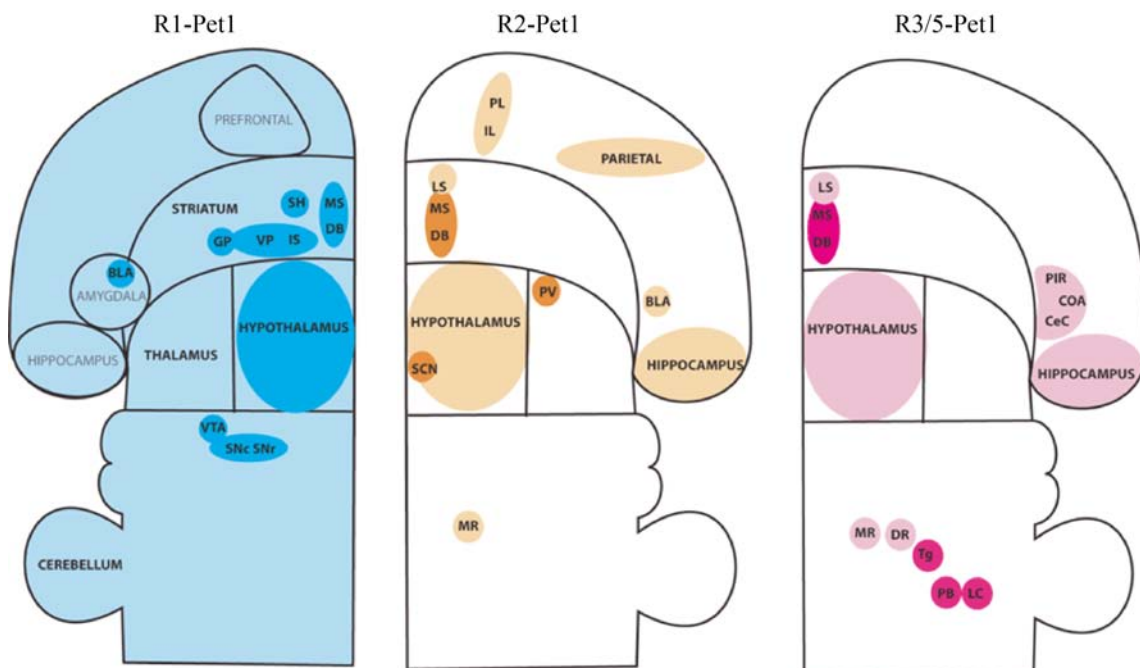
A különböző rhombomérákból differenciálódó sejtekből felépülő raphe magok között azok projekciós preferenciája is különbséget képez. A negyedik rhombomérától rostralisabb szelvényekből fejlődő magok – úgymint a DR, MR és a B9-hez tartozó sejtek – felszálló pályákat adnak, azaz a középagy és az előagy területeit innerválják. A negyedik rhombomérától caudalisabb szelvényekből fejlődő magok pedig a gerincvelőbe küldik leszálló nyúlványaikat. A raphe magok azonban rostralis vagy caudalis elhelyezkedésüktől függetlenül innerválhatják egymást és más agytörzsi struktúrákat is. A kisagyba pedig mindkét magcsoport küld nyúlványokat (Jacobs és Azmitia 1992, Harding és mtsai 2004, Wylie és mtsai 2010).

Láthatjuk, hogy a raphe-magok – különösképpen a MR – szerotoninerg sejtjei különböző eredetűek, és lényeges funkcionális eltéréseket hordozhatnak. Mivel a doktori munkám céljának megértéséhez az előagyi területeket beidegző raphe magok jellemzése szükséges, a következő fejezetben a MR és a DR kapcsolatainak bemutatására összpontosítok. A MR és a DR közti különbségek megértéséhez ugyanis a szerotoninerg sejtjeik eredete mellett szükséges áttekinteni azok kapcsolatrendszerét is. A caudalis raphe magokat a dolgozatom további fejezeteiben nem tárgyalom.

1.3. A nucleus raphe medianus és dorsalis kapcsolatai

A nucleus raphe medianus és dorsalis efferensei

A szerotoninkimutatás módszereinek fejlődése nyomán felfigyeltek az agykéregbe vetítő szerotoninerg rostok heterogenitására (Köhler és mtsai 1981, Lidov és mtsai 1980), illetve a MR és a DR különböző projekciós preferenciájára (Jacobs és mtsai 1974, Bobillier és mtsai 1975, Imai és mtsai 1986). Majd igazolták, hogy a MR-ból eredő rostok hosszú egyenes szakaszain ritkán, néhány száz mikrométerenként, illetve a legutolsó, dúsan elágazó szakaszán pedig sűrűn ülnek a nagy, gömbszerű varikozitások. Ezzel szemben a DR-ból eredő vékony rostokon vagy nagyon apró, ám sűrűn elhelyezkedő varikozitásokat vagy ritkábban előforduló orsószerűen épphogy megvastagodó varikozitásokat találtak. Már ekkor kimutatták, hogy a rostok morfológiai különbségei mellett eltérés van azok célterületeiben (Kosofsky és Molliver 1987), továbbá, nem utolsó sorban azt is, hogy e projekciók számottevő részéből hiányozhat a szerotonin (Köhler és Steinbusch 1982, O'Hearn és Molliver 1984,



1.3.1. ábra. A rostralis rhombomérákból fejlődő raphe magok efferenseinek célterületei a központi idegrendszer sémás ábrázolásán. A különböző rhombomérákból fejlődő projekciók preferenciális célterületeit eltérő színek jelölik. A sötétebb színek erőteljesebb rosthálózat jelenlétét mutatják. A PV rövidítés ezen az ábrán a thalamus paraventricularis magját jelöli. (Bang és mtsai 2012 alapján, módosítva).

Datiche és mtsai 1995). Majd demonstrálták, hogy a MR-ból eredő nagy varikozításokkal borított rostok kevésbé érzékenyek a szerotonin szintézisútjainak keresztül károsító neurotoxinokra, azaz vélhetően nem folyik bennük szerotoninszintézis sem. A DR-ból induló rostok pedig a várakozásoknak megfelelően károsodtak a szerotoninerg neurotoxinok adása után (Mamounas és Molliver 1988, Mamounas és mtsai 1991).

A rhomboméraspecifikus és a szerotoninspecifikus rekombinázt-rendszerek ötvözése nagy előrelépést hozott a raphe magok projekcióinak feltérképezésében is – csakúgy, mint ahogyan azt a magok szerveződésénél, felépítésénél az előző fejezetben bemutattam. E kombinatorikus genetikai módszer segítségével el tudták különíteni az R1-eredetű – tehát javarészt a DR-ba vándorló –, valamint a R2- és a R3-eredetű – tehát a MR nagyobb részét kitevő – szerotoninerg sejtek efferenseinek célterületeit (Bang és mtsai 2012, 1.3.31. ábra). Az alábbiakban ez eredmények alapján tárgyalom a raphe magok projekciós preferenciáját.

Az R1-eredetű raphe-rostok erőteljesen innerválják a neocortex felszínes rétegeit, a striatumot, a bazális előagy magcsoportjait, köztük a nucleus septalis medialis, a hypothalamust, a basolateralis amygdalát, a ventralis tegmentalis areát, valamint a substantia nigrát. A hippocampusban is megtaláljuk az R1-ből származó sejtek rostjait, melyek között előfordulnak nagyobb, illetve apró varikozításokkal borítottak is. Előbbiek lehetnek a MR-ba vándorló sejtek axonjai, utóbbiak pedig a DR-t alkotó sejtek projekciói. Nagy varikozításokat figyelhetünk meg a gyrus dentatus szemcsesejtrétegének bázisát elérő rostokon, a CA3 area stratum radiatumában, valamint a CA1 area stratum lacunosum-molecularejában és stratum radiatumában futó rostokon. Ez utóbbi rétegben kisebb varikozitású rostok is vannak, ahogyan a gyrus dentatus stratum molecularejában is. Egy másik, ám a hippocampusszal szoros funkcionális kapcsolatban álló (Knierim és mtsai 2006 Hippocampus) agyterületen, a lateralis entorhinalis kéregben szintén találtak R1-ből fejlődő nagy varikozításokkal borított rostokat. Az R1-eredetű rostok erőteljes beidegzést adnak a MR

szerotonin-tartalmú sejtjeinek is, valamint a caudalis raphe-magokhoz tartozó RMg és ROb-ba is vetítenek. A felsoroltakon kívül kisebb denzitással R1-eredetű szerotoninerg idegnyúlványok szerte az agyban kimutathatók.

A R2-eredetű raphe-sejtek axonjai jóval behatároltabb célterületeket preferálnak, mint az R1 sejtjeinek projekciói. Sűrű rostfelhőt képeznek a medialis prefrontalis kéregben, a parietalis kéregben, a perirhinalis kéregben, a hippocampusban, a nucleus septalis medialisban, a Broca-féle diagonális kötegben, a nucleus suprachiasmaticusban és a thalamus nucleus paraventricularisában. Gyengébb rostjelölés látható a basolateralis amygdalában és a hypothalamusban. Egyöntetűen nagy varikozitásokkal borított rostok, és corticalis rétegspecificitásukban is elkülönülnek az R1-eredetű axonoktól. A neocortexben ugyanis a mélyebb, III–VI. rétegekre jellemzőek. A hippocampusban keveredhetnek az R1-ből fejlődő nyúlványokkal, hiszen a gyrus dentatus szemcsesejtrétegének bázisában, esetleg a hilusban, továbbá a CA1 areában a stratum lacunosum-moleculare és radiatum határán és a CA3 area stratum radiatumában futnak ezek a rostok is. A R2-eredetű neuronokra jellemző, hogy a MR-n belül gazdag kollaterális hálózatot adnak, ugyanakkor más raphe magokat nem innerválnak.

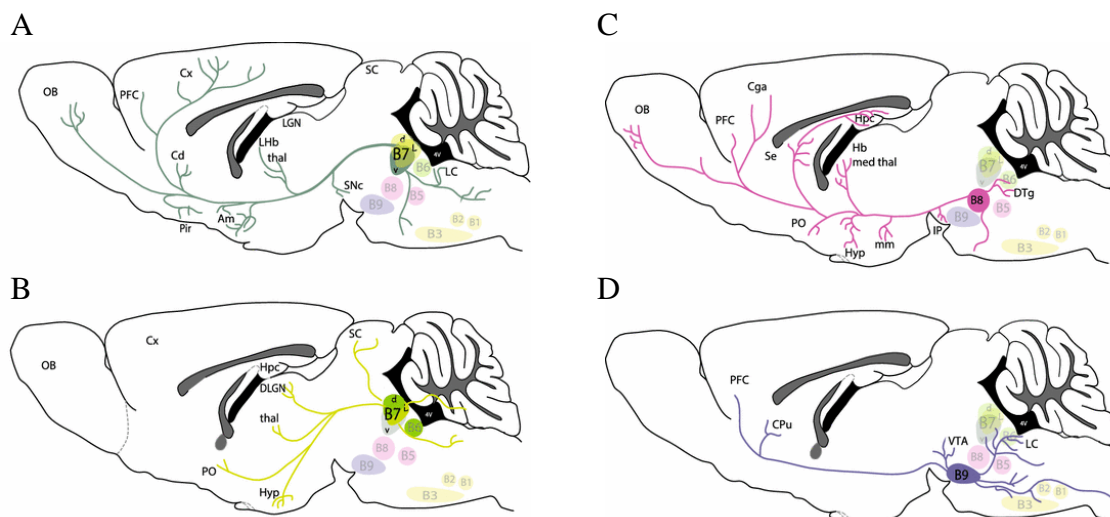
A R3-ból differenciálódó raphe sejtek nyúlványai szintén szűk projekciós preferenciát mutatnak. A R2-eredetű sejtekhez hasonlóan ezek is innerválják a limbikus rendszer fő területeit. A hippocampusban a nyúlványaik ugyanazokba a rétegekbe érkeznek, mint az R1- és R2-eredetű rostok is. A nucleus septalis medialis és a Broca-féle diagonális köteget, és egyes agytörzsi struktúrákat, mint a Gudden-féle tegmentális magokat, a locus coeruleust vagy a nucleus parabrachialis is dús rosthálózattal innerválják. Ezeken kívül rostjaik megtalálhatóak a MR-n belül és a DR-ban is, valamint beidegzik a nyúltvelő egyes szerotoninerg sejtjeit is. Vetítenek még a cortex piriformisba, viszont csak elvétve találták meg rostjaikat a frontalis vagy parietalis kéregben (Bang és mtsai 2012).

A fentiekből látható, hogy a MR jóval behatároltabb célterületre projektál, mint a DR. Ráadásul felvetődött az is, hogy a MR vetítő sejtjeinek jelentős részében nem termelődik szerotonin (Mamounas és Molliver 1988), ami alapján jogos a kérdés, hogy az efferenseknek a szerotoninerg sejtekre jellemzőnek tartott, Pet-1 transzkripció faktor aktivitásán alapuló feltérképezése egyáltalán miért rajzolja ki az amúgy minimálisan szerotoninerg fenotípust mutató MR projekcióit. Egyrészt a Pet-1 segítségével megjöhethetők bizonyos, a szerotoninerg fenotípus markereit minimálisan termelő, ám VGluT3-at erősen expresszáló sejtek (Okaty és mtsai 2015). Továbbá, nemrég bizonyították, hogy a MR azon neuronjainak, amelyekben a Pet-1 működését fokozó régió, az ePet aktív, mindössze fele tartalmaz szerotonint, és ezek többsége expresszál VGluT3-at is. Másik, jelentős hányaduk szerotonint nem, de VGluT3-at termel (Sós és mtsai 2017). Másrészt viszont Pet-1-génkiütött állatokban is maradt szerotoninerg populáció, holott korábban a Pet-1-et a szerotoninerg fenotípus kialakulásához nélkülözhetetlennek tartották. Külön kiemelném, hogy Pet-1 hiányában a VGluT3-expresszáló sejtek hasonló mértékben fordultak elő a raphe területén, mint a kontroll állatcsoportban, és ezeknek csupán egy része tartalmazott szerotonint is (Hendricks és mtsai 1999, Hendricks és mtsai 2003, Kiyasova és mtsai 2011). Ennek fényében a Pet-1 nem megbízható markere sem a szerotoninerg, sem a VGluT3-termelő raphe sejteknek. Érdekes, hogy a Pet-1-génkiütött állatban megmaradt szerotoninerg populációnak nagyon szűk projekciós preferenciája van: az amygdala basolaterális magcsoportja, a hypothalamus paraventricularis magja, illetve a thalamus intralaminaris magcsoportja a célterületeik (Kiyasova és mtsai 2011).

A MR, illetve a DR projekcióiban jelen lévő VGluT3-ról jelenleg annyit állíthatunk, hogy a hippocampust, a nucleus septalis medialis és a medialis prefrontalis kérget innerváló rostok többségében jelen van a VGluT3 (Jackson és mtsai 2009, Amilhon és mtsai 2010, Szőnyi és mtsai 2016). Találtak a ventralis tegmentalis areába, substantia nigrába és a hypothalamus egyes magcsoportjaiba (például a preoptikus areába és a paraventricularis magba) vetítő VGluT3-termelő raphe sejteket is (Hioki és mtsai 2010).

A Pet-1 körüli bizonytalanságok miatt a szerotoninergerg sejtekre jóval specifikusabb Sert-Cre egértörzsben (Zhuang és mtsai 2005) újatérképezték azok efferenseit, a projekciós preferenciákat az raphe magok alrégióinak szintjére bontották. A DR B7 sejtcsoportja esetében élesen elkülönül a ventralis alrégió – amely az obritalis, piriform és agranuláris kéregbe, az amygdala centralis magjába, a substantia nigrába, a locus coeruleusba vetít, és elkerüli a hippocampust –, a dorsalis alrégiótól – amely a lateralis thalamust és szintén a piriform kérget preferálja. A DR lateralis szárnyai hasonlóan a dorsalis alrégióhoz, a lateralis thalamust innerválják. A DR B6 sejtcsoportja a nucleus septalis lateralist, a hippocampust, a subiculumot és a hypothalamus egyes területeit, mint például a preoptikus areát innerválja.

A MR szerotoninergerg sejtjeinek projekciós célterületei elkülönülnek a DR-étől. A B8 sejtcsoport erőteljesen projektál a hippocampusba, a subiculumba, a nucleus septalis medialisba, továbbá a cingularis kéregbe, motoros kéregbe, a hypothalamus paraventricularis magjába, a nucleus interpeduncularisba, a habenula medialisba és a Gudden-féle tegmentalis magokba. A B5 sejtcsoport ehhez nagyon hasonló efferenciációs profilt mutat, esetében az előbbieken kívül még a nucleus parabrachialis és a hypothalamus további magcsoportjainak (például nucleus arcuatus, nucleus mamillaris)



1.3.2. ábra. A nucleus raphe dorsalis B7 sejtcsoportjának ventralis alrégiójában (A), dorsalis alrégiójában (B), a nucleus raphe medianus B8 sejtcsoportjában (C), valamint a B9 sejtcsoportban (D) elhelyezkedő szerotoninergerg neuronok jellegzetes efferenciációja az agy parasagittalis metszetein ábrázolva. (Muzerelle és mtsai 2016 alapján, módosítva).

innervációját kell megemlíteni. A B9 sejtseltek többek között a nucleus caudatus-putamen komplexumot, illetve például a locus coeruleust és a raphe magokat idegzik be (Muzerelle és mtsai 2016, 1.3.2. ábra).

A Pet-1-en és a Sert-en alapuló efferenciációs feltérképezések közötti különbségek (például az amygdala basolateralis magcsoportjának beidegzése) felfedhetik azoknak a raphe sejtselteknek a pályáit, amelyek ugyan Pet-1-et termelnek, de nem szerotoninergék és a fentiek alapján vélhetően VGluT3-expresszálóak. Hangsúlyozom, hogy az előzőekben tárgyalt bizonytalanságok miatt Pet-1- és Sert-független VGluT3-termelő populáció is lehet a raphe magokban, amelyeknek pályáit még nem ismerjük. A VGluT3-expresszáló sejtseltek efferenseiről alkotott képhez hozzátartozik, hogy lokális vagy távoli terminálisai nem mindegyikében jelenik meg a VGluT3 (Amilhon és mtsai 2010, Gagnon és Parent 2014).

A MR-ban és a DR-ban a szerotoninerg neuronok és az ezekkel részben átfedő VGluT3-expresszáló sejtseltek mellett jelentős számban γ -aminovajsav(GABA)-ürítő neuronok is találhatóak, amelyek innerválják és szabályozzák a lokális szerotoninerg sejtselteket (Descarries és mtsai 1982, Stamp és Semba 1995, Forchetti és Meek 1981, Tao és mtsai 1996, Varga és mtsai 2001, Wang és mtsai 1992, Gervasoni és mtsai 2000, Varga és mtsai 2001, Varga és mtsai 2003, Varga és mtsai 2002, Li és mtsai 2005). A GABAerg populáció elkülönül mind a szerotoninerg, mind a VGluT3-expresszáló neuronoktól, továbbá, a feltételezhetően dopaminerg sejtseltek egy újabb, a többivel nem átfedő kisebb populációt alkotnak (Hioki és mtsai 2010, Stamp és Semba 1995, Ochi és Shimizu 1978, Trulson és mtsai 1985, Matthews és mtsai 2016). A lokális innerváció mellett a DR GABAerg sejtselteinek egy része vetít a prefrontális kéregbe, nucleus accumbensbe és a laterális hypothalamusba, ez utóbbiban a DR-eredetű projekció nagyjából harmadát adják a GABAerg pályák (Bang és Commons 2012).

A nucleus raphe medianus és dorsalis afferensei

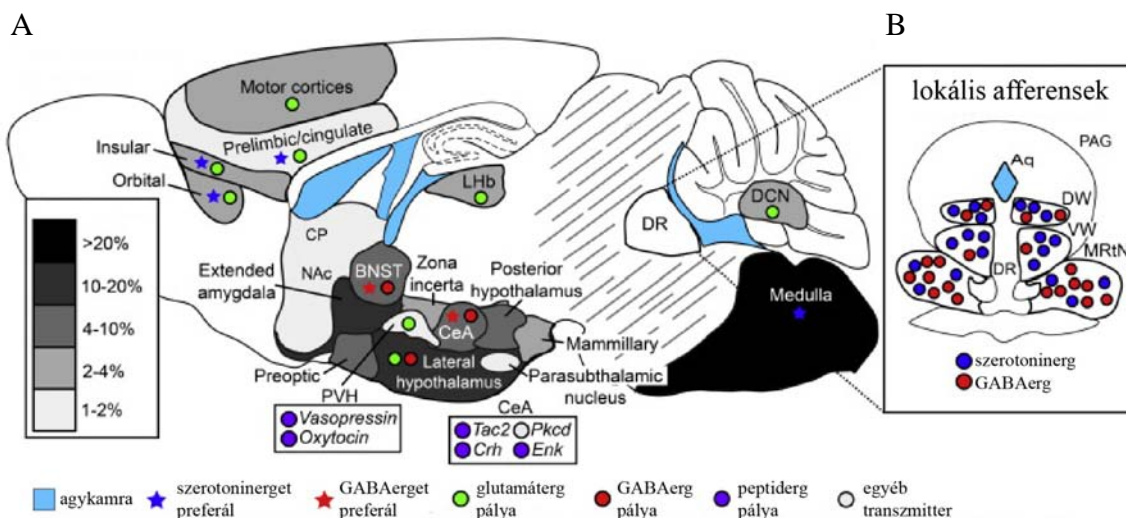
A klasszikus retrográd pályakövetési módszerekkel azonosították a raphe magok fő afferenseit. Ennek megfelelően a DR-t főleg a habenula lateralis, a prefrontalis kéreg (ennek a prelimbikus, az anterior cinguláris és az infralimbikus része emelendő ki), a thalamus paraventricularis és paratenialis magjai, a zona incerta és az amygdala centralis magja innerválja. Továbbá – egyebek mellett – a nucleus tuberomamillaris, a nucleus preopticus ventrolateralis, a nucleus interstitialis striae terminalis, a substantia innominata, a nucleus septalis lateralis, a ventralis tegmentalis area, a substantia nigra, az agytörzs periaquaeductalis szürkeállománya, a nucleus parabrachialis, a nucleus tegmentalis laterodorsalis, valamint a MR és a RMg adnak jelentősebb afferentációt.

A MR szintén jelentős beidegzést kap a medialis prefrontalis kéreg prelimbikus és anterior cinguláris részéből, a habenula lateralisból, a nucleus septalis lateralisból, a nucleus preopticus ventrolateralisból, a ventralis tegmentalis areából, a nucleus tegmentalis laterodorsalisból és az agytörzs periaquaeductalis szürkeállományából. Ezeken kívül a nucleus septalis medialis, a ventralis pallidum, a nucleus supramamillaris, a nucleus interpeduncularis, a locus coeruleus, valamint a többi szerotoninerget tartalmazó sejtcsoport adnak jelentős bemenetet a MR-ba (Aghajanian és Wang 1977, Marcinkiewicz és mtsai 1989, Gervasoni és mtsai 2000, Peyron és mtsai 1998, Vertes és Linley 2008, Soiza-Reilly és Commons 2011). A nocicepcióhoz tartozó idegpályákba is bekapcsolódhatnak a rostralis raphe magok, elsősorban az agytörzs periaquaeductalis szürkeállományán keresztül, illetve a DR esetében a RMg közvetítésével. A fájdalomra adott reakciók szervezésében fontos szerepet játszó, gerincvelőből felszálló tractus spinoreticularis kollaterálisokat ad a RMg-hoz, azonban a DR-t nem innerválja (Braz és mtsai 2009).

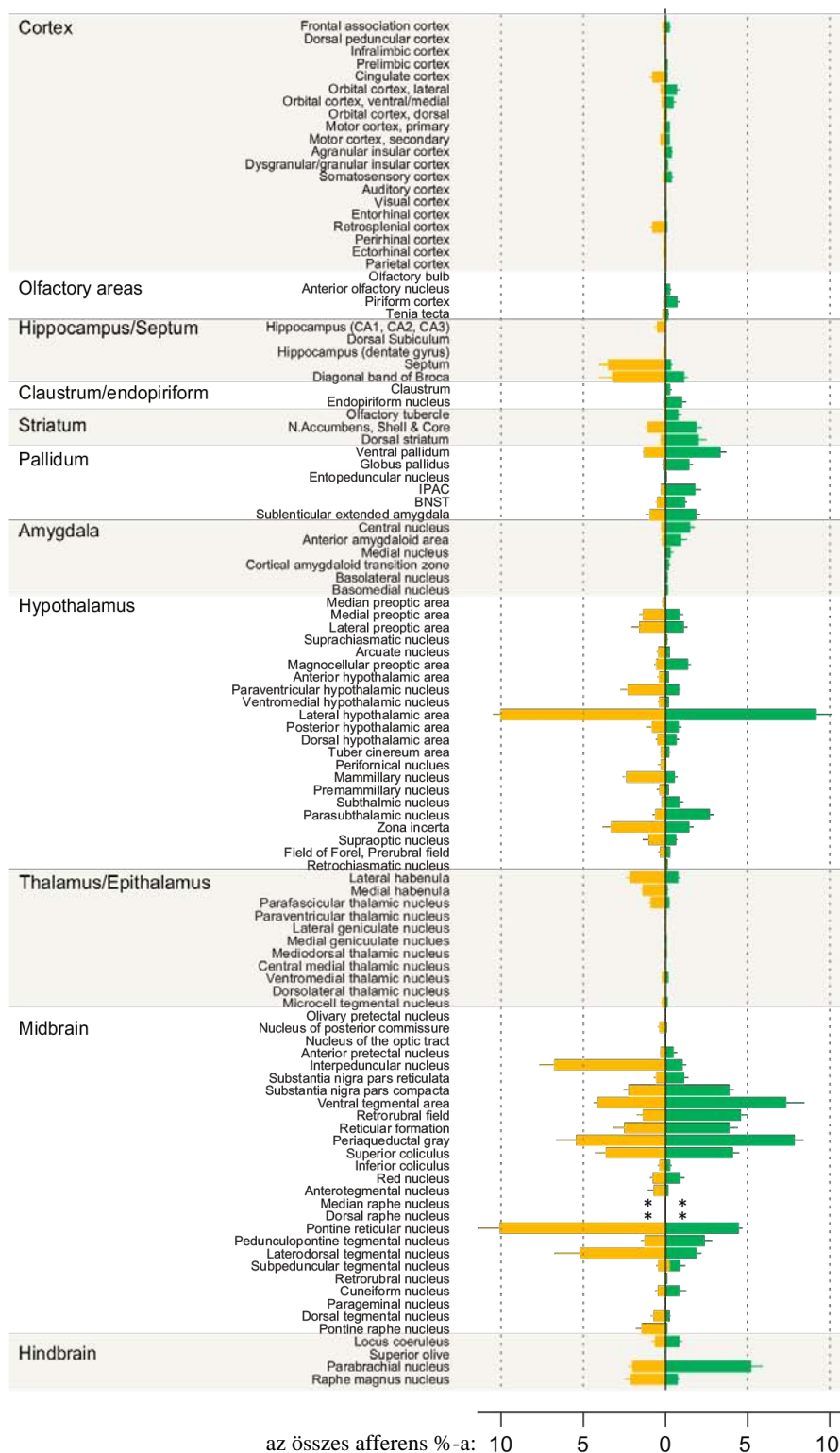
A hagyományos pályajelölések nem tudták elkülöníteni a raphe magok szerotoninerget tartalmazó és nem-szerotoninerget tartalmazó neuronjainak afferentációját. Ebben nagy előrelépést hozott a kizárólagosan a kiválasztott sejtípusból, megbízhatóan retrográd irányban terjedő vírusok pályatérképezésre való felhasználása. Transzgénikus egerekben megjelölhetőek

azok a neuronok, amelyek innerválják a Cre rekombinázt termelő szerotoninerget, amennyiben módosított, pszeudotipizált és fluoreszcens marker génjét is hordozó rabies vírussal fertőzik meg azokat. A rabies felvételéhez és transzszinaptikus terjedéséhez két olyan fehérje is szükséges, amely az emlősök szervezetében nincs jelen, így ezeknek a génjeit is be kell juttatni a neuronokba. A szerotoninerget sejtekre és azok afferenseire szorító rabiesfertőzést azzal érik el, hogy az előbbi gének termelését a Cre rekombinázt jelenlétéhez kötik (Wall és mtsai 2010, Wickersham és mtsai 2007, Watabe-Uchida és mtsai 2012, Miyamichi és mtsai 2011).

Ezzel a módszerrel meghatározták, hogy az egyes agyterületek a DR szerotoninerget és GABAerget sejteket bemenetnek mekkora hányadát adják (Weissbourd és mtsai 2014). Eszerint a DR szerotoninerget és GABAerget neuronjai legtöbb bemenetüket egyaránt a hypothalamusból kapják, ezen belül pedig a lateralis hypothalamus, a preoptikus area, a nucleus hypothalamicus posterior, a zona incerta, a mamillaris magok, valamint a



1.3.3. ábra. A DR szerotoninerget és GABAerget sejteinek fő afferensei. **A)** az agy sematikus parasagittalis metszetén a sötétebb színek jelölik, hogy a DR afferenseinek hány százaléka érkezik az adott agyterületről (megfelelően a bal oldali szövegdoboz skálájának). Ezen felül az egyes agyterületekre rajzolt csillagok jelzik, ha az onnan induló rostok preferálják a DR szerotoninerget (kék csillag) vagy GABAerget sejteket (vörös csillag). Az egyes agyterületekre rajzolt körök pedig az ott lévő vetítő sejtek fő transzmitterét mutatják (zöld kör: glutamát, vörös kör: GABA, lila kör: peptid, üres kör: egyéb). **B)** A DR szerotoninerget sejteket innerváló lokális szerotoninerget (kék körök) és GABAerget sejtek (vörös körök) elhelyezkedése (Weissbourd és mtsai 2014 alapján, módosítva).



1.3.4. ábra. A MR és DR szerotoninerg sejtjeinek afferentációja. A vízszintes oszlopdiaagramok az adott sorban megadott agyterületről érkező afferensek százalékos arányát mutatják (állatok közti átlag és annak standard hibája) a MR (sárga), illetve a DR (zöld) szerotoninerg sejtjeinek esetében. *: A MR és DR egymástól kapott afferenseit nem vizsgálták (Ogawa és mtsai 2014 alapján, módosítva).

nucleus parasubthalamicus járul hozzá jelentősebb mértékben az innervációhoz. A GABAerg sejteket jóval több rost éri el az amygdala területéről – főként annak centralis magcsoportjából és a nucleus interstitialis striae terminalisból –, mint szerotoninergerg társaikat, habár az amygdala ez utóbbiak számára is jelentős bemenetet ad. Lényeges különbséget találtak a kérgi területekről érkező afferensekben, amelyek a szerotoninergerg sejteket preferálják. Igaz ez az insularis kéregből, motoros kéregből, orbitalis kéregből, prelimbikus kéregből és az anterior cinguláris kéregből érkező afferensekre is. Mindenképpen ki kell még emelni a habenula lateralist, amely hozzávetőleg egyenlő arányban éri el a szerotoninergerg és a GABAerg sejteket. Megemlíthető továbbá a kisagy mély magjaiból érkező afferentáció is, amely szintén nem tesz szignifikáns különbséget a két célsejt típus között. Mind a szerotoninergerg, mind a GABAerg neuronokat jelentős mértékben innerválják más agytörzsi sejtcsoportok, valamint egymást is beidegzik. A DR-n belül különböznek az egyes alrégiók tekintetében, hogy annak szerotoninergerg vagy GABAerg sejtjeinek afferensei jellemzően melyik alrégióból érkeznek (1.3.3. ábra).

További tanulmányokban – szintén rabies vírus segítségével – összehasonlították a DR és a MR szerotoninergerg sejtjeinek afferenseit (Ogawa és mtsai 2014, Pollak Dorocic és mtsai 2014). A MR – ellentétben a DR-val – jelentős beidegzést kap a nucleus septalis medialisból, illetve a Broca-féle diagonális kötegből. A hypothalamus némely régiójából, mint például a nucleus paraventricularisból, a nucleus supramamillarisból és a zona incertából szintén több afferens rostot kap, mint a DR. Ugyanakkor az amygdalából, a nucleus interstitialis striae terminalisból, a striatumból és a bazális előagyból – amelyek a DR jelentős afferentációját adják – alig érik nyúlványok a MR-t. További eltérés a két raphe mag között, hogy a MR-t jelentős számban érik el a habenula lateralis mellett a habenula medialis rostjai is. Az középagyi idegmagokból érkező kapcsolataik terén mutatkozó főbb különbségek: a MR számára jelentős bemenetet ad a nucleus interpeduncularis, a nucleus reticularis pontis és a nucleus tegmentalis laterodorsalis, a DR pedig a substantia nigrából és a ventralis tegmentalis areából kap erőteljesebb innervációt. Az agykéregből érkező afferensek tekintében is találunk különbséget. A cingularis kéreg és a retrosplenialis kéreg jóval nagyobb

arányban vetít a MR-ba, mint a DR-ba. Ez utóbbi pedig az insularis és orbitalis kéregből kap jelentősebb bemenetet (bővebben lásd az 1.3.4. ábrán). E feltérképezés ellenére még mindig hiányzik a bizonyíték arra vonatkozóan, hogy egy adott agyterületről egyforma vagy eltérő típusú sejtek vetítenek az egyes raphe-magokba, amely a fent bemutatott – elsősorban kvantitatív és nem kvalitatív – afferentációs eltéréseket tágabb kontextusba engednék helyezni. Mindenesetre a jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján is levonhatjuk a következtetést, hogy a DR-t és a MR-t eltérő funkcionalitású agyi központok befolyásolják, és e raphe-magok is különböző régiókat innerválnak.

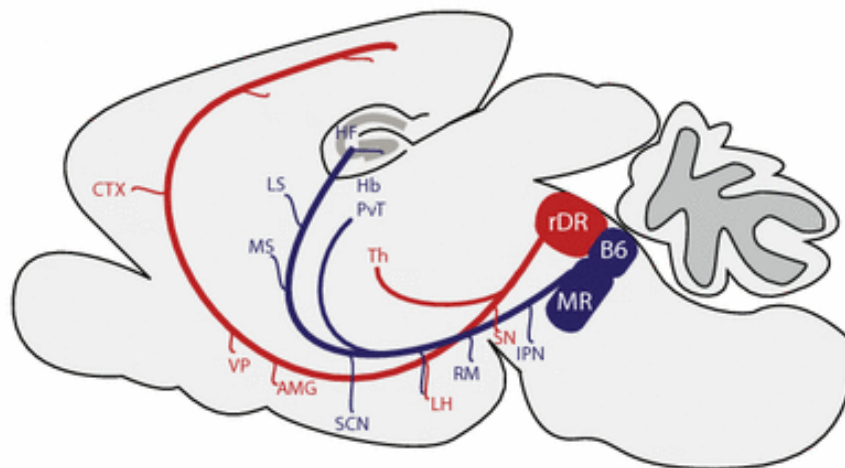
Funkcionális különbségek a nucleus raphe medianus és dorsalis között – az eltérő kapcsolatok fényében

A MR és a DR eltérő kapcsolatainak következménye az eltérő funkcionális szerepük. A DR szerotoninerg sejtjeinek aktivitását a fájdalmas ingerekkel, büntetéssel, negatív visszacsatolós tanulással, az impulzív viselkedés gátlásával hozzák összefüggésbe (Soubrié 1986, Stein és mtsai 1993, Dayan és Huys 2008, Boureau és Dayan 2011, den Ouden és mtsai 2013, Schweimer és Ungless 2010, Crockett és mtsai 2009, Dalley és Roiser 2012, Dugué és mtsai 2014). Mások a jutalomra hosszan kitartó, türelmes várakozást kapcsolják a DR szerotoninerg sejtjeinek emelkedett aktivitásához (Miyazaki és mtsai 2011, Miyazaki és mtsai 2012a, Miyazaki és mtsai 2012b, Miyazaki és mtsai 2014). Mind a várható büntetés elkerülése, mind a türelmes jutalomvárás a pillanatnyi és egy jövőbeni helyzet közötti ellentmondást igyekszik áthidalni, ami a DR szerotoninerg rendszerének feladata lehet (Cohen és mtsai 2015, Fonseca és mtsai 2015). Olyan helyzetben, amikor a kísérleti állatnak az egyébként jutalomhoz asszociált ingerre a megváltozott környezeti tényezők miatt nem volt szabad a jutalomért nyúlnia, a DR szerotoninerg sejtjeinek erős tónusos aktivitását regisztrálták, és amikor a környezet megengedte a jutalom elfogadását, a szerotoninerg rendszer már csökkent aktivitást mutatott (Li és mtsai 2013). A szerotoninerg sejtek kisüléseit heterogén módon időzítik a szenzoros ingerek változatos paramétereit (Heym és mtsai 1982, Waterhouse 2004, Ranade és Mainen 2009, Nakamura és mtsai 2008), ugyanakkor egy ingerkapcsolt viselkedés szükségszerű gátlása a szerotoninerg neuronok erősebb,

egyöntetűbb aktiválódását eredményezi (Li és mtsai 2013). A DR szerotoninerg sejtjei tehát működésbe lépnek, hogy türelmes várakozást tartsanak fenn, és ez a tulajdonságuk összefügghet a döntések jövőbeni következményeinek szerotoninhiányt kísérő nehézkes belátásával (Seymour és mtsai 2012), a szerotoninhiányhoz szintén kapcsolódó kilátástalansággal, küzdelem feladásával és magával a depresszióval (Jacobsen és mtsai 2012, Nutt 2002, Bambico és mtsai 2009, Lira és mtsai 2003, Gos és mtsai 2008, Takase és mtsai 2004). Ezzel összhangban, a DR szerotoninerg neuronjainak aktiválása csökkenti a kilátástalanságot, antidepresszáns hatású (Warden és mtsai 2012, Teissier és mtsai 2015). Felvetették, hogy a DR sejtjeinek aktivitásfokozása segítené a térbeli pozícióhoz kapcsolt jutalmazási szabályok elsajátítását (Liu és mtsai 2014), azonban inkább a várakozást fokozó hatásukból következhet a helypreferencia látszólagos kialakulása (Correia és mtsai 2017). A fentiekből következik, hogy a DR szerotoninerg sejtjei aktivitásuk tónusát változtatva vezérlik a türelmes viselkedést (vagy egy cselekvés türelmes visszatartását), aminek alapja, hogy a környezeti ingerek számtalan aspektusához időzítik kisüléseiket (Ranade és Mainen 2009, Li és mtsai 2013, Cohen és mtsai 2015, Correia és mtsai 2017). Ez a változatos mértékű és időzítésű, a jövőbeni magatartástól is függő aktivitás lehet az oka a két kezdeti, egymással ellentétes vélekedésnek, miszerint az éberségi szintet követő aktivitású szerotoninerg rendszer facilitálja a motoros viselkedéseket (Jacobs és Fornal 1999, Fornal és mtsai 1996), illetve hogy visszafogja azokat (Soubrié 1986). A DR előbbiekben vázolt funkcióját támogatják egyebek mellett az amygdalával, az orbitalis kéreggel (Rygula és mtsai 2015, Li és mtsai 2014, Waraczynski 2016, Tanaka és mtsai 2004), a lateralis hypothalamusszal (Stuber és Wise 2016), a nucleus accumbensszel és a ventralis pallidummal (Castro és mtsai 2015, Richard és mtsai 2013) létesített efferens és afferens kapcsolatai.

A MR efferensei – eltérően a DR-tól – a limbikus rendszert vagy az azzal szoros funkcionális kapcsolatban álló agyterületeket szabályozzák, ennél fogva a tájékozódásban, eseménymemóriában kitüntetett jelentőségű hippocampus (Kirk és Mackay 2003, Morris 2007, Eichenbaum 2000) neuronhálózatát modulálják. A MR és a

DR tehát két, egymástól funkcionálisan különböző projekciós rendszert képez (Commons 2016, 1.3.5. ábra). A hippocampus beidegzése mellett a MR erős kapcsolatban áll annak kulcsfontosságú szubkortikális regulátoraival, mint a nucleus septalis medialis (Buzsáki 2002, Hangya és mtsai 2009, Vandecasteele és mtsai 2014, Fuhrmann és mtsai 2015, Crooks és mtsai 2012), a nucleus supramamillarisszal (Pan és McNaughton 2004) és a Gudden-féle tegmentális magokkal (Vann 2013, Kocsis és mtsai 2001, Vann 2009). Ezek mellett a limbikus rendszer átkapcsolójaként is felfogható habenula medialis, illetve a szorongásos, averzív reakciók szervezésében szerepet játszó habenula lateralis (Herkenham és Nauta 1979, Hikosaka 2010, Matsumoto és Hikosaka 2009) közvetlenül vagy a nucleus interpeduncularison keresztül is befolyásolhatja a MR hippocampust szabályozó neuromodulációját (Hsu és mtsai 2013, Jhou és mtsai 2009, Valjakka és mtsai 1998, Aizawa és mtsai 2013, Goutagny és mtsai 2013, Segó és mtsai 2014, Quina és mtsai 2015). E funkcionális kapcsolatból adódóan a hippocampusfüggő memóriakonzolidációba beavatkozni képes MR (Wang és mtsai 2015) az averzív memóriatartalmak rögzülését befolyásolhatja, akár



1.3.5. ábra. A MR és a DR kapcsolatai különböző funkcionális egységet képeznek (Commons 2016 alapján, módosítva).

szorongásos viselkedés kialakulásához is hozzájárulhat (Amo és mtsai 2014, Ohmura és mtsai 2014, Teissier és mtsai 2015). A MR kapcsolataival nagy hasonlóságot mutat a DR caudalis régiója, a B6 sejtcsoport, mely szintén a limbikus rendszert célzó projekciós preferenciával rendelkezik (1.3.5. ábra). A hippocampust elérő, korábban

DR-eredetűnek hitt vékony, apró vagy alig megvastagodó orsószerű varikozitásokkal borított rostok azonban az újabb eredmények fényében nem feleltethetőek meg egyértelműen a B6 efferenseinek, mert a MR projekciós rostjai között találtak vékonyakat, valamint nagy varikozitásokkal borítottakat is (Muzerelle és mtsai 2016). A raphe rostok morfológiája feltételezhetően inkább az innervált agyterület lokális igényeinek függvényében változik (Amilhon és mtsai 2010, Gagnon és Parent 2014).

A raphe-magok közül tehát a MR képes a hippocampus információfeldolgozásába beavatkozni, ez ráadásul feltételezi, igényelheti a jelátvitel megbízható időzítését is. Tudjuk, hogy a hippocampust és a nucleus septalis medialis elérése raphe-rostokban a VGluT3 jelenléte jelentős (Szőnyi és mtsai 2016, Jackson és mtsai 2009, Amilhon és mtsai 2010, Hioki és mtsai 2010), a MR-n belül pedig a VGluT3-termelő sejtek expressziós profilukban elkülönülnek a szerotoninerg sejtektől, ami funkcionális különbséget is okoz (Okaty és mtsai 2015, Teissier és mtsai 2015). Ebből kifolyólag adódik a lehetőség, hogy a MR-nak a hippocampus hálózatára kifejtett hatásában a VGluT3 közvetítésével potenciálisan felszabaduló és gyors transzmisszióra képes glutamát kulcsszerepet töltsön be. A VGluT3 raphe-sejteken belüli szerepének tetten érése céljából ezek szerint a raphe-hippocampalis kapcsolat vizsgálata alkalmas lehet, hiszen itt kézenfekvő az igény egy, a hullámtevékenységbe, illetve a hálózat egyes elemeinek működésébe gyorsan, pillanatszerűen beavatkozni képes – potenciálisan glutamáterg – modulációra. Mielőtt bemutatnám ennek kiderítése céljából végzett kísérleteinket, áttekintem a raphe-eredetű innerváció lehetséges hatásait a hippocampus hálózati és sejtszintű működésére, hogy jobban meghatározhassuk ennek a feltételezett glutamáterg komponensnek a funkcionális helyét a raphe-hippocampalis kommunikációban. Majd tárgyalom a VGluT3-függő glutamátürítés lehetőségeit (transzmisszió és kotranszmisszió), hogy érzékeltessem, a raphe-sejteken kívül hol máshol találtak bizonyítékot a VGluT3 hozzájárulására a glutamáterg szignalizációhoz.

1.4. A raphe-hippocampalis kapcsolat jelentősége

Interneuronok szelektív beidegzése

A vastag, nagy varikozitásokkal borított raphe-rostok többszörös kontaktust létesítve szelektíven szinaptizálnak a hippocampus kalbindin D28k (CB)-, kalretinin (CR)-, vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP)-, valamint kolekisztokinin (CCK)-tartalmú interneuronjaival, azonban a parvalbumin (PV)-tartalmú interneuronokat és a principális sejteket elkerülik (Freund és mtsai 1990, Halasy és mtsai 1992, Acsády és mtsai 1993, Papp és mtsai 1999, Somogyi és mtsai 2004). Ez a szelektív innervációs preferencia arra enged következtetni, hogy a szinaptikus raphe-hippocampalis kapcsolatnak kitüntetett szerepe lehet a beidegzett interneuronok szabályozásában. Vélhetően főként a vékony rostokból volumen transzmisszióval felszabaduló szerotonin a neuronhálózat többi tagját is közvetlenül elérheti (Chazal és Ralston 1987, Bunin és Wightman 1998, Oleskevich és mtsai 1991, Vizi és Kiss 1998, Barnes és Sharp 1999, Dale és mtsai 2016, Vertes és mtsai 1999). A principális sejtek periszomatikus gátlásában részt vevő PV-tartalmú kosársejtek kitüntetett szerepet töltenek be a hippocampus alrégiói közötti, illetve más agyterületekkel folytatott kommunikációt kísérő oszcillációk szabályozásában (Schlingloff és mtsai 2014, Gulyás és Freund 2015, Buzsáki és Schomburg 2015, Stark és mtsai 2014, Ylinen és mtsai 1995). A periszomatikus gátlást biztosító másik sejtcsoport, a CCK-tartalmú kosársejtek membrántulajdonságaikból, receptoraikból és a jelátvitelük hatékonyságából fakadóan a principális sejtek kisüléseit a hangulathoz, a szervezet külső és belső állapotához igazíthatják, a szerotoninerg mellett számos modulátoros rendszer célpontjai (Glickfeld és Scanziani 2006, Freund és Katona 2007), viszont hálózatban betöltött szerepük egyelőre nem világos (del Pino és mtsai 2017). A CB kalciumkötő fehérje a principális sejtek distalis dendritszakaszát innerváló interneuronok egyes típusaiban van jelen, a VIP kosársejtekben – a CCK-tartalmúak egy részében –, valamint interneuron-specifikus interneuronokban mutatható ki, a CR is jellegzetes az interneuron-specifikus interneuronokra, melyek az innervált GABAerg sejtjeiken keresztül jelentős hatással lehetnek a hálózati aktivitásra (Freund és Buzsáki 1996, Klausberger és Somogyi 2008, Pi és mtsai 2013). Mindezek megadják

a szövettani alapját a raphe-efferensek hippocampusra kifejtett hatékony modulációjának (Freund és Katona 2007).

A hippocampuszal szoros funkcionális egységet képező nucleus septalis medialisnak (Buzsáki 2002, Hangya és mtsai 2009) a hippocampus interneuronjait szelektíven innerváló (Freund és Antal 1988, Gulyás és mtsai 1991) PV-tartalmú GABAerg sejteit is beidegzik a raphe-rostok (Leranth és Vertes 1999, Aznar és mtsai 2004, Acsády és mtsai 1996). Mind a septalis, mind a hippocampalis GABAerg sejtekre érkező raphe-efferensek esetében kimutatták, hogy jelentős részükben vagy hiányzik a szerotonin, de VGluT3 előfordul, vagy szerotonin mellett VGluT3 is jelen van, glutamáterg jelátvitelt biztosítva vagy potenciózva a szerotonin felszabadulását (Aznar és mtsai 2004, Jackson és mtsai 2009, Szőnyi és mtsai 2016, Somogyi és mtsai 2004, Amilhon és mtsai 2010). Mivel a dorsalis hippocampusban a legtöbb szerotoninerget rostot a CA3 régióban, ennél kevesebbet a gyrus dentatusban, és legkevesebbet a CA1 régióban találták (Mamounas és mtsai 1991), valamint a R2-eredetű vastag, nagy varikozitásokkal borított rostokat nagyobb mértékben látták a CA1-ben, mint a CA3-ban (Bang és mtsai 2012), és figyelembe véve a R2-ből származó raphe sejtek VGluT3- és TpH2-termelése szerinti kettéválását (Okaty és mtsai 2015) feltételezhetjük, hogy a CA1 raphe-eredetű innervációjában a szerotoninerget komponensnek kevesebb, a VGluT3-függő, potenciálisan glutamáterget komponensnek pedig több szerep jut. A ventralis hippocampus raphe-eredetű innervációjáról minimális adatot publikáltak, amelyből az esetleges szubregionális különbségekre alig derül fény (Muzerelle és mtsai 2016, Voisin és mtsai 2016). A fentiek alapján a dorsalis hippocampus CA1 régiójában nagy eséllyel meg lehet ragadni a raphe-efferensek VGluT3-függő komponensének funkcióját.

A szerotonin sejt szintű hatásai

A raphe-hippocampalis kapcsolaton belüli glutamáterget komponens szerepének elhelyezéséhez célszerű áttekinteni a szerotoninerget hatásokat is. A szerotoninerget moduláció hat csoportba sorolt metabotrop (5-HT₁₋₂ és 5-HT₄₋₇) és egy ionotrop (5-HT₃) receptoron keresztül szabályozza a hippocampus hálózatát, a moduláció tényleges

iránya és mértéke a lokális szerotonin-koncentráció függvénye (Barnes és Sharp 1999, Hensler 2006, Dale és mtsai 2016, Bockaert és mtsai 2006, Prince és mtsai 2016). Az 5-HT_{1A} receptorok nagy mennyiségben fordulnak elő a principális sejtek szomatodendritikus felszínén és a PV-tartalmú interneuronokon, G $\alpha_{i/o}$ -fehérje közvetítésével gátolják az adenil-ciklázt és befelé rektifikáló káliumcsatornák aktiválásával erőteljesen hiperpolarizálják a sejteket (Chalmers és Watson 1991, Aznar és mtsai 2003, Kia és mtsai 1996). Az 5-HT_{1B} receptorok jelátvittele is hasonló, ám ezek elsődlegesen az axonterminálisokra lokalizálódnak (Boschert és mtsai 1994), a CA1 principális sejteinek a subiculum (Sari és mtsai 1997) vagy például a nucleus interstitialis striae terminalis felé (Guo és Rainnie 2010) történő jeltovábbítását szabályozzák, továbbá a lokális serkentő és gátló kapcsolatokat is befolyásolják (Mlinar és mtsai 2003). Az 5-HT_{2A} és 5-HT_{2C} receptorok G α_q -n keresztül fokozzák a foszfolipáz C működését, és gátolják a szivárgó káliumáramot, depolarizálva ezzel a sejtet. Széleskörűen előfordulnak a hippocampusban, principális sejtek szomatodendritikus felszínén és interneuronokon egyaránt (Li és mtsai 2004, Bombardi 2012, Cornea-Hebert és mtsai 1999). Az 5-HT₄ és 5-HT₇ receptorok expressziója a principális sejtekre jellemző, G α_s -fehérje közvetítésével aktiválják az adenil-ciklázt (Neumaier és mtsai 2001, Peñas-Cazorla és Vilaró 2015, Suwa és mtsai 2014), az utóbbiak pedig G₁₂-n keresztül a nyúlványok képződésére, alakjára is hatással vannak (Kvachnina és mtsai 2005). Az 5-HT₄ receptorok termelése az emléknymok konszolidációja során csökken (Manuel-Apolinar és mtsai 2005), az 5-HT₇ receptorok expressziója pedig az életkor előrehaladtával csökken, és szerepük lehet a szinaptogenezisben (Kobe és mtsai 2012). Az 5-HT₆ receptorok jeltávitele hasonló az előzőekéhez, a principális sejtek mellett egyes interneuronokon is előfordulnak (Gerard és mtsai 1997, Helboe és mtsai 2015), és erősítik a GABAerg transzmissziót, ezáltal gátolják a hosszú távú potenciáció kialakulását (West és mtsai 2009, Dawson és mtsai 2001). Az 5-HT₅ receptorok G $\alpha_{i/o}$ közvetítésével gátolják az adenil-ciklázt, principális sejtek és egyes interneuronok is termelhetik, viszont velük kapcsolatban kevés funkcionális adat áll rendelkezésre (Oliver és mtsai 2000, Dale és mtsai 2016). Az eddig felsorolt metabotrop receptoroknál jóval gyorsabb hatást fejt ki az ionotrop 5-HT₃ receptor, amely ciszteinhurok-típusú

nem szelektív kationcsatorna, nátrium- és kálium-ionokat enged át, gyorsan depolarizálva a sejtet. A nikotinos acetilkolin-receptor $\alpha 4$ -alegységével heteropentamert képezve szerotoninszenzitivitása megmarad, de kalcium-permeabilitása nő (van Hoof és mtsai 1998). Elsősorban CCK-tartalmú interneuronok termelik, amelyek serkentése nyomán hatékonyan csökkenti a principális sejtek aktivitását (McMahon és Kauer 1997, Gulyás és mtsai 1999).

A fentiek tükrében a szerotonin hippocampalis hatása egyrészt a principális sejtek erőteljes hiperpolarizálása 5-HT_{1A}-n keresztül (Beck és mtsai 1992, Okuhara és Beck 1994), mely a gamma-oszcillációk gátlását eredményezi (Johnston és mtsai 2014, Twarkowski és mtsai 2016), másrészt az 5-HT₄ és az 5-HT₇ közvetítésével a lassú utóhiperpolarizáció áramait gátolva növeli a kisülések frekvenciáját (Bacon és Beck 2000). Ez a kettős mechanizmus a CA3 piramisesejtjeinek esetében a gyenge serkentő bemenetek semlegesítése és az erősebb serkentő áramok fokozása révén növeli a neuronális zajszűrést (Beck és mtsai 1992, Villani és Johnston 1993). A gyrus dentatus szemcsesejtjeinek dendritjein az 5-HT_{1A} receptorok a legdistalisabb szakaszra koncentrálnak, ennek következtében erőteljesebben gátolják az oda érkező laterális perforáns pálya kiváltotta áramokat, mint a dendritek középső szakaszára érkező medialis perforáns pálya bemenetét, ezzel modulálják az entorhinalis kéregből beérkező információ tartalmát (Nozaki és mtsai 2016, Tsao és mtsai 2013). Az 5-HT₄ által közvetített hatások regionálisan különböznek, a moharostok és a CA3 piramisesejtjei között gátolja a szinaptikus kapcsolatok megerősödését, és a tárolt információ előhívásának háttérbe szorításával utat enged az újonnan beérkező információ kódolásának a CA1-ban és gyrus dentatusban (Twarkowski és mtsai 2016). Az 5-HT₂-receptoroknak az interneurok GABAerg jelátvitelének fokozására vélhetően erőteljesebb a hatásuk, mint a principális sejtek direkt depolarizációjára, és ezért gátolják a hosszú távú potenciáció kialakulását (Shen és Andrade 1998, Wang és Arvanov 1998, Zhang és Stackman 2015). A szerotonin a változatos metabotrop receptorain keresztül tehát előtérbe hozhatja az aktuális térbeli helyzet (Zhang és mtsai 2013) hozzákapcsolását az újonnan megerősödő hippocampalis kapcsolatokhoz.

Szerotonin hiányában zavart szenved térbeli navigáció és memória (Glikmann-Johnston és mtsai 2015, Nitz és McNaughton 1999). A szerotoninerg moduláció megfelelő időbeli felbontását és a metabotrop hatásokból is következő zajszűrés erősítését pedig a gyors, szinaptikus ionotrop 5-HT₃ receptorok által aktivált CCK-tartalmú kosársejtek és interneuronszelektív interneuronok biztosíthatják (Gulyás és mtsai 1999), e közvetítéssel a szerotonin hatékonyan beleavatkozhat a hálózati aktivitásba, illetve a hosszú távú memórianyomok kialakulásába (Stäubli és Xu 1995, Reznic és Stäubli 1997, Maeda és mtsai 1994, Piguet és Galvan 1994). A CCK-tartalmú kosársejtekre és az interneuronszelektív interneuronokra érkező szinaptikus kapcsolatokban az esetlegesen jelen lévő glutamáterg transzmisszió (kotranszmisszió) jelentősen fokozhatja azok aktivitását, terminálisonkénti eltérő jelenléte (Gagnon és Parent 2014, Ramet és mtsai 2017) pedig a neuronhálózat egyes elemeit jobban kiemelheti a többinél. Az a megfigyelés, hogy a hippocampusban a szerotonint és VGluT3-at is tartalmazó raphe-terminálisok jelentős részéből hiányzik a szerotonin preszinaptikus visszavételéért felelős, a transzmisszió lecsengését biztosító SERT fehérje (Amilhon és mtsai 2010), szintén alátámasztja egy erős szerotoninerg tónuson ülő precíz glutamáterg szignalizáció lehetőségét.

Hatás a hálózati aktivitásra

A MR-nak a hippocampus hálózatára kifejtett fő hatásának az információkódoláshoz kapcsolódó, tájékozódásban és eseménymemóriában kitüntetett jelentőségű theta-oszcilláció (Buzsáki 2002, Dragoi és Buzsáki 2006, Diba és mtsai 2014, Cutsuridis és Poirazi 2015, Buzsáki és Moser 2013) deszinkronizációját, gátlását tartották (Vinogradova 2001), a MR elektromos nagyfrekvenciás ingerlését altatott állatokban ugyanis a theta-hullámok amplitúdójának erőteljes csökkenése kísérte (Assaf és Miller 1978, Vertes 1981, Vertes és Kocsis 1997, Vinogradova és mtsai 1999). Ezzel összhangban a MR-irtott állatokban vagy a mag farmakológiai inaktiválásának hatására perzisztens theta-aktivitás (Kinney és mtsai 1994, Kitchigina és mtsai 1999, Li és mtsai 2005, Maru és mtsai 1979, Vertes és mtsai 1994, Marrosu és mtsai 1996) és lokomotoros hiperaktivitás alakult ki (Wirtshafter és Asin 1982, Paris és Lorens 1987,

Wirtshafter és mtsai 1993). Amíg az altatott állatokban végzett kísérletek eredményei egyértelműen a MR theta-deszinkronizáló hatását mutatták, az éber állatokkal végzett elektromos stimulálások adatai ellentmondásosak. Egyes kísérletekben ugyanis a stimulálás hatására theta-oszcilláció alakult ki, társuló explorációs viselkedéssel (Robinson és Vanderwolf 1978), mások pedig mozdulatlanságot és alacsony frekvenciás, úgynevezett II-es típusú, kolinerg jelátviteltől függő (Kramis és mtsai 1975) theta-aktivitást figyeltek meg (Graeff és mtsai 1980). Az ellentmondások oka az lehetett, hogy a különböző kísérletekben nem pontosan ugyanazt a raphe-régiót stimulálták, illetve az I-es (helyzetváltozást kísérő, kolinerg jelátviteltől független, továbbá uretán-altatásban nem kiváltható) és II-es típusú (szenzoros aktivációhoz kapcsolódó, kolinerg jelátviteltől függő, alacsonyabb frekvenciás) theta-aktivitást (Kramis és mtsai 1975, Buzsáki 2002) nem különítették el. Uretán-altatásban a II-es típusú theta-hoz hasonló, az éber állapothoz képest alacsonyabb frekvenciájú, kolinerg jelátviteltől függő theta alakul ki, ez és a II-es típus közti különbséget nem definiálták egyértelműen (Clement és mtsai 2008, Buzsáki 2002).

Az I-es és II-es típusú theta-aktivitásra eltérő hatása van a raphe-stimulálásnak. A DR, valamint a MR középső-dorsalis régiójának ingerlésének hatása a szerotoninerg sejtek épségétől függ, és az I-es típusú theta-oszcillációt erősíti, az uretán-altatás alatt észlelhető theta-aktivitást pedig gátolja. A MR ventralis régiójának ingerlése, ahol több a nem-szerotoninerg sejt (Wiklund és mtsai 1981), ez utóbbi típusú theta-hullámokat segíti, ez az effektus nem függ a szerotoninerg sejtek épségétől (Peck és Vanderwolf 1991, Crooks és mtsai 2012, Bland és mtsai 2016). A szövettani vizsgálatok felfedték a raphe-magokban a vetítő VGluT3-tartalmú populációt (Jackson és mtsai 2009, Szőnyi és mtsai 2016), illetve funkcionális adat is utal a MR-ból eredő glutamáterg projekcióra (Kiss és mtsai 2002). Ezek alapján kialakult egy modell, amely szerint a raphe-magok szerotoninerg projekciója a navigációhoz kapcsolódó, I-es típusú theta-aktivitást erősítené, a kolinerg transzmissziótól függő theta-hullámokat pedig gátolná. A navigációt támogató szerotoninerg moduláció ötlete mellett szól annak sejt szintű hippocampalis hatása is, hiszen a medialis entorhinalis kéregből érkező, térbeli

pozícióval összefüggő információ fogadását segíti. A szerotoninerg rostok stratum lacunosum-molecularéra jellemző lefutása is ezt szolgálja. A raphe-magok nem-szerotoninerg, feltételezeten glutamáterg efferensei pedig a II-es típusú, uretán-altatásban is kimutatható, kolinerg jelátviteltől függő és a szenzoros aktivációhoz köthető theta-hullámokat segítenék (Li és mtsai 2005, Bland és mtsai 2016). Ezt a képet árnyalja, hogy az elektromos stimulálás nem szorítkozik csak a szerotoninerg vagy csak a glutamáterg (esetleg más) sejtpopulációra, továbbá, a szerotoninerg sejtek farmakológiai manipulációja – akár irtása – kihat a bennük termelődő VGluT3-függő glutamáterg komponensre is.

A kolinerg moduláció a figyelemfelkeltő, fájdalmas vagy különleges jelentőségű szenzoros ingerek hippocampalis feldolgozásában alapvető szerepet játszik (Lovett-Barron és mtsai 2014), és bár alig áll rendelkezésre adat a II-es típusú theta-oszcillációk alatti hippocampalis hálózati tevékenység részleteiről (Buzsáki 2002), ez a hullámtevékenység potenciálisan kísérelheti a jelentős szenzoros ingerület hippocampalis hálózatba érkezését. A raphe-efferensek glutamáterg komponensének pedig lehet szerepe ennek a hullámtevékenységnek a fenntartásában, illetve a szerotoninerg gátló hatások ellensúlyozásában (Li és mtsai 2005). A szenzoros aktivitáshoz kapcsolódó hálózati theta-tevékenység potenciális modulációján kívül azonban a raphe-efferensek VGluT3-tartalmú terminálisai a szenzoros kódolást a hálózat ideiglenes, de időben nagyon pontos finomhangolásával is szabályozhatják. Ez lehetőséget teremtene a pozíciófüggő és a különös jelentőséggel bíró szenzoros információk kódolásának hippocampalis összekapcsolására. Ehhez viszont az szükséges, hogy a raphe-eredetű VGluT3-expresszázó pályák valóban nagyon gyors, időben fókuszált jelátvitelre legyenek képesek. A MR theta-aktivitásra gyakorolt szabályozásának vizsgálata során véleményem szerint először ezt a lehetőséget érdemes tisztázni. Ehhez némi támpontot nyújt, hogy a MR alacsony frekvenciás (0,5 Hz), illetve theta-frekvenciás elektromos stimulálása átállítja a hippocampalis theta-hullámok fázisát (Jackson és mtsai 2008), tehát ez is arra utal, hogy a MR képes beleavatkozni a hippocampus hálózatának folyamataiba egy theta-ciklusnyi (mintegy 200 ms) időnél precízebben is. A glutamáterg

komponens alkalmas arra, hogy egy ilyen precíz szabályozásban részt vegyen, tehát e funkcionális aspektus alapján is azt feltételezhetjük, hogy a raphe-hippocampalis kapcsolatban a VGluT3 kitüntetett szerepet játszik. A következő alfejezetben kitérek azokra a bizonyítékokra, amelyek a VGluT3 részvételét igazolják glutamáterg jelátvitelben – a raphe-sejtektől eltérő neuronokban.

1.5. A glutamáterg kotranszmisszió

A glutamáterg transzmisszió alapvető feltételei

A glutamát univerzális aminosav, részt vesz az intermedier anyagcserében, fehérjék alapvető építőegysége, a GABA szintézisének kulcsvegyülete, emellett a központi idegrendszer egyik fő neurotranszmittere (Fonnum 1984). Minden sejt – ennél fogva minden neuron is – tartalmaz glutamátot, a jelenléte önmagában ezért nem elégséges a glutamáterg neurotranszmisszió bizonyítására. A glutamáterg jelátvitel további, preszinaptikus feltétele, hogy a jelátvitelben szerepet játszó glutamát legyen kompartmentalizálva, elszeparálva a citoplazmában lévő anyagcsere-reakciókban, fehérjésintézisben részt vevő glutamátmolekuláktól. Jelenlegi ismereteink szerint a glutamát kompartmentalizációját szinaptikus vezikulumok oldják meg, melyekben a vezikuláris glutamáttranszporterek (VGluT) aktív transzportja útján dúsul fel elégséges koncentrációban a transzmitter. A VGluT expressziója önmagában elégséges, hogy az idegsejt glutamátot üríthessen (Daniels és mtsai 2006, Takamori és mtsai 2000). A glutamáterg transzmisszió posztszinaptikus feltétele pedig az, hogy a felszabaduló glutamát receptorához kötődve hatást fejtsen ki a posztszinaptikus oldalon, és ezt akár exogén glutamáttal is utánozni lehessen (Kandel és mtsai 2000, Takamori 2006, Fremeau és mtsai 2004, Kandler és mtsai 1998).

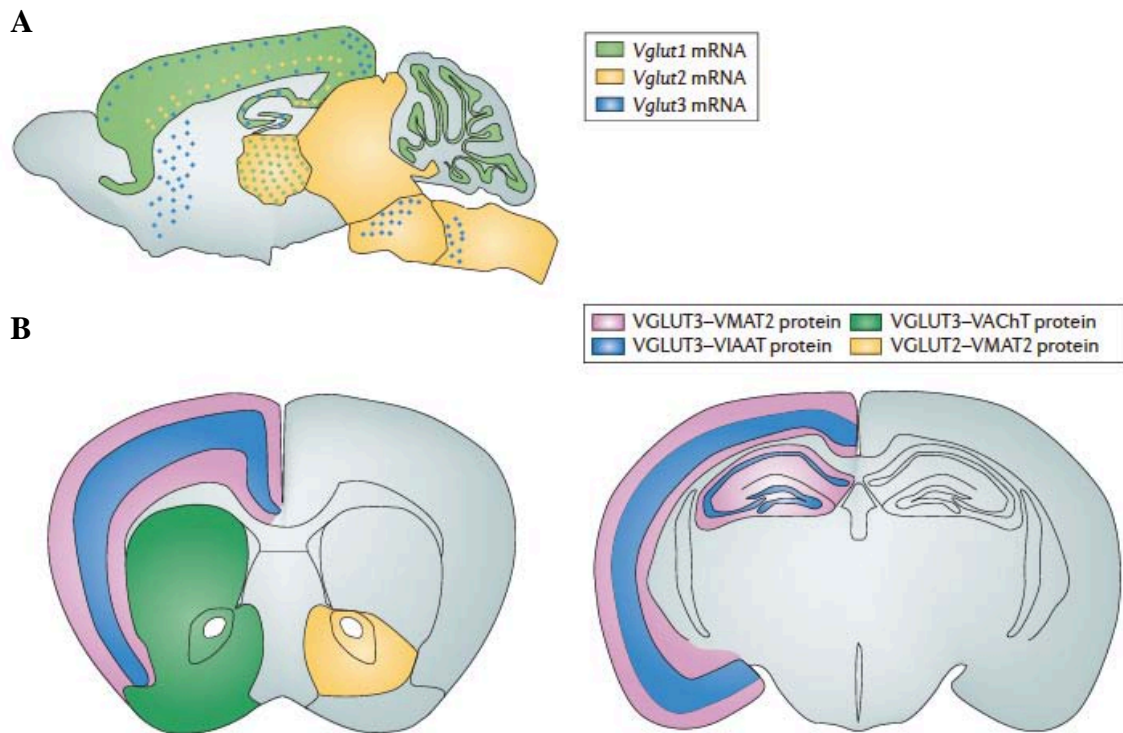
A vezikuláris glutamáttranszporterek komplementer előfordulása

A GABA, a monoaminok és az acetilkolin vezikuláris szállítófehérjéinek felfedezéséhez képest a glutamát transzporterét később azonosították. Majd kiderült, hogy a már korábban felfedezett (Ni és mtsai 1994) agyspecifikus nátrium-függő anorganikusfoszfát-transzporter (BNPI) katalizálja a glutamát bejutását az agykéreg principális sejtjeinek vezikulumaiba (Takamori és mtsai 2000, Bellocchio és mtsai 2000). A glutamáterg neuronok jelentős részében viszont nem találtak BNPI-t, ezekben egy másik, hozzá hasonló szerkezetű és funkciójú fehérjét fedeztek fel (Aihara és mtsai 2000, Herzog és mtsai 2001, Takamori és mtsai 2001). Mivel az egyedfejlődés korai szakaszaiban az expressziójának magasabb mértékét figyelték meg, azt először

differenciálódás-kapcsolt BNPI-nek, röviden DNPI-nek nevezték el. A BNPI helyett azonban a VGluT1, a DNPI helyett pedig a VGluT2 elnevezés honosodott meg, miután tisztázták neurális szerepüket (Bellocchio és mtsai 2000, Takamori és mtsai 2000, Fremeau és mtsai 2001).

A VGluT1 és a VGluT2 corticalis–subcorticalis komplementer expressziót mutat (lásd 1.5.1. ábra). A VGluT1 jellemzően a corticalis eredetű principális sejtekben termelődik, így a neocortexben, az entorhinalis kéregben, a hippocampusban, a basolateralis és lateralis amygdala sejtjeiben, ezeken kívül például a kisagy szemcsesejtjei is expresszálják. A VGluT2 ezzel szemben jellegzetes subcorticalis fehérje, többek között a thalamus, a hypothalamus, a substantia nigra, a nucleus septalis medialis, a nucleus subthalamicus vagy a mély kisagymagvak glutamáterg sejtjeiben, továbbá az amygdala medialis és centralis magjában, valamint az agytörzs számos idegsejtjében termelődik (Ni és mtsai 1995, Bellocchio és mtsai 1998, Hisano és mtsai 2000, Fremeau és mtsai 2001, Herzog és mtsai 2001, Fujiyama és mtsai 2001, Kaneko és Fujiyama 2002). A VGluT1 és a VGluT2 a gerincvelő szintjén is jellegzetes expresziós mintázatot mutat. A gerincvelőbe tartó vagy felszálló szenzoros pályák terminálisaiban döntően VGluT1 található, a VGluT2 pedig inkább a spinális serkentő interneuronokra jellemző (Todd és mtsai 2003, Wu és mtsai 2004, Oliveira és mtsai 2003, Polgár és mtsai 2008, Li és mtsai 2003).

A VGluT1 és a VGluT2 együttesen is expresszálódhat többek között a gerincvelő, a ganglion nervi trigemini, a kisagy, a gyrus dentatus, a nucleus septalis medialis, a tractus olfactorius, illetve a neocortex bizonyos sejtjeiben korai egyedfejlődési stádiumok alatt, sőt, tartósan is. Jellegzetes a glutamáterg sejtekre a két izoforma közötti váltás: születés után a VGluT1 transzkripciója növekszik, a VGluT2 transzkripciója csökken. Valószínűleg a legtöbb sejt esetében ennek az átmenetnek a lenyomata az ideiglenes koexpresszió (Herzog és mtsai 2001, Sakata-Haga és mtsai 2001, Miyazaki és mtsai 2003, Boulland és mtsai 2004, Fremeau és mtsai 2004, Danik és mtsai 2005, Landry és mtsai 2004).



1.5.1. ábra. A vezikuláris glutamáttranszporterek előfordulása az egér agyában. **A)** parasagittalis sémás metszeten a vezikuláris glutamáttranszporter (VGluT) három izoformája messenger RNS-ének jelenléte. **B)** egy rostralisabb (bal oldalon) és egy caudalisabb (jobb oldalon) coronalis sémás metszeten a VGluT3, illetve a VGluT2 és más vezikuláris transzporterek fehérjéinek koexpressziója. VMAT2: vezikuláris monoamintranszporter 2-es izoformája, VACHT: vezikuláris acetilkolin-transzporter, VIAAT: vezikuláris gátlóaminosav-transzporter, ez megegyezik a VGAT-tal. (El Mestikawy és mtsai 2011 alapján).

A VGluT3-at a már ismert vezikuláris glutamáttranszporterekhez hasonló molekuláris szerkezetű fehérjék után kutatva fedezték fel. Specifikus glutamáttranszporter, csakúgy mint a VGluT1 és VGluT2. A működéséhez szükséges energiát – hasonlóan a VGluT2-höz – a vezikuláris membránpotenciál-különbségből és protonkoncentráció-különbségből egyaránt meríti. A VGluT3 már alacsony glutamátkoncentráció mellett képes hatékony működésre, ám idegység alatt viszonylag kevés transzmittert szállít a vezikulumba. Akár csökkent expresszió esetén is képes biztosítani a normális vezikuláris glutamátárolást és a következményes glutamátürítést (Ramet és mtsai 2017). Hasonlóan a VGluT2-höz, a VGluT3 preszinaptikus jelenléte esetén is nagyobb a glutamátfelszabadulás valószínűsége, és a jelátvitel gyorsan depresszálódhat (Weston és mtsai 2011). A VGluT3 egy expressziót csökkentő mutációját vizsgálva arra a

következtetésre jutottak, hogy a különböző vezikulumokban és sejtkompartmentumokban eltérő mechanizmusok irányíthatják a fehérje eloszlását, mert a csökkent sejtszintű expresszió esetében heterogén módon ritkult a VGluT3 az egyes vezikulumokból (Ramet és mtsai 2017). A VGluT3-ra jellemző – eltérően a terminálisokra lokalizálódó VGluT1-től és VGluT2-től – a szomatodendritikus jelenlét, ezért részt vehet az ezidáig csak kevésbé tanulmányozott szomatodendritikus transzmitterfelszabadulásban (Zilberter 2000, Harkany és mtsai 2004).

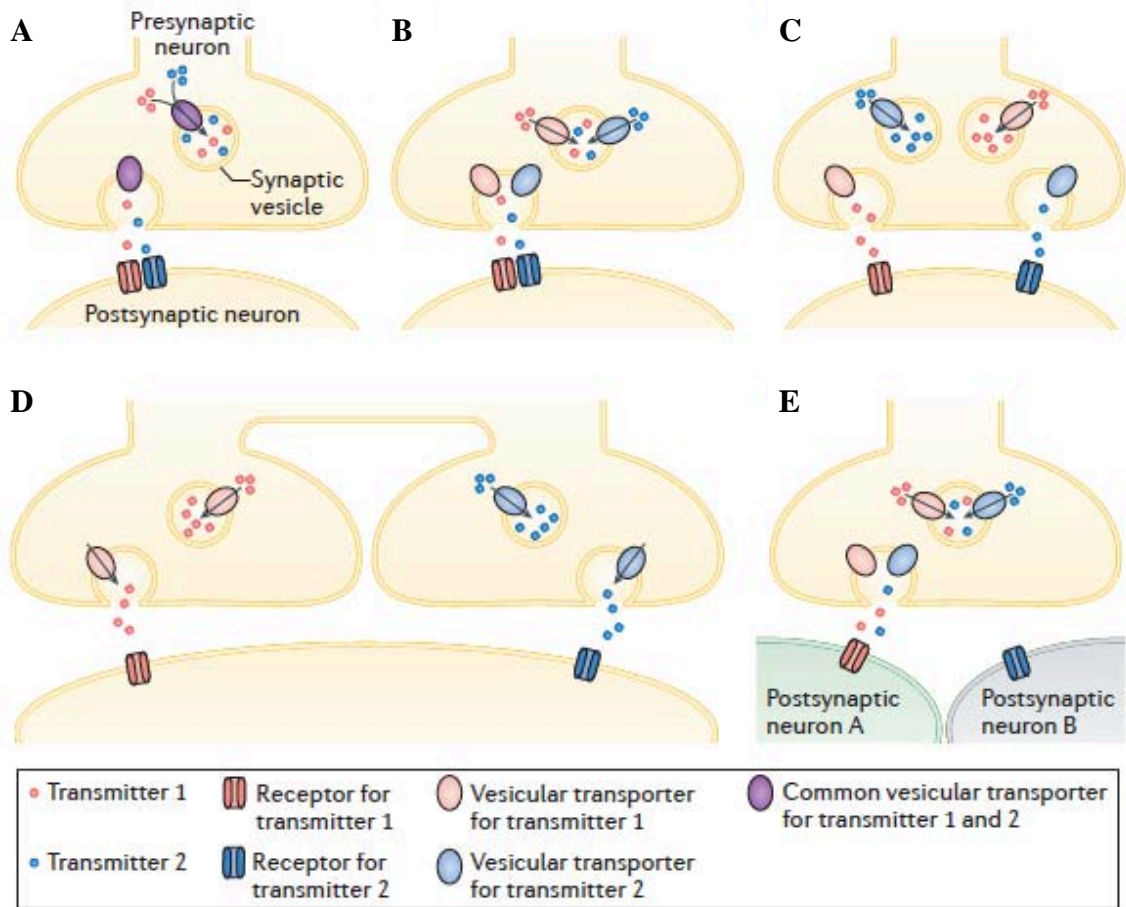
A VGluT3 felfedezésekor markáns tulajdonságának tartották, hogy korábban nem-glutamátergként megismert neuronokban fordul elő (lásd 1.5.1. ábra). Azóta kiderült, hogy olyan idegsejtekben is termelődik, amelyeknek – jelenlegi tudásunk szerint – a glutamát az egyetlen neurotranszmittere. A VGluT1 és a VGluT2 széleskörű jelenlétével ellentétben azonban a VGluT3-at csupán elszórtan mutatták ki kizárólagosan glutamátergnek tartott sejtípusokban (Herzog és mtsai 2004a, Fremeau és mtsai 2002, Gras és mtsai 2002, Schäfer és mtsai 2002, Takamori és mtsai 2002, Boulland és mtsai 2004, Fremeau és mtsai 2004, Ligucz-Leczna és Skangiel-Kramska 2007). Például a cochlea belső szőrsejtjeiben VGluT3 biztosítja a glutamáterg jelátvitelhez szükséges transzmitterkompartmentalizációt (Ruel és mtsai 2008, Akil és mtsai 2012). A bulbus olfactorius külső pamacsos sejtjei között VGluT3-termelő neuronok is vannak a VGluT1- és VGluT2-tartalmú populáció mellett, bár ezek egy része VGluT3-mal együtt VGluT1-t vagy VGluT2-t is koexpresszál (Tatti és mtsai 2014). A substantia nigra dopaminerg sejtjeit periszomatikusan innerváló, colliculus superiorból eredő pálya terminálisában szintén VGluT3 biztosítja a glutamáterg transzmissziót (Martín-Ibañez és mtsai 2006). A korábbi fejezetekben már foglalkoztam a MR-val és a DR-val, ahol a szerotoninerg és szerotonin–VGluT3-koexpresszáló, valamint a GABAerg és dopaminerg neuronok mellett jelentős populációt képviselnek a VGluT3-termelő sejtek, melyekben egyelőre más transzmitter vezikuláris transzporterét nem detektálták. A MR projekcióinak döntőrészt nem-szerotoninerg efferenseinek többségében a VGluT3 jelen van (Jackson és mtsai 2009, Hioki és mtsai 2010, Sós és mtsai 2017, Szőnyi és mtsai 2016).

Kotranszmisszió

A vezikuláris glutamáttranszporterek mindhárom izoformája a hagyományosan glutamátergnek leírt idegsejtek mellett egyéb jelátvivőmolekulájakról ismert neuronokban is termelődhet, ami felveti a két jelátvivőanyag együttes használatának, kotranszmissziójának lehetőségét. Két (vagy több) vezikuláris transzporter expressziója következtében egy neuron a kotranszmisszió alábbi lehetőségeit veheti igénybe (Vaaga és mtsai 2014, Tritsch és mtsai 2016, Münster-Wandowski és mtsai 2016):

- a) *együttes ürítés (co-release) közös vezikulumból:* a szinaptikus vezikulum mindkét transzportert tartalmazza, ennek következtében a két transzmitter egy vezikulumban tárolódik. Transzmisszió során a két transzmitter egyszerre ürül ki. Speciális esete, ha egyetlen, több szubsztrátumot (például GABÁt és glicint) is elfogadó vezikuláris transzporter közvetítésével valósul meg a transzmitterek tárolása a vezikulumokban. Az egyik transzporter vezikuláris szinergia révén segítheti a másik fehérje szállítóműködését (1.5.2. ábra A és B panelek)
- b) *kotranszmisszió külön vezikulumokból:* mindegyik vezikulum membránjában csak egyféle vezikuláris transzporter jelenik meg, vezikulumonként egyféle transzmitter raktározódik. A különböző jelátvivőanyag-tartalmú vezikulumok irányíthatnak ugyanabba vagy különböző terminálisokba. Amennyiben egy terminálisban többféle vezikulum foglal helyet, ezek exocitózisa kissé eltérően szabályozódhat aszinkron transzmissziót eredményezve. Ha különböző terminálisokba szegregálódnak a különböző transzmittert raktározó vezikulumok, a két idegvégződés egymástól akár független jelátvivőként is működhet (1.5.2. ábra C, D és E panelek).

Akár a közös, akár a külön vezikulumokból történő transzmisszió speciális esete lehet, ha a posztzinaptikus célpont is különbözik (1.5.2. ábra E panel). A dolgozatomban tárgyalt kotranszmisszió fogalmába nem vettem bele a klasszikus neurotranszmitterek és valamilyen peptid szignalizációs molekula egy neuronból történő felszabadulását. Ez



1.5.2. ábra. A kotranszmisszió lehetőségei. **A)** Egy vezikuláris transzporter kétféle transzmittert is képes szállítani. **B)** Egy vezikulumban kolokalizálódik kétféle vezikuláris transzporter, ez esetben lehetséges közöttük az együttműködés vezikuláris szinergia révén. **C)** A terminálisban két vezikulumpopuláció van jelen, mindegyik más vezikuláris transzmittert tartalmaz. **D)** Egy adott típusú vezikuláris transzmitter van csak jelen egy terminálisban, de az adott sejt különböző terminálisaiba különböző vezikulumok irányítodnak. **E)** A felszabaduló transzmitterek – akár közös vezikulumból történő kiürülést követően – különböző poszt-szinaptikus sejteken hathatnak. (Tritsch és mtsai 2016 alapján).

esetben jelentősen különbözik az ürülés háttérében álló molekuláris mechanizmus (Ludwig és Leng 2006, Sieburth és mtsai 2007, van den Pol 2012). Vezikuláris glutamáttranszporterekhez kötődően a fenti kotranszmissziós lehetőségek mindegyikére fedeztek fel példát, habár a transzmitterek együttműködésének részletei még sok esetben tisztázásra várnak. Az alábbiakban a három VGluT-izoforma kotranszmisszióban betöltött szerepét tekintem át.

Glutamáterg kotranszmisszió

Mindhárom VGluT izoforma részt vesz a glutamáterg kotranszmisszióban (El Mestikawy 2011). A VGluT1 például a retina GABAerg-glutamáterg bipoláris sejtjeinek (Kao és mtsai 2004), valamint a habenula medialis (MHb) kolinerg neuronjainak (Ren és mtsai 2011, Frahm és mtsai 2015) glutamáterg jeltovábbításáért felelős. A VGluT2 vesz részt a ventralis tegmentalis area (Root és mtsai 2014), illetve a nucleus entopeduncularis egyes GABAerg sejtjeinek glutamáterg kotranszmissziójában (Shabel és mtsai 2014). Továbbá, VGluT2 és VGAT koexpressziója következtében a nucleus supramamillarisnak a gyrus dentatus szemcsesejtjeit innerváló terminálisából glutamát és GABA is felszabadulhat (Boulland és mtsai 2009, Soussi és mtsai 2010). A hypothalamus számos neuroendokrin sejtcsoportja, például a nucleus periventricularis anteroventralis GABAerg sejtjei koexpresszálják VGluT2-t (Sakata-Haga és mtsai 2001, Hisano és Nogami 2002, Lin és mtsai 2003, Ottem és mtsai 2004). A nucleus pedunculo pontinus kolinerg neuronjainak egy kisebb hányadában szintén detektáltak VGluT2-t (Barroso-Chinea és mtsai 2011). Továbbá, a bazális előagy számos GABAerg vagy kolinerg sejtjeiben szintén megjelenhet VGluT2, korai egyedfejlődési periódusokban, de akár érett sejtekben is (Sotty és mtsai 2003, Danik és mtsai 2005, Gritti és mtsai 2006). A gerincvelő kolinerg motoneuronjai szintén expresszálhatnak VGluT1-t és VGluT2-t is (Herzog és mtsai 2004b, Nishimaru és mtsai 2005, Kraus és mtsai 2004). A VTA egyes dopaminerg neuronjai is képesek glutamáterg kotranszmisszióra VGluT2 részvételével (Zhang és mtsai 2015, Barker és mtsai 2016). Egyes adrenerg neuronok is termelnek VGluT2-t (Stornetta és mtsai 2002).

VGluT3 a kotranszmisszióban

A VGluT3 számos, eredetileg nem-glutamátergként megismert neuronban expresszálódik. Hasonlóan a másik két izoformához, GABAerg és kolinerg sejtekben is jelen van. Szemben a VGluT2-vel, katekolaminerg sejtekben még nem mutatták ki, viszont szerotoninerg neuronokban egyedülként a VGluT3 fordul elő a vezikuláris glutamáttranszporterek közül. A felfedezését követően kételkedtek abban, hogy a

VGluT3 jelenléte ténylegesen glutamátürítéssel társul, azonban a későbbi kutatások erre számos funkcionális bizonyítékot szolgáltatottak (El Mestikawy és mtsai 2011).

A VGluT3 jellegzetes expressziós változást mutat az egyedfejlődés során. Amíg a VGluT1 és a VGluT2 termelése összességében folyamatosan fokozódik – annak ellenére, hogy egyes neuronokban a VGluT2 jelenléte csökken –, a VGluT3 termelődésének két csúcsát figyelték meg. Egereknél a születés utáni 10. nap körül jelentkezik az első expressziós maximum, ilyenkor az előagyi régiók – például a striatum vagy a hippocampus – mellett a caudalisabb agyterületeken – többek között a kisagyban, a colliculus inferiorban vagy a híd több setjcsoportjában – is nagyobb mennyiségben detektálható a VGluT3. Ezeknek a caudalisabb régióknak a VGluT3-termelése hamar lecsökken, viszont a 15. posztnatális naptól kezdve az előagyan újabb emelkedő expresszió kezdődik, amely a felnőttkorig tart. A kisagy Purkyně-sejtjeiben termelődik ideiglenesen a VGluT3. Ezekben a neuronokban a GABAerg neurotranszmisszió elemei szintén megtalálhatóak ekkor már, a VGluT3 pedig szomatodendritikusan és az axonterminálisok zömében van jelen (Gras és mtsai 2005). Felnőttkorban a Purkyně-sejtek terminálisában nem mutatható ki VGluT3, ugyanakkor a mély magok sejtjeiben továbbra is expresszálódhat (Boulland és mtsai 2004). A GABAerg–glutamáterg kotranszmisszióknak a Purkyně-sejtek kapcsolatainak fejlődésében és érésében lehet szerepe, a felszabaduló glutamát valószínűleg retrográd útvonalon hat, és a preszinaptikus sejtekről érkező GABAerg jelátvitelt fokozza (Duguid és Smart 2004). A VGluT3 fontos szereplő a hallópálya kapcsolatrendszerének kialakulásában is. A nucleus medialis corporis trapezoidei fejlődő, GABAerg–glicinerg nyúlványaiban a VGluT3 szintén átmenetileg termelődik, és glutamáterg kotranszmissziót tesz lehetővé. A felszabaduló glutamát a posztszinaptikus receptorai révén az oliva superior komplexum nucleus laterálisában szabályozza a szinapszisok érését (Gillespie és mtsai 2005, Case és Gillespie 2011, Noh és mtsai 2010, Case és mtsai 2014). Az oliva superior komplexum fejlődése során egyébként a VGluT3 mellett a másik két VGluT expresszióváltásának is jut szerep (Blaesse és mtsai 2005).

A *bulbus olfactorius* GABAerg sejtjeinek egy része fiatal és felnőtt állatokban egyaránt expresszál VGlut3-at, dendritikus glutamaterg transzmissziót biztosítva (Didier és mtsai 2001, Gabellec és mtsai 2007, Tatti és mtsai 2014). Továbbá, VGlut3-függő dendritikus glutamaterg jelátvitelt figyeltek meg a neocortex II/III. rétegének piramis-sejtjeiben, ahol a dendritekből retrográd irányban felszabaduló transzmitter a nem akkomodálódó, gyorsan tüzelő interneuronok GABAerg szignálját csökkentheti metabotrop glutamát-receptorok közvetítésével (Zilberter 2000, Harkany és mtsai 2004).

Sokkal szembetűnőbb a kolecisztokinintartalmú GABAerg kosársejtek egy csoportjának VGlut3-expressziója a neocortex II/III. rétegében, illetve a hippocampusban, sőt, az amygdalában is. Egyes feltételezések szerint ezekben az interneuronokban is az esetleges retrográd glutamaterg jelátvitelben játszik szerepet a VGlut3, viszont ennek meggyőző funkcionális bizonyítékát még nem mutatták be (Omiya és mtsai 2015, Herzog és mtsai 2004a, Fremeau és mtsai 2002, Docherty és mtsai 1987, Hioki és mtsai 2004, Somogyi és mtsai 2004). A VGlut3 jelen van a kosársejtek axonterminálisaiban is, méghozzá kolokalizál VGAT-tartalmú vezikulumokkal (Stensrud és mtsai 2013). A poszt-szinaptikus oldalon pedig glutamát-receptor koncentrációdik, ami működő GABAerg-glutamaterg kotranszmisszióra utal (Stensrud és mtsai 2015). A glutamaterg komponens szabályozhatja a preszinaptikus GABA-felszabadulást. Egyfelől potenciózhatja azt, mert a poszt-szinaptikus glutamát-receptorok aktivációja retrográd nitrogén-monoxid-szignált indíthat el. A nitrogén-monoxid hatására fokozódó ciklikus guanozin-monofoszfát képződése erősíti a GABAerg transzmissziót (Szabadits és mtsai 2011, Merino és mtsai 2014, Neitz és mtsai 2014). Másfelől egyes preszinaptikus metabotrop glutamát-receptorok közvetítésével gátolhatja is a GABA ürülését (Somogyi és mtsai 2003, Summa és mtsai 2013).

A *nucleus interstitialis striae terminalis* túlnyomórészt GABAerg projekcióval innerválja a VTA-t, ebben a pályában az idegrostok egy kisebb hányada VGlut3-at koexpresszál. Egyetlen neuron nyúlványait követve, mindegyik terminálisban kimutatták a VGAT-ot, viszont a VGlut3 ezek közül csupán némelyik végződésben volt jelen. Egyes

célsejtekre tehát glutamáterg hatás nem érkezik (Kudo és mtsai 2012). A retinában a glicinerg amakrinsejtek egyik csoportja VGluT3 segítségével glutamáterg jelátvitelre is képes. Jellemző rájuk, hogy a glicinerg és a glutamáterg transzmisszió elkülönül, eltérő ganglionsejt-populációt céloz (Haverkamp és Wässle 2004, Johnson és mtsai 2004, Marshak és mtsai 2015, Tien és mtsai 2016).

A nucleus accumbens kolinerg neuronjaiban nagy jelentősége van a VGluT3-expresszióknak, mert fokozza az acetil-kolin vezikuláris tárolását. VGluT3 hiányában a striatum kolinerg pályái hiányosan működtek, és a striatalis dopaminerg hatás túlsúlyba került, anélkül hogy a sejtek morfológiai vagy számbeli eltérését detektálták volna. A VAcHT transzportját vezikuláris szinergiával segíti a vele egy vezikulumra kolokalizálódó VGluT3 glutamátszállítása. Önmagában a VAcHT ugyanis gyorsan kimeríti a protonkoncentráció-különbséget, amit a savas glutamát kompenzálhat (Gras és mtsai 2008). Felvetették, hogy VGluT3-on keresztül jelentős klorid- vagy foszfátáram irányulhat a vezikulum lumene felé – akár a glutamát helyett –, és ez hatékonyan pufferezné a másik transzporter generálta protonvesztést (Juge és mtsai 2006, Schenck és mtsai 2009, El Mestikawy és mtsai 2011). Később bebizonyították, hogy ezekben a terminálisokban a VGluT3 a glutamátürüléshez is hozzájárul az acetil-kolin vezikuláris koncentrációjának növelése mellett. Az így ürülő glutamát ráadásul kulcsszerepet tölt be a célsejtek dopaminérzékenységének kontrolljában, ami befolyásolja az addiktív magatartásformák kialakulását (Higley és mtsai 2011, Guzman és mtsai 2011, Nelson és mtsai 2014, Sakae és mtsai 2015). A bazális előagy kolinerg sejtjeinek az amygdala nucleus basolateralisát innerváló nyúlványaira korlátozódva detektáltak VGluT3-koexpressziót (Nickerson Poulin és mtsai 2006).

A szerotoninerg sejtek túlnyomó többségében jelen van a VGluT3 mRNS-e, azonban nem mindegyikük expresszálja a fehérjét (Fremeau és mtsai 2002, Gras és mtsai 2002, Schäfer és mtsai 2002, Takamori és mtsai 2002, Sós és mtsai 2017). Korábban már tárgyaltam, hogy a raphe-sejtek számos fehérje termelése tekintetében különböznek egymástól a VGluT3-tartalom szerint (Okaty és mtsai 2015). A raphe-magokból

kiinduló efferensek jelentős hányadában megtalálható a VGluT3, és ezek egy része szerotonint nem is tartalmaz, másik része pedig szerotonint és VGluT3-t koexpresszál (Hioki és mtsai 2010, Jackson és mtsai 2009, Szőnyi és mtsai 2016). A koexpresszáló sejtek projekcióiban pedig egyes terminálisokból hiányozhat a VGluT3 (Gagnon és Parent 2014), másokban pedig akár a változó mennyiségű jelenléte ellenére hatékonyan fokozza vezikuláris szinergiával a szerotonin vezikuláris dúsulását (Ramet és mtsai 2017, Amilhon és mtsai 2010). A caudalis raphe magokból a gerincvelőbe leszálló szerotoninerg nyúlványokban is detektáltak VGluT3-at. Ezek terminálisainak egy részéből hiányzik a szerotonin, más terminálisokban pedig a VGluT3 kolokalizál nemcsak a szerotoninerg, hanem a GABAerg transzmisszió elemeivel is – gátló, szimmetrikus kapcsolatokat létesítve (Nakamura és mtsai 2004, Oliveira és mtsai 2003, Stornetta és mtsai 2005). Annak ellenére, hogy már számos sejtípus esetében igazolták a koexpresszált VGluT funkcióját, a szerotoninerg rendszeren belüli VGluT3 szerepéről alig tudunk valamit. A raphe-hippocampalis kapcsolatban a VGluT3-nak kitüntetett jelentősége lehet – mint ahogyan azt az előző alfejezetben feltételeztem –, és doktori munkám során erre kerestünk funkcionális bizonyítékot.

2. Célkitűzések

Doktori munkám során a raphe-hippocampalis kapcsolat glutamáterg komponensének a szerepét kutattuk *in vivo* kísérletekben.

Az egyes raphe-sejtek VGluT3-tartalma képessé teheti azokat glutamát kotranszmissziójára. Feltételezhetjük, hogy a kotranszmisszióra képes sejtek másképpen működnek, más a tüzelési aktivitásuk, mint a glutamáterg kotranszmissziót nem használó társaiknak. Ezért szeretnénk tisztázni, hogy a VGluT3-expresszáló raphe-sejtek milyen alapvető funkcionális, elektrofiziológiai tulajdonságokban különböznek a VGluT3-at nem tartalmazó raphe-sejtektől. Fontos következtetéseket vonhatunk le abból is, ha tisztázzuk, hogyan viszonyul az egyes raphe-sejtek aktivitása a hippocampus állapotához, illetve a hullámtevékenység fázisához, továbbá, szenzoros ingerlés befolyásolja-e működésüket. Ennek érdekében altatott állatokban MR-sejtek (illetve kiterjesztve a nucleus raphe paramedianusra is: median raphe régió, azaz MRR-sejtek – a továbbiakban ezt a kifejezést alkalmazom) alapaktivitását, és szenzoros ingerlésre adott válaszát regisztráltuk, majd e sejteket – a VGluT3- és szerotonin-tartalmuk későbbi immunhisztokémiai kimutatása érdekében – jelölőanyaggal feltöltöttük. E kísérletsorozattal az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A MRR VGluT3-expresszáló sejtjeinek tüzelési frekvenciája vagy variabilitása különbözik-e a szerotonintartalmú sejtjeiktől?
2. A MRR VGluT3-expresszáló sejtjeinek, illetve szerotoninerg sejtjeinek tüzelése függ-e a hippocampus állapotától, illetve a szenzoros ingerléstől?
3. A MRR VGluT3-expresszáló és szerotonintartalmú sejtjeinek kisülései kapcsolódnak-e a hippocampus hullámtevékenységének fázisához?

Második kísérletsorozatunkban a MRR efferenseinek a hippocampus interneuronjaira gyakorolt sejt szintű hatásait vizsgáltuk. Az interneuronok szelektív szinaptikus innervációt kapnak a raphe-rostoktól, ezért a potenciális, glutamáterg hatást célszerű

ezeket a sejteket keresni. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a raphe-rostok glutamáterg transzmissziója mivel egészíti ki a szerotoninerg jelátvitelt. Feltételezésünk szerint gyors jelátvitelt biztosít, ami szinaptikus kapcsolatot és gyors posztzinaptikus glutamát receptorokat is igényel. Ezzel a kísérletsorozatunkkal az alábbi kérdéseket szeretnénk tisztázni:

1. Mik a jellemzői a hippocampus interneuronjainak a MRR elektromos ingerlésével kiváltott gyors serkentésének? Mennyire megbízhatóan váltja ki a stimulálás ezt a választ, és milyen a lecsengése?
2. Függ-e az interneuronok reakciója a glutamáterg jelátviteltől? Az AMPA-típusú glutamát receptoroknak az elvezetett sejtre lokalizálódó farmakológiai blokádjának megváltoztatja-e a válasz karakterisztikáját? Mi az ionotrop 5-HT₃-receptor szerepe a hatásban?
3. Az interneuronok válasza összefüggésben van-e azok neurokémiai vagy elektrofiziológiai tulajdonságaival?

3. Módszerek

A kísérleti állatokkal végzett munka etikai vonatkozásai

Kísérleteimet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Agykéreg Kutatócsoportjában végeztem. A kísérletes beavatkozásokat a munkahelyi állatkísérleti etikai bizottság és a Budapest Fővárosi Állat-és Élelmiszerellenőrző Állomás engedélyezte, igazodva az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvényhez, továbbá az állatkísérletek végzéséről szóló 1998. évi 243. kormányrendeletre, valamint a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló, az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelvéhez. A kísérletek tervezése és kivitelezése során minden erőfeszítést megtettünk a részt vevő állatok esetleges fájdalmának, szenvedésének csökkentésére, illetve a lehető legkevesebb egyedet használtuk fel. Mind a MRR sejteinek elektrofiziológiai jellemzése, mind a raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatásának vizsgálata során felnőtt (testtömegük 200 és 500 gramm közé esett) hím Wistar patkányokkal dolgoztunk. Mindkét kísérletsorozatban az állatokat 0,007 ml/testsúlygramm dózissal, 20%-os uretán-oldat intraperitoneális injekciójával altattuk el, majd azokat sztereotaxiás célzókészülékbe fogtuk be, és a koponyatetőt az elektrofiziológiai kísérlethez feltártuk. Az állatok testhőmérsékletét a kísérletek alatt homeotermikus fűtőpaddal 37 Celsius-fokon tartottuk. Az uretán-altatás maximális ideje (a bealtatástól számítva a perfúzióig) 12 óra volt.

3.1. A MRR sejteinek elektrofiziológiai jellemzése

A MRR-sejtek aktivitása mellett a hippocampus és a prefrontalis kéreg lokális mezőpotenciálját is regisztráltam. Kontroll és szenzoros stimuláció alatti felvételeket követően a MRR-sejtet jelölőanyaggal feltöltöttem, majd az agyat fixáltam a sejt későbbi neurokémiai azonosítása céljából. Az egyértelműen azonosított, 5-HT- és VGluT3-tartalom szerint négy csoportba osztott sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait összehasonlítottam. A kísérletek túlnyomó részét én végeztem, az elsők némelyikénél témavezetőm segített a sejtjelölésnél. A szövettani feldolgozás kollégáim, Borhegyi Zsolt, Cserép Csaba, Papp Edit és Nyíri Gábor munkája. Az adatanalízist szintén én végeztem.

Lokális mezőpotenciál regisztrálása a hippocampusban és a prefrontalis kéregben

A koponyatetőn egy-egy csontfuratot készítettem a hippocampus (Paxinos és Watson 2005 szerinti – a továbbiakban is ezt a forrást használom – sztereotaxiás koordináták: bregma AP -4,5 mm és ML -2,5 mm vagy +2,5 mm) és a prefrontalis kéreg (sztereotaxiás koordináták: bregma AP +2,7 mm és ML +0,5 – +0,6 mm) fölé. Ezekre a lyukakon keresztül szigetelt acéldrótot ültettem be a helyi mezőpotenciálváltozás (LFP) monopoláris regisztrálása céljából. A beültetés során az elektródákat piezoelektromos mikromanipulátor segítségével, az agyfelszínre merőlegesen toltam le, hippocampus esetében az elektróda végét a dorsalis CA1 piramisrétegébe (agyfelszíntől 2300–2400 µm-re), prefrontalis kéreg esetében pedig annak infralimbikus részébe (agyfelszíntől 4500 µm-re) pozicionáltam. Az elektródákat a koponyához cink-foszfát-cementtel rögzítettem. Az elektróda végének helyét a kísérletek után minden esetben a szövettani feldolgozást követően ellenőriztem. Az LFP-t 2000–5000-szeresére erősítettem és 0,3–2000 Hz között szűrtem Supertech BioAmp váltóáramú erősítővel. Közös földként az állat nyaki bőre alá helyezett ezüstdrót szolgált. A kísérletsorozat legelső állataiban prefrontális kérgi elvezetés nem, csupán hippocampalis LFP-mérés készült.

Juxtacelluláris aktivitásmérés a MRR-ban

Harmadik, megközelítőleg 2 x 2 mm-es csontfuratot is készítettem a koponyatetőn, amely a MRR neuronjainak aktivitását regisztráló juxtacelluláris elektróda bevezetésére szolgált. Kísérleteim során kétfajta pozícióból közelítettem meg a MRR-t. Eleinte dorsolaterális irányból (sztereotaxiás koordináták: lambda AP +1,0 mm és ML -1,4 – -2,0 mm, 15 fokban döntve) céloztam, viszont ekkor gyakran a MRR-től oldalra eső agytörzsi területeket találtam el. Később áttértem a középvonali, dorsocaudalis irányból (sztereotaxiás koordináták: lambda AP -2,6 mm és ML 0 mm, 30 fokos szögben) történő célzásra, mely hatékonyabbnak bizonyult. A juxtacelluláris aktivitásmérésre használt filamentumos boroszilikát mikroelektródát (1,5 mm külső és 0,75 mm belső átmérőjű) mindig frissen, a kísérlet előtt készítettem Sutter P-87 elektródahúzóval. A mikroelektróda vékony végét fénymikroszkóp alatt letörtem, hogy az *in vivo*, agyban mért ellenállása 20–45 MOhm közé essen. Az elektródát 2% Neurobiotint tartalmazó 0,5 M NaCl-oldattal töltöttem meg, hogy az elvezetett sejteket későbbi neurokémiai azonosítás céljából jelölőanyaggal feltölthessem. A MRR sejtjeire (mindkét elektróda-bevezetési pozíció esetében) az agyfelszíntől számítva 6900–8500 μm mélységben számítottam, és ebben a tartományban az elektródát a piezoelektromos mikromanipulátor segítségével 0,8-1 $\mu\text{m/s}$ sebességgel mozgattam. A mikroelektróda jelét AgCl-ozott ezüstszállal vezettem az előerősítőbe, földelésként a LFP-regisztrálásnál is használt, nyaki bőr alá illesztett ezüstszálat használtam. A jelet 500-1000-szeresére erősítettem és 100–5000 Hz között szűrtem AxoClamp 2B egyenáramú erősítővel, valamint Supertech LinearAmp jelkondicionálóval. Mind a juxtacelluláris elvezetés jelét, mind a LFP-t 10 kHz-es mintavételezéssel 16 bites feloldással, Spike2 szoftver vezérlésével és CED Micro1401 mkII vagy CED Micro3 1401 analóg-digitális átalakítóval digitalizáltam.

Szenzoros stimulálás

A MRR-neuronok spontán aktivitását 2-10 percig regisztráltam (egyetlen sejt esetében 1 perc spontán aktivitást mentettem). Ezután a farokcsípés – mint szenzoros stimulálás – kiváltotta aktivitásváltozást figyeltem meg, a farokcsípést minden esetben ugyanazzal,

ragasztószalag körbetekerésével tompított fogazatú krododilcsipesz segítségével végeztem 30 s hosszan, 5 esetben pedig 60 s hosszan. Amennyiben az első farokcsípés nem váltott ki agyiállapot-átmenetet, legalább 1 perc várakozási idő elteltével megismételtem a farokcsípést erősebb csipesszel.

Sejtjelölés

A MRR-neuronok spontán és szenzoros stimulálás alatti aktivitásának regisztrálása után a 301 felhasznált kísérleti állatból 166 esetben jutottunk el a sejtjelölésig, vagyis a sejt Neurobiotinnal való feltöltéséig. Sejtjelölés során $-0,5 - -0,9$ nA tartóáram mellett 1 és 20 nA között addig növeltük a 200 ms-onként ismétlődő és 200 ms hosszú injektáló áramimpulzusok amplitúdóját, amíg azokkal a sejt kisüléseit vezérelni nem tudtuk. Szükség esetén az injektáló áram erősségét a sejtválasz függvényében ezután is változtattuk. A jelölés időtartama 2–10 perc közé esett. Sikeres jelölés után az injektáló áramot felfüggesztettem, és a sejt reakcióját figyelembe véve a negatív tartóáramot is lassan csökkentettem, eközben szintén nagyon lassú sebességgel távolodtam az elektródával a sejttől. Sikertelen jelölés esetén újabb MRR-sejtek után kutattam, a jelölési próbálkozás és az újabb elvezetés között legalább 100 μm távolságot tartottam, hogy a szövettani feldolgozás után egyértelműen rekonstruálni lehessen, melyik sejtet vezettem el.

Szövettani feldolgozás

A patkányok vérért transzkardiálisan fiziológiás sóoldattal kimostam, ezt követően 4%-os paraformaldehid-oldattal vagy Zamboni-oldattal (4% paraformaldehid, 15% pikrinsav és 0,05% glutáraldehid 0,1 M foszfátpufferben, pH = 7,4) 20 percen keresztül perfundáltam azokat. A sejtjelölés és a perfúzió közötti túlélési idő 10-150 perc között változott. A fixált agyakat 7,4-es pH értékű, 0,1 M foszfátpufferrel átmostuk, majd 40-80 μm vékony coronalis szeletekre metszettük. A foszfátpufferrel végzett többszörös átmosás után a metszetekkel trisz(hidroximetil)aminometánt tartalmazó fiziológiás sóoldatban (TBS, pH = 7,4) dolgoztunk tovább, tehát minden antitest-inkubációt ilyen oldatban végeztünk. A Neurobiotinnal jelölt sejteket Alexa488-konjugált Streptavidin-

festéssel (1:2000 arányban hígítva) vizualizáltuk, a sejtek szerotonintartalmának megállapítására a nyúl 5-HT-ellenes antitestjét (1:10000 hígításban) és a szamár DyLight405-konjugált nyúlelles antitestjét (1:4000 hígításban), továbbá a VGluT3-expresszió megjelenítésére a hörcsög VGluT3-ellenes antitestjét (1:2000 hígításban) és a szamár Cy3-konjugált hörcsögellenes antitestjét (1:200 hígításban) használtuk. Az immunhisztokémiai festések fluoreszcens jelét Olympus DP70 CCD-kamerával felszerelt Zeiss Axioplan2 mikroszkóppal vagy egyes esetekben Nikon A1R konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A fluoreszcens jelek kiértékelése után a Neurobiotin-jelölést biotinilált avidin-tornaperoxidáz komplexszel (Elite ABC, Vector Laboratories) katalizált DAB (2,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid)-nikkel kromogén képződésével erősítettük. Ezzel a módszerrel a 166 sejtjelöléses kísérletből 78 állat esetében találtunk jelölt sejtet. Némelyik állatban két neuront is jelöltünk, és azonosítottunk. Azokat a kísérleteket, amelyekben egyértelműen nem sikerült azonosítani a jelölt sejtet, vagy ahol a sejtjelölés a MRR-n kívül esett, az adatelemzésből kizártuk. Az így maradt 60 MRR-neuronból csak azokkal dolgoztunk tovább, amelyeknek a neurokémiai azonosítása is egyértelműen megtörtént, így a munkámnak ennek a kísérletsorozatában összesen 23 MRR-sejt adatait dolgoztam fel.

Adatelemzés

A Spike2 szoftver beépített mintázatkereső modulja segítségével, manuális ellenőrzés mellett detektáltam az azonosított sejtek akciós potenciáljainak pozitív csúcsát. Ezután a Spike2-fájlok adatait MATLAB környezetbe exportáltam, és minden további analízist ott végeztem a saját magam által írt programok segítségével. A sejtjelölés során mentett adatokat további elemzésre nem használtam fel.

Akciós potenciálok átlagos hossza. Az akciós potenciálok átlagos hosszának meghatározásához az eredeti 10 kHz-cel mintavételezett adatsorok adatsűrűségét lineárisan 1 MHz-re növeltem, majd az akciós potenciálok pozitív csúcsai körüli 10 ms-

os időablakban átlagoltam a jelet, és az átlaggörbe amplitúdójának felénél mértem annak szélességét. A sejtek alapaktivitása és szenzoros ingerlése során regisztrált akciós potenciálokat egyaránt felhasználtam ehhez az elemzéshez.

Sejtaktivitás a hippocampalis állapot függvényében. Uretán-altatásban két fontos hippocampalis működési állapot figyelhető meg: a) theta-állapot 2,5–6 Hz-es hullámok dominanciájával és b) nem-theta-állapot az előbbinél lassabb hullámokkal. A MRR-sejtek alapaktivitásának vizsgálata során figyelembe vettem e két állapotot, melyeket a hippocampalis LFP folytonos wavelet-transzformátumának spektrális összetétele alapján különítettem el. Az analízishez először az LFP-jelet 400 Hz-es mintavételi frekvenciára alulmintavételeztem, valamint az 50 Hz-es, esetleges elektromos hálózati zajt 2048-rendű, zéró-fázisú digitális szűrővel (az ehhez szükséges osztandó koefficiensvektort a MATLAB beépített, véges impulzusválaszú szűrőelrendezéshez alkalmazható fir1 generátorával hoztam létre) kiszűrtem, majd a jelet a kísérletek közötti összehasonlíthatóság kedvéért standardizálással normalizáltam (az eredeti jelből annak átlagát kivontam, majd a szórással osztottam). Az ilyen módon előkészített jelből számoltam ki exponenciálisan növekvő skálázással a wavelet-transzformátumot Torrence és Compo algoritmus alapján, Morlet-bázisfüggvény felhasználásával (Torrence és Compo 1998). Az exponenciálisan változó skálák összehasonlíthatósága céljából Liu módszerével normalizáltam a wavelet-transzformátumot: minden időpontban a wavelet-transzformátum skálánkénti teljesítményét elosztottam a vonatkozó skálaszélességgel (Liu és mtsai 2007). Theta-állapotot definiáltam, ha az adott időpontban a wavelet-transzformátum normalizált teljesítményének a 2,5–6 Hz-hez tartozó skálákban nagyobb volt az összege, mint a 0,9–2,5 Hz-hez tartozó skálákban. Egyéb esetben pedig nem-theta-állapotot határoztam meg.

A MRR-sejtek akciós potenciáljait szétválogattam aszerint, hogy theta- vagy nem-theta-állapot alatt fordultak elő. A két különböző állapotban külön jellemeztem a sejtek tüzelési aktivitását a tüzelési frekvenciával (kisülések száma időegység alatt), az akciós potenciálok közötti időtartamok eloszlásának variációs koefficiensével (szórás és

középérték hányadosa) és Shannon-entrópiájával. Ez utóbbi a tüzelési mintázat információtartamára utaló mérték, amely bizonyos esetben jobban érzékelteti a tüzelés variabilitását, mint a variációs koefficiens (Ditlevsen és Lansky 2011). Számolása során az akciós potenciálok közötti időtartamokat, mint eseményeket intervallumokba csoportosítjuk. Az optimális intervallumszélességet a vastag szélű (heavy tailed) eloszlásokra – mint amilyen a neuronok kisülési gyakorisága is – jól alkalmazható Freedman–Diaconis-szabály (Freedman és Diaconis 1981) segítségével mindegyik sejtre külön-külön határoztam meg. A csoportokba osztott események gyakoriságának és a gyakoriság kettes alapú logaritmusának szorzatai összegének abszolút értéke adja meg a Shannon-entrópiát. Abban az esetben, ha valamelyik sejt a theta- vagy a nem-theta-állapot alatt egyáltalán nem tüzelt, a variációs koefficiens és a Shannon-entrópia értékét 0-nak állítottam be. Az akciós potenciálok közötti azon intervallumokat, amelyek éppen állapotátmenetre estek, az elemzésekben nem vettem figyelembe.

Sejtaktivitás a szenzoros ingerlés függvényében. A MRR-sejtek tüzelési aktivitását a szenzoros ingerlés függvényében is vizsgáltam. Az ingerlést megelőző alapállapotot a hippocampalis theta- vagy nem-theta-állapotokra való tekintet nélkül egyként kezeltem. A sejtek tüzelési aktivitását alapállapotban és a szenzoros ingerlés alatt ugyanazokkal a paraméterekkel jellemeztem, mint a fentebb bemutatott hippocampalisállapot-függés vizsgálata során (tüzelési frekvencia, akciós potenciálok közötti időtartamok eloszlásának variációs koefficiense és Shannon-entrópiája). Amennyiben valamelyik sejt alapállapotban vagy ingerlés során egyáltalán nem tüzelt, a variációs koefficiens és a Shannon-entrópia értékét szintén 0-nak állítottam be.

Az előbbieken túl a MRR-sejtek szenzoros stimulusra adott válaszát a következő két változóval is jellemeztem: a) átmeneti változás, amit a farokcsípés kezdetétől számított első (0–1 s közötti) és első 5 másodperc (0–5 s közötti) alatti normalizált tüzelési frekvencia hányadosaként számoltam, b) tartós változás, amit a farokcsípés előtti 0–15. másodperc közötti, valamint a farokcsípés kezdetétől számított 1–16. másodperc közötti normalizált tüzelési frekvencia különbségeként határoztam meg. A tüzelési frekvencia

normalizálásához azt a vizsgált időintervallum legmagasabb értékével osztottam. Az adatanalízis során csak azokat a farokcsípéseket vettem figyelembe, amelyek hatására a hippocampusban theta-aktivitás alakult ki. Egyetlen sejt esetében nem végeztem farokcsípést, így ennek az adatait a szenzoros stimulálás hatásainak elemzése során értelemszerűen nem használtam fel.

Ritmikus tüzelés. A ritmikus tüzelés jeleit az akciós potenciálok autokorrelogrammjában kerestem. Az autokorrelogrammok készítése során az akciós potenciálok körüli 4 másodpercben 50 milliszekundumos intervallumonként számoltam a kisülés valószínűségét. Meghatároztam, milyen frekvencia jellemzi az eloszlásfüggvényt a csúcsok közötti időtartam alapján. A sejtek alapaktivitását és a szenzoros ingerlés alatti kisüléseket ebben az esetben is szétválasztottam.

A sejtaktivitás fázispreferenciája. Egy sejt akciós potenciáljai és egy adott oszcilláció valamely fázisa közötti szignifikáns időbeli kapcsolat a fázispreferencia. Elemzéseimben a MRR-sejteknek a hippocampus, illetve a prefrontalis kéreg oszcillációinak fázisához való kapcsoltságát vizsgáltam, elkülönítve az alapállapotot és a szenzoros ingerlés alatti aktivitást. Az LFP folytonos wavelet-transzformátumában az akciós potenciálok csúcsainak megfelelő időpontokban megkerestem a legnagyobb spektrális teljesítményhez tartozó frekvenciasávot, amelyet domináns frekvenciának neveztem, és meghatároztam a hozzájuk tartozó pillanatnyi fázisértékeket. A theta-oszcilláció csoportjába a 2,5–6 Hz közé eső, a nem-theta-oszcilláció csoportjába pedig a 0,9–2,5 Hz közé eső domináns frekvenciákhoz tartozó fázisértékeket soroltam. A két csoporton belül a fáziseloszlást Watson-teszttel vizsgáltam, az egyenletes eloszlástól szignifikánsan eltérő esetekben kiszámoltam az átlagos fázist és a hozzá tartozó átlagos vektorhosszt. Abban az esetben, ha valamely sejtnél alapállapotban vagy szenzoros ingerlés során legalább 50 akciós potenciál nem fordult elő, az adott állapot adatait nem használtam fel a fázispreferencia elemzéséhez. A theta- vagy nem-theta-csoportba sorolásnál a minimumkritérium 40 akciós potenciál volt.

Statisztikai összehasonlítás. A VGluT3(+)/5-HT(-), a VGluT3(+)/5-HT(+), a VGluT3(-)/5-HT(+), valamint a VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek csoportkülönbségeit egyszempontos nemparaméteres Kruskal-Wallis ANOVA segítségével kerestük, majd a páronkénti szignifikáns eltéréseket Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával határozzuk meg. Egy adott csoportnak két állapot közötti összehasonlítását előjel-teszttel végeztük. Az ábrákon a sejtenkénti adatokat, a csoportok középértékét és az interkvartilis tartományt jelenítettem meg. A kísérletsorozathoz tartozó adatokat minden egyes sejtre (és körülményre) vonatkozóan ábrázoltam az eredmények bemutatása során, a szövegben pedig csak a releváns középértékeket tüntettem fel (az elemszámból fakadóan szórást vagy a szórás standard hibáját nem számoltuk ki, helyette minden egyes értéket ábrázoltam).

3.2. A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása

Ezekben a kísérletekben hippocampalis neuronok elektrofiziológiai aktivitását regisztráltuk juxtacelluláris elektródával, miközben elektromosan stimuláltuk a MRR-t. LFP-elvezetéssel a hippocampus hálózati aktivitását is nyomon követtük. Kísérleteink jelentős részében farmakológiai tesztekkel vizsgáltuk a regisztrált hatás kialakításáért felelősnek tartott receptorok szerepét. Az elvezetett neuronokat későbbi neurokémiai azonosítás céljából jelölőanyaggal feltöltöttük. A kísérletek harmadát végeztem én, ezeknek egyes lépései során témavezetőm segítségét nyújtott. A doktori munka keretében bemutatott szövettani feldolgozás Borhegyi Zsolt munkája. Az adatanalízis fő részét Hangya Balázs és témavezetőm, Varga Viktor végezte.

Lokális mezőpotenciál regisztrálása a hippocampusban

A hippocampus dorsalis CA1 areájának mintavételezése hasonlóan történt, mint ahogy azt a MRR sejtjeinek elektrofiziológiai jellemzéséhez végzett kísérletek módszerei között fentebb leírtam. A koponyatetőn egy csontfuratot készítettünk a jobb oldali hippocampus (sztereotaxiás koordináták: bregma AP -4 mm és ML -2,5 mm) fölé, ezen keresztül piezoelektromos mikromanipulátor segítségével szigetelt acélodrótot ültettünk be a dorsalis CA1 (az agyfelszíntől merőlegesen 2100-2400 μm -re) LFP-jának monopoláris regisztrálása céljából. Az elektródát szintén rögzítettük a koponyához cink-foszfát-cementtel. Az elektróda végének helyét minden kísérlet után a szövettani feldolgozást követően ellenőriztük. Az LFP-t 2000-szeresére erősítettük és 0,3–2000 Hz között szűrtük Supertech BioAmp váltóáramú erősítővel. Földként az állat nyaki bőre alá helyezett ezüstdrót szolgált.

A MRR elektromos ingerlése és a hippocampalis sejtjek aktivitásának regisztrálása

Elektromos ingerlés céljából bipoláris volfrámelektrodát ültettünk be a MRR-ba, melyhez előtte szintén kellett egy csontlyukat fúrni (sztereotaxiás koordináták: lambda +1 mm, középvonalban). Az ingerlő elektródát a sztereotaxiás készülék manipulátorával, lassú manuális mozgatással az agyfelszíntől 7,5-7,8 mm-ig

derékszögben toltuk le, és a kísérlet végéig ebben a manipulátorban maradt rögzítve, nem ragasztottuk az állat koponyájához. Az elektróda ceruzahegyszerű végén az egyik pólus koncentrikusan körülölelte a másik pólust, amely 100 μm -rel (vagy egyes kísérletekben 500 μm -rel) mélyebbre ért. Az elektromos ingerlés 0,2 ms vagy 1 ms hosszú négyszögjelét AMPI Iso-Flex stimulusizolátor állította elő, melyet CED Micro1401 mkII analóg-digitális jelátalakító kimeneti pulzusaival szabályoztunk. A stimulálás során 1 Hz-es ismétléssel 18–120 másodpercig adtuk a négyszögjelek sorozatát, egy-egy jelsorozatban pedig az áramerősséget 0,2, 0,5, 0,7 vagy 1 mA-ra állítottuk be. Két ilyen jelsorozat között a megelőző sorozat hosszának legalább kétszerese telt el.

Az elektromos ingerlés előtt először hippocampalis idegsejtet kerestünk juxtacelluláris elvezetési technikával. A sejt alapaktivitásának regisztrálása után következett az elektromos stimulálás, ezután pedig – egyes kísérletekben – farmakológiai tesztet végeztünk. Végül a sejt Neurobiotin jelölőanyaggal való feltöltése következett későbbi neurokémiai azonosítás céljából.

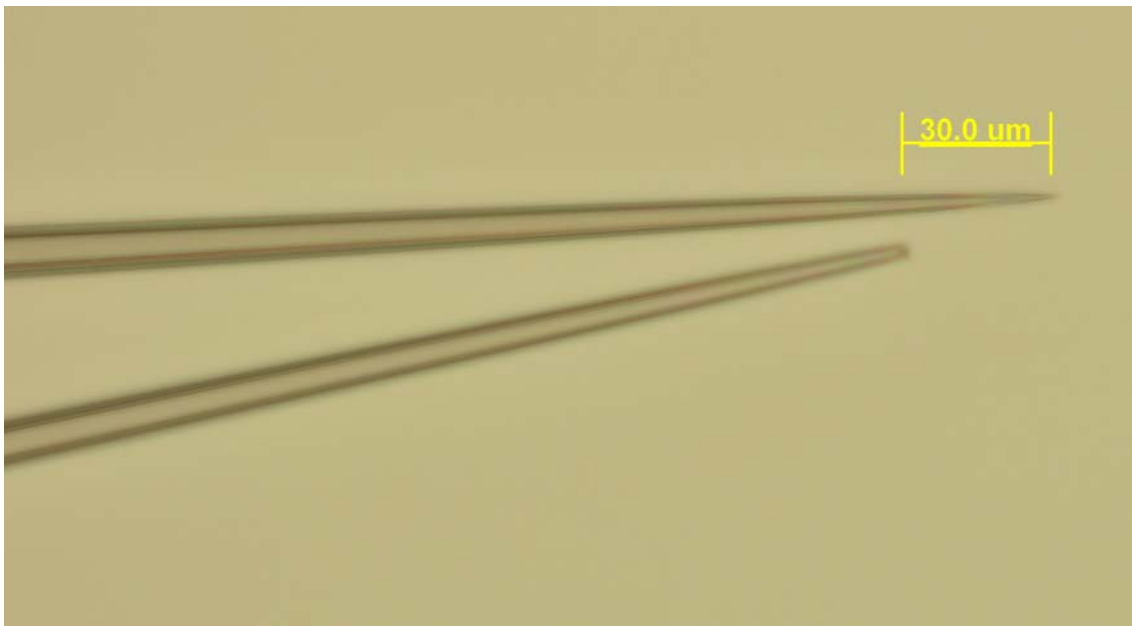
Juxtacelluláris aktivitásmérés a hippocampusban

A hippocampus sejtjeinek juxtacelluláris aktivitásmérése hasonló technikával történt, mint ahogyan azt a MRR sejtjeinek elektrofiziológiai jellemzéséhez végzett kísérletek módszerei részleteztem. Ebben az esetben a 2 x 2 mm-es csontfuratot a bal oldali hippocampus dorsalis CA1 areájá fölé készítettük (sztereotaxiás koordináták: bregma AP -4,0 mm és ML +2,5 mm). A mérés előtt húzott majd letört végű filamentumos boroszilikát mikroelektródát ezekben a kísérletekben is 2% Neurobiotint tartalmazó 0,5 M NaCl-oldattal töltöttük meg, *in vivo* mért ellenállása szintúgy 20–45 MOhm közé esett. Az elektródát piezoelektromos mikromanipulátorral, 0,8-1 $\mu\text{m}/\text{s}$ sebességgel mozgattuk az agyszövetben, a hippocampalis sejtekre az agyfelszíntől 2000 – 4200 μm mélyen számítottunk. Földként a LFP-mérésnél is használt nyaki bőr alá illesztett ezüstsál szolgált. A jel erősítési és szűrési paraméterei megegyeztek a MRR-sejtek aktivitásmérésénél leírtakkal (500-1000-szeres erősítéssel 100–5000 Hz között

átengedve a szűrőn). A juxtacelluláris elvezetés jelét és az LFP-t minden esetben 16 bites feloldással Spike2 szoftverrel vezérelt CED Micro1401 mkII analóg-digitális átalakítóval digitalizáltuk, egyetlen kísérlet esetében 11,11 kHz-es, a többi esetben pedig 10 kHz-es mintavételezéssel.

Farmakológiai tesztek

Egyes kísérleteinkben a juxtacelluláris aktivitásmérő elektróda mellé egy másik boroszilikát-elektrodát is illesztettünk AMPA-típusú glutamát-receptor blokkolójának iontoforézise céljából. Az iontoforézis-elektrodát ugyanabból a boroszilikát üvegből húztuk, mint a juxtacelluláris elvezetéshez használt mikroelektrodát, viszont a végét jobban letörtük, hogy az átmérője megközelítőleg 3–4 μm legyen (szemben a juxtacelluláris mikroelektroda hegyének 1 μm körüli átmérőjével). Az iontoforéziselektroda vékony nyakát ívmelegítő alatt meghajlítottuk, hogy a két üvegelektroda egymás mellé pozícionálva kisebb szöget zárjon be. A végüket egymástól fénymikroszkópos ellenőrzés mellett 10–30 μm távolságra állítottuk be, majd egy üveg tárgylemez kis darabja segítségével pillanatragasztóval egymáshoz ragasztottuk az elektrodákat. Az iontoforéziselektrodát fiziológiás sóoldatban (0,9 %) feloldott



3.2.1. ábra. A farmakológiai tesztekhez használt iontoforézis (alsó, vastagabb végű) és juxtacelluláris elvezető üvegelektroda (felső, vékonyabb végű) hegye. A másik végükön a két üvegelektrodát egy üveglap segítségével egymáshoz ragasztottuk.

dinátrium-2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalin-7-szulfonamiddal (NBQX) töltöttük meg, miután az oldat kémhatását 8 – 9 közötti pH-értékre állítottuk be. Ebben a lúgos közegben az NBQX anion formában van jelen, és így negatív árammal iontoforetizálható. Az iontoforéziselektrodába – csakúgy, mint a juxtacelluláris elektróda esetében – AgCl-ozott ezüstszálat tettünk, és az AxoClamp 2B egyenáramú erősítőre kötöttük. A kísérletek során a farmakológiai teszt előtt 5 nA pozitív tartóárammal ellensúlyoztuk az ionok kiáramlását az elektródából. A farmakológiai teszt során pedig -40, -50 vagy -80 nA negatív áramot kapcsolunk a mikroelektrodára, ezzel a juxtacelluláris elektróda által elvezetett sejt környezetébe iontoforetizálva az NBQX-et. Az iontoforézis, illetve a tartóáram alkalmazása nem terhelte zajjal a juxtacelluláris elvezetés jelét. A NBQX iontoforézisének kezdete után 2–5 perccel kezdtük el az újabb elektromos ingerlést, maga az iontoforézis pedig 3–6 percig tartott. Ezután 8 nA pozitív tartóáramot kapcsolunk az iontoforéziselektrodára. Ennek a fajta iontoforéziselektrodának a hatékonyságát a laboratóriumunk egy korábbi munkájában már igazolta (Varga és mtsai 2008).

Kísérleteink egy részében 5-HT₃ receptor antagonistájával is teszteltük a MRR elektromos ingerlésére adott hippocampalis választ. Ondansetront oldottunk fel fiziológiás sóoldatban, és 1-2 mg/testsúlykg dózisban intraperitoneálisan injektáltuk. Az injekció után 5, 10 majd 15 perccel elektromosan ingereltük a MRR-t.

Sejtjelölés

A hippocampalis sejteket az alapaktivitásuk, továbbá az elektromos ingerlésre, illetve a farmakológiai tesztekre adott válaszuknak regisztrálása után megkíséreltük Neurobiotin jelölőanyaggal feltölteni. A sejtjelölés módszere megegyezik a MRR-neuronok sejtjelölésénél leírtakkal. Jelen kísérletsorozatban az átlagos jelölési idő 5 perc volt.

Szövetani feldolgozás

A sikeres sejtjelölés után 10-30 perccel az állatok vérét transzkardiálisan fiziológiás sóoldattal kimostuk, majd glutáraldehides Zamboni-oldattal 20 percen keresztül

perfundáltuk azokat. A hippocampusok blokkja ki lett vágva a fixált agyakból, és az éjszaka alatt glutáraldehidmentes fixálóoldatban posztfixáltuk. A posztfixált blokkokat 60 µm vékony szeletekre vágtuk, 0,1 M foszfátpufferben többször átmostuk, majd ezután átvittük a szeleteket TBS-be, és minden antitest-inkubációt TBS-ben végeztünk. A jelölt sejt megkereséséhez a hippocampus-metszeteket Alexa488-konjugált Streptavidin (1:3000 hígításban), triton X-100 (0,1%) és ABC (1:800 hígításban) oldatával inkubáltuk 2 órán át, majd fénymikroszkópban megkerestük azokat a metszeteket, amelyekben Neurobitin-sejtjelölés látszódott. A további lépésekben már csak ezeken a metszeten végeztünk immunhisztokémiai festéseket. A sejt lokalizációjától és in vivo aktivitásmintázatától függően választottunk antitesteket: kolecisztokinin-ellenes egér antitesttel (1:2000 hígításban), szomatosztatin-ellenes patkány antitesttel (1:100 hígításban), P-anyag receptora, illetve kalbindin D28k-ellenes egér antitesttel (1:1000 hígításban) inkubáltuk a metszeteket az éjszaka során. Másnap, átmosás után a vizualizációhoz a metszeteket kísérletenként változó szekunder antitesttel inkubáltuk 2 órán át, melyekhez a következő fluoreszcens jelölőmolekulák voltak konjugálva: AMCA (1:50 hígításban használtuk), Cy3 (1:200 hígításban), Alexa488 (1:200 hígításban), Alexa594 (1:200 hígításban) vagy Alexa350 (1:50 hígításban). Átmosást követően VectaShield médiumban tárgylemezre húztuk a metszeteket, és Olympus DP70 CCD-kamerával felszerelt Zeiss Axioplan2 epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, valamint kifényképeztük a Neurobitin-jelölt sejteket és az elvégzett immunhisztokémiai reakció eredményét. Ezután a metszeteket 2 órára újra ABC-oldatban (1:400 hígításban) inkubáltuk, és a Neurobitin-jelölést DAB-nikkel kromogén képződésével erősítettük. Végül a metszeteket dehidráltuk, és tárgylemezen Durcupan gyantába beágyasztuk.

Adatelemzés

A Spike2-fájlok adatait MATLAB környezetbe exportáltuk, és minden analízist ott végeztünk a saját munkacsoportunkban készített programok segítségével. Az elvezetett sejtek akciós potenciáljainak csúcsát amplitúdó alapján detektáltuk. Az azonosított hippocampalis sejtek mellett felhasználtuk azoknak a Neurobitinnal nem jelölt, de

elvezetési koordináták alapján hippocampusban lévő sejteknek az adatait is, amelyeknél az alapaktivitás regisztrálása után elektromos MRR-ingerlést végeztünk. Ez utóbbi, nem jelölt sejteket két csoportra, (feltételezett) principális sejtekre és (feltételezett) interneuronokra osztottuk az alábbi elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján: a) tüzelési frekvencia (kisülésszám időegység alatt), b) az akciós potenciál hossza (az akciós potenciálok átlaggörbéje amplitúdójának felénél mért szélessége), c) komplex kisüléssorozat jelenléte (általában 2-3, egyre csökkenő amplitúdójú akciós potenciál, melyek között az időtartam egyre hosszabbodik, példát lásd a 4.2.2. ábrán). A principális sejtek ugyanis átlagosan 1 Hz-nél lassabb frekvenciával sülnek ki, akciós potenciáljaik 1 ms-nál hosszabbak és jellemzőek rájuk a komplex kisüléssorozatok, szemben az 1 Hz-nél gyorsabban, 1 ms-nál rövidebb akciós potenciálokat tüzelő interneuronokkal.

Sejtaktivitás a hippocampalis állapot függvényében. Hasonlóan a MRR-sejtek elektrofiziológiai jellemzése során leírtakhoz, ebben a kísérletsorozatban is theta- és nem-theta állapotot különböztettünk meg a hippocampusban az LFP folytonos wavelet-transzformátumának spektrális összetétele alapján. A wavelet-analízis előtt az eredeti LFP-jelet 400 Hz-re alulmintavételeztük, az 50 Hz-es, elektromos hálózati zajt zérófázisú digitális szűrővel kiszűrtük, végül standardizálással normalizáltuk (részleteket lásd fentebb a 3.1. alfejezetben). Az exponenciálisan skálázott wavelet-transzformátumot szintén Torrence és Compo algoritmus alapján, Morlet-bázisfüggvény felhasználásával állítottuk elő (Torrence és Compo 1998). A wavelet-transzformátumban minden egyes időpontban megkerestük a legnagyobb spektrális teljesítményű skálához tartozó frekvenciaértéket, melyet domináns frekvenciának nevezünk. Theta-állapotot definiáltunk abban az esetben, ha a domináns frekvencia legalább 3 s-ig folyamatosan 2,5–6 Hz közé esett. Továbbá, ha az így meghatározott thetaállapot-szegmensek közé 500 ms-nál nem hosszabb olyan szakasz került, amelyben a domináns frekvencia a 2,5–6 Hz-es tartományon kívülre esett, azt is a theta-állapothoz soroltuk. Nem-theta-állapotot definiáltunk, ha a domináns frekvencia legalább 3 s-ig folyamatosan a 2,5–6 Hz-es tartományon kívülre esett. A theta-, illetve a nem-theta-

állapotok e módon megkeresett szegmenseiből a további analízishez a leghosszabbakat használtuk fel. Az elvezetett sejtek állapotfüggő aktivitását a kiválasztott theta- és nem-theta-szegmensek alatti akcióspotenciál-sorozatok jellemzésével vizsgáltuk. Meghatároztuk a tüzelési frekvenciát (kisülésszám időegység alatt), a theta-modulációt (a kisüléssorozat autospektrumában a 2,5–6 Hz közötti frekvenciatartomány spektrális teljesítménye viszonyítva a többi frekvencia spektrális teljesítményéhez), valamint a theta-oszcilláció fázisának preferenciáját (számolásának részleteit lásd fentebb a 3.1. alfejezetében, jelen esetben is meghatároztuk az átlagos fázist és az átlagos vektorhosszt).

MRR elektromos ingerlésének hatása a hippocampalis sejtek aktivitására. Az elektromos ingerlést vezérlő 1 Hz-cel ismétlődő négyszögjelek felszálló szárának megfelelő időpontokat rögzítettük az analóg-digitális jelátalakítóval. Ezekhez az időpontokhoz viszonyítva a két pulzus közötti 1 s-ban 1 ms-os intervallumonként meghatároztuk az elvezetett sejtek akciós potenciáljainak eloszlását (egyetlen sejt esetében az intervallum 10/11 ms volt a 11,11 kHz-es mintavételezés miatt). Kontrollként az elektromos ingerlést megelőző regisztrátumokat is 1 s-os szegmensekre osztottuk, utánozva a stimuláló pulzusok ismétlődését. Ezekben a szegmensekben szintén 1 ms-os intervallumonként (kivéve azt az egy esetet, ahol a mintavételezés miatt 10/11 ms-os intervallumokkal kellett dolgoznunk) kiszámoltuk az akciós potenciálok eloszlását, és összehasonlítottuk az elektromos ingerlés alatt kapott értékekkel. Ha az egy intervallumra eső legnagyobb eseményszám az elektromos ingerlés alatt nagyobb volt, mint a kontroll regisztrátumban, a MRR-ingerlést a hippocampalis sejtek aktiválásában hatásosnak tartottuk, a hatékonyság mérőszámaként pedig a két eseményszám arányát határoztuk meg. Abban az esetben, ha a fenti módon detektált aktiváció az elektromos pulzusokat követő 50 ms-on belülre esett, a további paraméterek kiszámolásához a pulzusokat követő 50 ms-on belüli eseményeket vettük figyelembe. Ha ez az aktiváció még gyorsabb volt, a pulzusokat követő 20 ms-on belül észleltük, csupán a pulzusokat követő 20 ms eseményeivel számoltunk. A stimulálás sikerrátájaként megadtuk, hogy az ingerlő pulzusok hány százalékát követte akciós

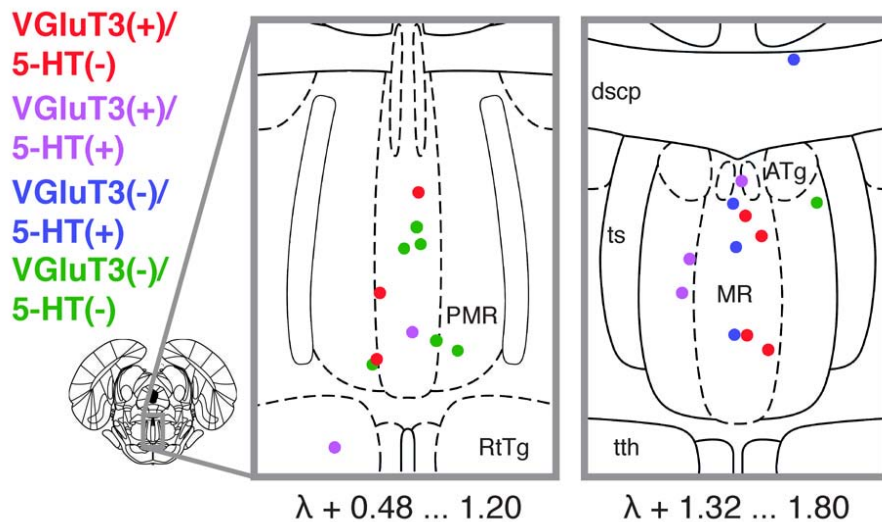
potenciál az előbb említett 20 vagy 50 ms-os időablakban. A hatás latenciájaként a pulzusok és az azokat követő akciós potenciálok közötti átlagos időtartamot számoltuk, továbbá, az időtartamok szórása, valamint a legrövidebb és a leghosszabb időtartam közti különbség pedig a hatás fókuszáltságáról adott információt. A farmakológiai tesztek hatásának vizsgálata során az antagonistá iontoforézise vagy injektálása előtti, alatti és utáni elektromos stimulálások sikerrátáját, a kiváltott válasz latenciáját és szórását, valamint a legrövidebb és leghosszabb latencia közötti időtartamot hasonlítottuk össze. Megvizsgáltuk, hogy önmagában az antagonitáknak (NBQX, illetve ondansetron) az elvezetett sejtek tüzelési frekvenciájára gyakorolt hatása magyarázhatja-e a MRR elektromos stimulálását követő esetleges alacsonyabb kisülésszámot. Ehhez a hippocampalis theta- és nem-theta-állapotok alatti eseményeket külön kezeltük, továbbá az egyes sejtek esetében minden egyes elektromos stimulálási szakaszra meghatároztuk a két változás korrelációját.

Statisztikai összehasonlítás. A kiváltott válasz jellemzéséhez az adatok átlagát és az átlag standard hibáját számoltuk ki, amelyeket a szövegben feltüntettem. A csoportok közötti szignifikáns különbséget Mann-Whitney U-teszttel, a csoporton belüli állapotok között pedig Wilcoxon-féle rangpróbával kerestük.

4. Eredmények

4.1. A MRR sejtjeinek elektrofiziológiai jellemzése

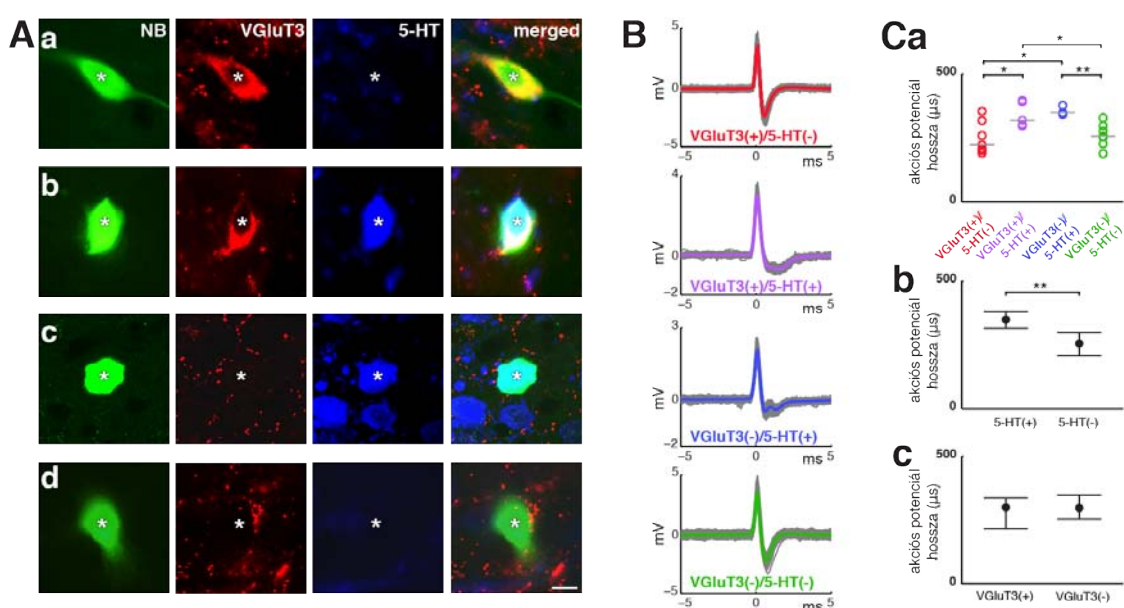
A kísérleteink eredményeképpen a MRR-ban lévő 60 Neurobiotinnal jelölt sejt közül annak a 23-nak az adatait elemeztem, amelyek egyértelmű neurokémiai azonosítása is megtörtént. Ezeket a 5-HT- és a VGluT3-tartalom alapján négy csoportba osztottam: 7 neuron VGluT3-pozitivitást mutatott, 5-HT-t viszont nem termelt (VGluT3(+)/5-HT(-) sejtek), 5 neuron mindkettőt (VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek), 4 neuron csak 5-HT-t tartalmazott (VGluT3(-)/5-HT(+) sejtek), és 7 további neuron pedig mindkét markerre nézve negatívnak bizonyult (VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek, részletesen lásd a 4.1.1. ábrán). Kettő szerotoninerget sejtet a MRR-nak az anatómiai atlasz (Paxinos és Watson 2005) szerinti határán kívül találtunk meg, ugyanakkor nem különböztek csoportbeli, MRR-ban lévő társaiktól, ezért az ezekből származó adatokat is felhasználtam az eredmények kiértékelése során.



4.1.1. ábra. Az elvezetett és azonosított MRR-sejtek elhelyezkedése az agy coronalis metszetén. Az egyes sejtcsoportokat különböző színek jelölik. A színkódot a további ábrák is követik. Rövidítések: MR: nucleus raphe medianus, PMR: nucleus raphe paramedianus, RtTg: nucleus reticulotegmentalis pontis, ATg: nucleus tegmentalis anterior, dscp: a felső kisagykarok keresztesződése, ts: tractus tectospinalis, tth: tractus trigeminothalamicus

Alapvető különbség a csoportok között az akcióspotenciálok hosszában

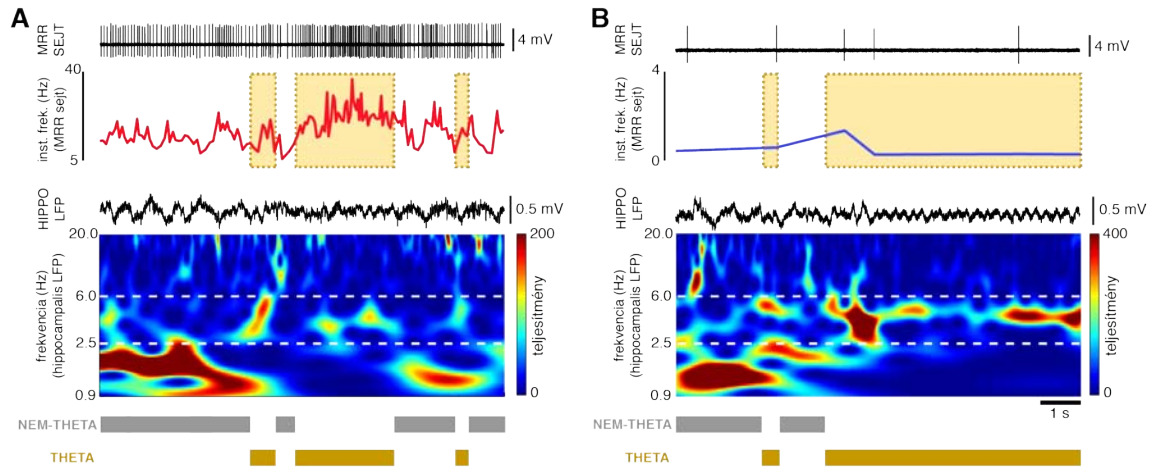
A VGluT3(+)/5-HT(-) és a VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek esetében rövid akcióspotenciálokat mértünk (a csoportok középértéke 223,5 μ s, illetve 257,1 μ s), szemben a VGluT3(-)/5-HT(+) sejtek (csoport-középérték: 319,9 μ s) és a VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek (csoport-középérték: 346,3 μ s) hosszabb akcióspotenciáljaival (Kruskal–Wallis-próba: $p = 0,0146$). Páronkénti Wilcoxon-féle előjeles rangpróba bizonyította, hogy a 5-HT-negatív sejtek – akár termeltek VGluT3-t, akár nem – jelentősen rövidebb akcióspotenciálokat tüzeltek, mint a 5-HT-t tartalmazó sejtek ($p < 0,01$, 4.1.2. ábra).



4.1.2. ábra. **A)** példák a neurokémiaailag azonosított MRR sejtekre. **B)** Az **A)** sejteinek átlagos akcióspotenciáljai. **C)** Az átlagos akcióspotenciálok hosszának összehasonlítása csoportonként, ahol szürke vonalak jelzik a csoportokhoz tartozó középértékeket (**Ca**), illetve szerotonin-tartalom szerint (**Cb**) és VGluT3-tartalom szerint (**Cc**) kettévontva, ahol az interkvartilis tartományt ábrázoltam a vízszintes vonásokkal, a fekete pontokkal pedig a csoportközépértékeket. A * $p < 0,05$, a ** pedig $p < 0,01$ értéket jelöl.

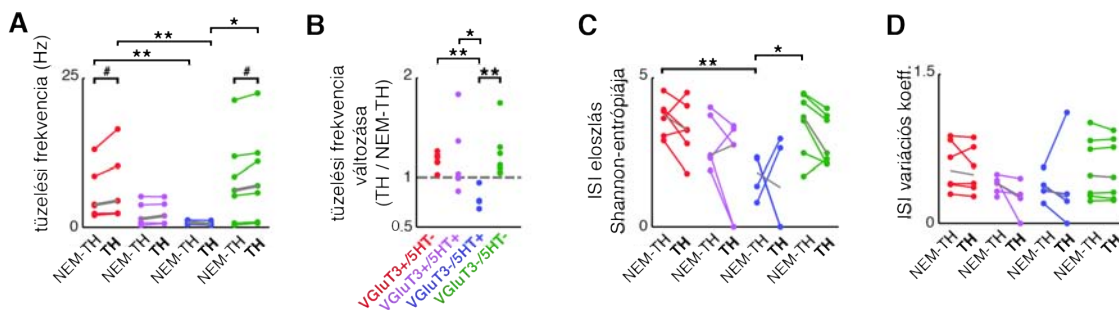
Különbség a tüzelési frekvenciában

A négy sejtcsoport tüzelési frekvenciáját a hippocampalis theta- és nem-theta állapotok alatt külön-külön hasonlítottam össze (két példát a 4.1.3. ábrán mutatok be). Theta-állapot során szignifikáns csoportkülönbséget (Kruskal–Wallis-próba: $p = 0,0168$) találtam, azonban nem-theta alatt nem ($p = 0,0769$). A theta-állapot alatti tüzelésifrekvencia-különbséget tovább pontosítottam páronkénti Wilcoxon-féle előjeles

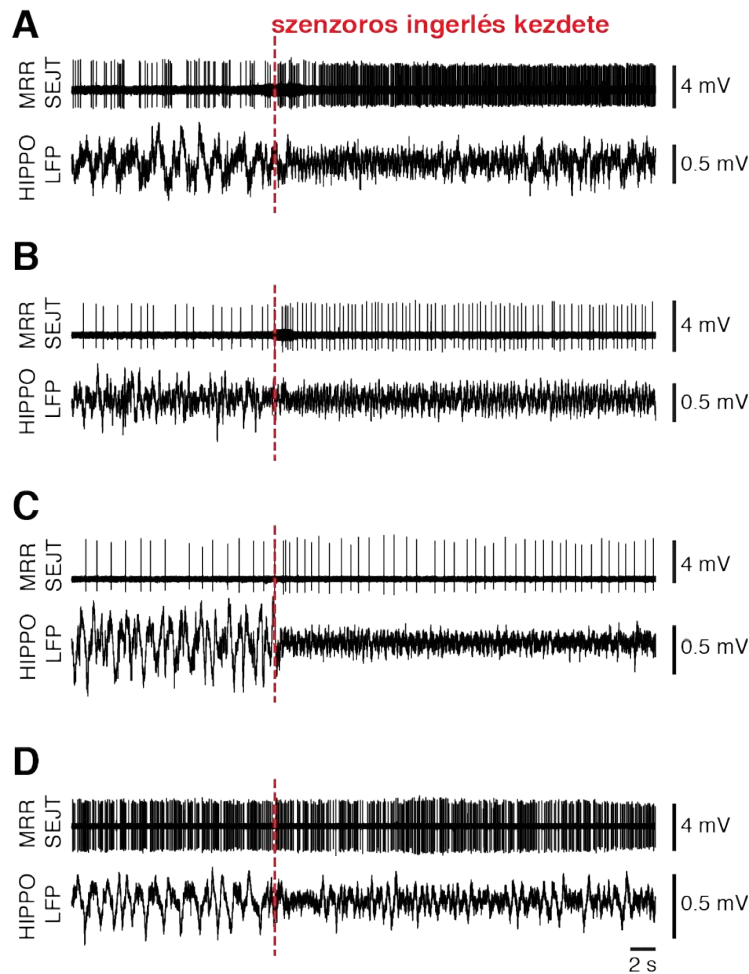


4.1.3. ábra. Példaként bemutatott VGLuT3(+)/5-HT(-) sejt (A) és VGLuT3(-)/5-HT(+) sejt (B) tüzelése a hippocampalis theta- és nem-theta állapotok függvényében. Legfelső sorban a sejtaktivitás nyers regisztrátuma, alatta a hozzá tartozó pillanatnyi, instans tüzelési frekvencia értékei. Középen a sejtel párhuzamosan regisztrált hippocampalis LFP nyers regisztrátuma. Ez alatt ennek wavelet-transzformátumának spektrális teljesítménye színekódolva. A hippocampalis thetára (uretán-altatásban) jellegzetes frekvenciasávok szaggatott vonallal jelölve. Legalul pedig az általunk használt theta–nem-theta állapotok meghatározása. A theta állapot alatti tüzelést az instans frekvencia görbéjén a háttérben lévő sárga négyzetekkel kiemeltük.

rangpróbával. A VGLuT3(+)/5-HT(-) sejtek jelentősen ($p < 0,01$) gyorsabban (középérték: 4,48 Hz) tüzeltek, mint a VGLuT3(-)/5-HT(+) sejtek (középérték: 0,58 Hz). A VGLuT3(+)/5-HT(+) sejtek szignifikánsan nem különböztek a többitől, mégis megjegyzendő, hogy a tüzelési frekvenciájuk középértéke (1,95 Hz) az előbbi két csoporté közé esett (az egyedi értékeket lásd a 4.1.4. ábrán). A VGLuT3(-)/5-HT(-) sejtek gyorsan tüzeltek (középérték: 7,00 Hz), hasonlóan a VGLuT3(+)/5-HT(-) csoporthoz, és szignifikánsan különbözve ($p < 0,05$) a VGLuT3(-)/5-HT(+) sejtektől.



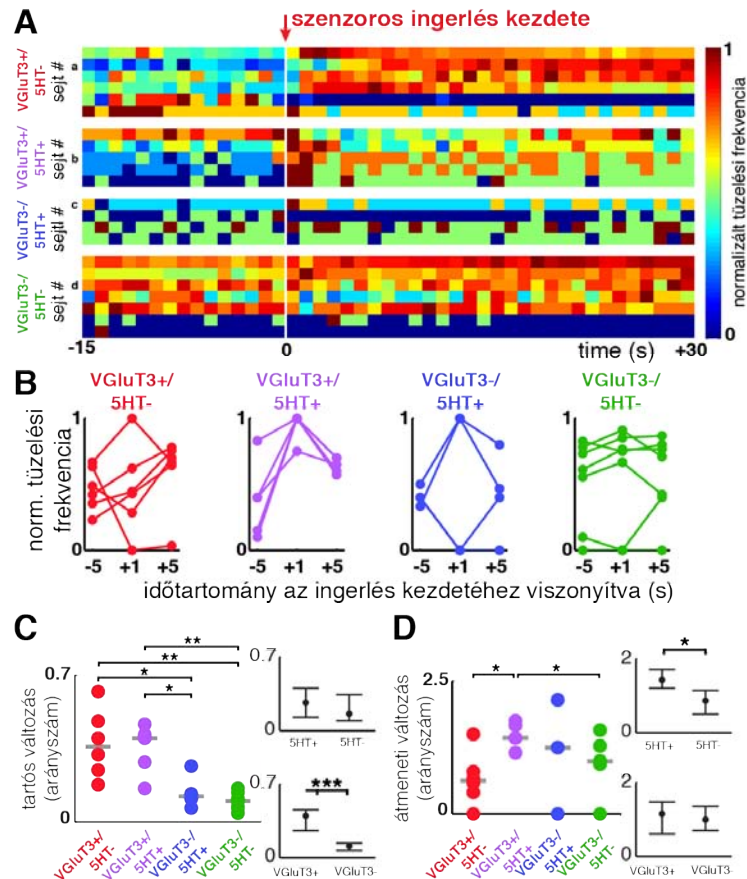
4.1.4. ábra. A tüzelési frekvencia (A), annak változása a theta- és nem-theta-állapotok között (B), illetve a tüzelés variabilitását jellemző Shannon-entrópia (C) és az akciós potenciálok közötti időtartamok (ISI) variációs koefficiense (D), sejtcsoportok szerint. A * $p < 0,05$, a ** pedig $p < 0,01$ értéket jelöl.



4.1.6. ábra. Példák a szenzoros aktiváció által kiváltott sejtválaszokra, az egyidejű hippocampalis aktivitást is ábrázoltam a sejtek nyers regisztrátumai alatt. **A)** VGlut3(+)/5-HT(-) sejt, **B)** VGlut3(+)/5-HT(+) sejt, **C)** VGlut3(-)/5-HT(+) sejt, **D)** VGlut3(-)/5-HT(-) sejt.

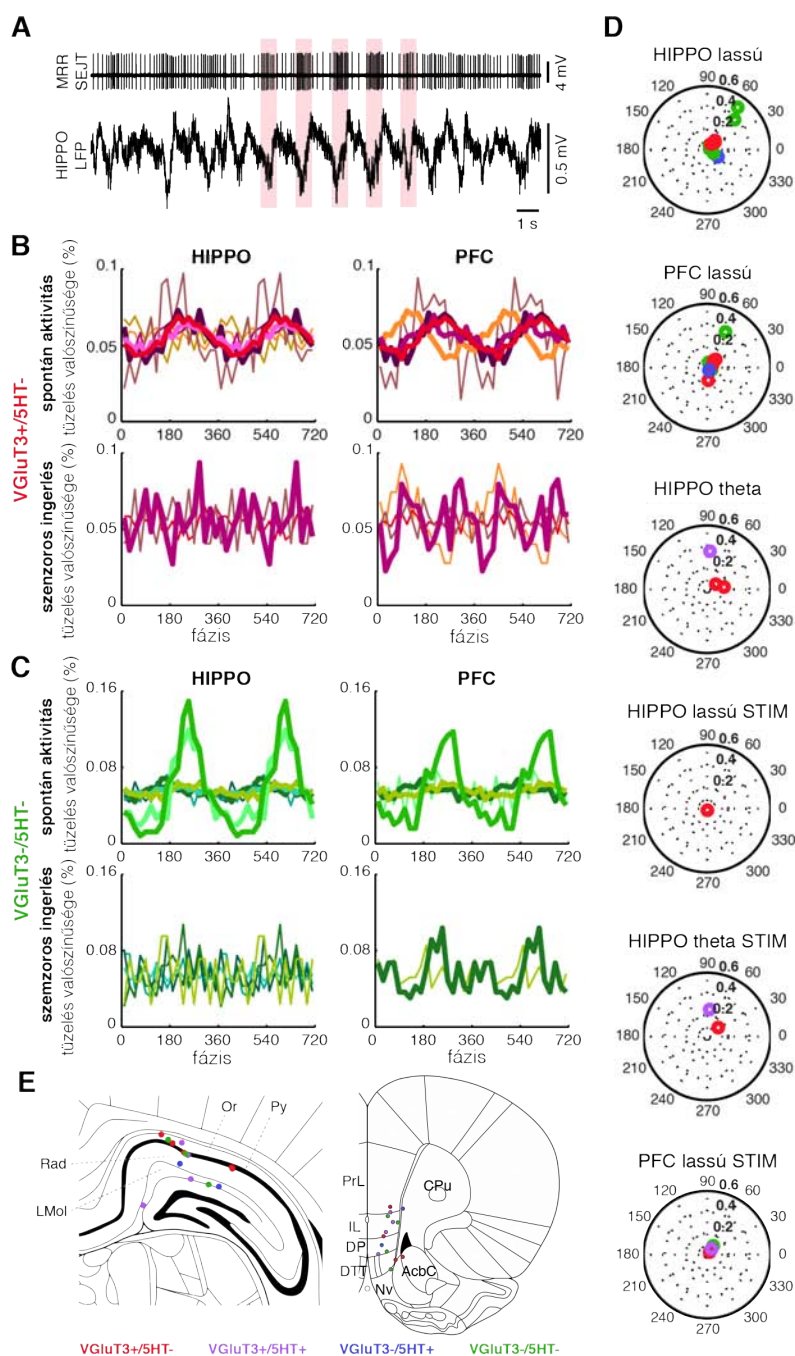
Ugyan a Kruskal–Wallis-próba nem emelt ki szignifikáns tüzelésfrekvencia-különbséget a hippocampalis nem-theta-állapot alatt ($p = 0,0769$), a csoportok közötti tendenciózus eltérés látszik a 4.1.4. ábrán. A VGlut3(+)/5-HT(-) és a VGlut3(-)/5-HT(-) sejtek gyorsan tüzeltek (középértékek: 3,78 Hz, illetve 6,23 Hz), náluk lassabban a VGlut3(+)/5-HT(+) sejtek (középérték: 1,43 Hz), a leglassabbak pedig a VGlut3(-)/5-HT(+) sejtek voltak (középérték: 0,82 Hz), emlékeztetve a theta-állapot alatt megfigyelhető különbségekre.

A tüzelési frekvenciát a csoportokon belül, a hippocampalis theta- és nem-theta állapotok alatti aktivitások között előjel-tesztel vizsgáltam. A VGlut3(+)/5-HT(-) és a VGlut3(-)/5-HT(-) sejtek egyaránt szignifikánsan gyorsabbak voltak theta-állapot alatt,



4.1.7. ábra. Szenzoros aktivációt követő átmeneti és tartós tüzelésváltozás. **A)** Mindegyik sejt normalizált pillanatnyi tüzelési frekvenciája, 1 s-os ablakokban, sejtcsoportokra bontva. **B)** Az ingerlés kezdetéhez viszonyítva, 5 s-mal korábbi, 1 s-mal későbbi, illetve 5 s-mal későbbi normalizált tüzelési frekvencia (az **A)** panel adataiból). **C-D)** A szenzoros ingerlést követő tartós (**C)** és átmeneti (**D)** aktiváció arányszámjai, csoportonként. Az egyes csoportokra jellemző középértékeket szürke vonal ábrázolja, a VGlut3-tartalom, illetve 5-HT-tartalom szerint kettébontott populációk esetében pedig a középértéket a fekete kör, az interkvartilis tartományt a hozzájuk hűtött vízszintes vonalak mutatják. A * $p < 0,05$, a ** pedig $p < 0,01$ értéket jelöl.

mint nem-theta-állapot során (4.1.4. ábra A panel). A VGlut3(+)/5-HT(+) sejtek némelyike sokkal gyorsabban tüzelt theta-állapot alatt, mások pedig nem-theta-állapothoz köthetően voltak aktívabbak (4.1.4. ábra B panel), ebből kifolyólag csoportszintű szignifikáns különbséget nem találtam. A VGlut3(-)/5-HT(+) sejtek mindegyike lassabban tüzelt theta-állapot alatt a nem-thetához képest, a csoportot vizsgálva mégsem tudtam jelentős eltérést kimutatni. A theta–nem-theta-állapotok közötti tüzelési frekvencia változásában viszont szignifikáns különbséget (Kruskal-Wallis-próba: $p = 0,0264$) találtam az egyes neurokémiai csoportok között. Wilcoxon-féle előjeles rangpróbákkal igazoltam, hogy a VGlut3(-)/5-HT(+) sejtekre szemben a



4.1.8. ábra. Fázispreferencia. **A)** Egy példaképpen bemutatott VGlut3(+)/5-HT(-) sejt tüzelése, amely koncentrálnak az egyidejű hipocampalis lassú hullámokhoz kapcsolódóan (halványrózsaszín háttér emeli ki). **B-C)** A VGlut3(+)/5-HT(-) (**B**) és VGlut3(-)/5-HT(-) sejt (**C**) tüzelési valószínűsége a hipocampalis lassú hullámok fázisának függvényében. vastag vonallal jelöltük azoknak a sejteknek az adatait, amelyek esetében az eloszlás szignifikánsan eltért az uniform von Mises-eloszlástól. **D)** Poláris grafikonok, amelyeken a további állapotok oszcillációinak fázisához számolt preferenciát ábrázoltuk (a sejtekre vonatkozó színes körök pozíciója a grafikon sugarához viszonyítva az átlagos vektorhossznak felel meg. **E)** az LFP-elvezető elektródák pozíciója a hipocampusban (balra), illetve a prefrontális kéregben (jobbra).

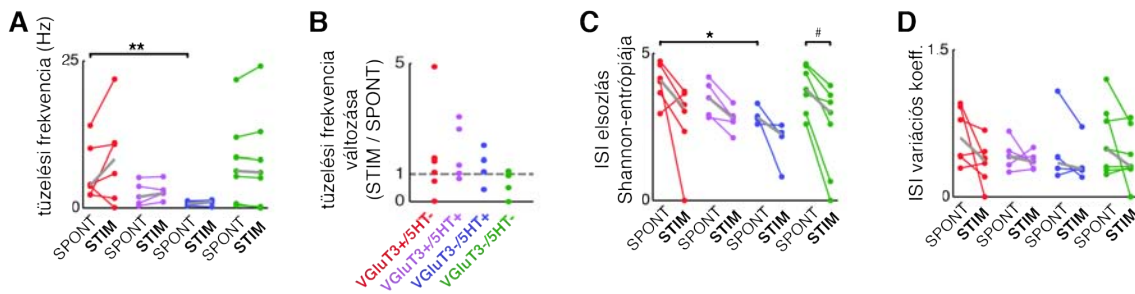
többi három csoporttal jellemző a hippocampalis theta-állapot alatti lassabb tüzelés (4.1.4. ábra B panel).

Különbség a tüzelési mintázat variabilitásában. A tüzelési mintázat variabilitását az akciós potenciálok közötti időtartamok eloszlásának variációs koefficiensével jellemeztem. Nem találtam azonban sem csoportfüggő, sem állapotfüggő szignifikáns különbséget (Kruskal–Wallis-próba p-értéke theta-állapot alatt: 0,3216, illetve nem-theta-állapot alatt: 0,5563) , mindössze tendenciózus eltérések mutatkoztak (4.1.4. ábra D panel). A variabilitás jellemzésére általam alkalmazott másik mérőszám az akciós potenciálok közötti időtartamok eloszlásának Shannon-entrópiája volt. Nem-theta-állapot során szignifikáns csoportkülönbséget találtam (Kruskal–Wallis-próba: $p = 0,0365$), a VGluT3(-)/5-HT(+) sejtek tüzelése ugyanis szignifikánsan kevésbé volt variábilis, mint a VGluT3(+)/5-HT(-) és a VGluT3(-)/5-HT(-) sejteké ($p < 0,01$, illetve $p < 0,05$). Theta-állapot alatt viszont nem észleltem különbséget az egyes neurokémiai csoportok tüzelésének variabilitásában (Kruskal–Wallis-próba: $p = 0,2603$, az egyedi sejtek adatai lásd a 4.1.4. ábrán).

A szenzoros ingerlés hatása a sejtaktivitásra

Szenzoros ingerlés alatt – amennyiben a teljes spontán aktivitással hasonlítottam össze – nem változott lényegesen az egyes csoportokra jellemző tüzelési frekvencia vagy variabilitás. Ugyanúgy, mint a spontán aktivitás során, a VGluT3(+)/5-HT(-) és a VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek kisülései voltak a leggyorsabbak, náluk lassabban tüzeltek a VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek, végül a leglassabbnak ezúttal is a VGluT3(-)/5-HT(+) csoport tagjai bizonyultak. A variabilitás mérőszámait – az akciós potenciálok közötti időtartam eloszlásának variációs koefficiensét és Shannon-entrópiáját – vizsgálva szenzoros ingerlés alatt sem találtam számottevő csoportkülönbséget, a theta–nem-theta állapotok összehasonlításánál leírt tendenciaszerű eltérés, miszerint a VGluT3(+)/5-HT(-) és a VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek kissé variábilisabban tüzeltek, mint a 5-HT-t tartalmazó sejtek, ezúttal is fennállt (részletesen lásd az adatokat a 4.1.5. ábrán).

A VGluT3(-)/5-HT(-) csoport esetében nem találtam olyan sejtet, ami számottevően növelte volna aktivitását a szenzoros stimulálás alatt, azonban néhány sejt közülük



4.1.5. ábra. A tüzelési frekvencia (A), annak változása a spontán aktivitás és a szenzoros ingerlés között (B), illetve a tüzelés variabilitását jellemző Shannon-entrópia (C) és az akciós potenciálok közötti időtartamok (ISI) variációs koefficiense (D), sejtcsoportok szerint. A * $p < 0,05$, a ** pedig $p < 0,01$ értéket jelöl, a # pedig sejtcsoporton belüli $p < 0,05$ értéket.

teljesen felfüggesztette a tüzelését. A többi három csoportban előfordultak szenzoros ingerlés alatti aktívabb sejtek, viszont a VGluT3(+)/5-HT(-)ak között is találtam egyet, amely farokcsípés alatt lényegében nem tüzelt (lásd a példákat a 4.1.6. ábrán és az összes sejt reakcióját a 4.1.7. ábrán). Ezután a szenzoros ingerlés kiváltotta esetleges átmeneti aktivitásváltozást vizsgáltam. Az átmeneti és a tartós aktivitásváltozás számszerűsítésére két változót vezettem be. A 5-HT-t tartalmazó sejtekre jellemző volt az átmenetileg eltérő tüzelési aktivitás a farokcsípés kezdeti 1 másodpercében. A VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek mindegyike növelte a tüzelési rátáját ebben az időszakban, a VGluT3(-)/5-HT(+) csoport esetében pedig egyesek átmeneti aktivitásnövekedése mellett más sejtekre az akciós potenciálok frekvenciájának átmeneti csökkenése volt jellemző. A VGluT3(+)/5-HT(-) sejtek közül egynél találtam átmeneti tüzelésifrekvencia-növekedést. Az 5-HT-t tartalmazó sejtek mindkét csoportjára – tehát függetlenül a VGluT3 expressziójától – jellemző volt az átmeneti aktivitásváltozás szenzoros ingerlés kezdetén, szemben a 5-HT-t nem tartalmazó sejtekkel. A szenzoros ingerlés első másodpercében átmenetileg megfigyelhető magasabb tüzelési frekvencia mellett a VGluT3(+)/5-HT(+) sejtekre jellemző volt, hogy az ingerlés további 15 másodpercében is a spontán aktivitáshoz képest még mindig nagyobb volt a kisülések intenzitása, habár a kezdeti, átmeneti növekedés mértékét ez nem érte már el. A VGluT3(+)/5-HT(-) sejtek esetében is igazoltam a tartós aktivitásváltozást, és összesítve

a VGluT3-expresszáló sejtek mindkét csoportjára teljesült, hogy farokcsípést követően tartósan megváltoztatják tüzelési frekvenciájukat, szemben a VGluT3-t nem termelő sejtekkel. Annak ellenére, hogy a VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek között némelyik – a csoportátlagnál egyébként is lassabban tüzelő – alig produkált akciós potenciált a szenzoros ingerlés alatt, rájuk csoportszinten nem volt jellemző az átmeneti aktivitásváltozás (4.1.7. ábra). Az egyes VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek szenzoros stimulálás alatti minimális kisülésszámának következtében viszont ingerlés alatt az akciós potenciálok közötti időtartamok eloszlásának Shannon-entrópiája a spontán aktivitáshoz képest szignifikánsan csökkent (lásd 4.1.5. ábra C panel).

Fázispreferencia. A hippocampus és a prefrontalis kéreg lassú, 0,9–2,5 Hz közötti frekvenciájú oszcillációjához fáziskapcsolt sejteket a VGluT3(-)/5-HT(-) csoportban találtam, figyelembe véve a kapcsolatot erősségét jellemző átlagos vektorhosszt. Ez a fáziskapcsoltság a szenzoros ingerlés alatt nem volt kimutatható. A VGluT3(+)/5-HT(-) sejtek aktivitását is modulálták a hippocampalis és a prefrontalis kérgi lassú hullámok, habár e sejtek esetében az átlagos vektorhossz rendre alacsony volt, ami ellene szól az erős fázispreferenciának. A theta-aktivitás 2,5–6 Hz-es oszcillációjához egyetlen VGluT3(+)/5-HT(+) sejt tüzelt fáziskapcsoltan, ennek ellenére a 5-HT-t termelő sejtek között nem találtam jellegzetes fázispreferenciát a hippocampalis vagy prefrontalis kérgi oszcillációkhoz (4.1.8. ábra).

Ritmikus tüzelés. A hippocampalis vagy prefrontalis kérgi ritmusokhoz való gyenge fáziskapcsoltság mellett az általunk elvezetett sejtekre saját ritmikus aktivitás sem volt jellemző. Mindössze egyetlen VGluT3(+)/5-HT(-) és egyetlen VGluT3(-)/5-HT(+) sejt autokorrelogramjai fedtek fel gyenge, 1 Hz körüli ritmicitást. Szenzoros stimulálás alatt egyetlen esetben sem találtam ritmikus tüzelést.

4.2. A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása

Az elvezetett sejtek alapvető csoportosítása. A raphe-hippocampalis rostok ingerlésének hatását 52 hippocampalis sejt elvezetése során vizsgáltuk. Ezek közül 8-at Neurobiotinnal feltöltöttünk és a szövetségi feldolgozás után a hippocampusban megtaláltunk, morfológiájuk alapján mind interneuronok voltak. Ezek közül az interneuronok közül 4 esetben neurokémiai azonosítást végeztünk, melynek eredményeképpen 1 CB-tartalmú és 1 CCK-tartalmú sejtet találtunk a hippocampus CA1 areájában a stratum radiatum és a stratum lacunosum-moleculare határán, 1 további CCK-tartalmú sejtet a CA3 area stratum pyramidalejában, és 1 szomatosztatin (SOM)-tartalmú sejtet a gyrus dentatus stratum granulare suprapyramidale alatt, a hilusban azonosítottunk, ez utóbbiban a P-anyag-receptorait (SPR) is kimutatták az immunhisztokémiai tesztheink. A 44 további, jelölőanyaggal fel nem töltött sejtet az elektrofiziológiai paramétereik (akciós potenciál hossza, átlagos tüzelési frekvencia, komplex kisüléssorozat jelenléte) alapján 3 (feltételezett) principális sejtre és 41 (feltételezett) interneuronra osztottuk.

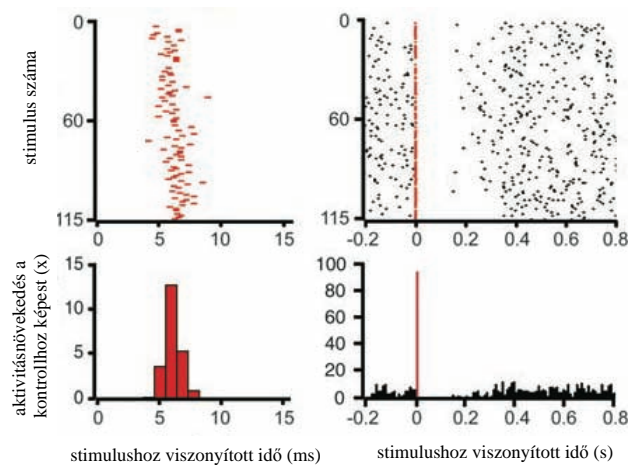
A raphe-hippocampalis rostok ingerlésének hatása az elvezetett sejtekre. A hippocampalis sejteknek a MRR elektromos stimulálására adott reakcióját az alábbi kategóriákba soroltuk:

- a) gyors (15 ms-nál kisebb latenciájú) aktiváció, melyet 16 sejtnél regisztráltunk,
- b) lassú (15 – 50 ms közötti latenciájú) aktiváció, ezt 7 esetben mértük,
- c) nagyon lassú (50 ms fölötti latenciájú) aktiváció, melyet 4 sejt mutatott,
- d) gátlás kezdeti aktiváció nélkül, ezt 25 sejt esetében igazoltuk.

Az ingerlést 15 ms-nál kisebb latenciával követő, gyors aktiválódás gyors szinaptikus serkentésre utalt, kísérleteink, majd eredményeink kiértékelésénél ennek tisztázására helyeztük a hangsúlyt. Mivel ezt a gyors aktivációt már a kezdeti kísérletekben megfigyeltük, a későbbiekben célzottan ezt a választípust kerestük. Abban az esetben

jelöltük meg az elvezetett sejtet, ha láttuk a gyors aktiváció jeleit, ebből kifolyólag mind a 8 jelölőanyaggal feltöltött neuron (köztük a 4 neurokémiaailag azonosított is) olyan sejt, amely esetében ezt a gyors választ regisztráltuk.

A gyors aktiváció jellemzése. A 16 gyors aktivációt mutató sejt az elektromos pulzusokat követően átlagosan $8,9 \pm 0,58$ ms latenciával sült ki (példát a 4.2.1. ábrán mutatok be). A válasz sikerrátája $65,7 \pm 5,29\%$ volt, azaz a pulzusok ekkora hányadát követte akciós potenciál e rövid időablakon belül. Az aktiváció időben erősen fókuszált volt: a latenciaidők szórása $1,7 \pm 0,19$ ms, a kisüléshez vezető legrövidebb és leghosszabb latencia közti különbség pedig $8,05 \pm 1,03$ ms volt. A kontrollhoz képest a stimulálás $491,2 \pm 155,24\%$ -os aktivitásnövekedést eredményezett. Ezekkel szemben a 7 lassú aktivációt produkáló sejt a stimulust követően átlagosan $23,12 \pm 2,97$ ms-os latenciával sült ki, a válasz kevésbé volt fókuszált, a szórás $6,7 \pm 1,22$ ms, a legrövidebb és leghosszabb latencia közti különbség $32,14 \pm 8,15$ ms volt. A kontrollhoz képest $148,95 \pm 26,37\%$ -os aktivitásnövekedést mértünk, viszont a sikerráta $73,66 \pm 8,15\%$

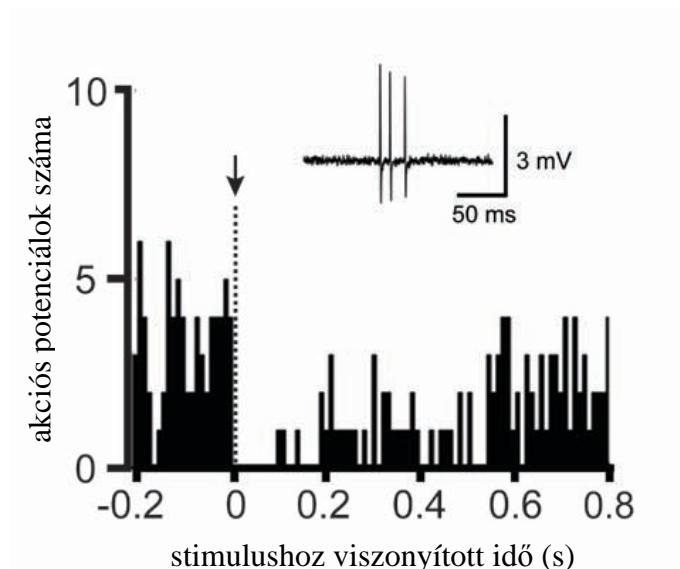


4.2.1. ábra. Példaképpen bemutatott interneuron válasza a MRR elektromos ingerlésére. A felső grafikonok soronként minden egyes stimulálást követő akciós potenciálok idejét mutatják, bal oldalon ránagyítva az első 15 ms eseményeire. Az alsó grafikonok az összes stimulálás alapján az akciós potenciálok időbeli eloszlását ábrázolják, a kontrollhoz képest.

volt. A fenti paraméterek közötti különbség – kivéve a sikerrátát – szignifikáns volt ($p < 0,05$). Egyetlen sejt esetében a stimulálás után következő kisülés átlagos latenciája ugyan 15 ms-nál rövidebb volt, mégis a lassú aktivációt adó csoportba soroltuk, mert a válasz időbeli fókuszáltságának paraméterei a többi lassan válaszoló sejtnél mért

tartományba esett. Továbbá, 4 gyorsan aktiválódó sejt esetében az akciós potenciálok egy második, hosszabb latenciaérték körül is csoportosultak: a serkentődés gyors komponensének átlagos latenciája $9,14 \pm 0,4$ ms, a lassú komponensének $23,13 \pm 4,57$ ms volt. A legrövidebb és leghosszabb latenciák közti különbség a gyors komponens esetében $8,55 \pm 0,82$ ms, a lassú komponensnél $11 \pm 4,28$ ms volt. A stimuláló pulzusokat a rövid latenciájú kisülés $51,8 \pm 3,2\%$ -ban, a hosszabb latenciájú kisülés pedig $42,88 \pm 14,48\%$ -ban követte. Ezt a 4 sejtet a gyorsan aktiválódók között tárgyaljuk.

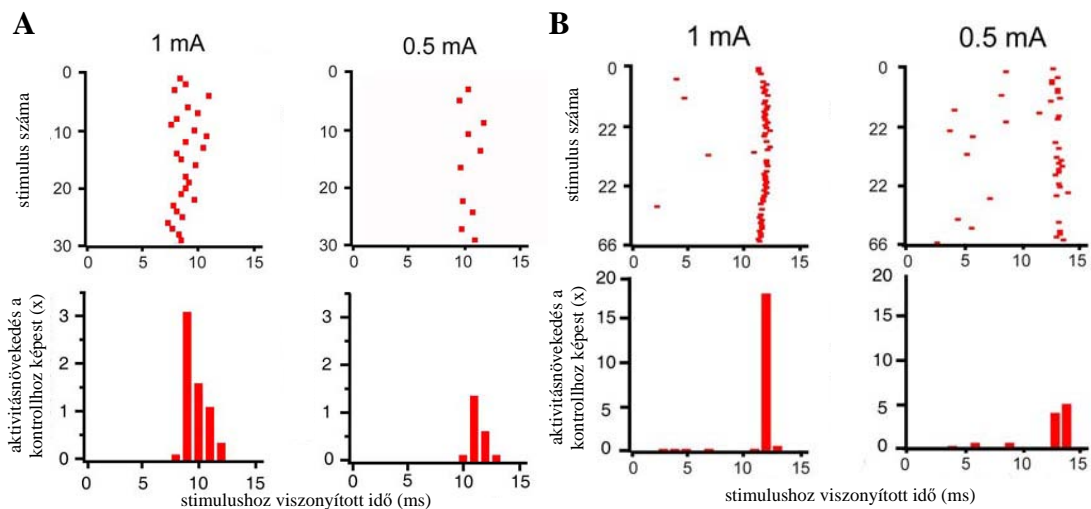
A sejtek gátlódása a raphe-hippocampalis ingerlés során. Az stimuláló pulzusokat követően 25 sejt esetében a kisülések száma csökkent, aktivitásnövekedést még hosszú latenciával sem figyeltünk meg. Ezeket a neuronokat a MRR elektromos ingerlése tehát gátolta. Kiemelem, hogy e között a 25 sejt között volt az elektrofiziológiai jellemzők alapján principális sejtnek klasszifikált 3 neuron is. A 4.2.2. ábrán példaképpen bemutatott, a hippocampus CA1 areájának principális sejtje a pulzusokat követően 1,5 ms latenciával gátlódott (a principális sejtek egyébként is alacsony tüzelési frekvenciája torzíthatja a gátlásos válasz jellemzőit), e hatás 63,5 ms-ig fennállt a kisülések rátájának 96,2%-os csökkenését okozva.



4.2.2. ábra. Egy hippocampalis piramissejt válasza a MRR ingerlését követően. A felső, kisebb beillesztett ábrán látható a piramissejtekre jellemző burst-szerű tüzelési aktivitás.

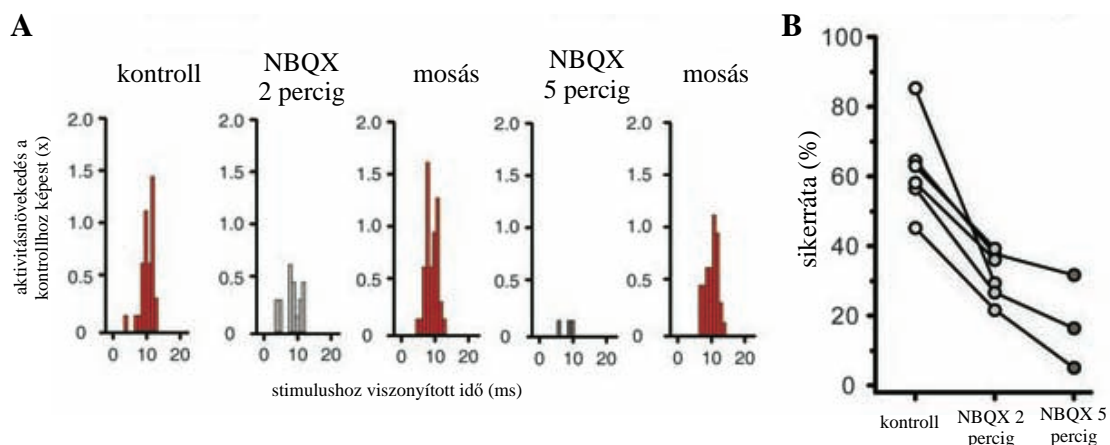
A 16 gyors aktivációt mutató sejt közül 10 esetben a kezdeti aktivációt a kisülések gátlása követte. Az akciós potenciálok ritkulása az ingerlő pulzusok után $90,6 \pm 4\%$ -ban jelentkezett, $15 \pm 1,71$ ms latenciával. A gátlás időtartama, azaz a serkentés vége és a gátolt időszak utáni első akciós potenciál latenciája közötti különbség $144,85 \pm 17,32$ ms volt.

Hatás az ingerlő áram erősségének függvényében. A gyorsan aktiválódó sejtek közül 10 esetében teszteltük a hatásbeli különbséget 0,5 mA-es és 1 mA-es (egy esetben helyett 0,7 mA-t állítottunk be) ingerlő intenzitás között. Ennek a 10 neuronnak az esetében a nagyobb ingerlő áramot követő kisülés sikerrátája $67,9 \pm 5,5\%$ volt, amely az alacsonyabb ingerlő áram alkalmazása során $52,7 \pm 6,7\%$ -ra csökkent. Az átlagos latencia $8,61 \pm 0,67$ ms-ról $9,26 \pm 0,8$ ms-ra változott, a latenciaértékek szórása pedig $1,72 \pm 0,23$ ms-ról $2,27 \pm 0,36$ ms-ra (4.2.3. ábra). Ezek a változások nem bizonyultak szignifikánsnak ($p > 0,05$).



4.2.3. ábra. Két interneuron (A és B) aktivációja az ingerlő áram erősségének függvényében (az áramerősséget lásd az ábrák felett). A felső grafikonok soronként minden egyes stimulálást követő akciós potenciálok idejét mutatják, az alsó grafikonok pedig az összes stimulálás alapján az akciós potenciálok időbeli eloszlását ábrázolják, a kontrollhoz képest.

A gyors aktiváció glutamát-receptor-függése. A MRR stimulálását követő gyors aktiváció háttérben álló mechanizmus felderítésére az AMPA-típusú glutamát-receptor blokkolóját (NBQX) iontoforetizáltuk lokálisan az elvezetett sejt környezetébe. Ezt a farmakológiai tesztet 6 olyan sejt esetében végeztük el, amelyek az első, még farmakonmentes elektromos ingerlésre gyors aktivációval reagáltak. Az NBQX iontoforézise alatt újból stimuláltuk a MRR-t, és követtük, hogyan változik a hippocampalis sejtek válasza. Először 2 percen keresztül iontoforetizáltunk NBQX-t, ez alatt a gyors aktiváció sikerrátája $53,8 \pm 4,5\%$ -ra csökkent, a változás szignifikáns volt ($p < 0,05$). A szignifikáns sikerrátacsökkenés mellett a válasz latenciája (az eredeti $105,4 \pm 9,9\%$ -a lett), illetve annak szórása (az eredeti $163,3 \pm 51,3\%$ -a lett) nem változott érdemben ($p > 0,05$). Az NBQX hatása reverzibilis volt, a farmakon iontoforézisének felfüggesztése után végzett elektromos stimulálás sikerrátája a legelső stimulálás értékének szintjére emelkedett. Ezután 3 esetben megismételtük a farmakológiai blokádot, ezúttal viszont már 5 percen keresztül iontoforetizáltunk NBQX-t, ami alatt az elektromos pulzusok mindössze $29,7 \pm 11\%$ -át követte gyors kisülés (4.2.4. ábra). Ebben az esetben a megmaradt aktiváció latenciája az eredeti $95,1 \pm 17,2\%$ -a lett, a latencia szórása pedig az eredeti $144,8 \pm 24,9\%$ -a lett, egyik eltérés sem bizonyult szignifikánsnak ($p > 0,05$).

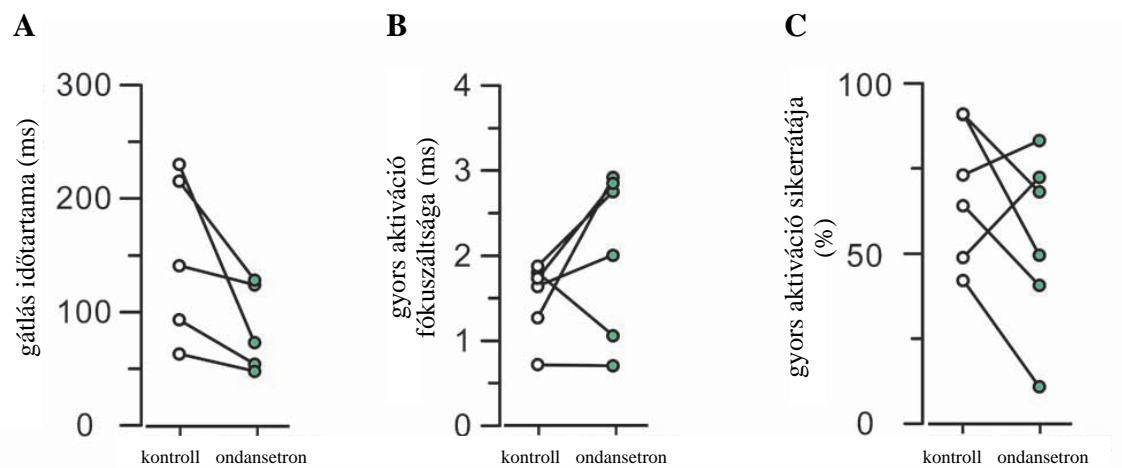


4.2.4. ábra. Az NBQX hatása a MRR ingerlését követő gyors aktiválódás sikerrátájára egy példasejt esetében (A), illetve mindegyik tesztelt sejt esetében (B).

Az egyik sejt esetében az egyébként használatos -40 nA iontoforetizáló áram mellett -80 nA-t is alkalmaztunk, szintén 2 percen keresztül. A nagyobb iontoforetizáló áram egységnyi idő alatt nagyobb mennyiségben mozgatja meg a töltéssel rendelkező molekulákat, ennél fogva erőteljesebb hatást képes kifejteni. Az elektromos ingerlés kezdeti 62,9%-os sikerrátáját az első, -40 nA-es iontoforézis 39,3%-ra csökkentette, majd a második, -80 nA-s iontoforézis pedig 29,5%-ra. Mivel mind az iontoforézis időtartama, mind az alkalmazott áramerősség befolyásolja az elvezetett sejt környezetébe kerülő hatóanyag mennyiségét, a fenti kísérletek során bizonyítottuk, hogy az NBQX dózisfüggően, reverzibilisen és megismételhetően képes gátolni a hippocampalis interneuronoknak a MRR elektromos ingerlését követő gyors aktivációját.

A lassú aktiváció glutamát-receptor-függése. Az AMPA-típusú glutamát-receptor részvételét a lassú aktivációban két sejt esetében tudtuk vizsgálni. Ez a két sejt mutatott a gyors aktiváció mellett hosszabb latenciájú serkentődést is azok között a neuronok között, amelyeknél kipróbáltuk az NBQX hatását. Az egyik esetében az NBQX iontoforézise alatt csökkent a lassú aktiváció sikerrátája is (a gyors aktivációé mellett), a másik sejt esetében viszont nem. Az előzőeken kívül két olyan sejt esetében is teszteltünk az NBQX hatását, amelyeknél gyors serkentődés nem fordult elő, hanem lassú aktivációval válaszoltak a MRR ingerlésére. Ezeknél a stimulálás sikerrátáját az AMPA-típusú glutamát-receptor blokkolása 0,7%-kal változtatta meg, amit hatástalannak tekintettünk.

Az 5-HT₃ receptorok szerepe. A hippocampalis sejteknek a MRR elektromos ingerlésére adott válaszában felvetődött az 5-HT₃ receptorok szerepe is, ennek tisztázása céljából e receptor antagonistáját, ondansetront alkalmaztunk egyes farmakológiai tesztjeinkben. A farmakonmentes elektromos stimulációra gyors aktivációval reagáló sejtek közül összesen 6 esetben intraperitoneálisan injektáltuk. Négy esetben az injekció utáni 5., valamint három esetben az injekció utáni 10. vagy 15. percen kezdtünk újabb elektromos stimulálást (volt olyan kísérlet, ahol az ondansetron injektálását követően



4.2.5. ábra. Ondansetron hatása a MRR ingerlése által kiváltott gyors serkentés utáni, hosszabb latenciájú gátlás időtartamára (A), a gyors serkentés időbeli fókuszáltságára (B), valamint annak sikerrátájára (C).

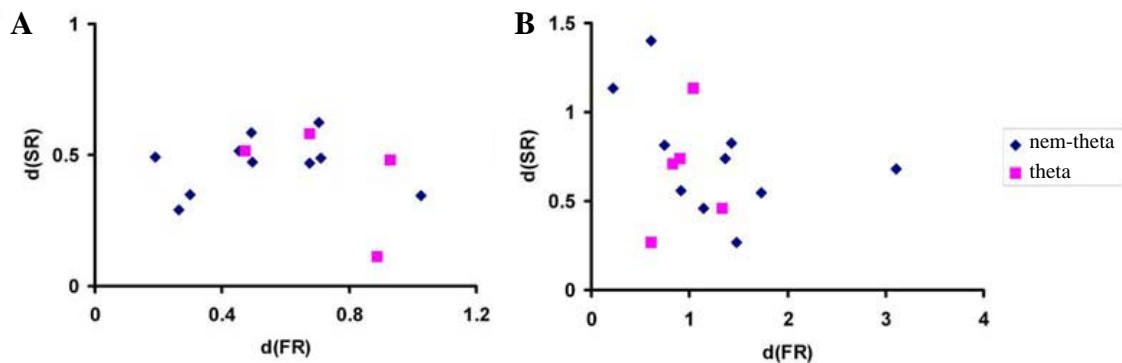
két ingerléssorozatot is indítottunk). Az injekció után 5 perccel indított ingerlés által kiváltott gyors aktiváció sikerrátája a kontroll $66,6 \pm 18,2\%$ -ára csökkent, a válasz latenciája a kontroll $106,2 \pm 7,4\%$ -a lett, a latencia szórása pedig $138,8 \pm 37,3\%$ -ra növekedett. Az injekció után 10 vagy 15 perccel indított stimulálásra adott válasz sikerrátája a kontroll $94,2 \pm 20,3\%$ -a, latenciája a kontroll $102 \pm 3\%$ -a, latenciájának szórása pedig a kontroll $129,5 \pm 21,2\%$ -a volt (4.2.5. ábra B és C panelek).

Egy kísérlet során az ondansetron intraperitoneális injekciója után NBQX-t is iontoforetizáltunk az elvezetett sejt közelébe. A MRR-ingerlésre adott gyors aktiváció ondansetron adása előtti sikerrátája $64,5\%$ volt, ami ondansetron hatása alatt $29,5\%$ -ra csökkent, ezután az NBQX jelenlétében tovább csökkent $22,6\%$ -ra.

A közül a 6 sejt közül, amelyek elvezetése során ondansetront is injektáltunk az állatoknak, 5 esetben regisztráltunk a MRR ingerlés által kiváltott gyors aktivációt követő gátlást. Ennek a gátlásnak az időtartamát mind az 5 sejt esetében jelentősen csökkentette az ondansetron (4.2.5. ábra A panel). A gátlás átlagos időtartama $148,5 \pm 32,85$ ms-ról $83,25 \pm 14,13$ ms-ra csökkent ($p < 0,05$).

A farmakológiai tesztek hatása a sejtek alapaktivására. Az ondansetron vagy az NBQX alkalmazása nemcsak a MRR elektromos stimulálására adott választ

befolyásolhatja, hanem a hippocampalis sejtek alapaktivitását is. Ennek tisztázása érdekében az első elektromos ingerlést megelőző kontroll állapot alatti és a farmakológiai teszt során, a stimulálási időszakon kívül mért tüzelési frekvenciát összehasonlítottuk. Ondansetron injekcióját követően a tesztelt 6 sejtől 5 esetben találtunk jelentős, 25%-nál nagyobb eltérést a kontrollhoz képest: 3 neuronnak nőtt, 2-nek pedig csökkent a tüzelési frekvenciája. NBQX iontoforézise során 6-ból 4 sejt esetében legalább 25%-kal csökkent a tüzelési frekvencia. Az aktivitás ilyen mértékű eltérése akár hozzájárulhatott az ingerlő pulzusokat követő kisülés sikerrátájának csökkenéséhez is. Ezért megvizsgáltuk, hogy az előbb leírt aktivitáscsökkenés magyarázza-e, pontosabban korrelál-e az ingerlés kiváltotta aktiváció sikerrátájának csökkenésével. Sem a hippocampalis theta-, sem a nem-theta állapotok alatt nem korrelált az NBQX iontoforézise (theta alatt: $r^2 = 0,1669$, illetve nem-theta alatt: $r^2 = 0,0133$) vagy az ondansetron adása alatti (theta alatt: $r^2 = 0,06$, illetve nem-theta alatt: $r^2 = 0,2102$) tüzelésifrekvencia-változás a MRR ingerlésére adott válasz sikerrátájának csökkenésével (4.2.6. ábra).



4.2.6. ábra. NBQX (A) és ondansetron (B) hatása alatti elektromos stimulálások során mért átlagos tüzelési frekvenciaváltozás – $d(FR)$ – a stimulálást megelőző vagy követő kontroll szakaszokhoz képest (x tengely), illetve az elektromos ingerlés kiváltotta gyors serkentés sikerrátájának változása – $d(SR)$ – a kontroll stimuláláshoz képest (y tengely). A theta- és nem-theta állapotok alatti stimulálásokat külön kezeltük.

A gyorsan aktiválódó sejtek elektrofiziológiai jellemzése. A hippocampus theta- és nem-theta-állapotának függvényében azoknak a sejteknek a tüzelési mintázatát vizsgáltuk, amelyek a MRR elektromos ingerlésére gyors latenciával aktiválódtak. A két

hippocampalis állapot alatt a sejtek tüzelési frekvenciáját, a theta-ritmusos tüzelésre utaló theta-moduláció faktorát, valamint a theta-hullámok fázisához való kapcsoltságot jellemeztük. Ritmusos tüzelésről beszélünk, ha a sejt kisülései periodikusan, a theta(2,5–6 Hz-es)-oszcilláció szerint csoportokba rendeződve fordultak elő. Ha az akciós potenciálok nem csoportokba rendeződve, hanem hozzávetőlegesen egyenletes időközönként, egyesével ismétlődnek, reguláris tüzelésnek neveztük a mintázatot. Egyéb esetekben pedig irreguláris tüzelési mintázat kifejezést használtunk. A sejteket kategorizáltuk aszerint is, hogy jelentősen különbözött-e a nem-theta- és theta-állapotok alatti tüzelési frekvenciájuk.

A négy neurokémiaailag azonosított sejt eltért egymástól a tüzelési mintázatukban. A CA3 area stratum pyramidalejában megtalált CCK-tartalmú interneuron a hippocampus theta-állapota alatt gyorsabban tüzelt a nem-thetához képest, kisülései pedig theta-ritmus szerint csoportosultak. Ehhez hasonló aktivitást mutatott két további, neurokémiaailag nem azonosított interneuron is.

A másik, CA1 felszínebb rétegeinek határán azonosított CCK-tartalmú sejt irreguláris tüzelésében nem volt számottevő különbség a nem-theta–theta állapot között. A CB-tartalmú interneuron is irregulárisan tüzelt, theta-állapot során pedig enyhén begyorsult (a frekvenciabeli különbség azonban nem érte el az 50%-ot). Egy további interneuron esetében regisztráltunk az előbbi kettőhöz hasonló tüzelési mintázatot. Találtunk két másik sejtet, amelyek reguláris tüzelését nem befolyásolta a hippocampalis állapot.

A negyedik azonosított sejtünkénél, amely SOM-t és SPR-t expresszált, sem találtunk ritmikus tüzelést, viszont theta-állapot során jelentősen lassult az aktivitása. Ezen kívül két másik irregulárisan tüzelő interneuront találtunk még, amely theta-alatt lényegesen lassabb volt.

Három, immunhisztokémiával nem azonosított, irreguláris tüzelő interneuron az előző csoporttal szemben theta-alatt jelentősen növelte aktivitását. Egy további olyan

interneuronot vezetünk el, amely tüzelési frekvenciáját a nem-theta–theta állapotok nem befolyásolták, viszont kisülései erősen kapcsolódtak a theta-ritmus fázisához. Végül regisztráltuk egy olyan interneuronnak a tüzelési mintázatát is, amely börsztszerű, komplex kisüléssorozatokat produkált, és theta-állapotban többszörösére növelte tüzelési frekvenciáját (a sejtek paramétereit a 4.2.1. táblázatban foglaltam össze).

4.2.1. táblázat. Gyors serkentés mutató interneuronok elektrofiziológiai jellemzői. NA: nincs adat. ON: theta-állapotban legalább 50 %-os tüzelésifrekvencia-növekedés a nem-theta állapot alattihoz képest. OFF: theta-állapotban legalább 50 %-os tüzelésifrekvencia-csökkenés a nem-theta állapothoz képest. enyhén: theta alatt enyhén aktiválódó sejt, az 50 %-os frekvencianövekedést nem érte el.

kód-szám	tüzelési frekvencia (Hz)		theta-moduláció (%)		preferált fázis átlaga (fok)	preferált fázishoz tartozó átlagos vektorhossz	neuroké-miai jellemző	kategória	
	nem-theta-állapot	theta-állapot	nem-theta-állapot	theta-állapot				theta	ritmus
758	3,21	12,76	7,46	35,29	0,1	0,58	CCK	ON	ritmusos
787	1,94	3,06	12,6	6,63	85,36	0,78		ON	ritmusos
796	5,7	9,01	4,2	37,41	71,69	0,51		ON	ritmusos
1015	3,59	14,96	6,61	9	215,28	0,37		ON	komplex
560	7,15	6,86	5,05	3,77	16,84	0,25	CCK	nem	irreguláris
804	3,47	3,88	7,43	4,88	308,55	0,4		nem	irreguláris
992	7,06	9,32	14,82	10,34	NA	NA	CB	enyhén	irreguláris
851	8,71	NA	34,36	NA	NA	NA		nem	reguláris
908	23,11	NA	12,21	NA	NA	NA		nem	reguláris
907	8,84	1,39	2,4	3,13	NA	NA	SOM/SPR	OFF	irreguláris
682	8,75	3,46	7,17	3,55	NA	NA		OFF	irreguláris
1008	3,81	NA	33,24	NA	NA	NA		OFF	irreguláris
909	1,43	2,98	0,94	4,09	NA	NA		ON	irreguláris
911	0,37	3,1	3,96	3,96	NA	NA		ON	irreguláris
1034	4,32	6,64	10,49	5,42	NA	NA		ON	irreguláris
1022	4,13	3,56	8,08	8,75	178,93	0,75		nem	ritmusos

5. Megbeszélés

5.1. A MRR sejtjeinek elektrofiziológiai jellemzése

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a MRR VGluT3(+)/5-HT(-) sejtjei alapvető *in vivo* elektrofiziológiai paramétereikben különböznek a VGluT3(-)/5-HT(+) társaiktól. Az 5.1.1. összefoglaló táblázatban feltüntettem a legjelentősebb fiziológiai különbségeket, amelyeket az egyes MRR-populációk között találtunk. A glutamáterg sejtek gyorsabban tüzelnek, és a hippocampus theta-oszcillációja során növelik aktivitásukat szemben az azt csökkentő szerotoninergerg neuronokkal. A glutamáterg-szerotoninergerg transzmisszióra is képes VGluT3(+)/5-HT(+) sejtek egyik előző csoporttól sem különböztek jelentősen, a sejtek paramétereit jellemzően e két csoport középértékei közé estek. A tüzelés variabilitásában alig találtunk szignifikáns különbséget – annak ellenére, hogy a kisülések közötti időintervallumok variációs koefficiense mellett kiszámoltuk az érzékenyebbnek tartott Shannon-entrópiát is.

5.1.1. táblázat. A MRR-sejtek főbb elektrofiziológiai különbségei.

sejtcsoport	akciós potenciál hossza	tüzelési frekvencia (egymáshoz viszonyítva)	átmeneti tüzelésváltozás szenzoros ingerlésre	tartós aktiválódás szenzoros ingerlésre
VGluT3(+)/5-HT(-)	rövid	gyors	nem	igen
VGluT3(+)/5-HT(+)	hosszú	közepes	igen	igen
VGluT3(-)/5-HT(+)	hosszú	lassú	igen	nem
VGluT3(-)/5-HT(-)	rövid	gyors	nem	nem

A nem-glutamáterg, nem-szerotoninergerg sejtek – melyek között a publikált adatok (Descarries és mtsai 1982, Hioki és mtsai 2010, Varga és mtsai 2001) alapján főleg GABAerg sejtek lehetnek, ám ezt ebben a tanulmányban nem volt célunk bizonyítani – a vizsgált elektrofiziológiai paramétereikben emlékeztettek a VGluT3(+)/5-HT(-)

sejtekre. Korábbi tanulmányokban az immunhisztokémiai azonosítás nélkül elvezetett raphe-sejteket gyorsabb vagy lassabb tüzelési frekvenciájuk alapján különítették el (Viana Di Prisco és mtsai 2002). Figyelembe véve jelen eredményeinket, ez félrevezető lehet, hiszen két - vélhetően funkcionalitásában is elkülönülő – populáció hasonlóképpen gyorsan tüzel. A szerotoninerg sejteket ezenkívül akciós potenciáljaik szélessége alapján (Kocsis és Vertes 1996, Allers és Sharp 2003, Kirby és mtsai 2003, Hajós és mtsai 2007), illetve 5-HT_{1A} receptor közvetítette gátlásuk alapján szokták azonosítani (Viana Di Prisco és mtsai 2002). Eredményeinkből látszik, hogy a szerotoninerg sejteket hosszabb, a nem-szerotoninerg sejteket rövidebb akciós potenciálok jellemzik, mindez viszont független a VGluT3-tartalomtól. A korábbi tanulmányokban ezzel a módszerrel elkülönített szerotoninerg sejtek között ezért keveredhettek a glutamáterg-szerotoninerg kotranszmisszióra képes és tisztán szerotoninerg neuronok adatai. A farmakológiai megközelítéssel detektált szerotoninerg neuronok között is lehettek glutamáterg kotranszmisszióra képesek, sőt, találtak olyan szerotoninerg sejteket, amelyek 5-HT_{1A} receptort nem is expresszálnak (Kiyasova és mtsai 2013). A genetikai megközelítés sem jelent nagyobb segítséget, mert a Sert-Cre (Zhuang és mtsai 2005), a TpH2-Cre (Weber és mtsai 2009, 2011) vagy a VGluT3-Cre (Tatti és mtsai 2014) törzsekben a glutamáterg-szerotoninerg kotranszmisszióra képes sejteket nem lehet elkülöníteni. A raphe-kutatásban gyakran használt ePet-Cre (Scott és mtsai 2005), illetve Pet1-Cre (Pelosi és mtsai 2014) szintén nem megbízható, hiszen VGluT3-expresszálnó sejteket is jelöl, ugyanakkor minden egyes szerotoninerg sejtet pedig nem (Kiyasova és mtsai 2011, Sós és mtsai 2017).

További megfigyelésünk, hogy a VGluT3(-)/5-HT(-) sejtek nem mindegyike helyezkedett el a nucleus raphe paramedianus területén – ahogy azt egyébként a GABAerg raphe-sejtektől várnánk –, hanem egyesek teljesen a középvonalban voltak (lásd 4.1.1. ábra). Ennek magyarázata lehet, hogy az azonosított VGluT3(-)/5-HT(-) sejteink között dopaminerg neuronok is vannak, hiszen a MR-ban igazoltak dopaminerg (vetítő) sejteket (lásd 1.3. alfejezet). További lehetőség, hogy ezidáig ismeretlen GABA-, VGluT3- és szerotoninmentes populációval van dolgunk. Ahogyan

az immunhisztokémiában általában, esetünkben sem szabad teljesen megfélekedezni a negatív eredmények nehéz értékeléséről, hiszen attól, hogy a tesztjeink nem detektálnak egy fehérjét, az még jelen lehet a vizsgált sejtben. Az álnegatív eredmény lehetőségének ellentmond, hogy az immunonegativitást mutató sejtek fiziológiailag elkülönültek az immunopozitív (tehát a többi három) populációktól.

Mindezeket figyelembe véve, a MRR VGluT3- és szerotonintartalom szerinti klasszifikációjához olyan módszerre volt szükségünk, amellyel az elvezetett sejt neurokémiai identitását meggyőzően megállapíthatjuk. Ilyen módszer a juxtacellulárisan elvezetett sejt jelölőanyaggal való feltöltése későbbi, szöveti fixálást követő immunhisztokémiai azonosítása céljából (Pinault 1996). Ezért ezt a módszert alkalmaztuk uretán-altatott állatokban. Az uretán-altatásnak két előnye volt kísérleteink során, egyrészt – mivel a korábban publikált raphe-elvezetések javarészt szintén uretán-altatásban végezték (Viana Di Prisco és mtsai 2002, Kocsis és mtsai 2006) – a mi adatainkat is értelmezhetjük ezek tükrében, másrészt lényegesebb, hogy az uretán-altatás a természetes alvás során megfigyelt agyi állapotváltozásokat jól modellezi, és hatása alatt hippocampalis theta-oszcilláció is előfordul (Clement és mtsai 2008, Pagliardini és mtsai 2013). A theta-oszcilláció jelenléte, illetve kiválthatósága fontos szempont volt, hiszen a raphe-sejtek aktivitásukat a korábbi adatok és feltételezések szerint ahhoz igazítják (lásd 1.4. alfejezet), fiziológiai jellemzésük során véleményünk szerint nem maradhatott el a hippocampalis állapottól függő tüzelési aktivitás vizsgálata.

Külön kiemelném a VGluT3(+)/5-HT(+) neuronokat, amelyek szignifikánsan nem különböztek sem a tisztán glutamáterg, sem a tisztán szerotoninerg populációtól, hanem paramétereik e két csoporté közé estek. Okaty és munkatársainak tanulmányából (Okaty és mtsai 2015) tudjuk, hogy a MRR sejtek VGluT3-expressziója korrelál több más, ingerelhetőséget, tüzelési aktivitást, neurotranszmissziót befolyásoló fehérje termelésével. Előfordulhat, hogy a szerotoninerg-glutamáterg egy átmeneti, átalakulóban lévő sejteket tartalmazó csoport, és ezért a fiziológiai tulajdonságaikatt meghatározó

fehérjék expressziója éppen változik, ennek lenyomatát látjuk mind a glutamáterg, mind a szerotoninerg populációra hasonlító tulajdonságaikban. Neuronok ilyen fenotípusváltását megfigyelték már más agyterületeken (Dulcis és mtsai 2013, Dehorter és mtsai 2015), azonban ennek ellentmond éppen Okatyék megállapítása, miszerint a VGluT3-termelés szerint szétválasztott raphe-sejtcsoportokon belüli expressziós mintázat nem volt variábilis. Éppen átalakulóban lévő sejtektől ugyanis a fenotípust meghatározó fehérjék variábilis termelését várnánk. Másrészt, már régebben megfigyelték, hogy patkányokban az életkorral változik a szerotoninerg rostok morfológiája (Davidoff és Lolova 1991), és ennél még lényegesebb, hogy a szerotoninerg sejtek antidepresszáns gyógyszerelés hatására elveszthetik szerotoninerg fenotípusukat, ehelyett noradrenalin üríthetnek, a locus coeruleus egyes sejtjei meg éppen fordítva, szerotonint kezdenek termelni és felszabadítani noradrenalin helyett (Baudry és mtsai 2010). A szerotoninerg sejtekben tehát lehet egy fenotípusváltási potenciál. Erre a tanulmányunk ugyan nem szolgáltat direkt bizonyítékot, de a későbbi kutatások során érdemes lehet megfontolni ezt a potenciális jelenséget.

A szerotoninerg sejteket a kezdeti fiziológiai vizsgálatok alapján egyöntetűen lassan tüzelő sejteknek tartották, amelyek aktivitása követi az éberségi szintet, REM-alvás alatt kerülnek a legnagyobb gátlás alá (Jacobs és Fornal 1999). Később kiderült, hogy egyes szerotoninerg sejtek gyorsabb, theta-oszcillációhoz kapcsolt ritmusos kisülésekre képesek (Kocsis és mtsai 2006), még későbbi eredmények alapján pedig kirajzolódott egy kép a szerotoninerg sejtekről, miszerint a környezeti ingerek változatos paramétereikhez kapcsolódhat aktivitásuk (Ranade és Mainen 2009). Az általunk bemutatott szerotoninerg sejtek elektrofiziológiai tulajdonságaikban emlékeztettek a korábban, mások által publikáltakra (Mosko és Jacobs 1974, Trulson és Jacobs 1979, Urbain és mtsai 2006), ugyanakkor nem azonosítottunk theta-ritmusos sejtet (egyik neurokémiai csoportban sem). A Kocsis és munkatársainak 2006-os cikkében közölt theta-ritmusos raphe-sejtek pozícióját megnézve, vélhetően ennek oka az, hogy ők a MRR eltérő alrégióiban vezettek el neuronokat. Ezzel együtt nem zárhatjuk ki, hogy

akár a glutamáterg-serotoninerg, akár a tisztán glutamáterg csoportban is legyenek theta-ritmusban tüzelő sejtek.

Szenzoros ingerlés jellemzően növelte a sejtek tüzelési aktivitását, azokét a serotoninerg sejtekét is, amelyek az uretán-altatás alatt spontán kialakuló theta-oszcillációk során kevesebbet tüzeltek. Lényeges különbség volt – amely mind a négy vizsgált sejtpopulációt elkülönítette egymástól – a szenzoros aktiváció kezdetére adott válasz. A glutamáterg sejtek (a VGluT3(+)/5-HT(+) csoport is) jellegzetesen, tartósan megnövelték tüzelési frekvenciájukat, de közülük csupán a serotoninerg-glutamáterg koexpresszáló populáció adott egy átmeneti, még gyorsabb tüzelésbeli választ. A VGluT3-at nem termelő serotoninerg csoport is átmenetileg aktiválódott, de tartós aktivitásfokozás nélkül. A nem-glutamáterg, nem-serotoninerg sejteket – ellentétben a többi elektrofiziológiai paraméterrel – elkülönítette a VGluT3(+)/5-HT(-) sejtektől, hogy az előbbieknél nem találtunk jellegzetes szenzoros ingerléssel kiváltott választ. Ezek alapján láthatjuk, hogy a MRR e négy sejtpopulációja fiziológiailag – ebből fakadóan feltételezhetően funkcionálisan is – elkülönül egymástól. A szenzoros ingerléshez kapcsolódó aktiváció forrását nem vizsgáltuk, ehhez az afferenseknek olyan sejttípus-specifikus feltérképezésére lenne szükség, mint amelyet MRR serotoninerg sejteinek esetében az 1.3. fejezetben bemutatam. A MRR GABAerg és VGluT3-expresszáló sejteinek bemenetét ugyanis nem ismerjük. Feltételezésünk szerint azonban egy ilyen szenzoros aktiváció a periaqueductalis szürkeállományon kívül (Braz és mtsai 2009) az agytörzs noradrenerg (Mejias-Aponte és mtsai 2009, Sara 2009), illetve kolinerg sejteiből (Boucetta és mtsai 2014) vagy a nucleus septalis medialisból (Swanson és Cowan 1979, Fuhrmann és mtsai 2015) is érkezhethet. Mint ahogyan azt már többször említettem, a DR serotoninerg sejteit is változatos szenzoros bemenet éri el, aminek következtében az ingerek számtalan aspektusára reagálhatnak (Ranade és Mainen 2009, Levine és Jacobs 1992). Ebbe a rendszerbe kapcsolódhatnak be a MRR neuronjai is. Az eltérő aktivitású, és különbözőképpen ingerelhető serotoninerg és nem-serotoninerg (köztük a munkámban jellemzett VGluT3-expresszáló sejtek, továbbá a GABAerg sejtek is) populációk egymásra hatva (Soiza-Reilly és Commons

2011, Li és mtsai 2005, Commons 2016) szabályozhatják a hippocampalis információfeldolgozást (lásd az 1.4. alfejezetet), az általunk leírt alapvető fiziológiai tulajdonságaik keretben adnak a szerotoninergerg és glutamáterg komponens egymásra épülő, ám egymástól el is különülő modulációnak.

Végül, a nem-szerotoninergerg sejteknek a hippocampalis (és prefrontalis kérgi) lassú hullámokhoz kapcsolódó, ám annak fázisát nem erőteljesen preferáló tüzelése összhangban van a korábbi adatokkal, miszerint a raphe-magok fő kérgi bemenete, a prefrontalis kéregből eredő rostok elsősorban a nem-szerotoninergerg sejteket innerválják (Li és mtsai 2005, Warden és mtsai 2012, Weissbourd és mtsai 2014). Ezek közül eddig a GABA-ergerg sejteket vizsgálták, a VGluT3-tartalmú raphe-sejtek afferentációját – ahogyan azt fentebb is hangsúlyoztam – még nem térképezték fel. Az általunk látott gyenge kapcsolat arra utal, hogy ezek a sejtek önmaguk nem vesznek részt a kérgi ritmus kialakításában, viszont reagálhatnak rá, a prefrontalis kéreg szabályozhatja aktivitásukat. A gyenge vagy hiányzó fáziskapcsoltság ellenére a VGluT3-tartalmú sejtek – amelyek között az eddigi adatok fényében (Szőnyi és mtsai 2016, Amilhon és mtsai 2010) nagyrészt vetítő sejtek lehetnek – időnként fellépő gyorsabb tüzelése arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek a hálózatszintű moduláció mellett (esetleg helyett) részt vehetnek a célterület csupán néhány sejtjét érintő glutamáterg finomhangolásban. Ennek a lehetőségnek feltétele egy erőteljes, megbízható jelátvitel, amelyet a doktori munkám második részében bemutatott kísérletsorozatban teszteltünk.

5.2. A raphe-hippocampalis rostok interneuronokra gyakorolt hatása

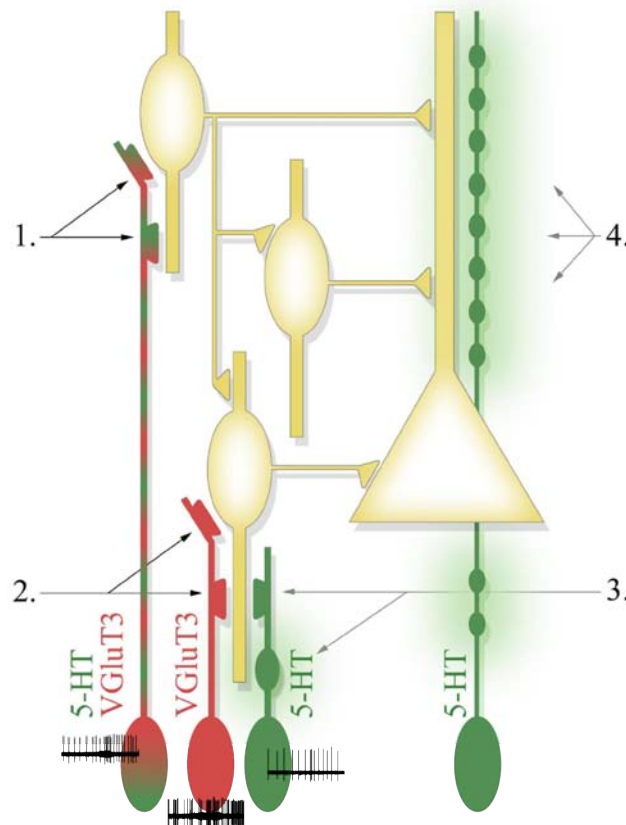
Munkámnak ebben a részében leírtunk egy glutamáterg, időben fókuszált, erős serkentő kapcsolatot a raphe-rostok és a hippocampus egyes interneuronjai között. Fontosnak tartom hangsúlyozni, hogy az általam bemutatott adatokat nagy mértékben kiegészítik és alátámasztják a kutatásban részt vevő szerzőtársaim eredményei. *In vivo* elektromos ingerléses kísérleteink pályaspecificitását igazolták Losonczy Attila hippocampalis szeletekben végzett kísérletei. A MRR sejtjeit transzdukcióval a fényérzékeny channelrhodopsin-2 fehérje termelésére készítette (vad típusú, nem transzgénikus egerekben). Ez a fényérzékeny fehérje megjelent a MRR efferenseiben is, így a hippocampalis rostokban is: a később levágott agyszeletekben ott voltak ezek, a megfelelő hullámhosszúságú fényel serkenthető rostok. Ezek aktiválásával ugyanazt a hatást tudta kiváltani a hippocampalis interneuronokban, amelyet mi is láttunk *in vivo* kísérleteink során, és az ionotrop glutamát receptorok gátlása jelentősen csökkentette a gyors aktiváció kiválthatóságát. Borhegyi Zsolt kimutatta az aktivált interneuronokra érkező preszinaptikus raphe-rostokban a VGluT3-at, illetve a szerotonint, Nyíri Gábor pedig igazolta, hogy a raphe-terminálisok posztszinaptikus oldalán glutamát receptor expresszálódik (részleteket lásd a cikkünkben: Varga és mtsai 2009). Ezekkel a kísérletekkel elsőként bizonyítottuk a MRR rostjaiból a VGluT3-függő glutamát felszabadulást és a glutamáterg posztszinaptikus hatást. Lényegesnek tartom még hozzátenni, hogy az interneuronokon kívül piramissejtek aktivitását is regisztráltuk (Losonczy Attila is hasonlóképpen az agyszeletekben). A raphe-rostok ingerlése a piramissejteket gátolta, ami igazolta, hogy a MRR efferensei interneuronok közvetítésével szabályozni tudják a hippocampus principális sejtjeinek működését.

Szintén fontos eredménynek tartom, hogy mind az elektromos ingerlő áram erősségének csökkentése, mind az AMPA-típusú glutamát receptorok gátlása a kiváltott válasz sikerrátáját csökkentette csak, annak latenciájára vagy fókuszáltságára nem volt hatással. Ennek magyarázata az lehet, hogy ebben a kapcsolatban a preszinaptikus glutamát felszabadulás valószínűsége akár egy impulzus hatására is magas lehet.

Csökkent ingerlő áram esetén az elvezetett neuront beidegző preszinaptikus MRR-sejtek aktiválásának valószínűsége csökken, azonban ha mégis eléri ezeket az ingerlés, a leterjedő akciós potenciál a terminálisaikat kisütve nagy valószínűséggel fog glutamát-felszabadulást kiváltani. Külön ki kell emelni a válasz latenciájának alacsony variabilitását: hatékony szinapszisokra általában jellemző a precíz ingerületátvitel, amit a szinaptikus masinéria felépítésére vezetnek vissza. Eredményeink Losonczy Attila méréseivel kiegészülve arra utalnak (például a válaszok amplitúdója, ami sok esetben tüzelési küszöbig depolarizálta a célneuronokat), hogy a raphe-hippocampalis szinapszisok hasonló jellegűek, mint az agy más területein leírt úgynevezett detonátor szinapszisok, melyek kulcsszerepűek lehetnek agyterületek közötti pontos információtovábbítás szempontjából. Antagonista alkalmazása esetén pedig, ha a felszabaduló glutamát ki tudja szorítani a farmakont, az elegendő lesz a sejt kisüléséhez, tehát feltételezhetjük a posztszinaptikus oldal erőteljes érzékenységét is a glutamát iránt. Egyébként a VGluT3-t (és a VGluT2-t) tartalmazó szinapszisokra általánosságban véve a transzmitter felszabadulásának nagy valószínűsége jellemző, ellentétben a VGluT1-gyel (lásd az 1.5. alfejezetet). A transzmitter nagy felszabadulási valószínűsége ellenére ez a kapcsolat nem mutat kifejezett depressziót ismételt ingerlés esetén, sőt, inkább facilitáció merült fel az *in vitro* adatok értékelése kapcsán (ez kollaborátorunk, Losonczy Attila munkája). Ez jelzi – habár a tényleges depresszív vagy facilitátoros jelleg meghatározására további kísérletek szükségesek – hogy a raphe-hippocampalis glutamáterg kapcsolat különösen hatékony lehet a többi szubkortikális neuromodulátoros projekcióval összehasonlítva. Ennek a célterület finomszabályozásában mindenképpen lényeges szerepe lehet.

A VGluT3-expresszáló MRR-sejtek elektrofiziológiai jellemzése során kiderítettük, hogy a szerotonintartalmuktól függetlenül erőteljesen és tartósan aktiválódnak szenzoros ingerlés alatt. Ezek a sejtek gyorsabb tüzelésükből fakadóan gyorsabb jelátvitelre is képesek lehetnek, mint a lassú, tisztán szerotoninerg társaik (lásd 5.2.1. ábra). A potenciálisan gyorsabb jelátvitelhez a második kísérletsorozatunkból származó bizonyítékok alapján ténylegesen gyors, nagy hatásfokú glutamáterg serkentés társul. Ez

összhangban van az eredeti feltételezésünkkel (lásd 1.4. alfejezet), miszerint a MRR glutamáterg efferensei fájdalmas vagy különös jelentőséggel bíró szenzoros ingerület hatására aktiválódhatnak, és szabályozhatják a hippocampalis információfeldolgozást. A gyors glutamáterg pálya megeremti a lehetőségét a precíz, theta-periódusokon belüli modulációnak (Jackson és mtsai 2008), és az interneuronok aktiválásán keresztül markáns hatást gyakorolhat a piramissejtekre. Az általunk jelölőanyaggal feltöltött, MRR-ingerlésre gyorsan aktiválódó interneuronok egyike sem tartalmazott PV-t, kettő közülök CCK-t termelt, egy-egy másik CB-t, illetve SOM-t. Habár az alacsony elemszám miatt mi szerteágazó statisztikát nem végezhetünk a MRR glutamáterg rostjai által inervált hippocampalis interneuronok neurokémiai tulajdonságairól,



5.2.1. ábra. A raphe-hippocampalis kapcsolat sémája. A raphe-rostok szerotoninerg-glutamáterg kotranszmisszióval (1.), tisztán glutamáterg (2.) vagy tisztán szerotoninerg (3.) szinaptikus kapcsolatokon keresztül szabályozhatják a hippocampus interneuronjait, míg a principális sejteket volumen transzmisszióval éri el a szerotoninerg hatás (4.). Az interneuronokat szabályozó MRR-sejtek neurokémiai különbségeik mellett elektrofiziológiailag is elkülönülnek, ami a MRR összetett funkcionalitására utal.

adataink mégis összhangban vannak a korábbi ismeretekkel, miszerint a raphe-rostok szelektíven CB-, VIP- és CCK-tartalmú interneurookkal (ezek részben átfedő populációk, lásd 1.4. alfejezet) szinaptizálnak. Ezeken az interneuronokon keresztül tehát a bizonyos szenzoros ingerekre aktiválódó glutamáterg raphe-sejtek finomszabályozhatják a hippocampusban a jelentős szenzoros információ társítását az éppen folyó helyzetkódoláshoz. Ennek tesztelése, bizonyítása már túlmutat jelen doktori munkán, ennek érdekében új kísérletek szükségesek. Munkánkból azonban következtethetünk a hippocampus hálózat raphe-rostok által elért elemei közti együttműködésre, hiszen az ionotrop 5-HT₃ receptorok blokkolása változatos módon alakította az elektromos ingerlésre adott válasz sikerrátáját, egyes esetekben növelte azt. Ez arra utal, hogy alaphelyzetben az ionotrop szerotoninreceptor által serkentett interneuronok befolyásolják, visszafogják a raphe-eredetű glutamáttal aktivált interneuronokat. A gyors aktivációt a legtöbb esetben követő gátlásnak hátterében is más interneuronok hatása áll, amelyek szintén az ionotrop szerotoninreceptorok által – továbbá feltételezhetően a metabotrop 5-HT_{2A} receptorokon keresztül is – aktiválódnak, hogy azután (akár többszörös interakción keresztül is), gátolják a raphe-ingerlésre egyébként nagyon gyorsan serkentődő sejteket. Mindez előrevetíti, mennyire változatos hatást fejthetnek ki a raphe-rostok a hippocampus információfeldolgozására.

A glutamáterg-szerotoninerg transzmisszió kooperációjának egyik módjáról írtam eddig, miszerint a szerotoninerg háttérhez egy időben behatárolt, ám erőteljes glutamáterg komponens társul. A glutamáterg komponensnek eszerint a piramissejtek behatárolt csoportjára, amelyek a releváns információfeldolgozásban éppen részt vesznek, lenne (közvetett) hatása, ráadásul a feltételezett információkapcsolásnak rövid időablakon belül kellene megvalósulnia, így e hatásnak időben is fókuszálnak kellene lennie. Ezt a szerotonin – és ahogy kísérleteink mutatják – a glutamát gyors kinetikájú ionotrop receptorai közvetítik. Ezek mellett azonban metabotrop receptorokat is expresszálnak a hippocampus interneuronjai, valamint principális sejtjei egyaránt (lásd 1.4. alfejezet). A méréseink során látott lassú, időben kevésbé fókuszált serkentő és gátló válaszok hátterében is a szerotonin metabotrop receptorai állhatnak (de ezt ebben a munkában

nem volt célunk vizsgálni). Mindenesetre felvetődik annak is a lehetősége, hogy az együtt ürülő szerotonin és glutamát a metabotrop receptoraikon keresztül befolyásolják célsejtjeiket. A különböző metabotrop receptorok dimerizáció után szorosan együttműködhetnek, az egyik ligandkötése befolyásolhatja a másik jelátviteli útvonalaikat (Angers és mtsai 2002, Devi 2001, Niswender és Conn 2010). Stuart C. Sealfon munkacsoportja igazolta, hogy a glutamát egyik metabotrop receptora, az mGluR2 és az 5-HT_{2A} receptorok funkcionális dimereket (esetleg nagyobb egységeket: tetramereket, oligomereket) alkotnak, melyek integrálják a két transzmitter jelátviteli kaszkádjait. Az 5-HT_{2A} receptor önmagában nagy affinitással kapcsolódik a G $\alpha_{q/11}$ fehérjéhez, és agonistát kötve többek között a foszfolipáz C aktiválásával járó szignáltranszdukciót indít el. Amennyiben mGluR2 receptort is koexpresszál a sejt, az 5-HT_{2A} affinitása a G $\alpha_{q/11}$ -hez csökken, és nagyobb affinitással kapcsolódik a G α_i -hez, aminek megfelelően az elindított jelátviteli folyamatok is módosulnak, a foszfolipáz C aktiválása mellett a pszichózisban kulcselemnek tartott transzkripciót szabályozó faktor, az *egr-2* G α_i -függő indukciója is megvalósul. E kettős jelátvitel húzódnak meg a hallucinogén anyagok (ezek az 5-HT_{2A} receptor agonistái) hatása háttérében is. A két metabotrop receptor között a transzmembrán hélixek interakciója szükséges, hogy egymás jelátvitelét befolyásolják. Önmagában az mGluR2 jelenléte – ligand kötése nélkül – megváltoztatja a szerotoninerger jelátvitelt, viszont az agonistakötött mGluR2 már stabilizálja az 5-HT_{2A} eredeti, G $\alpha_{q/11}$ -függő szignalizációját. Ez azt is jelenti, hogy a glutamáterger jelátvitel megfelelő szintű mGluR2 expresszió esetén gátolhatja, kivédheti a hallucinogén hatásokban kulcsfontosságú *egr-2*, illetve az általa szabályozott gének indukcióját. A glutamáterger-szerotoninerger jelátvitel összekapcsolódása tehát messzemenően alakíthatja az idegrendszer működését (González-Maeso és mtsai 2008). Ezt a hatást ugyan a prefrontális kéregben írták le, de hasonló interakciót a hippocampusban sem zárhatunk ki. A raphe-magokból a hippocampust elérő és ott nem szinaptizáló vékony rostok egy adott hányada feltehetőleg tartalmaz VGluT3-at, hiszen mind a MR-ban, mind a DR-hoz tartozó B6 sejtcsoportban előfordulhatnak vékony rostokat képező neuronok, és mindkét régióban a vetítő sejtek jelentős aránya expresszál VGluT3-at. Ennélfogva elképzelhető, hogy volumen transzmisszió útján is felszabadul szerotoninerger sejtekből

glutamát, és az esetlegesen metabotrop receptorok közvetítésével hatást fejthet ki. Kérdés azonban, hogy egy ilyen hipotetikus esetben a glutamát meddig képes eldiffundálni. Ennek eldöntésére, illetve, hogy a vékony rostok apró varikozitásaiban ténylegesen jelen van-e a VGluT3, további kísérletek szükségesek.

6. Következtetések

Doktori munkám során választ kaptunk mindkét kísérletsorozatunk elején megfogalmazott kérdéseinkre. Ezek szerint a MRR VGluT3-tartalmú sejtjei nemcsak a glutamáterg kotranszmisszió lehetőségében, de elektrofiziológiailag is elkülönülnek a VGluT3-at nem expresszáló szerotoninerg sejtektől. Munkánknak alapvető kihatása lehet a sejtjelölés nélkül elvezetett MRR-sejtek azonosítására. Korábban, a széles akciós potenciálokat tüzelő, lassú MRR-sejteket egyúttal szerotoninergnek tartották, ezt a csoportot eredményeink nyomán nem lehet homogénnek tekinteni, mivel a két neurokémiai csoport neuronjainak akcióspotenciál-szélessége jelentősen nem tér el egymástól. Még lényegesebb, hogy a gyorsan tüzelő MRR-neuronokat sem szabad egy csoportba besorolni, hiszen ezek között találjuk a VGluT3-tartalmú, szerotoninmentes, valamint a VGluT3(-)/5-HT(-), javarészt feltételezhetően GABAerg sejteket is. Az éber állatokban, immunhisztokémiai azonosítás nélkül elvezetett sejtek adatainak értékelésénél tehát figyelembe kell venni a fentieket. Továbbá, a szenzoros ingerekre történő aktivitásfokozás a glutamáterg MRR-sejtek körében erősíti a feltételezést, amely szerint e sejtek funkciója az élőlény számára jelentőséggel bíró szenzoros ingerek hippocampalis feldolgozását segíteni. Második kísérletsorozatunk felfedte az ilyen képességhez szükséges időben precíz, hatékony jelátvitelt a raphe-rostok és posztszinaptikus partnereik között. A következőkben ezért indokoltak olyan kísérletek, amelyekben a glutamáterg komponens manipulálásával – lehetőség szerint specifikus, reverzibilis gátlásával – megvizsgáljuk, miképpen változik a kísérleti állatok tanulása, főként a helyhez, pozícióhoz kötött társítások esetében. Mindenképpen szükséges a jövőben szabadon viselkedő állatokban jellemezni a MRR-sejtek aktivitását is, hiszen jelenlegi munkánkban uretán-altatást alkalmaztunk, ami tulajdonképpen a hippocampalis theta-aktivitás egyik típusát engedi kialakulni, az exploráció alatti tulajdonságait a MRR-neuronoknak nem tudtuk tetten érni. Szintén érdekes lenne, hogy az úgynevezett éles hullámú aktivitáshoz eltérően kapcsolódnak-e a szerotonint tartalmazó és nem tartalmazó VGluT3-expresszáló sejtek. Természetesen, a viselkedés egyes elemeihez való aktivitásviszonyuk is fontos adatokat szolgáltatna arra

vonatkozóan, hogy mi lehet a MRR sejtjeinek a funkciója a viselkedés szabályozásában. A sejtspecifikus manipulációt pedig ennek fényében pontosíthatnánk, és kideríthetnénk azt a magatartásformát, amely során komoly szerepet játszik a szerotoninerg rendszer glutamáterg komponense.

Összefoglalás

A szerotoninerg rendszer működéséről alkotott felfogásunk alapvetően megváltozott a vezikuláris glutamáttranszporter 3-as izoformájának (VGluT3) felfedezésével. A VGluT3 a szerotoninerg sejtek jelentős hányadában expresszálódik, emellett a raphe-magok nem-szerotoninerg vetítő sejtjeinek nagy részében is jelen van. Glutamérg kotranszmisszióra teheti képessé a raphe-rostokat, ami új funkcionális perspektívába helyezi a hippocampust innerváló nucleus raphe medianust (MR). A feltételezett gyors glutamáterg jelátvitel segítségével precízen finomhangolhatja a célterület információfeldolgozását, szabályozhatja akár a hirtelen bekövetkező, különlegesen jelentős események kapcsolását a pozíciókód hippocampalis feldolgozásához. Első kísérletsorozatunkban bizonyítottuk, hogy a MR VGluT3-tartalmú sejtjeinek kisülései szignifikánsan gyorsabbak, mint a VGluT3-at nem tartalmazó szerotoninerg sejtjei, és szenzoros ingerlésre tartósan aktiválódnak. Hippocampalis theta-oszcilláció során növelték aktivitásukat, ellentétben a szerotoninerg neuronokkal. Elektrofiziológiai alaptulajdonságaik tehát alkalmassá teszik ezeket a sejteket gyors neuromoduláció szabályozására. Második kísérletsorozatunkban elsőként bizonyítottuk, hogy a raphe-rostokból glutamát szabadulhat fel, ami a posztszinaptikus interneuronokat erőteljesen, időben precízen aktiválja. Farmakológiai tesztjeink igazolták az AMPA-típusú glutamát-receptorok szerepét ennek az effektusnak a kialakításában. A raphe-rostok által innervált interneuronok gyors serkentése a piramissejtek gátlásával a hippocampalis hálózat dinamikájába messzemenően beavatkozhat. A VGluT3-tartalmú MR-sejtek gyors kisüléseiknek és hatékony jeltovábbító képességének köszönhetően alkalmasak egy hirtelen bekövetkező eseményhez igazítani a hippocampus információfeldolgozását. Ez kiegészítheti a lassú szerotoninerg modulációt a pozícióhoz köthető információk hippocampalis fogadásában és konszolidációjában. Munkánk képviseli az első lépést a szubkortikális modulátoros rendszerek egy új típusú, erőteljes hatást kifejtő komponensének jellemzésében.

Summary

The concept of serotonergic modulation was fundamentally altered by the discovery of the third isoform of the vesicular glutamate transporter (VGluT3). VGluT3 is expressed by a significant portion of both serotonergic and non-serotonergic projection cells of the raphe nuclei, therefore the fibers of median raphe nucleus (MR) may corelease glutamate, placing the raphe-hippocampal projection into a new functional perspective. By assuming fast glutamatergic transmission, these fibers can temporally fine-tune the hippocampal signal processing and accurately regulate the connection between salient sensory inputs and position coding. In our first series of experiments, we demonstrated that VGluT3-expressing neurons in MR fire at significantly higher frequency than VGluT3-lacking serotonergic cells, and they are permanently activated by sensory stimulation. During hippocampal theta oscillation, they increased their firing rate, in contrast to serotonergic neurons. Hence, according to their basic electrophysiological properties, the VGluT3-containing MR cells are suitable for rapid neuromodulatory signaling. In our second series of experiments, we provided the first evidence that raphe fibers corelease glutamate resulting in the powerful, temporally focused activation of postsynaptic interneurons. We also demonstrated that this effect is mediated by AMPA type glutamate receptors. The rapid activation of hippocampal interneurons can largely interfere with the dynamics of hippocampal network by inhibition of pyramidal cells. VGluT3-expressing MR cells – considering their fast discharges and efficient signaling capabilities – are in a key position to adjust the hippocampal network to process unexpected events. This may complement the slow serotonergic modulation in shaping the hippocampal information flow during the acquisition and consolidation of positional information. Our work is the initial step in the quest for identifying the function of a newly discovered, powerful component of subcortical modulation.

Irodalomjegyzék

- Acsády L, Arabadzisz D, Katona I, Freund TF. (1996) Topographic distribution of dorsal and median raphe neurons with hippocampal, septal and dual projection. *Acta Biol Hung*, 47: 9-19.
- Acsády L, Halasy K, Freund TF. (1993) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. *Neuroscience*, 52: 829-41.
- Aghajanian GK, Asher IM. (1971) Histochemical fluorescence of raphe neurons: selective enhancement by tryptophan. *Science*, 172: 1159-61.
- Aghajanian GK, Kuhar MJ, Roth RH. (1973) Serotonin-containing neuronal perikarya and terminals: differential effects of P-chlorophenylalanine. *Brain Res*, 54: 85-101.
- Aghajanian GK, Wang RY. (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res*, 122: 229-42.
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, 74: 2622-5.
- Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R, McHugh TJ, Fukai T, Isomura Y, Okamoto H. (2013) The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. *J Neurosci*, 33: 8909-21.
- Akil O, Seal RP, Burke K, Wang C, Alemi A, During M, Edwards RH, Lustig LR. (2012) Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy. *Neuron*, 75: 283-93.
- Allers KA, Sharp T. (2003) Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience*, 122: 193-204.
- Alonso A, Merchan P, Sandoval JE, Sanchez-Arrones L, Garcia-Cazorla A, Artuch R, Ferran JL, Martinez-de-la-Torre M, Puelles L. (2013) Development of the serotonergic cells in murine raphe nuclei and their relations with rhombomeric domains. *Brain Struct Funct*, 218: 1229-77.
- Amilhon B, Lepicard E, Renoir T, Mongeau R, Popa D, Poirel O, Miot S, Gras C, Gardier AM, Gallego J, Hamon M, Lanfumey L, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2010) VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J Neurosci*, 30: 2198-210.
- Amo R, Fredes F, Kinoshita M, Aoki R, Aizawa H, Agetsuma M, Aoki T, Shiraki T, Kakinuma H, Matsuda M, Yamazaki M, Takahoko M, Tsuboi T, Higashijima S, Miyasaka N, Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y, Fukai T, Okamoto H. (2014) The

habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron*, 84: 1034-48.

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

Angers S, Salahpour A, Bouvier M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 409-35.

Assaf SY, Miller JJ. (1978) The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization. *Neuroscience*, 3: 539-50.

Awatramani R, Soriano P, Rodriguez C, Mai JJ, Dymecki SM. (2003) Cryptic boundaries in roof plate and choroid plexus identified by intersectional gene activation. *Nat Genet*, 35: 70-5.

Azmitia EC, Henriksen SJ. (1976) A modification of the Falck-Hillarp technique for 5-HT fluorescence employing hypertonic formaldehyde perfusion. *J Histochem Cytochem*, 24: 1286-8.

Aznar S, Qian Z, Shah R, Rahbek B, Knudsen GM. (2003) The 5-HT_{1A} serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Res*, 959: 58-67.

Aznar S, Qian ZX, Knudsen GM. (2004) Non-serotonergic dorsal and median raphe projection onto parvalbumin- and calbindin-containing neurons in hippocampus and septum. *Neuroscience*, 124: 573-81.

Bacon WL, Beck SG. (2000) 5-Hydroxytryptamine(7) receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 294: 672-9.

Bambico FR, Nguyen NT, Gobbi G. (2009) Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol*, 19: 215-28.

Bang SJ, Commons KG. (2012) Forebrain GABAergic projections from the dorsal raphe nucleus identified by using GAD67-GFP knock-in mice. *J Comp Neurol*, 520: 4157-67.

Bang SJ, Jensen P, Dymecki SM, Commons KG. (2012) Projections and interconnections of genetically defined serotonin neurons in mice. *Eur J Neurosci*, 35: 85-96.

Barker DJ, Root DH, Zhang S, Morales M. (2016) Multiplexed neurochemical signaling by neurons of the ventral tegmental area. *J Chem Neuroanat*, 73: 33-42.

Barnes NM, Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-152.

Barroso-Chinea P, Rico AJ, Conte-Perales L, Gomez-Bautista V, Luquin N, Sierra S, Roda E, Lanciego JL. (2011) Glutamatergic and cholinergic pedunculopontine neurons

innervate the thalamic parafascicular nucleus in rats: changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct Funct*, 216: 319-30.

Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay JM, Kellermann O. (2010) miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science*, 329: 1537-41.

Beck SG, Choi KC, List TJ. (1992) Comparison of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated hyperpolarization in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 263: 350-9.

Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci*, 18: 8648-59.

Bellocchio EE, Reimer RJ, Freneau RT, Jr., Edwards RH. (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, 289: 957-60.

Blaesse P, Ehrhardt S, Friauf E, Nothwang HG. (2005) Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Cell Tissue Res*, 320: 33-50.

Bland BH, Bland CE, MacIver MB. (2016) Median raphe stimulation-induced motor inhibition concurrent with suppression of type 1 and type 2 hippocampal theta. *Hippocampus*, 26: 289-300.

Bloom FE, Battsberg EL. (1976) A rapid, simple and sensitive method for the demonstration of central catecholamine-containing neurons and axons by glyoxylic acid-induced fluorescence. II. A detailed description of methodology. *J Histochem Cytochem*, 24: 561-71.

Bobillier P, Pettijean F, Salvert D, Ligier M, Seguin S. (1975) Differential projections of the nucleus raphe dorsalis and nucleus raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res*, 85: 205-10.

Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. (2006) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res*, 326: 553-72.

Bogdanski DF, Pletscher A, Brodie BB, Udenfriend S. (1956) Identification and assay of serotonin in brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 117: 82-8.

Bogdanski DF, Weissbach H, Udenfriend S. (1957) The distribution of serotonin, 5-hydroxytryptophan decarboxylase, and monoamine oxidase in brain. *J Neurochem*, 1: 272-8.

Bombardi C. (2012) Neuronal localization of 5-HT_{2A} receptor immunoreactivity in the rat hippocampal region. *Brain Res Bull*, 87: 259-73.

Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R. (1994) The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience*, 58: 167-82.

- Boucetta S, Cisse Y, Mainville L, Morales M, Jones BE. (2014) Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci*, 34: 4708-27.
- Boulland JL, Jenstad M, Boekel AJ, Wouterlood FG, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. (2009) Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb Cortex*, 19: 241-8.
- Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fremereau RT, Jr., Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol*, 480: 264-80.
- Boureau YL, Dayan P. (2011) Opponency revisited: competition and cooperation between dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology*, 36: 74-97.
- Braz JM, Enquist LW, Basbaum AI. (2009) Inputs to serotonergic neurons revealed by conditional viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol*, 514: 145-60.
- Bunin MA, Wightman RM. (1998) Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci*, 18: 4854-60.
- Buzsáki G. (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33: 325-40.
- Buzsáki G, Moser EI. (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*, 16: 130-8.
- Buzsáki G, Schomburg EW. (2015) What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nat Neurosci*, 18: 484-9.
- Case DT, Alamilla J, Gillespie DC. (2014) VGLUT3 does not synergize GABA/glycine release during functional refinement of an inhibitory auditory circuit. *Front Neural Circuits*, 8: 140.
- Case DT, Gillespie DC. (2011) Pre- and postsynaptic properties of glutamatergic transmission in the immature inhibitory MNTB-LSO pathway. *J Neurophysiol*, 106: 2570-9.
- Castro DC, Cole SL, Berridge KC. (2015) Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Front Syst Neurosci*, 9: 90.
- Chalmers DT, Watson SJ. (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res*, 561: 51-60.
- Chazal G, Ralston HJ, 3rd. (1987) Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J Comp Neurol*, 259: 317-29.

- Clement EA, Richard A, Thwaites M, Ailon J, Peters S, Dickson CT. (2008) Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia. *PLoS One*, 3: e2004.
- Cohen JY, Amoroso MW, Uchida N. (2015) Serotonergic neurons signal reward and punishment on multiple timescales. *Elife*, 4:
- Commons KG. (2016) Ascending serotonin neuron diversity under two umbrellas. *Brain Struct Funct*, 221: 3347-60.
- Cornea-Hebert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. (1999) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol*, 409: 187-209.
- Correia PA, Lottem E, Banerjee D, Machado AS, Carey MR, Mainen ZF. (2017) Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *Elife*, 6:
- Crawford LK, Craige CP, Beck SG. (2010) Increased intrinsic excitability of lateral wing serotonin neurons of the dorsal raphe: a mechanism for selective activation in stress circuits. *J Neurophysiol*, 103: 2652-63.
- Crockett MJ, Clark L, Robbins TW. (2009) Reconciling the role of serotonin in behavioral inhibition and aversion: acute tryptophan depletion abolishes punishment-induced inhibition in humans. *J Neurosci*, 29: 11993-9.
- Crooks R, Jackson J, Bland BH. (2012) Dissociable pathways facilitate theta and non-theta states in the median raphe--septohippocampal circuit. *Hippocampus*, 22: 1567-76.
- Cutsuridis V, Poirazi P. (2015) A computational study on how theta modulated inhibition can account for the long temporal windows in the entorhinal-hippocampal loop. *Neurobiol Learn Mem*, 120: 69-83.
- Dahlstrom A, Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20: 398-9.
- Dale E, Pehrson AL, Jeyarajah T, Li Y, Leiser SC, Smagin G, Olsen CK, Sanchez C. (2016) Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectr*, 21: 143-61.
- Dalgliesh CE, Toh CC, Work TS. (1952) Smooth muscle stimulants from the gastrointestinal tract; identification of 5-hydroxytryptamine and its distinction from substance P. *Biochem J*, 52: xxx.
- Dalley JW, Roiser JP. (2012) Dopamine, serotonin and impulsivity. *Neuroscience*, 215: 42-58.
- Daniels RW, Collins CA, Chen K, Gelfand MV, Featherstone DE, DiAntonio A. (2006) A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron*, 49: 11-6.
- Danik M, Cassoly E, Manseau F, Sotty F, Mougnot D, Williams S. (2005) Frequent coexpression of the vesicular glutamate transporter 1 and 2 genes, as well as

coexpression with genes for choline acetyltransferase or glutamic acid decarboxylase in neurons of rat brain. *J Neurosci Res*, 81: 506-21.

Datiche F, Luppi PH, Cattarelli M. (1995) Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain Res*, 671: 27-37.

Davidoff MS, Lolova IS. (1991) Age-related changes in serotonin-immunoreactivity in the telencephalon and diencephalon of rats. *J Hirnforsch*, 32: 745-53.

Dawson LA, Nguyen HQ, Li P. (2001) The 5-HT(6) receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 25: 662-8.

Dayan P, Huys QJ. (2008) Serotonin, inhibition, and negative mood. *PLoS Comput Biol*, 4: e4.

Dehorter N, Ciceri G, Bartolini G, Lim L, del Pino I, Marin O. (2015) Tuning of fast-spiking interneuron properties by an activity-dependent transcriptional switch. *Science*, 349: 1216-20.

Del Pino I, Brotons-Mas JR, Marques-Smith A, Marighetto A, Frick A, Marin O, Rico B. (2017) Abnormal wiring of CCK+ basket cells disrupts spatial information coding. *Nat Neurosci*,

den Ouden HE, Daw ND, Fernandez G, Elshout JA, Rijpkema M, Hoogman M, Franke B, Cools R. (2013) Dissociable effects of dopamine and serotonin on reversal learning. *Neuron*, 80: 1090-100.

Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A. (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol*, 207: 239-54.

Devi LA. (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 532-7.

Diba K, Amarasingham A, Mizuseki K, Buzsáki G. (2014) Millisecond timescale synchrony among hippocampal neurons. *J Neurosci*, 34: 14984-94.

Didier A, Carleton A, Bjaalie JG, Vincent JD, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Lledo PM. (2001) A dendrodendritic reciprocal synapse provides a recurrent excitatory connection in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 6441-6.

Ditlevsen S, Lansky P. (2011) Firing variability is higher than deduced from the empirical coefficient of variation. *Neural Comput*, 23: 1944-66.

Docherty M, Bradford HF, Wu JY. (1987) Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature*, 330: 64-6.

Dragoi G, Buzsáki G. (2006) Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron*, 50: 145-57.

- Dugue GP, Lorincz ML, Lottem E, Audero E, Matias S, Correia PA, Lena C, Mainen ZF. (2014) Optogenetic recruitment of dorsal raphe serotonergic neurons acutely decreases mechanosensory responsivity in behaving mice. *PLoS One*, 9: e105941.
- Duguid IC, Smart TG. (2004) Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nat Neurosci*, 7: 525-33.
- Dulcis D, Jamshidi P, Leutgeb S, Spitzer NC. (2013) Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior. *Science*, 340: 449-53.
- Eichenbaum H. (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*, 1: 41-50.
- El Mestikawy S, Wallen-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci*, 12: 204-16.
- Erspamer V. (1954) Pharmacology of indole-alkylamines. *Pharmacol Rev*, 6: 425-87.
- Erspamer V, Asero B. (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169: 800-1.
- Erspamer V, Vialli M. (1937) Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll Soc Med-chir Pavia*, 51: 357-363.
- Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. (1962) Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem*, 10: 348-354.
- Feldberg W, Toh CC. (1953) Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin, enteramine) in the wall of the digestive tract. *J Physiol*, 119: 352-62.
- Fonnum F. (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, 42: 1-11.
- Fonseca MS, Murakami M, Mainen ZF. (2015) Activation of dorsal raphe serotonergic neurons promotes waiting but is not reinforcing. *Curr Biol*, 25: 306-15.
- Forchetti CM, Meek JL. (1981) Evidence for a tonic GABAergic control of serotonin neurons in the median raphe nucleus. *Brain Res*, 206: 208-12.
- Fornal CA, Metzler CW, Marrosu F, Ribiero-do-Valle LE, Jacobs BL. (1996) A subgroup of dorsal raphe serotonergic neurons in the cat is strongly activated during oral-buccal movements. *Brain Res*, 716: 123-33.
- Frahm S, Antolin-Fontes B, Gorlich A, Zander JF, Ahnert-Hilger G, Ibanez-Tallon I. (2015) An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence. *Elife*, 4: e11396.
- Freedman D, Diaconis P. (1981) On the histogram as a density estimator. *Probability Theory and Related Fields*, 57: 453-476.
- Freneau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. (2002)

- The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 14488-93.
- Freneau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31: 247-60.
- Freneau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*, 27: 98-103.
- Freund TF, Antal M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336: 170-3.
- Freund TF, Buzsaki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470.
- Freund TF, Gulyas AI, Acsady L, Gorcs T, Toth K. (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 8501-5.
- Freund TF, Katona I. (2007) Perisomatic inhibition. *Neuron*, 56: 33-42.
- Fu W, Le Maitre E, Fabre V, Bernard JF, David Xu ZQ, Hokfelt T. (2010) Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *J Comp Neurol*, 518: 3464-94.
- Fuhrmann F, Justus D, Sosulina L, Kaneko H, Beutel T, Friedrichs D, Schoch S, Schwarz MK, Fuhrmann M, Remy S. (2015) Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Related Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron*, 86: 1253-64.
- Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T. (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 435: 379-87.
- Fuxe K, Jonsson G. (1967) A modification of the histochemical fluorescence method for the improved localization of 5-hydroxytryptamine. *Histochemie*, 11: 161-6.
- Fuxe K, Jonsson G. (1974) Further mapping of central 5-hydroxytryptamine neurons: studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 10: 1-12.
- Gabellec MM, Panzanelli P, Sassoe-Pognetto M, Lledo PM. (2007) Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 25: 1373-83.
- Gaddum JH. (1953) Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5-hydroxytryptamine. *J Physiol*, 121: 15p.
- Gagnon D, Parent M. (2014) Distribution of VGLUT3 in highly collateralized axons from the rat dorsal raphe nucleus as revealed by single-neuron reconstructions. *PLoS One*, 9: e87709.

- Gerard C, Martres MP, Lefevre K, Miquel MC, Verge D, Lanfumey L, Doucet E, Hamon M, el Mestikawy S. (1997) Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res*, 746: 207-19.
- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*, 20: 4217-25.
- Gillespie DC, Kim G, Kandler K. (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci*, 8: 332-8.
- Glickfeld LL, Scanziani M. (2006) Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat Neurosci*, 9: 807-15.
- Glikmann-Johnston Y, Saling MM, Reutens DC, Stout JC. (2015) Hippocampal 5-HT_{1A} Receptor and Spatial Learning and Memory. *Front Pharmacol*, 6: 289.
- Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC. (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452: 93-7.
- Gos T, Krell D, Brisch R, Biellau H, Trubner K, Steiner J, Bernstein HG, Bogerts B. (2008) Demonstration of decreased activity of dorsal raphe nucleus neurons in depressed suicidal patients by the AgNOR staining method. *J Affect Disord*, 111: 251-60.
- Goutagny R, Loureiro M, Jackson J, Chaumont J, Williams S, Isope P, Kelche C, Cassel JC, Lecourtier L. (2013) Interactions between the lateral habenula and the hippocampus: implication for spatial memory processes. *Neuropsychopharmacology*, 38: 2418-26.
- Graeff FG, Quintero S, Gray JA. (1980) Median raphe stimulation, hippocampal theta rhythm and threat-induced behavioral inhibition. *Physiol Behav*, 25: 253-61.
- Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci*, 11: 292-300.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, 22: 5442-51.
- Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S. (2005) Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology*, 49: 901-11.
- Gritti I, Henny P, Galloni F, Mainville L, Mariotti M, Jones BE. (2006) Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience*, 143: 1051-64.

- Gulyás AI, Acsady L, Freund TF. (1999) Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus. *Neurochem Int*, 34: 359-72.
- Gulyás AI, Freund TT. (2015) Generation of physiological and pathological high frequency oscillations: the role of perisomatic inhibition in sharp-wave ripple and interictal spike generation. *Curr Opin Neurobiol*, 31: 26-32.
- Gulyás AI, Seress L, Toth K, Acsady L, Antal M, Freund TF. (1991) Septal GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus of the macaque monkey. *Neuroscience*, 41: 381-90.
- Guo JD, Rainnie DG. (2010) Presynaptic 5-HT(1B) receptor-mediated serotonergic inhibition of glutamate transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience*, 165: 1390-401.
- Guzman MS, De Jaeger X, Raulic S, Souza IA, Li AX, Schmid S, Menon RS, Gainetdinov RR, Caron MG, Bartha R, Prado VF, Prado MA. (2011) Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission. *PLoS Biol*, 9: e1001194.
- Hajós M, Allers KA, Jennings K, Sharp T, Charette G, Sik A, Kocsis B. (2007) Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods. *Eur J Neurosci*, 25: 119-26.
- Halasy K, Miettinen R, Szabat E, Freund TF. (1992) GABAergic Interneurons are the Major Postsynaptic Targets of Median Raphe Afferents in the Rat Dentate Gyrus. *Eur J Neurosci*, 4: 144-153.
- Hangya B, Borhegyi Z, Szilagyí N, Freund TF, Varga V. (2009) GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci*, 29: 8094-102.
- Harding A, Paxinos G, Halliday G. The Serotonin and Tachykinin Systems. In: Paxinos G (szerk.) *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press, London, 2004: 1205-1214.
- Harkany T, Holmgren C, Hartig W, Qureshi T, Chaudhry FA, Storm-Mathisen J, Dobszay MB, Berghuis P, Schulte G, Sousa KM, Fremeau RT, Jr., Edwards RH, Mackie K, Ernfors P, Zilberter Y. (2004) Endocannabinoid-independent retrograde signaling at inhibitory synapses in layer 2/3 of neocortex: involvement of vesicular glutamate transporter 3. *J Neurosci*, 24: 4978-88.
- Haverkamp S, Wässle H. (2004) Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3. *J Comp Neurol*, 468: 251-63.
- Helboe L, Egebjerg J, de Jong IE. (2015) Distribution of serotonin receptor 5-HT6 mRNA in rat neuronal subpopulations: A double in situ hybridization study. *Neuroscience*, 310: 442-54.

- Hendricks T, Francis N, Fyodorov D, Deneris ES. (1999) The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J Neurosci*, 19: 10348-56.
- Hendricks TJ, Fyodorov DV, Wegman LJ, Lelutiu NB, Pehek EA, Yamamoto B, Silver J, Weeber EJ, Sweatt JD, Deneris ES. (2003) Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron*, 37: 233-47.
- Hensler JG. (2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*, 30: 203-14.
- Herkenham M, Nauta WJ. (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 187: 19-47.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 21: Rc181.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S. (2004a) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience*, 123: 983-1002.
- Herzog E, Landry M, Buhler E, Bouali-Benazzouz R, Legay C, Henderson CE, Nagy F, Dreyfus P, Giros B, El Mestikawy S. (2004b) Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci*, 20: 1752-60.
- Heym J, Trulsson ME, Jacobs BL. (1982) Raphe unit activity in freely moving cats: effects of phasic auditory and visual stimuli. *Brain Res*, 232: 29-39.
- Higley MJ, Gittis AH, Oldenburg IA, Balthasar N, Seal RP, Edwards RH, Lowell BB, Kreitzer AC, Sabatini BL. (2011) Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS One*, 6: e19155.
- Hikosaka O. (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci*, 11: 503-13.
- Hioki H, Fujiyama F, Nakamura K, Wu SX, Matsuda W, Kaneko T. (2004) Chemically specific circuit composed of vesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex*, 14: 1266-75.
- Hioki H, Nakamura H, Ma YF, Konno M, Hayakawa T, Nakamura KC, Fujiyama F, Kaneko T. (2010) Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *J Comp Neurol*, 518: 668-86.
- Hisano S, Hoshi K, Ikeda Y, Maruyama D, Kanemoto M, Ichijo H, Kojima I, Takeda J, Nogami H. (2000) Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Brain Res Mol Brain Res*, 83: 34-43.

Hisano S, Nogami H. (2002) Transporters in the neurohypophysial neuroendocrine system, with special reference to vesicular glutamate transporters (BNPI and DNPI): a review. *Microsc Res Tech*, 56: 122-31.

Hokfelt T, Ljungdahl A. (1972) Modification of the Falck-Hillarp formaldehyde fluorescence method using the Vibratome: simple, rapid and sensitive localization of catecholamines in sections of unfixed or formalin fixed brain tissue. *Histochemie*, 29: 325-39.

Holman RB, Angwin P, Barchas JD. (1976) Simultaneous determination of indole- and catecholamines in small brain regions in the rat using a weak cation exchange resin. *Neuroscience*, 1: 147-50.

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

Hsu YW, Tempest L, Quina LA, Wei AD, Zeng H, Turner EE. (2013) Medial habenula output circuit mediated by alpha5 nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. *J Neurosci*, 33: 18022-35.

Imai H, Steindler DA, Kitai ST. (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 243: 363-80.

Jackson J, Bland BH, Antle MC. (2009) Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse*, 63: 31-41.

Jacobs BL, Azmitia EC. (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72: 165-229.

Jacobs BL, Fornal CA. (1999) Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*, 21: 9s-15s.

Jacobs BL, Wise WD, Taylor KM. (1974) Differential behavioral and neurochemical effects following lesions of the dorsal or median raphe nuclei in rats. *Brain Res*, 79: 353-61.

Jacobsen JP, Medvedev IO, Caron MG. (2012) The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367: 2444-59.

Jensen P, Farago AF, Awatramani RB, Scott MM, Deneris ES, Dymecki SM. (2008) Redefining the serotonergic system by genetic lineage. *Nat Neurosci*, 11: 417-9.

Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC. (2009) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron*, 61: 786-800.

Johnson J, Sherry DM, Liu X, Fremeau RT, Jr., Seal RP, Edwards RH, Copenhagen DR. (2004) Vesicular glutamate transporter 3 expression identifies glutamatergic amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol*, 477: 386-98.

Johnston A, McBain CJ, Fisahn A. (2014) 5-Hydroxytryptamine1A receptor-activation hyperpolarizes pyramidal cells and suppresses hippocampal gamma oscillations via Kir3 channel activation. *J Physiol*, 592: 4187-99.

Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, Omote H, Moriyama Y. (2006) Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem*, 281: 39499-506.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Companies, United States of America, 2000: 280-281.

Kandler K, Katz LC, Kauer JA. (1998) Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors. *Nat Neurosci*, 1: 119-23.

Kaneko T, Fujiyama F. (2002) Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci Res*, 42: 243-50.

Kao YH, Lassoova L, Bar-Yehuda T, Edwards RH, Sterling P, Vardi N. (2004) Evidence that certain retinal bipolar cells use both glutamate and GABA. *J Comp Neurol*, 478: 207-18.

Kia HK, Brisorgueil MJ, Daval G, Langlois X, Hamon M, Verge D. (1996) Serotonin1A receptors are expressed by a subpopulation of cholinergic neurons in the rat medial septum and diagonal band of Broca--a double immunocytochemical study. *Neuroscience*, 74: 143-54.

Kinney GG, Kocsis B, Vertes RP. (1994) Injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane-anesthetized rat. *Brain Res*, 654: 96-104.

Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. (2003) Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience*, 116: 669-83.

Kirk IJ, Mackay JC. (2003) The role of theta-range oscillations in synchronising and integrating activity in distributed mnemonic networks. *Cortex*, 39: 993-1008.

Kiss J, Csaki A, Bokor H, Kocsis K, Kocsis B. (2002) Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [³H]D-aspartate labelling and immunocytochemistry. *Neuroscience*, 111: 671-91.

Kitchigina VF, Kudina TA, Kuttyreva EV, Vinogradova OS. (1999) Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of the median raphe nucleus in the awake rabbit. *Neuroscience*, 94: 453-63.

Kiyasova V, Bonnavion P, Scotto-Lomassese S, Fabre V, Sahly I, Tronche F, Deneris E, Gaspar P, Fernandez SP. (2013) A subpopulation of serotonergic neurons that do not express the 5-HT1A autoreceptor. *ACS Chem Neurosci*, 4: 89-95.

- Kiyasova V, Fernandez SP, Laine J, Stankovski L, Muzerelle A, Doly S, Gaspar P. (2011) A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei. *J Neurosci*, 31: 2756-68.
- Klausberger T, Somogyi P. (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, 321: 53-7.
- Knierim JJ, Lee I, Hargreaves EL. (2006) Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. *Hippocampus*, 16: 755-64.
- Kobe F, Guseva D, Jensen TP, Wirth A, Renner U, Hess D, Muller M, Medrihan L, Zhang W, Zhang M, Braun K, Westerholz S, Herzog A, Radyushkin K, El-Kordi A, Ehrenreich H, Richter DW, Rusakov DA, Ponimaskin E. (2012) 5-HT7R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J Neurosci*, 32: 2915-30.
- Kocsis B, Di Prisco GV, Vertes RP. (2001) Theta synchronization in the limbic system: the role of Gudden's tegmental nuclei. *Eur J Neurosci*, 13: 381-8.
- Kocsis B, Varga V, Dahan L, Sik A. (2006) Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1059-64.
- Kocsis B, Vertes RP. (1996) Midbrain raphe cell firing and hippocampal theta rhythm in urethane-anaesthetized rats. *Neuroreport*, 7: 2867-72.
- Kohler C, Chan-Palay V, Steinbusch H. (1981) The distribution and orientation of serotonin fibers in the entorhinal and other retrohippocampal areas. An immunohistochemical study with anti-serotonin antibodies in the rats brain. *Anat Embryol (Berl)*, 161: 237-64.
- Kohler C, Steinbusch H. (1982) Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, 7: 951-75.
- Kosofsky BE, Molliver ME. (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*, 1: 153-68.
- Kramis R, Vanderwolf CH, Bland BH. (1975) Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol*, 49: 58-85.
- Kraus T, Neuhuber WL, Raab M. (2004) Vesicular glutamate transporter 1 immunoreactivity in motor endplates of striated esophageal but not skeletal muscles in the mouse. *Neurosci Lett*, 360: 53-6.
- Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M. (2012) Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J Neurosci*, 32: 18035-46.

- Kuntzman R, Shore PA, Bogdanski D, Brodie BB. (1961) Microanalytical procedures for fluorometric assay of brain DOPA-5HTP decarboxylase, norepinephrine and serotonin, and a detailed mapping of decarboxylase activity in brain. *J Neurochem*, 6: 226-32.
- Kvachnina E, Liu G, Dityatev A, Renner U, Dumuis A, Richter DW, Dityateva G, Schachner M, Voyno-Yasenetskaya TA, Ponimaskin EG. (2005) 5-HT₇ receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J Neurosci*, 25: 7821-30.
- Landry M, Bouali-Benazzouz R, El Mestikawy S, Ravassard P, Nagy F. (2004) Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, 468: 380-94.
- Leranth C, Vertes RP. (1999) Median raphe serotonergic innervation of medial septum/diagonal band of Broca (MSDB) parvalbumin-containing neurons: possible involvement of the MSDB in the desynchronization of the hippocampal EEG. *J Comp Neurol*, 410: 586-98.
- Levine ES, Jacobs BL. (1992) Microiontophoresis and single-unit recordings of serotonergic neurons in the awake cat. *J Chem Neuroanat* 5: 335-337.
- Li H, Scholl JL, Tu W, Hassell JE, Watt MJ, Forster GL, Renner KJ. (2014) Serotonergic responses to stress are enhanced in the central amygdala and inhibited in the ventral hippocampus during amphetamine withdrawal. *Eur J Neurosci*, 40: 3684-92.
- Li JL, Fujiyama F, Kaneko T, Mizuno N. (2003) Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J Comp Neurol*, 457: 236-49.
- Li QH, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Nakatsuka D, Cui Y, Watanabe Y. (2004) Unique expression patterns of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *J Comp Neurol*, 469: 128-40.
- Li S, Varga V, Sik A, Kocsis B. (2005) GABAergic control of the ascending input from the median raphe nucleus to the limbic system. *J Neurophysiol*, 94: 2561-74.
- Li Y, Dalphin N, Hyland BI. (2013) Association with reward negatively modulates short latency phasic conditioned responses of dorsal raphe nucleus neurons in freely moving rats. *J Neurosci*, 33: 5065-78.
- Lidov HG, Grzanna R, Molliver ME. (1980) The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat--an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 5: 207-27.
- Liguz-Leczna M, Skangiel-Kramska J. (2007) Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 67: 207-18.

- Lin W, McKinney K, Liu L, Lakhani S, Jennes L. (2003) Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. *Endocrinology*, 144: 662-70.
- Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R, Gingrich JA. (2003) Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*, 54: 960-71.
- Liu Y, San Liang X, Weisberg RH. (2007) Rectification of the Bias in the Wavelet Power Spectrum. *J Atmos Oceanic Technol*, 24: 2093-2102.
- Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M. (2014) Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*, 81: 1360-74.
- Loren I, Bjorklund A, Falck B, Lindvall O. (1976) [An improved histofluorescence procedure for freeze-dried paraffin-embedded tissue based on combined formaldehyde-glyoxylic acid perfusion with high magnesium content and acid pH]. *Histochemistry*, 49: 177-92.
- Lovett-Barron M, Kaifosh P, Kheirbek MA, Danielson N, Zaremba JD, Reardon TR, Turi GF, Hen R, Zemelman BV, Losonczy A. (2014) Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science*, 343: 857-63.
- Ludwig M, Leng G. (2006) Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci*, 7: 126-36.
- Maeda T, Kaneko S, Satoh M. (1994) Inhibitory influence via 5-HT₃ receptors on the induction of LTP in mossy fiber-CA3 system of guinea-pig hippocampal slices. *Neurosci Res*, 18: 277-82.
- Mamounas LA, Molliver ME. (1988) Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). *Exp Neurol*, 102: 23-36.
- Mamounas LA, Mullen CA, O'Hearn E, Molliver ME. (1991) Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *J Comp Neurol*, 314: 558-86.
- Manuel-Apolinar L, Rocha L, Pascoe D, Castillo E, Castillo C, Meneses A. (2005) Modifications of 5-HT₄ receptor expression in rat brain during memory consolidation. *Brain Res*, 1042: 73-81.
- Marcinkiewicz M, Morcos R, Chretien M. (1989) CNS connections with the median raphe nucleus: retrograde tracing with WGA-apoHRP-Gold complex in the rat. *J Comp Neurol*, 289: 11-35.
- Marrosu F, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL. (1996) 5-HT_{1A} agonists induce hippocampal theta activity in freely moving cats: role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res*, 739: 192-200.

- Marshak DW, Chuang AZ, Dolino DM, Jacoby RA, Liu WS, Long YE, Sherman MB, Suh JM, Vila A, Mills SL. (2015) Synaptic connections of amacrine cells containing vesicular glutamate transporter 3 in baboon retinas. *Vis Neurosci*, 32: E006.
- Martin-Ibanez R, Jenstad M, Berghuis P, Edwards RH, Hioki H, Kaneko T, Mulder J, Canals JM, Ernfors P, Chaudhry FA, Harkany T. (2006) Vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3) identifies spatially segregated excitatory terminals in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci*, 23: 1063-70.
- Maru E, Takahashi LK, Iwahara S. (1979) Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Res*, 163: 223-34.
- Matsumoto M, Hikosaka O. (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci*, 12: 77-84.
- Matthews GA, Nieh EH, Vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, Glober GF, Izadmehr EM, Thomas RE, Lacy GD, Wildes CP, Ungless MA, Tye KM. (2016) Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell*, 164: 617-31.
- McMahon LL, Kauer JA. (1997) Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J Neurophysiol*, 78: 2493-502.
- Mejias-Aponte CA, Drouin C, Aston-Jones G. (2009) Adrenergic and noradrenergic innervation of the midbrain ventral tegmental area and retrorubral field: prominent inputs from medullary homeostatic centers. *J Neurosci*, 29: 3613-26.
- Merino JJ, Arce C, Naddaf A, Bellver-Landete V, Oset-Gasque MJ, Gonzalez MP. (2014) The nitric oxide donor SNAP-induced amino acid neurotransmitter release in cortical neurons. Effects of blockers of voltage-dependent sodium and calcium channels. *PLoS One*, 9: e90703.
- Miyamichi K, Amat F, Moussavi F, Wang C, Wickersham I, Wall NR, Taniguchi H, Tasic B, Huang ZJ, He Z, Callaway EM, Horowitz MA, Luo L. (2011) Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature*, 472: 191-6.
- Miyazaki K, Miyazaki KW, Doya K. (2012a) The role of serotonin in the regulation of patience and impulsivity. *Mol Neurobiol*, 45: 213-24.
- Miyazaki KW, Miyazaki K, Doya K. (2011) Activation of the central serotonergic system in response to delayed but not omitted rewards. *Eur J Neurosci*, 33: 153-60.
- Miyazaki KW, Miyazaki K, Doya K. (2012b) Activation of dorsal raphe serotonin neurons is necessary for waiting for delayed rewards. *J Neurosci*, 32: 10451-7.
- Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, Doya K. (2014) Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr Biol*, 24: 2033-40.
- Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M. (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci*, 17: 2563-72.

- Mlinar B, Falsini C, Corradetti R. (2003) Pharmacological characterization of 5-HT(1B) receptor-mediated inhibition of local excitatory synaptic transmission in the CA1 region of rat hippocampus. *Br J Pharmacol*, 138: 71-80.
- Morris R. Theories of Hippocampal Function. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (szerk.) *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, New York, 2007: 581-713.
- Mosko SS, Jacobs BL. (1974) Midbrain raphe neurons: spontaneous activity and response to light. *Physiol Behav*, 13: 589-93.
- Munster-Wandowski A, Zander JF, Richter K, Ahnert-Hilger G. (2016) Co-existence of Functionally Different Vesicular Neurotransmitter Transporters. *Front Synaptic Neurosci*, 8: 4.
- Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, Soiza-Reilly M, Gaspar P. (2016) Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct*, 221: 535-61.
- Nakamura K, Matsumoto M, Hikosaka O. (2008) Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. *J Neurosci*, 28: 5331-43.
- Nakamura K, Matsumura K, Hubschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, Boldogkoi Z, Konig M, Thiel HJ, Gerstberger R, Kobayashi S, Kaneko T. (2004) Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J Neurosci*, 24: 5370-80.
- Neitz A, Mergia E, Neubacher U, Koesling D, Mittmann T. (2015) NO regulates the strength of synaptic inputs onto hippocampal CA1 neurons via NO-GC1/cGMP signalling. *Pflugers Arch*, 467: 1383-94.
- Nelson AB, Bussert TG, Kreitzer AC, Seal RP. (2014) Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3. *J Neurosci*, 34: 8772-7.
- Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. (2001) Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat*, 21: 63-73.
- Ni B, Rosteck PR, Jr., Nadi NS, Paul SM. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 5607-11.
- Ni B, Wu X, Yan GM, Wang J, Paul SM. (1995) Regional expression and cellular localization of the Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter of rat brain. *J Neurosci*, 15: 5789-99.
- Nickerson Poulin A, Guerci A, El Mestikawy S, Semba K. (2006) Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. *J Comp Neurol*, 498: 690-711.

- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 5245-9.
- Niswender CM, Conn PJ. (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50: 295-322.
- Nitz DA, McNaughton BL. (1999) Hippocampal EEG and unit activity responses to modulation of serotonergic median raphe neurons in the freely behaving rat. *Learn Mem*, 6: 153-67.
- Noh J, Seal RP, Garver JA, Edwards RH, Kandler K. (2010) Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat Neurosci*, 13: 232-8.
- Nozaki K, Kubo R, Furukawa Y. (2016) Serotonin modulates the excitatory synaptic transmission in the dentate granule cells. *J Neurophysiol*, 115: 2997-3007.
- Nutt DJ. (2002) The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol*, 17 Suppl 1: S1-12.
- O'Connor JM. (1912) Über den Adrenalingehalt des Blutes. *Arch Exp Pathol Pharmacol*, 67: 195-232.
- O'Hearn E, Molliver ME. (1984) Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study. *Brain Res Bull*, 13: 709-26.
- Ochi J, Shimizu K. (1978) Occurrence of dopamine-containing neurons in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Neurosci Lett*, 8: 317-20.
- Ogawa SK, Cohen JY, Hwang D, Uchida N, Watabe-Uchida M. (2014) Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. *Cell Rep*, 8: 1105-18.
- Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, Yamanaka A, Yoshioka M. (2014) Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17: 1777-83.
- Okaty BW, Freret ME, Rood BD, Brust RD, Hennessy ML, deBairos D, Kim JC, Cook MN, Dymecki SM. (2015) Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron*, 88: 774-91.
- Okuhara DY, Beck SG. (1994) 5-HT_{1A} receptor linked to inward-rectifying potassium current in hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Neurophysiol*, 71: 2161-7.
- Oleskevich S, Descarries L, Watkins KC, Seguela P, Daszuta A. (1991) Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience*, 42: 777-91.
- Oliveira AL, Hydling F, Olsson E, Shi T, Edwards RH, Fujiyama F, Kaneko T, Hokfelt T, Cullheim S, Meister B. (2003) Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse*, 50: 117-29.

- Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinathsinghji DJ. (2000) Localization of 5-HT(5A) receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res*, 867: 131-42.
- Omiya Y, Uchigashima M, Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Yoshida T, Kusumi I, Watanabe M. (2015) VGluT3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains. *J Neurosci*, 35: 4215-28.
- Ottem EN, Godwin JG, Krishnan S, Petersen SL. (2004) Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *J Neurosci*, 24: 8097-105.
- Pagliardini S, Gosgnach S, Dickson CT. (2013) Spontaneous sleep-like brain state alternations and breathing characteristics in urethane anesthetized mice. *PLoS One*, 8: e70411.
- Palkovits M. (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res*, 59: 449-50.
- Palkovits M, Brownstein M, Saavedra JM. (1974) Serotonin content of the brain stem nuclei in the rat. *Brain Res*, 80: 237-49.
- Pan WX, McNaughton N. (2004) The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. *Prog Neurobiol*, 74: 127-66.
- Papp EC, Hajos N, Acsady L, Freund TF. (1999) Medial septal and median raphe innervation of vasoactive intestinal polypeptide-containing interneurons in the hippocampus. *Neuroscience*, 90: 369-82.
- Paris JM, Lorens SA. (1987) Intra-median raphe infusions of muscimol and the substance P analogue DiMe-C7 produce hyperactivity: role of serotonin neurons. *Behav Brain Res*, 26: 139-51.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press, CD-ROM Edition, 2005.
- Peck BK, Vanderwolf CH. (1991) Effects of raphe stimulation on hippocampal and neocortical activity and behaviour. *Brain Res*, 568: 244-52.
- Pelosi B, Migliarini S, Pacini G, Pratelli M, Pasqualetti M. (2014) Generation of Pet1210-Cre transgenic mouse line reveals non-serotonergic expression domains of Pet1 both in CNS and periphery. *PLoS One*, 9: e104318.
- Penas-Cazorla R, Vilaro MT. (2015) Serotonin 5-HT4 receptors and forebrain cholinergic system: receptor expression in identified cell populations. *Brain Struct Funct*, 220: 3413-34.
- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH. (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82: 443-68.
- Pi HJ, Hangya B, Kvitsiani D, Sanders JI, Huang ZJ, Kepecs A. (2013) Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*, 503: 521-4.

- Piguet P, Galvan M. (1994) Transient and long-lasting actions of 5-HT on rat dentate gyrus neurones in vitro. *J Physiol*, 481 (Pt 3): 629-39.
- Pinault D. (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods*, 65: 113-36.
- Polgar E, Al-Khater KM, Shehab S, Watanabe M, Todd AJ. (2008) Large projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that lack the neurokinin 1 receptor are densely innervated by VGLUT2-containing axons and possess GluR4-containing AMPA receptors. *J Neurosci*, 28: 13150-60.
- Pollak Dorocic I, Furth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlen M, Meletis K. (2014) A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron*, 83: 663-78.
- Prince LY, Bacon TJ, Tigaret CM, Mellor JR. (2016) Neuromodulation of the Feedforward Dentate Gyrus-CA3 Microcircuit. *Front Synaptic Neurosci*, 8: 32.
- Quina LA, Tempest L, Ng L, Harris JA, Ferguson S, Jhou TC, Turner EE. (2015) Efferent pathways of the mouse lateral habenula. *J Comp Neurol*, 523: 32-60.
- Ramet L, Zimmermann J, Bersot T, Poirel O, De Gois S, Silm K, Sakae DY, Mansouri-Guilani N, Bourque MJ, Trudeau LE, Pietrancosta N, Daumas S, Bernard V, Rosenmund C, El Mestikawy S. (2017) Characterization of a Human Point Mutation of VGLUT3 (p.A211V) in the Rodent Brain Suggests a Nonuniform Distribution of the Transporter in Synaptic Vesicles. *J Neurosci*, 37: 4181-4199.
- Ranade SP, Mainen ZF. (2009) Transient firing of dorsal raphe neurons encodes diverse and specific sensory, motor, and reward events. *J Neurophysiol*, 102: 3026-37.
- Rapport MM. (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem*, 180: 961-9.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. (1948a) Crystalline Serotonin. *Science*, 108: 329-30.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. (1948b) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, 176: 1243-51.
- Ren J, Qin C, Hu F, Tan J, Qiu L, Zhao S, Feng G, Luo M. (2011) Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*, 69: 445-52.
- Reznic J, Staubli U. (1997) Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal cellular activity in the freely moving rat. *J Neurophysiol*, 77: 517-21.
- Richard JM, Castro DC, Difeliceantonio AG, Robinson MJ, Berridge KC. (2013) Mapping brain circuits of reward and motivation: in the footsteps of Ann Kelley. *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 1919-31.

Robinson TE, Vanderwolf CH. (1978) Electrical stimulation of the brain stem in freely moving rats: II. Effects on hippocampal and neocortical electrical activity, and relations to behavior. *Exp Neurol*, 61: 485-515.

Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang HL, Hoffman AF, Lupica CR, Morales M. (2014) Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci*, 17: 1543-51.

Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL. (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet*, 83: 278-92.

Rygula R, Clarke HF, Cardinal RN, Cockcroft GJ, Xia J, Dalley JW, Robbins TW, Roberts AC. (2015) Role of Central Serotonin in Anticipation of Rewarding and Punishing Outcomes: Effects of Selective Amygdala or Orbitofrontal 5-HT Depletion. *Cereb Cortex*, 25: 3064-76.

Saavedra JM, Brownstein M, Axelrod J. (1973) A specific and sensitive enzymatic-isotopic microassay for serotonin in tissues. *J Pharmacol Exp Ther*, 186: 508-15.

Sakae DY, Marti F, Lecca S, Vorspan F, Martin-Garcia E, Morel LJ, Henrion A, Gutierrez-Cuesta J, Besnard A, Heck N, Herzog E, Bolte S, Prado VF, Prado MA, Bellivier F, Eap CB, Crettol S, Vanhoutte P, Caboche J, Gratton A, Moquin L, Giros B, Maldonado R, Daumas S, Mameli M, Jamain S, El Mestikawy S. (2015) The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*, 20: 1448-59.

Sakata-Haga H, Kanemoto M, Maruyama D, Hoshi K, Mogi K, Narita M, Okado N, Ikeda Y, Nogami H, Fukui Y, Kojima I, Takeda J, Hisano S. (2001) Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res*, 902: 143-55.

Sara SJ. (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10: 211-23.

Sari Y, Lefevre K, Bancila M, Quignon M, Miquel MC, Langlois X, Hamon M, Verge D. (1997) Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT1B receptors in the rat brain. *Brain Res*, 760: 281-6.

Savage C. (1952) Lysergic acid diethylamide; a clinical-psychological study. *Am J Psychiatry*, 108: 896-900.

Schäfer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem*, 277: 50734-48.

Schenck S, Wojcik SM, Brose N, Takamori S. (2009) A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat Neurosci*, 12: 156-62.

- Schlingloff D, Kali S, Freund TF, Hajos N, Gulyas AI. (2014) Mechanisms of sharp wave initiation and ripple generation. *J Neurosci*, 34: 11385-98.
- Schweimer JV, Ungless MA. (2010) Phasic responses in dorsal raphe serotonin neurons to noxious stimuli. *Neuroscience*, 171: 1209-15.
- Scott MM, Wylie CJ, Lerch JK, Murphy R, Lobur K, Herlitze S, Jiang W, Conlon RA, Strowbridge BW, Deneris ES. (2005) A genetic approach to access serotonin neurons for in vivo and in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 16472-7.
- Sego C, Goncalves L, Lima L, Furigo IC, Donato J, Jr., Metzger M. (2014) Lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 522: 1454-84.
- Seymour B, Daw ND, Roiser JP, Dayan P, Dolan R. (2012) Serotonin selectively modulates reward value in human decision-making. *J Neurosci*, 32: 5833-42.
- Shabel SJ, Proulx CD, Piriz J, Malinow R. (2014) Mood regulation. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science*, 345: 1494-8.
- Shen RY, Andrade R. (1998) 5-Hydroxytryptamine₂ receptor facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*, 285: 805-12.
- Sieburth D, Madison JM, Kaplan JM. (2007) PKC-1 regulates secretion of neuropeptides. *Nat Neurosci*, 10: 49-57.
- Soiza-Reilly M, Commons KG. (2011) Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat*, 41: 247-55.
- Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, El Mestikawy S, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci*, 19: 552-69.
- Somogyi P, Dalezios Y, Lujan R, Roberts JD, Watanabe M, Shigemoto R. (2003) High level of mGluR7 in the presynaptic active zones of select populations of GABAergic terminals innervating interneurons in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 17: 2503-20.
- Sós KE, Mayer MI, Cserep C, Takacs FS, Szonyi A, Freund TF, Nyiri G. (2017) Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region. *Brain Struct Funct*, 222: 287-299.
- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S. (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol*, 551: 927-43.
- Soubrie P. (1986) [Serotonergic neurons and behavior]. *J Pharmacol*, 17: 107-12.
- Soussi R, Zhang N, Tahtakran S, Houser CR, Esclapez M. (2010) Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. *Eur J Neurosci*, 32: 771-85.

Spaethling JM, Piel D, Dueck H, Buckley PT, Morris JF, Fisher SA, Lee J, Sul JY, Kim J, Bartfai T, Beck SG, Eberwine JH. (2014) Serotonergic neuron regulation informed by in vivo single-cell transcriptomics. *Faseb j*, 28: 771-80.

Stamp JA, Semba K. (1995) Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res*, 677: 39-49.

Stark E, Roux L, Eichler R, Senzai Y, Royer S, Buzsaki G. (2014) Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations. *Neuron*, 83: 467-80.

Staubli U, Xu FB. (1995) Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J Neurosci*, 15: 2445-52.

Stein DJ, Hollander E, Liebowitz MR. (1993) Neurobiology of impulsivity and the impulse control disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 5: 9-17.

Steinbusch HW. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6: 557-618.

Steinbusch HW, Verhofstad AA, Joosten HW. (1978) Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience*, 3: 811-9.

Steinbusch HW, Verhofstad AA, Penke B, Varga J, Joosten HW. (1981) Immunohistochemical characterization of monoamine-containing neurons in the central nervous system by antibodies to serotonin and noradrenalin. A study in the rat and the lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Acta Histochem Suppl*, 24: 107-22.

Stensrud MJ, Chaudhry FA, Leergaard TB, Bjaalie JG, Gundersen V. (2013) Vesicular glutamate transporter-3 in the rodent brain: vesicular colocalization with vesicular gamma-aminobutyric acid transporter. *J Comp Neurol*, 521: 3042-56.

Stensrud MJ, Sogn CJ, Gundersen V. (2015) Immunogold characteristics of VGLUT3-positive GABAergic nerve terminals suggest corelease of glutamate. *J Comp Neurol*, 523: 2698-713.

Stornetta RL, Rosin DL, Simmons JR, McQuiston TJ, Vujovic N, Weston MC, Guyenet PG. (2005) Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and gamma-aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column. *J Comp Neurol*, 492: 477-94.

Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG. (2002) Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. *J Comp Neurol*, 444: 191-206.

Stuber GD, Wise RA. (2016) Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci*, 19: 198-205.

Summa M, Di Prisco S, Grilli M, Usai C, Marchi M, Pittaluga A. (2013) Presynaptic mGlu7 receptors control GABA release in mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 66: 215-24.

Suwa B, Bock N, Preusse S, Rothenberger A, Manzke T. (2014) Distribution of serotonin 4(a) receptors in the juvenile rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat*, 55: 67-77.

Swanson LW, Cowan WM. (1979) The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*, 186: 621-55.

Szabadits E, Cserep C, Szonyi A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Watanabe M, Itohara S, Freund TF, Nyiri G. (2011) NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *J Neurosci*, 31: 5893-904.

Szönyi A, Mayer MI, Cserep C, Takacs VT, Watanabe M, Freund TF, Nyiri G. (2016) The ascending median raphe projections are mainly glutamatergic in the mouse forebrain. *Brain Struct Funct*, 221: 735-51.

Takamori S. (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*, 55: 343-51.

Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R. (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep*, 3: 798-803.

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 407: 189-94.

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*, 21: Rc182.

Takase LF, Nogueira MI, Baratta M, Bland ST, Watkins LR, Maier SF, Fornal CA, Jacobs BL. (2004) Inescapable shock activates serotonergic neurons in all raphe nuclei of rat. *Behav Brain Res*, 153: 233-9.

Tanaka SC, Doya K, Okada G, Ueda K, Okamoto Y, Yamawaki S. (2004) Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. *Nat Neurosci*, 7: 887-93.

Tao R, Ma Z, Auerbach SB. (1996) Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br J Pharmacol*, 119: 1375-84.

Tatti R, Bhaukaurally K, Gschwend O, Seal RP, Edwards RH, Rodriguez I, Carleton A. (2014) A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun*, 5: 3791.

Teissier A, Chmiakine A, Inbar B, Bagchi S, Ray RS, Palmiter RD, Dymecki SM, Moore H, Ansorge MS. (2015) Activity of Raphe Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep*, 13: 1965-76.

Tien NW, Kim T, Kerschensteiner D. (2016) Target-Specific Glycinergic Transmission from VGLUT3-Expressing Amacrine Cells Shapes Suppressive Contrast Responses in the Retina. *Cell Rep*, 15: 1369-75.

- Todd AJ, Hughes DI, Polgar E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ. (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci*, 17: 13-27.
- Torrence C, Compo GP. (1998) A practical guide to wavelet analysis. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 79: 61-78.
- Touret M, Kitahama K, Geffard M, Jouvet M. (1987) 5-Hydroxytryptophan (5-HTP)-immunoreactive neurons in the rat brain tissue. *Neurosci Lett*, 80: 263-7.
- Tritsch NX, Granger AJ, Sabatini BL. (2016) Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat Rev Neurosci*, 17: 139-45.
- Trulson ME, Cannon MS, Raese JD. (1985) Identification of dopamine-containing cell bodies in the dorsal and median raphe nuclei of the rat brain using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Res Bull*, 15: 229-34.
- Trulson ME, Jacobs BL. (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res*, 163: 135-50.
- Tsao A, Moser MB, Moser EI. (2013) Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Curr Biol*, 23: 399-405.
- Twarkowski H, Hagen A, Manahan-Vaughan D. (2016) The 5-hydroxytryptamine₄ receptor enables differentiation of informational content and encoding in the hippocampus. *Hippocampus*, 26: 875-91.
- Twarog BM. (1954) Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J Cell Comp Physiol*, 44: 141-63.
- Twarog BM, Page IH. (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, 175: 157-61.
- Urbain N, Creamer K, Debonnel G. (2006) Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *J Physiol*, 573: 679-95.
- Vaaga CE, Borisovska M, Westbrook GL. (2014) Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission. *Curr Opin Neurobiol*, 29: 25-32.
- Valjakka A, Vartiainen J, Tuomisto L, Tuomisto JT, Olkkonen H, Airaksinen MM. (1998) The fasciculus retroflexus controls the integrity of REM sleep by supporting the generation of hippocampal theta rhythm and rapid eye movements in rats. *Brain Res Bull*, 47: 171-84.
- van den Pol AN. (2012) Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron*, 76: 98-115.
- van Hooft JA, Spier AD, Yakel JL, Lummis SC, Vijverberg HP. (1998) Promiscuous coassembly of serotonin 5-HT₃ and nicotinic alpha₄ receptor subunits into Ca²⁺-permeable ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11456-61.

- Vandecasteele M, Varga V, Berenyi A, Papp E, Bartho P, Venance L, Freund TF, Buzsaki G. (2014) Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 13535-40.
- Vann SD. (2009) Gudden's ventral tegmental nucleus is vital for memory: re-evaluating diencephalic inputs for amnesia. *Brain*, 132: 2372-84.
- Vann SD. (2013) Dismantling the Papez circuit for memory in rats. *Elife*, 2: e00736.
- Varga V, Hangya B, Kranitz K, Ludanyi A, Zemankovics R, Katona I, Shigemoto R, Freund TF, Borhegyi Z. (2008) The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum. *J Physiol*, 586: 3893-915.
- Varga V, Kocsis B, Sharp T. (2003) Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci*, 17: 280-6.
- Varga V, Sik A, Freund TF, Kocsis B. (2002) GABA(B) receptors in the median raphe nucleus: distribution and role in the serotonergic control of hippocampal activity. *Neuroscience*, 109: 119-32.
- Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M. (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience*, 106: 783-92.
- Vasudeva RK, Lin RC, Simpson KL, Waterhouse BD. (2011) Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrergic cell groups. *J Chem Neuroanat*, 41: 281-93.
- Vertes RP. (1981) An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. *J Neurophysiol*, 46: 1140-59.
- Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM. (1999) Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 407: 555-82.
- Vertes RP, Kinney GG, Kocsis B, Fortin WJ. (1994) Pharmacological suppression of the median raphe nucleus with serotonin1A agonists, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuroscience*, 60: 441-51.
- Vertes RP, Kocsis B. (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81: 893-926.
- Vertes RP, Linley SB. Efferent and afferent connections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. In: Monti JM, Pandi-Perumal SR, Jacobs BL, Nutt DJ (szerk.) *Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*. Birkhäuser, Basel: 2008: 69-102.
- Viana Di Prisco G, Albo Z, Vertes RP, Kocsis B. (2002) Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res*, 145: 383-94.

- Villani F, Johnston D. (1993) Serotonin inhibits induction of long-term potentiation at commissural synapses in hippocampus. *Brain Res*, 606: 304-8.
- Vinogradova OS. (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus*, 11: 578-98.
- Vinogradova OS, Kitchigina VF, Kudina TA, Zenchenko KI. (1999) Spontaneous activity and sensory responses of hippocampal neurons during persistent theta-rhythm evoked by median raphe nucleus blockade in rabbit. *Neuroscience*, 94: 745-53.
- Vizi ES, Kiss JP. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*, 8: 566-607.
- Voisin AN, Mnie-Filali O, Giguere N, Fortin GM, Vigneault E, El Mestikawy S, Descarries L, Trudeau LE. (2016) Axonal Segregation and Role of the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT3 in Serotonin Neurons. *Front Neuroanat*, 10: 39.
- Wall NR, Wickersham IR, Cetin A, De La Parra M, Callaway EM. (2010) Monosynaptic circuit tracing in vivo through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 21848-53.
- Wang DV, Yau HJ, Broker CJ, Tsou JH, Bonci A, Ikemoto S. (2015) Mesopontine median raphe regulates hippocampal ripple oscillation and memory consolidation. *Nat Neurosci*, 18: 728-35.
- Wang QP, Ochiai H, Nakai Y. (1992) GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining. *Brain Res Bull*, 29: 943-8.
- Wang RY, Arvanov VL. (1998) M100907, a highly selective 5-HT_{2A} receptor antagonist and a potential atypical antipsychotic drug, facilitates induction of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampal slice. *Brain Res*, 779: 309-13.
- Waraczynski M. (2016) Toward a systems-oriented approach to the role of the extended amygdala in adaptive responding. *Neurosci Biobehav Rev*, 68: 177-94.
- Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim SY, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K. (2012) A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*, 492: 428-32.
- Watabe-Uchida M, Zhu L, Ogawa SK, Vamanrao A, Uchida N. (2012) Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 74: 858-73.
- Waterhouse BD, Devilbiss D, Seiple S, Markowitz R. (2004) Sensorimotor-related discharge of simultaneously recorded, single neurons in the dorsal raphe nucleus of the awake, unrestrained rat. *Brain Res*, 1000: 183-91.
- Weber T, Bohm G, Hermann E, Schutz G, Schonig K, Bartsch D. (2009) Inducible gene manipulations in serotonergic neurons. *Front Mol Neurosci*, 2: 24.
- Weber T, Schonig K, Tews B, Bartsch D. (2011) Inducible gene manipulations in brain serotonergic neurons of transgenic rats. *PLoS One*, 6: e28283.

- Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L. (2014) Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*, 83: 645-62.
- Weissmann D, Belin MF, Aguera M, Meunier C, Maitre M, Cash CD, Ehret M, Mandel P, Pujol JF. (1987) Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience*, 23: 291-304.
- West PJ, Marcy VR, Marino MJ, Schaffhauser H. (2009) Activation of the 5-HT(6) receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *Neuroscience*, 164: 692-701.
- Weston MC, Nehring RB, Wojcik SM, Rosenmund C. (2011) Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity. *Neuron*, 69: 1147-59.
- Whitaker-Azmitia PM. (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21: 2s-8s.
- Wickersham IR, Lyon DC, Barnard RJ, Mori T, Finke S, Conzelmann KK, Young JA, Callaway EM. (2007) Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron*, 53: 639-47.
- Wiklund L, Leger L, Persson M. (1981) Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *J Comp Neurol*, 203: 613-47.
- Wirtshafter D, Asin KE. (1982) Evidence that electrolytic median raphe lesions increase locomotion but not exploration. *Physiol Behav*, 28: 749-54.
- Wirtshafter D, Stratford TR, Pitzer MR. (1993) Studies on the behavioral activation produced by stimulation of GABAB receptors in the median raphe nucleus. *Behav Brain Res*, 59: 83-93.
- Woolley DW, Shaw E. (1953) Antimetabolites of serotonin. *J Biol Chem*, 203: 69-79.
- Woolley DW, Shaw E. (1954) A BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL SUGGESTION ABOUT CERTAIN MENTAL DISORDERS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40: 228-31.
- Wu SX, Koshimizu Y, Feng YP, Okamoto K, Fujiyama F, Hioki H, Li YQ, Kaneko T, Mizuno N. (2004) Vesicular glutamate transporter immunoreactivity in the central and peripheral endings of muscle-spindle afferents. *Brain Res*, 1011: 247-51.
- Wylie CJ, Hendricks TJ, Zhang B, Wang L, Lu P, Leahy P, Fox S, Maeno H, Deneris ES. (2010) Distinct transcriptomes define rostral and caudal serotonin neurons. *J Neurosci*, 30: 670-84.
- Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, Buzsaki G. (1995) Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 5: 78-90.

Zhang G, Stackman RW, Jr. (2015) The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Front Pharmacol*, 6: 225.

Zhang S, Qi J, Li X, Wang HL, Britt JP, Hoffman AF, Bonci A, Lupica CR, Morales M. (2015) Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat Neurosci*, 18: 386-92.

Zhang SJ, Ye J, Couey JJ, Witter M, Moser EI, Moser MB. (2014) Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369: 20120516.

Zhuang X, Masson J, Gingrich JA, Rayport S, Hen R. (2005) Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J Neurosci Methods*, 143: 27-32.

Zilberter Y. (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol*, 528: 489-96.

Saját publikációk jegyzéke

Domonkos A, Nikitidou Ledri L, Laszlovszky T, Cserep C, Borhegyi Z, Papp E, Nyiri G, Freund TF, Varga V. (2016) Divergent in vivo activity of non-serotonergic and serotonergic VGluT3-neurons in the median raphe region. *J Physiol*, 594: 3775-90.

Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF. (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science*, 326: 449-53.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálát kell adnom Istennek, hogy felszította bennem a kutatás, felfedezés iránti vágyat és elköteleződést, és hogy ennek érdekében gondomat viseli, útjaimat szüntelenül egyengeti. Kimondhatatlan hálával tartozom szüleimnek, akik elengedtek otthonról és támogattak, hogy őket otthon hagyva egy távoli városban éjt nappalá téve kutatásaimmal foglalkozzak. Szintén hálával tartozom menyasszonyomnak is, aki türelmesen viselte a munkával töltött hétvégéket, és akinek – most már feleségemként – mégis van ereje támaszt adni nekem. Hálával tartozom Freund Tamásnak is, a kutatócsoportunk vezetőjének, aki első e-mailemre válaszolva azonnal hívott a csoportjába, és azóta is bízik bennem és támogatja munkámat. Rengeteget tanultam a kísérletek tervezéséről, a kutatói hozzáállásról témavezetőmtől, Varga Viktortól, aki mindig türelmesen fogadta kérdéseimet, ötleteimet, és akinek mindig csodálhattam alázatos tudományszeretetét. A doktori munkám elkészültében is, és azon kívül is rengeteget köszönhetek neki. Mentorom, Ligeti Erzsébet odaadó gondoskodását – úgy érzem – nem fogom tudni eléggé meghálálni. Köszönet illeti továbbá szerzőtársaimat, kollégáimat, akik elfogadtak, elviseltek és elviselnek engem, különösen nagy kihívás lehet ez Barth Albert és Jelítai Márti számára. Külön köszönöm Acsády László segítségét, aki a dolgozatom intézeti védeke során bírálatot készített és javaslataival segítette közérthetőbb formába hozni munkámat. A közlemények szerzői között nem találjuk asszisztenseinket, Lengyel Katalint, Iványi Katalint, Szépné Simon Emőkét és Goda Győzöt sem, rajtuk mégis rengeteg múlt a sikeres kísérletek érdekében, nekik is köszönettel tartozom.

is identified (especially as to whether it is regular or irregular), and phonological, phonetic, and articulatory processing cannot be computed before the phonemes of the inflected form have been determined. Word identification has been shown to occur at 170 to 250 ms (8, 29, 36), consistent with the ~200-ms component, and syllabification and other phonological processes at 400 to 600 ms, consistent with the phonological component at 400 to 500 ms (8). In naming tasks, speech onset occurs at around 600 ms (8), which is consistent with the self-monitoring behavioral responses we recorded (fig. S6). Self-monitoring has been localized to the temporal lobe (8), where we recorded LFPs in the post-response latency range that may correspond to previously described scalp event-related potentials (37). Working backward from 600 ms, we note that motor neuron commands occur 50 to 100 ms before speech, placing them just after the phonological component we found to peak at 400 to 500 ms (38). In sum, the location, behavioral correlates, and timing of the components of neuronal activity in Broca's area suggest that they embody, respectively, lexical identification (~200 ms), grammatical inflection (~320 ms), and phonological processing (~450 ms) in the production of nouns and verbs alike.

Although the language processing stream as a whole surely exhibits parallelism, feedback, and interactivity, the current results support parsimony-based models such as LRM (7), in which one portion of this stream consists of spatiotemporally distinct processes corresponding to levels of linguistic computation. Among the processes identified by these higher-resolution data is grammatical computation, which has been elusive in previous, coarser-grained investigations. As such, the results are also consistent with recent proposals that Broca's area is not dedicated to a single kind of linguistic representation but is differentiated into adjacent but distinct circuits that process phonological, grammatical, and lexical information (37, 39–41).

References and Notes

- S. Pinker, *The Language Instinct* (HarperCollins, 1994).
- S. Pinker, *Science* **253**, 530 (1991).
- K. Plunkett, V. Marchman, *Cognition* **38**, 43 (1991).
- B. MacWhinney, J. Leinbach, *Cognition* **40**, 121 (1991).
- M. F. Joanisse, M. S. Seidenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7592 (1999).
- J. L. McClelland, *Psychol. Rev.* **86**, 287 (1979).
- W. J. M. Levelt, A. Roelofs, A. S. Meyer, *Behav. Brain Sci.* **22**, 1 (1999).
- P. Indefrey, W. J. M. Levelt, *Cognition* **92**, 101 (2004).
- D. P. Janssen, A. Roelofs, W. J. M. Levelt, *Lang. Cogn. Process.* **17**, 209 (2002).
- N. Dronkers, *Nature* **384**, 159 (1996).
- We use "Broca's area" to denote the left IFG pars opercularis and pars triangularis [classically, Brodmann areas 44 and 45, but see (30)].
- P. Broca, *Bulletin de la Société Anatomique* **6**, 330 (1861).
- E. Zurif, A. Caramazza, R. Myerson, *Neuropsychologia* **10**, 405 (1972).
- Y. Grodzinsky, *Behav. Brain Sci.* **23**, 1 (2000).
- E. Kaan, T. Y. Swaab, *Trends Cogn. Sci.* **6**, 350 (2002).
- Materials and Methods are available as supporting material on Science Online.
- The context words ("a" and "to") prevented participants from simply concatenating the cue and target (a strategy that would succeed in two-thirds of the trials) and helped equalize difficulty across conditions.
- Differences in the signals between regular and irregular verbs are not analyzed here [for discussion, see (19)].
- N. T. Sahin, S. Pinker, E. Halgren, *Cortex* **42**, 540 (2006).
- L. Cohen, S. Dehaene, *Neuroimage* **22**, 466 (2004).
- A. C. Nobre, T. Allison, G. McCarthy, *Nature* **372**, 260 (1994).
- C. J. Price, J. T. Devlin, *Neuroimage* **19**, 473 (2003).
- N. T. Sahin *et al.*, *Neuroimage* **36**, 574 (2007).
- O. Hauk, F. Pulvermüller, *Clin. Neurophysiol.* **115**, 1090 (2004).
- Frequency score was the rounded natural log of the combined frequencies of all inflectional forms of a word, plus one.
- These factors were largely independent. Word length correlated little with morpheme count (0.267) or frequency (−0.347).
- A. D. Friederici, *Trends Cogn. Sci.* **13**, 175 (2009).
- E. Halgren *et al.*, *J. Physiol. (Paris)* **88**, 51 (1994).
- K. Marinovic *et al.*, *Neuron* **38**, 487 (2003).
- K. Amunts *et al.*, *J. Comp. Neurol.* **412**, 319 (1999).
- This component may approximate the P600 component often recorded from the scalp (42), but comparisons are difficult because the P600 is generally elicited by errors, in comprehension rather than production experiments.
- A. Caramazza, A. E. Hillis, *Nature* **349**, 788 (1991).
- K. Shapiro, A. Caramazza, *Trends Cogn. Sci.* **7**, 201 (2003).
- The exception was that, for nouns, the Overt-Read comparison at ~320 and the Overt-Null comparison at ~450 ms only approached significance ($P = 0.08$ and 0.06 , respectively; one-tailed t test).
- We measured the average amplitude of the rectified all-conditions LFP in Broca's area channels in all patients, in the 150- to 650-ms interval, embracing our components of interest. The response epoch had a higher amplitude than the cue epoch in most (20 of 26) channels, and across all channels was 99% greater. [Patient A yielded a higher amplitude in the response epoch in 7 of 10 channels, on average 71.7% higher; patient B in 7 of 10 channels (+33.6% on average); and patient C in 6 of 6 channels (+191.6% on average)].
- R. Gaillard *et al.*, *Neuron* **50**, 191 (2006).
- A. D. Friederici, *Trends Cogn. Sci.* **6**, 78 (2002).
- LFP components reported here vary by amplitude but not latency or duration; evidently, the processes they index are consistently timed, and other processes [e.g., assembly and enactment of the articulatory plan (8)] produce the differences in response latency.
- P. Hagoort, *Trends Cogn. Sci.* **9**, 416 (2005).
- I. Bornkessel, M. Schlesewsky, *Psychol. Rev.* **113**, 787 (2006).
- However, the fine-grained, within-gyrus localization reported here cannot easily be mapped onto the more macroscopic divisions suggested by these authors.
- A. D. Friederici, *Clin. Neurosci.* **4**, 64 (1997).
- Supported by NIH grants NS18741 (E.H.), NS44623 (E.H.), HD18381 (S.P.), T32-MH070328 (N.T.S.), NCRP P41-RR14075; and the Mental Illness and Neuroscience Discovery (MIND) Institute (N.T.S.), Sackler Scholars Programme in Psychobiology (N.T.S.), and Harvard Mind/Brain/Behavior Initiative (N.T.S.). We heartily thank the patients. We also thank E. Papavassiliou and J. Wu for access to their patients; S. Narayanan, N. Dehghani, M. T. Wheeler, F. Kampmann, and L. Gruber for assistance with intracranial electrophysiological data; R. Raizada for manuscript suggestions; N. M. Sahin; and two anonymous reviewers whose suggestions and encouragement greatly improved this paper.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/326/5951/445/DC1
Materials and Methods

Figs. S1 to S6
Tables S1 and S2
References

3 April 2009; accepted 28 August 2009
10.1126/science.1174481

Fast Synaptic Subcortical Control of Hippocampal Circuits

Viktor Varga,^{1*}† Attila Losonczy,^{2*}†‡ Boris V. Zemelman,^{2*} Zsolt Borhegyi,¹ Gábor Nyiri,¹ Andor Domonkos,¹ Balázs Hangya,¹ Noémi Holderith,¹ Jeffrey C. Magee,² Tamás F. Freund¹

Cortical information processing is under state-dependent control of subcortical neuromodulatory systems. Although this modulatory effect is thought to be mediated mainly by slow nonsynaptic metabotropic receptors, other mechanisms, such as direct synaptic transmission, are possible. Yet, it is currently unknown if any such form of subcortical control exists. Here, we present direct evidence of a strong, spatiotemporally precise excitatory input from an ascending neuromodulatory center. Selective stimulation of serotonergic median raphe neurons produced a rapid activation of hippocampal interneurons. At the network level, this subcortical drive was manifested as a pattern of effective disinaptic GABAergic inhibition that spread throughout the circuit. This form of subcortical network regulation should be incorporated into current concepts of normal and pathological cortical function.

Subcortical monoaminergic systems are thought to modulate target cortical networks on a slow time scale of hundreds of milliseconds to seconds corresponding to the duration of metabotropic receptor signaling (1). Among these ascending systems, the serotonergic raphe-hippocampal (RH) pathway that primarily originates within the midbrain median raphe nucleus (MnR) is a key modulator of hippocampal mnemonic functions (2). Contrary to the slow

modulatory effect commonly associated with ascending systems, electrical stimulation of the RH pathway produces a rapid and robust modulation of hippocampal electroencephalographic activity (3–5). Anatomical evidence shows that MnR projections form some classical synapses onto GABAergic interneurons (INs) in the hippocampus (6), potentially providing a substrate for a fast neuromodulation of the hippocampal circuit. Recent reports of the presence of glutamate

in the serotonergic system (7–9) raise the possibility that this system may use a coordinated action of serotonin [5-hydroxytryptamine (5-HT)] and glutamate to rapidly activate elements of the hippocampal network.

To investigate this form of ascending neuromodulation, we first performed a series of in vitro experiments. Because RH axons are intermingled with intra- and extrahippocampal axons of various origins, we virally targeted a channelrhodopsin2-enhanced green fluorescent fusion protein construct (ChR2-eGFP) to the MnR (fig. S2, a to e) and subsequently used ChR2-assisted photostimulation in acute rat hippocampal slices to selectively activate the labeled RH input (10, 11).

¹Institute of Experimental Medicine, Budapest 1083, Hungary.
²Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA 20147, USA.

*These authors contributed equally to this work.
 †To whom correspondence should be addressed. E-mail: vargav@koki.hu (V.V.), losonczya@janelia.hhmi.org (A.L.)
 ‡Present address: Department of Neuroscience, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

eGFP-positive (eGFP+) fibers formed a dense plexus mostly immunoreactive for 5-HT ($85 \pm 4\%$ 5-HT in eGFP+ RH fibers and $37 \pm 3\%$ eGFP+ in 5-HT+ RH fibers; $n = 3$ animals, fig. S2f) (11) in strata oriens/alveus and at the border of strata radiatum and lacunosum-moleculare (sr/sl-m) of CA1 and CA3 regions, matching previously documented laminar distribution of RH fibers (6, 12). We therefore focused on INs located in these areas to perform whole-cell voltage recordings. Two-photon imaging revealed that eGFP+ RH axons often formed what appeared to be climbing-type contacts at multiple close appositions with IN dendrites (Figs. 1A and 2A). To functionally characterize these putative contacts, we photostimulated the ChR2-eGFP+ axons using brief light exposures. Single light pulses (1 ms) evoked large-amplitude excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in most recorded INs (amplitude: 6.47 ± 1.33 mV, $n = 22$ out of 27 INs; Fig. 1, B and C). In many cases, this input was sufficient to trigger action potential output from the activated cell ($n = 7$ out

of 22; Fig. 2, A and B). Light-evoked EPSPs had a short latency (2.67 ± 0.17 ms, $n = 22$), small temporal jitter (SD of latency: 0.42 ± 0.07 ms, $n = 22$), a fast rise time, and a mono-exponential decay (20 to 80 rise time: 3.15 ± 0.31 ms; decay tau: 105.71 ± 10.79 ms, $n = 22$; Fig. 1, B and C). Repetitive photostimulation reliably evoked trains of EPSPs in INs (Fig. 1, D and E). Single-pulse photostimulation did not evoke detectable responses in CA3 pyramidal cells (CA3PC, $n = 9$ cells) and produced either no response (25 out of 29 cells) or only a slow, small hyperpolarization in CA1 pyramidal cells (CA1PC, peak hyperpolarization; single pulse: 0.31 ± 0.18 mV, $n = 4$; train: 0.91 ± 0.13 mV, $n = 21$; Fig. 1D).

To directly test whether EPSPs on INs are mediated by synapses formed by RH afferents, we accomplished correlated light and electron microscopic analysis of six appositions between eGFP+ and neurochemically identified boutons and recorded INs. Five of six boutons were glutamatergic, as indicated by positive immunoreactivity for vesicular glutamate transporter type 3

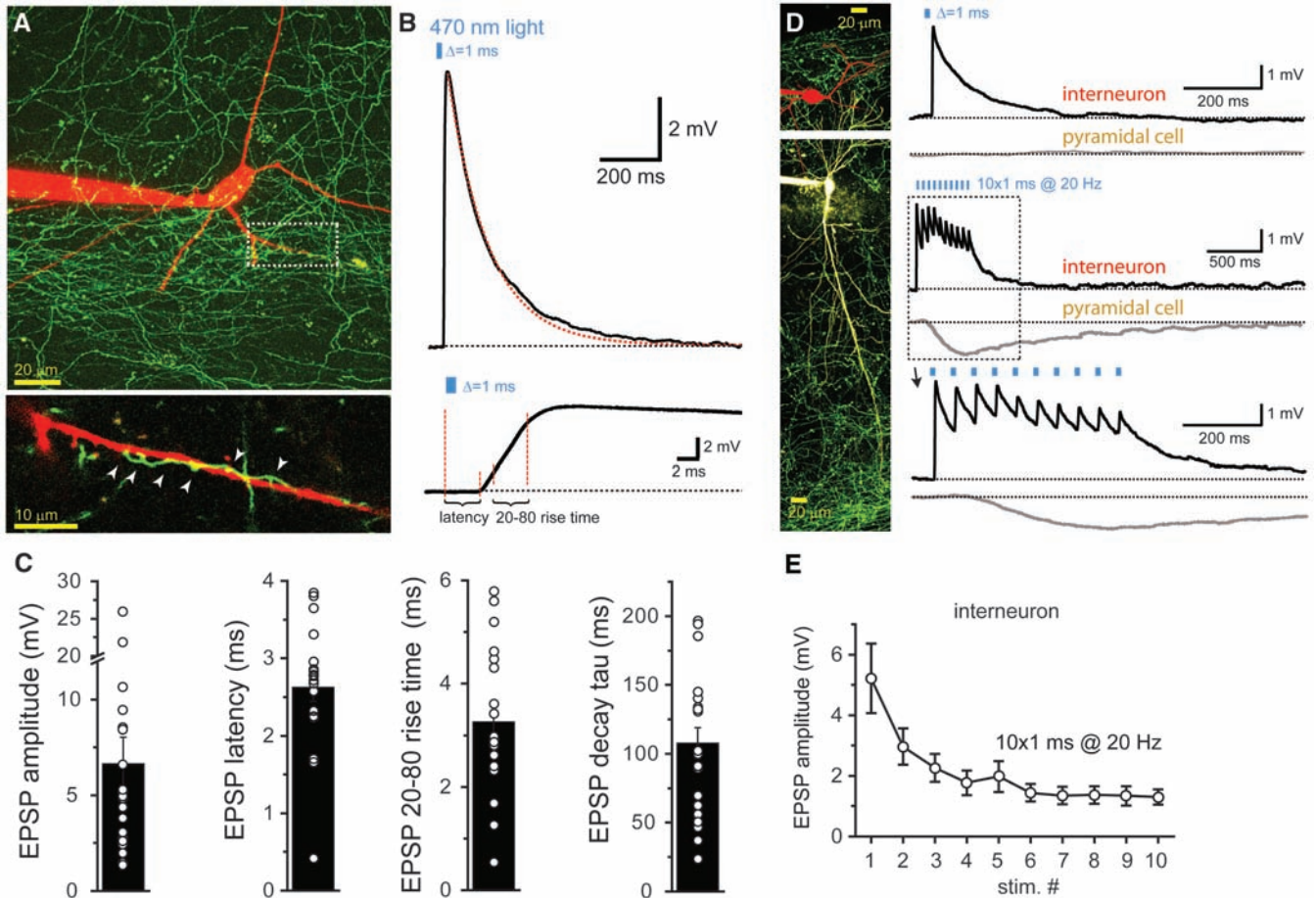


Fig. 1. MnR input excites hippocampal INs in vitro. (A) Two-photon image of an IN filled with Alexa 594 (red) surrounded by a dense network of eGFP+ RH fibers (green) at the border of sr/sl-m of CA1 region in a dorsal hippocampal slice. Dashed boxed region is expanded (lower panel) to show multiple putative contacts (arrowheads) made by an eGFP+ axon on the IN's dendrite. (B) (Upper panel) ChR2-photostimulation produces a large-amplitude and short-latency EPSP in the IN (red dotted line is exponential fit). (Lower panel)

Locations used to measure EPSP kinetics are indicated on an expanded time scale of the rising phase of the EPSP. (C) Summary data of EPSP kinetics. Symbols: individual recordings; bars: mean \pm SEM. (D) Image of an IN (red) and a CA1PC (yellow-white) recorded sequentially (left) and averaged responses recorded from the IN (black) and from the PC (gray) to ChR2-photostimulation (right). (E) Summary plot of peak EPSP amplitude during train photostimulation from INs (10 pulses at 20 Hz, $n = 10$; error bars: SEM).

(VGLuT3), and one was 5-HT/VGLuT3 double immunoreactive ($n = 2$ INs, two connections tested for 5-HT/VGLuT3 and four tested only for VGLuT3). All examined appositions were synaptic contacts between the identified boutons and dendritic profiles of INs (Fig. 2, C to J, and fig. S3, a to d).

What type of neurotransmitters mediate fast transmission at RH-IN synapses? First, we tested the contribution of ionotropic 5-HT₃ receptors (5-HT₃R) that are expressed by a subset of hippocampal INs, which are innervated by MnR afferents (6, 13). The selective 5-HT₃R antagonist MDL72222 (100 μ M) significantly reduced the amplitude of the EPSPs (to $74 \pm 5\%$ of control, $P < 0.05$, $n = 16$; Fig. 3, A to D) (11). A prominent 5-HT₃R antagonist-resistant component was still present and was abolished by subsequent coapplication of AMPA-type (NBQX, 5 μ M) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-type (D,L-AP5, 50 μ M) ionotropic glutamate receptor (iGluR) antagonists [to $6 \pm 1\%$, $P < 0.001$, $n = 16$; the slow hyperpolarization on PCs was sensitive to 5-HT_{1A}R antagonist (S)-WAY 100135, 100 μ M; fig. S3e].

Two lines of evidence further support the dual-component serotonergic/glutamatergic nature of fast synaptic transmission in RH-IN synapses. VGLuT3+ terminals at the border of sr/sl-m in the hippocampus CA1 area originate from raphe nuclei (8). Using electron microscopy (EM) and combined immunogold-immunoperoxidase staining, we found that most (19 out of 25) synapses

of these above-mentioned terminals and many (10 out of 16) synapses of RH terminals labeled by the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHAL) are GluR1 subunit positive as well (Fig. 3, E to L). Moreover, in several cases, two-photon uncaging of MNI-glutamate (14) at putative synaptic contact sites made by eGFP+ axons evoked fast rising and decaying EPSPs in INs (fig. S3, f to i).

MnR activation may therefore robustly engage hippocampal INs via a fast serotonergic/glutamatergic excitation. To directly test this prediction, we first juxtacellularly recorded hippocampal neurons during electrical stimulation of the MnR in vivo ($n = 60$ cells; 8 cells were labeled and recovered, 4 cells were anatomically identified) (11). We found a subset of neurons that MnR stimulation activated with a short latency (8.9 ± 0.58 ms, $n = 16$; Fig. 4) (11). These fast activated cells showed a robust (firing: $491.2 \pm 155.2\%$ of control; success rate: $65.7 \pm 5.3\%$; Fig. 4, figs. S4 to S6, and table S2) and temporally focused activation (duration: 8.05 ± 1.03 ms; jitter: 1.7 ± 0.19 ms). All of these parameters except success rate were significantly different from those of a second subset of neurons that were activated more slowly (latency: 15 to 50 ms; $n = 7$, $P < 0.05$; table S2).

Evidence of the prominent glutamatergic component of the MnR-stimulation-mediated excitatory drive was also found in vivo. Local iontophoresis of NBQX ($n = 6$; table S3) (11) significantly suppressed the success rate of the

fast activation (2 min: to $53.8 \pm 4.5\%$; $P < 0.05$, $n = 6$; 5 min: to $29.7 \pm 11\%$, $n = 3$; Fig. 4, H and I) in a dose-dependent and reversible way, without altering the latency and nonsignificantly increasing the jitter of the response (table S3) (11). We determined the position of fast responding INs in the hippocampal network by identifying labeled cells immunocytochemically and analyzing their state-dependent activity (table S1 and figs. S4 to S6).

That hippocampal INs are highly interconnected (15) raises the possibility that the activated components of the inhibitory circuit could, through feed-forward inhibition, themselves play a role in producing the elevated spike precision described above. Further analysis of our MnR-stimulation data revealed that the initial increase in IN spiking was often followed by a period of suppressed activity (by $90.6 \pm 4\%$, 10 out of 16 cells; latency: 15 ± 1.71 ms; duration: 144.85 ± 17.32 ms; fig. 4F). Two further observations indicated that this postexcitatory suppression was caused by MnR-triggered inhibition. First, this effect appeared to be sensitive to 5-HT₃R antagonists, as ondansetron (1 to 2 mg/kg, intraperitoneal injection) significantly reduced the duration of the inhibitory period (from 148.5 ± 32.85 ms to 83.25 ± 14.13 ms; $n = 5$; 5 to 15 min after injection, $P < 0.05$) and increased the jitter of the primary facilitatory response (fig. S9h and table S3).

Photostimulation experiments were used to investigate this network effect in vitro. With a

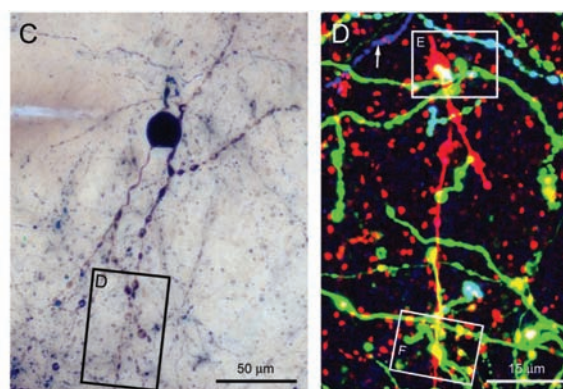
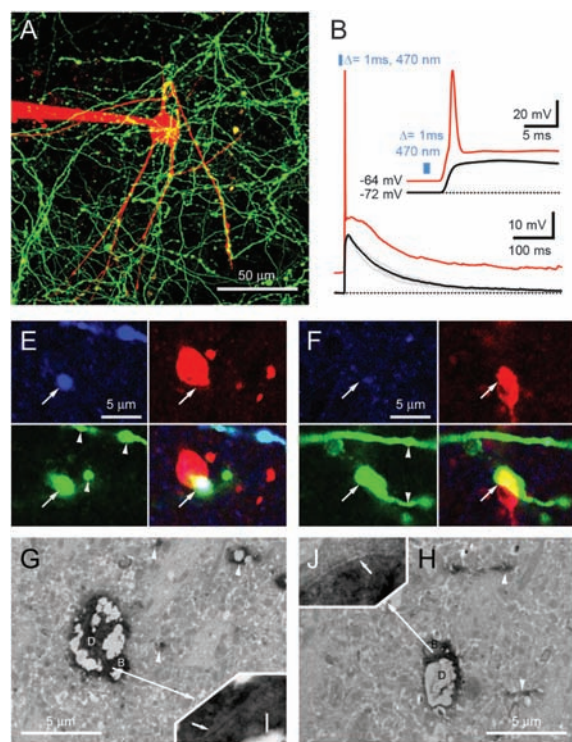
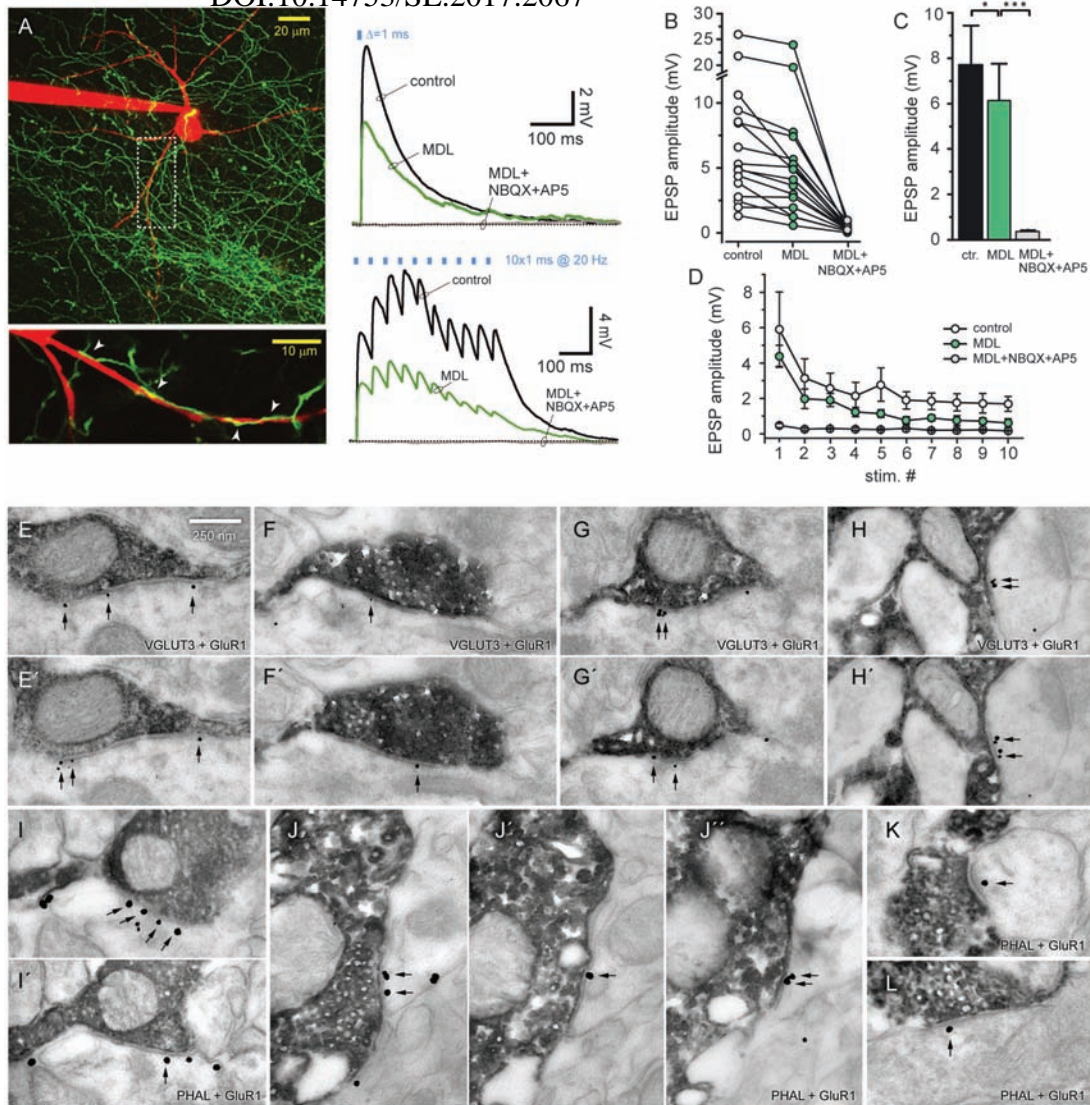


Fig. 2. RH fibers excite hippocampal INs via 5-HT- and/or VGLuT3-containing synapses. (A) Two-photon image of an IN (red) and eGFP+ RH axons (green) at the border of sr/sl-m. (B) ChR2 photostimulation evokes short-latency action potential in the IN (red trace, right; expanded time scale) at resting membrane potential (V_m). At a more hyperpolarized V_m , underlying large EPSPs are observed (individual traces: gray; average: black). (C) The IN in (A) processed for light microscopy (image stack of 100 μ m). Black frame marks the dendritic segment analyzed for contacts with RH fibers. (D) Triple immunofluorescent confocal image of the dendritic segment. Red: biocytin (cell) and VGLuT3 (boutons); green: eGFP (RH axons); blue: 5-HT. Colocalization or overlaps: yellow: red + green; light blue: blue + green; white: triple labeling. White boxes demarcate the putative contacts examined by triple immunofluorescence on higher magnification (E and F) and by correlated EM (G to J). The small arrow to the left of the upper white frame points to an eGFP-5-HT+ fiber. (E) High-magnification single-plane confocal images of the possible contact between the dendritic segment and the 5-HT+/VGLuT3+ bouton shown in the upper white frame in (D). Separate and overlaid images of the three channels are presented. Arrow: bouton examined by EM (G and I); arrowheads: surrounding eGFP+ elements used as landmarks to identify the area on the low-magnification EM [small arrowheads in (G) and (H)]. (F) Putative contact between the dendritic

segment and the 5-HT- bouton designated by the lower frame in (D). (G) Low-power EM image of the contact depicted in (E). (H) Low-power EM image of the contact in (F). (I) High-power EM image [scale bar of (G) is 1 μ m in (I)] of the contact in (G) showing the parallel apposition of the dendritic and bouton membranes surrounding a possible synaptic cleft (small white arrow). The 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) precipitate masks synaptic vesicles. (J) The same as in (I) for the 5-HT-/VGLuT3+ bouton shown in (H) [scale bar of (H) is 1 μ m in (J)]. B: RH boutons; D: IN dendrite.

Fig. 3. Monosynaptic excitation of INs is mediated by 5-HT₃ and AMPA/NMDA receptors. **(A)** Upper left: Image of an IN (red) and eGFP+ RH fibers (green). Lower left: Expanded image of the dashed boxed region in upper panel; arrowheads indicate the positions of multiple close appositions between a proximal dendritic segment of the IN and eGFP+ axons. Traces to the right of the image are averaged V_m responses evoked by single-pulse and train photostimulation in control (black), MDL72222 (100 μ M, green), and MDL72222+NBQX+AP5 (gray). Subsequent coapplication of iGluR antagonists (NBQX 5 μ M, D,L-AP5 50 μ M) abolishes photostimulation-evoked responses. **(B and C)** Grouped data (B) and summary graph (C) of EPSPs evoked by single-pulse photostimulation in INs. Lines connect individual recordings in control (open circles), MDL72222 (green circles), and MDL72222+NBQX+AP5 (gray circles). **(D)** Summary plot of peak EPSP amplitude during train photostimulation ($n = 10$; error bars: SEM). **(E to L)** EM images of immunoperoxidase-immunogold stainings. Images show Glu1 receptor subunit labeling in the synaptic contacts (arrows) that are established either by VGLUT3+ boutons [(E) to (H)], DAB-positive dark precipitation) or by PHAL-labeled [(I) to (L)], DAB-positive] RH terminals at the border of sr/sl-m. (E to J) Two or three sections of the same synapse with multiple labelings for Glu1 are shown. Scale bar on (E) applies for (F) to (L).



low concentration of chloride ($[Cl^-]_{in}$) in the intracellular solutions, monosynaptic EPSPs were often followed by readily observable GABAergic (i.e., gabazine-sensitive, $n = 2$) inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs; fig. S9, a and b) (11). When present, these IPSPs were preferentially blocked by the 5-HT₃R antagonist ($n = 5$ out of 13 INs; fig. S9, b, e, and f). The most likely interpretation of this result (and observed in 7 out of 13 INs; fig. S9, c to f) is that the recorded IN is itself innervated by a subset of INs that are strongly excited by RH afferents. In agreement with this, IPSPs were disynaptic in origin, as the evoked responses were abolished by the coapplication of 5-HT₃R and iGluR antagonists (amplitude: to $7 \pm 2\%$, $P < 0.05$, $n = 13$; fig. S9, e to g).

Finally, we found that MnR activation of the inhibitory circuit is effectively transmitted to the output elements, i.e., principal cells of the hippocampal circuit. When recording from PCs

with low $[Cl^-]_{in}$ in the intracellular solution in vitro, we observed robust disynaptic GABAergic IPSPs (fig. S10, a to c). This fast inhibition was also observed in PCs in vivo as a form of short-latency cessation of PCs spiking when recorded juxtacellularly (fig. S10d; $n = 3$) and as a short-latency hyperpolarization when recorded intracellularly (fig. S10e) during MnR stimulation (11).

The present demonstration of a fast synaptic activation of hippocampal interneurons by MnR afferents via glutamate/serotonin cotransmission puts the subcortical control of cortical information processing in a fundamentally new perspective. The current view of a slow and diffuse modulation conveying emotional, motivational, or other state-dependent tuning (1, 16) is now complemented by the ability to carry out target-selective synaptic actions with high temporal and spatial resolution. This additional ability may promote the rapid formation and selection of particular

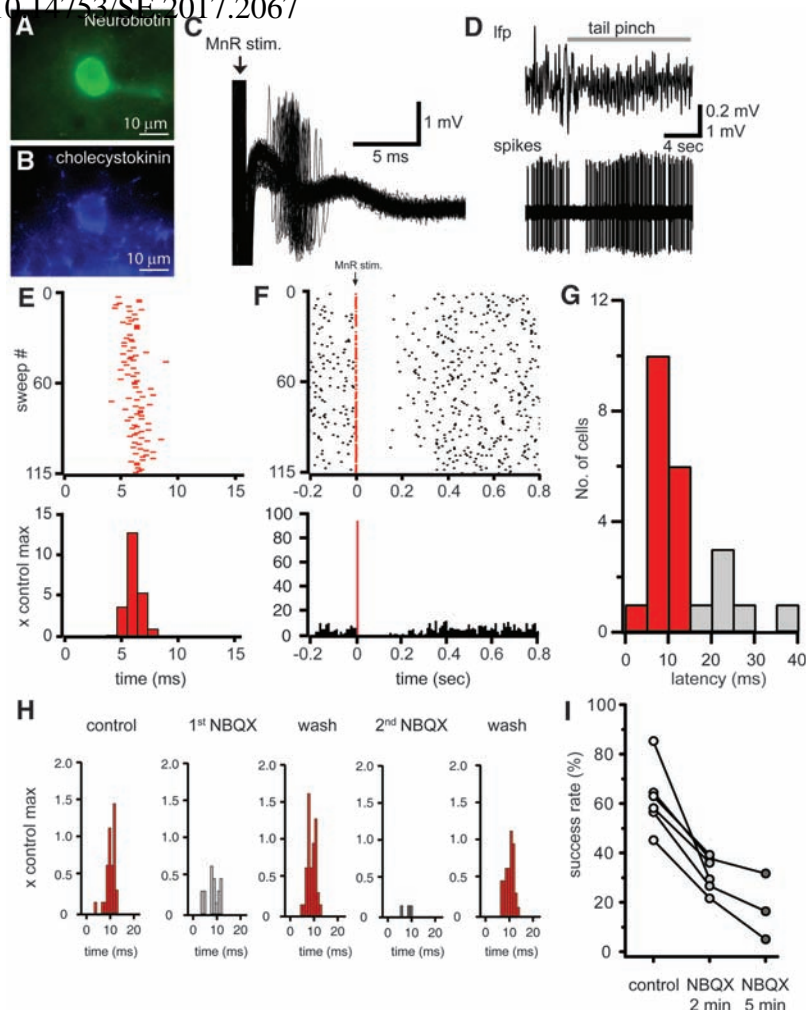
hippocampal local representations or modes of information processing (17, 18), possibly through fast alterations in the relative contribution of the different classes of interneurons to rhythmic population activity (13, 19) (fig. S1). Finally, the present observations lend support to a proposed role of glutamate in disorders that have traditionally been considered to be subcortical in origin, such as depression, anxiety, and certain components of schizophrenia (20–22).

References and Notes

1. E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessel, *Principles of Neural Science* (McGraw Hill, New York, ed. 4, 2000).
2. J. G. Hensler, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **30**, 203 (2006).
3. D. A. Nitz, B. L. McNaughton, *Learn. Mem.* **6**, 153 (1999).
4. R. P. Vertes, *J. Neurophysiol.* **46**, 1140 (1981).
5. B. Kocsis, V. Varga, L. Dahan, A. Sik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1059 (2006).
6. T. F. Freund, A. I. Gulyás, L. Acsády, T. Görös, K. Tóth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 8501 (1990).
7. C. Gras et al., *J. Neurosci.* **22**, 5442 (2002).

DOI:10.1126/science.1178307

Fig. 4. A subset of hippocampal INs is activated by MnR stimulation in vivo with short latency by a partly glutamatergic mechanism. (A and B) Immunofluorescent identification of a fast-activated IN [(A) neurobiotin: green; (B) cholecystokinin: blue]. (C) MnR stimulation–induced activation of this IN is manifested as the concentration of evoked spikes within 10 ms of stimulation (overlying 20-ms windows of raw data, $n = 115$). (D) Firing pattern of the IN during the non-theta to theta transition. (E and F) Response of this IN is characterized by raster plots (upper) and peristimulus time histograms (PSTHs) (lower panels, PSTH bin size = 1 ms) showing the MnR stimulation–induced fast activation (E) and the subsequent long-lasting inhibition [(F), bin size = 10 ms]. Note the robust increase in spike count (13 times that of the control, 6-ms latency). (G) Distribution of response latencies of neurons activated by MnR stimulation within 50 ms after stimulus onset ($n = 23$). The peak of fast responders can be clearly distinguished ($n = 17$ in red). (H) The fast response is largely attenuated by local application of NBQX: Doubling the duration of NBQX application (1st: 2 min; 2nd: 5 min) almost totally attenuates the fast response. After switching off NBQX ejection, the fast response recovers (1st and 2nd wash out). (I) Change of success rate of fast activation during all NBQX experiments (2 min, $n = 6$; 5 min, $n = 3$) after continuous drug iontophoresis. NBQX reduced the success rate in all instances, and its effect was time (dose) dependent.



8. J. Somogyi *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* **19**, 552 (2004).
9. J. Jackson, B. H. Bland, M. C. Antle, *Synapse* **63**, 31 (2009).
10. L. Petreanu, D. Huber, A. Sobczyk, K. Svoboda, *Nat. Neurosci.* **10**, 663 (2007).
11. Supplementary methods and results are available as supporting material on Science Online.
12. R. P. Vertes, W. J. Fortin, A. M. Crane, *J. Comp. Neurol.* **410**, 555 (1999).
13. T. F. Freund, *Trends Neurosci.* **26**, 489 (2003).
14. A. Losonczy, J. C. Magee, *Neuron* **50**, 291 (2006).
15. T. F. Freund, G. Buzsáki, *Hippocampus* **6**, 347 (1996).
16. B. L. Jacobs, E. C. Azmitia, *Physiol. Rev.* **72**, 165 (1992).
17. M. A. P. Moita, S. Rosis, Y. Zhou, J. E. LeDoux, H. T. Blair, *Neuron* **37**, 485 (2003).
18. H. Hirase, X. Leinekugel, J. Csicsvari, A. Czúrkó, G. Buzsáki, *J. Neurosci.* **21**, RC145 (2001).
19. J. A. Cardin *et al.*, *Nature* **459**, 663 (2009).

20. N. Müller, M. J. Schwarz, *Mol. Psychiatry* **12**, 988 (2007).
21. R. D. Paz, S. Tardito, M. Atzori, K. Y. Tseng, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **18**, 773 (2008).
22. The efficiency in recruiting inhibitory neuron groups of the fast modulation described herein implies that the pathological alteration of this connection would dramatically shift the inhibitory and excitatory balance leading, ultimately, to the impairment of the target network.
23. We thank A. Lee and B. Kocsis for their comments on the manuscript. We thank L. Acsády and B. K. Andrásfalvy for helping to establish the collaboration between V.V. and A.L. We thank B. Shields, K. Lengyel, and G. Goda for technical assistance. V.V. and G.N. were János Bolyai Research Fellows. This work was supported by grants from the NIH (NIH-MH-54671), Howard Hughes Medical Institute (HHMI55005608), and Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K-60927 and NKTH-OTKA CNK 77793). Author contributions V.V., A.L., J.C.M., and T.F.F. conceived the

experiments. V.V. conducted the in vivo physiological experiments with the help of A.D. B.V.Z. performed the molecular experiments. A.L. performed the in vitro experiments. Z. B. and G.N. performed most of the histological experiments. N.H. performed the in vitro experiments for the specificity of the NBQX effect. V.V. and A.L. analyzed most of the physiological data except firing pattern analysis carried out by B.H. A.L., V.V., B.V.Z., J.C.M., and T.F.F. wrote the paper.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/326/5951/449/DC1

Materials and Methods

SOM Text

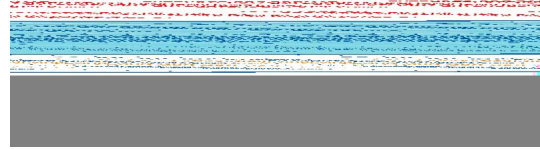
Figs. S1 to S10

Tables S1 to S3

References

26 June 2009; accepted 19 August 2009

10.1126/science.1178307



Fast Synaptic Subcortical Control of Hippocampal Circuits

Viktor Varga, Attila Losonczy, Boris V. Zemelman, Zolt Borhegyi, Gábor Nyiri, Andor Domonkos, Balázs Hangya, Noémi Holderith, Jeffrey C. Magee and Tamás F. Freund (October 15, 2009)
Science **326** (5951), 449-453. [doi: 10.1126/science.1178307]

Editor's Summary

Subcortical Network Regulation

Subcortical neuromodulatory centers dominate the motivational and emotional state-dependent control of cortical functions. Control of cortical circuits has been thought to involve a slow, diffuse neuromodulation that affects the excitability of large numbers of neurons relatively indiscriminately. **Varga *et al.*** (p. 449) describe a form of subcortical control of cortical information processing whereby strong, spatiotemporally precise excitatory input from midbrain serotonergic neurons produces a robust activation of hippocampal interneurons. This effect is mediated by a synaptic release of both serotonin and glutamate and impacts network activity patterns.

This copy is for your personal, non-commercial use only.

- Article Tools** Visit the online version of this article to access the personalization and article tools:
<http://science.sciencemag.org/content/326/5951/449>
- Permissions** Obtain information about reproducing this article:
<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

Science (print ISSN 0036-8075; online ISSN 1095-9203) is published weekly, except the last week in December, by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. Copyright 2016 by the American Association for the Advancement of Science; all rights reserved. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

Divergent *in vivo* activity of non-serotonergic and serotonergic VGluT3–neurons in the median raphe region

Andor Domonkos^{1,2}, Litsa Nikitidou Ledri¹, Tamás Laszlovszky¹, Csaba Cserép¹, Zsolt Borhegyi^{1,3}, Edit Papp¹, Gábor Nyiri¹, Tamás F. Freund¹ and Viktor Varga¹

¹Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

²János Szentágothai Doctoral School of Neurosciences, Semmelweis University, Budapest, Hungary

³Present address: MTA-ELTE-NAP B-Opto-Neuropharmacology Group, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

Key points

- The median raphe is a key subcortical modulatory centre involved in several brain functions, such as regulation of the sleep–wake cycle, emotions and memory storage.
- A large proportion of median raphe neurones are glutamatergic and implement a radically different mode of communication compared to serotonergic cells, although their *in vivo* activity is unknown.
- We provide the first description of the *in vivo*, brain state-dependent firing properties of median raphe glutamatergic neurones identified by immunopositivity for the vesicular glutamate transporter type 3 (VGluT3) and serotonin (5-HT). Glutamatergic populations (VGluT3+/5-HT– and VGluT3+/5-HT+) were compared with the purely serotonergic (VGluT3–/5-HT+ and VGluT3–/5-HT–) neurones.
- VGluT3+/5-HT+ neurones fired similar to VGluT3–/5-HT+ cells, whereas they significantly diverged from the VGluT3+/5-HT– population. Activity of the latter subgroup resembled the spiking of VGluT3–/5-HT– cells, except for their diverging response to sensory stimulation.
- The VGluT3+ population of the median raphe may broadcast rapidly varying signals on top of a state-dependent, tonic modulation.

Abstract Subcortical modulation is crucial for information processing in the cerebral cortex. Besides the canonical neuromodulators, glutamate has recently been identified as a key cotransmitter of numerous monoaminergic projections. In the median raphe, a pure glutamatergic neurone population projecting to limbic areas was also discovered with a possibly novel, yet undetermined function. In the present study, we report the first functional description of the vesicular glutamate transporter type 3 (VGluT3)-expressing median raphe neurones. Because there is no appropriate genetic marker for the separation of serotonergic (5-HT+) and non-serotonergic (5-HT–) VGluT3+ neurones, we utilized immunohistochemistry after recording and juxtacellular labelling in anaesthetized rats. VGluT3+/5-HT– neurones fired faster, more variably and were permanently activated during sensory stimulation, as opposed to the transient response of the slow firing VGluT3–/5-HT+ subgroup. VGluT3+/5-HT– cells were also more active during hippocampal theta. In addition, the VGluT3–/5-HT– population, comprising putative GABAergic cells, resembled the firing of VGluT3+/5-HT– neurones but without any significant reaction to the sensory stimulus. Interestingly, the VGluT3+/5-HT+ group, spiking slower than the VGluT3+/5-HT– population, exhibited a mixed response (i.e. the initial transient activation was followed by a sustained elevation of firing). Phase coupling to hippocampal and prefrontal slow oscillations was found in VGluT3+/5-HT– neurones, also differentiating them from the VGluT3+/5-HT+ subpopulation. Taken together, glutamatergic neurones in the median raphe may implement multiple, highly divergent forms of modulation in parallel: a slow, tonic

mode interrupted by sensory-evoked rapid transients, as well as a fast one capable of conveying complex patterns influenced by sensory inputs.

(Received 15 December 2015; accepted after revision 22 March 2016; first published online 29 March 2016)

Corresponding author V. Varga: Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Szegony utca 43, 1083 Budapest, Hungary. Email: vargav@koki.mta.hu

Abbreviations AP, anteroposterior; DV, dorsoventral; 5-HT, serotonin; 5-HT_{1A}R, 5-HT receptor type 1A; ISI, inter-spike interval; LFP, local field potential; ML, mediolateral; MRR, median raphe region; TpH₂, tryptophan hydroxylase; VGluT3, vesicular glutamate transporter type 3.

Introduction

The ascending projection from the median raphe region (MRR; median raphe nucleus and paramedian raphe nucleus) is essential for a multitude of brain functions, such as the regulation of the sleep–wake cycle (Monti *et al.* 2008) or the modulation of oscillations (Jackson *et al.* 2008). The MRR consists of a heterogeneous collection of serotonergic, GABAergic and later identified glutamatergic neurones (Jacobs & Azmitia, 1992; Allers & Sharp, 2003; Jackson *et al.* 2009). Initial studies described the electrophysiological phenotype of serotonin (5-HT)-containing neurones, with a slow, regular firing pattern that changes with the stages of the sleep–wake cycle (Mosko & Jacobs, 1974). Nevertheless, a significant number of unidentified, fast spiking neurones, which were occasionally coupled to forebrain oscillations or behavioural phenomena, were also recorded (Sakai & Crochet, 2001; Viana DiPrisco *et al.* 2002). Mounting evidence suggested that the rapidly firing MRR neurones may belong to 5-HT[−] and possibly GABAergic subgroups (Allers & Sharp, 2003; Calizo *et al.* 2011; Kirby *et al.* 2003). However, some fast firing MRR neurones with spikes coupled to hippocampal theta, the prominent limbic oscillation, were unexpectedly found to contain 5-HT (Kocsis *et al.* 2006).

The discovery of the third isoform of the vesicular glutamate transporter (VGluT3) in 5-HT⁺ neurones, amongst others, raised the possibility of a novel, uncharacterized form of modulation by co-released glutamate (Fremeau *et al.* 2002; Schäfer *et al.* 2002). Glutamatergic synaptic signalling by monoaminergic cells has only recently been confirmed (Qi *et al.* 2014; Noh *et al.* 2010; Varga *et al.* 2009). Glutamate from MRR axons, in contrast to 5-HT, selectively and powerfully recruits certain interneurone types in the hippocampus via synapses that contain both 5-HT and VGluT3 or only VGluT3 (Varga *et al.* 2009). In parallel with the identification of fast glutamatergic modulation, a large fraction of MRR projection neurones was reported to be purely glutamatergic in addition to serotonergic and dual-transmitter subpopulations (Hioki *et al.* 2010; Jackson *et al.* 2009; Szőnyi *et al.* 2014). However, the functional characteristics of VGluT3⁺ MRR neurones (i.e.

whether they resemble the classic slow firing phenotype of 5-HT⁺ neurones or belong to fast spiking subgroups or form a mixed population) remain to be determined. The relationship of their discharge pattern to forebrain activity states, as well as to oscillations, is unknown.

In the present study, we characterized the *in vivo* activity of VGluT3-expressing (5-HT⁺ and 5-HT[−]) MRR neurones and compared them with VGluT3[−] subgroups (5-HT⁺ and 5-HT[−]). Because there is no appropriate genetic marker to undoubtedly separate these subgroups, we juxtacellularly recorded their activity followed by labelling and identification utilizing *post hoc* immunohistochemistry.

Methods

Animals

A total of 301 male Wistar rats, weighing 200–500 g, were used in the present study. All experiments were performed in accordance with the Institutional Ethical Codex, Hungarian Act of Animal Care and Experimentation (1998, XXVIII, section 243/1998) and the European Union guidelines (directive 2010/63/EU), and with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences. All efforts were made to minimize pain and suffering and to reduce the number of animals used.

Juxtacellular recording in the MRR

The rats were anaesthetized by i.p. injection of 20% urethane (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; dose: 0.007 ml g^{−1} body weight). During the experiments, the temperature of animals was held constant by a homeothermic heating pad. A cranial window was drilled to access the MRR either from lateral [stereotactic co-ordinates: anteroposterior (AP) +1.0 mm, mediolateral (ML) −1.4 to −2.0 mm from lambda and 15° angle] or from posterior (stereotactic co-ordinates: AP −2.6 mm, ML 0 mm from lambda and 30° angle). For juxtacellular recording, filamented borosilicate micropipettes were filled with 0.5 M NaCl containing

2% Neurobiotin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA; impedance of micropipettes: 20–45 M Ω). After reaching the target zone (6900–8500 μm from brain surface), the recording pipette was slowly (0.8–1 $\mu\text{m s}^{-1}$) advanced using a micropositioner (EXFO, Quebec, Canada). The juxtacellular MRR unit signal was filtered between 0.1 and 5 kHz and amplified (gain: 500 or 1000) using an AxoClamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and a LinearAmp signal conditioner (Supertech, Pécs, Hungary).

Electrode implantation into the hippocampus and prefrontal cortex

Additional holes were drilled for implantation of monopolar stainless steel wires into dorsal CA1 of the hippocampus [AP -4.5 mm, ML -2.5 mm or $+2.5$ mm from bregma and 0° angle, dorsoventral (DV): 2300–2400 μm from brain surface] and occasionally into the infralimbic part of prefrontal cortex (AP $+2.7$ mm, ML $+0.5$ to $+0.6$ mm from bregma and 0° angle, DV: 4500 μm from brain surface) to record local field potentials (LFP) filtered between 0.3 and 2 kHz (gain: 2000 or 5000), using an AC-coupled amplifier (BioAmp; Supertech). A silver wire served as a common ground was placed below the neck skin. All electrophysiological data were digitized at 10 kHz using a Micro1401 mkII or a Micro3 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) controlled by Spike2 (Cambridge Electronic Design).

Recording protocol

Spontaneous and sensory stimulation-evoked activity of MRR neurones simultaneous with hippocampal and occasionally prefrontal cortical LFP was registered. Tail pinch served as the sensory stimulation. The recording duration of spontaneous activity was 2–10 min (except for one case in which 1 min spontaneous activity was saved). In all experiments, the tail pinch was applied by the same small crocodile clip (the serrated surface was covered by thin plastic tape) for 30 s. In five cases, the tail pinch duration was 60 s. If the first stimulation had not evoked brain state change after at least 1 min, a second tail pinch was applied using a stronger clip. Only the first effective tail pinch was considered when the data were analysed. In the case of one neurone, no tail pinch was executed, and therefore the data from this recording were used only in spike half-width analysis and phase preference calculation.

Labelling of recorded neurones

In 166 animals (from a total of 301 rats), successful recordings were followed by Neurobiotin-labelling of the neurones: 1–10 nA current (gradually increased

until current-modulated neuronal firing was detected) was applied via the recording pipette, in parallel with a cathodal DC current of 0.5–0.9 nA amplitude. The duration of labelling was 2–10 min (Pinault 1996).

Histological processing

After successful labelling, animals were transcardially perfused with saline followed by Zamboni's fixative or 4% paraformaldehyde (survival time after labelling varied between 10 and 150 min). Brains were cut to 40–80 μm thick coronal slices on a vibrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). After extensive washing in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), the sections were transferred into Tris-buffered saline (Sigma-Aldrich) (pH 7.4). Subsequent to this step, all the washes and serum dilutions were performed in Tris-buffered saline. Neurobiotin-filled neurones were identified by Alexa488-conjugated Streptavidin staining (Life Technologies, Grand Island, NY, USA, catalogue no.: S-32354, dilution 1:2000), neurochemical content (5-HT and VGluT3) was screened by immunofluorescence [primaries: rabbit anti-5-HT (ImmunoStar Inc., Hudson, WI, USA, catalogue no.: 20080, dilution 1:10000) and guinea pig anti-VGluT3 (Merck, Darmstadt, Germany, catalogue no.: AB5421, dilution 1:2000); secondaries: Dylight405-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, catalogue no.: 711-475-152, dilution 1:400) and Cy3-conjugated donkey anti-guinea-pig (Jackson ImmunoResearch, catalogue no.: 706-166-148, dilution 1:200)]. Fluorescence signals were inspected using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with a DP70 CCD-camera (Olympus, Tokyo, Japan) or using an A1R confocal laser scanning microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Reconstruction of the cells and the recording positions

Neurobiotin signal was intensified using Nickel-DAB (2,3-diaminobenzidine; Sigma-Aldrich) chromogen developed by avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Elite ABC; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Dendritic arborization of neurones with good labelling quality was three-dimensionally reconstructed using Neurolucida software (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) and an Axioplan 2 microscope. The maximal diameter of the coronal projection of dendritic arborization was measured. The position of recovered neurones, as well as the position of LFP recording wires (except in some experiments; see Fig. 6E) was determined based on a stereotaxic atlas of the rat brain (Paxinos & Watson, 2005).

Selection criteria of cells

In 78 out of 166 experiments, the labelled neurones were undoubtedly recovered. In some of these animals, two neurones were recorded and identified. In a few experiments, either the recording position and the location of the Neurobiotin-filled neurone did not match perfectly

or multiple somata were recovered close to each other. For all of these cases, the recordings were excluded from further analysis. By applying these restrictions, we recovered 60 MRR neurones. From that pool, only cells with unequivocal identification by immunofluorescence were involved in the present study, resulting in a total of 23 neurones (Fig. 1B).

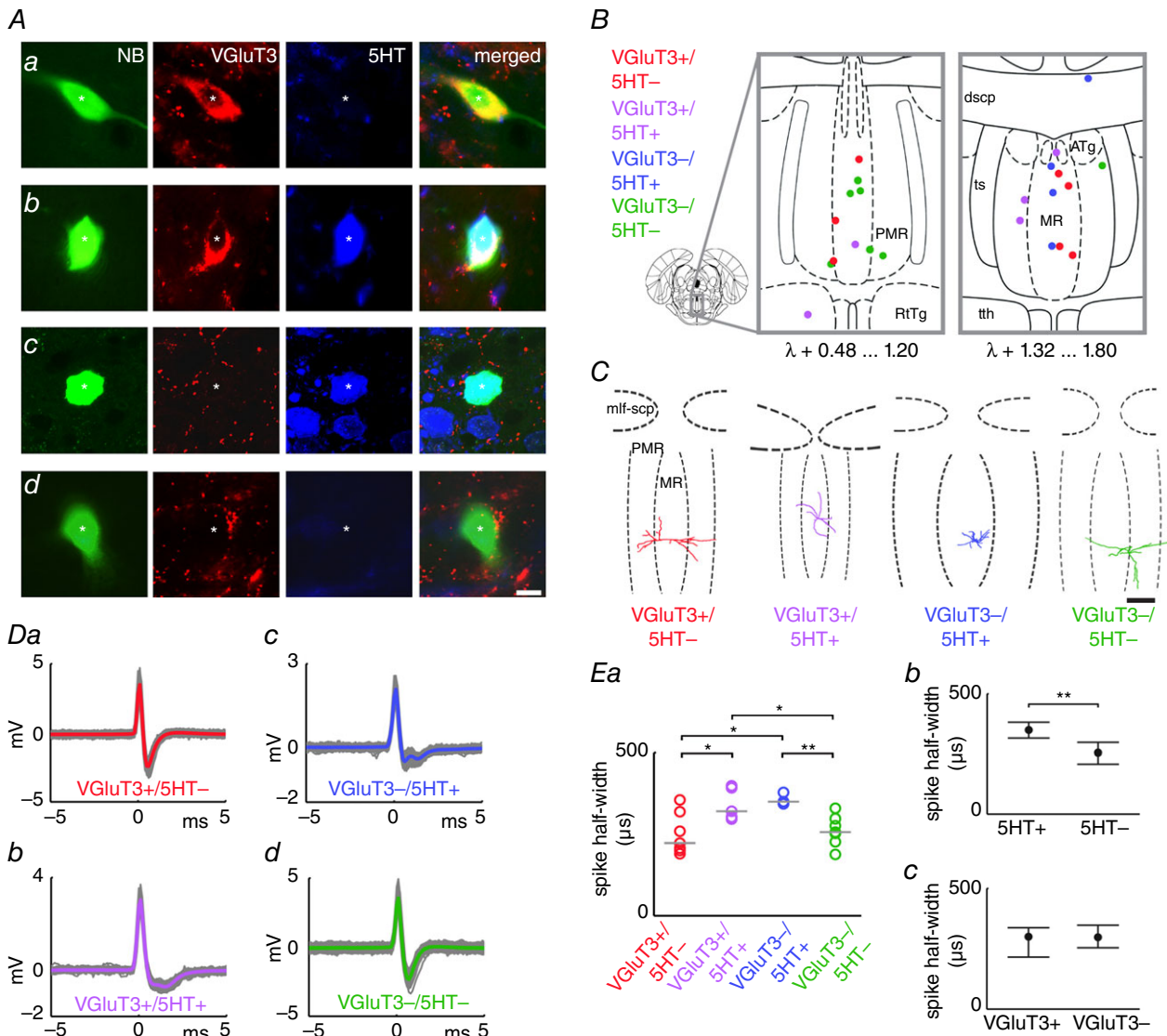


Figure 1. Examples and recording positions of all neurochemically identified MRR neurones

Immunofluorescence images of example Neurobiotin (NB)-filled neurones: VGluT3+/5HT- (Aa), VGluT3+/5HT+ (Ab), VGluT3-/5HT+ (Ac) and VGluT3-/5HT- (Ad) neurones. Asterisks indicate the soma. Scale bar = 10 μ m. B, coloured dots indicate the position of recorded and neurochemically identified neurones overlaid onto two representative coronal diagrams of MRR (MR + PMR, based on Paxinos & Watson, 2005). ATg, anterior tegmental nucleus; dscp, decussation of the superior cerebellar peduncle; MR, median raphe nucleus; PMR, paramedian raphe nucleus; RtTg, reticulotegmental nucleus of the pons; ts, tectospinal tract; tth, trigeminothalamic tract. C, coronal projections of three-dimensionally reconstructed dendritic arborization of four representative neurones. mlf-scp, medial longitudinal fascicle and superior cerebellar peduncle; MR, median raphe nucleus; PMR, paramedian raphe nucleus. Scale bar = 300 μ m. Da–Dd, spike waveform averages (plotted in colour) of corresponding neurones in (A). Ea, spike half-width (grey lines: group medians). Kruskal–Wallis ANOVA: $P = 0.0146$. Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Data grouped on the basis of 5-HT (Eb) and VGluT3 (Ec) content (median + interquartile range).

Data analysis

Spikes in unit recordings were detected using Spike2 software, controlled by visual inspection to remove artefacts, and time stamps corresponding to the spike peaks were exported to the MATLAB (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) environment, where custom-written routines and scripts were run for further analysis. To calculate the spike waveform average, data in ± 5 ms time windows around spike peaks were interpolated linearly to obtain a waveform oversampled at 1 MHz. Spike half-width was determined as the duration of the action potential halfway between the baseline and the peak of the waveform average. For calculation of spike averages, all data from pre-labelling recordings (i.e. including spontaneous and sensory stimulation periods) were used.

Sensory stimulation-evoked response

The sensory stimulation-evoked response was tested in the first 30 s of tail pinch periods. Transient change was defined as the ratio of the normalized firing rate in 0–1 s vs. 0–5 s after the start of stimulation. Permanent change was defined as the difference of the normalized firing rate 0–15 s before and 1–16 s after the start of stimulation.

Firing rate and interspike interval (ISI) distribution

The firing rate (event count / time in seconds) and the coefficient of variation of ISIs (SD/mean of ISI) were calculated for both spontaneous firing and sensory stimulation. For visualization purposes, we generated ISI distribution plots with the same logarithmically increasing bin range for all neurones. This bin range was delimited by the shortest and the longest ISI of all the recordings. Because the widely used parameter, the coefficient of variation, was reported as an underestimate of firing variability in some cases (Ditlevsen & Lansky, 2011), we calculated the Shannon-entropy of ISI distribution as well (Huang *et al.* 2014). For calculation of the Shannon-entropy of ISI distribution (absolute value of summed products of ISI distribution probabilities along all non-zero bins and their respective second base logarithm), we used the Freedman–Diaconis rule to assess the optimal bin width individually for each neurone (spontaneous firing and sensory stimulation were also separated). The Freedman–Diaconis rule is an algorithm for optimal bin size estimation of data with heavy-tailed distribution (Freedman & Diaconis, 1981). If there was no spiking during a condition, the coefficient of variation and Shannon-entropy of ISI distribution resulted in a zero value.

Rhythmic firing

The firing rhythmicity was evaluated by autocorrelograms of action potentials (spontaneous and sensory stimulated conditions were separated). Event probability was calculated with ± 2 s lag around spike peaks in 50 ms time bins. In cases where rhythmic modulation was detected, the modulation frequency was calculated from the interval between peaks of autocorrelogram side lobes (not counting the central lobe).

State-dependent firing

Continuous wavelet transform of the hippocampal LFP was used to determine the hippocampal state based on the frequency of oscillation. To generate the continuous wavelet transform, the LFP raw signal was down-sampled to 400 Hz, 50 Hz noise was filtered out (2048-order band stop finite impulse response filter with 49–51 Hz cut-off designed by MATLAB built-in 'fir1' function), and then the normalized signal (the mean was subtracted and then divided by the SD) was decomposed by a Morlet kernel function with exponential scaling (Torrence & Compo, 1998). The wavelet power spectrum (i.e. the squared absolute value of the wavelet transform coefficient) was divided by the scale vector for bias rectification (Liu *et al.* 2007). Finally, scales below 0.9 Hz (possibly corresponding to any low-frequency artefacts introduced at the onset or offset of the tail pinch) were cut and not used in further analysis. Theta and non-theta states of the spontaneous, non-stimulated condition were differentiated. Theta was detected when the summed power of the wavelet power spectrum in the band at 2.5–6.0 Hz was higher than in the band below 2.5 Hz; otherwise, the hippocampal state was identified as non-theta. Spikes of MRR cells were counted during the theta and non-theta states (in ± 1.25 ms time windows because of 400 Hz sampling rate) and divided by the duration of the given state to obtain the firing frequency. The theta and non-theta states were differentiated only during spontaneous activity; the sensory stimulation was not included in this analysis. The ISIs during theta vs. non-theta states were separated, although the ISIs overlapping with state transitions were excluded. In addition, the coefficient of variation and the Shannon-entropy of distribution of these ISI groups were calculated.

Phase preference

The frequency of the dominant oscillation was determined as the frequency with highest spectral power in non-bias-rectified wavelet transform. The instantaneous phase values coinciding with spikes were extracted from wavelet coefficients. Events occurring during theta (dominant frequency of LFP: 2.5–6.0 Hz) and non-theta

(slow; dominant frequency of LFP: 0.9–2.5 Hz) oscillations were segregated. The phase values according to theta and non-theta groups were also merged. Spontaneous and stimulated conditions were also separated. The uniformity of spike-coupled instantaneous phase distribution (i. e. phase preference) was tested by Watson's test and, in cases where the distribution was found to deviate from uniformity, the mean phase and mean vector length were determined. To generate phase histograms, the circle was divided into 20° bins. Neurones must have had at least 50 spikes during a given condition (spontaneous or stimulated) and 40 spikes during spontaneous theta and non-theta oscillations to be included in the analysis.

Statistical analysis

Individual values and medians are presented. In some cases, medians and interquartile range are plotted. Group differences were tested by Kruskal–Wallis ANOVA and the two-sided Wilcoxon rank sum test. Divergence between theta and non-theta, as well as between spontaneous and stimulated conditions, was assessed using a sign test. In the case of maximal dendritic diameter analysis, data are only presented in the text.

Results

Spontaneous activity of the MRR neurones was juxtacellularly recorded simultaneously with LFP in the hippocampus, the major limbic target, and occasionally in the prefrontal cortex, the main cortical input of the MRR in urethane-anaesthetized male Wistar rats. Tail pinch as sensory stimulation was applied for 30 s after the spontaneous activity recording.

Unequivocal neurochemical identification (see selection criteria in Methods) was possible in 23 neurones out of 60 recovered MRR cells, which resulted in seven VGluT3+/5-HT–, five VGluT3+/5-HT+, four VGluT3–/5-HT+ and seven VGluT3–/5-HT– neurones being included in the present study (Fig. 1A). Two out of the nine 5-HT+ neurones were found in transition zones outside the MRR (Fig. 1B), although these cells were no different in any respect from MRR 5-HT+ neurones, and so all the further analyses contain the data from these cells. The dendritic arborization of 15 neurones was three-dimensionally reconstructed (Fig. 1C): the dendritic tree of VGluT3+/5-HT– neurones span a larger distance as a result of long, relatively branchless dendrites (group median diameter of dendritic arbor: 752.9 μm , interquartile range: 594.9–859.9 μm) compared to the two 5-HT+ (VGluT3+ and VGluT3–, group medians: 536.2 and 510.1 μm , interquartile ranges: 488.0–713.8 μm and 325.5–694.6 μm , respectively)

and the VGluT3–/5-HT– (group median: 522.1 μm , interquartile range: 272.6–841.5 μm) populations (number of reconstructed cells: VGluT3+/5-HT–, $n = 5$; VGluT3+/5-HT+, $n = 4$; VGluT3–/5-HT+, $n = 2$; VGluT3–/5-HT–, $n = 4$). However, based on these data, there was no significant morphological difference between the MRR subpopulations (Kruskal–Wallis ANOVA: $P = 0.6481$). Comparison of the action potential half-width from both spontaneous and stimulated conditions revealed that the 5-HT– population had narrower spikes (group median of VGluT3+/5-HT–: 223.5 μs and VGluT3–/5-HT–: 257.1 μs) compared to their 5-HT+ counterparts (group median of VGluT3–/5-HT+: 319.9 μs and VGluT3+/5-HT+: 349.3 μs) (Fig. 1D and E).

Firing rate and firing variability during spontaneous activity

Spontaneous recording segments were divided into non-theta and theta epochs, which enabled the analysis of state-dependent activity (Fig. 2A and B). VGluT3+/5-HT– cells fired significantly faster than VGluT3–/5-HT+ cells (Fig. 2C) during both non-theta (group median firing rate: 3.78 and 0.82 Hz, respectively) and theta states (group median firing rate: 4.48 and 0.58 Hz, respectively). VGluT3+/5-HT+ neurones not diverging consequentially from the previous populations, represented a transition subgroup between them (group median firing rate during non-theta: 1.43 Hz and during theta: 1.95 Hz) (Fig. 2C). VGluT3–/5-HT– neurones (at group level) fired fast (group median firing rate during non-theta: 6.23 Hz and during theta: 7.00 Hz) similar to VGluT3+ neurones (Fig. 2C). Spontaneous transition from non-theta to theta was accompanied by the activation of VGluT3+/5-HT– and VGluT3–/5-HT– neurones (Fig. 2A, C and D). By contrast, the firing rate of VGluT3–/5-HT+ neurones was lower during theta, setting them apart from even VGluT3+/5-HT+ neurones that did not show a group-level state-preference (Fig. 2B–D). Thus, the firing rate ratio between non-theta and theta epochs revealed a significant activation of VGluT3+/5-HT– and VGluT3–/5-HT– during theta. An opposite direction of change was found in the case of VGluT3–/5-HT+ neurones, whereas both facilitation and suppression was detected in the VGluT3+/5-HT+ population (Fig. 2D). The firing variability of VGluT3+/5-HT– and VGluT3–/5-HT+ neurones during non-theta state was different, as denoted by Shannon-entropy of ISI distribution, although, during theta, there was no significant variability-difference across neurochemical groups (Fig. 2E). The coefficient of variation of ISI showed no consequent distinction either during non-theta or theta states (Fig. 2F).

According to recent studies, rhythmic firing was reported in a subgroup of both 5-HT+ and 5-HT- neurones (Allers & Sharp, 2003; Kocsis *et al.* 2006). Therefore, we assessed the rhythmic modulation of our sample of identified neurones. Based on the analysis of auto-correlograms, a rhythmic component in the spike train of only one VGluT3+/5-HT- and one VGluT3-/5-HT+ neurone was detected. The former reflected the low frequency (1.33 Hz), periodic fluctuation of spike density, whereas the latter corresponded to regular single spiking (Fig. 3).

Effect of sensory stimulation

The activity of MRR neurones was affected in a substantially divergent manner by sensory stimulation (Fig. 4A and B). The firing rate of VGluT3+ cells (both 5-HT+ and 5-HT-) changed permanently, which was manifested as an elevation in the majority (eight out of 11) or cessation of firing in case of one VGluT3+ cell (Fig. 4C and D). By contrast, most of the VGluT3-/5-HT+ neurones only transiently changed their firing at stimulus onset (three increased and one stopped spiking) (Fig. 4C and E).

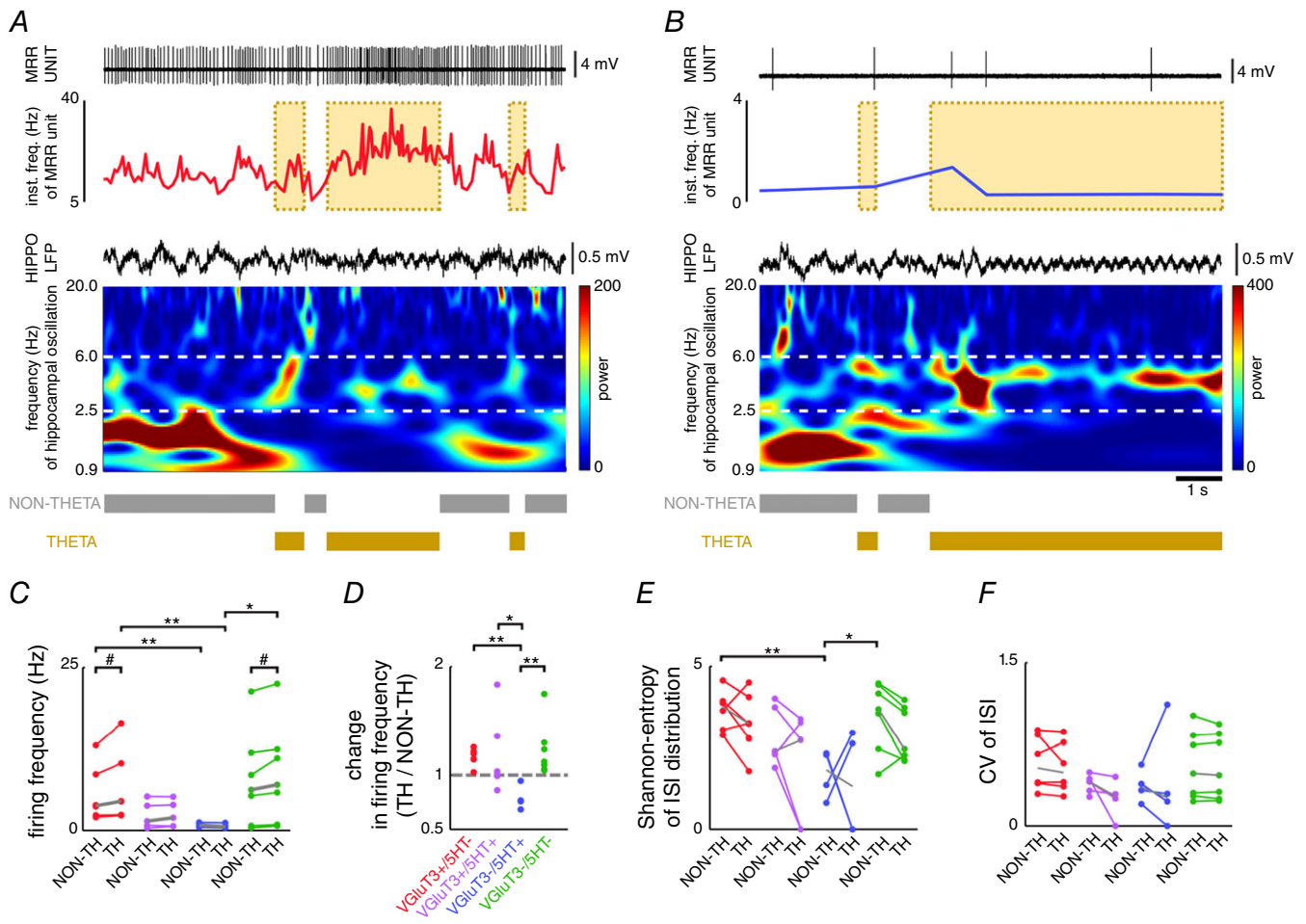


Figure 2. State-dependent firing of MRR neurones
Firing of a VGluT3+/5-HT- (A) and a VGluT3-/5-HT+ (B) neurone in relation to hippocampal theta and non-theta states. Upper: raw unit recording (high-pass filtered at 100 Hz) and instantaneous firing frequency. Bottom: simultaneous wide band (0.3–5000 Hz) hippocampal LFP, spectral power of wavelet decomposition of LFP and definition of theta and non-theta states. Note the elevated baseline activity of the VGluT3-positive neurone marked by the yellow background area during a hippocampal theta episode. C, firing frequency during non-theta and theta states. Group medians are plotted in grey. Kruskal–Wallis ANOVA: non-theta: $P = 0.0769$; theta: $P = 0.0168$. Two-sided Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Sign test: # $P < 0.05$. D, ratio of theta vs. non-theta firing frequency. Kruskal–Wallis ANOVA: $P = 0.0264$. Two-sided Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. E, Shannon-entropy of ISI distribution. Group medians are plotted in grey. Kruskal–Wallis ANOVA: non-theta: $P = 0.0365$; theta: $P = 0.2603$. Two-sided Wilcoxon rank sum test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. F, coefficient of variation of ISI. Group medians are plotted in grey. Kruskal–Wallis ANOVA: non-theta: $P = 0.5563$; theta: $P = 0.3216$.

Notably, VGluT3+/5-HT+ cells responded by both transient, short lasting (five out of five) and sustained (four out of five) acceleration. VGluT3-/5-HT- neurones did not change their firing rate in response to sensory stimulation.

Comparing the ISI distributions during spontaneous (without separation of non-theta and theta) and stimulation-evoked activity uncovered only subtle alteration of shape, indicating the lack of a firing pattern switch (Fig. 5A and B). Although the VGluT3+/5-HT- population fired faster than the VGluT3-/5-HT+ cells even during stimulation (Fig. 5C), as in the spontaneous condition (both non-theta and theta epochs) (Fig. 2C), stimulation altered the activity of individual neurones in significantly divergent directions compared to the spontaneous non-theta to theta transition (Fig. 2D vs. Fig. 5D). Importantly, during stimulus delivery, ISI variability was reduced relative to pre-stimulation periods throughout all neurochemical subgroups, as reflected by both the narrowing of ISI distributions (Fig. 5B) and the drop of entropy (Fig. 5E and F). Rhythmic modulation of firing was not detectable during sensory stimulation in any cells.

Phase coupling to forebrain oscillations

The temporal relationship between the firing of MRR neurones and the phase of hippocampal and prefrontal oscillations was analysed. 5-HT- (both VGluT3+ and VGluT3-) cells were weakly phase-coupled to hippocampal and/or prefrontal slow oscillation, which disappeared during sensory stimulation (Fig. 6A-C). Although 5-HT- neurones were characteristically modulated by forebrain slow oscillation, the mean vector length corresponding to the strength of phase coupling was low in most cases (Fig. 6D). Phase

coupling to hippocampal theta was observed for one VGluT3+/5-HT+ neurone (Fig. 6D). VGluT3-/5-HT+ cells showed weak coupling to hippocampal or prefrontal activity.

Discussion

In the present study, we provide the first description of the *in vivo*, brain state-dependent firing properties of the previously uncharacterized glutamatergic neurone populations in the MRR. We demonstrate that VGluT3+/5-HT- neurones fundamentally diverged from VGluT3+/5-HT+ cells in several aspects. VGluT3+/5-HT- neurones, resembling VGluT3-/5-HT- cells, had narrow action potentials and fired faster and more variably compared to their VGluT3+/5-HT+ counterparts, whereas the latter population emitted broad action potentials at lower frequency in a regular fashion and, as such, overlapped with the VGluT3-/5-HT+ subgroup. The activity of 5-HT- populations was characteristically higher during hippocampal theta compared to non-theta state, as opposed to the lack of group-level state-preference in the 5-HT-containing subgroups. In the case of some VGluT3+/5-HT- and VGluT3+/5-HT+ cells, weak modulation by forebrain oscillations was also detected. The response to sensory stimulation differentiated all four neurochemical categories: VGluT3+/5-HT- neurones exhibited elevated activity throughout stimulus delivery, whereas VGluT3-/5-HT+ cells were activated only at stimulus onset. VGluT3+/5-HT+ neurones were characterized by the combined response of a transient acceleration and subsequent long-lasting increase of activity. VGluT3-/5-HT- cells were not significantly affected by the sensory stimulus.

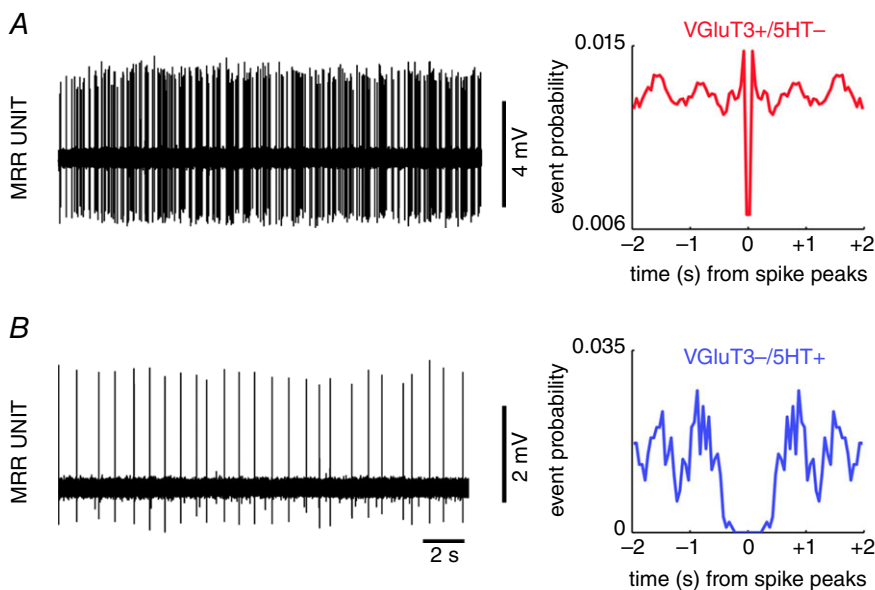


Figure 3. Two MRR neurones exhibited spontaneous rhythmic firing
Selected recording trace (left) and autocorrelogram (right) of VGluT3+/5-HT- (A) and VGluT3-/5-HT+ (B) neurones.

Technical considerations

The currently available, MRR-related recombinase expressing mouse strains, including VGluT3-Cre (Tatti *et al.* 2014), ePet-Cre (Scott *et al.* 2005), Pet1₂₁₀-Cre (Pelosi *et al.* 2014), TpH2-Cre (Weber *et al.* 2009, 2011) or SERT-Cre (Zhuang *et al.* 2005) animals, cannot unequivocally differentiate the most prominent MRR subpopulations. VGluT3 is also expressed by 5-HT+ cells, but, as demonstrated in the present study, they are fundamentally different from the VGluT3+/5-HT- group, rendering presently known serotonergic and glutamatergic markers unusable for tagging only the 5-HT- glutamatergic population. Therefore, the only feasible technique is labelling after single-cell recording and *post hoc* neurochemical identification (Pinault 1996). This constraint led us to deploy juxtacellular recording under urethane-anaesthesia, which reportedly maintains

the brain close to natural sleep conditions (Clement *et al.* 2008; Pagliardini *et al.* 2013) and provides a mechanically stable preparation, and, as such, enables both the lengthening of recordings and an increase in the yield of labelling attempts. Moreover, the spontaneous alternation of brain states characteristic to urethane-anaesthesia was pivotal for investigating the state-dependent activity of MRR neurones.

Questions about the identity of the identified populations

First, our findings demonstrate that, solely on the basis of electrophysiological criteria, the major neurone classes in the MRR cannot be separated. Even the well-established pharmacological methods relying on the inhibitory effect of 5-HT receptor type 1A (5-HT1AR) agonists on

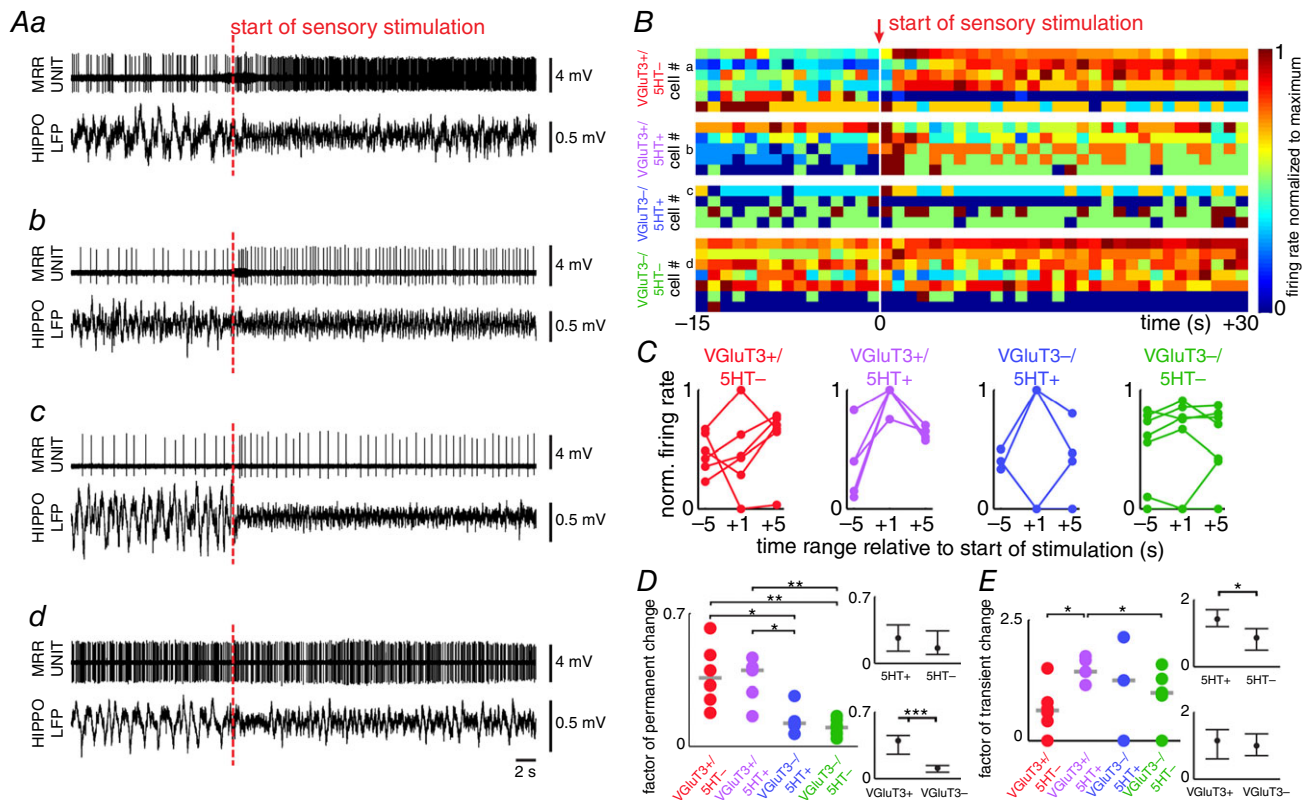


Figure 4. Divergent effect of sensory stimulation on the activity of MRR neurones
Raw recordings of VGluT3+/5-HT- (Aa), VGluT3+/5-HT+ (Ab), VGluT3-/5-HT+ (Ac) and VGluT3-/5-HT- (Ad) neurones (red dashed line: start of 30 s long tail pinch). Upper: high-pass filtered (at 100 Hz) MRR unit recording. Bottom: wide band (0.3–5000 Hz) hippocampal LFP. B, response of all identified neurones to sensory stimulation (white line: start of 30 s long tail pinch). Examples presented in (A) are indicated on the left. Firing rate was calculated in 1 s time bins and normalized to the maximum. Cells in each neurochemical category were ordered by the highest firing rate within the extracted recording segment. C, transient firing rate change after sensory stimulation. Normalized firing in given time ranges were condensed from the data shown in (B). D and E, quantification of permanent (D) and transient (E) firing rate changes. Kruskal–Wallis ANOVA: transient changes: 0.1065; permanent changes: 0.0028. Wilcoxon rank sum test: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. Right: data are grouped on the basis of 5-HT (upper) and VGluT3 (bottom) content (median + interquartile range).

serotonergic activity (Viana Di Prisco *et al.* 2002) are insufficient because of the overlap between the VGluT3+ and 5-HT+ subgroups (as reported in the present study), the lack of 5-HT1AR in the case of some 5-HT+ raphe neurones (Kiyasova *et al.* 2013) and the indirect disfacilitation of 5-HT- cells by dampened 5-HT levels (Liu *et al.* 2000). A striking observation of the present study is the overlap between VGluT3+/5-HT- and VGluT3-/5-HT-, putative GABAergic fast firing neurones, implying that a significant proportion of rapidly spiking cells reported earlier in blind recording studies (Kocsis &

Vertes, 1996; Viana Di Prisco *et al.* 2002; Wang *et al.* 2015) may have belonged to the VGluT3+/5-HT- subclass.

The intermediate phenotype of VGluT3+/5-HT+ neurones raises two radically different possibilities. First, the 'pure' glutamatergic and serotonergic populations correspond to the two extrema of a spectrum with the VGluT3+/5-HT+ cells as a transitional form inbetween. As documented for several other neurone types (Baudry *et al.* 2010; Dulcis *et al.* 2013; Dehorter *et al.* 2015), these populations may transform into each other by yet unknown mechanisms. The negative

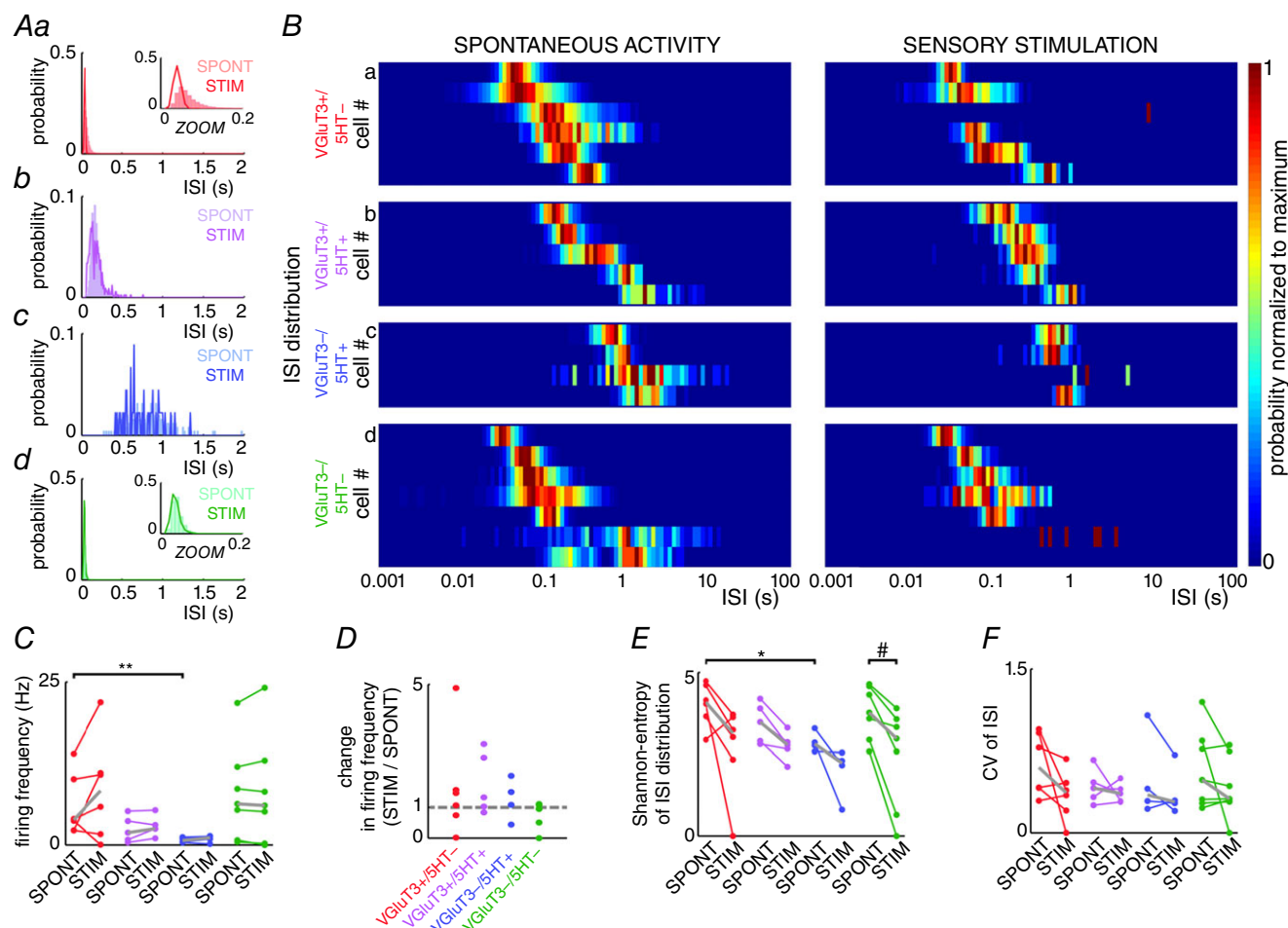


Figure 5. Firing frequency and ISI distribution of MRR neurones during spontaneous activity and sensory stimulation

ISI distribution of example neurones: VGluT3+/5-HT- (Aa), VGluT3+/5-HT+ (Ab), VGluT3-/5-HT+ (Ac) and VGluT3-/5-HT- (Ad) neurones. Data from spontaneous activity and sensory stimulated conditions are separated. B, ISI distribution of all identified neurones (excluding the single VGluT3+/5-HT- neurone without sensory stimulation), normalized to the maximum of the given neurone. Examples shown in (A) are indicated on the left side. Cells are ordered by the peaks closest to the shortest ISI. Note that the x-axis has logarithmic scaling. C, firing frequency during spontaneous and stimulated conditions. Group medians are plotted in grey. Kruskal–Wallis ANOVA: spontaneous activity: $P = 0.0424$; stimulation: $P = 0.1992$. Two-sided Wilcoxon rank sum test: $**P < 0.01$. D, ratio of stimulation evoked vs. spontaneous firing frequency. Kruskal–Wallis ANOVA: $P = 0.3191$. E, Shannon-entropy of ISI distribution. Group medians are plotted in grey. Kruskal–Wallis ANOVA: spontaneous activity: $P = 0.0605$; stimulation: $P = 0.3679$. Two-sided Wilcoxon rank sum test: $*P < 0.05$. Sign test: $\#P < 0.05$. F, coefficient of variation of ISI. Group medians are plotted in grey. Kruskal–Wallis ANOVA: spontaneous activity: $P = 0.5789$; stimulation: $P = 0.8647$.

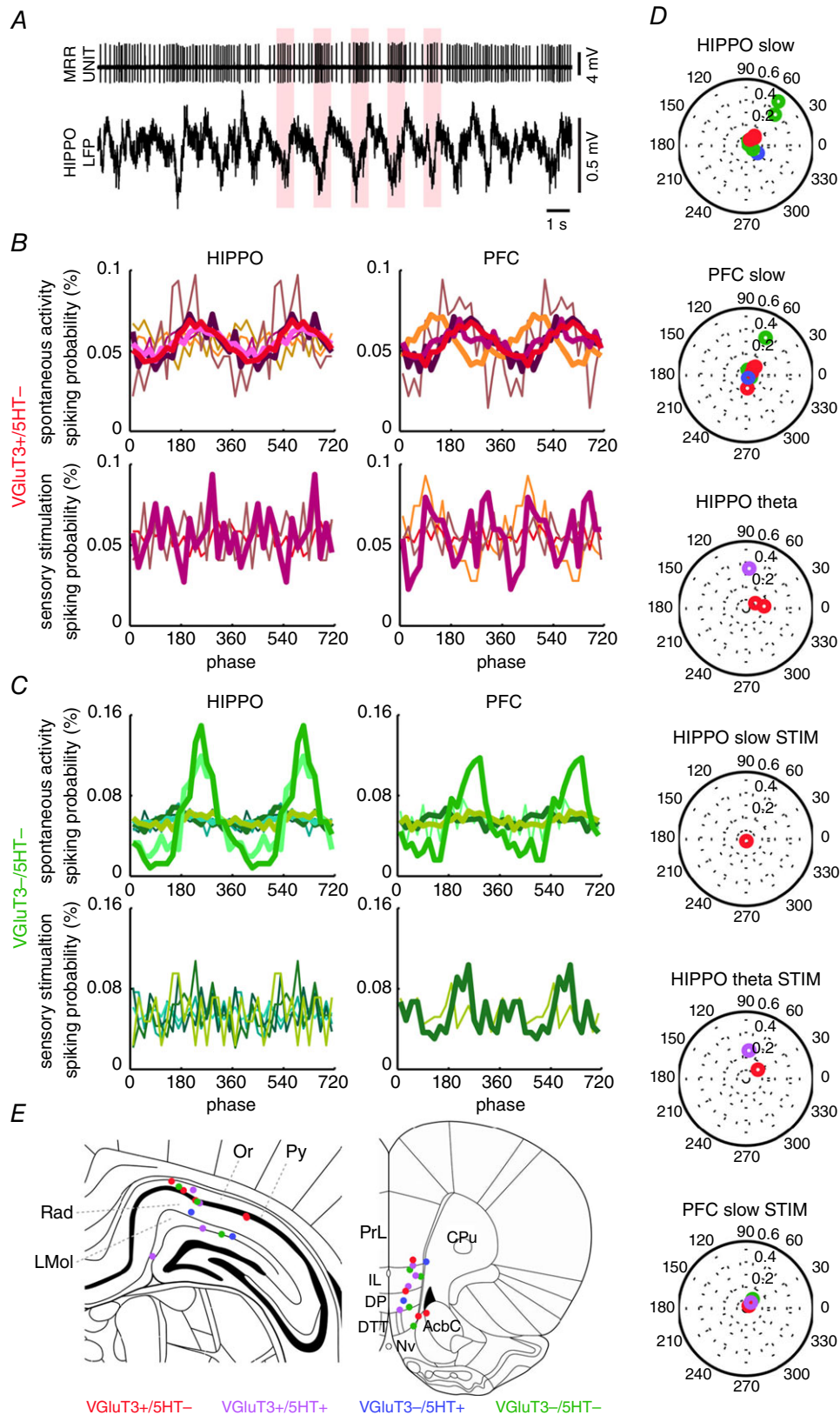


Figure 6. Phase-coupling of MRR neurones to forebrain oscillations
 A, raw recording of a VGlut3+/5HT- neurone coupled to troughs of hippocampal slow oscillation. Upper: high-pass filtered (at 100 Hz) MRR unit recording. Bottom: wide band (0.3–5000 Hz) hippocampal LFP. Slow

correlation of VGluT3 and tryptophan hydroxylase (TpH2) expression (Okaty *et al.* 2015) may also support this possibility: all non-GABAergic raphe neurones probably express certain (but, in several cases, immunohistochemically undetectable) amounts of VGluT3 and TpH2. Alternatively, VGluT3+/5-HT- MRR neurones may form a 'truly' discrete class, without the possibility of conversion into 5-HT+ cells, which is supported by their substantially different firing behaviour. Nevertheless, either of these alternatives will have a profound impact on our understanding of the operation of the serotonergic system.

Basic electrophysiological characteristics of MRR neurones: spike width, frequency and variability

Spike width, firing frequency and ISI variability have been used as basic electrophysiological characteristics to separate various neurone types, including 5-HT+ and 5-HT- cells. These parameters clearly segregated the VGluT3+ population in correlation with 5-HT content. The 5-HT- subgroups fired narrow action potentials at high frequency in a more irregular manner compared to the slow, regular firing of broad spikes by the 5-HT+ subgroup. In our sample, the VGluT3-/5-HT- population overlapped with the former, whereas purely 5-HT+ cells resembled the latter subgroup. Notably, we have not encountered fast spiking, rhythmic bursting 5-HT+ neurones (Kocsis *et al.* 2006), possibly as a result of the different areas sampled in the present study. However, the electrophysiological phenotype of 5-HT+ neurones reported in the present study is in agreement with the findings of previous studies (Mosko & Jacobs, 1974; Trulson & Jacobs, 1979; Urbain *et al.* 2006). The high firing rate of 5-HT- cells may be the result of their more depolarized membrane potential and smaller activation gap, rendering this population highly responsive even to a small fluctuation of inputs. By contrast, 5-HT+ neurones may be relatively resistant to changes of input patterns because of a hyperpolarized membrane potential,

higher firing threshold (Beck *et al.* 2004) and various conductances favouring stereotypical discharge patterns (Tuckwell & Penington, 2014).

A key firing pattern feature is the rhythmic modulation characterizing neurone populations that are involved in the generation of oscillatory population patterns. Besides the well-documented, regular discharge of 5-HT+ neurones, rhythmically modulated firing was observed only in the case of one 5-HT- neurone. The small depth and low stability of modulation implies non-cell-autonomous processes possibly generated by a combination of top-down cortical influences and a fluctuating local activity. Indeed, low frequency LFP oscillations and the slow rhythmic modulation of discharge have been documented in the midbrain raphe nuclei (Hajos *et al.* 2007).

Preference of forebrain activity states

All 5-HT- neurones (both VGluT3+ and VGluT3-) fired faster during spontaneous theta compared to the non-theta state. The MRR receives many afferents from brain areas involved in the regulation of theta activity; for example, cholinergic inputs from the pontomesencephalic tegmentum (Cornwall *et al.* 1990), GABAergic projections from theta-related brainstem nuclei (e.g. nucleus incertus; Ma & Gundlach, 2015) or from the hypothalamus (Gervasoni *et al.* 2000), excitatory input from the lateral habenula (Wang & Aghajanian, 1977) and afferents from the medial septum (Fuhrmann *et al.* 2015). Any or the combination of these can feed theta-coupled drive to the MRR. Additionally, cortical afferents from prefrontal areas are well known modulators of the midbrain raphe circuitry and may transmit fluctuating excitation (Hajos *et al.* 1998). Prefrontal or habenular stimulation was demonstrated to excite fast firing cells (previously assumed to be GABAergic) and inhibit the majority of tested 5-HT+ neurones (Varga *et al.* 2001, 2003). In light of our results, at least a portion of the facilitated, putative GABAergic neurones would have belonged to the purely VGluT3+

waves with coupled spikes are highlighted. *B* and *C*, hippocampal (left) and prefrontal (right) slow oscillation phase preference. VGluT3+/5-HT- (*B*) and VGluT3-/5-HT- cells (*C*) were typically locked to hippocampal and/or prefrontal slow (0.9–2.5 Hz) oscillations. All cells are plotted in different colours, enabling the comparison of hippocampal and prefrontal preferences. Thick lines: significant difference from uniform distribution ($P < 0.05$, Watson's test). *D*, polar histograms show the mean vector length (radius, bold numbers) at the preferred phase (angle in degrees) during conditions when at least one neurone had a significant phase preference to slow or theta band oscillations. Colour codes neurochemical content. *E*, LFP recording positions in hippocampus (left: bregma -4.56 mm) and prefrontal cortex (right: bregma + 2.76 mm). Colour codes the neurochemical content of the MRR neurone recorded in the given experiment. Note that, in the case of some experiments (hippocampal recording site: $n = 2$ VGluT3+/5-HT-, $n = 1$ VGluT3+/5-HT+, $n = 1$ VGluT3-/5-HT+, $n = 4$ VGluT3-/5-HT-; prefrontal recording site: $n = 3$ VGluT3+/5-HT-, $n = 1$ VGluT3+/5-HT+, $n = 1$ VGluT3-/5-HT+, $n = 3$ VGluT3-/5-HT-), the recording position was not recovered. Only the structures close to recording area are indicated based on Paxinos & Watson, 2005). Hippocampus: LMol, lacunosum moleculare layer of the hippocampus; Or, oriens layer of the hippocampus; Py, pyramidal cell layer of the hippocampus; Rad, radiatum layer of the hippocampus. Prefrontal cortex: AcbC, accumbens nucleus, core; CPu, caudate putamen (striatum); DP, dorsal peduncular cortex; DTT, dorsal tenia tecta; IL, infralimbic cortex; Nv, navicular nucleus of the basal forebrain; PrL, prelimbic cortex.

subgroup identified in the present study. It can also explain some excitatory effect on 5-HT+ neurones of prefrontal cortex stimulation: the latency and jitter conforms to either a slow-conducting, low precision direct pathway or a disynaptic connection, in which prefrontal cortex input excites 5-HT+ cells via VGluT3+ neurones. By contrast to the latter population, 5-HT+ neurones (both VGluT3+ and VGluT3-) proved to be heterogeneous in terms of state-preference. Some of them fired at higher frequency during non-theta, slow oscillation-dominated states, whereas others, such as 5-HT- cells, emitted more action potentials when the hippocampus was governed by theta activity. The observation of heterogeneous state-preference by 5-HT+ populations recapitulates several earlier reports about variable relationship of slow firing, putative 5-HT-containing neurones to stages of the sleep-wake cycle or to activated/deactivated states of urethane-anaesthesia (Viana Di Prisco *et al.* 2002; Urbain *et al.* 2006). Taken together, a higher impulse flow in 5-HT-MRR pathways is associated with theta states, as opposed to a more uniform, state independent output of the 5-HT+ populations.

Effect of sensory stimulation

As the most important distinguishing feature, the four neurochemically separated MRR populations responded in a significantly divergent manner to tail pinch, a noxious sensory stimulus known to elicit an aroused brain state in urethane-anaesthetized animals (Kramis *et al.* 1975). The effect of sensory stimulation on VGluT3+/5-HT- neurones recapitulated the change coupled to the non-theta to theta transition (i.e. persistent increase of activity for the whole duration of stimulation, except in case of one cell that stopped firing during tail pinch but was activated during spontaneous theta). Activating inputs can originate from several areas known to be activated by sensory inputs, such as pontomesencephalic cholinergic cell groups (Boucetta *et al.* 2014) or the medial septum (Swanson & Cowan, 1979), although VGluT3-specific tracing is necessary to proceed beyond speculation. By contrast to the sustained response of VGluT3+/5-HT- cells, a transient, short lasting acceleration was observed in the case of the 5-HT+ populations (both VGluT3+ and VGluT3-). Sensory stimulus-locked spiking of putative 5-HT+ mid-brain raphe neurones has recently been reported in freely-moving mice exposed to a startle reflex-inducing auditory stimulus (Ranade & Mainen, 2009), in agreement with earlier studies about sensory-evoked responses in the raphe (Levine & Jacobs, 1992). Similar to the purely 5-HT+ subgroup, VGluT3+/5-HT+ neurones emitted spikes at stimulus onset but, resembling VGluT3+/5-HT- cells, their activity remained elevated until termination of stimulation. This double phenotype may point to shared inputs with both pure populations

(i.e. with VGluT3+/5-HT- and VGluT3-/5-HT+ cells). Alternatively, both of these populations may directly affect the dual identity cells. Interestingly, the VGluT3-/5-HT-, putative GABAergic subgroup was the least affected by the delivery of a sensory stimulus. Our observations also raise the intriguing possibility that the fast spiking, theta coupled and sensory responsive neurones in previous studies may have belonged either to the 'atypical' 5-HT+ or to the VGluT3+ subgroups, instead of being GABAergic.

Modulation by forebrain oscillations

Phase coupling to forebrain oscillations did not differentiate the identified populations. Weak phase coupling either to prefrontal/hippocampal slow or hippocampal theta oscillation was detected in every neurochemical subgroup. A high prevalence of weak phase synchrony irrespective of neurochemical identity suggests that the MRR network may be constantly influenced by a complex and dynamically interfering mosaic of oscillating inputs (e.g. from prefrontal cortex, habenular complex or medial septum). However, our results also suggest that, instead of pacing any of the forebrain rhythms, the neurones that we recorded modulated them.

Functional implications

Our data highlight the various facets of modulation implemented by MRR VGluT3+ neurones. A high firing rate and irregular spiking with occasional phase coupling to oscillations of VGluT3+/5-HT- neurones are optimal for reliably conveying minute changes of input patterns, whereas a robust response to sensory stimuli is ideal for the reconfiguration of networks via highly target specific, temporally precise synaptic connections (Varga *et al.* 2009). Additionally, through extensive local axon arbours (Amilhon *et al.* 2010, Calizo *et al.* 2011), VGluT3+ neurones may provide excitatory drive to 5-HT+ cells, as suggested by Soiza-Reilly & Commons (2011). Notably, MRR 5-HT- neurones were shown to be unresponsive to 5-HT1AR-activation; thus, they can be decoupled from the activity of the serotonergic network (Beck *et al.* 2004). As such, the two 5-HT- fast spiker populations (i.e. the glutamatergic and the GABAergic) may implement complementary feed-forward regulation of the ascending 5-HT+ system as a function of their extra-raphe afferents. The shift of this excitation-inhibition balance would have a profound effect on the serotonergic modulation of forebrain operation. By contrast, the state-dependent, stereotypical firing pattern of 5-HT+ cells (both VGluT3+ and VGluT3-) may serve the regulation of vigilance states, which matches the classic view of the function of the serotonergic system (Jacobs & Azmitia, 1992). The stimulus-locked activity of these cells, as suggested by

recent studies, would signal the detection of salient stimuli (Ranade & Mainen *et al.* 2009), as well as switch the activity of target networks (Jackson *et al.* 2008). Additionally, the heightened discharge rate of VGluT3+/5-HT+ cells would contribute to the stabilization of the post-stimulation state.

In summary, the results of the present study have unravelled how the major MRR neurone classes share the regulation of spontaneously alternating or sensory-evoked forebrain activity states. Any perturbation that alters the division of labour among the various components of the MRR network may have a disruptive impact on the operation of forebrain circuitry. We also raise the striking possibility that several pathological states previously connected to serotonergic dysfunction may actually be caused by impairment of the ascending glutamatergic system of the raphe.

References

- Allers KA & Sharp T (2003). Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods *in vivo*. *Neuroscience* **122**, 193–204.
- Amilhon B, Lepicard E, Renoir T, Mongeau R, Popa D, Poirel O, Miot S, Gras C, Gardier AM, Gallego J, Hamon M, Lanfumey L, Gasnier B, Giros B & Mestikawy El S (2010). VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J Neurosci* **30**, 2198–2210.
- Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay JM & Kellermann O (2010). MiR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* **329**, 1537–1541.
- Beck SG, Pan Y-Z, Akanwa AC & Kirby LG (2004). Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* **91**, 994–1005.
- Boucetta S, Cissé Y, Mainville L, Morales M & Jones BE (2014). Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci* **34**, 4708–4727.
- Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan Y-Z, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA & Beck SG (2011). Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* **61**, 524–543.
- Clement EA, Richard A, Thwaites M, Ailon J, Peters S & Dickson CT (2008). Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia. *PLoS ONE* **3**, e2004.
- Cornwall J, Cooper JD & Phillipson OT (1990). Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* **25**, 271–284.
- Dehorter N, Ciceri G, Bartolini G, Lim L, del Pino I & Marín O (2015). Tuning of fast-spiking interneuron properties by an activity-dependent transcriptional switch. *Science* **349**, 1216–1220.
- Ditlevsen S & Lansky P (2011). Firing variability is higher than deduced from the empirical coefficient of variation. *Neural Comput* **23**, 1944–1966.
- Dulcis D, Jamshidi P, Leutgeb S & Spitzer NC (2013). Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior. *Science* **340**, 449–453.
- Freedman D & Diaconis P (1981). On the histogram as a density estimator. *Probab Theory Relat Fields* **57**, 453–476.
- Fremeau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA & Edwards RH (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14488–14493.
- Fuhrmann F, Justus D, Sosulina L, Kaneko H, Beutel T, Friedrichs D, Schoch S, Schwarz MK, Fuhrmann M & Remy S (2015). Locomotion, theta oscillations, and the speed-correlated firing of hippocampal neurons are controlled by a medial septal glutamatergic circuit. *Neuron* **86**, 1253–1264.
- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P & Luppi PH (2000). Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* **20**, 4217–4225.
- Hajos M, Allers KA, Jennings K, Sharp T, Charette G, Sık A & Kocsis B (2007). Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods. *Eur J Neurosci* **25**, 119–126.
- Hajos M, Gartside SE, Varga V & Sharp T (2003). *In vivo* inhibition of neuronal activity in the rat ventromedial prefrontal cortex by midbrain-raphe nuclei: role of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* **45**, 72–81.
- Hajos M, Richards CD, Székely AD & Sharp T (1998). An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* **87**, 95–108.
- Hioki H, Nakamura H, Ma Y-F, Konno M, Hayakawa T, Nakamura KC, Fujiyama F & Kaneko T (2010). Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *J Comp Neurol* **518**, 668–686.
- Huang J-J, Yen C-T, Tsao H-W, Tsai M-L & Huang C (2014). Neuronal oscillations in Golgi cells and Purkinje cells are accompanied by decreases in Shannon information entropy. *Cerebellum* **13**, 97–108.
- Jackson J, Bland BH & Antle MC (2009). Nonserotonergic projection neurons in the midbrain raphe nuclei contain the vesicular glutamate transporter VGLUT3. *Synapse* **63**, 31–41.
- Jackson J, Dickson CT & Bland BH (2008). Median raphe stimulation disrupts hippocampal theta via rapid inhibition and state-dependent phase reset of theta-related neural circuitry. *J Neurophysiol* **99**, 3009–3026.
- Jacobs BL & Azmitia EC (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**, 165–229.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ & Beck SG (2003). Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* **116**, 669–683.

- Kiyasova V, Bonnavion P, Scotto-Lomassese S, Fabre V, Sahly I, Tronche F, Deneris E, Gaspar P & Fernandez SP (2013). A subpopulation of serotonergic neurons that do not express the 5-HT_{1A} autoreceptor. *ACS Chem Neurosci* **4**, 89–95.
- Kramis R, Vanderwolf CH & Bland BH (1975). Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane, and pentobarbital. *Exp Neurol* **49**, 58–85.
- Kocsis B, Varga V, Dahan L & Sık A (2006). Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 1059–1064.
- Kocsis B & Vertes RP (1996). Midbrain raphe cell firing and hippocampal theta rhythm in urethane-anaesthetized rats. *Neuroreport* **7**, 2867–2872.
- Levine ES & Jacobs BL (1992). Microiontophoresis and single-unit recordings of serotonergic neurons in the awake cat. *J Chem Neuroanat* **5**, 335–337.
- Liu R, Jolas T & Aghajanian G (2000). Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* **873**, 34–45.
- Liu Y, San Liang X & Weisberg RH (2007). Rectification of the bias in the wavelet power spectrum. *J Atmos Oceanic Technol* **24**, 2093–2102.
- Ma S & Gundlach AL (2015). Ascending control of arousal and motivation: role of nucleus incertus and its peptide neuromodulators in behavioural responses to stress. *J Neuroendocrinol* **27**, 457–467.
- Monti JM & Jantos H (2008). The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. *Prog Brain Res* **172**, 625–646.
- Mosko SS & Jacobs BL (1974). Midbrain raphe neurons: spontaneous activity and response to light. *Physiol Behav* **13**, 589–593.
- Noh J, Seal RP, Garver JA, Edwards RH & Kandler K (2010). Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat Neurosci* **13**, 232–238.
- Okaty BW, Freret ME, Rood BD, Brust RD, Hennessy ML, deBairos D, Kim JC, Cook MN & Dymecki SM (2015). Multi-scale molecular deconstruction of the serotonin neuron system. *Neuron* **88**, 774–791.
- Pagliardini S, Funk GD & Dickson CT (2013). Breathing and brain state: urethane anesthesia as a model for natural sleep. *Respir Physiol Neurobiol* **188**, 324–332.
- Paxinos G & Watson C (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 5th edn. CD-Rom. Academic Press, San Diego, CA.
- Pelosi B, Migliarini S, Pacini G, Pratelli M & Pasqualetti M (2014). Generation of Pet1210-Cre transgenic mouse line reveals non-serotonergic expression domains of Pet1 both in CNS and periphery. *PLoS ONE* **9**, e104318.
- Pinault D (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Meth* **65**, 113–136.
- Qi J, Zhang S, Wang H-L, Wang H, de Jesus Aceves Buendia J, Hoffman AF, Lupica CR, Seal RP & Morales M (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat Commun* **5**, 5390.
- Ranade SP & Mainen ZF (2009). Transient firing of dorsal raphe neurons encodes diverse and specific sensory, motor, and reward events. *J Neurophysiol* **102**, 3026–3037.
- Sakai K & Crochet S (2001). Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake–sleep states. *Neuroscience* **104**, 1141–1155.
- Schäfer MK-H, Varoqui H, Defamie N, Weihe E & Erickson JD (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* **277**, 50734–50748.
- Scott MM, Wylie CJ, Lerch JK, Murphy R, Lobur K, Herlitze S, Jiang W, Conlon RA, Strowbridge BW & Deneris ES (2005). A genetic approach to access serotonin neurons for in vivo and in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 16472–16477.
- Soiza-Reilly M & Commons KG (2011). Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* **41**, 247–255.
- Swanson LW & Cowan WM (1979). The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* **186**, 621–655.
- Szönyi A, Mayer MI, Cserép C, Takács VT, Watanabe M, Freund TF & Nyiri G (2014). The ascending median raphe projections are mainly glutamatergic in the mouse forebrain. *Brain Struct Funct* **221**, 735–751.
- Tatti R, Bhaukaurally K, Gschwend O, Seal RP, Edwards RH, Rodriguez I & Carleton A (2014). A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun* **5**, 3791.
- Torrence C, Compo GP (1998). A practical guide to wavelet analysis. *Bull Am Meteorol Soc* **79**, 61–78.
- Trulsson ME & Jacobs BL (1979). Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* **163**, 135–150.
- Tuckwell HC & Penington NJ (2014). Computational modeling of spike generation in serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Prog Neurobiol* **118**, 59–101.
- Urbain N, Creamer K & Debonnel G (2006). Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep–wake cycle of the rat. *J Physiol* **573**, 679–695.
- Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC & Freund TF (2009). Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* **326**, 449–453.
- Varga V, Kocsis B & Sharp T (2003). Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci* **17**, 280–286.
- Varga V, Székely AD, Csillag A, Sharp T & Hajos M (2001). Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* **106**, 783–792.
- Viana Di Prisco G, Albo Z, Vertes RP & Kocsis B (2002). Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res* **145**, 383–394.

- Wang RY & Aghajanian GK (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science* **197**, 89–91.
- Wang DV, Yau H-J, Broker CJ, Tsou J-H, Bonci A & Ikemoto S (2015). Mesopontine median raphe regulates hippocampal ripple oscillation and memory consolidation. *Nat Neurosci* **18**, 728–735.
- Weber T, Böhm G, Hermann E, Schütz G, Schönig K & Bartsch D (2009). Inducible gene manipulations in serotonergic neurons. *Front Mol Neurosci* **2**, 24.
- Weber T, Schönig K, Tews B & Bartsch D (2011). Inducible gene manipulations in brain serotonergic neurons of transgenic rats. *PLoS ONE* **6**, e28283.
- Zhuang X, Masson J, Gingrich JA, Rayport S & Hen R (2005). Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J Neurosci Meth* **143**, 27–32.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

All of the experimental work and analyses were performed in the Laboratory of Cerebral Cortex Research, Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary. AD helped design the study, performed experiments, analysed data and co-wrote the manuscript. LNL,

TL, CC, ZB and EP performed experiments and helped prepare the manuscript. GN contributed to analysis and interpretation of the data and helped prepare the manuscript. TFF contributed to the interpretation of the data and critically revised the manuscript. VV designed the study, performed experiments, helped in the analysis and co-wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This work was funded by European Research Council ERC-2011-ADG-294313-SERRACO grant to TFF; Kerpel-Fronius Young Investigators' Grant to AD; János Bolyai Research Scholarship (BO/431/12/5) to GN; National Research, Development and Innovation Office (former Hungarian Scientific Research Fund) grant K 109790 to VV; and the National Brain Program of Hungary.

Acknowledgements

We thank Emőke Szépné Simon, Katalin Lengyel and Győző Goda for essential technical assistance, as well as László Barna and the Nikon Microscopy Centre at the Institute of Experimental Medicine, Nikon Austria GmbH and Auro-Science Consulting Ltd for technical support. We also thank Drs György Buzsáki, Márta Jelitai and Balázs Hangya for critically proofreading the manuscript submitted for publication, as well as Balázs Hangya for providing scripts of Watsons' test.