

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola  
Szabályozásbiológia Ph. D. Program

## **A szaglóközpont szerveződésének ultrastruktúrális, funkcionális és molekuláris jellemzői egyes gastropoda fajokban (*Helix pomatia*, *Limax valentianus*)**

*Ph.D. értekezés*

**Battonyai Izabella**

Témavezető:

**Dr. Elekes Károly**

a biológiai tudomány doktora

**PÉCS, 2014**

## TARTALOM

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
1.1. A Gastropoda fajok szaglása .....	5
1.2. A szaglólélebeny (procerebrum) szerveződése .....	8
1.3. Szinapszisok a Gastropoda idegrendszerben.....	11
1.4. A procerebrum ultrastruktúrája és szinaptikus szerveződése.....	11
1.5. Az olfaktórikus folyamatok funkcionális jellemzése .....	12
1.6. Hírvivők a procerebrumban.....	15
1.7. Feszültségfüggő ioncsatornák gerincesekben és gerinctelenekben .....	17
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	20
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	21
3.1. Kísérleti állatok .....	21
3.2. Elektronmikroszkópia.....	21
3.3. Immunhisztokémia .....	22
3.4. Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémia.....	23
3.5. Western blot vizsgálatok .....	24
3.6. Elektrofiziológia .....	25
3.6.1. Patch-clamp vizsgálatok.....	25
3.6.2. Voltage-clamp vizsgálatok .....	26
4. EREDMÉNYEK.....	28
4.1. A globulus sejtréteg ultrastruktúrája és szinaptológiája .....	28
4.1.1. Általános felépítés .....	28
4.1.2. Axo-szomatikus kapcsolatok és szinaptikus konfigurációk .....	31
4.2. Az 5-HTerg innerváció kémiai-neuroanatómiája a szaglólélebenyben.....	34
4.2.1. A <i>Helix</i> procerebrum 5-HT-immunreaktív innervációja .....	34
4.2.2. A <i>Limax</i> procerebrum 5-HTerg innervációja .....	38
4.2.3. Az 5-HT-immunreaktív innerváció ultrastruktúrális jellemzői.....	39
4.3. Feszültségfüggő K <sup>+</sup> -csatornák immunhisztokémiai azonosítása és eloszlása <i>Helix</i> központi idegrendszerében .....	43

4.3.1. K <sub>v</sub> 2.1 immunreaktív elemek eloszlása .....	44
4.3.2. K <sub>v</sub> 3.4 immunreaktív elemek eloszlása .....	46
4.3.3. K <sub>v</sub> 4.3 immunreaktív elemek eloszlása .....	48
4.4. Az ioncsatornák azonosítása Western blot módszerrel .....	54
4.5. K <sup>+</sup> -csatornák elektrofiziológiai jellemzése <i>Helix</i> központi neuronjaiban .....	56
5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA .....	61
5.1. A procerebrum sejtes rétegének szinaptikus szerveződése .....	61
5.2. A procerebrum szerotonerg innervációja .....	63
5.3. Feszültségfüggő K <sup>+</sup> -csatornák sejtszintű eloszlása és funkcionális jellemzői a <i>Helix</i> központi idegrendszerében.....	65
5.4. K <sup>+</sup> -csatornák eloszlásának összehasonlítása más szignalizációs rendszerekkel .....	69
6. ÖSSZEFOGLALÁS .....	72
7. SUMMARY .....	75
8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE .....	78
9.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk.....	78
9.2. A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások, posztterek .....	78
9.3. Egyéb publikációk .....	79
9. IDÉZETT IRODALOM .....	80
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	95

## A SZÖVEGBEN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK

**5-HT:** 5-hidroxitriptamin, szerotonin  
**ABC:** avidin-biotin-komplex  
**4-AP:** 4-aminopyridin  
**B:** ritmusosan tüzelő (bursting) neuron  
**BO:** szaglógumó (bulbus olfactorius)  
**BSA:** borjú szérum albumin (bovine serum albumine),  
**CGC:** cerebrális óriás neuron (cerebral giant cell)  
**CM:** cell mass (sejtes réteg)  
**CT:** kötőszövet (connective tissue)  
**DAB:** 3,3'-diaminobenzidín tetrahidroklorid  
**EPSP:** excitatórikus posztszinaptikus potenciál  
**FITC:** fluoreszcein izotiocianát  
**GA:** glutáraldehid  
**GC:** globulus sejt  
**HP:** holding potenciál  
**HRP:** torma peroxidáz (Horse Radish Peroxidase)  
**IgG:** immunoglobulin G  
**IR:** immunreaktív  
**IM:** belső neuropil (internal mass)  
**KIR:** központi idegrendszer  
**LFP:** local field potential  
**MP:** membrán potenciál  
**MT:** metacerebrum  
**MZ:** mezocerebrum  
**NB:** nem tüzelő (non-bursting) neuron  
**NP:** neuropil  
**PB:** foszfát-puffer  
**PBS:** (phosphate buffered saline) foszfát pufferelt fiziológiás sóoldat  
**PBS-TX:** Triton X-et tartalmazó PBS  
**PC:** procerebrum  
**PFA:** paraformaldehid  
**SOG:** garat alatti gangliongyűrű  
**TB:** tris-puffer  
**TBS:** tris-pufferelt fiziológiás sóoldat  
**TBS-TX:** Triton X-et tartalmazó TBS  
**TEA:** tetraethylammonium  
**TM:** terminális neuropil (terminal mass)  
**TRITC:** tetraetil-rodamin izotiocianát

# 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. A Gastropoda fajok szaglása

Szárazföldi csigák (Stylommatophora, Gastropoda) perifériás érzékelésében kiemelkedően fontos szerepet töltenek be a környezetből jövő szaginformációk, magatartási válaszaikat alapjaiban meghatározza a külvilág ingereinek nagy hatékonyságú detektálása. A legtöbb csigafajnak ugyan van szeme, azonban csak néhány faj használja őket tárgyfelismerésre, és a távoli érzékelés leggyakrabban a szagláson alapul (Chase, 2002), amely emellett a táplálkozási magatartás integratív és meghatározó részének is tekinthető. A csigafajok legfőbb szenzoros modalitása a szaglás, mely meghatároz és befolyásol számos specifikus viselkedést: a szagmolekulák táplálékforrásokhoz, peterakó helyekhez vezetnek, figyelmeztetnek a predátor jelenlétéről, toxikus veszélyt jeleznek és lehetővé teszik a fajok közti kommunikációt (Stocker, 1993).

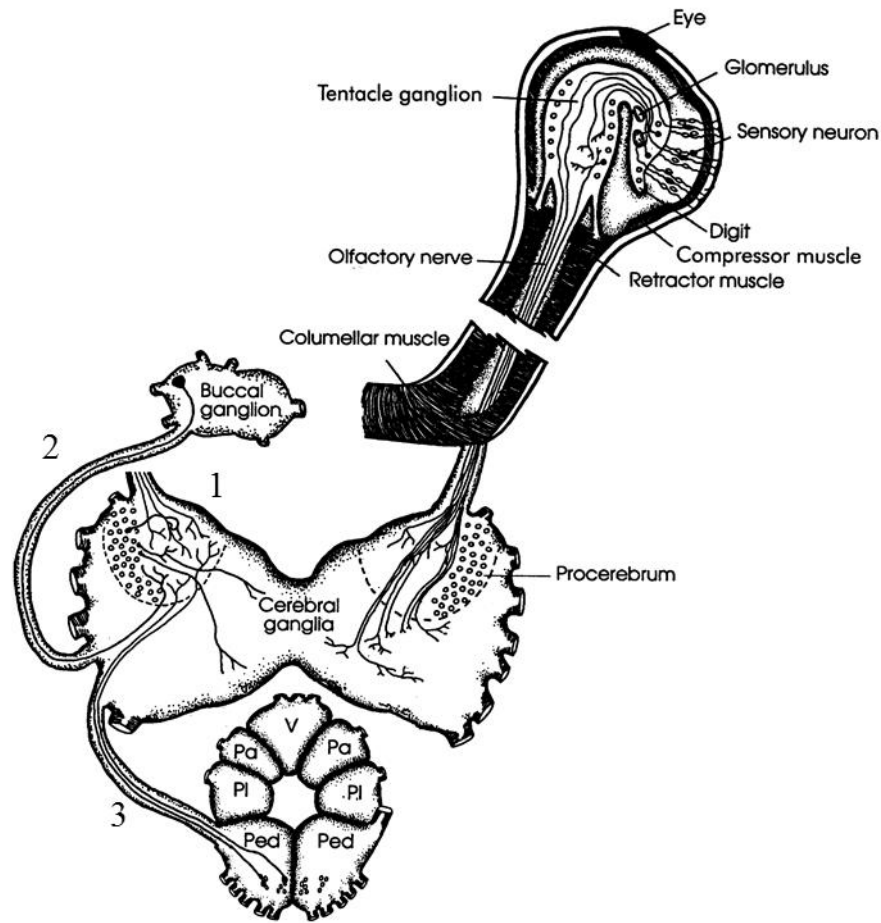
A szárazföldi nyeles szemű tüdős csigák, melyek két prominens képviselője az éticsiga (*Helix pomatia*) és a meztelen csiga (*Limax valentianus*), két pár tapogatóval rendelkeznek. Az alsó helyzetű tapogatók a talajon, míg a felső helyzetűek a levegőben lévő kémiai ingereket érzékelik. Ez utóbbiak csúcsán található a kezdetleges kehelyszemek (Chase, 2002). A csigák tapogatói általában kemorecepciós (és mechanorecepciós) szerepet töltenek be. Az elől-kopoltyúsok (Prosobranchia) csoportjában egy pár kemoszenzitív tapogató található, míg a hátul-kopoltyúsoknál (Opisthobranchia) mindkét pár rendelkezik kemorecepcióra specializálódott epitheliummal. Az egyik, vagy mindkét felső tapogató eltávolítása a térbeli orientáció romlásához vezetett (Chase és Croll, 1981; Chase, 1986). Elektrofiziológiai és autoradiográfias módszerekkel bebizonyították, hogy a csiga tapogatóinak szenzoros rendszerében a receptor sejtek részt vesznek olfaktórikus és mechanoszenzoros információk feldolgozásában is (Chase, 1982, 1986).

A szárazföldi tüdős csigáknak jól fejlett olfaktórikus rendszerének anatómiájáról és sejtes szerveződéséről ma már széleskörű ismeretekkel rendelkezünk (1. ábra). Kutatása klasszikus hisztokémiai és ezüst impregnációs módszerekkel indult és folytatódott is (Flemming, 1870; Hanström, 1925; Zaitseva, 1980). A szaglóhám (olfaktórikus epithelium) a tapogató disztális csúcsán, annak ventrális részén helyezkedik el. A felszíni fedőréteg komplex szerkezete, a kefeszegély védi a szenzoros struktúrákat a kiszáradástól, és feltehetően szerepe van az olfaktórikus molekulák befogásában (megkötésében) is.

Hisztokémiai vizsgálatok során olyan szekréciós mirigysejteket azonosítottak, melyek specifikusan az olfaktórikus szervekkel álltak kapcsolatban, és szerepük feltehetően a befogott szagmolekulák optimalizálásában van (Chase, 2002).

Az olfaktórikus epithelium alatt körülbelül 1 millió szenzoros neuron található. Az érző neuronok kisméretű (<20  $\mu\text{m}$ ), bipoláris primer receptor sejtek. Szárazföldi csigák tapogatóiban 4-6 féle érző neuron található (Chase, 1986). A neuronok élettartama rövid, folyamatosan megújulnak, hasonlóan a gerincesek olfaktórikus epitheliumában jelen lévő szenzoros neuronokhoz. Emlősöknél és puhatestűeknél hasonló jellegzetesség a neuronális elemek megújulása mind a szenzoros periférián (Chase és Rieling, 1986), mind a központi feldolgozó struktúrákban, azaz a csiga szaglőlebenyében (procerebrum, PC) (Zakharov és mtsai., 1998) illetve az emlősök szaglógumójában (bulbus olfactoriusban, BO) (Magavi és mtsai., 2005; Lledo és mtsai., 2006). A PC megújuló zónája az apikális póluson található (Watanabe és mtsai., 2009), mely egyben az apiko-bazális tengely mentén terjedő oszcillációs hullámok kialakulásának is a helye (Delaney és mtsai., 1994; Toda és mtsai., 2000; Nikitin és Balaban, 2000). Akárcsak a BO-ban (Lois és Alvarez-Buylla, 1994), az új neuronok a csiga szaglőlebenyben is legkésőbb a kikelés után a 7. napon megjelennek (Zakharov és mtsai., 1998). A neurogenesis során fellépő szagingerék feltehetően befolyásolják a szinaptikus kapcsolatok alakulását a PC neuronjaiban.

Az érzőneuronok általában közvetlenül az epithelium alatt helyezkednek el, és az ott található tapogató ganglionnal állnak közvetlen kapcsolatban a dúc úgynevezett ujjain (digitek) keresztül. A tapogató ganglion a cerebrális ganglionhoz a tapogató idegen keresztül kapcsolódik. A tapogató ganglion neuronjainak többsége 6-9  $\mu\text{m}$  nagyságú, bár előfordul közöttük néhány nagyobb, 15-35  $\mu\text{m}$  átmérőjű sejt is. A tapogató ganglion és a digitek közepén neuropil régió található. A neuropil régióknak és a digiteknek jellegzetes struktúrái a glomerulusok, melyekben egymással szinaptikus kapcsolatban álló idegsejtek nyúlványai találhatók egy kötőszöveti tokban. A glomerulusok kör alakú szinaptikus rendszerek, melyeket afferens szenzoros neuronok, lokális gátló interneuronok és másodlagos interneuronok alakítanak ki, és ahonnan projekciók indulnak magasabb agyi struktúrákba (North és Greenspan, 2007).



**1. ábra Terresztrialis tüdős csigák olfaktórikus rendszere.** Az ábra *Achatina*, *Helix*, és *Limax* fajok olfaktórikus rendszere alapján készült. Minden struktúra kétoldali, de az egyszerűség kedvéért a bukkális (pofa) gangliont és a tapogatót csak az egyik oldalon ábrázoltuk. A PC-ben csak a felső tapogatóból érkező bemenetet ábrázoljuk. Három rostköteg köti össze a PC-t más KIR-beli régiókkal: (1) a PC neuronok intrinsic idegrostjai, (2) a pofa (bukkális) ganglion idegrostjai, és (3) a pedális ganglion idegrostjai. Pa: parietális ganglion, Ped: pedális ganglion, Pl: pleurális ganglion, V: viszcerális ganglion (Chase, 2002).

A receptor sejttestek hosszú disztális nyúlványai a szenzoros epitheliumba lépnek be, majd a vékony érző axonok több ágara oszlanak el, és végül a digiteken keresztül a tapogató ganglionba vetülnek (Zaitseva, 1991). A szagingert feldolgozó neuronális elemek csigákban és más gerinctelen (ízeltlábú) fajokban is számos hasonlóságot mutatnak a gerincesek olfaktórikus rendszerével (Chase, 1986; Ache, 1991; Chase és Tolloczko, 1993; Hildebrand és Sepherd, 1997; Laurent, 1996; Shipley és Ennis, 1995). Ez a hasonlóság mindenekelőtt a tapogató ganglion glomerulusainak, illetve az ízeltlábúak deuterocerebrum és a gerinces BO glomerulusainak felépítésében nyilvánul meg. Ugyanakkor eltérés, hogy míg a szárazföldi csigában (*Achatina*) a tapogató receptor sejtek mindössze 10%-a

végződik olfaktórikus glomerulusokban (Chase és Tolloczko, 1989; Chase, 1986), addig rovarokban és gerincesekben ez az arány 90-100% körül van (Boeckh és mtsai., 1987). Az, hogy a nyeles szemű tüdős csigák tapogatóinak szenzoros rendszere alapvető szerveződésében hasonlít a gerincesek szagló rendszeréhez (Chase, 1986) megerősíti, hogy tanulmányozása modellként szolgálhat az olfaktórikus rendszerek részletesebb megismeréséhez.

## 1.2. A szaglólebeny (procerebrum) szerveződése

A csigák központi idegrendszere (KIR) a magasabb rendű gerinctelen állatok világában több neuront tartalmaz, mint például a gyűrűsférgeké, ugyanakkor lényegesen kevesebbet, mint az ízeltlábúaké. Bár a KIR pontos neuronszámát nehéz meghatározni, a három nagy Gastropoda csoport esetében általánosságban elmondható, hogy az elől-kopoltyús fajokban 50.000-200.000, a hátul-kopoltyús fajokban 4000-20.000, míg a Pulmonata (tüdős csigák) csoportjában pedig körülbelül 50.000-100.000 neuron található (Chase, 2002). A velük végzett kísérleti munkát némileg nehezíti a kevésbé hozzáférhető perifériás idegrendszer, ugyanakkor ezt ellensúlyozza a KIR-ben jelen lévő, könnyen vizsgálható óriásneuronok jelenléte, melyekről először Buchholz tesz említést édesvízi csiga fajokban (l. Chase, 2002).

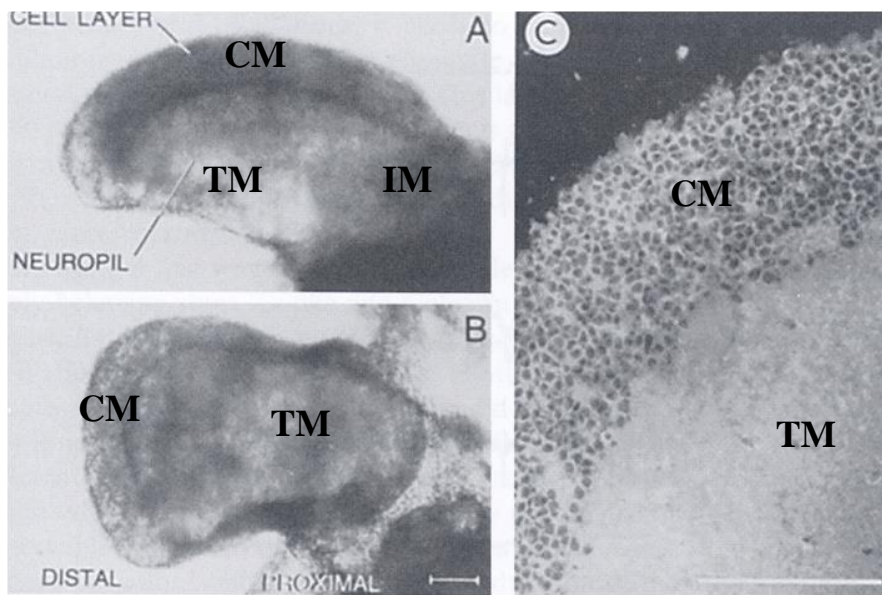
A szaginformáció központi feldolgozásának színtere a PC, mely a cerebrális ganglion jellegzetes struktúrája a nyeles szemű tüdős csigák idegrendszerében (Van Mol, 1974). A PC a cerebrális ganglion laterális részén helyezkedik el. A PC-t olfaktórikus lebenynek is nevezik (Chase, 2002). Morfológiai és fiziológiai vizsgálatokkal is igazolták, hogy részt vesz a szaglás folyamatában (Chase és Tolloczko, 1989; Gelperin és Tank, 1990), fontos szerepet tölt be az olfaktórikus információ feldolgozásban (Delaney és mtsai., 1994, Gelperin, 1999, Chase, 2002), a szagmemória raktározásban és a szag-averzió rögzítésében (Kimura és mtsai., 1998a; Gelperin, 1999; Chase, 2002; Kasai és mtsai., 2006; Matsuo és Ito, 2008). Már korai vizsgálatok során feltárták, hogy a PC bemenetet kap mind a felső, mind az alsó tapogatóból (Hanström, 1925). *Helix* fajokban a PC a felső és alsó tapogatóból is kap olfaktórikus bemenetet (Ierusalimsky és Balaban, 2010), és *Limax* fajokban is kimutattak olfaktórikus epitheliumot mindkét pár tapogatóban, így a PC itt is mindkét tapogatóból kap bemenetet (Chase, 1986; Gelperin és mtsai., 1993; Chase és Tolloczko, 1993; Kimura és mtsai., 1998a). Későbbi tanulmányok fényt derítettek arra is, hogy a PC olfaktórikus bemenetei három szinten valósulnak meg: elsődleges bemenetei



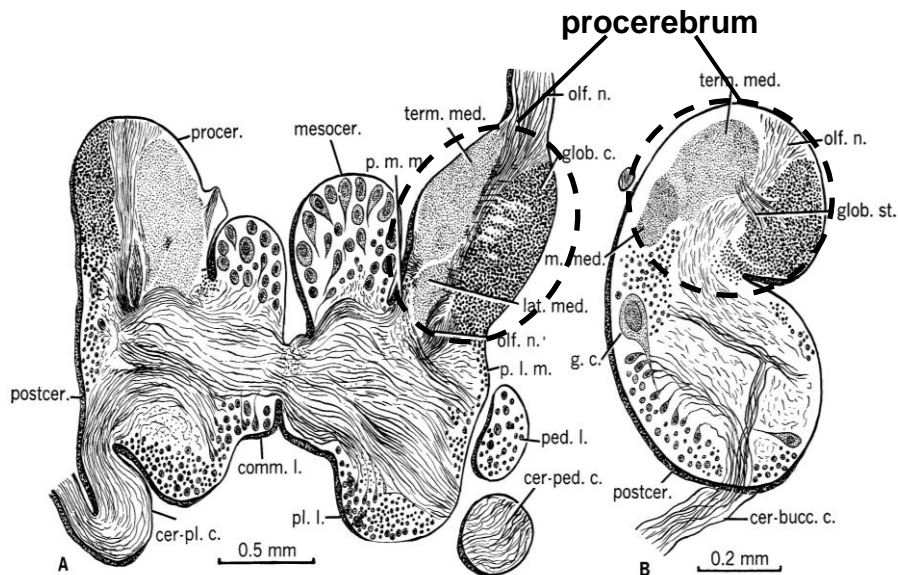
közvetlenül az olfaktórikus szenzoros neuronokból (kb. 5%) (Chase és Kamil 1983), másodlagos bemenetei a tapogató ganglionból (Ierusalemky és Balaban, 2010), míg harmadlagos bemenetei a digiteken keresztül érkeznek (Chase és Tolloczko, 1993).

A teljes PC három egységből áll, melyek a sejtes réteg (cell mass, CM), a terminális neuropil (terminal mass, TM) és a belső neuropil (internal mass, IM). Hasonlóan más olfaktórikus rendszerekhez, a PC-ben jelen lévő sejtpopuláció is két csoportra osztható: lokális interneuronokra és projekciós neuronokra. Utóbbiak szerepe az olfaktórikus információ elosztása magasabb idegi központok felé, és ezek a neuronok elkülöníthetők az eltérő régiókban mutatott axon arborizációjuk alapján (Ratté és Chase, 1997). A CM döntő része több tízezer kis méretű neuronból (5-8  $\mu\text{m}$ ), ún. globulus sejtekből áll (Ratté és Chase, 1997). *Achatina fulica*-ban és *Helix aspersa*-ban nagyjából 20,000 (Chase, 1986), míg *Limax maximus*-ban körülbelül 50,000-100,000 neuron (az összneuronszám mintegy 90%-a) alkotja a PC lebenyt (Gelperin és Tank, 1990). A globulus sejtek további, mintegy 10%-a 12-15  $\mu\text{m}$  átmérőjű. Itt jegyezzük meg, hogy egyéb idegsejtek méretük alapján négy kategóriába sorolhatók a tüdőcsigák csoportjában: kisméretű (12-30  $\mu\text{m}$ ), közepes méretű (30-60  $\mu\text{m}$ ), nagyméretű (70-90  $\mu\text{m}$ ) idegsejtek, továbbá óriás neuronok (100  $\mu\text{m}$  felett).

*Limax* PC-ben elektrofiziológiai tulajdonságok alapján is az idegsejteknek legalább két típusa különíthető el: kb. 90%-a nem-börsztölő (ritkán tüzelő) neuron (NB), míg a többi börsztölő (gyakran, ritmusosan tüzelő) neuron (B). A B neuronok felelnek meg a nagyobb, (12-15  $\mu\text{m}$ ), míg az NB neuronok kisebb (5-9  $\mu\text{m}$ ) méretű sejteknek. Az NB neuronok szinaptikus kapcsolatban állnak szenzoros afferensekkel és interganglionáris interneuronokkal a terminális és internális neuropilben is (Chase és Tolloczko, 1993; Inoue és mtsai., 2000), és részei az olfaktórikus magatartást kialakító neuronhálózatoknak.



**2. ábra** A meztelen csiga, (*Limax maximus*) procerebrális lebenye. A PC lebenyenként 50,000-100,000 neuront tartalmaz. A, B: Glia buroktól mentes teljes (*whole-mount*) lebenyek. C: Egy 6  $\mu\text{m}$ -os metszeten jól látható a kisméretű neuronok rétege (CM) tömött csoportosulása a lebeny peremén. A sejtes réteg mellett találhatóak a neuropil régiók (IM: internális neuropil, TM: terminális neuropil). Arányméret: 100  $\mu\text{m}$ , (Delaney és mtsai., 1994).



**3. ábra** Az éticsiga (*Helix pomatia*) cerebrális ganglionjának szerkezete és szövettani képe (sematikus rajz, hematoxin-eosin festés alapján, Bullock és Horridge, 1965). A: Frontális metszet. B: Szagittális metszet. A cerebrális ganglion fő részei a pro-, mezo- és a meta/posttcerebrum.

### 1.3. Szinapszisok a Gastropoda idegrendszerben

Mivel a neuronális szignalizációs folyamatok evolúciósan konzerváltak, a Gastropoda idegsejtek membrán felépítése, ioncsatornái és szinaptikus transzmissziós folyamatai alapjaiban nem különböznek más gerinctelen, vagy akár gerinces állatokétól (Kandel, 1976). Döntő számban a polarizált kémiai szinapszisok fordulnak elő. Korai elektronmikroszkópos vizsgálatok során a Gastropoda ganglionok neuropiljében kevés szinapszist azonosítottak (Coggeshall, 1967). A szinaptikus specializációk részben eltérőek a gerincesekben leírtaktól; nincs specializált posztzinaptikus denzitás, ugyanakkor ez a struktúra a preszinaptikus oldalon van jelen (l. Kandel, 1976; Elekes és mtsai, 1983, 1984, 1985). A szimmetrikus szinapszisok esetében a membrán mindkét oldala denz, és a vezikulák sem csak egy oldalon halmozódnak fel (McCarragher és Chase, 1985). Feltehetően a KIR neuronjainak szinapszisaiból egyfajta klasszikus hírvivő molekula szabadul fel, míg a nem-szinaptikus kapcsolatokból egy vagy több transzmitter is egyidőben, így ez utóbbi, ún. extraszinaptikus kapcsolatok kiemelt helyszíne (Chase, 2002).

### 1.4. A procerebrum ultrastruktúrája és szinaptikus szerveződése

*Helix* (Zs.-Nagy és Sakharov 1970; Ratté és Chase 1997, 2000; Zaitseva 2000) és *Limax* fajokban (Zs.-Nagy és Sakharov 1970; Watanabe 1998; Zaitseva 2000) rutin elektronmikroszkópos, illetve intracelluláris biocytin jelölést követő ultrastruktúrális vizsgálatokkal, továbbá ezüst impregnáció után vizsgálták a PC cito-architektúráját és szinaptológiáját. A PC sejtpopuláció nem bizonyult egységesnek: a B és NB idegsejteknek projekciós mintázata eltérő volt. Míg a B sejtek csak a lebenyen belül arborizáltak, addig az NB sejtek a lebenyen kívülre is vetültek. Biocytinnel történő intracelluláris jelölést követően részletesen tanulmányozták *Helix aspersa*-ban a neuronok kapcsolatrendszerét (Ratté és Chase, 2000). Projekciós jellemzőik alapján három különböző neuron típust azonosítottak, melyek közül egy a PC-n kívülre vetült, és felrajzolták specializált szinaptikus kapcsolataik számos jellemzőjét. Ugyanakkor megállapítható volt, hogy bár az axonális elemek kapcsolatrendszerére a PC egészében figyelmet fordítottak, a sejtes réteg részletes szinaptológiája kevésbé feltárt maradt, illetve a szerzők véleménye szerint annak szerveződése nem volt eltérő a medulláris neuropilben megfigyelttől.

Zs.-Nagy és Zakharov (1970) egy korai tanulmányukban axo-szomatikus kapcsolatokat írtak le *Helix* és *Limax* fajok PC-ben, azonban az önmagában használt OsO<sub>4</sub> fixálás gyenge minőségű ultrastruktúrális megőrzést eredményezett, és ez megnehezíti megfigyeléseik valós értékelését. Zaitseva (2000) különböző szárazföldi csiga fajokban (*Helix*, *Limax*, *Deroceras*) ultrastruktúrális szinten axo-szomatikus és axo-axonikus kapcsolatokat különböztetett meg a globulus sejtrétegben. Sajnos, az eredmények bemutatása ennél a szerzőnél is gyenge minőségű ultrastruktúrális megőrzés mellett történt, valamint anélkül, hogy azokat funkcionálisan értelmezte, illetve összefüggésbe hozta volna esetleges szerepüket olfaktórikus integratív folyamatokkal. Az intercelluláris kapcsolatokon belül az axo-szomatikus kapcsolatok igen ritkán fordulnak elő a gerinctelen állatok idegrendszerében, beleértve a Gastropodákat is (Elekes és Florey, 1987; Elekes és mtsai., 1985; Elekes, 1991), habár szerepük egyes specifikus folyamatokban, mint például az idegsejtek aktivitásának finom hangolása, vagy a sejtek metabolizmusára kifejtett hatása nem elhanyagolható. Mindezek alapján indokoltnak tartottuk és újravizsgáltuk a PC sejtes rétegének finomszerkezeti (ultrastruktúrális) szerveződését és szinaptológiáját *Helix pomatia*-ban, tovább bővítendő jelenlegi funkcionális-morfológiai ismereteinket a szaginformációt feldolgozó hálózatok szignalizációs rendszereivel kapcsolatban, különös tekintettel a lokális körök, hálózatok feltárására és szerepére.

### **1.5. Az olfaktórikus folyamatok funkcionális jellemzése**

Habár a puhatestűk és az emlősök az evolúció során a közös őstől mintegy 600 millió éve elváltak (Runnegar és Pojeta, 1985), számos bizonyíték áll rendelkezésre, hogy hasonló feladatokat analóg módon oldanak meg. Ennek utal a tanulási és memória folyamatok sejtszintű alapjainak hasonlósága, beleértve az evolúciósan konzervált géneket (Nakaya és mtsai., 2001; Fukunaga és mtsai., 2006), a celluláris szintű szignalizációs folyamatokat (Bailey és mtsai., 1996; Hatakeyama és mtsai., 2000, 2004; Bukanova és mtsai., 2005; Grinkevich és mtsai., 2008), a neuronális integráció mechanizmusait (Gelperin, 1999, 2006; Antonov és mtsai., 2003; Apfelbach és mtsai., 2005), a szinaptikus plaszticitást (Frank és Greenberg, 1994; Kandel, 2001; Pittenger és Kandel, 2003; Glanzman, 2006) és a tanulási formák kialakulását (Delaney és Gelperin, 1986; Sahley, 1990, Sahley és mtsai., 1990, McComb és mtsai., 2005; Lorenzetti és mtsai., 2006). Ezek a megfigyelések is azt támasztják alá, hogy az emlős tanulási és memória mechanizmusok alapjainak a puhatestű idegrendszer szintjén történő kutatása célravezető stratégia lehet,

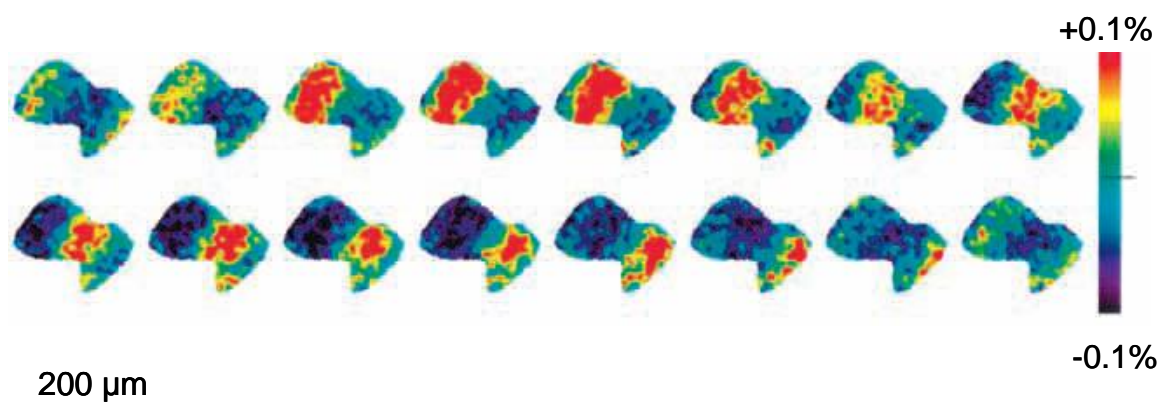
melyet például az *Aplysia*-ban feltárt rövid és hosszú távú memóriaraktározási folyamatok is bizonyítanak (Kandel, 2001; Hawkins és mtsai., 2006, Reissner és mtsai., 2006).

A neurofiziológusok több mint 80 éve kutatják az olfaktórikus rendszereket (Gerard és Young, 1937), melyek a szagingerek kódolásáról, oszcilláló dinamikáról és a szagmemória kialakulásával kapcsolatos ismereteinket bővítették. A szagingerek által modulált lokális mező potenciálokat (local field potentials, LFP) elsőként sün BO-ban mutatták ki (Adrian, 1942). Azóta a jelenséget azonosították számos gerinces BO-ban, és az ezzel analóg ízeltlábú és puhatestű struktúrákban is (Tank és mtsai., 1994; Delaney és Hall, 1995; Gray, 1994; Laurent, 1997). Az oszcilláló dinamika jelentőségét a környezetből jövő ingerek tulajdonságainak időbeli kódolásában már felfedezték emlős számos szenzoros és premotoros területen a KIR-ben (Singer és Gray, 1995; Murthy és Fetz, 1996), valamint humán agyban is (Ribary és mtsai., 1991; Classen és mtsai., 1998). Az oszcilláló dinamika feltehetően hozzájárul az olfaktórikus rendszerek azon képességéhez, hogy egy összetett szagforrásból az egyes szagösszetevőket meg lehessen különböztetni (Hopfield, 1991; Heinbockel és mtsai., 1998).

Gerincesekben és gerinctelenekben a szag diszkrimináció erősen függ az olfaktórikus központok neuronális hálózataitól. A gerinctelen modell rendszerek lehetővé teszik, hogy a szaglást feldolgozó hálózatok oszcilláló dinamikája és a szag-irányította viselkedési válaszok közti kapcsolatot vizsgálni lehessen. A szag modulálta oszcilláló dinamika és a szag-tanulási folyamatok jól ismertek pl. a háziméhben (*Apis mellifera*) (Stopfer és mtsai., 1997, Laurent, 1997; Menzel és Müller, 1996), vagy a meztelen csigában (*Limax maximus*) (Gelperin és Tank, 1990; Sahley 1990; Gervais és mtsai. 1996). Háziméhben végzett vizsgálatok során az oszcilláló dinamika blokkolása esetében kimutatták, hogy két hasonló szag megkülönböztetésének képessége gyengült (Stopfer és mtsai., 1997). A *Limax maximus* eltérő memóriaképet alakít ki attól függően, hogy a szag egységes forrásból, vagy térben szeparált, de folyamatos szagforrásból származik (Hopfield és Gelperin, 1989).

Szárazföldi csigákban a PC, akárcsak az emlős BO, koherens oszcillációt mutat, melyet elsődleges szag ingerek modulálnak (Gelperin és Tank, 1990; Chase, 2000; Samarova és Balaban, 2009), azonban azt a szél is kiválthatja (Ito és mtsai., 2006). Csigák szag detekciója során LFP amplitúdó és frekvenciaváltozást regisztráltak (Gelperin és Tank, 1990; Kimura és mtsai., 1998b). *Limax* B és NB neuronjai membrán potenciál változásaiban szinkron oszcillációkat mutatnak (Kleinfeld és mtsai., 1994), melyeket feltehetően a B neuronok generálnak (Gelperin és Flores, 1997). Mikor a B neuronok egy adott régióban szinkron tüzelnek, akkor létrejön az 0,7 Hz periodicitást mutató LFP

oszilláló frekvencia (Gelperin és Tank, 1990). A B sejtek a PC apiko-bazális tengelye mentén helyezkednek el, és a serkentő szinaptikus kapcsolatok a B sejtek közt egy folyamatos hiperpolarizációs-depolarizációs hullám terjedését eredményezik, melynek sebessége  $1 \text{ mm s}^{-1}$  az apikális pólustól a bazális felé (4. ábra) (Kleinfeld és mtsai., 1994; Kawahara és mtsai., 1997; Gelperin 1999). A PC és az emlős BO hasonló tulajdonságokkal rendelkezik. Mindegyikben az LFP-k szinkron oszillációkat mutatnak, és szag-indukálta frekvenciaváltozások jönnek létre, melyek a szagtanulástól függenek (Kimura és mtsai., 1998b; Ravel és mtsai., 2003; Inoue és mtsai., 2006). Az emlős BO LFP-k koherens 1-100 Hz oszillációt mutatnak. A szagok jelentésüktől és az állat viselkedési állapotától függően egyedi mintázatot alakítanak ki az LFP oszilláció spektrumában (Kay és Freeman, 1998; Chabaud és mtsai., 2000; Martin és mtsai., 2003). Teknősök egyes agykérgi területeinek és a *Limax* PC-nek összehasonlító vizsgálata során a tér/frekvencia analízisek két hullám terjedését regisztrálták, melyek különböző irányba terjedtek (Mitra és Pesaran, 1999). A PC hullámai feltehetően a tanult szagok térbeli elkülönítését végzik. Az LFP oszillációk elsődleges funkciója tehát a szag azonosításában a szagot feldolgozó interneuronok aktivitásának temporális mintázattá alakítása (Laurent, 1996; MacLeod és Laurent, 1996; Meredith, 1986; Wehr és Laurent, 1996). A nyeles szemű csigák PC-je a rövid távú (1-100 perc) memória folyamatokban játszik meghatározó szerepet, mely hosszú távú (napok) memóriává is átalakulhat (Gelperin, 1975).



**4. ábra** CCD felvétel sorozat egy feszültség-érzékeny festékkel (Di-4-ANEPPS) jelölt PC-ből (*Limax*). Megfigyelhető az oszillációs hullámok spontán tovaterjedése a PC csúcsától (balra fent kezdődően) az alapjáig (alul jobbra bezárólag) (Gelperin, 1999).

## 1.6. Hírvivők a procerebrumban

Eltekintve egyes endogén neuropeptidektől illetve az oktopamintól, a Gastropoda idegrendszerben azonosított neurotranszmitterek és neuromodulátorok megegyeznek a gerincesekben leírt neurotranszmitterekkel (pl. acetilkolin, 5-HT, dopamin, glutamát) (Chase, 2002). Noha a PC-ben nagyszámú kémiai hírvivő jelenlétét mutatták ki (Gelperin, 1999, 1. táblázat), jelenlegi ismereteink szerint a PC neuronális folyamatainak meghatározó transzmitterei a glutamát, a nitrogén-monoxid, az 5-HT és az FMRFamid.

A PC teljes medulláris neuropil régiójának 5-HTerg innervációját mind fluoreszcens hisztokémiai módszerrel (Osborne és Cottrell, 1971; Inoue és mtsai., 2004), mind immunhisztokémiai úton (Matsuo 2009; Kobayashi és mtsai., 2010) kimutatták. *Limax* PC globulus sejtjein 5-HT és dopamin hatását is igazolták: mindkét szignál molekula megnövelte az intracelluláris cAMP szintet (Yamane és Gelperin, 1987), ezzel alátámasztva, hogy hatásuk fehérje foszforilációs folyamatokhoz kapcsolódik. Az 5-HT emellett növelte az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintet is, mely szintén igazolta szerepét a másodlagos-hírvivő rendszerek szabályozásában. Feltételezték, hogy az 5-HT indukálta folyamatok kapcsolatban állnak a szag-feldolgozó neuronális hálózatok működésével (Yamane és mtsai., 1989). Valóban, később igazolták, hogy *Limax*-ban az 5-HT dóziszfüggő módon növeli a PC LFP oszcillációinak frekvenciáját (Gelperin és mtsai., 1993; Inoue és mtsai., 2001), hasonlóan az acetilkolinhoz (Watanabe és mtsai., 2001). Az extrinsic 5-HT bemenetek növelik a NB neuronok érzékenységét, mely által a B neuronok serkentése fokozódik, és ez által nő az LFP oszcilláció frekvenciája (Kobayashi és mtsai., 2010). Az 5-HT-ről ma már jól ismert, hogy meghatározó molekula *Aplysia* asszociatív tanulási mechanizmusában (Abrams, 1985; Hawkins és mtsai., 1993), illetve szerepet játszik *Helix* averzív, táplálék elkerülő magatartásában (Balaban és mtsai., 1987; Shirahata és mtsai., 2006). Az 5-HT feltehetően olyan neuronális jelutakban is fontos szerepet tölt be, melyek során a rövid távú memória végül hosszú távú memóriává válik (Abel és Kandel, 1998).

Már korai és újabb immunhisztokémiai munkák során, továbbá napjaink molekuláris technikáinak (Matsuo, 2009) segítségével a *Helix* és *Limax* PC-ben peptiderg, mindenekelőtt endogén oligopeptid természetű szignál molekulákat is azonosítottak (Cooke és Gelperin 1988a, b; Hernádi és mtsai., 1995; Elekes és mtsai., 2000; Kobayashi és mtsai., 2010; továbbá l. Gelperin, 1999).

Ugyanakkor még mindig rendkívül kevés információ áll rendelkezésünkre a PC azonosított transzmitter/modulátor tartalmú elemeinek nagyfeloldású kémiai-neuroanatómiai szerveződéséről, ultrastruktúrális jellemzőiről, intracelluláris kapcsolataikról, beleértve a posztszinaptikus célelemeik vagy célsejtjeik azonosítását. Ezért munkánk egyik további célja volt, hogy a korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémia segítségével elemezzük és feltárjuk az 5-HTerg innerváció részleteit a PC sejtés rétegében és egyes neuropilár területein.

<b>Neurotranszmitter</b>	<b>Eljárás</b>	<b>Hivatkozás</b>
Dopamin	Immunhisztokémia Farmakológia, Biokémia	Hernádi és mtsai. (1993) Gelperin és mtsai. (1993) Yamane és Gelperin (1987)
Szerotonin	Immunhisztokémia Flack-Hillarp, Farmakológia, Biokémia	Bernocchi és mtsai. (1998) Osborne és Cottrell (1971) Gelperin és mtsai. (1993) Yamane és mtsai. (1989)
Glutamát	Farmakológia	Rhines és mtsai. (1993)
Pedális peptid	mRNS detekció	Poteryaev és mtsai. (1997)
FMRFamid	Immunhisztokémia	Elekes és Nässel (1990) Cooke és Gelperin (1988a)
SCP-B	Biokémia	Yamane és Gelperin (1987)
Met-enkefalin	Immunhisztokémia	Marchand és mtsai. (1991) Elekes és mtsai. (1993)
Leukokinin I	Immunhisztokémia	Elekes és mtsai. (1994)
Substance-P	Immunhisztokémia	Elekes és Nässel (1994)
Locustatachykinin I	Immunhisztokémia	Elekes és Nässel (1994)
CARP	Immunhisztokémia	Hernadi és mtsai. (1995)
PDH	Immunhisztokémia	Elekes és Nässel (1999)
MIP	Immunhisztokémia	Elekes és mtsai. (1999)
GFAD/achatin	Immunhisztokémia	Poteryaev és mtsai. (1998)
Somatostatin	Immunhisztokémia	Magdelaine és mtsai. (1991)
VIP	Immunhisztokémia	Kaufmann és mtsai. (1995)
Nitrogén-monoxid	Diaforáz festés Immunhisztokémia Farmakológia	Sánchez-Alvarez (1994) Cooke és mtsai. (1994) Gelperin (1994)

**1. táblázat Neurotranszmitterek és neuromodulátorok a teresztriális csigák procerebrumában.** SCP-B: small cardioactive peptid; CARP: catch-relaxing peptid; PDH: pigment-dispersing hormon; MIP: *Mytilus* inhibitory peptid; GFAD: Gly-D-Phe-Ala-Asp-COOH; VIP: vasoactive intestinal peptid; (módosítva Gelperin, 1999, után).

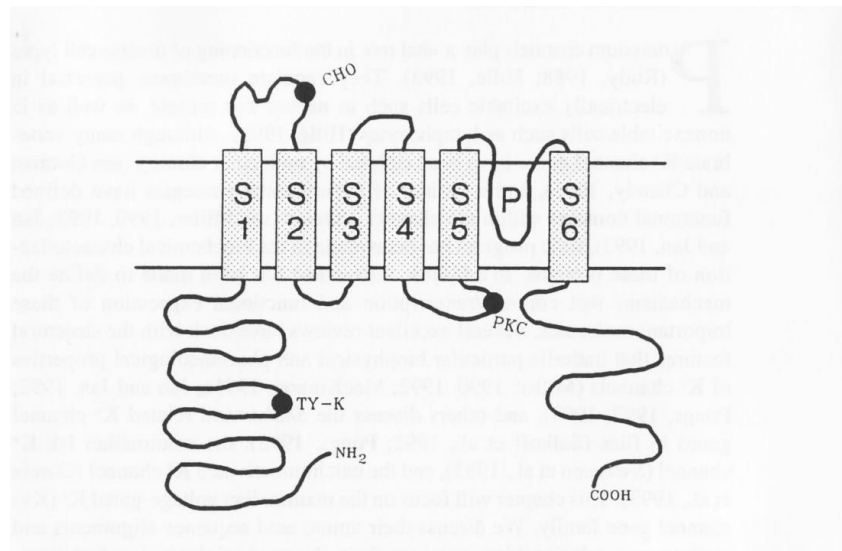


## 1.7. Feszültségfüggő ioncsatornák gerincesekben és gerinctelenekben

A szöveteket felépítő sejtekben több mint 300 fajta ioncsatorna fordul elő, amelyek csoportosíthatók számos jellegzetes tulajdonság alapján, pl. a rajtuk áthaladó ionok milyensége szerint, vagy az adott csatornát felépítő fehérjék elhelyezkedése alapján (Hille, 2001; Camerino és mtsai., 2007). Az állati sejtek elektromos aktivitását feszültségfüggő ioncsatornák tartják fent, melyek minden állatcsoportban megtalálhatók. Sőt, több millió éves evolúciós folyamatok során nem csak eukarióta, hanem prokarióta csoportokban is jelen vannak (Kurachi és mtsai., 1999). A  $K^+$ -csatornák az ioncsatornák legszélesebb körben elterjedt tagjai, gyakorlatilag minden élő sejtben megtalálhatók (Kurachi és mtsai., 1999). Ezen belül is a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák alapvető szerepet játszanak az idegsejtek ingerlékenységében, valamint a sejtmembrán potenciál változásai során a repolarizációban (Hille, 2001; Freeman és mtsai., 1990). A  $K^+$ -csatornák idegsejtek rövid és hosszú távú memória raktározási folyamataiban is meghatározóak, vagyis a szinaptikus plaszticitási események kialakításában (Pfaffinger és Siegelbaum, 1990).

A  $K^+$ -csatornák felépítése evolúciósan konzervált, alapvető építőköveik viszonylag egyszerű membránba ágyazott fehérjék, melyek ún. transzmembrán alegységekből, és az azokat összekötő fehérjeláncokból állnak (Bauman és mtsai., 1988). Az ősi csatornák két transzmembrán doménnel rendelkeztek (Goldstein és mtsai., 1998), mely az evolúció során további doménnel bővült. Az eukarióta feszültségfüggő  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  és  $Na^+$  csatornák hat transzmembrán domént (6-TM) tartalmaznak, melyek az alapvető pórusformáló egységet alkotják (Choe, 2002).

A 6-TM domént tartalmazó  $K^+$ -csatornából négy összeállva képes egy pórust kialakítani, melyen keresztül az ionok áramlása lehetővé válik. Korai munkákban négy alapvető családot különböztettek meg:  $K_v1$ ,  $K_v2$ ,  $K_v3$ ,  $K_v4$  melyek megfelelnek a *shaker*, *shab*, *shaw* és *shal* csatornáknak, melyeket *Drosophila*-ban azonosítottak (Butler és mtsai., 1989), újabban azonban további családokra is fény derült ( $K_v$  5-12, Kues és Wunder, 1992). Továbbá, az egyes családok számos altípust tartalmaznak, melyek között apró szerkezeti különbségek vannak, amelyek eltérő funkcionális tulajdonságokat eredményeznek. Poszt-transzlációs módosítások, és eltérő splice variánsok szintén előfordulhatnak, melyekkel együtt a potenciális csatorna összerendeződés lehetősége igen nagyszámú lehet.



**5. ábra** A feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák szerkezeti felépítésének sematikus képe. Hat membránt átvéelő fehérje domén (S1-S6) alkotja az alap szerkezetet, „P” a pórust formáló domént jelzi. Három lehetséges poszttranszlációs modifikációs hely van jelölve: N-glikolizáció („CHO”) tirozin kináz („TY-K”) és protein kináz C („PKC”). Négy alegység összeállása teszi lehetővé az ionok áramlását a csatornán keresztül (North, 1995).

Alcsalád	HUGO*	Családtagok száma	<i>Drosophila</i> gén ortológok	Sejtszintű elhelyezkedés	Létrehozott áram
$K_v1$	KCNA	6	<i>Shaker</i>	axon, idegvégződések	Tranziens/hosszan tartó
$K_v2$	KCNB	2	<i>Shab</i>	szoma, dendrit	Kifelé egyenirányító
$K_v3$	KCNC	4	<i>Shaw</i>	dendrit, axon	Tranziens/hosszan tartó
$K_v4$	KCND	3	<i>Shal</i>	szomatodendr. membrán	A-típusú
$K_v7$	KCNQ	5	-	axon, szomatodendr. régiók	M-típusú

**2. táblázat** Emlős központi idegrendszerben azonosított feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák. Az öt nagy család mindegyike további családtagokat tartalmaz, melyek sejtszintű elhelyezkedése és az általuk létrehozott áram eltérő lehet (Vacher és mtsai., 2008). HUGO: név a HUGO gén nevezéktan alapján.

A  $K^+$ -csatornák molekuláris diverzifikációja már a valódi szövetes állatok korai evolúciója során kezdődött, és jelenleg is rendkívül széles skálájuk van jelen az élő sejtekben (Birnbaum és mtsai., 2004). Gerinctelenekben a  $K^+$ -csatornák a legnagyobb csatorna családot jelentik, legyekben nagyjából 30, férgekben pedig 90 gént azonosítottak (Butler és mtsai., 1989; Wei és mtsai., 1996).  $K^+$ -áramot először egy puhatestű, az *Onchidium* idegsejtjéből vezettek el (Hagiwara és mtsai., 1961). *Aplysia*  $K^+$ -csatorna klónozása jelentős homológiát mutatott egyes gerincesekben jelen lévő  $K^+$ -csatornákkal (Pfaffinger és mtsai., 1991). Továbbá kimutatták, hogy az *Aplysia* neuronok elektromos tulajdonságait *shaker* családba tartozó  $K^+$ -csatorna gének befolyásolják (Kaang és mtsai., 1992). Szintén ismert a  $K^+$ -csatornák hatása a sejtszintű tanulási folyamatokra *Aplysia* (Kandel és Schwartz, 1982; Baxter és Bryne, 1990) és *Hermisenda* (Alkon és mtsai., 1985; Collin és mtsai., 1988) fajokban.

Azanza (2008) *Helix aspersa* garat alatti gangliongyűrűjében immunhisztokémiai festéssel különböző ioncsatornákat azonosított, köztük kifelé egyenirányító áramot létrehozó  $K^+$ -csatornát is. Azonban a vizsgált csatornatípusok nem voltak eléggé specifikusak, így a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornákat tartalmazó neuronok pontos lokalizációjáról, projekciós mintázatáról és lehetséges intercelluláris kapcsolataira a teljes KIR-ben, különös tekintettel a PC-re, kevés információ áll rendelkezésünkre. Ezért munkánk utolsó részében vizsgáltuk egyes, feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák eloszlását és lehetséges kapcsolatrendszerét az éticsiga (*Helix pomatia*) KIR-ben, és ezen belül a PC-ben.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Mint azt az Irodalmi áttekintésben részletesen megvilágítottuk, a szárazföldi nyeles szemű csigák szaglóközpontjának (procerebrum, PC) anatómai felépítéséről, és az ott jelen lévő neurotranszmitterekről, valamint a tanulás és memória folyamatokban betöltött szerepéről számos információ áll rendelkezésünkre. Azonban kevésbé ismert a PC sejtés rétegének ultrastrukturális szerveződése és kapcsolatrendszerei, valamint a PC egyik pivotális extrinsic modulátorának, az 5-HT-nek pontos projekciói, illetve szinaptikus kapcsolatrendszere. Viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre a Gastropoda fajokban jelen lévő ioncsatornákról, mindenekelőtt azok sejtszintű eloszlásáról, kapcsolatrendszereiről, az egyes neuronokban aktívan működő, azok szignalizációs folyamatait meghatározó ionáramok funkcionális-morfológiájáról, azok esetleges kapcsolatáról a szaginformáció feldolgozásával.

Ezért munkánk során a következő feladatokat tűztük ki célul:

- i. Újra vizsgáljuk és leírjuk a PC sejtés rétegének ultrastrukturális szerveződését, különös tekintettel a lokális neuropilekre és intercelluláris kapcsolatokra;
- ii. Részletesen jellemezzük a PC 5-HTerg innervációs rendszerét, különös tekintettel a sejtés réteg innervációjára, a projekciók célpontjaira, és az intercelluláris kapcsolatok különböző formáira;
- iii. Azonosítsunk feszültségfüggő  $K^+$ -csatornákat a KIR-ben, különös tekintettel a PC-re, meghatározzuk eloszlásukat és funkcionális jellemzőiket.

Vizsgálatainkkal elsősorban tovább kívántuk bővíteni a Gastropoda fajok szaglásával kapcsolatos funkcionális-morfológiai ismereteinket, melyeknek birtokában a szaglás, és szélesebb körben a kémiai percepció folyamatainak, továbbá a neuronális szintű integratív események kémiai-neuroanatómai és membránszintű aspektusainak jobb megismerése várható.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Kísérleti állatok

Kísérleti állataink felnőtt éticsiga, *Helix pomatia* és meztelen csiga, *Limax valentianus* egyedei voltak. Az éticsigákat tavasztól őszig gyűjtöttük Tihany és Balatonfüred környékén. Az egyedeket természetes környezetben tartottuk és salátával etetve, míg a téli hónapok során az állatokat 4-6 °C-on hibernálva tartottuk. A kísérletes munkát megelőzően egy hétig laboratóriumi körülmények közé kerültek. A *Limax* egyedeket a Tokushima Bunri Egyetem Farmakológiai Intézetének (Sanuki, Shido, Kagawa, Japán) tenyészetéből kaptuk, vagy a már Japánban előzőleg megfelelően fixált KIR-eikkel dolgoztunk. Vizsgálatainkhoz igyekeztünk csak a feltétlenül szükséges számú állatot felhasználni, és azokat a kísérleti eljárások előtt a számukra legmegfelelőbb környezetben tartani.

#### 3.2. Elektronmikroszkópia

A *Helix* és *Limax* KIR-eket izolálásukat követően kifeszített állapotban, Petri csészében 0,1 M PB-ben hígított 2,5 % PFA és 1 % GA keverékével fixáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Fixálást követően a preparátumokat PB-ben alaposan mostuk, majd 0,1 M Nakkodiláttal pufferelt 1 % OsO<sub>4</sub>-os utófixálás után (1 óra, 4 °C-on) növekvő koncentrációjú etilalkohol sorozatban, majd propilén oxidban víztelenítettük. Víztelenítés során a blokk kontrasztot 70%-os etilalkoholban telített uranil acetáttal végeztük. A dehidrált szöveteket propilénoxid és Araldit (Durcupan ACM, Fluka) 3:1, 1:1, 1:3 térfogatarányú keverékével infiltráltuk, Aralditba ágyasztuk, majd 48 órát polimerizáltuk. Ezt követően 1 µm-es félvékony metszeteket 1%-os toluidinkék festést követően Zeiss Axioplan fénymikroszkóppal tanulmányoztuk, majd ennek alapján 50-60 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk (LKB Novacut). Az ultravékony metszeteket ólom-citráttal kontrasztoltuk (Reynolds, 1963) és JEOL 1200 EX, JEOL 1200 EXII, valamint Hitachi H-7650 elektronmikroszkópokkal vizsgáltuk.

### 3.3. Immunhisztokémia

Az általunk alkalmazott módszerek az indirekt kétlépéses (fluoreszcens festékekkel vagy peroxidázzal kapcsolt IgG), illetve a háromlépéses avidin-biotin komplex (ABC) eljárás elvén alapultak.

A feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák immunhisztokémiai vizsgálata során több, összesen hét  $K^+$ -csatorna antitestet teszteltünk. Elsőként a  $K_v1$  család tagjai közül választottunk ( $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$ ,  $K_v1.4$ ), mivel a *shaker* gének nagymértékű fajok közti konzervációt mutatnak (Wymore és mtsai., 1994). A  $K_v4.2$  és  $K_v4.3$  csatornákat pedig azért vizsgáltuk, mert a szakirodalomból ismert, hogy egyes idegi struktúrákban együtt fordulnak elő (Kollo és mtsai., 2006). Végül immunhisztokémiai vizsgálatainkat kiegészítettük két további, másik  $K^+$ -csatorna családtaggal, a  $K_v2.1$  és  $K_v3.4$  csatornákkal. Az ellenanyagok közül három ( $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$  és  $K_v4.3$ ) antiszérum bizonyult sikeresnek és adott specifikus immunjelölést, ezért a továbbiakban csak ezekkel ( $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$ ,  $K_v4.3$ ) dolgoztunk a *Helix* KIR-ben.

Az 5-HT immunhisztokémiai lokalizációja céljából csak a cerebrális gangliont (PC), míg az ioncsatornák esetében a teljes KIR-t, beleértve a bukkális ganglionpárt is, 0,1 M PB-ben hígított 4%-os PFA-val rögzítettük egy éjszakán át 4 °C-on. A rögzített mintákat 1 órán át 20%-os, PB-ben oldott szacharóz oldatban szobahőmérsékleten tartottuk, majd Shandon Cryomatrix fagyasztóközegbe ágyaztuk. Ezután kriosztáttal 16  $\mu$ m-es sorozat metszeteket készítettünk, melyeket Cr-Al-zselatinnal bevont tárgylemezre vettünk fel. A metszeteket 1 órán át 0,25% BSA-t és 0,25% TX-et tartalmazó PBS (PBS-TX-BSA) oldattal blokkoltuk. A következő elsődleges antitestekkel inkubáltunk 24 órán át 4 °C-on: monoklonális anti-5-HT antitest (1:500-1000, DAKO); poliklonális nyúl anti- $K_v3.4$  és  $K_v4.3$  antitestek (1:500 vagy 1:1000; Alomone Laboratory), és monoklonális egér anti- $K_v2.1$  antitest (1:500; Neuromab/Antibodies Inc.). Ezt követően a preparátumokat 3x10 percig PBS-TX-el mostuk, majd másodlagos antitesttel inkubáltuk a primer antitesteknek megfelelően: nyúl anti-szamár IgG konjugálva FITC (fluoreszcein izotiocianát) vagy TRITC (tetraetilrodamin izotiocianát) (1:200; Dako), vagy biotin-konjugált kecske anti-egér IgG-al vagy anti-nyúl IgG-al (1:200; Vector), amit avidin-HRP inkubáció követett (1:200; Vector). Minden antiszérumot PBS-TX-BSA-ban hígítottunk és 24 órát 4 °C-on inkubáltuk, de a biotin-konjugált IgG-k 5 órát inkubálódtak szobahőmérsékleten. A HRP reakciót sötétben 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,6) oldott 0,05 % 3,3'-DAB (DAB,

Sigma-Aldrich) mint kromogén és 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szubsztrát jelenlétében tettünk láthatóvá. Sztereomikroszkóp alatt ellenőriztük a reakció előrehaladását és azt PBS-ben történő mosással állítottuk le. A metszeteket glicerin és PBS 1:1 arányú keverékével fedtük le és Zeiss Axioplan mikroszkóppal vizsgáltuk. A képi rögzítéshez Canon PS G5 típusú digitális vagy CCD (Alpha DCM510, Hangzhou Scopetek Opto-Electric) kamerát használtunk. Az antitestek specifitását negatív kontrol (elsődleges antitestek elhagyása) és preabszorpciós kontrol kísérletekkel ellenőriztük. A preabszorpciós kontrol kísérleteknél a megfelelően kihígított antitestet összekevertük az antigénnel (1 g peptid/1 g antitest), egy éjszakán át inkubáltuk velük 4 °C-on a metszeteket. Immunjelölést ezekben az esetekben nem tapasztaltunk.

### **3.4. Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémia**

A *Helix* és *Limax* KIR-eket 2,5 % PFA és 0,1 % GA keverékével (0,1 M foszfát pufferben hígítva) egy éjszakán át 4 °C-on fixáltuk. A fixált cerebrális ganglion procerebrális lebenyéből (5-HT, K<sub>v</sub>4.3) és a pedális ganglion caudo-medialis lebenyéből (K<sub>v</sub>4.3) zselatin albuminos beágyazás és 10%-os PFA-s utófixálás után rezgőkéssel (Vibratome, Pelco) 50 µm vastagságú szövetszeleteket készítettünk. A szeleteket 30 perc 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-os blokkolást majd kimosást követően PBS-TX-BSA-ban is blokkoltuk 1 órát, majd 0,25%-os PBS-TX-BSA-ban 1:500 arányban hígított monoklonális anti-5-HT antitesttel (DAKO) vagy K<sub>v</sub>4.3 antitesttel (Alomone) inkubáltuk 24 órán át 4°C-on. PBS-TX-el történt mosás (3x10 perces) után anti-5-HT esetében 4 °C-on 16 órás inkubáció következett 1:50 arányban hígított, HRP-vel kapcsolt másodlagos IgG antitesttel. Az immunhisztokémiai reakciót sötétben 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,6) oldott 0,05 % DAB (Sigma-Aldrich) és 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hívtuk elő. Az anti-nyúl K<sub>v</sub>4.3 immunreakciót egy lépéses polimer-HRP IHC detekciós rendszerrel (BioGenex) vizualizáltuk. Az antitesteket PBS-BSA-TX-ben hígítottuk és az inkubációt egy éjszakán át 4 °C-on folytattuk. Az 1% OsO<sub>4</sub>-os 0,1 M Na-kakodilát pufferelt utófixálás után a preparátumokat növekvő koncentrációjú etilalkohol sorozatban, majd propilén oxidban víztelenítettük. A víztelenítés során 70%-os alkoholban 30 percen át telített uranil-acetáttal blokkfestést végeztünk. A dehidrált szövet szeleteket propilénoxid és Araldit (Durcupan ACM, Fluka) 3:1, 1:1, 1:3 térfogatarányú keverékével infiltráltuk, majd tárgylemezen Aralditba ágyaztuk és lefedtük. 24 órás polimerizáció után fénymikroszkópban vizsgáltuk őket, illetve a jelölt elemeket

Camera lucida rendszerben követtük és rajzoltuk. Ezt követően az EM vizsgálatra érdemes szeleteket vagy területeket újra Aralditba ágyasztuk. 1 µm-es félvékony, illetve 50-60 nm-es ultravékony metszeteket (LKB Nova) készítettünk. A félvékony metszeteket festetlenül vagy 1%-os toluidinkék festés után Zeiss Axioplan fénymikroszkópban tanulmányoztuk. Az ultravékony metszeteket ólom-citráttal kontrasztoltuk és JEOL 1200 EX elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.5. Western blot vizsgálatok**

K<sub>v</sub>2.1 és K<sub>v</sub>3.3 immunoblott kísérletekhez 10 állat teljes KIR-ét és 10 állat PC-jét, míg K<sub>v</sub>4.3 esetén 10 darab teljes KIR-t, illetve a KIR-t körülvevő kötőszöveti tokot és a PC-t elkülönítve homogenizáltuk SDS-tartalmú lizáló pufferben. Az elektroforézissel elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránsávokat 5 percig mostuk 0,1% Tween-20 detergenst tartalmazó 0,1 M Tris-HCl pufferben (TBS-T) pH (7,6) majd 5%-os zsírtalan tejjel blokkoltuk 1 órát szobahőmérsékleten. Majd a megfelelő antitestekkel anti-K<sub>v</sub>2.1 (1:200, Neuromab), anti-K<sub>v</sub>3.4 (1:200, Alomone) és anti-K<sub>v</sub>4.3 (1:200, Alomone) egy éjszakán át (16 óra) 4 °C-on inkubáltuk. 3x10 perc mosást követően (0,1 M TBS-T pH 7,6) a membrán csíkokat 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a másodlagos antitestekkel: HRP-konjugált kecske anti-egér antitest (Sigma, St. Louis, MO, 1:5000) K<sub>v</sub>2.1, HRP-konjugált kecske anti-nyúl antitest (Dako, 1:2000) K<sub>v</sub>3.4 és K<sub>v</sub>4.3 antitestek esetén. Mosást (2x10 perc 0,1 M TBS-T (pH 7,6), és 5 perc 0,1 M TBS) követően a membráncsíkokon a specifikus reakciót kemiluminescens technikával, ECL reagenssel (Pierce, Rockford, IL), vagy 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,6) oldott 0,05 % 3,3 DAB (Sigma-Aldrich) kromogénnel 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szubsztrát jelenlétében tettük láthatóvá. Mindhárom antitest esetében negatív kontrol (primer antitest kihagyása) és preabszorpció kontrol (1 µg peptid/ 1 µg antitest inkubáció egy éjszakán át, szobahőmérsékleten) kísérletekkel is megbizonyosodtunk a jelölés specifitásáról.



### 3.6. Elektrofiziológia

#### 3.6.1. Patch-clamp vizsgálatok

*Limax PC globulus* sejtjein a patch-clamp kísérleteket egy korábban közölt protokoll alapján végeztük (Watanabe és mtsai., 2003). A kipreparált központi idegrendszert *Limax* fiziológias sóoldatot tartalmazó kísérleti kamrába helyeztük, melynek összetétele a következő volt: 70 mM NaCl, 2 mM KCl, 4,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 4,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glükóz és 5 mM HEPES (pH 7,0). Ezt követően a PC felszínét borító kötőszövetet csipesszel eltávolítottuk, így a PC caudális felszíne patch pipettával könnyen hozzáférhetővé vált. A patch-clamp felvételeket 409-es víz-immersiós objektívvel rendelkező differenciál interferencia kontraszt mikroszkóppal (BX51WI, Olympus) készítettük. A patch pipettában lévő oldat összetétele a következő volt: 70 mM kálium glükonát, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES (pH 7,6) és 100–250 µg/ml nystatin (Wako Chemicals). A pipetta ellenállása 8-12 MΩ volt.

A vizsgálatok során Axopatch 200B (Molecular Devices) erősítőt használtunk és a jeleket egy A/D konverterrel (Digidata 1322A, Molecular Devices) összekötött számítógépen rögzítettük. Az 5-HT lokális alkalmazása során az üvegpipettát, melynek hegye 1–2 µm átmérőjű volt, a neuronok sejttestének közelében ( $\leq 50$  µm) helyeztük el és az alkalmazott nyomás időtartama 50–200 ms (10–30 kPa) volt. Az 5-HT-t *Limax* fiziológias oldatban oldottuk fel, mely 0,05% Fast Green-t (Sigma) is tartalmazott az applikálás vizuális ellenőrzése céljából. Az 5-HT oldat kimosása fiziológias sóoldattal történt.

*Helix* PC globulus sejtjein áramméréseinket egy inverz mikroszkóp (Leitz Labovert FS) segítségével, egész-sejt konfigurációban végeztük. Több kísérlet során a sejtmembrán átjárhatóságát gyenge szívóhatás mellett 100 µg/ml nystatin oldattal is biztosítottuk. A két felvételi módszer (csak szívás; szívás és oldat) között nem tapasztaltunk különbséget. A feszültségfüggő áramokat egy EPC-7 patch-clamp erősítővel (List Electronics) és egy TL-1 DMA AD konverterrel (Axon Instruments) rögzítettük. A legtöbb elvezetéshez a PC sejtes rétegének 5-9 µm nagyságú neuronjait használtuk. Egyes esetekben, a nagyobb (10-15 µm) PC sejteket is vizsgáltuk. Az intracelluláris elektródákat boroszilikát üveg kapillárisokból (típusa PG150-T-7,5) húztuk, melyek ellenállása 6-7 MΩ volt. Az elektródákat a következő összetételű intracelluláris oldattal töltöttük: 140 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH 7,2 (NaOH-val beállítva). A legtöbb mérés

esetében a soros ellenállás kompenzálása 60 %-os szinten történt. Az elektrofiziológiai adatok analizálására és feldolgozására pClamp 5.5 programot (Axon Instruments, Union City, CA, USA) használtunk, csakúgy, mint a patch-clamp protokollok generálására az elektromos tulajdonságok rögzítése során. Felvételkor a jeleket 20 kHz-el szűrtük és a háttér áram kompenzációt automatikusan végeztünk. Az egyes áramokat speciális protokollokkal választottuk el egymástól tranziens  $K^+$ -áramok esetén, míg outward  $K^+$ -áramok esetén speciális oldatokat használtunk.

### 3.6.2. Voltage-clamp vizsgálatok

A  $K^+$ -csatornákkal kapcsolatos további elektrofiziológiai méréseinket olyan idegsejteken végeztük, amelyek a  $K^+$ -csatornák immunhisztokémiai vizualizálása során korábban jelölődést mutattak:  $K_v4.3$  (pedális ganglion, caudo-medialis lebeny neuronjai (21A ábra),  $K_v2.1$  (cerebrális ganglion, PC (16D ábra),  $K_v3.4$  (bukkális ganglion, B2 sejt, 17A ábra). A cerebrális (CG), pedális (PG) és bukkális (BG) ganglionokat kipreparáltuk, és a vastag kötőszöveti réteg eltávolítása után annak legbelső rétegét, ún. perineuriumot 5-8 percig 1% proteázzal (Sigma XIV, Sigma) emésztettük. Az elektrofiziológiai kísérleteket szobahőmérsékleten (20-22 °C) végeztük csiga fiziológiás sóoldatban (összetétel: 80 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM  $CaCl_2$ , 5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl, pH=7,4).

A vizsgált neuronok membránján keresztül folyó ionáramokat két mikroelektrodás feszültség-zár (voltage-clamp) módban regisztráltuk. A bukkális ganglion nagyméretű neuronjai esetén GeneClamp erősítőt (Axon Instruments, Union City, USA), míg a PC kisméretű, valamint a pedális lebeny neuronjainál AxoClamp 2B erősítővel dolgoztunk. Az intracelluláris elektródákat boroszilikát üveg kapillárisokból húztuk (típusa 1B1150F-3 WPI), amelyek ellenállása 4–6 M $\Omega$  volt, és amelyeket 4 mM Na-acetáttal vagy 2,5 mM KCl-al töltöttünk. Az áramméréseknél az intracelluláris jelek gyűjtését és feldolgozását Digidata interface és pCLAMP szoftver (Axon Instruments) segítségével végeztük. A kapacitás és kicsorgási áram kompenzációját analóg illetve P/4 protokollal végeztük. A kísérleti kamrát folyamatosan perfundáltuk csiga fiziológiás oldattal. A kísérletek egy részénél a tranziens  $K^+$ -áram regisztrátumok felvételekor a fiziológiás sóoldatban a következő komponenseket változtatattuk meg: tetraetilammonium (TEA, Sigma) 5 vagy 10 mM-ról 15 mM-ra növelve, illetve a NaCl-ot cukorra cserélve. Cukorban és 15 mM TEA oldatban a Na-függő bemenő áramok és az A-típusú  $K^+$ -áram kivételével a  $K^+$ -áramok eltűnnek. A kísérleti oldatokat a fürdőfolyadékba egy 10 ml-nél kisebb térfogatú

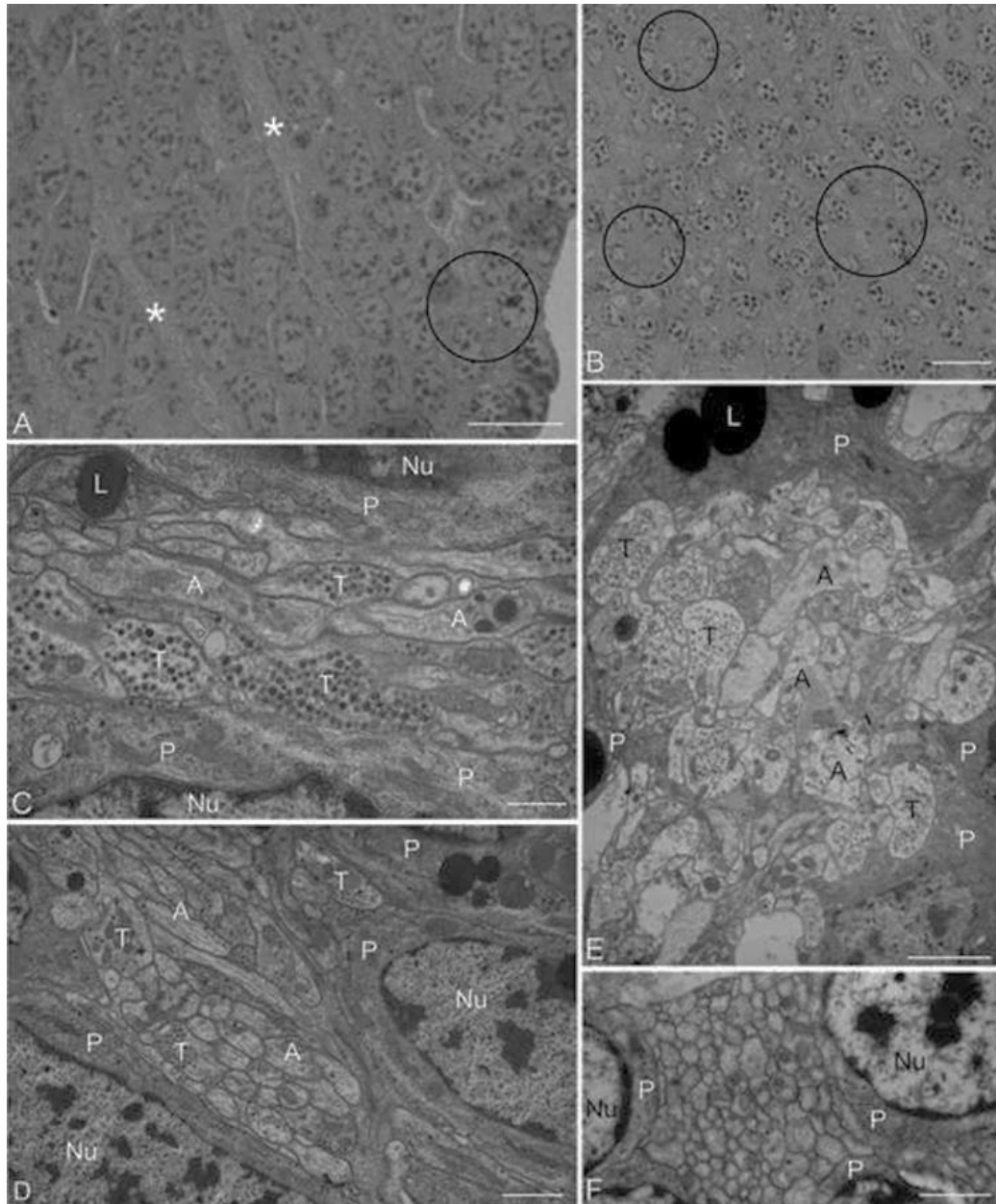
elosztóegységből jutattuk. A pipettát (20 mm) közvetlenül a vizsgálandó sejt szomája fölé helyeztük, miközben a kifolyó folyadék sebességét hidrosztatikus nyomással szabályoztuk. Ez a rendszer az oldatok gyors és kizárólag lokális cseréjét tette lehetővé a sejtek természetes funkciójának minimális megzavarásával. A  $K^+$ -csatornák blokkolására a következő anyagokat használtuk: BDS-II (vérnyomás csökkentő, Alomone), 4-aminopyridine (4-AP, Sigma).

## 4. EREDMÉNYEK

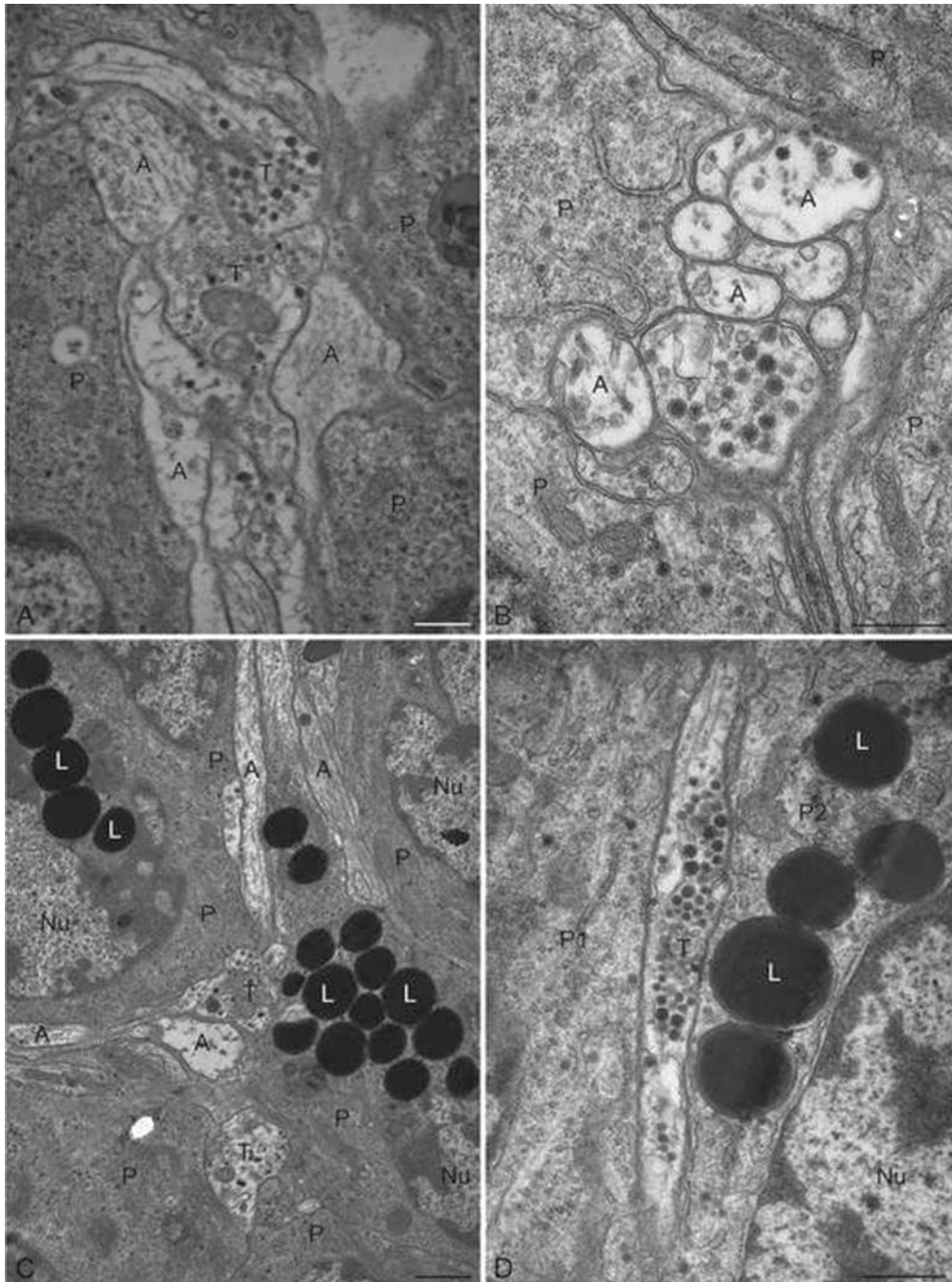
### 4.1. A globulus sejtréteg ultrastruktúrája és szinaptológiája

#### 4.1.1. Általános felépítés

*Helix* és *Limax* PC-ben félvékony metszeteken a globulus sejtek rétegében teljes mélységben jellegzetes lokális neuropil régiók voltak megfigyelhetők (6. ábra). Ezek az egységek viszonylag nagy számban fordultak elő a PC-ben és neuropil metszési síkjától függően ovoid régiók voltak (6B ábra), vagy szeptum-szerű struktúrák (trajektóriák) formájában jelentkeztek (6A ábra). Ez utóbbiak kapcsolatban álltak a terminális (medulláris) neuropillel. *Helix*-hez hasonlóan *Limax*-ban is különböző kiterjedésű neuropil egységeket azonosítottunk a globulus sejtek rétegében (6C-E ábrák), melyek keverten tartalmaztak változatos átmérőjű, granuláris vezikulákból álló varikozitásokat illetve elektron transzparens, csak mitokondriumokat és neurotubulusokat tartalmazó axonprofilokat. Továbbá több perikaryonnal is körbevett nagyszámú, igen vékony, feltehetőleg érzőrostokból álló axonkötegeket tartalmazó egységek is előfordultak (6F ábra). A globulus sejtek rétegében jelen lévő neuropil régiók elektronmikroszkópos vizsgálata során megállapítható volt, hogy a nagyobb méretű egységek fokozatosan felrostozódtak és végül individuális elemekben végződtek. A kisebb kiterjedésű neuropilek csak néhány axonprofilt tartalmaztak és sokkal szorosabb kapcsolatot formáltak a közelükben lévő globulus sejtek perikaryonjaival, végül egész mélyen beékelődtek a perikaryonok közé (7A-C ábra). Individuális axon nyúlványok hosszan futottak az egymás mellett sűrűn elhelyezkedő sejttestek között, a granuláris és agranuláris vezikulákat tartalmazó varikozitásaik pedig már szoros membránkapcsolatban álltak a neuronokkal, azokba mélyen beékelődtek (7D, 8A, B ábrák). A globulus sejtek között jelen lévő neuropil régióknak ez a szerveződési formája olyan helyi finomszabályozási folyamatokra utal, mely által lokális és gyors hatások befolyásolhatják a neuronok aktivitását.



**6. ábra** Neuropil régiók *Helix* (A-D) és *Limax* (E, F) szaglólélebenyének (procerebrum, PC) sejtes rétegében. **A, B:** 1  $\mu$ m-es félvékony metszetekben toluidin festést követően jól láthatók a nagyszámú globulus sejt között elhelyezkedő kisebb helyi neuropil régiók (csillagok, körök). **C, D:** Ultrastrukturális szinten jól látható, hogy a globulus sejtek (P) között elhelyezkedő lokális neuropil régiók granuláris vezikulákat tartalmazó (T) illetve csak mitokondriumokat és/vagy neurotubulusokat tartalmazó (A) axonprofilokból állnak. A neuropilek közvetlen kapcsolatban állnak a körülöttük elhelyezkedő perikaryonokkal. **E:** Egy nagyobb kiterjedésű neuropil egységet számos sejttest (P) vesz körül, melyben mind granuláris vezikulumot tartalmazó (T), és mind "tiszta" axonprofilok is jelen vannak. **F:** Nagyszámú kisméretű axonprofil helyezkedik el a sejttestek (P) között, melyek feltehetően egy szenzoros rostköteg elemei. Arányméretetek: A, B: 10  $\mu$ m C, E: 1  $\mu$ m, D, F: 2  $\mu$ m



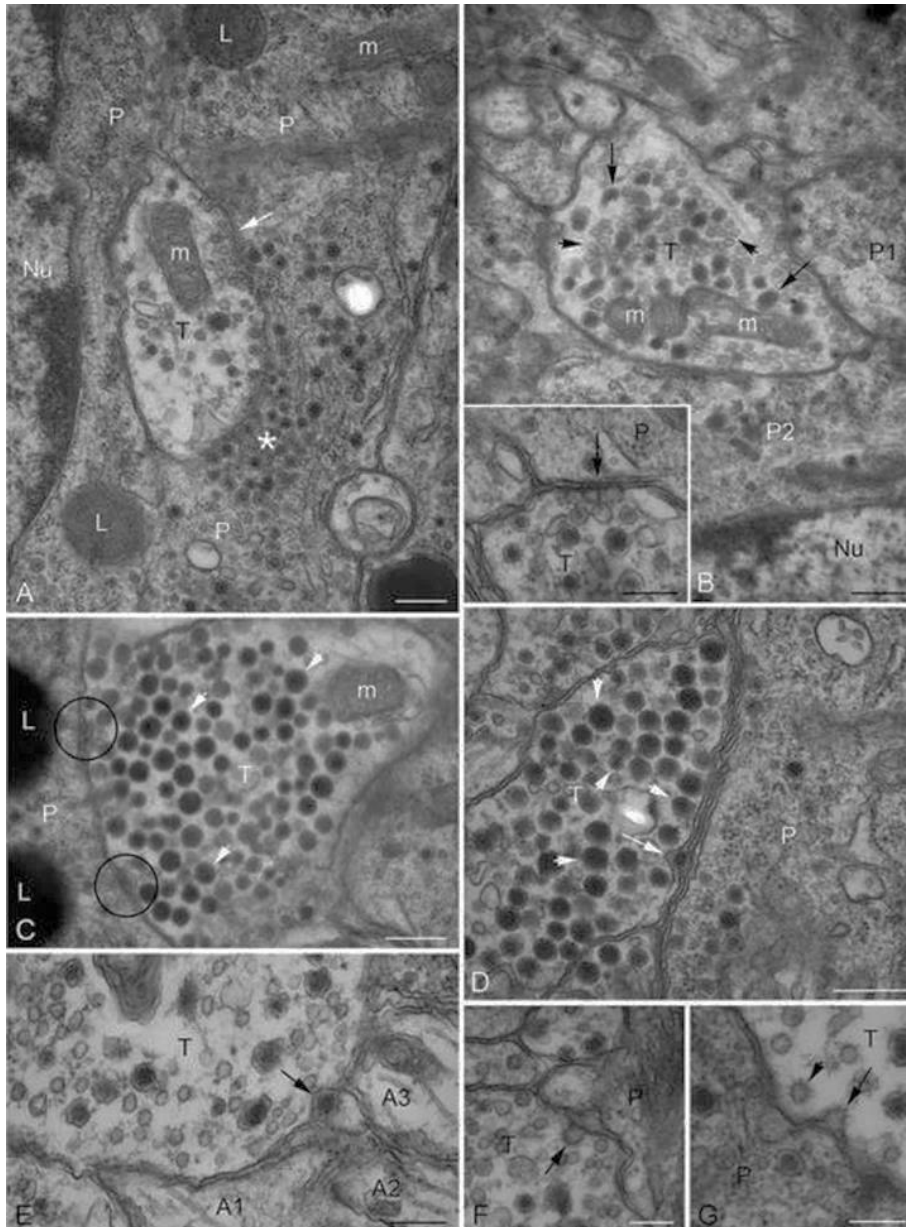
**7. ábra A PC neuropil régióinak ultrastrukturális szerveződése – axonkötegek fokozatos elágazódása, felrostozódása (*Helix*). **A:** Globulus sejtestek (P) között axonokat (A) és varikozitásokat (T) tartalmazó kisebb neuropil régió. **B:** Egy, az A képen láthatónál már kisebb axon köteg számos sejtest (P) közé mélyen beágyazódva helyezkedik el. **C:** A neuronok sejtestjei között axonális nyúlványok (A) szinte teljesen felrostozódva futnak. Jól megfigyelhetők a perikaryonokkal (P) kapcsolatba lépő varikozitások (T) is. **D:** Egy számos granuláris és agranuláris vezikulát tartalmazó axonprofil (T) két globulus sejtesttel (P1, P2) hosszú membránszakaszok mentén kapcsolatban áll. L - nagyméretű lizoszóma-szerű elektron-denz granulumok, Nu - sejtmag. Arányméretek: A, B, D: 1  $\mu$ m, C: 2  $\mu$ m**

#### 4.1.2. Axo-szomatikus kapcsolatok és szinaptikus konfigurációk

A PC sejtes rétegének ultrastrukturális elemzése során az axo-szomatikus kapcsolatok rendszeres és nagy változatosságot mutató előfordulása volt jellemző (8, 9. ábrák). Specializált és membránspecializációt nem mutató, a globulus sejtek perikaryonjába mélyen beágyazott varikozitások jellemezték az axo-szomatikus kapcsolatokat (8A, B ábrák). A varikozitásokat nagyszámú granuláris és agranuláris vezikulák jelenléte jellemezte, melyek közül a specializált kapcsolat mentén csak a szinaptikus, agranuláris vezikulák felhalmozódása volt megfigyelhető (8A ábra). Ugyanakkor a beágyazott varikozitással szemben a posztzinaptikus perikaryonális membránszakasz mentén esetenként nagyszámú granuláris vezikula feldúsulása is előfordult (8A ábra). Az axo-szomatikus és axo-axonikus kapcsolatok ultrastrukturális elemzése során olyan jellegzetes membrán konfigurációkat is rendszeresen megfigyeltünk, melyek a szoros membrán kontaktusok mentén a nem-szinaptikus, aktív hírvívő felszabadulás jelenségére, az exocitózis folyamatára utaltak (8C-G ábrák). A granuláris vezikula tartalom aktív felszabadulását bizonyító (8C-E ábrák), illetve a felszabadulást követő membrán visszanyerést (retrieval) mutató elrendeződéseket egyaránt találtunk (8F, G ábrák).

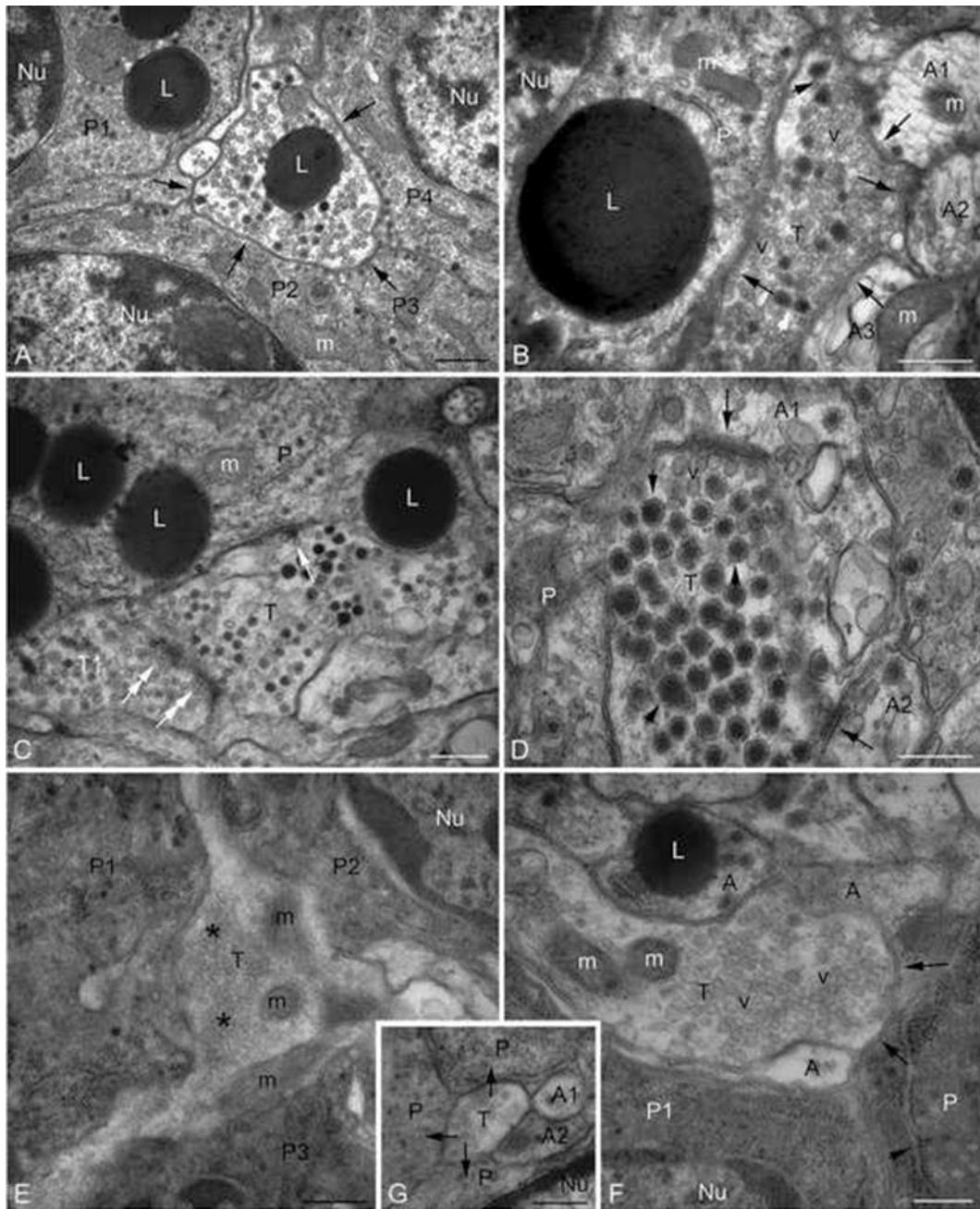
A lokális neuropilekben megfigyelt axo-szomatikus és axo-axonikus kapcsolatok a szinaptikus konfigurációk számos formáját hozták létre. Varikozitások egyidejűleg több perikaryonnal (9A ábra), illetve egy perikaryonnal és egy vagy több axonprofíllal is kapcsolatba léptek (9B, D ábrák), ami a szinaptikus divergencia jelenségnek felelt meg. Megfigyeltünk olyan végződéseket is, melyek miközben globulus sejttestekkel álltak kapcsolatban, egyidejűleg maguk is kaptak szinaptikus bemenetet (9C ábra), mely a preszinaptikus moduláció folyamatára utalt. A szinaptikus konfigurációk hasonló, divergenciára utaló formái *Limax* PC-ben is jelen voltak (9E-G ábrák).

A *Helix* és *Limax* PC sejtes réteg szinaptikus kapcsolatainak különböző formáit a 10. ábrán összegeztük. Sematikusan ábráztuk mind az axo-szomatikus mind az axo-axonikus interakciókat, valamint a szinaptikus és nem-szinaptikus membrán konfigurációkat (10. ábra - betétkép). Mindezek a helyi integratív folyamatok és szabályozási mechanizmusok széles skáláját teszik lehetővé, melyeknek feltehetően szerepük van a PC neuronok aktivitásának finomszabályozásában és így a szaglász integratív folyamatainak végső meghatározásában is.



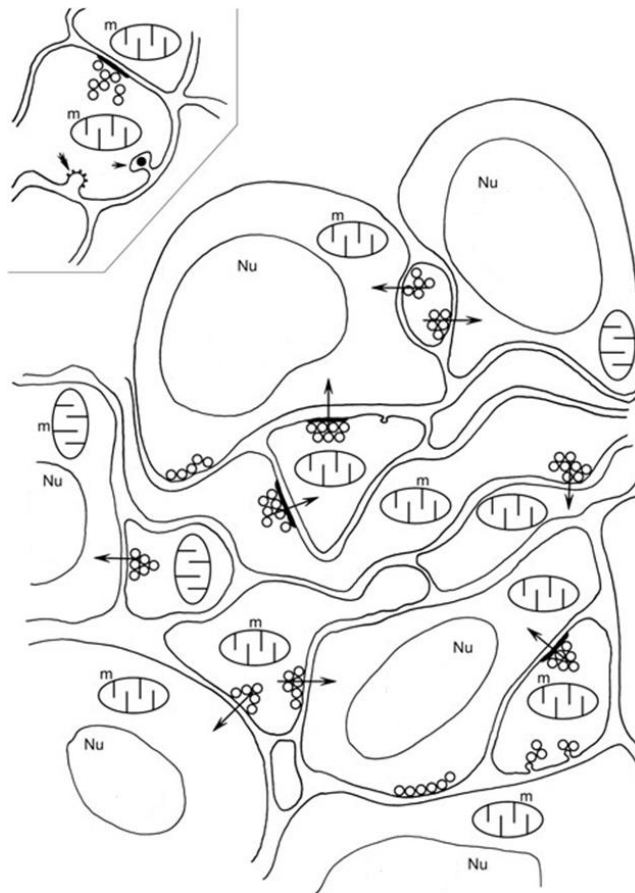
**8. ábra Szinapszisok és membránkonfigurációk *Helix* PC-ben.** **A:** Egy globulus sejttestbe (P) mélyen beágyazódó végződés (T) szinaptikus kapcsolatot létesít (nyíl). A citoplazmában a varikozitással szemben nagyszámú granuláris vezikula felhalmozódás figyelhető meg (csillag). **B:** Egy varikozitás (T) két sejttesttel is (P1, P2) szoros membránkapcsolatot létesít. Nyílhegyek: agranuláris, nyilak: granuláris vezikulák. **Betét:** A varikozitásnak a sorozatmetszet egy további tagjában megjelenő specializált axo-szomatikus (T, P) kapcsolata (nyíl). **C-G:** Nem specializált axo-szomatikus kapcsolatok membrán konfigurációi. **C:** Egy számos denz granulomot tartalmazó (nyílhegyek) nagyméretű varikozitás (T) szoros membránkapcsolata mentén két exocitózisra utaló jelenség is megfigyelhető (körök). **D:** Exocitózis (nyíl) egy varikozitás (T) axolemmája mentén egy perikaryon (P) mellett. **E:** Exocitózissal felszabaduló denz granulum tartalom (nyíl) egy varikozitásból (T), mely egyidejűleg több axonprofillal (A1-A3) áll kapcsolatban. **F, G:** Endocitotikus membrán konfigurációk (nyilak) és „coated pit” (nyílhegy) axo-szomatikus (T, P) kapcsolatok mentén. Nu - sejtmag, L - lizoszóma-szerű elektron denz granulum, m - mitokondrium. Arányméretek: A, B: 0,5  $\mu\text{m}$ , C: 0,3  $\mu\text{m}$ , D: 0,4  $\mu\text{m}$ , betét: 0,25  $\mu\text{m}$ , E: 0,25  $\mu\text{m}$ , F, G: 0,15  $\mu\text{m}$





**9. ábra Szinaptikus konfigurációk *Helix* (A-D) és *Limax* (E-G) PC globulus sejtrétegében. A:** Egy varikozitás (T) egyidejűleg négy sejttesttel (P1–P4) is kapcsolatban áll (nyilak), mely elrendeződés divergenciára utal. **B:** Számos vezikulát (v) és granulumot (nyílhegy) tartalmazó varikozitás (T) egyidejűleg három axonprofillal (A1–A3) és egy sejttesttel (P) is kapcsolatban áll (nyilak) (kétirányú, axonális és perikaryonális szinaptikus divergencia). **C:** Egy varikozitás (T) szinaptikus kapcsolatot (nyíl) létesít egy sejttesttel (P) és egyben bemenetet kap (kettős nyilak) egy másik varikozitásból (T1) (preszinaptikus moduláció). **D:** Egy nagyméretű granulumokat (nyílhegyek) tartalmazó varikozitás szinaptikus kapcsolatot (nyilak) létesít két axonprofillal (A1, A2). **E:** Számos agranuláris szinaptikus vezikulát (csillagok) tartalmazó interszegmentális varikozitás (T) három sejttesttel (P1–P3) is kapcsolatban áll. **F:** Egy szinte kizárólag agranuláris szinaptikus vezikulákat (v) tartalmazó varikozitás (T) egy sejttesttel (P) és számos axonprofillal (A) áll kapcsolatban. Egy másik sejttest (P1) egy vékony axon nyúlvánnyal határolt. **G:** Három kisméretű axonprofil (T, A1, A2) szorosan beágyazódik három sejttest (P) közé. Az egyik profil (T) szoros membrán kapcsolatot létesít a sejtekkel (nyilak). Nu - sejtmag, L - lizoszóma-szerű

elektron denz granulum, m - mitokondrium, nyílhegyek - riboszómális endoplazmatikus retikulum.  
 Arányméreték: A-D: 0,5  $\mu\text{m}$  E-G: 0,4  $\mu\text{m}$



**10. ábra A PC (*Helix* és *Limax*) sejtes réteg szinaptológiája.** A séma a 6.,7. és 8. ábrán bemutatott eredmények összegzésén is alapul. **Betét:** Szinaptikus és nem-szinaptikus kapcsolatok membrán-specializációi. A szinaptikus és nem szinaptikus kapcsolatok (nyilak) a szabályozási folyamatok széles skáláját teszik lehetővé, mely által a PC sejtek aktivitását befolyásolják. A B (tüzelő) és NB (nem tüzelő) neuronok között nem tettünk különbséget. A feltüntetett végződések feltehető eredete: i) tapogató ganglion; ii) intrinsic PC neuronok és iii) extrinsic cerebrális és pedális neuronok. Nu - sejtmag, szürke ovoid szimbólumok - sejtmagvacska, m - mitokondrium.

## 4.2. Az 5-HTerg innerváció kémiai-neuroanatómiája a szaglőlebenyben

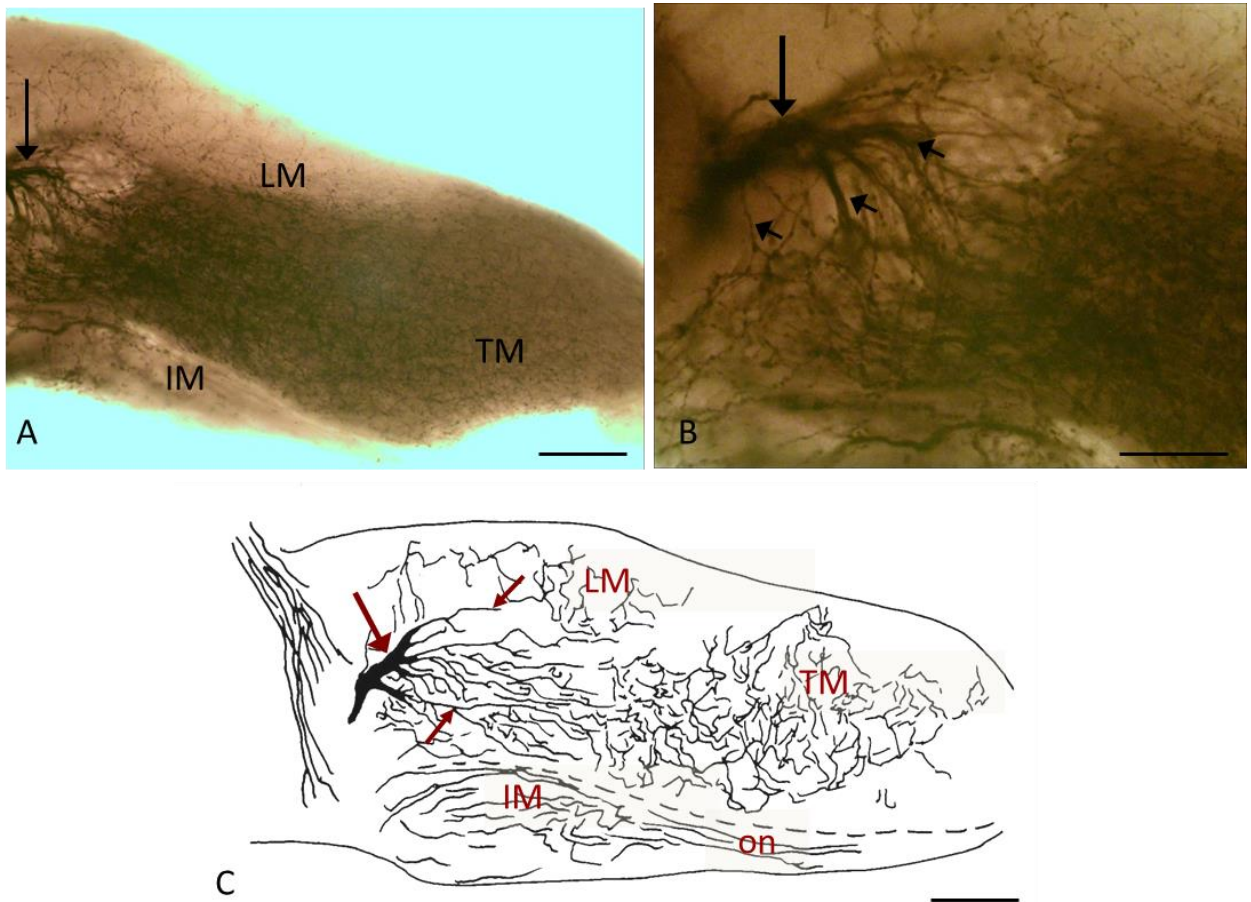
### 4.2.1. A *Helix* procerebrum 5-HT-immunreaktív innervációja

Fénymikroszkópos vizsgálataink során *Helix* PC-ben 50  $\mu\text{m}$  vastag szeleteken feltártuk az 5-HTerg innerváció jellegzetességeit (11, 12. ábra). Általánosságban

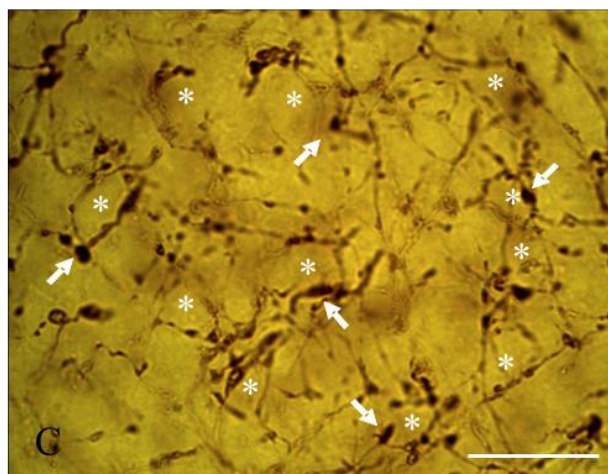
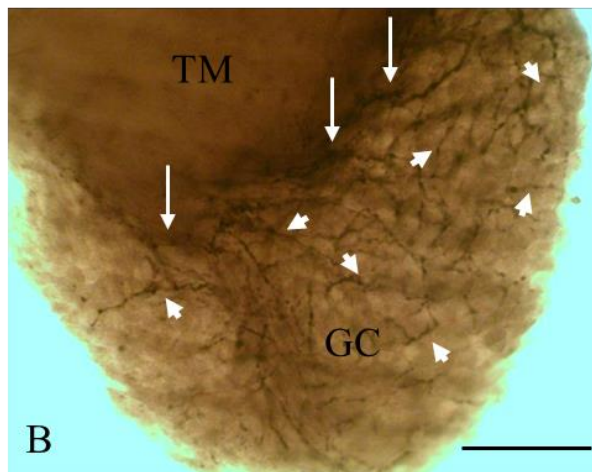
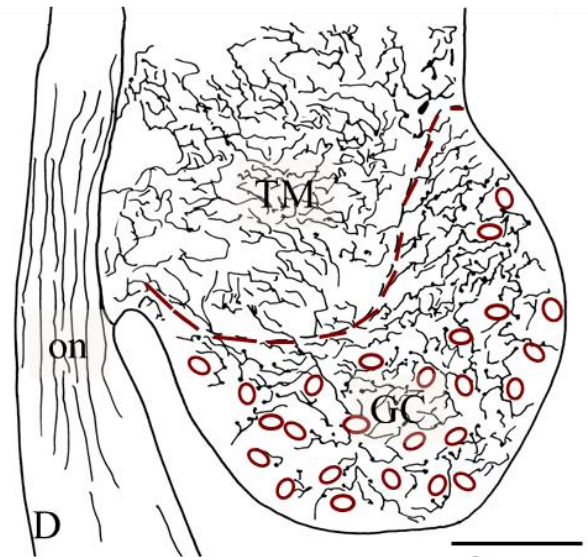
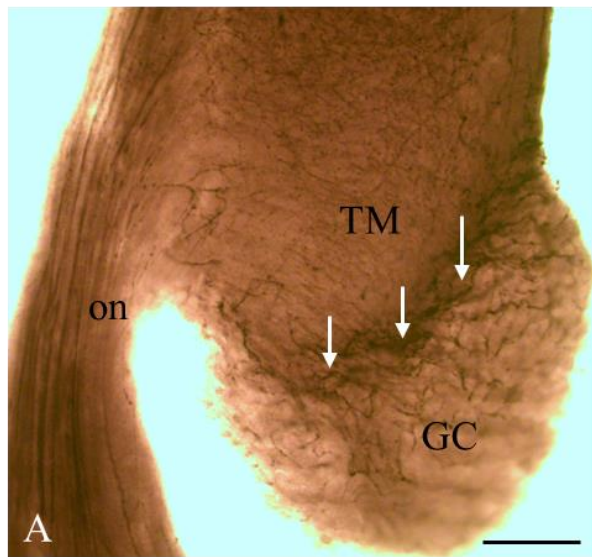
elmondható, hogy a teljes szaglólebenyben jelentős számú 5-HT-IR rost volt jelen. Nagyobb nagyítású felvételeken jól látható volt, amint az elágazó rostrendszerek eltérő denzitású hálózatot formáltak az egyes neuropil régiókban, valamint a globulus sejtek rétegében.

Az 5-HT-IR innerváció kialakításában meghatározó volt a PC területére kívülről belépő, a poszt(meta)cerebrumban eredő vastag axonköteg, mely nagy számban tartalmazott jelölt rostokat és a PC területére lépve gazdagon elágazott (11. ábra). A rostok behálózták a teljes procerebrális neuropil területet is, ugyanakkor az immunreakció erősségében az egyes neuropil régiókban különbségek mutatkoztak. A legsűrűbb hálózat a terminális neuropil területén jelent meg, az 5-HTerg rostok a teljes terminális neuropil mélységében karakteres, hálózat jellegű mintázatot adtak (11A ábra), mely eredete visszavezethető volt a posztcerebrumból érkező axonköteg főbb leágazódásaira (11B ábra.) A belső (internális) és szélső (laterális) neuropil területeken kevésbé sűrű hálózatot sikerült feltárnunk, azonban az innerváció mintázata egyértelművé tette, hogy a kisebb számban jelen lévő jelölt rostok mégis teljesen behálózzák a neuropil régiókat (11A ábra). Camera lucidával történt axon követés is igazolta az egyes neuropil területek eltérő mértékű 5-HT-IR innervációját (11C ábra). Az eltérő erősségű, de mégis egységes mintázattal jelen lévő innerváció a PC neuropil régióiban egy egységes 5-HTerg szabályozási mechanizmusra utal.

Jelentős számú 5-HT-IR rost volt továbbá jelen a terminális neuropil és a globulus sejtek rétegének határán, melyek beléptek a PC sejtes rétegébe (12A, B ábrák). A tapogatókból érkező szaglóidegben párhuzamosan futó jelölt axonok a PC területére érve többszörösen elágazó nyúlványokra bomlottak, alátámasztva azt, hogy a PC 5-HTerg beidegzése nem csak központi, hanem perifériás idegi struktúrákból is származhat (12A, D ábrák). A terminális neuropil és a sejtes réteg határán lévő rostkötegből a sejtes rétegbe belépő axonok sűrűn elágaztak, és gyakran kosárszerűen vették körbe a neuronok sejttestjeit, melyek esetében nagyobb nagyításban jól megfigyelhetővé váltak az 5-HT-IR varikozitások is (12B, C ábrák). Camera lucidával történt követéssel is megerősítettük, hogy a sejtes rétegben is számos elágazó varikozus 5-HT-IR rost van jelen (12D ábra), melyek az egyes globulus sejttesteket individuálisan innerválják (12E ábra).



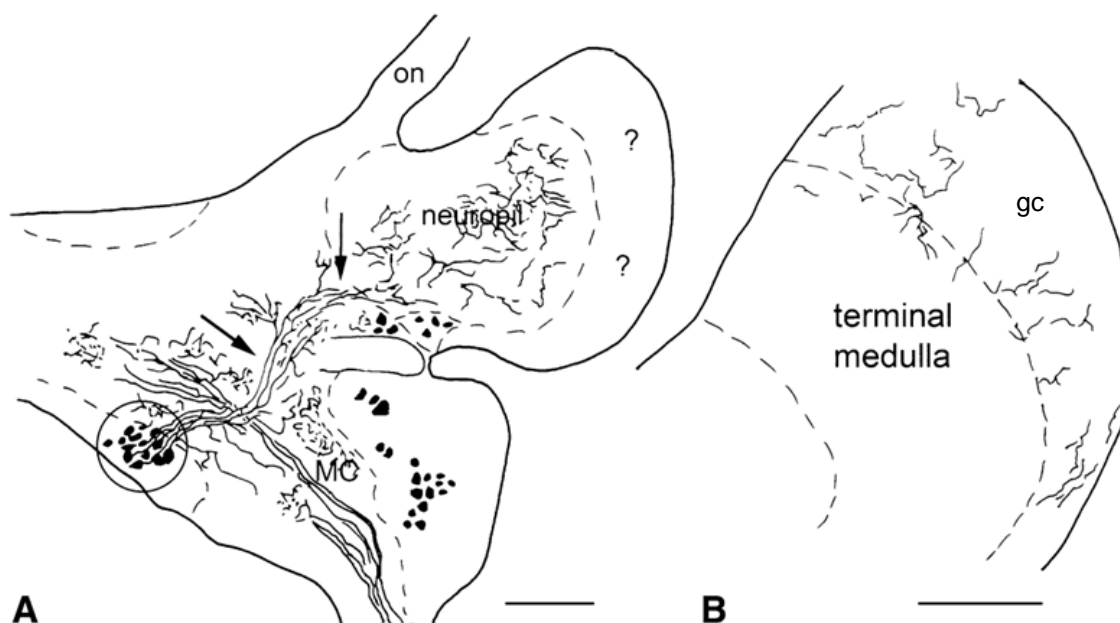
**11. ábra A *Helix* PC extrinsic 5-HT-IR innervációja és szerveződése a medulláris neuropil területén.** **A:** Egy posztocerebrumban eredő vastag axon köteg (nyíl) lép be a PC területére, gazdagon elágazódik és vetül a teljes procerebrális neuropil területére. **B:** Nagyobb nagyítás a belépő vastag axonkötegről (nyíl), melynek számos vastagabb leágazása után (nyílhegyek) varikózus rostokra történő, különlegesen gazdag arborizációja jól megfigyelhető. **C:** Camera lucida rajz jól mutatja a PC 5-HT-IR innervációs rendszerét és egyben az egyes neuropil területek eltérő erősségű innervációját. Szagittális 50  $\mu\text{m}$ -es Vibratome szeletek. IM - internális neuropil, TM - terminális neuropil LM - laterális neuropil, on - szaglóiideg. Arányméretetek: A, C: 100  $\mu\text{m}$ , B: 20  $\mu\text{m}$



**12. ábra 5-HT-IR innerváció a *Helix* PC sejtes rétegében.** A, B: A 5-HT-IR innerváció alacsony és közepes nagyításban. A nyilak mutatják a jelölt varikózus rostok belépését a terminális neuropil (TM) területéről, melyek ezután a perikaryonális réteg (GC) teljes mélységében megfigyelhetők (B, nyílhegyek). A szaglőidegben (on) is párhuzamosan futnak a jelölt rostok (A), melyek egy része szintén a neuropil régiókba vetül. C: A sejtes rétegben az 5-HT-IR rostok kosárszerűen veszik körbe a perikaryonokat (csillagok). Nyilak: 5-HTerg varikozitások. D, E: Camera lucida rajzok a sejtes réteg (GC) és a terminális neuropil (TM)(D), valamint nagy nagyításban a sejtek individuális (E) innervációs mintázatáról. Arányméretetek: A, B: 60  $\mu$ m, C: 80 $\mu$ m, D: 15  $\mu$ m

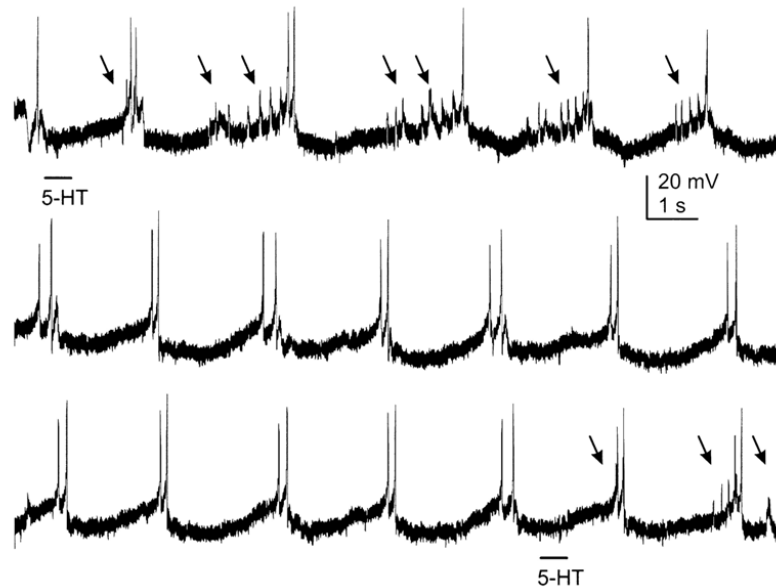
#### 4.2.2. A *Limax* procerebrum 5-HTerg innervációja

Korábbi immunfluoreszcens vizsgálatok során a *Limax* PC kompakt 5-HT-IR innervációját írták le a neuropil régiókban (Kobayashi és mtsai., 2010). Jelen munkánk során HRP-DAB vizualizálást követően és camera lucida követéssel nemcsak PC neuropil területeinek 5-HT-IR innervációs rendszerét és annak eredetét sikerült feltárnunk (13A ábra), hanem erősebb nagyítással a PC sejtjes rétegében rendkívül finom, ritka elrendezésben jelen lévő rostokat is megfigyeltünk (13B ábra).



**13. ábra 5-HT-IR elemek a *Limax* PC-ben.** 50  $\mu$ m vastag Vibratome szeletek camera lucida követése alapján (HRP-DAB reakció). **A:** 5-HT-IR rostok (nyilak), a metacerebrumba (MC) komisszurális lebenyből (bekarikázva) eredve a medulláris neuropilbe vetülnek, ahol elágazódnak. **B:** Nagyobb nagyítás mellett 5-HT-IR nyúlványok a PC sejtjes rétegében (gc) is követhetők, ahol azonban a *Helix*-ben megfigyeltekhez viszonyítva (12. ábra) sokkal kisebb számban vannak jelen. on - szaglóideg. Arányméreték: A: 100  $\mu$ m, B: 50  $\mu$ m

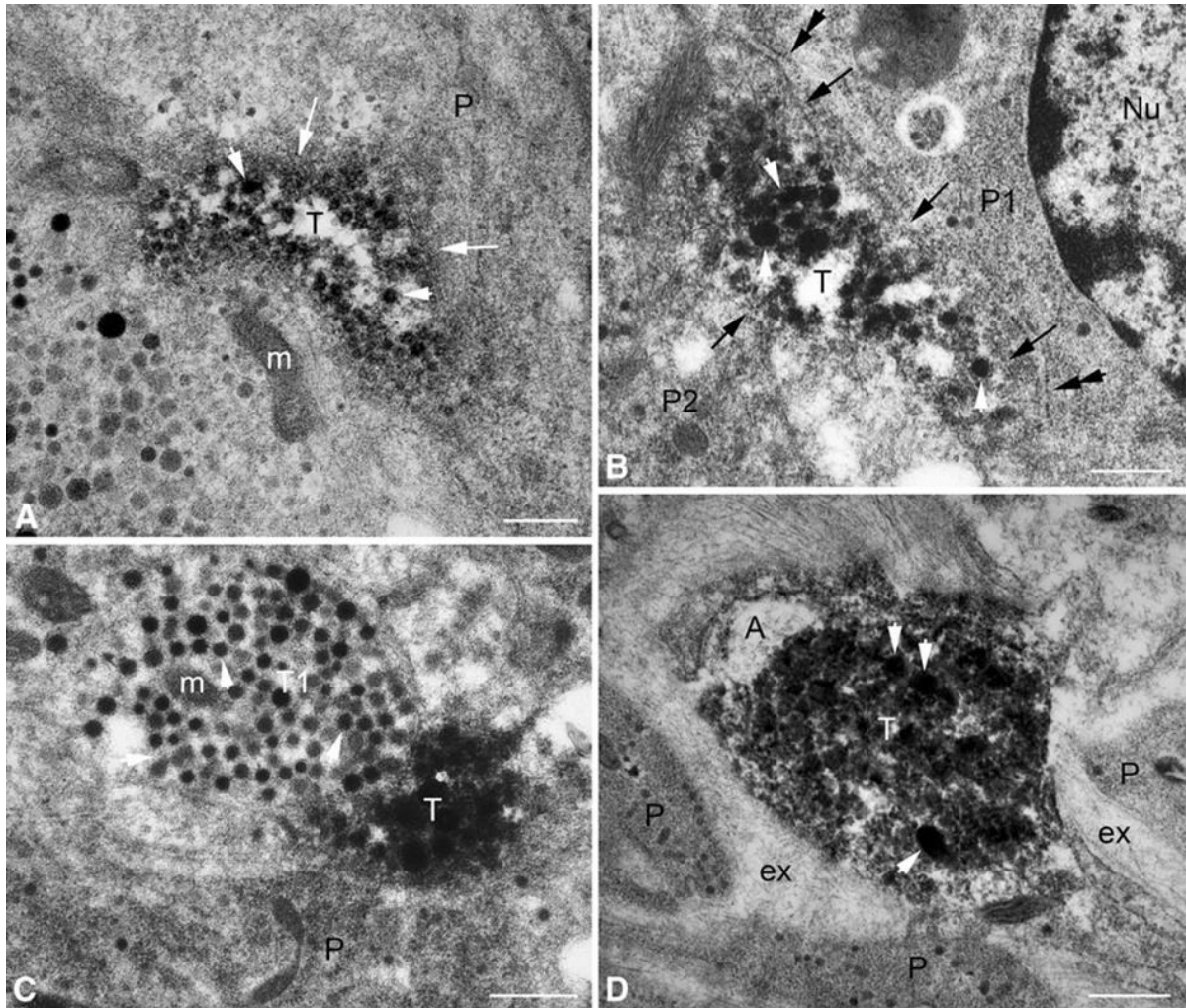
Mint ahogy a *Limax* PC sejtjes rétegében az 5-HT-IR innerváció még az immerziós feloldással is csak igen sporadikusnak bizonyult, teszteltük a globulus sejtek 5-HT érzékenységét elektrofiziológiai úton patch-clamp technika segítségével. A globulus sejtrétegre történő 1 mM 5-HT lokális applikációját követően a tüzelő sejtek fokozott EPSP aktivitása volt megfigyelhető (14. ábra). A nem tüzelő neuronok esetében csak EPSP-k megjelenését csak esetenként tapasztaltuk.



**14. ábra** Lokális 5-HT hatás patch-clamp módban történő rögzítése *Limax* PC-ben. 1 mM 5-HT hozzáadását követően (vízszintes sávok a felső és alsó felvételek alatt) megnövekedett EPSP aktivitás (nyilak) tapasztalható a B neuronokban.

#### 4.2.3. Az 5-HT-immunreaktív innerváció ultrastrukturális jellemzői

Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálataink során feltártuk a *Helix* szaglóközpontban jelen lévő 5-HT-IR elemek ultrastrukturális jellemzőit (15, 16. ábrák). A jelölt axonprofilokkal kapcsolatban nem sikerült specializált szinaptikus kapcsolatokat megfigyelni, melynek egyik lehetséges oka, hogy az erős immunhisztokémiai reakció elfedte azokat. A másik lehetséges magyarázat az, hogy a nagyon alacsony (0,1%) glutáraldehid koncentráció nem volt optimális a szinaptikus membránspecializációk megőrzéséhez. Továbbá a detergens TX alkalmazása kifejezetten rontja a membránok szerkezetét. Ugyanakkor az 5-HT-IR varikozitások gyakran alkottak szoros, de nem specializált membrán kapcsolatokat egy (15A, C ábra) vagy több perikaryonnal (15B, D ábra) is a PC sejtes rétegében. A jelölt profilok legtöbb esetben számos granuláris vezikulát tartalmaztak (15A ábra), míg közelükben nagyszámú, de eltérő típusú változó elektron denzitású granulumokat tartalmazó jelöletlen axonokat lehetett megfigyelni. Egyes esetekben nagyméretű 5-HT-IR végződések több perikaryon közé is benyomultak, miközben széles extracelluláris tér választotta el őket a sejtestektől (15D ábra).



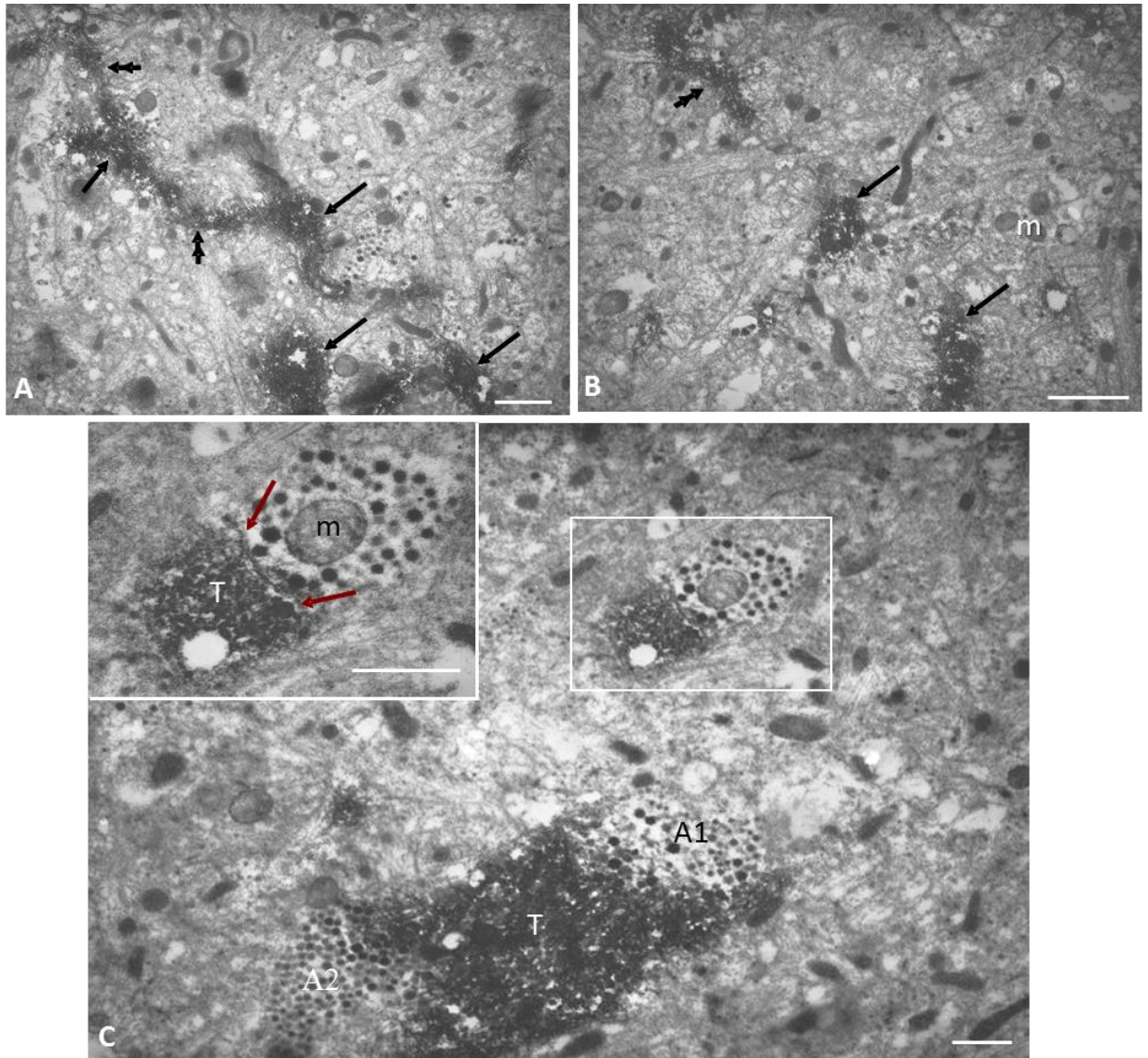
**15. ábra Az 5-HT-IR varikozitások ultrastruktúrája a PC sejtes rétegében.** **A:** Néhány granuláris vezikulát (nyílhegyek) tartalmazó jelölt varikozitás (T) kapcsolatot létesít (nyilak) egy perikaryonnal (P). A kép bal oldalán egy számos változó elektron denzitású granulumot tartalmazó jelöletlen axonprofil látható. **B:** Egy hasonló, granuláris vezikulákat (nyílhegyek) tartalmazó jelölt varikozitás (T) közeli, membránspecializáció mentes kapcsolatot létesít két perikaryonnal (P1, P2). **C:** Jelölt axonprofil (T) egy perikaryon (P) és egy nagyméretű számos elektron denz granulumot (nyílhegyek) tartalmazó axonprofil (T1) között helyezkedik el. **D:** Nagyméretű 5-HT-IR axonprofil (T) több sejttest (P) közé nyúlik be, melyektől széles extracelluláris tér (ex) választja el. Nu - sejtmag, m - mitokondrium, A - jelöletlen axon, kettős nyílhegy - riboszomás endoplazmatikus retikulum. Aránymértékek: A-D: 0,25  $\mu$ m

A PC különböző neuropil régiói több olyan 5-HT-IR profilt tartalmaztak, melyek axo-axonikus kapcsolatot is létesítettek (16. ábra). A hosszan követhető intervarikozus axon szakaszok és kiöblösödő varikozitásaik hosszan követhetőek voltak a terminális neuropilben (16A, B ábrák). A neuropil régió nagyméretű granuláris vezikulákat

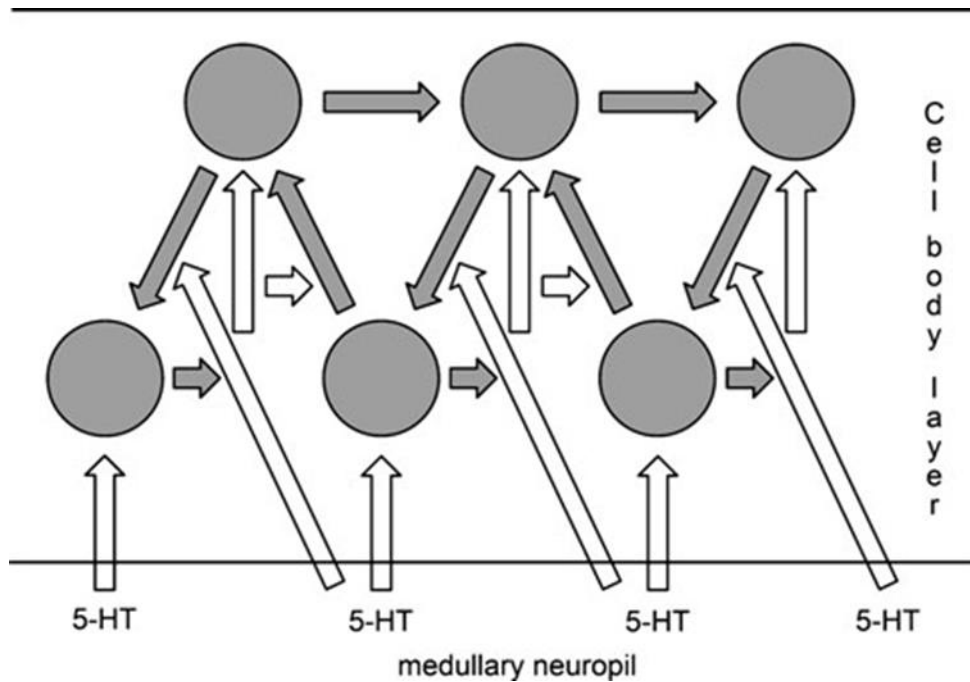


tartalmazó jelölt axonprofiljai jelöletlen axonprofilokkal szoros, de membránspecializáció mentes kapcsolatokat alakítottak ki. A belső (internális) neuropil 5-HT-IR innervációja nem mutatott eltérő képet a terminális neuropilhez képest. A jelölt rostok jelöletlen elemek közelében helyezkedtek el, egyes esetekben a nagyméretű 5-HT-IR varikozitások közeli, de nem specifikus membrán kapcsolatban álltak a jelöletlen profilokkal (16C ábra).

A *Helix* PC sejtes réteg 5-HTerg innervációja és az egyes sejtközötti kapcsolatok sematikus összefoglalása a 17. ábrán látható. A PC területére lépve az 5-HTerg rostok elágazódnak és innerválják az egyes globulus sejteket mind perikaryonális, mind axonális szinten. Az erőteljes és egész PC területére kiterjedő 5-HTerg innerváció, mely egy több szinten megvalósuló szabályozási rendszert alkot, végső soron egy széleskörű, a szaglási információk feldolgozásában és így a viselkedési válasz kialakításában is meghatározó modulációs rendszert hoz létre.



**16. ábra 5-HT-IR elemek és axo-axonikus kapcsolatok a PC neuropil régiójában. A, B:** Jelölt varikózus nyúlványok (nyilak) a terminális neuropilben kisméretű jelöletlen elemek közé ágyazva. Kettős nyilak: intervarikózus axonszakaszok. **C:** Az internális neuropilben egy nagyméretű jelölt varikozitás (T) két posztzinaptikus axonprofillal (A1, A2) létesít kapcsolatot. **Betét:** Nagyobb nagyítású kép a C ábrán bekeretezett axo-axonikus kapcsolatról. Nyilak egy szoros, de nem specializált membrán kapcsolat jeleznek. m - mitokondrium. Arányméreték: A, B: 1  $\mu$ m, C: 1  $\mu$ m, betét: 0,5  $\mu$ m



**17. ábra A *Helix* PC sejtjes réteg 5-HT-IR innervációs rendszerének sematikus ábrázolása.** Az extrinsic 5-HTerg rostok (fehér nyilak) belépnek a PC sejtjes rétegébe, ahol az egyes PC neuronokat mind perikaryonális, mind axonális szinten innerválják. A B és az NB neuronok között nem tettünk különbséget. A

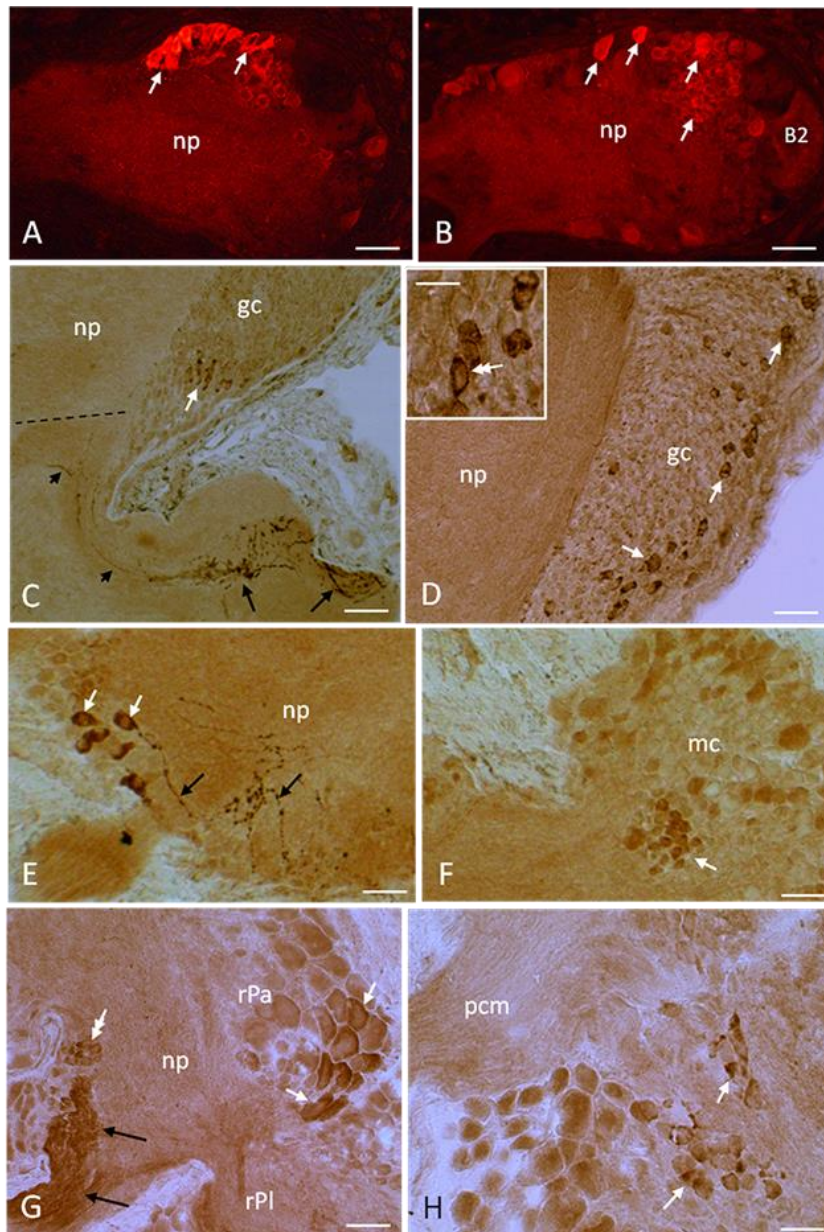
PC sejtek szerepét a belépő 5-HTerg elemek innervációjában feltételezzük.

#### **4.3. Feszültségfüggő $K^+$ -csatornák immunhisztokémiai azonosítása és eloszlása *Helix* központi idegrendszerében**

Immunhisztokémiai vizsgálataink során a három, eredményesen reagáló ioncsatorna ( $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$  és  $K_v4.3$ ) esetében az immunreaktív neuronok általános előfordulását figyeltük meg a *Helix* KIR-ben, mind a jelölt neuroncsoportok jelenléte, mind az idegdúcok neuropiljének innervációja tekintetében, továbbá egyes esetekben a KIR-hez közeli nem-neuronális struktúrákban is (18-22. ábrák). Bár az immunpozitív neuronok elhelyezkedésében és számában az egyes ganglionokban kisebb eltérések voltak, általánosságban elmondható, hogy az egyes ioncsatornákat kifejező neuronok eloszlásának mintázata nagyon hasonló képet mutatott (23. ábra).

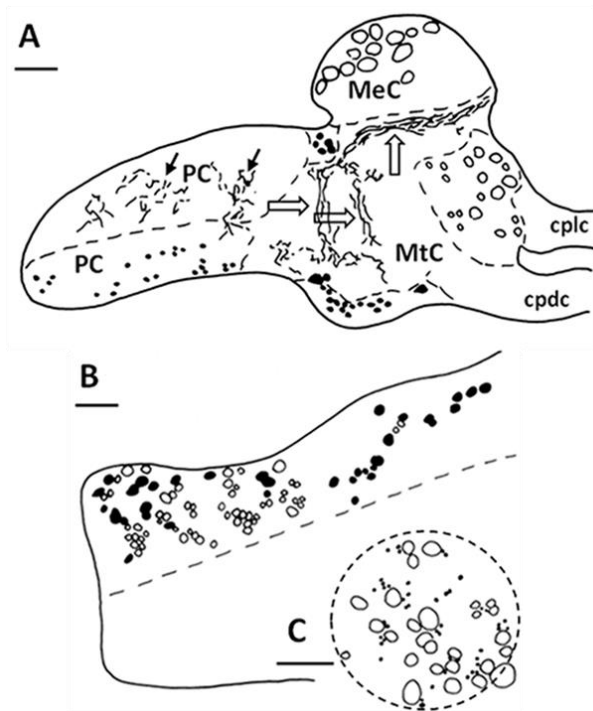
#### 4.3.1. K<sub>v</sub>2.1 immunreaktív elemek eloszlása

K<sub>v</sub>2.1-IR neuronok voltak megfigyelhetők a pofa és a cerebrális ganglionokban, valamint a garat alatti gangliongyűrűben is (23. ábra). A pofa ganglion rostro-dorzális felszínének középső részén a jelölt neuronok egy nagyobb csoportja helyezkedett el, átlagos átmérőjük 15 µm volt (18A, B ábra). Nagyszámú K<sub>v</sub>2.1-IR globulus sejt fordult elő a cerebrális ganglionban a PC területén (18C, D ábra). Nagy nagyításnál egyértelmű volt, hogy az erős immunreakció főleg az 5-8 µm átmérőjű globulus sejtek citoplazmájának egy vékony sávjában koncentrált (18D, betétkép). A sejtes réteg marginális régiójában elhelyezkedő nagyobb méretű (12-15 µm) neuronok, melyek jellegzetes Na<sub>v</sub>1.9 immunpozitivitást is mutattak (Pirger és mtsai., 2013), nem mutattak K<sub>v</sub>2.1 immunreaktivitást. A metacerebrum laterális részén látható volt egy jelölt axonköteg, mely számos varikózus rostra elágazódva a cerebrális ganglion pedális lebenyét innerválta (18C ábra). Ezeknek a rostkötegeknek az eredete a laterális metacerebrumban jelen lévő, kisméretű (15-20 µm) jelölt sejtekből álló neuroncsoport volt (18E ábra). A mezocerebrumban gyengébb intenzitású, K<sub>v</sub>2.1-IR sejtek csoportja helyezkedett el (18F ábra). Camera lucida segítségével közelebbi képet kaptunk a K<sub>v</sub>2.1-IR elemek megjelenéséről a cerebrális ganglionban (19. ábra). Egy először két ágból álló vastag axonköteg a mezo- és metacerebrum neuropiljében futott, majd a két procerebrális lebenyt összekötő kommissúra felé haladt (19A ábra). A globulus sejtréteg jelölt és jelöletlen neuronjainak együttesében (19B ábra) nagy feloldású képeken a jelöletlen perikaryonok és a K<sub>v</sub>2.1-IR varikozitások egymáshoz való viszonyát is pontosítottuk (19C ábra). Nagyobb nagyításban a PC sejtes rétegében a jelöletlen neuronok között a kis immunpozitív varikozitások eloszlása is jól nyomon követhető volt (19C ábra). A garatalatti gangliongyűrű valamennyi (pleurális, parietális, pedális, viscerális) ganglionja tartalmazott K<sub>v</sub>2.1-IR sejtcsoportokat (23. ábra). A jelölt neuronokban az immunreaktivitás sok esetben csak a citoplazma egy kis részében koncentrált (18G, H ábra). A parietális ganglionban az immunreaktív neuronok két elkülönülő csoportot alkottak. Míg az egyik kisebb méretű (15-20 µm) a palliális ideggyökér közelében elhelyezkedő neuronokból állt (18G ábra), addig a másik csoport közepes méretű (40-50 µm) neuronokat tartalmazott, melyek a pleurális ganglion közelében helyezkedtek el. A pedális ganglion K<sub>v</sub>2.1-IR neuronjai, négy csoportot alkottak, ezek az anterior, laterális és mediális lebenyben helyezkedtek el, és mindegyik 25-30 jelölt neuront tartalmazott (18H, 23. ábra).



**18. ábra**  $K_{V}2.1$  immunreaktív ( $K_{V}2.1$ -IR) elemek  $16\ \mu\text{m}$ -es kriosztát metszetekben a *Helix* KIR-ben. **A, B:**  $K_{V}2.1$ -IR neuronok (nyilak) a jobb pofa ganglion dorzális felszínének rostro-mediális részén. **C:** Jelölt neuroncsoport (fehér nyíl) a PC globulus sejtrétegében. Szaggatott vonal jelzi a PC és a meta(poszt)cerebrális neuropil régiók határát. Kis jelölt axonkötegek (fekete nyílhegyek) és varikózus arborizációjuk (fekete nyilak) a metacerebrum laterális részén (pedális lebeny). **D:** Immunpozitív globulus sejtek (fehér nyilak) a PC-ben. **Betét:** Jól látható, hogy az immunreaktivitás a citoplazma vékony sávjába koncentrálnódik (kettős nyíl). **E:** Immunjelölt neuronok (fehér nyilak) és varikózus axonjaik (fekete nyilak) a laterális metacerebrumban. **F:**  $K_{V}2.1$ -IR sejtek csoportja (fehér nyíl) a mezocerebrumban. **G:** Kisebb (kettős nyíl) és nagyobb (fehér nyilak) méretű  $K_{V}2.1$ -IR neuronok a jobb parietális ganglionban. A fekete nyilak egy erősen immunreaktív rostköteg vetülését jelölik az egyik jobb palliális ideg irányába. **H:** Jelölt neuronok csoportjai (fehér nyilak) a jobb pedális ganglion kommisszurális lebenyében. Az immunreaktivitás nem egyenletesen oszlik el, hanem csak a citoplazma egy részében van jelen. gc: globulus sejtek rétege, np: neuropil, mc: mezocerebrum, pcm: pedális kommisszúra, rPa: jobb parietális ganglion,

rPI: jobb pedális ganglion Arányméreték: A, B: 20  $\mu\text{m}$  C:70  $\mu\text{m}$ , D:30  $\mu\text{m}$ , betét: 10  $\mu\text{m}$ , E-H: 40  $\mu\text{m}$

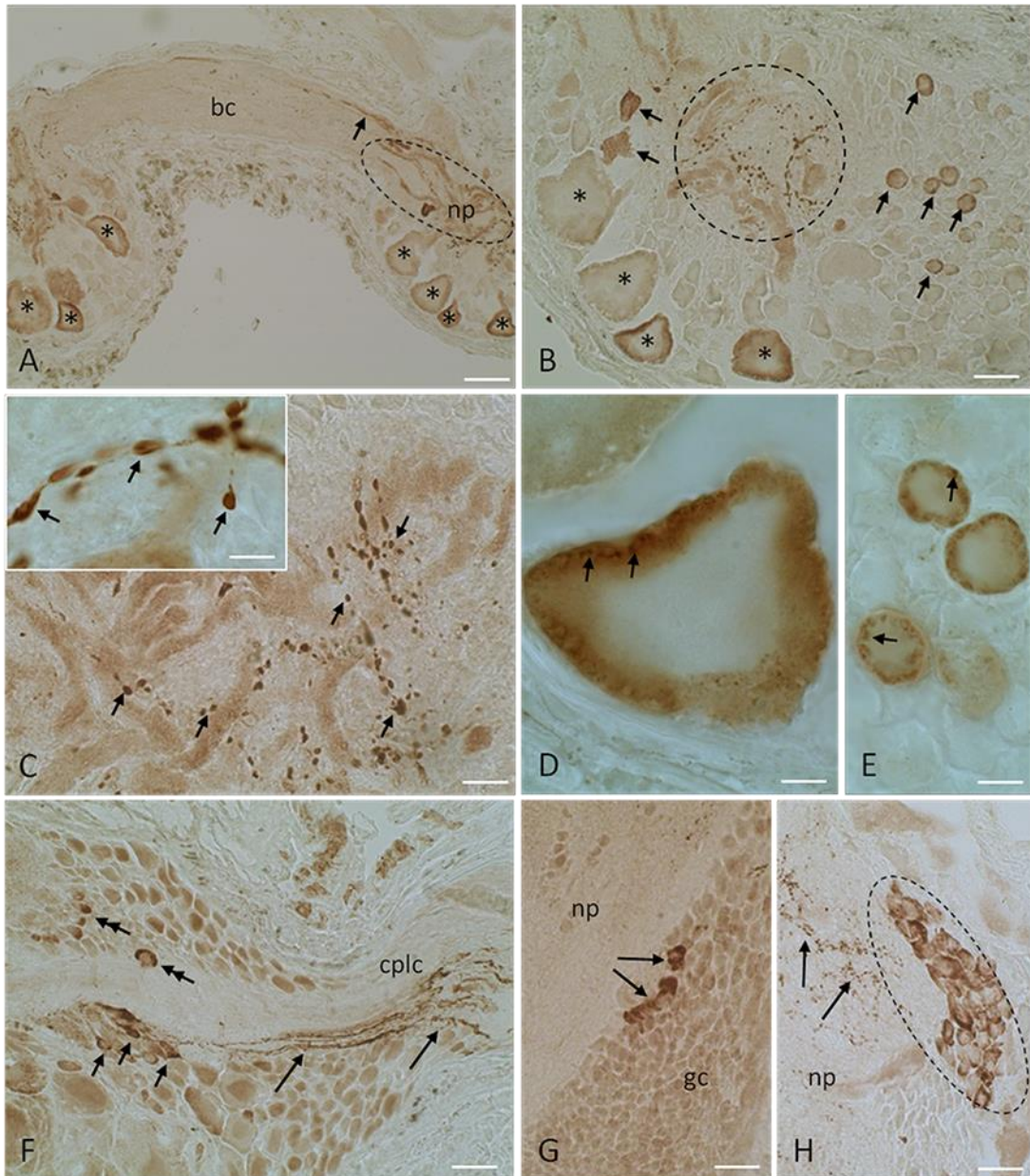


**19. ábra Camera lucida rajz  $K_v2.1$ -IR elemekről a cerebrális ganglionban illetve a PC-ben. A:**  $K_v2.1$ -IR neuronok (fekete pontok) közelében axon nyúlványok (fekete nyilak) és axon kötegek (nagy fehér nyilak) futnak. Üres körök: jelöletlen sejtek. A szaggatott vonal (a B ábrán is) a sejtés réteg és neuropil határát jelzi. PC: procerebrum, MtC: metacerebrum, MeC: mezocerebrum, cpdc: cerebro-pedális konnektívum, cplc: cerebro-pleurális konnektívum. **B, C:** PC részletek nagyobb nagyításban, melyekben jelölt (fekete pontok) és jelöletlen (üres körök) globulus sejtek láthatók a B ábrán, míg a C ábrán a jelöletlen sejttestek (üres körök) és a  $K_v2.1$ -IR varikozitások (kis fekete pontok) viszonyát ábrázoljuk. Arányméreték: A: 100  $\mu\text{m}$ , B: 500  $\mu\text{m}$ , C: 25  $\mu\text{m}$

#### 4.3.2. $K_v3.4$ immunreaktív elemek eloszlása

*Helix* KIR-ben számos helyen azonosítottunk  $K_v3.4$ -IR neuronokat (23. ábra). A pofa ganglion ventro-mediális részén közepes méretű (50-60  $\mu\text{m}$ ) neuronok mutattak immunreaktivitást (20A ábra). A jelölt neuronok vastag axonjai a neuropilbe vetültek, ott többszörösen elágaztak (20B ábra), végül beléptek a bukkális kommisszúrába (20A ábra). A neuropilben további jelölt varikozus nyúlványok futottak, melyek szorosán a  $K_v3.4$ -IR neuronok vastag immunpozitív axonjai mellett, vagy felettük, juxtglomeruláris helyzetben helyezkedtek el (20B, C ábra). A pofa ganglion mediális és laterális régióiban kisméretű (10-15  $\mu\text{m}$ ) immunpozitív sejtek csoportjait is megfigyeltük, melyek a ganglion teljes

vastagságában a dorzálistól a ventrális felszínig követhetők voltak (20B ábra). Nagyobb nagyítású immerzió olajos vizsgálatok során jól láthatóvá vált, hogy mind a közepes, mind a kisebb méretű jelölt neuronok citoplazmája pont-szerű precipitátumokat tartalmaztak, melyek főleg a sejtek periferiáján, a membrán közelében helyezkedtek el (20D, E ábra).



**20. ábra K<sub>3.4</sub>-IR elemek a *Helix* KIR-ben.** A: A pofa ganglionok dorzális felszínének ventromediális részén közepes méretű (50-60  $\mu$ m) Kv3.4-IR neuronok (csillagok) láthatók. Vastag elágazó axonjaik (szaggatott kör) behálózzák a neuropilt (np), majd a kommisszúrába (bc) lépnek (nyíl). B: Egy következő sorozatmetszeten varikózus axonok (szaggatott kör) helyezkednek el jelölt neuronok (csillagok) neuritjai mentén. Nyilak - kisméretű (10  $\mu$ m) immunpozitív neuronok. C: Nagyobb nagyítású részlet a B ábrából. Varikózus axonok (nyilak) juxtglomeruláris kapcsolata a vastag neuritokkal. **Betét:** Jelölt varikozitások (nyilak) nagy (immerziós) nagyítású képe. D, E: K<sub>3.4</sub> immunreaktivitás intracelluláris lokalizációja a pofa ganglion közepes (D) és kis (E) méretű

neuronjaiban. Nyilak - szemcsés reakciótermék. **F:** A posztocerebrum pedális lebenyében jelen lévő jelölt neuroncsoportból (nyilak) axonok (hosszú nyilak) futnak a pedális konnektívumba (cplc). Kettős nyilak - további immunreaktív neuronok a pedális lebenyben. **G:** Kisméretű jelölt neuronok csoportja (nyilak) a PC-ben. **H:** Jelölt sejtek nagyobb csoportja (szaggatott kör) a jobb pedális ganglion cerebrális lebenyében. Varikózus axonok a neuropilben (nyilak). Arányméreték: A: 80  $\mu\text{m}$ , B: 40  $\mu\text{m}$ , C: 6  $\mu\text{m}$ , betét: 1,2  $\mu\text{m}$ , D: 7  $\mu\text{m}$ , E: 8  $\mu\text{m}$ , F: 40  $\mu\text{m}$ , G: 15  $\mu\text{m}$ , H: 40  $\mu\text{m}$

A pofa ganglionban, de a teljes KIR-ben is,  $K_v3.4$  immunreaktivitást egyetlen óriásneuron, a B2 sejt mutatott (22A, 23. ábrák), mely a nyálmirigy szabályozásában tölt be fontos szerepet (Altrup és mtsai., 1982). A PC-ben kisszámú (10-15) kisméretű (5-8  $\mu\text{m}$ ) jelölt neuronokat azonosítottunk a sejtes réteg és a terminális neuropil határa mentén (20G ábra), míg a cerebrális ganglion egyéb anatómiailag különálló régiói közül, a metacerebrumban voltak jelen nagyobb számban (25-40) 20-30  $\mu\text{m}$  méretű immunpozitív neuronok (20 F, 23. ábrák). A pedális lebenyben megfigyelhető  $K_v3.4$ -IR neuronok nyúlványai a cerebro-pedális konnektívumba vetültek (20F ábra). A garatalatti gangliongyűrű valamennyi ganglionjában további kisebb jelölt neuroncsoportokat figyelhettünk meg (22. ábra), köztük a pedális ganglion cerebro-pedális lebenyében egy számos (30-40) jelölt sejtől álló immunpozitív neuroncsoportot sikerült azonosítanunk (20H ábra). A ganglion komplex teljes neuropil régióját sűrűn elágazó varikózus axonok hálózták be (l. pl. 20H ábra).

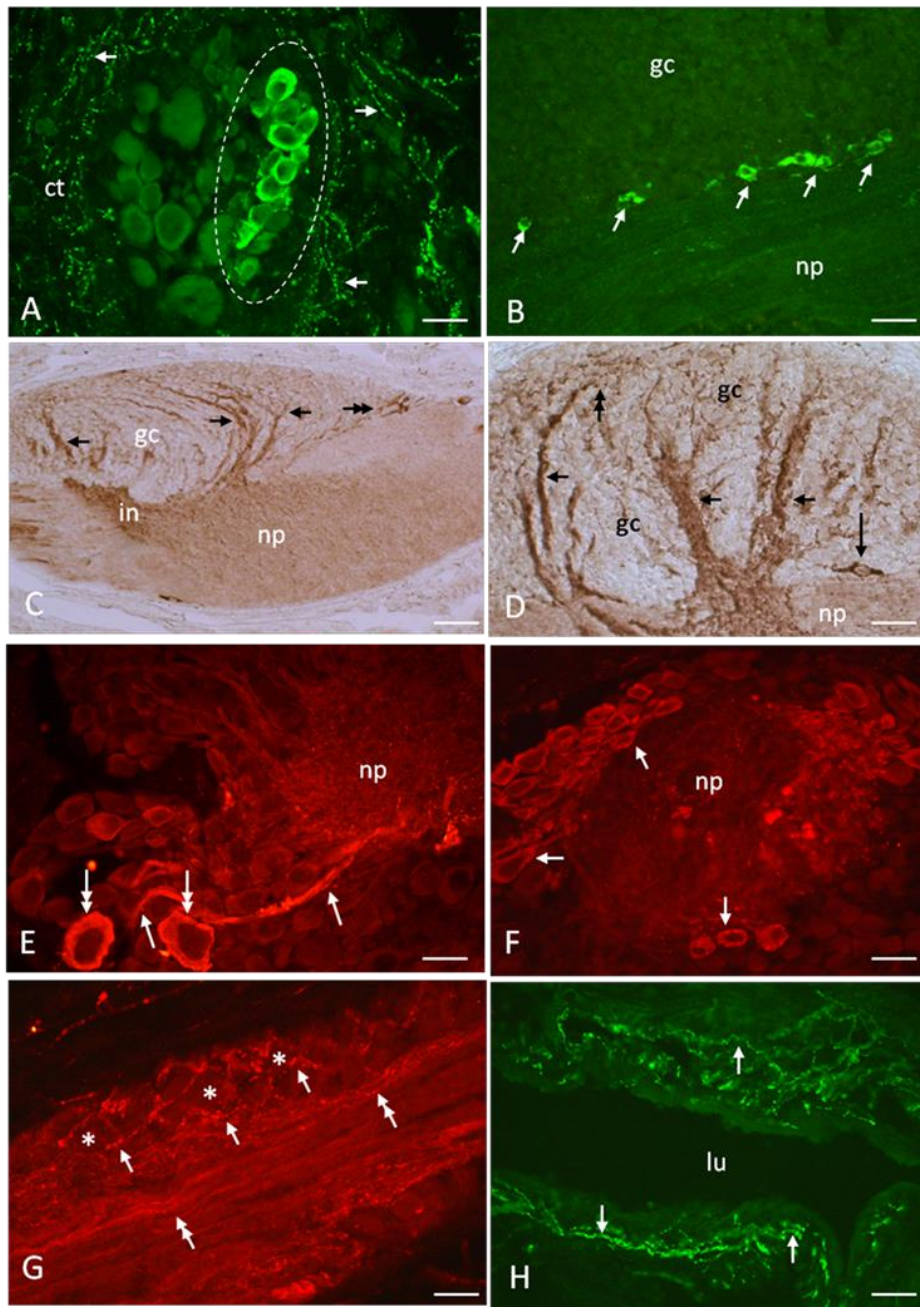
#### 4.3.3. $K_v4.3$ immunreaktív elemek eloszlása

$K_v4.3$  immunreaktív neuronok a viscerális ganglion kivételével a teljes KIR-ben előfordultak (21, 23. ábrák). Nem csak immunpozitív sejteket, hanem a neuropil régiókban számos jelölt rostot is megfigyeltünk, továbbá nem-neuronális szövetekben is azonosítottunk  $K_v4.3$ -IR elemeket, melyek a ganglionok közelében, elsősorban a kötőszöveti burokba koncentráálódtak. A pofa ganglionban mintegy 30-40 sejtet tartalmazó jelölt neuroncsoportot azonosítottunk, melynek tagjai a dorzális felszíntől a ventrálisig a ganglion teljes mélységében jelen voltak (21A ábra). Emellett a B2 óriásneuron is immunreaktívnek bizonyult (22B, 23. ábrák). A PC-ben a viszonylag kisszámú immunpozitív globulus sejt egy része a sejtes rétegben elszórtan, egy része pedig a sejtes réteg és a medulláris (terminális) neuropil határán helyezkedett el (21B ábra), melyek a citoplazmájukban erős immunreaktivitást mutattak. A sejtes rétegben szeptum-szerűen futó jelölt axon kötegek gazdagon elágaztak a neuronok között, ezek egy része a PC laterális



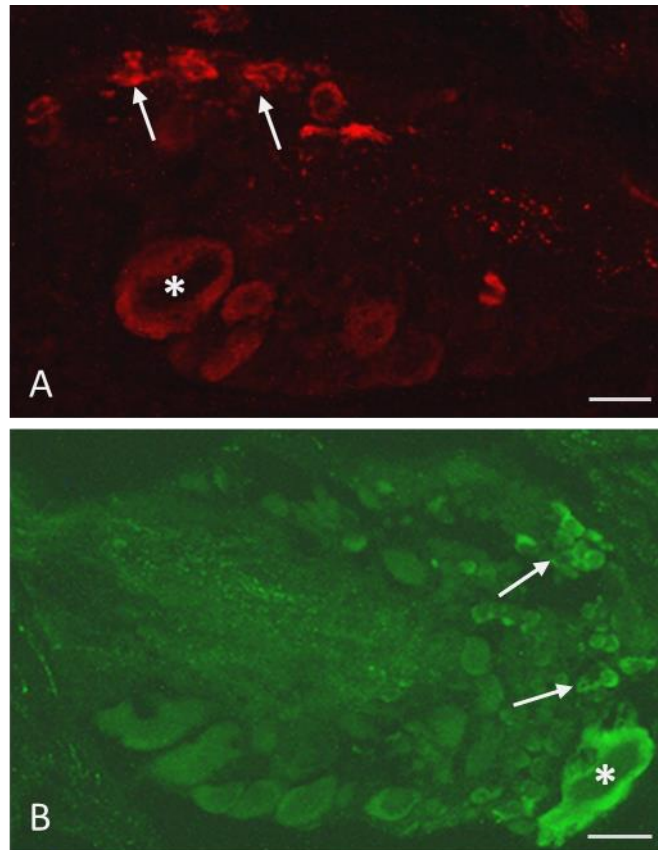
felszínén elhelyezkedő neuronokból eredt (21C, D ábra). A terminális neuropilben megfigyelt festődés homogén, ugyanakkor viszonylag gyenge intenzitású volt, mely éles ellentétben állt az internális neuropil régióban megfigyelt erőteljes reakcióval (21C, D ábra). A garatalatti gangliongyűrű számos  $K_v4.3$ -IR sejtcsoportot tartalmazott, melyek elsősorban a pedális és pleurális ganglionokban helyezkedtek el (21E, F ábra). Erős immunreakciót mutatott az a neuroncsoport, melyek a pedális ganglion caudo-mediális lebenyében 25-30  $\mu\text{m}$  nagyságú jelölt sejteket tartalmazott (21E ábra). Immunpozitív neuritjük hosszan követhető volt a neuropil régióban és ott gyakran többszörösen elágazott. A pleurális ganglionban két, nagyszámú mintegy 50-60 25  $\mu\text{m}$  átmérőjű sejtből álló  $K_v4.3$ -IR neuroncsoport helyezkedett el a neuropil régiót körülvéve, (21F ábra). A jobb parietális ganglionból kilépő  $K_v4.3$ -IR varikózus rostok egy része párhuzamosan futott tovább a palliális ideggyökérben a periféria felé, míg másik részük a jelöletlen neuronok sejttestjeit vették körbe a palliális ideg kezdeti szakaszán (21G ábra). Eltérően a többi vizsgált ioncsatornától, a viscerális ganglionban  $K_v4.3$ -IR sejteket nem sikerült azonosítanunk (23. ábra). Egyedül a  $K_v4.3$  csatorna immunhisztokémiai vizualizálása során tapasztaltuk, hogy a KIR-t körbevevő kötőszöveti tok számos elágazó immunpozitív rostot tartalmazott (21A ábra). Perifériás szinten a garat alatti gangliongyűrű mellett futó aorta keresztmetszeti képen jól látható volt, hogy az aortafalat jelölt varikózus rostok sűrűn behálózták (21H ábra).

Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a  $K_v4.3$ -IR elemek ultrastrukturális lokalizációjáról közelebbi képet kívántunk kapni két felépítésében és élettani folyamatok szabályozásában is eltérő szerepet játszó központi idegrendszeri struktúrában, a PC-ben (szaglás) és a pedális ganglionban (mozgás, szaporodás). A jelölt elemek a PC-ben elsősorban kis átmérőjű, néhány granulás vesikulát tartalmazó varikozitások voltak (24A, B ábra), míg a pedális ganglionban nagy (3-4  $\mu\text{m}$ ) átmérőjű axonprofilok voltak megfigyelhetők, melyek számos granulás vesikulát tartalmaztak (24C ábra). A granulás vesikulák mindkét jelölt profilban 80-100 nm nagyságúak voltak (24. ábra). Az immunreakció erőssége eltérő volt, egyes esetekben az axonprofilok erősen elektron denz precipitátummal voltak befedve (24A, B ábra), míg más esetben részben az axoplazmában, részben pedig az axon membrán, illetve a granulás vesikulák felszíne mentén finom jelölődés volt megfigyelhető, mely az egész axonprofilnak fokozott elektron denzitást kölcsönzött (24C ábra). A jelöletlen axonprofilok, varikozitások egyértelműen megkülönböztethetőek voltak az elektron denzitás alapján (24D ábra).

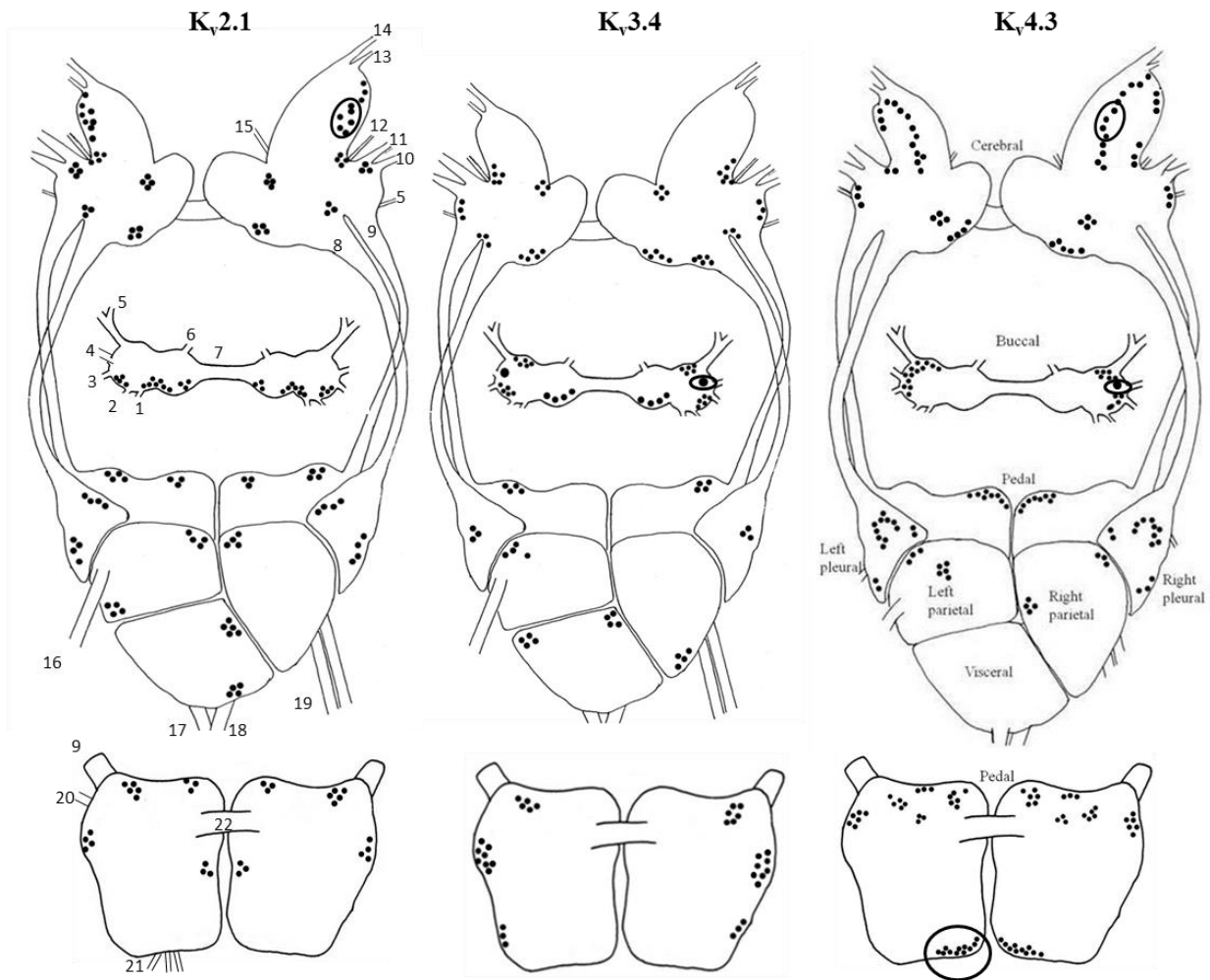


**21. ábra K<sub>v</sub>4.3-IR elemek *Helix* KIR-ben és a periférián.** **A:** K<sub>v</sub>4.3-IR neuronok csoportja (szaggatott kör) a jobb pofa ganglion laterális felszínén. A ganglion körüli kötőszövetben számos jelölt rost fut (nyilak). **B:** Jelölt neuronok (nyilak) a sejtes réteg és a neuropil határán a PC-ben. **C:** K<sub>v</sub>4.3-IR axon elágazódások (nyilak) a globulus sejtek rétegében (gc). Az axonok egy része a globulus sejtekből ered (kettős nyilak). Az eltérő intenzitású festődés alapján a terminális neuropil (np) és az internális (in) neuropil jól elkülöníthető. HRP-DAB reakció. **D:** Nagyobb nagyítású kép a K<sub>v</sub>4.3-IR axon elágazódásokról (nyilak). Kettős nyilak: jelölt sejtek csoportja, hosszú nyíl: magányos jelölt neuron a terminális neuropil (np) közelében. **E:** K<sub>v</sub>4.3-IR neuronok (kettős nyilak) a pedális ganglion caudo-mediális lebenyében, amelyek axonjai (nyíl) a neuropil (np) régióba vetülnek. **F:** Immunpozitív neuronok csoportjai (nyilak) veszik körbe a jobb pleurális ganglion neuropiljét (np). **G:** Finom varikózus rostok (nyilak) hálózják be a palliális ideg eredésének felszínén elhelyezkedő jelöletlen neuronokat (csillagok). Kettős nyílhegyek - jelölt axonok az

idegben párhuzamosan. **H**: Az aorta keresztmetszete a SOG közelében. Számos elágazó varikózus rost fut az aorta falában (nyilak). lu- lumen. Arányméretetek: A: 18  $\mu\text{m}$ , B: 18  $\mu\text{m}$ , C, D, E: 35  $\mu\text{m}$ , F: 30  $\mu\text{m}$ , G: 30  $\mu\text{m}$ , H: 30  $\mu\text{m}$

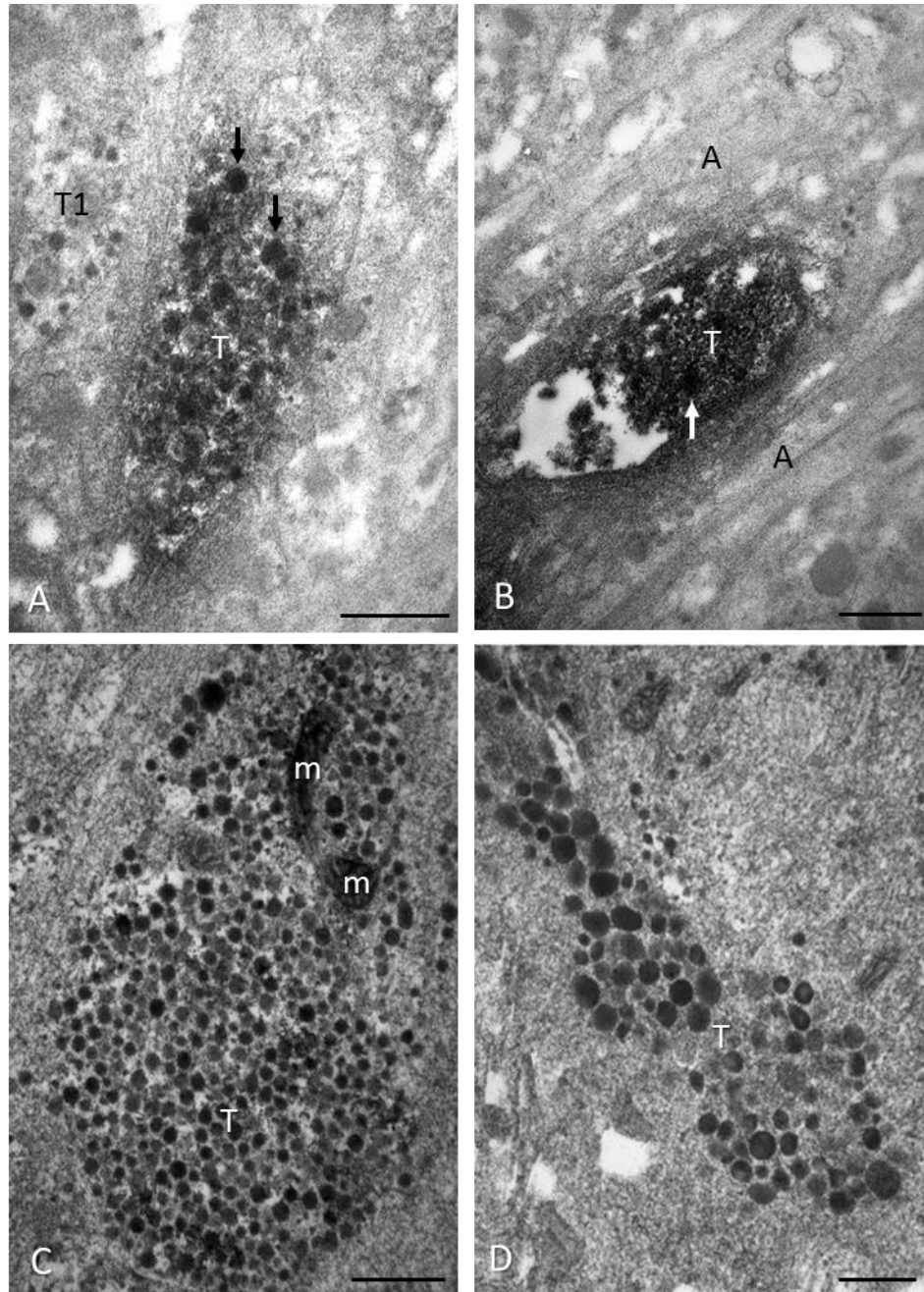


**22. ábra** *Helix pofa* (bukkális) ganglionjában a  $K_v3.4$ -IR (A, TRITC) illetve  $K_v4.3$ -IR (B, FITC) B2 óriásneuron (csillag) jól azonosítható volt. A képeken látható további kisméretű immunreaktív sejtek (nyilak) a 20B és a 21A ábrákon mutatott neuron együttesek folytatása. Arányméretetek: A, B: 40  $\mu\text{m}$



**23. ábra** A három feszültségfüggő  $K^+$ -csatornát ( $K_{v2.1}$ ,  $K_{v3.4}$ ,  $K_{v4.3}$ ) tartalmazó neuronok (fekete jelek) eloszlása *Helix KIR*-ben. Az egyszerűség kedvéért valamennyi jelölt elemet a dorzális felszínen ábrázoltuk. Az eredmények leírásánál részletezzük pontos lokalizációjukat. Bekarikázva azok a neuronok ( $K_{v2.1}$  – globulus sejtek,  $K_{v3.4}$  – B2 óriásneuron,  $K_{v4.3}$  – pedális ganglion caudo-mediális neuronjai), amelyeken az elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztük. Idegek: 1 nyelőcső; 2 nyál; 3, 4, 6 garat; 5 cerebro-bukkális konnektívum; 7 bukkális kommissúra; 8 cerebro-pleurális konnektívum; 9 cerebro-pedális konnektívum; 10 külső ajak; 11 középső ajak; 12 belső ajak; 13 optikus; 14 szagló; 15 belső peritentakuláris; 16: cerebrális kommissúra 17 bal parietális; 18 anális; 19 intesztinális; 20 jobb palliális; 21 bőr; 22 pedális; 23 anterior pedális kommissúra.

A jelölt sejtek száma az egyes immunfestéseket követően a következő volt.  $K_{v2.1}$ -IR neuronok a cerebrális ganglionban (procerebrummal együtt): 260, bukkális ganglion: 80, garat alatti ganglion gyűrű (SOG, pedális ganglionnal együtt): 300.  $K_{v3.4}$ -IR neuronok a cerebrális ganglionban: 120, bukkális ganglionban: 60, SOG: 240.  $K_{v4.3}$ -IR neuronok a cerebrális ganglionban: 320, bukkális ganglionban: 80, SOG: 300.

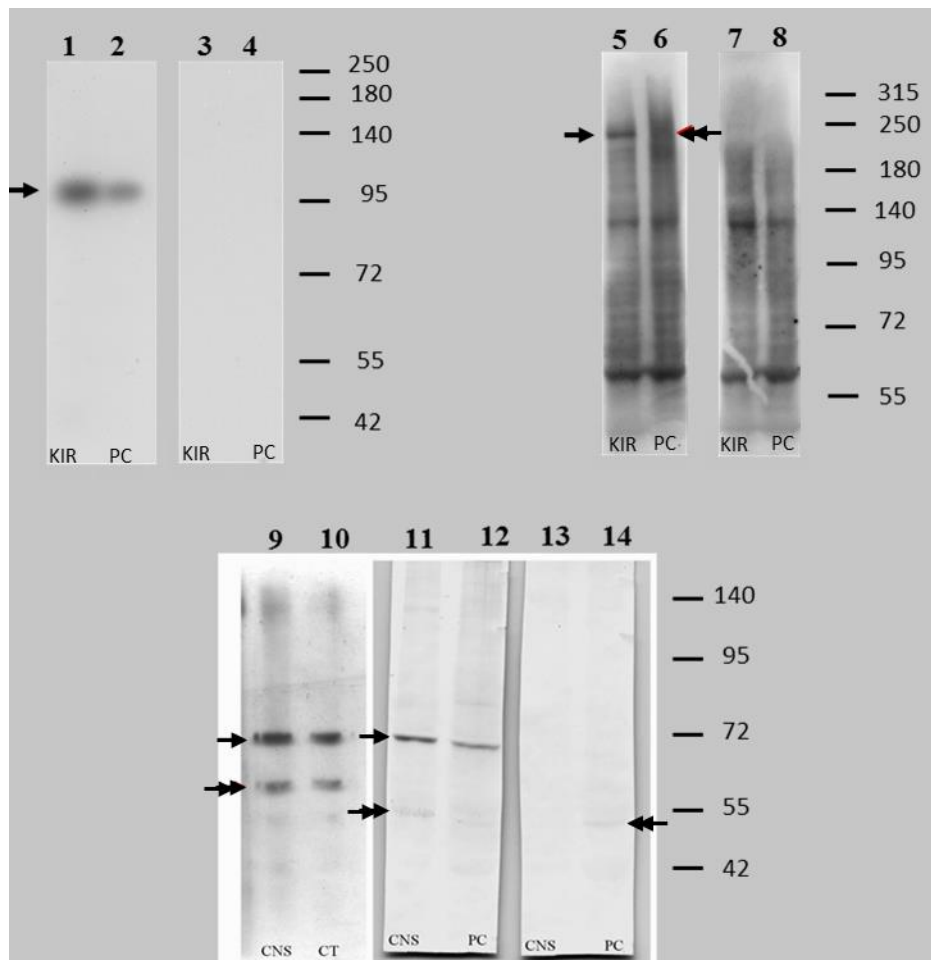


**24. ábra K<sub>v</sub>4.3-IR varikozitások ultrastruktúrája a PC-ben (A, B) és a pedális ganglionban (C, D).** **A, B:** Számos nagy (80-100 nm) elektron denz granulumot (nyilak) tartalmaznak a K<sub>v</sub>4.3-IR varikozitások (T). T1 – jelöletlen axonprofil, mely a jelölt elemekben megfigyelteknél kisebb méretű granuláris vezikulákat tartalmaz. A: jelöletlen axonok. **C:** Nagy méretű jelölt varikozitás (T) a pedális ganglionban, mely nagy mennyiségű granuláris vezikulát tartalmaz. **D** - Jelöletlen axonprofil eltérő elektron denzitású granulumokkal, melyek mérete (120-160 nm) és alakja teljesen eltér a C ábrán látható jelölt profilban jelen lévőkéétől. m -mitokondrium. Arányméreték: A, B: 0,5 μm, C, D: 0,25 μm

#### 4.4. Az ioncsatornák azonosítása Western blot módszerrel

Western blot kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy meggyőződjünk az egyes ioncsatorna antitestek specifitásáról *Helix* központi idegrendszerében, és így az immunhisztokémiai festések során kapott eredményeinket egyértelműen meg tudjuk erősíteni.

A K<sub>v</sub>2.1, K<sub>v</sub>3.4 csatornák analízise során a PC, a teljes KIR, illetve a K<sub>v</sub>4.3 csatorna esetében a kötőszöveti burokból készített homogenizátumok elektroforetikus elválasztását és membránra blottolását követően vizsgáltuk az egyes ioncsatornák jelenlétét (25. ábra). A specifikus, K<sub>v</sub>2.1-IR sáv a teljes központi idegrendszerben és a külön vizsgált PC-ben is 110 kDa tartományban jelent meg. K<sub>v</sub>3.4 ioncsatorna esetében bár számos másodlagos sáv is megjelent előhívás során, mind a teljes KIR-ben, mind a PC-ben megjelent a specifikus, 240 kDa sáv. Bár a PC-ben ez jelentősen halványabb reakciót adott, mint a KIR-ben, jól korrelált azokkal az immunhisztokémiai eredményekkel, melyek során következetesen kisszámú immunpozitív sejtet sikerült azonosítanunk a globulus sejtek rétegében. K<sub>v</sub>4.3 antitest vizsgálata során, mivel előzőleg immunhisztokémiai festések során azt tapasztaltuk, hogy a KIR-t körbevevő kötőszöveti burok is jelentős mennyiségű immunpozitív rostot tartalmaz, nem csak a szaglóközpontot, hanem a KIR-t körbevevő kötőszöveti burkot is vizsgáltuk. Minden esetben sikerült azonosítani a specifikus immunreaktív sávot, amely a 73 kDa mérettartományba esett. Mindhárom csatorna vizsgálata során nem csak negatív kontrollal (primer antitest elhagyása), hanem preabszorpciós fehérjék használatával is meggyőződünk a jelölések specifitásáról.



**25. ábra  $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$  és  $K_v4.3$  csatornák azonosítása Western blottal.** 1, 2 oszlop:  $K_v2.1$ -IR sávok a KIR-ben és a PC-ben. Nyíl: jelölődés a várt molekulásúly (110 kDa) helyén. 3,4 oszlop:  $K_v2.1$  antitest preabszorpciós blokkolása után jelölés nem figyelhető meg. 5, 6 oszlop:  $K_v3.4$ -IR sávok a KIR-ben és a PC-ben. Fekete nyíl: jelölődés a várt molekulásúly (240 kDa) helyén a KIR-ben. A gyengébben jelölődött sáv (dupla nyíl) a PC-ben jól korrelál az IHC eredményekkel, ahol kevesebb immunpozitív sejtet sikerült azonosítanunk. 7, 8 oszlop:  $K_v3.4$  antitest preabszorpciós blokkolását követően az 5. oszlopban jelölt specifikus sáv hiányzik. 9-14 oszlop:  $K_v4.3$  antitest vizsgálatok. 9, 10 oszlop: KIR és a kötőszöveti burok (CT). 11, 12: KIR és PC. Nyilak: jelölés a várt molekulásúly, 73 kDa értéken mind a KIR (CNS), a CT-ben és a PC-ben is. Dupla nyilak: másodlagos sávok. 13, 14 oszlop: preabszorpciós kontroll kísérletek után csak a másodlagos sávok megmaradtak meg (piros nyilak). 1-10 oszlop: kemilumineszcens hívások: 11-14 oszlop: HRP-DAB reakció.

#### 4.5. $K^+$ -csatornák elektrofiziológiai jellemzése *Helix* központi neuronjaiban

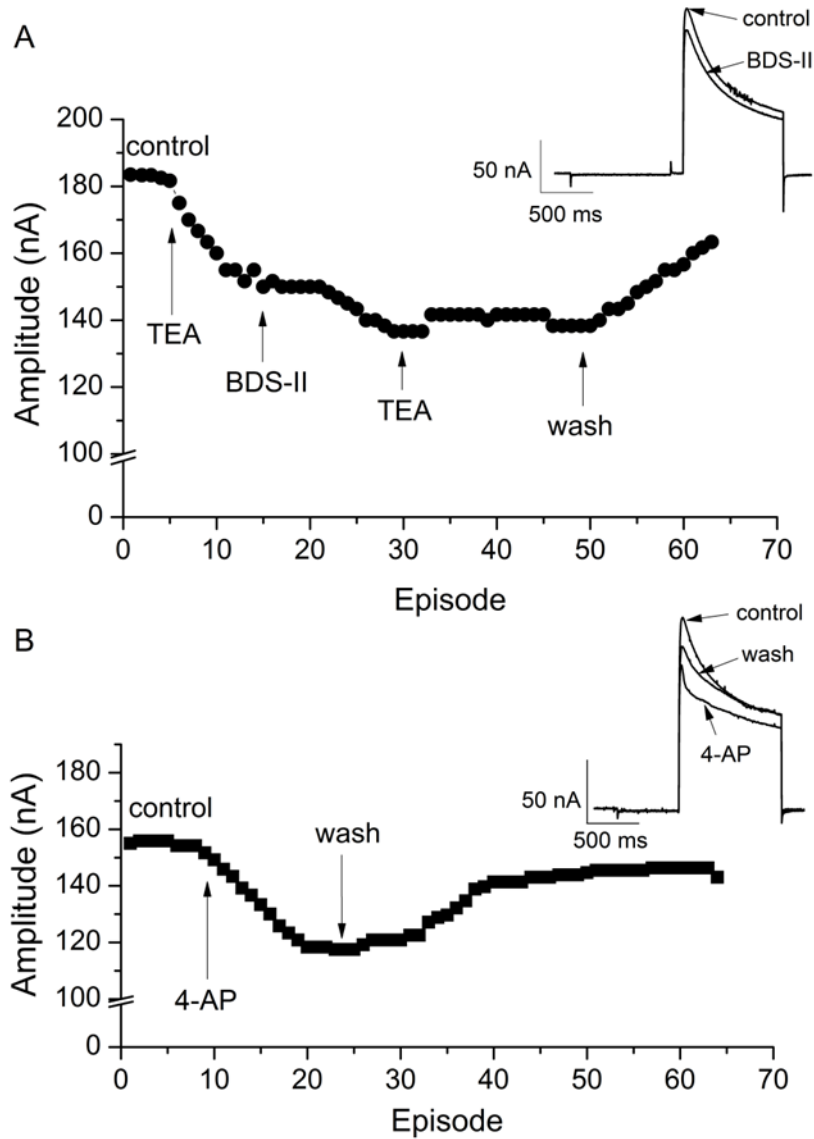
A  $K_v3.4$  immunreaktivitást mutató pofa (bukkális) ganglion B2 neuronjának membránpotenciálja (MP)  $-100$  mV-os,  $200$  ms idejű elő-hiperpolarizációt követően  $-50$  mV értéket ért el, mely tipikusan a gyors, A-típusú  $K^+$ -áramra jellemző (26A ábra). Az áram inaktiválódott  $5$  mM TEA hozzáadása után, amely a bemenő  $Na^+$ - és a késői egyenirányító  $Ca^{2+}$ -aktiválta  $K^+$ -áramokat is blokkolta (26A ábra). Az áramgörbén az összes áram együtt látható, azonban a  $-100$  mV értékre beállított előhiperpolarizáció nélkül ábrázoltuk őket. Az A-áram kinetikai jellegzetességei nem tértek el a gerincesekben és gerinctelenekben ismerttől: a tranziens áram a maximumát gyorsan elérte az adott depolarizáló feszültségen, majd exponenciálisan tért vissza a nyugalmi áramszintre (Rudy, 1988). Az A-típusú áramot hatásosan tudtuk blokkolni 4-AP, TEA és BDS-II-vel, mely utóbbi specifikus  $K_v3.4$  csatornablokkoló (26B ábra). BDS-II kimosása után a membránpotenciál hamar visszaállt a nyugalmi értékre (26A, 27A' ábrák). A késői egyenirányító áramokat  $20$  mM TEA hozzáadásával blokkoltuk, míg kisebb koncentrációban alkalmazott ( $4$  mM) 4-AP nem eredményezett jelentős változást (26. ábra). A TEA-val történt blokkolás koncentrációfüggő és reverzibilis volt.

Hasonló protokollok alkalmazása során a pedális ganglion caudo-mediális lebenyében meglehetősen más típusú tranziens  $K^+$ -áramokat vezetünk el az előzőleg  $K_v4.3$  immunreaktivitást mutató neuronokban (27B ábra). Ez az A-típusú áram kisebb amplitúdójú és lassabb kinetikájú volt, ugyanakkor a feszültségfüggése nagyon hasonlított a gyors tranziens A-áramnál tapasztalhoz (27B' ábra). Ez az áram is blokkolható volt 4-AP-nel, azonban TEA-ra kevésbé volt érzékeny. A lassú A-típusú tranziens áram, amelyet a pedális ganglion neuronjaiban regisztráltunk hasonlított *Aplysia* neuronjaiban mért egyes áramokra (Furukawa és mtsai., 1992), azonban ott ezt a csatornát nem azonosították immunhisztokémiai módszerekkel.

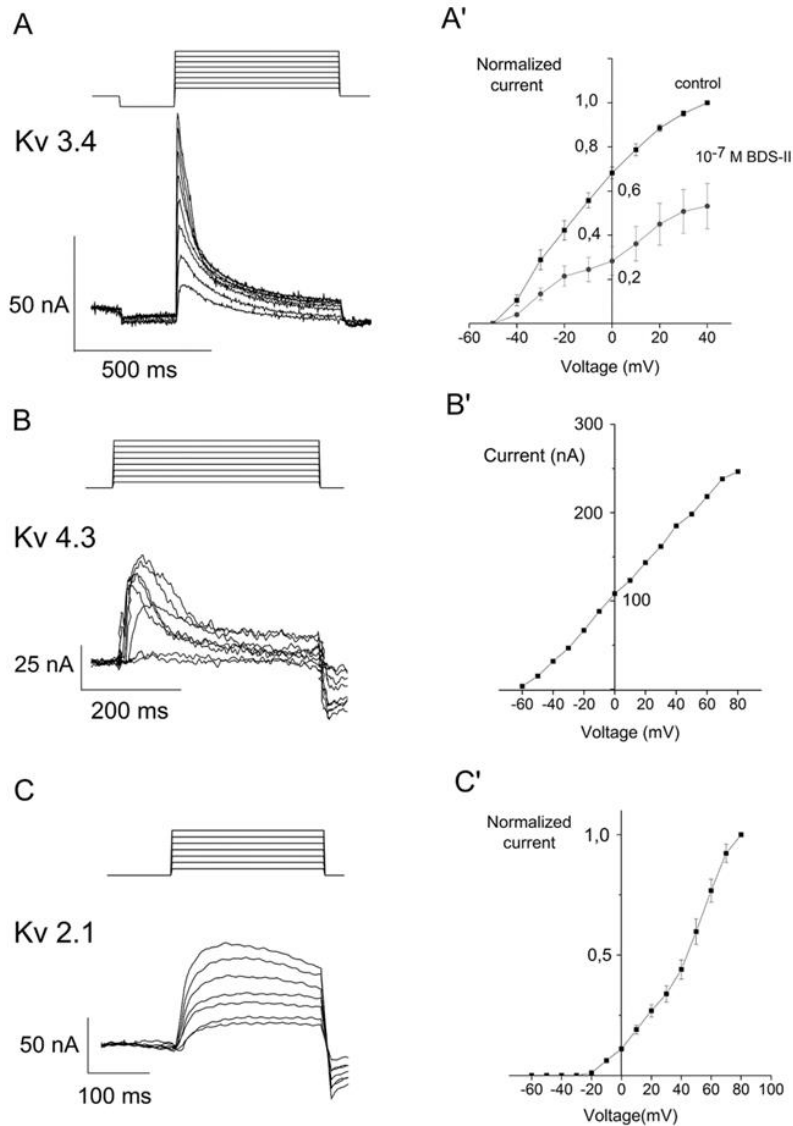
Elektrofiziológiai vizsgálataink során mind voltage-clamp (feszültség-zár) (27C, C' ábra), mind patch-clamp (folt-zár) (28. ábra) módban sikeresen regisztráltunk  $K^+$ -áramokat a PC globulus sejtjeiből. Voltage-clamp elvezetések során részben azon sejtek  $K^+$ -áramait vizsgáltuk, melyek előzőleg immunhisztokémiai festések során  $K_v2.1$  illetve  $K_v4.3$  immunreaktivitást mutattak (18D, 21B ábra), mivel előzőleg patch-clamp vizsgálataink során ezekben késői egyenirányító áramkomponenst regisztráltunk (28A ábra). Patch-clamp vizsgálataink során relatíve alacsony ( $-80$  mV) holding potenciál (HP) mellett,  $Na^+$ -mentes oldatban (NMDG-vel helyettesítve) a kifelé irányuló  $K^+$ -áramokat depolarizáló



négyszög impulzusokkal generáltuk (28. ábra) A kifelé irányuló áramok  $-80$  mV HP értéknél  $-30$  mV értéken aktiválódtak. Az aktiváció mértéke feszültség függő volt, a csúcáramot  $+30$  mV-nál,  $5-7$  ms alatt érte el a depolarizációs lépéseket követően. A depolarizáló négyszög impulzusokkal kiváltott áram stabil volt (mintegy  $100$  ms-ig) és csak kismértékben inaktiválódott. A neuronok egy részében lassú, A-típusú  $K^+$ -áramot rögzítettünk, de késői egyenirányító áramkomponenst is megfigyeltünk (28A ábra). Ez utóbbi áramkomponens jelentősen lecsökkent, amikor  $-60$  mV-os HP mellett intracellulárisan  $50$  mM TEA-t adtunk hozzá (27C ábra). Az I-V görbe a késői ( $150$  ms) áramok és a tranziens kimenő áramok csúcértékének vizsgálata alapján azt mutatja, hogy a korai áramok inkább a negatív értékek, míg a késői áramok magasabb feszültség értékek közelében aktiválódtak (28D, E ábra). Az áram-feszültség karakterisztika alapján elmondható, hogy a PC neuronokban regisztrált áramok  $-60$  mV HP értékről indulva  $-20$  mV értéken már aktiválódtak, amely értéken az A-típusú áramok teljesen inaktívak. A  $K_v2.1$  csatornát expresszálo neuronokban regisztrált  $K^+$ -áram (27C ábra) nagyon hasonló ahhoz, amit gerincesek  $K_v2.1$ -IR neuronjaiban is azonosítottak (Kristen és mtsai., 2010).



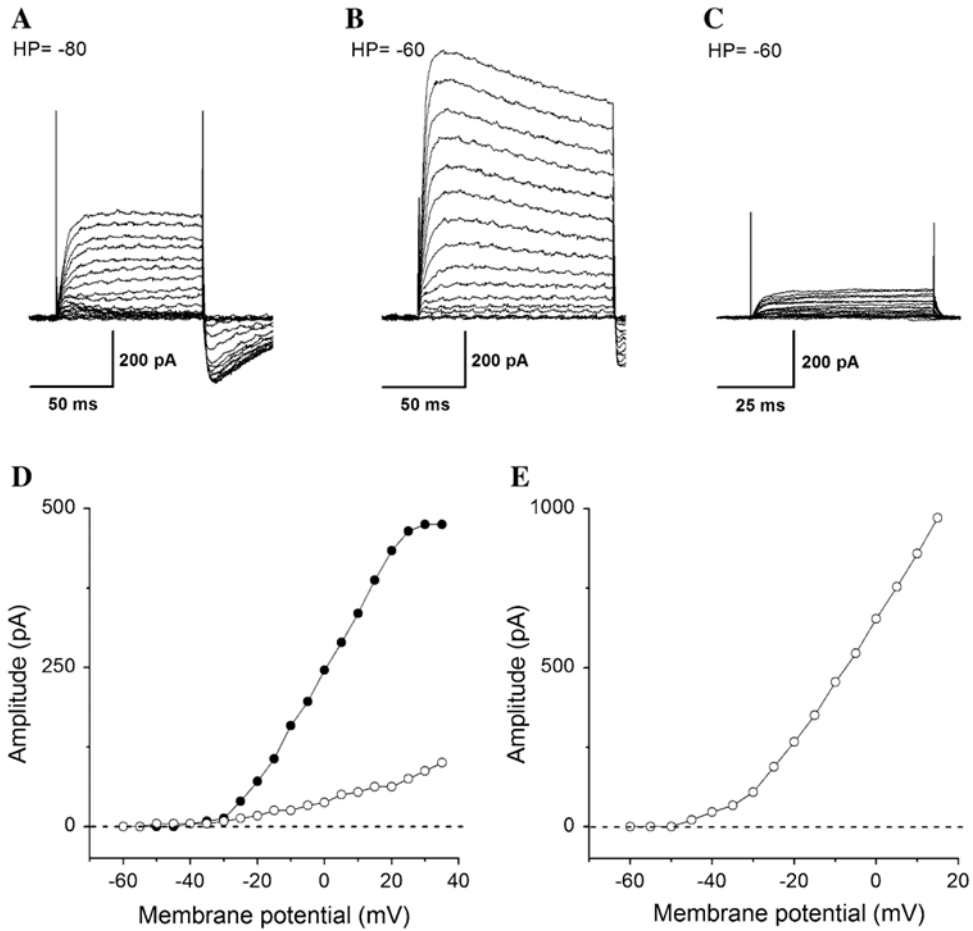
**26. ábra B2 neuron tranziens áramának blokkolása.** A blokkolást  $10^{-7}$  M BDS-II, 20 mM TEA (A) és 4 mM 4-AP (B) koncentrációjú oldatokkal végeztük. A blokkolókat az ötödik epizódban a nyilakkal jelzett időpontokban adtuk és a kimosást a 33-ik epizódban kezdtük meg. Az ötödik epizódban hozzáadott 4-AP kimosása a 22-ik epizódban kezdődött. Mindkét esetben a kimosást követően a normál aktivitás visszatérése majdnem teljes volt. Az eltelt idő a 100 mV-os depolarizáló lépés és a -60 mV-os holding potenciál között 30 másodperc volt. A tesz impulzusokat -100 mV elő-hiperpolarizáció előzte meg. A betétképek az áram regisztrátumokat mutatják  $10^{-7}$  BDS II és 4 mM 4-AP kezelés előtt és után.



**27. ábra *Helix* különböző neuronjaiból regisztrál háromféle  $K^+$ -áram ( $K_V3.4$ ,  $K_V4.3$ ,  $K_V2.1$ ) jellemzői.**

**A:** Gyors (A-típusú) tranziens áram a pofa ganglion B2 óriás neuronjából. Az áramokat 10 mV-os depolarizáló lépcsőkkel váltottuk ki, -30 mV-tól indulva +40 mV-os tartományban. A membránpotenciál előre beállított értéke (HP) -50 mV volt, a depolarizációs impulzusokat 600 ms időtartam és -30 mV - +40 mV tartományban. A depolarizáció kiváltását egy 200 ms elő-hiperpolarizáció (-100mV) előzte meg. Az áramgörbék felett lévő feszültség görbéket a kísérletek alatt folyamatosan rögzítettük. **A'**: Áram-feszültség (I-V) görbe hat neuron összesített regisztrátuma alapján. A felső görbe fiziológias sóoldatban rögzített átlagos csúcs amplitúdókat mutat, míg az alatta lévő azokat az értékeket, melyeket a  $K_V3.4$  csatorna specifikus blokkolója, a

BDS-II ( $10^{-7}$  M) alkalmazását követően kaptuk. **B:** Lassú tranziens áram a pedális ganglion caudális lebenyében elhelyezkedő neuronjaiból, melyet 10 mV-os depolarizációs lépésekkel váltottunk ki (-60 mV-tól indulva +10 mV amplitúdó tartományokkal). A HP beállított értéke -60 mV volt. **B'**: Az I-V karakterisztika alapján az aktiváció küszöbértéke megegyezik a  $K_V3.4$  áramot expresszáló neuronban rögzített értékkel. **C:** Késleltetett (delayed) áramok a PC neuronjaiban amelyeket 10 mV-os depolarizációs lépésekkel indukáltunk (0 mV - +60 mV tartományban). A HP értéke -60 mV volt. **C'**: I-V karakterisztika átlagolt értékek alapján. A késői egyenirányító áram -20 mV-on aktiválódott.



**28. ábra Kifelé menő áramok a PC neuronokban.** **A:** -80 holdingpotenciál értékről 5mV-os lépésekkel +20 mV MP értékig haladva kifelé irányuló nem inaktíváló áramot is regisztráltunk. **B:** Depolarizáló feszültséglépcsőkkel -80 és +20 mV közötti MP tartományban (5 mV-os lépésekben) a kimenő áramok között tranziens és nem-tranziens áram komponenseket is regisztráltunk. **C:** A késői, kifelé egyenirányító  $K^+$ -áram 50 mM TEA hozzáadását követően lecsökkent. **D, E:** Áram-feszültség (I-V görbék) karakterisztikája tranziens és kifelé egyenirányító  $K^+$ -áramok alapján.

## 5. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A szaglólélelbeny (procerebrum, PC) az információ feldolgozás egyik legmagasabb szinten szerveződött idegi struktúrája nyeles szemű tüdős csigákban. Bár korábbról számos adattal rendelkezünk az olfaktórikus szignalizációban szerepet játszó szinaptikus kapcsolatokra, illetve egyes kémiai hírvivőkre vonatkozóan (Chase, 2002, Gelperin 1999; továbbá Kimura és mtsai., 1998a; Kasai és mtsai., 2006; Matsuo és Ito 2008; Ratté és Chase, 2000; Matsuo és mtsai., 2010; Ierusalemky és Balaban, 2010), a kép korántsem teljes. Mindenekelőtt a kapcsolat rendszerek komplexitását, az intercelluláris kapcsolatok nagyfeloldású elemzését, továbbá egyes transzmitter rendszerek pontos kémiai neuroanatómiáját, és végül az információátadás egyes membránfiziológiai és molekuláris aspektusait illetően vannak hiányosságok. Mindezek vizsgálata a szaginformáció feldolgozásának pontosabb értelmezése, illetve további elemzése szempontjából is elengedhetetlennek tűnik. Ezért jelen munkánkban részletesen tanulmányoztuk a PC sejtes rétegének ultrastrukturális szerkezetét, egyik meghatározó modulátorának (Gelperin, 1999), az 5-HT-nak lokalizációját, az 5-HTerg innerváció fény- és elektronmikroszkópos szintű szerveződését, továbbá azonosítottunk feszültségfüggő  $K^+$ -csatornákat és feltártuk azok PC-n belüli, illetve teljes KIR-beli eloszlását. Vizsgálatainkat kiegészítettük elektrofiziológiai kísérletekkel, amelyek során vizsgáltuk az 5-HT hatását *Limax* PC globulus sejtjeinek aktivitására, továbbá jellemeztük egyes  $K^+$ -csatornák elektromos tulajdonságait a *Helix* globulus sejtekben illetve egyéb központi neuronok szintjén, melyekben egyes  $K^+$ -csatornák jelenlétét immunhisztokémiaileg kimutattuk.

### 5.1. A procerebrum sejtes rétegének szinaptikus szerveződése

Vizsgálataink során első célunk volt, hogy feltárjuk a nyeles szemű Gastropoda fajok szaglási ingereit feldolgozó központi apparátus intercelluláris kapcsolatrendszerének egyes ultrastrukturális jellegzetességeit. A két általunk vizsgált faj az éticsiga, *Helix pomatia* és a meztelen csiga, *Limax valentianus*, szaglólélelbenyében a sejtes réteg területén jól meghatározható, lokális neuropil területeket azonosítottunk. Ezek a globulus sejtek között jelenlévő lokális neuropil régiók eltérő méretűek voltak. A lokális neuropileket alkotó axonális elemek egy része mind axo-szomatikus, mind axo-axonikus kapcsolatokat létesített és ezeket a kapcsolatokat gyakran különböző szinaptikus konfigurációk, mint a

divergencia, illetve a preszinaptikus moduláció is jellemezték. Ezek a megfigyeléseink a PC sejtes rétegében zajló lokális szabályozó illetve integratív folyamatokra utalnak, amelyek nagy valószínűséggel a globulus sejtek működésének és így a szaginformáció feldolgozásának finomhangolásával ("fine tuning") kapcsolatos eseményeket jeleznek. Egyben felhívják a figyelmet az olfaktórikus központban jelen lévő és több szinten (perikaryon – axo-szomatikus, lokális neuropil – axo-axonikus, medulláris neuropil – axo-axonikus) megvalósuló szinaptikus kapcsolatrendszerre is. A sejtes réteg szinaptikus szerveződéséről egyedül Ratté és Chase (2000) közölt egy részletesebb, a szöveti megőrzés szintjén is elfogadható tanulmányt, mely szerint a sejtes réteg neuropil régióinak szerveződése megegyezik a medulláris neuropilével. A mi megfigyeléseink viszont azt támasztják alá, hogy a PC sejtes rétegének neuropil régiói, különös tekintettel a perikaryonokhoz kapcsolódó szinaptikus elrendeződésekre, lokális hálózatok elemeiként fontos és feltehetőleg különálló szabályozó egységeket alkotnak. Mind a *Helix*, mind a *Limax* PC sejtes rétegében nagyszámban előforduló axo-szomatikus kapcsolatok arra is utalnak, hogy nem csak a terminális és internális neuropilek, hanem a sejtes réteg szintjén megvalósuló szinaptikus modulációs folyamatok is fontos részei a tapogató régióból jövő olfaktórikus információk feldolgozásának. Ha figyelembe vesszük, hogy a PC bemenetet kaphat a cerebrális ganglion régióiból, illetve a pedális ganglionból is (Hanström, 1925; Ratté és Chase, 2000; Chase, 2002; Kobayashi és mtsai., 2010; Ierusalemky és Balaban, 2010), akkor nyilvánvaló, hogy az axo-szomatikus kapcsolatok (illetve maguk a lokális neuropilek is) nem tekinthetők kizárólag intrinsic szabályozási folyamatok megvalósulási helyeinek, hanem egy részüknél kívülről jövő (extrinsic) elemek is szerepet kell hogy játsszanak. Szintén megfigyeltük, hogy az axonprofilokkal kapcsolatban lévő perikaryonok gyakran nagyméretű, lizoszómákra emlékeztető elektron denz granulumokat is tartalmaztak. Érdekes módon a medulláris neuropilt alkotó axonprofilokban ilyen denz struktúrákat egy esetben nem tapasztaltunk. Ez indirekt módon arra utal, hogy a denz granulumokat tartalmazó sejtek a PC sejtes rétegének intrinsic globulus sejtjei. Ezt alátámasztja az is, hogy Ratté és Chase (2000) *Helix* PC sejtjeinek intracelluláris jelölése során olyan axonprofilokat is azonosítottak, melyek csak a sejtes rétegben lévő globulus sejtekkel szinaptizáltak.

Eredményeink alapján lehetőség nyílik arra, hogy új megvilágításba helyezzük a nyeles szemű csigák szaglólebensében az intrinsic és extrinsic innervációs rendszerek szinaptikus szerveződését (10. ábra) is, melynek segítségével az olfaktórikus információk feldolgozásának háttérében álló folyamatokról is remélhetőleg pontosabb képet kaphatunk.

Az intrinsic és extrinsic kapcsolatok végső soron összefüggő szabályozási rendszere feltehetően két szinten valósul meg: axonális szinten a neuropil régióban és a PC sejtes rétegében perikaryonális szinten. Ez utóbbi szinten olyan lokális hálózatok közreműködésével, melyeken keresztül a globulus sejtek aktivitása, de akár metabolikus folyamataik is szabályozódnak, és egyben a perikaryonális és axonális szabályozó mechanizmusok összhangba kerülnek. A PC neuropil régiójában felismert szinaptikus konfigurációk (divergencia, preszinaptikus moduláció) azt jelzik, hogy a szaglási információk feldolgozásában a lokális neuropilek integratív szerepet töltenek be. A preszinaptikus modulációs folyamatokra utaló konfigurációk pedig a tanulási folyamatok egyszerűbb formáinak strukturális megfelelői. Axonális szinten a preszinaptikus moduláció mind intrinsic, mind extrinsic elemeket is tartalmazhat, ami a folyamatot még komplexebbé teszi. Intracelluláris jelölést követően *Helix* PC-ben Ratté és Chase (2000) szintén azonosítottak szinaptikus divergenciát és konvergenciát bizonyító kapcsolatokat. A PC-ben megfigyelt intercelluláris kapcsolatok „vegyes” – szinaptikus és nem-szinaptikus – megjelenési formái azt jelzik, hogy a lokális szabályozási körök mind gyors, mind lassú, modulátoros események részei. Ugyanakkor az a tény, hogy az aktív exocitózist bizonyító membrán konfigurációk rendszeresen szoros, 16-20 nm-es axo-axonikus vagy axo-szomatikus kapcsolatok mentén voltak megfigyelhetők arra utal, hogy a modulátoros eseményeknél egyértelműen a gyorsabb és nem pedig a lassú, távoli kontrol folyamatok játszanak szerepet.

## **5.2. A procerebrum szerotonerg innervációja**

Vizsgálataink során erős 5-HT immunreaktivitást figyeltünk meg a PC sejtes rétegében. Kimutattuk, hogy az 5-HT-IR varikózus rostok individuálisan, kosárszerűen vették körbe a globulus sejteket, és ez az innervációs elrendezés szinte a teljes sejtes rétegre kiterjedt. Ez a megfigyelésünk az irodalomban az első morfológiai bizonyíték az 5-HT pivotális szerepének az olfaktórikus információk perikaryonális szintű szabályozásában, egyben jól kapcsolódik korábbi fiziológiai és biokémiai megfigyelésekhez is (Gelperin és mtsai., 1993; Gelperin 1999; Kobayashi és mtsai., 2010). A globulus sejtek perikaryonjainak szinte teljes körű 5-HT-IR innervációja egyben arra is utal, hogy az 5-HT nemcsak fontos modulátora a szaginformáció központi feldolgozásának, hanem azt egyidejűleg képes hatása alatt tartani és befolyásolni.

Noha a *Helix* és *Limax* igen közeli rokon Gastropoda fajok, megfigyeléseink szerint az 5-HTerg rendszer mégis eltérő innervációs mintázatot mutat a két faj PC-jében. Kobayashi és mtsai. (2010) a *Limax* PC teljes neuropil régiójában kiterjedt 5-HTerg innervációt mutatott ki. Vizsgálataink során a jelölt elemek camera lucidában történt követése során nemcsak a PC neuropil innerváció metacerebrális eredetét és mintázatát tártuk fel, hanem az 5-HTerg rostok laza hálózatát a sejtes rétegben is kimutattuk. Ez utóbbi lényeges különbség a *Helix* PC-vel szemben és megerősíti azt, hogy a *Helix* PC extenzív 5-HTerg innervációja lehetővé teszi a globulus sejtek aktivitásának akár szinkronizált finomhangolását, amely a szaginformációk feldolgozásában és a kialakítandó viselkedési válasz kialakításában is meghatározó lehet. Összehasonlító jelleggel megemlíjtjük, hogy a gerinctelenekben ubiquiteruropeptidet, az FMRFamidot tartalmazó rostok innervációs mintázata szintén egyértelmű különbséget mutat *Helix* és *Limax* PC-ben. Míg *Limax*-ban a sejtes réteg nagyszámú FMRFamid-IR neuront tartalmaz, melyek projekciói nemcsak a sejtes rétegbe, de a neuropilbe is vetülnek (Kobayashi és mtsai., 2010), addig *Helix* PC sejtes rétegében néhány FMRFamid-IR perikaryont leszámítva az erőteljes FMRFamid innerváció a neuropil régiókba koncentrálódik (Elekes és Nással, 1990). Elektrofiziológiai vizsgálataink során *Limax* PC-ben kimutattuk, hogy a lokálisan applikált 5-HT EPSP-sorozatokat indukál mindenekelőtt a ritmikusan tüzelő B sejtekben. Ez a perikaryonális szintű hatás, tekintettel a *Limax* PC globulus sejtrétegének szegényes 5-HT-IR innervációjára, felveti annak lehetőségét, hogy az 5-HT, legalábbis részben, nem neurotranszmitterként vagy modulátorként szerepel ezen a szinten, hanem hatása neurohumorális eredetű. Korábbi vizsgálatok során igazolták, hogy 5-HTerg neurotoxinnal (5,7-dihidroxitriptamin) történt kezelést követően *Limax*-ban a szagmemória hatékonysága csökkent (Shirahata és mtsai., 2006). Elektronmikroszkópos eredményeink egyértelműen alátámasztják, hogy az 5-HT-IR (5-HTerg) elemek fontos komponensei a *Helix* PC szinaptikus kapcsolatrendszerének mind perikaryonális, mind axonális szinten. Az 5-HT-IR axo-szomatikus illetve axo-axonikus kapcsolatok jellege mindenekelőtt az 5-HT modulátoros szerepére utal.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy megfigyeléseinkkel a PC olfaktórikus információk feldolgozásában betöltött szerepéhez eddig nem ismert adatokkal és megfigyelésekkel járultunk hozzá, melyek során a PC globulus sejtes rétegében egy komplex lokális kapcsolatrendszer jelenlétét mutattuk ki, illetve sikeresen azonosítottunk szinaptikus (gyors) és nem-szinaptikus (modulátoros) interakciókra utaló axo-szomatikus és axo-axonikus kapcsolatokat. Továbbá feltártuk a sejtes réteg és a neuropil mezők 5-



HTerg innervációs mintázatát, mely hozzájárul az 5-HT olfaktórikus információk feldolgozásában betöltött szerepének pontosabb értelmezéséhez.

### **5.3. Feszültségfüggő $K^+$ -csatornák sejtszintű eloszlása és funkcionális jellemzői a *Helix* központi idegrendszerében**

Régóta köztudott, hogy a puhatestűek KIR-je számos gerincesben is előforduló neuropeptidet tartalmaz, amelyek aminosav sorrendje gyakran átfedést mutat gerincesekben leírt típusokkal (Walker, 1986). Ez arra utal, hogy a különféle hírvivők egy része egy közös őstől, egy olyan prekursor molekulától származhatnak, melynek alapján az egyes neurotranszmitterek felépítésében megfigyelt hasonlóság magyarázható (Venter és mtsai., 1988; Barreiro-Iglesias és mtsai., 2010). Ennek alapján nem meglepő, hogy az egyes szignalizációs útvonalak alkotó elemei, mint pl. az ioncsatornák is olyan molekuláris felépítéssel rendelkeznek, melynek alapján valamennyien egyértelműen visszavezethetők egy közös ősrre. Ilyen ősi eredetűek a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák is (Rudy, 1988; Lu és mtsai., 2001; Yifrach, 2004), amelyek közül immunhisztokémiai vizsgálataink során sikeresen azonosítottunk három különböző  $K^+$ -csatorna családból származó csatornát a *Helix* KIR-ben. Ezek a  $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$ , és a  $K_v4.3$  voltak. Western blot vizsgálatokkal  $K_v2.1$  csatorna esetében 110 kDa, míg  $K_v4.3$  csatornánál 73 kDa mérettartományban azonosítottunk specifikus sávokat, melyek megegyeztek a gerincesekben talált csatornák irodalmi adataival (Mohapatra és mtsai., 2008; Yang és mtsai., 2001).  $K_v3.4$  csatorna esetében a vártnál kétszer akkora magasságban jelent meg a specifikus sáv, mely azonban a szekvencia specifikus kontroll peptid használatával eltűnt. Annak, hogy kétszeres súlynál jelent meg a specifikus sáv egyik lehetséges magyarázata az, hogy az antigén feltárás során nem voltak teljesen megfelelőek a redukáló körülmények. *Torpedo californica* elektromos szervében a nikotin típusú acetilkolin receptor mind monomer, mind dimer formában átjárható volt kationok számára, sőt, egyes szerkezetbeli eltérések (pl. az alegységek közti diszulfid hidak roncsolása) sem vezetett a receptor aktivitásának megváltozásához (Anholt és mtsai., 1980). Ebből és saját eredményeinkből arra következtetünk, hogy a dimerizáció, mely alapesetben egy olyan homomultimer csatornánál következik be, mint egy feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna, inkább szerkezeti, mintsem funkcionális változásokat von maga után. Két eltérő kinetikájú/farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező  $K^+$ -csatorna együttes expressziója, mely heteromultimer csatorna felépítést eredményez, azt is okozza, hogy az általuk létrehozott ionáramok jellegzetességei is megváltoznak (Christie és mtsai.,

1990), következésképpen a csatorna funkcionális változását okozza. Az a tény, hogy voltage-clamp kísérleteink során a BDS-II-vel megfelelően lehetett blokkolni a  $K_v3.4$  csatorna által létrehozott áramot, bizonyítja, hogy esetünkben *Helix* KIR-ben egy működő csatornáról van szó és megerősíti azt, hogy a csatorna dimer formája egy fajspecifikus jellegzetesség, mely alapjaiban nem befolyásolja annak elektrofiziológiai tulajdonságait.

A különböző, általunk vizsgált  $K^+$ -csatornák eltérő eloszlása felveti, hogy a különböző feszültségfüggő  $K^+$ -csatornákat tartalmazó neuroncsoportok egy-egy specifikus szignalizációs folyamatban vesznek részt. Kiss és mtsai. (2012) három  $Na^+$ -csatorna ( $Na_v1.9$ ,  $Na_v1.8$ , és  $Na_v1.7$ ) eloszlásának immunhisztokémiai vizsgálata során hasonló eredményeket kaptak: a különféle csatornákat expresszáló neuronok eltérő csoportokban voltak jelen az egyes ganglionokban. Ez alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a különböző ioncsatornák eltérő szabályozási folyamatokban töltenek be szerepet. A  $K_v4.3$  csatorna esetében a ganglionokat körbevevő kötőszöveti tok és az aorta fala is varikózus nyúlványokba koncentrálnak immunreaktivitást mutatott. Ezek a struktúrák feltehetőleg mindkét elemben jelenlévő izomrostok innervációjához kapcsolódnak, a csatorna szerepe pedig így a neuromuszkuláris átvedésben valószínűsíthető. Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *Helix* KIR-t körülvevő kötőszöveti tok mind 5-HT, mind FMRFamid immunreaktív rostokat tartalmaz (Hernádi és mtsai., 1989; Elekes és Nässel 1990; Elekes 1991), továbbá, hogy az 5-HT-IR varikozitások közeli, de nem specializált kapcsolatban állnak az izomrostokkal (Elekes, 1991). Ezért a kötőszöveti burokokban akár mindkét rosttípusban jelen lehet a  $K_v4.3$  csatorna és szerepet játszhat neuromuszkuláris modulációs folyamatokban. A  $K_v4.3$ -IR rostok az aorta falát a lumentől távol hálózta be (21H ábra) mely, az aorta ismert felépítése alapján, szintén arra utal, hogy a jelölt varikózus rostok az aorta fal simaizom sejtjeit innerválják. Az innervációs elrendeződés ezen formája erősen hasonlít arra, ami a *Helix*-ben az elsődleges nyálmirigy vezetéknel volt megfigyelhető, ahol a vezeték falában lévő izomrostokat innerváló rosthálózat nem a lumen mentén húzódó belső epitheliális sejtréteghez kapcsolódott, hanem a külső izomréteg mentén futott (Elekes, 2000; Kiss és mtsai., 2003, 2010).

A három vizsgált  $K^+$ -csatornát tartalmazó neuronok eloszlása részleteiben ugyan némileg eltérő, de mégis egységes képet alkotott a *Helix* KIR-ben (23. ábra). A cerebrális ganglionban a jelölt neuronok csoportjai hasonló anatómiai régiókban helyezkedtek el, döntő részben a metacerebrum egyes lebenyeiben illetve a PC-ben. A PC-ben a kisméretű (5-8  $\mu m$ ) globulus sejtek populációján belül mindhárom vizsgált csatorna esetében az immunreaktív sejtcsoportok általában eltérő területeken jelentek meg, és legtöbb esetben

kisszámú jelölt neuron alkotta őket. A  $K^+$ -csatornákat expresszáló globulus sejtcsoportok eltérő lokalizációja felveti, hogy a kisméretű, nem tüzelő, NB sejtek látszólag homogén populációja az oszcillációs tevékenység illetve általánosabban az olfaktórikus információ feldolgozás során eltérő (szabályozó) szerepet tölt be. Azok a globulus sejtek, amelyek a PC külső, marginális felszínén helyezkednek el és méretben nagyobbak voltak (12-15  $\mu\text{m}$ ) soha nem mutattak immunpozitivást. Ugyanakkor Kiss és mtsai. (2012) a PC neuronok  $Na^+$ -csatorna tartalmának immunhisztokémiai elemzése során  $Na_v1.9$  valamint  $Na_v1.8$  csatornák jelenlétét kimutatták mind a kisebb, mind a nagyobb méretű neuronok egy részében. Ez nyilvánvalóan azt jelenti, hogy a  $K^+$ - és  $Na^+$ -csatornákat, legalábbis részben a globulus sejtek eltérő populációi tartalmazzák. Feltételezhető, hogy a globulus sejtek mintegy 10%-át alkotó nagyobb méretű, tüzelő neuronok (B sejtek) (Chase 2002; Nikitin és mtsai, 2005) az általunk vizsgált  $K^+$ -csatornáktól eltérő típusokat expresszálnak. Míg a globulus sejtek populációjának döntő részét alkotó ritkán (vagy nem) tüzelő (NB) neuronokat jellemzik azok a  $K^+$ - és  $Na^+$ -csatornák, melyekhez jelen vizsgálataink vagy friss irodalmi adatok (Kiss és mtsai., 2012; Pirger és mtsai., 2013) kapcsolódnak.

Az akciós potenciál gyors repolarizációs szakaszában és a tüzelési frekvencia meghatározásában elsődlegesen olyan ioncsatornák vesznek részt, melyeken keresztül  $K^+$ -ionok áramlanak (Rudy, 1988). Ezért részletesen vizsgáltuk egyes, immunhisztokémiailag is detektált  $K^+$ -csatorna elektrofiziológiai (funkcionális) sajátosságait a PC sejtek esetében. Ilyen kifelé egyenirányító áram valósul meg a  $K_v2.1$  ioncsatornán keresztül, melyet számos globulus sejt expresszált (18. ábra). Elektrofiziológiai kísérleteink során azt is kimutattuk, hogy a ritkán tüzelő PC sejtek tranziens ( $K_v2.1$ ) és A-típusú ( $K_v4.3$ ) áramot is tartalmaznak (27. ábra). A  $K_v4.3$ -IR sejtek kis számban voltak csak jelen a PC-ben és a PC és a neuropil régió határán helyezkedtek el (21B, 23. ábra).  $K_v4.3$ -IR nyúlványok mind a sejttestek mellett, mind a terminális és internális neuropil régióban is futottak (21C, D ábra), mely arra utal, hogy ez a csatorna a szag ingerek feldolgozásának integratív modulációs folyamataiban a PC minden szintjén fontos szerepet tölt be. Ennek a csatornának fiziológiai szerepe elsősorban a tüzelési frekvencia csökkentésében és a szinaptikus transzmissziós hatékonyság modulálásában van (Rogawski, 1985). Ugyanakkor a PC neuronok teljes kimenő áramában nem csak az általunk azonosított  $K^+$ -áramok, hanem további  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$ -áramok is szerepet játszanak (Pirger és mtsai., 2013).

A táplálkozási folyamatok szabályozásának központjában, a pofa (bukkális) ganglionban (Chase, 2002) kisebb és nagyobb immunreaktív  $K^+$ -csatorna tartalmú sejtcsoportokat figyeltünk meg. A jelölt sejtek mérete 15-20  $\mu\text{m}$  vagy 30-40  $\mu\text{m}$  volt, és

egy részük a caudális régióban, közel a garat és nyálmirigy ideg eredetéhez helyezkedett el. A cerebrális és bukkális gangliont összekötő konnektívum eredeténél további,  $K_v3.4$ -IR és  $K_v4.3$ -IR sejtcsoportokat azonosítottunk, míg a bukkális kommissúra közelében  $K_v2.1$  és  $K_v3.4$  immunreaktív sejteket találtunk. A pofa ganglionban azonosított óriásneuronok közül (Altrup és Speckmann, 1994) csak a B2 neuron, melynek elsődleges neurotranszmittere az acetilkolin és a nyálmirigyét innerválja (Altrup és Speckmann, 1994), mutatott immunpozitivitást mind anti- $K_v3.4$ , mind anti- $K_v4.3$  antiszérummal szemben. Itt jegyezzük meg, hogy érdekes módon más, a *Helix* KIR-ben korábban azonosított óriásneuron, mint pl. a cerebrális 5-HTerg CGC (Pentreath és mtsai., 1982) illetve az FMRFamid tartalmú C3 (Cottrell és mtsai., 1983) jelzésű óriásneuronok, vagy a pedális ganglion dopaminerg RPeD1 óriásneuronja (Chase, 2002) nem mutatott immunreaktivitást egyik általunk vizsgált csatorna esetén sem. Ezek a neuronok nagy valószínűséggel más  $K^+$ -csatorna családok tagjait expresszálják. A garatalatti gangliongyűrűben csak részben volt átfedés a jelölt neuronok megjelenésében, a pedális ganglion rostro-caudális és rostro-laterális lebenyében valamint a cerebro-pleurális és cerebro-pedális konnektívumok eredésénél azonosítottunk  $K_v2.1$ -IR,  $K_v3.4$  és  $K_v4.3$ -IR neuronokat is. Egyes  $K^+$ -csatornáknak ez az eloszlása feltehetően azt jelenti, hogy amennyiben ugyanazokban a neuronokban expresszálódnak is, de különféle szignalizációs utakban töltenek be szabályozó szerepet. Továbbá, amit több esetben is tapasztalunk, hogy egy-egy neuroncsoport egyes sejtjei csak egy adott csatornát expresszálnak, például a PC-ben, a parietális ganglionban vagy a pedális ganglion caudo-mediális lebenyében lévő neuronok esetében arra utal, hogy ezek csak egyes, jól meghatározott intracelluláris szabályozó folyamatokban játszanak szerepet.

A HRP-DAB reakció során kapott reakciótemékek sejtszintű lokalizációja és eloszlása a jelölt neuronokban nem csak a sejttestekre korlátozódott, hanem varikózus axonjaik is rendszeresen mutattak immunpozitivitást. Ez arra utal, hogy a  $K^+$ -csatornák axo-axonikus és axo-szomatikus szignalizációs utakat is meghatároznak és pre- és posztzinaptikus folyamatokban is szerepük van. A gyakori és erős perikaryonális jelölődésnek két lehetséges magyarázata lehet: az a csatornák szintézisének helyeire és/vagy axo-szomatikus kapcsolatokban való részvételére utal. Axo-szomatikus kapcsolatok jelenléte ismert *Aplysia* és *Helix* KIR-ben (Schwartz és Shkolnik, 1981; Elekes és mtsai., 1985; Elekes, 1991), de *Helix* és *Limax* PC globulus sejttestjeiben is megfigyelték már őket (Elekes és mtsai., 2013). Érdekes módon  $K_v2.1$  csatorna esetében nem találtunk immunreaktív varikozitásokat a globulus sejtek között, ennek feltehetően az

az oka, hogy ez a csatornatípus nem közvetlenül határozza meg a globulus sejtek aktivitását. A  $K_v4.3$  csatorna jelenlétét ultrastrukturálisan is vizsgáltuk HRP-DAB reakciót követően. A jelölt varikozitások jellegzetesen egyforma ultrastrukturális szerveződést mutattak: bennük következetesen számos nagyméretű granuláris vezikula (80-100 nm) volt megfigyelhető. A jelölt elemek mellett elhelyezkedő kisebb, jelöletlen profilok 50-60 nm nagyságú agranuláris vezikulákat és nagyobb, változatos formájú és elektron denzitású 120-160 nm méretű vezikulákat is tartalmaztak, kihangsúlyozva az immunjelölt elemek specifikusságát. Elektronmikroszkópos vizsgálataink megerősítették fénymikroszkópos eredményeinket, miszerint a  $K^+$ -csatorna antitestekkel kapott immunhisztokémiai festések során a reakciótermékek nem koncentráálódtak kizárólagosan a sejtmembránban, hanem homogéneen voltak jelen a neuronokban illetve finom precipitátumok formájában a granuláris vezikulák membránján is lokalizálódtak.

#### **5.4. $K^+$ -csatornák eloszlásának összehasonlítása más szignalizációs rendszerekkel**

Megfigyeléseink szerint a vizsgált  $K^+$ -csatornákat tartalmazó neuronok részben átfedést mutattak olyan jelölt sejtekkel vagy sejtcsoportokkal, amelyek transzmitter vagy modulátor tartalmát korábban immunhisztokémiai úton (Hernádi és mtsai., 1989, 1993, 1995; Elekes és Nässel, 1990; Elekes, 2000) vagy immunhisztokémia és intracelluláris jelölés együttes alkalmazásával (Hernádi, 2000) *Helix* KIR-ben feltártuk. Ebben az összefüggésben itt is megjegyezzük, hogy a funkcionálisan és neurokémiaailag azonosított jellegzetes Gastropoda óriásneuronok (Chase, 2002) közül egyedül a pofa ganglion B2 sejtje mutatott immunreaktivitást anti- $K_v3.4$  és anti- $K_v4.3$  antiszérummal szemben, mely a nyálmirigy beidegzésében tölt be fontos szerepet (Altrup és Speckmann, 1994). Ugyanakkor különböző  $Na^+$ -csatornák immunhisztokémiai lokalizációja során a *Helix* KIR-ben több óriásneuron is immunreaktívnek bizonyult (Kiss és mtsai., 2012). Anti- $Na_v1.7$  immunreaktivitást mutatott a metacerebrális C3-as FMRFamiderg óriásneuron (Cottrell és mtsai, 1983), valamint a szintén FMRFamiderg jobb RP11 és a bal pleurális LP11 kommand neuronok (Balaban, 1979). A B3 bukkális óriássejt (Altrup és Speckmann, 1994) anti- $Na_v1.8$  antitest immunhisztokémiai vizsgálata során mutatott jelölődést, míg  $Na_v1.9$ -es csatornát expresszáltak az FMRFamid-IR (Elekes és Nässel, 1990) jobb parietális RPa2 és RPa3 kommand neuronok (Balaban, 1979).

Habár az 5-HT-t tartalmazó sejtcsoportok (Hernádi és mtsai., 1989) és az általunk vizsgált  $K^+$ -csatornákkal jelölt neuronok eloszlása nem mutatott átfedést, a  $K_v2.1$ -IR és

K<sub>v</sub>4.3-IR axonális nyúlványok (18, 21. ábra) és az 5-HT-IR rostok (12. ábra) elhelyezkedése feltűnő hasonlóságot mutatott a PC sejtes rétegében. Feltehetően a K<sup>+</sup>-csatornák expressziója csak az 5-HTerg sejtek nyúlványrendszerének PC-beli szakaszaira (szinaptikus varikozitásaira) korlátozódik. A PC sejtes rétegének FMRFamid-IR innervációja szintén ismert mind *Helix*-ben (Elekes és Nässel, 1990), mind *Limax*-ban (Cooke és Gelperin, 1988a; Kobayashi és mtsai., 2010). Ezért feltételezzük, hogy a K<sub>v</sub>2.1 és K<sub>v</sub>4.3 csatornák nagy valószínűséggel szelektíven vesznek részt extrinsic (5-HT) és intrinsic (FMRFamid) szabályozott olfaktórikus információk neurokémiai komplex szabályozásában (Gelperin, 1999; Matsuo és mtsai., 2010; Kobayashi és mtsai., 2010). Az általunk vizsgált K<sup>+</sup>-csatornákat tartalmazó neuronok elhelyezkedése a *Helix* KIR egyéb területein más, szignalizációs utakban meghatározó transzmitter molekuláékival is átfedett, mint például a dopamin (DA, Hernádi és mtsai., 1993) és egyes endogén (mollusca) neuropeptidok, mint az FMRFamid (Elekes és Nässel, 1990; a CARP (catch-relaxing peptid, Hernádi és mtsai., 1995) és a MIP (Mytilus inhibitory peptid, Elekes és mtsai., 2000). Ezen szignál molekulákat korábban, mint fontos szabályozó molekulákat azonosították már Gastropoda fajokban (l. pl. Walker, 1986, 1992; Walker és mtsai., 1996). A pofa ganglion caudo-mediális és caudo-laterális részén mindhárom vizsgált csatorna esetén azonosítottunk immunreaktív neuronokat. Ezek a sejtek korábbi irodalmi adatok alapján neuropeptideket (MIP, CARP) tartalmaznak, illetve tirozin-hidroxiláz immunreaktivitást mutattak, mely utóbbi a sejtek dopamin tartalmára utal (Hernádi és mtsai., 1993). A cerebrális ganglion metacerebrális területén kisméretű peptiderg neuronok (15-30 μm) csoportjai találhatóak a pedális, pleurális és komisszurális lebenyekben is, amelyek régiójában mindhárom ioncsatorna esetében immunreaktív sejteket azonosítottunk. A pedális ganglion rostro-laterális és laterális lebenyében, ahol mindhárom endogén neuropeptid jelen van szintén találtunk a feszültségfüggő ioncsatornákat expresszáló sejteket. Továbbá, a caudo-mediális lebeny K<sub>v</sub>4.3-IR sejtjei megegyeznek azokkal, amelyek tirozin hidroxiláz immunreaktívak is voltak. A pleurális ganglion caudális részén nagyszámú K<sub>v</sub>2.1-IR és K<sub>v</sub>4.3-IR neuront mutattunk ki, melyek átfednek azokkal a sejtekkel, amelyek irodalmi adatok alapján MIP- és FMRFamid-IR is mutatnak. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a dopaminerg és peptiderg rendszerek működésében az általunk vizsgált feszültségfüggő K<sup>+</sup>-csatornák is szerepet játszanak. Immunhisztokémiai és retrográd jelölést követően a peptiderg neuronok (FMRFamid és CARP tartalmú), melyek a *Helix* különböző feji régióit innerválják, legnagyobb számban a metacerebrum kommisszurális, pleurális, és pedális lebenyében lokalizálódtak (Hernádi,

2000), ugyanott, ahol mindhárom csatorna esetében azonosítottunk immunreaktív neuronokat (23. ábra). Ez arra utal, hogy a különböző feji régióit (ajak, tapogatók) innerváló és endogén mollusca neuropeptideket tartalmazó cerebrális neuronok szignalizációs üzeneteiket az általunk vizsgált feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák által közvetített úton juttatják el posztzinaptikus célpontjaikhoz. Ezek a neuronok egyébként a korábban vizsgált  $Na^+$ -csatornák közül a  $Na_v1.8$  csatornát is kifejezik (Kiss és mtsai., 2012).

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Gastropoda fajok procerebrumának anatómiai szerveződéséről és hírvivő molekuláiról, továbbá a tanulás és memória folyamatokban betöltött szerepéről számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Ultrastrukturális ismereteink a PC sejtes rétegének és az 5-HT-nak részletes projekciós és szinaptikus kapcsolat rendszeréről hiányosak, ezért vizsgálataink során először ezeket tanulmányoztuk rutin elektronmikroszkópia segítségével, illetve immunhisztokémiai technikákkal. Ugyancsak kevés információ áll rendelkezésünkre a Gastropoda KIR-ben jelen lévő ioncsatornákról, azok sejtszintű eloszlásáról, az egyes sejtekben aktívan működő ionáramokról, azok esetleges kapcsolatáról a szaginformáció feldolgozási folyamataiban. Immunhisztokémiai és elektrofiziológiai vizsgálatokkal kívántunk közelebbi képet kapni a *Helix*-ben jelen lévő feszültségfüggő  $K^+$ -csatornákról. A kapott eredményeink hozzájárulnak ahhoz, hogy jobban megértsük Gastropoda KIR szinaptikus és nem-szinaptikus kapcsolatrendszerét és az azokban szerepet játszó egyes hírvivő és intramembrán molekulák természetét, valamint megismerjük az integratív folyamatokban betöltött szerepüket is.

Új eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

1. Leírtuk a szaglólébebeny (procerebrum, PC) sejtes rétegének ultrastrukturális szerveződését éticsigában (*Helix pomatia*) és egy meztelen csigafajban (*Limax valentianus*). Sikeresen azonosítottunk a sejtes rétegben a globulus sejtek között lokális neuropil régiókat fény- és elektronmikroszkópos vizsgálataink során. Leírtuk a lokális neuropilekhez köthető szinaptikus- és nem szinaptikus kapcsolatokat jellemző axo-axonikus és axo-szomatikus szinteken, továbbá feltártuk a szinaptikus és nem-szinaptikus kapcsolatokat jellemző konfigurációkat, mint a konvergencia, divergencia és a preszinaptikus moduláció, melyek feltehetően alapvetően meghatározóak a szag feldolgozó hálózatok szignalizációs útjaiban. A szoros, de nem specializált kapcsolatok mentén jellegzetes membránkonfigurációkat is kimutattunk, melyek az aktív exocitózis jelenségére utalva a PC-ben zajló modulációs folyamatok jelentőségét húzzák alá.
2. Részletesen jellemeztük a PC 5-HTerg innervációs rendszerét fény- és elektronmikroszkópos szinten kétlépéses peroxidáz immunhisztokémiai festéseket



követően. *Helix*-ben az 5-HT-IR varikózus rostok sűrűn behálózzák a PC neuropiljét és sejtes rétegét is. Bár az egyes neuropil régiók innervációja eltérő erősségű volt, az 5-HT-IR rostok végső soron egy összefüggő hálózatot alkottak a PC egészében, melyek a metacerebrum régiójából érkeznek. Kimutattuk, hogy az 5-HT-IR rostok a PC szinte valamennyi perikaryonjait individuálisan, kosárszerűen innerválják. Ultrastrukturális szinten a sejtes rétegben az 5-HTerg rostok által formált axo-axonikus és axo-szomatikus kapcsolatokat is azonosítottunk, melyek során az 5-HT-IR elemek a PC szinaptikus konfigurációit mind axonális, mind perikaryonális szinten feltártuk. Eredményeink az 5-HT modulációs szerepét támasztják alá, annak funkcionális-morfológiai hátterét adják. *Limax* PC-ben a sejtes régió sporadikus innervációjának modulátoros szerepét elektrofiziológiai vizsgálatainkkal igazoltuk, kimutatva az 5-HT serkentő hatását a tüzelő B sejtek aktivitására.

3. Három feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna ( $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$  és  $K_v4.3$ ) jelenlétét mutattuk ki *Helix pomatia* központi idegrendszerében és néhány perifériás struktúrában. A három vizsgált  $K^+$ -csatornát tartalmazó neuronok száma viszonylag alacsony volt, eloszlásuk részben eltérő, de az általános mintázati képet illetően hasonló volt a teljes *Helix* KIR-ben. Azaz a jelölt neuronok változó méretű csoportokat alkottak, melyek lényegében mindhárom csatorna esetében ugyanazokban a ganglionokban és ugyanazokban az intraganglionáris régiókban voltak jelen. Ez arra utal, hogy a három vizsgált csatorna feltehetőleg specifikus, egy-egy adott szabályozáshoz kötötten funkcionál. Megfigyeltük, hogy a  $K_v4.3$  csatorna esetén a ganglionokat körbevevő kötőszöveti tok és az aorta fala is erős immunreaktív innervációt mutatott. Ez a csatorna típus ideg-izom kapcsolatokban betöltött szerepére utal.

4. Ultrastrukturális szinten a *Helix* KIR egyes területein (PC, pedális ganglion) kimutattuk, hogy a  $K_v4.3$ -IR varikozitások egy jellegzetes axon típust képviselnek, melyben számos nagy (80-100 nm) elektron denz granulumot figyelhető meg, és ahol a reakciótermék mind az axolemmához, mind a granulumok külső felszínéhez kötődik. A specifikus, egy axon típusban való jelenlét ismételten hangsúlyozza az egyes  $K^+$  csatornák eltérő szerepét szabályozási folyamatokban.

5. Patch-clamp és voltage-clamp kísérletek során az előzetesen immunhisztokémiai technikákkal sejtszinten azonosított csatornák funkcionális jellemzőit vizsgáltuk *Helix* KIR-ben. Voltage-clamp eredményeink megerősítették az immunhisztokémiai vizsgálatok

során azonosított  $K^+$ -csatornák jelenlétét *Helix* KIR-ben. Sikeresen azonosítottuk a  $K_v3.4$  csatorna által létrehozott gyors, A-típusú  $K^+$ -áramot a bukkális ganglion B2 neuronjában, a PC  $K_v2.1$ -IR sejtekben a késői egyenirányító áramot és a pedális ganglion  $K_v4.3$ -IR neuronjaiban pedig szintén A-típusú, de lassú kinetikájú  $K^+$ -áramot regisztráltunk. Patch-clamp vizsgálatok is megerősítették kifelé menő (outward) feszültségfüggő  $K^+$ -áram jelenlétét PC sejtekben, mely mind kifelé egyenirányító, mind tranziens (A-áram) komponenset tartalmazott. Ez arra utal, hogy a szaglási információt feldolgozó hálózatokban mindkét áram típus szerepet játszik.

## 7. SUMMARY

The procerebrum (PC) of terrestrial pulmonates is the center of odor processing. There are a number of data concerning the characteristics of the anatomical organization and neurotransmitter content, as well as the olfactory learning and memory processes in the PC of Gastropoda species. On the other hand, we have little information about the ultrastructural organization of the cell body layer and the 5-HTergic innervation pattern of the PC at high resolution. Therefore, we have performed both routine electron microscopy and correlative light- and electron microscopic immunohistochemistry, in order to resolve the fine structural organization, and 5-HT immunoreactive innervation of the cell body layer and the medullary neuropil. Data have also been sporadic on the presence, distribution and cellular localization of ion channels, especially the K<sup>+</sup>-channels in the snail CNS. To have a detailed insight into the distribution of K<sup>+</sup>-channels, including also their possible implication in odor transduction processes, we applied immunohistochemical and electrophysiological methods. Therefore we have analyzed the presence and functional characteristics of different voltage-gated K<sup>+</sup>-channels in the *Helix* CNS, including the PC. Our results would also contribute to our better understanding of the synaptic and non-synaptic connections and their signal molecules of the Gastropod CNS, playing role in integrative, among others olfactory, processes.

Our new results can be summarized as follows:

1. We have described the detailed ultrastructural organization in the globuli cell layer of the PC in two prominent terrestrial pulmonate gastropod species, *Helix pomatia* and *Limax maximus*. Our electron microscopic analysis has revealed that the PC cell body layer in both species contains local neuropil regions of different size which are characterized by a high frequency of occurrence of axo-axonic and axo-somatic contacts, displaying different forms of synaptic configurations, such as convergence, divergence and presynaptic modulation. Along the unspecialized axo-somatic contacts exocytotic membrane configurations were also observed indicating the process of extrasynaptic release, which underlines to significance of modulatory processes in the PC. These observations considerably widen the interpretation possibilities concerning the role and modulation of integrative olfactory processing networks in the PC.

2. We have uncovered a number of *de novo* details about the *Helix* PC 5-HTergic innervation. Two-step peroxidase immunohistochemistry revealed a rich innervation established by a 5-HT-IR network. Low- and high magnification views showed that the cell body layer received a massive innervation by varicose axon processes, surrounding the individual cell bodies and forming frequently a perisomatic basket-like innervation. The neuropil regions also were richly supplied by 5-HTergic-IR processes originating from the metacerebrum, although the different neuropil regions displayed a varying intensity of innervation. At the ultrastructural level, 5-HT-IR fibers often formed axo-somatic and axo-axonic connections in the PC cell body layer, accompanied by different synaptic configurations. In the cell body layer of the *Limax* PC the modulatory role of the sporadic 5-HTergic innervation was proved by electrophysiological experiments, showing that the focal application of 5-HT increased EPSP activity of the bursting cells. Our results suggest that 5-HT is a pivotal signal molecule, having a general modulatory role in the PC, where it influences the neuronal activity both perikaryonal and axonal level. Furthermore, our observations provide a firm functional-morphological basis of the 5-HTergic innervation in the PC.

3. Our immunohistochemical experiments revealed neurons displaying immunoreactivities against three voltage-gated potassium channels ( $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$  and  $K_v4.3$ ) throughout the CNS of *Helix*. Although slight differences in the number of labeled cells and cell groups and their localization in the different ganglia could be observed, in general the distribution pattern of the different channel expressing cells was similar. The antibodies used labeled distinct sets of neurons, which innervate the neuropil of the ganglia in the CNS. The overall discrete number of labeled cell groups, representing subpopulations of larger units of neurons, suggests a well-defined specific role for each  $K^+$ -channels studied.  $K_v4.3$  immunoreactivity also occurred in the neural sheath and the aorta wall, referring the involvement of the channel in neuro-muscular interactions.

4. At ultrastructural level we identified  $K_v4.3$ -IR varicosities in some parts of the *Helix* CNS, the PC and the pedal ganglion. The labeled varicosities were characterized by a rather uniform fine structure, containing one type of large granular vesicles measuring 80-100 nm. The immunoprecipitation could be observed also along the axolemma and on the outer surface of the vesicles.

5. Patch-clamp and voltage-clamp experiments have proven the functional existence of the different  $K^+$ -channels in cell types previously demonstrated to be immunoreactive to one of antibodies raised against them. We successfully identified a typical fast transient  $K^+$ -current (A-current) in the B2 neuron of the buccal ganglion. Using the same voltage-protocol, a different, slow transient A-type  $K^+$ -current was recorded from neurons located in the caudo-medial lobe of the pedal ganglion. In the PC, both patch-clamp and voltage-clamp experiments revealed delayed rectifier  $K^+$ -current in neurons expressing  $K_v2.1$  type channel, and transient A-type  $K^+$ -current in neurons expressing  $K_v4.3$  type channel. It suggests that both ion channels are involved in different ways or steps of odor information processing.

## 8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### 9.1. A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

**Battonyai I**, Krajcs N, Serfőző Z, Kiss T, Elekes K. (2014) Potassium channels in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*: localization and functional characterization *Neuroscience* DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.03.006 **IF: 3,389**

**Battonyai I**, Serfőző Z, Elekes K. (2012) Potassium channels in the *Helix* central nervous system: preliminary immunohistochemical studies. *Acta Biol. Hung.* 63 (Suppl. 2), 146-150 **IF: 0,504**

**Battonyai I**, Elekes K. (2012) The 5-HT immunoreactive innervation of the *Helix* procerebrum. *Acta Biol. Hung.* 63 (Suppl. 2), 96-103. **IF: 0,504**

Elekes K, **Battonyai I**, Kobayashi S, Ito E. (2013) Organization of the procerebrum in terrestrial pulmonates (*Helix*, *Limax*) reconsidered: cell mass layer synaptology and its serotonergic input system, *Brain Struct. Funct.* 218:477-490. **IF: 7.837**

Pirger Z, **Battonyai I**, Krajcs N, Elekes K, Kiss T (2013) Voltage-gated membrane currents in neurons involved in odor information processing in snail procerebrum. *Brain Struct. Funct.* 219:673–682 **IF: 7.837**

### 9.2. A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások, poszterek

**Battonyai I**, Krajcs N, Kiss T, Elekes K.: Potassium channels in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*, XIV. MITT Konferencia, Budapest, január 17-19., 2013

**Battonyai I**, Elekes K.: Synapses and neurotransmitters in the olfactory center of the snail, 7th European Conference on Comparative Neurobiology, Budapest April 25-27, 2013

**Battonyai I**, Krajcs N, Kiss T, Elekes K: Distribution of voltage-gated potassium channels in the snail central nervous system, FFRM, Prague, September 11 - 14, 2013

**Battonyai I**, Krajcs N, Serfőző Z, Kiss T, Elekes K: Potassium channels in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*. MITT 14th Conference of the Hungarian Neuroscience Society, January 17-19, 2013, Budapest, Hungary. *Abstract: MITT Abstract Book*, ISBN 978-963-88224-2-0, p. 84-85.

Krajcs N, **Battonyai I**, Hernádi L, Elekes K, Kiss T: Neural control of string muscles responsible for patterned tentacle movements of the snail, *Helix pomatia*. International IBRO Workshop, 2012. január 19-21, Szeged. *Abstract: Ideggyógy. Szemle/Clin. Neurosci.* 2012;65(S1):39

**Battonyai I**, Serfőző Z, Krajcs N, Kiss T, Elekes K: Immunohistochemical visualization of potassium channels in the central nervous system of the snail. 8th FENS Forum of Neuroscience, July 14-18, 2012, Barcelona, Spain

**Battonyai I**, Elekes K: Is serotonin a pivotal modulator in the snail olfactory center? MITT 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society, January 20-22, 2011, Budapest, Hungary. Abstract: *Front. Neurosci. Conference Abstract: 13th Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT)*. doi: 10.3389/conf.fnins.2011.84.00094

**Battonyai I**, Serfőző Z, Elekes K: Potassium channels in the *Helix* central nervous system: preliminary immunohistochemical studies. 12th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), August 31 – September 04 2011, Tihany, Hungary

**Battonyai I**, Elekes K: The 5-HT immunoreactive innervation of the *Helix* procerebrum. 12th Symposium on Invertebrate Neurobiology (ISIN), August 31 – September 04, 2011, Tihany, Hungary

**Battonyai I**, Krajcs N, Kiss T, Elekes K: Serotonin is involved in both the central and peripheral regulation of snail olfaction. 3rd European Synapse Meeting, October 13-15, 2011, Balatonfüred, Hungary

Elekes K, Fekete ZN, **Battonyai I**, Mikite K, Kobayashi S, Ito E: Organization of the olfactory center of terrestrial snails (*Helix*, *Limax*) revisited: massive axo-somatic innervation of the globuli cells in the procerebrum. International IBRO Workshop 2010, Pécs, 2010. január 21-23. Abstract: *Front. Neurosci. Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010*. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00034

Pirger Z, Kiss T, **Battonyai I**, Elekes K: Sodium-channel and membrane current characteristics of the procerebral neurons of *Helix pomatia*. International IBRO Workshop 2010, Pécs, 2010. január 21-23. Abstract: *Front. Neurosci. Conference Abstract: IBRO International Workshop 2010*. doi: 10.3389/conf.fnins.2010.10.00117

### 9.3. Egyéb publikációk

Kiss T, **Battonyai I**, Pirger Z. (2014) Down regulation of sodium channels in the central nervous system of hibernating snails. *Physiology and Behavior Közlésre elfogadva*. **IF: 3.160**

Talapka P, Bódi N, **Battonyai I**, Fekete E, Bagyánszki M. (2011) Subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rat duodenum. *World J Gastroenterol*. 17:1026-1029. **IF: 2.471**

Bódi N, **Battonyai I**, Talapka P, Fekete E, Bagyánszki M. (2009) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. *Acta Biol. Hung*. 60:347-358. **IF: 0.593**

## 9. IDÉZETT IRODALOM

Abel T, Kandel ER, 1998. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long term memory storage. *Brain Res Rev* 26:360-378.

Abrams TW, 1985. Activity-dependent presynaptic facilitation: an associative mechanism in *Aplysia*. *Cell Mol Neurobiol* 5:123-45.

Ache BW, 1991. Phylogeny of smell and taste. In *Smell and Taste in Health and Disease* (ed.: Getchell TV, Doty RL, Bartoshuk LM, Snow JB), pp. 3-18. New York: Raven Press.

Adrian ED, 1942. Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J Physiol (Lond)* 100: 459-473.

Alkon DL, Sakakibara M, Forman R, Harrigan J, Lederhendler I, Farley J, 1985. Reduction of two voltage-dependent K<sup>+</sup> currents mediates retention of a learned association. *Behav Neural Biol* 44:278-300.

Altrup U, Speckmann EJ, 1982. Responses of identified neurons B1, B2 and B3 in the buccal ganglia of *Helix pomatia* to stimulation of ganglionic nerves. *Comp Biochem Physiol A* 72: 643-657.

Altrup U, Speckmann EJ, 1994. Identified neuronal individuals in the buccal ganglia of *Helix pomatia*. *Neurosci Behav Physiol* 42:1090-115.

Angers A, Storozhuk MV, Duchaine T, Castellucci VF, DesGroseillers L, 1998. Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J Neurosci* 18:5586-93.

Anholt R, Lindstrom J, Montal M, 1980. Functional equivalence of monomeric and dimeric forms of purified acetylcholine receptors from *Torpedo californica* in reconstituted lipid vesicles. *Eur J Biochem* 109:481-487.

Antonov I, Antonova I, Kandel ER, Hawkins RD, 2003. Activity-dependent presynaptic facilitation and Hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in *Aplysia*. *Neuron* 37:135-147.

Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, Hayes RA, McGregor IS, 2005. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1123-1144.

Azanza MJ, Pérez-Castejón C, Pes N, Pérez-Bruzón RN, Aisa J, Junquera C, Maestú C, Lahoz M, Martínez-Ciriano C, Vera-Gil A, Del Moral A, 2008. Characterization by immunocytochemistry of ionic channels in *Helix aspersa* suboesophageal brain ganglia neurons. *Histol Histopathol* 23:397-406.



- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER, 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci* 93:13445-13452.
- Balaban PM, 1979. A system of command neurons in snail's escape behavior. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 39:97-107.
- Balaban PM, 1987. Changes in the duration of action potentials of functionally different *Helix* neurons in response to serotonin. *Neurophysiology* 19:316-22. (In Russian)
- Barreiro-Iglesias A, Laramore C, Shifman MI, Anado'n R, Selzer ME, Rodicio MC, 2010. The sea lamprey tyrosine hydroxylase: cDNA cloning and in situ hybridization study in the brain. *Neuroscience* 168:659-669.
- Baumann A, Grupe A, Ackermann A, Pongs O, 1988. Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *EMBO J* 7:2457-63.
- Baxter DA, Byrne JH, 1990. Differential effects of cAMP and serotonin on membrane current, action-potential duration, and excitability in somata of pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 64:978-990.
- Bernocchi G, Vignola C, Scherini E, Necchi D, Pisu MB, 1998. Bioactive peptides and serotonin immunocytochemistry in the cerebral ganglia of hibernating *Helix aspersa*. *J Exp Zool* 280:354-367.
- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader LA, 2004. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* 84:803-33.
- Boeckh J, Ernst KD, Selsam P, 1987. Neurophysiology and neuroanatomy of the olfactory pathway in the cockroach. *Ann N Y Acad Sci* 510:39-43.
- Bukanova JV, Solntseva EI, Skrebitsky VG, 2005. Cyclic nucleotides induce long-term augmentation of glutamate-activated chloride current in molluscan neurons. *Cell Mol Neurobiol* 25:1185-1194.
- Bullock TH, Horridge G.A, 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*. Freeman and Co., San Francisco.
- Butler A, Wei A, Baker K, Salkoff L, 1989. A family of K<sup>+</sup> channel genes in *Drosophila*. *Science* 17:943-7.
- Camerino DC, Tricarico D, Desaphy JF, 2007. Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics* 4:184-98.

- Chabaud P, Ravel N, Wilson D. A, Mouly A. M, Vigouroux M, Farget V, Gervais R, 2000. Exposure to behaviorally relevant odour reveals differential characteristics in rat central olfactory pathways as studied through oscillatory activities. *Chem Senses* 25:561-573.
- Chase R, 1982. The olfactory sensitivity of snails, *Achatina fulica*. *J Comp Physiol* 148:225-235.
- Chase R, 1986. Brain cells that command sexual behavior in the snail *Helix aspera*. *J Neurobiol* 17:669-679.
- Chase R, 2000. Structure and function in the cerebral ganglion. *Microsc Res Tech* 49:511-520.
- Chase R, 2002. *Behavior and Its Neural Control in Gastropod Molluscs*. Oxford University Press.
- Chase R, Croll RP, 1981. Tentacular function in snail olfactory orientation. *J Comp Physiol* 143:357-362.
- Chase R, Kamil R, 1983. Neuronal elements in snail tentacles as revealed by horseradish peroxidase backfilling. *J Neurobiol* 14:29-42.
- Chase R, Rieling J, 1986. Autoradiographic evidence for receptor cell renewal in the olfactory epithelium of a snail. *Brain Res* 384:232-239.
- Chase R, Tolloczko B, 1989. Interganglionic dendrites constitute an output pathway from the procerebrum of the snail *Achatina fulica*. *J Comp Neurol* 283:143-152.
- Chase R, Tolloczko B, 1993. Tracing neuronal pathways in snail olfaction: from the tip of the tentacles to the brain and beyond. *Microsc Res Tech* 24:214-230.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Doulgass J, Andelman JP, 1990. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 4:405-411.
- Choe S, 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3:115-21.
- Classen J, Gerloff C, Honda M, Hallett M, 1998. Integrative visuomotor behavior is associated with interregionally coherent oscillations in the human brain. *J Neurophysiol* 79: 1567-1573.
- Coggeshall RE, 1967. A light and electron microscope study of the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* 30:1263-1287.

- Collin C, Ikeno H, Harrigan JF, Lederhendler I, Alkon DL, 1988. Sequential modification of membrane currents with classical conditioning. *Biophys J* 54:955-960.
- Cooke IRC, Gelperin A, 1988a. Distribution of FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of the slug *Limax maximus*. *Cell Tissue Res* 253:69-76.
- Cooke IRC, Gelperin A, 1988b. Distribution of GABA-like immunoreactive neurons in the slug *Limax maximus*. *Cell Tissue Res* 253:77-81.
- Cooke IRC, Edwards SL, Anderson CR, 1994. The distribution of NADPH-diaphorase activity and immunoreactivity to nitric oxide synthase in the nervous system of the pulmonate mollusc *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res* 277:565-572.
- Cottrell GA, Schot LP, Dockray GJ, 1983. Identification and probable role of a single neuron containing the neuropeptide *Helix* FMRFamide. *Nature* 304:638-640.
- Delaney KR, Gelperin A, 1986. Post-ingestive food-aversion learning to amino acid deficient diets by the terrestrial slug *Limax maximus*. *J Comp Physiol* 159:281-295.
- Delaney KR, Hall JB, 1995. An in vitro preparation of frog nose and brain for the study of odour-evoked oscillatory activity. *J Neurosci Meth* 68:193-202.
- Delaney KR, Gelperin A, Fee M. S, Flores JA, Gervais R, Tank DW, Kleinfeld D, 1994. Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:669-673.
- Elekes K, 1991. Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body region and neural sheath of the snail, *Helix pomatia*, ganglia: an electron microscopic immunocytochemical study. *Neuroscience* 42:583-591.
- Elekes K, 2000. Ultrastructural aspects of peptidergic modulation in the peripheral nervous system of *Helix pomatia*. *Microscopy research and technique* 49:534-546.
- Elekes K, Rózsa KS, 1984. Synaptic organization of a multifunctional interneuron in the central nervous system of *Helix pomatia* L. *Cell Tissue Res* 236:677-83.
- Elekes K, Florey E, 1987. New types of synaptic connections in crayfish stretch receptor organs: an electron microscopic study. *J Neurocytol* 16:613-26.
- Elekes K, Nässel DR, 1990. Distribution of FMRFamide-like immuno-reactive neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res* 262:177-190.
- Elekes K, Nässel DR, 1994. Tachykinin-related neuropeptides in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*: an immunocytochemical study. *Brain Res.* 661, 223-236.

- Elekes K, Nässel DR, 1999. Pigment-dispersing hormonelike neurons in the central nervous system of gastropods, *Helix* and *Lymnaea*. *Cell Tissue Res* 295:339-48.
- Elekes K, Vehovszky A, Salánki J, 1983. Ultrastructure of synaptic connections of a bimodal pacemaker giant neuron in the central nervous system of *Helix pomatia* L. *Neuroscience* 8:617-29.
- Elekes K, Stefano GB, Carpenter DO, 1993. Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica*): a comparative immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 272:329-341.
- Elekes K, Nagy T, Fekete ZN, 1999. MIP-immunoreactive innervation of the snail, *Helix pomatia*, heart. An ultrastructural study. *Acta Biol Hung* 50:55-64.
- Elekes K, Hernádi L, Muren JE, Nässel DR, 1994. Peptidergic neurons in the snail *Helix pomatia*: Distribution of neurons in the central and peripheral nervous system that react with an antibody raised against an insect neuropeptide, leucokinin I. *J Comp Neurol* 341:257-272.
- Elekes K, Battonyai I, Kobayashi S, Ito E, 2013. Organization of the proocerebrum in terrestrial pulmonates (*Helix*, *Limax*) reconsidered: cell mass layer synaptology and its serotonergic input system, *Brain Struct Funct* 218:477-490.
- Elekes K, Rózsa KS, Vehovszky A, Hernádi L, Salánki J, 1985. Nerve cells and synaptic connections in the intestinal nerve of the snail, *Helix pomatia* L. An ultrastructural and HRP study. *Cell Tissue Res* 239:611-20.
- Elekes K, Kiss T, Fujisawa Y, Hernádi L, Erdélyi L, Muneoka Y, 2000. Mytilus inhibitory peptides (MIP) in the central and peripheral nervous system of the pulmonate gastropods, *Lymnaea stagnalis* and *Helix pomatia*: distribution and physiological actions. *Cell Tissue Res* 302:115-34.
- Flemming W, 1870. Untersuchungen über Sinnesepithelien der Mollusken. *Arch Mikrosk Anat* 6:439-472.
- Frank DA, Greenberg ME, 1994. CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79:5-8.
- Freeman SN, Conley EC, Brennand JC, Russell NJ, Brammar WJ, 1990. Cloning and characterization of a cDNA encoding a human brain potassium channel. *Biochem Soc Trans* 18:891-2.
- Fukunaga S, Matsuo R, Hoshino S, Kirino Y, 2006. Novel kruppel-like factor is induced by neuronal activity and by sensory input in the central nervous system of the terrestrial slug *Limax valentianus*. *J Neurobiol* 66:169-181.

- Furukawa Y, Kandel ER, Pfaffinger PJ, 1992. Three types of early potassium transient currents in *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 12:9898-1000.
- Gelperin A, 1975. Rapid food-aversion learning by a terrestrial mollusk. *Science* 189:567-570.
- Gelperin A, 1994. Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature* 369:61-63.
- Gelperin A, 1999. Oscillatory dynamics and information processing in olfactory systems. *J Exp Biol* 202:1855-1864.
- Gelperin A, 2006. Olfactory computations and network oscillations. *J Neurosci* 26:1663-1668.
- Gelperin A, Tank DW, 1990. Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature* 345:437-440.
- Gelperin A, Flores J, 1997. Vital staining from dye-coated microprobes identifies new olfactory interneurons for optical and electrical recording. *J Neurosci Meth* 72:97-108.
- Gelperin A, Rhines LD, Flores J, Tank DW, 1993. Coherent network oscillations by olfactory interneurons: modulation by endogenous amines. *J Neurophysiol* 69:1930-1939.
- Gerard RW, Young JZ, 1937. Electrical activity of the central nervous system of the frog. *Proc Roy Soc B* 122:343-352.
- Gervais R, Kleinfeld D, Delaney K. R, Gelperin A. 1996. Central and reflex neuronal responses elicited by odor in a terrestrial mollusc. *J Neurophysiol* 76:1327-1339.
- Glanzman DL, 2006. The cellular mechanisms of learning in *Aplysia*: Of blind men and elephants. *Biol Bull* 210:271-279.
- Goldstein SA, Wang KW, Ilan N, Pausch MH, 1998. Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J Mol Med (Berl)*. 76:13-20.
- Gray CM, 1994. Synchronous oscillations in neuronal systems: Mechanisms and functions. *J Comput Neurosci* 1:11-38.
- Grinkevich LN, Lisachev PD, Kharchenko OA, Vasil'ev GV, 2008. Expression of MAP/ERK kinase cascade corresponds to the ability to develop food aversion in terrestrial snail at different stages of ontogenesis. *Brain Res* 1187:12-19.

- Hagiwara S, Kusano K, Saito N, 1961. Membrane changes of *Onchidium* nerve cell in potassium-rich media. *J Physiol* 155:470-89.
- Hanström B, 1925. Über die sogenannten Intelligenzsphären des Molluskengehirns and die Innervation des Tentakels von *Helix*. *Acta Zool. Stockh* 6:183-215.
- Hatakeyama D, Fujito Y, Sakakibara M, Ito E, 2004. Expression and distribution of transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 318:631-641.
- Hatakeyama D, Ito I, Kojima S, Fujito Y, Ito E, 2000. Complement receptor 3-like immunoreactivity in the light green cells and the canopy cells of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res* 865:102-106.
- Hawkins, RD, Kandel, ER, Bailey CH, 2006. Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. *Biol Bull* 210:174-191.
- Heinbockel T, Kloppenborg P, Hildebrand JG, 1998. Pheromone-evoked potentials and oscillations in the antennal lobes of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J Comp Physiol* 182:703-714.
- Hernádi L, 2000. Topographic organization of efferent neurons with different neurochemical characters in the cerebral ganglia of the snail *Helix pomatia*. *Microsc Res Tech* 15:521-33.
- Hernádi L, Elekes K, S.-Rózsa K, 1989. Distribution of serotonin-containing neuron in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res* 257:313-323.
- Hernádi L, Juhos S, Elekes K, 1993. Distribution of dopamine-immunoreactive and tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons in the central nervous system of *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res* 274:503-513.
- Hernádi L, Teranno Y, Muneoka Y, Kiss T, 1995. Distribution of catch-relaxing peptide (CARP)-like immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res* 280:335-348.
- Hildebrand JG, Shepherd GM, 1997. Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci* 20:595-631.
- Hille B, 2001. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer; Sunderland, MA.
- Hopfield JJ, 1991. Olfactory computation and object perception. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6462-6466.

Hopfield JF, Gelperin A, 1989. Differential conditioning to a compound stimulus and its components in the terrestrial mollusc *Limax maximus*. Behav Neurosci 103:274-293.

Ierusalimsky VN, Balaban PM, 2010. Two morphological sub-systems within the olfactory organs of a terrestrial snail. Brain Res 1326:68-74.

Inoue T, Watanabe S, Kirino Y, 2001. Serotonin and NO complementarily regulate generation of oscillatory activity in the olfactory CNS of a terrestrial mollusk. J Neurophysiol. 85:2634-2638.

Inoue T, Watanabe S, Kawahara S, Kirino Y, 2000. Phase-dependent filtering of sensory information in the oscillatory olfactory center of a terrestrial mollusk. J Neurophysiol 84:1112-1115.

Inoue T, Inokuma Y, Watanabe S, Kirino Y, 2004. In vitro study of odor-evoked behavior in a terrestrial mollusk. J Neurophysiol 91:372-381.

Inoue T, Murakami M, Watanabe S, Inokuma Y, Kirino Y, 2006. In vitro odor-aversion conditioning in a terrestrial mollusk. J Neurophysiol 95:3898-3903.

Ito I, Watanabe S, Kirino Y, 2006. Air movement evokes electro-olfactogram oscillations in the olfactory epithelium and modulates olfactory processing in a slug. J Neurophysiol 96:1939-1948.

Kandel ER, 1976. Cellular Basis of Behavior. Freeman. San Fransisco.

Kandel ER, 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. Science 294:1030-1038.

Kandel ER, Schwartz JH, 1982. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science 218:433-443.

Kaang BK, Pfaffinger PJ, Grant SGN, Kandel ER, Furukawa Y, 1992. Overexpression of an *Aplysia* Shaker K<sup>+</sup> channel gene modifies the electrical properties and synaptic efficacy of identified *Aplysia* neurons. Proc Natl Acad Sci USA 89:1133-1137.

Kasai Y, Watanabe S, Kirino Y, Matsuo R, 2006. The procerebrum is necessary for odor-aversion learning in the terrestrial slug *Limax valentianus*. Learn Mem 13:482-488.

Kaufmann W, Kerschbaum HH, Hauserkronberger C, Hacker GW, Hermann A, 1995. Distribution and seasonal variation of vasoactive intestinal (VIP)-like peptides in the nervous system of *Helix pomatia*. Brain Res 695:125-136.

- Kawahara S, Toda S, Suzuki Y, Watanabe S, Kirino Y, 1997. Comparative study on neural oscillation in the procerebrum of the terrestrial slugs *Incilaria bilineata* and *Limax marginatus*. *J Exp Biol* 200:1851-1861.
- Kay LM, Freeman WJ, 1998. Bidirectional processing in the olfactory- limbic axis during olfactory behavior. *Behav Neurosci* 112:541-553.
- Kimura T, Suzuki H, Kono E, Sekiguchi T, 1998a. Mapping of interneurons that contribute to food aversive conditioning in the slug brain. *Learn Mem* 4:376-388.
- Kimura T, Toda S, Sekiguchi T, Kawahara S, Kirino, Y, 1998b. Optical recording analysis of olfactory response of the procerebral lobe in the slug. *Learn Mem* 4:389-400.
- Kiss T, László Z, Pirger Z, 2012. Cellular localization and kinetic properties of Na<sub>v</sub>1.9, Na<sub>v</sub>1.8-, and Na<sub>v</sub>1.7-like channel subtypes in *Helix pomatia*. *Neuroscience* 203:78-90.
- Kiss T, Hiripi L, Papp N, Elekes K, 2003. Dopamine and serotonin receptors mediating contractions of the snail, *Helix pomatia*, salivary duct. *Neuroscience* 116:775-790.
- Kiss T, Hernádi L, László Z, N. Fekete Zs, Elekes K, 2010. Peptidergic modulation of serotonin and nerve elicited responses of the salivary duct musculature in the snail, *Helix pomatia*. *Peptides* 31:1007-1018.
- Kleinfeld DKR, Fee MS, Flores JA, Tank DW, Gelperin A, 1994. Dynamics of propagating waves in the olfactory network of a terrestrial mollusk: an electrical and optical study. *J. Neurophysiol* 72:1402-1419.
- Kobayashi S, Hattori M, Elekes K, Ito E, Matsuo R, 2010. FMRFamide regulates oscillatory activity of the olfactory center in the slug. *Eur J Neurosci* 32:1180-92
- Kollo M, Holderith NB, Nusser Z, 2006. Novel subcellular distribution pattern of A-type K<sup>+</sup> channels on neuronal surface. *J Neurosci* 26:2684-91.
- Kristen MS, O'Connell RL, Tamkun MM, 2010. Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107:12351-12356.
- Kues WA, Wunder F, 1992. Heterogeneous expression patterns of mammalian potassium channel genes in developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci* 4:1296-1308.
- Kurachi Y, Jan LY, Lazdunski M, 1999. Potassium ion channels: molecular structure, function, and disease. *Current topics in membranes*. Academic Press, New York.
- Laurent G, 1996. Odor images and tunes. *Neuron* 16:473-476.
- Laurent G, 1997. Olfactory processing: maps, time and codes. *Curr Opin Neurobiol* 7:547-553.



- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS, 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lois C, Alvarez-Buylla A, 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lorenzetti FD, Mozzachiodi R, Baxter DA, Byrne JH, 2006. Classical and operant conditioning differentially modify the intrinsic properties of an identified neuron. *Nat Neurosci* 9:17-19.
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y, 2001. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413:809-813.
- MacLeod K, Laurent G, 1996. Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies. *Science* 274:976-9.
- Magavi SSP, Mitchell BD, Szentirmai O, Carter BS, Macklis JD, 2005. Adult-born and preexisting olfactory granule neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo. *J Neurosci* 25:10729-10739.
- Magdelaine S, Mansuit P, Marchand CR, Richardson J, 1991. Growth and SRIF-like substances in the snail *Helix aspersa maxima* fed with an arginin-enriched food at different times of a short daily photoperiod. *Comp Biochem Physiol* 99:429-435.
- Marchand CR, Griffond B, MouColard C, 1991. Distribution of methionine-enkephalin-like and FMRFamide-like immunoreactivities in the central nervous system (including dorsal bodies) of the snail *Helix aspersa* Müller. *Zool Sci* 8:905-913.
- Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N, 2003. Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24:389-397.
- Matsuo R, 2009. Glutamatergic neurotransmission in the procerebrum (olfactory center) of a terrestrial mollusk. *J Neurosci* 29:3011-3023.
- Matsuo R, Ito E, 2008. Recovery of learning ability after the ablation of the procerebrum in the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Acta Biol Hung* 59 (Suppl.):73-76.
- Matsuo R, Kobayashi S, Murakami J, Ito E, 2010. Spontaneous recovery of the injured olfactory center in the terrestrial slug *Limax*. *Plos One* 5, e9054. doi: 10.1371/journal.pone.0009054.
- McCarragher G, Chase R, 1985. Quantification of ultrastructural symmetry at molluscan chemical synapses. *J Neurobiol* 16:69-74.

- McComb C, Rosenegger D, Varshney N, Kwok HY, Lukowiak K, 2005. Operant conditioning of an in vitro CNS-pneumostome preparation of *Lymnaea*. *Neurobiol Learn Mem* 84:9-24.
- Menzel R, Müller U, 1996. Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrate. *Annu Rev Neurosci* 19:379-404.
- Meredith M, 1986. Patterned response to odor in mammalian olfactory bulb: the influence of intensity. *J Neurophysiol* 56:572-97.
- Mitra PP, Pesaran B, 1999. Analysis of dynamic brain imaging data. *Biophys J* 76:691-708.
- Mohapatra DP, Siino DF, Trimmer JS, 2008. Interdomain cytoplasmic interactions govern the intracellular trafficking, gating, and modulation of the Kv2.1 channel. *J Neurosci* 28:4982-94.
- Murthy VN, Fetz EE, 1996. Oscillatory activity in sensorimotor cortex of awake monkeys: synchronization of local field potentials and relation to behavior. *J Neurophysiol* 76:3949-3967.
- Nakaya T, Kawahara S, Watanabe S, Lee D.-S, Suzuki T, Kirino Y, 2001. Identification and expression of a novel gene in odour-taste associative learning in the terrestrial slug. *Genes Cells* 6:43-56.
- Nikitin ES, Balaban PM, 2000. Optical recording of odor-evoked responses in the olfactory brain of the naive and aversively trained terrestrial snails. *Learn Mem* 7:422-432.
- Nikitin ES, Zakharov IS, Samarova EI, Kemenes G, Balaban PM, 2005. Fine tuning of olfactory orientation behaviour by the interaction of oscillatory and single neuronal activity. *Learn Mem* 7:422-432.
- North RA, 1995. Handbook of receptors and channels, Ligand-and Voltage-gated ion channels. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.
- North G, Greenspan RJ, 2007. Invertebrate neurobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor-New York.
- Osborne NN, Cottrell GA, 1971. Distribution of biogenic amines in the slug *Limax maximus*. *Z Zellforsch* 112:15-30.
- Pentreath VW, Berry MS, Osborne NN, 1982. The serotonergic cerebral cells in gastropods. *Biology of serotonergic transmission*. Chichester: John Wiley and Sons. pp. 457-513.

- Pfaffinger PJ, Siegelbaum SA, 1990. K<sup>+</sup> channel modulation by G proteins and second messengers. In: Potassium channels: structure, classification, function and therapeutic potential (Cook NS, ed), 117-153 Chichester: Norwood.
- Pfaffinger PJ, Furukawa Y, Zhao B, Dugan D, Kandel ER, 1991. Cloning and expression of an *Aplysia* K channel and comparison with native *Aplysia* K currents. *J Neurosci* 11:918-927
- Pirger Z, Battonyai I, Krajcs N, Elekes K, Kiss T, 2013. Voltage-gated membrane currents in neurons involved in odor information processing in snail procerebrum. *Brain Struct Funct* 219:673-682.
- Pittenger C, Kandel ER, 2003. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: *Aplysia* and the hippocampus. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:757-763.
- Poteryaev DA, Zakharov IS, Balaban PM, Belyavsky AV, 1998. A novel neuropeptide precursor gene is expressed in the terrestrial snail central nervous system by a group of neurons that control mating behavior. *J Neurobiol* 35:183-197.
- Poteryaev DA, Zakharov IS, Balaban PM, Uvarov PN, Belyavsky AV, 1997. Characterization of a cDNA clone encoding pedal peptide in the terrestrial snail. *Neuroreport*. 8:3631-5.
- Ratté S, Chase R, 1997. Morphology of interneurons in the procerebrum of the snail *Helix aspersa*. *J Comp Neurol* 384:359-372.
- Ratté S, Chase R, 2000. Synapse distribution of olfactory interneurons in the procerebrum of the snail *Helix aspera*. *J Comp Neurol* 417:366-384.
- Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, Tallon-Baudry C, Bertrand O, Gervais R, 2003. Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60–90 Hz) and beta (15–40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17:350-358.
- Reissner KJ, Shobe JL, Carew TJ, 2006. Molecular nodes in memory processing: Insights from *Aplysia*. *Cell Mol Life Sci* 63:963-974.
- Reynolds ES, 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- Rhines LD, Sokolove PG, Tank DW, Gelperin A, 1993. Cultured olfactory interneurons from *Limax maximus*: optical and electrophysiological studies of transmitter-evoked responses. *J Neurophys* 69:1940-1947.

- Ribary U, Joannides AA, Singh KD, Hasson R, Bolton JPR, Lado F, Mogilner A, Llinas R, 1991. Magnetic field tomography of coherent thalamocortical 40 Hz oscillations in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11037-11041.
- Rogawski MA, Beinfeld MC, Hays SE, Hökfelt T, Skirboll LR, 1985. Cholecystokinin and cultured spinal neurons. Immunohistochemistry, receptor binding, and neurophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 448:403-12.
- Rudy B, 1988. Diversity and ubiquity of K-channels. *Neuroscience* 25:729-749.
- Runnegar B, Pojeta J, 1985. Origin and diversification of the Mollusca. In *The Mollusca* (eds.: Trueman ER, Clarke MR), pp. 1-57. Academic Press, Orlando, FL.
- Sahley CL, 1990. The behavioral analysis of associative learning in the terrestrial mollusc *Limax maximus*: The importance of interevent relationships. In *Connectionist modeling and brain function: The developing interface* (eds.: Hanson S, Olson C), pp. 36-73. MIT Press, Cambridge, MA.
- Sahley C. L., Martin K. A., Gelperin A, 1990. Analysis of associative learning in the terrestrial mollusc *Limax maximus*. II. Appetitive learning. *J Comp Physiol* 167:339-345.
- Samarova, E, Balaban P, 2009. Changes in frequency of spontaneous oscillations in procerebrum correlate to behavioral choice in terrestrial snails. *Front Cell Neurosci* 3:8.
- Sánchez-Alvarez M, León-Olea M, Talavera E, Pellicer F, Sánchez-Islas E, Martínez-Lorenzana G, 1994. Distribution of NADPH-diaphorase in the perioesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. *Neurosci Lett* 169:51-55.
- Shipley MT, Ennis M, 1995. Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.* 30:123-176.
- Shirahata T, Tsunoda M, Santa T, Kirino Y, Watanabe S, 2006. Depletion of serotonin selectively impairs short-term memory without affecting long-term memory in odor learning in the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Learn Mem* 3:267-70.
- Singer W, Gray CM, 1995. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 18:555-586.
- Stocker RF, Gendre N, Batterham P, 1993. Genetic Analysis of the lozenge gene complex of *Drosophila melanogaster*: the antennal phenotype. *J. Neurogenet* 9:29-53.
- Stopfer M, Bhagavan S, Smith B. H, Laurent G, 1997. Impaired odour discrimination on desynchronization of odorencoding neural assemblies. *Nature* 390:70-74.

- Schwartz JH, Shkolnik LJ, 1981. The giant serotonergic neuron of *Aplysia*: a multi-targeted nerve cell. *J Neurosci* 1:606-619.
- Tank DW, Gelperin A, Kleinfeld D, 1994. Odors, oscillations and waves: Does it all compute? *Science* 265:1819-1820.
- Toda, S, Kawahara S, Kirino Y, 2000. Image analysis of olfactory responses in the procerebrum of the terrestrial slug *Limax marginatus*. *J Exp Biol* 203:2895-2905.
- Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS, 2008. Localization and targeting of voltage-gated ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* 88:1407-1447.
- Van Mol JJ, 1974. Evolution phylogénétique du ganglion cérébroïde des Gastéropodes Pulmonés. *Haliotis* 4:77-86.
- Venter JC, Di Porzio U, Robinson DA, Shreeve SM, Lai J, Kerlavage AR, Fracek SP, Lentès K-U, Fraser CM, 1988. Evolution of neurotransmitter receptor systems. *Prog Neurobiol* 30:105-169.
- Walker RJ, 1986. Transmitters and modulators. *The Mollusca vol 9, Neurobiology and behavior Part 2*, pp. 279-453 Academic Press.
- Walker RJ, 1992. Neuroactive peptides with an RFamide or Famide carboxyl terminal. *Comp Biochem Physiol C* 102:213-22.
- Walker RJ, Brooks HL, Holden-Dye L, 1996. Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology* 113:3-33.
- Watanabe S, Kawahara S, Kirino Y, 1998. Morphological characterization of the bursting and nonbursting neurones in the olfactory centre of the terrestrial slug *Limax marginatus*. *J Exp Biology* 201:925-930.
- Watanabe S, Inoue T, Kirino Y, 2003. Contribution of excitatory chloride conductance in the determination of the direction of traveling waves in an olfactory center. *J Neurosci* 23:2932-2938.
- Watanabe S, Kirino Y, Gelperin A, 2009. Neural and molecular mechanisms of microcognition in *Limax*. *Learn Mem* 15:633-642.
- Watanabe S, Inoue T, Murakami M, Inokuma Y, Kawahara S, Kirino Y, 2001. Modulation of oscillatory neural activities by cholinergic activation of interneurons in the olfactory center of a terrestrial slug. *Brain. Res* 896:30-35.
- Wehr M, Laurent G, 1996. Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature* 384:162-6.

Wei A, Jegla T, Salkoff L, 1996. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35:805-829.

Wymore RS, Korenberg JR, Kinoshita KD, Aiyar J, Coyne C, Chen XN, Hustad CM, Copeland NG, Gutman GA, Jenkins NA, Chandy KG, 1994. Genomic organization, nucleotide sequence, biophysical properties, and localization of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel gene KCNA4/Kv1.4 to mouse chromosome 2/human 11p14 and mapping of KCNC1/Kv3.1 to mouse 7/human 11p14.3-p15.2 and KCNA1/Kv1.1 to human 12p13. *Genomics* 20:191-202.

Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto KJ, 2001. Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *Biol Chem* 276:4839-44.

Yamane T, Gelperin A, 1987. Aminergic and peptidergic amplification of intracellular cyclic AMP levels in a molluscan neural network. *Cell Mol Neurobiol* 3:291-301

Yamane T, Oestreicher AB, Gelperin A, 1989. Serotonin-stimulated biochemical events in the procerebrum of *Limax*. *Cell Mol Neurobiol* 4:447-59.

Yifrach O, 2004. Hill coefficient for estimating the magnitude of cooperativity in gating transitions of voltage-dependent ion channels. *Biophys J* 87:822-830.

Zaitseva OV, 1980. Innervation of the skin in pulmonate molluscs. *Arch Anat Hist Embryol* 78:32-40.

Zaitseva OV, 1991. Structural organisation of the tentacular sensory system in land pulmonates. In *Simpler nervous system*, ed.: Sakharov DA, Winlow O. Manchester University Press pages: 238-257.

Zaitseva OV, Ivanova IP, Luk'yanova EL, 2000. Ultrastructure of the area of procerebrum cell bodies in snails and slugs. *J Evol Biochem Physiol* 36:421-431

Zakharov IS, Hayes NL, Ierusalimsky VN, Nowakowski RS, Balaban PM, 1998. Postembryonic neuronogenesis in the procerebrum of the terrestrial snail, *Helix lucorum*. *J Neurobiol* 35:271-276.

Zs-Nagy I, Sakharov DA, 1970. The fine structure of the procerebrum of pulmonate molluscs, *Helix* and *Limax*. *Tissue Cell* 2:399-411.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni a lehetőséget arra, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezzem ki mindenkinek, akiknek segítségével ez a disszertáció létrejött.

Köszönetet mondok Dr. Elekes Károly témavezetőmnek, a Magyar Tudományos Akadémia Ökológiai Kutatóközpontjának Balatoni Limnológiai Intézetének tudományos tanácsadója, aki nélkülözhetetlen szakmai tanácsaival, önzetlen támogatásával alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz. Köszönöm állandó segítőkész támogatását és dolgozatom alapos és kritikus átnézését, értékes javaslatai minden esetben nagymértékben hozzájárultak előrehaladásomhoz. Hálás vagyok a volt, Dr. Bíró Péter akadémikusnak, az Intézet korábbi és Dr. G-Tóth Lászlónak az Intézet jelenlegi igazgatójának, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a Magyar Tudományos Akadémia Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézetében disszertációm elkészítéséhez.

Hálás vagyok minden kollégámnak, akik a munkám során segítséget nyújtottak és bizalommal fordulhattam hozzájuk szakmai tanácsért. Köszönetet mondok Dr. Kiss Tibornak, Dr. Hernádi Lászlónak, Dr. Serfőző Zoltánnak, Dr. Pirger Zsoltnak és Krajcs Nórának segítőkészségükért. Köszönettel tartozom mindenekelőtt Nagyné Fekete Zsuzsának, a szövettani, immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos munkák során nyújtott nagy segítségéért. Szintén köszönöm Ihász Katalinnak a Western blot kísérletek során nyújtott közreműködését. Ugyancsak köszönöm Balázs Boldizsárnak az elektronmikroszkópos vizsgálatok és a számítógépes munkákkal kapcsolatos segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Seress Lászlónak (PTE ÁOK, Központi EM Labor, Pécs) a JEOL 1200 EXII és néhai Dr. Kiss Józsefnek (SE ÁOK, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Budapest) a Hitachi H-7650 elektronmikroszkóp használatának lehetőségéért. Köszönöm Kiss Rózsának az irodalmazás során nyújtott folyamatos odaadó segítségét.

Köszönettel tartozom volt egyetemi oktatóimnak, Dr. Fekete Évának és Dr. Bagyánszki Máriának, akik elindítottak az úton, mely során nem csak elsajátítottam élettani és neurobiológiai ismereteket, hanem meg is szerettem azokat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet családtagjaimnak, elsősorban szüleimnek, akik szeretetükkel és segítségükkel mindvégig támaszt nyújtottak iskolai tanulmányaim során, testvéreimnek, férjemnek, aki disszertációm elkészítésének teljes ideje alatt végtelen türelmet és megértést tanúsított irántam.