

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai Doktori Iskola

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

*PhD értekezés*

**Battonyai Izabella**

Témavezető

*Dr. Elekes Károly*

a biológiai tudomány doktora

***PÉCS, 2014***

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

*PhD értekezés*

**Battonyai Izabella**

Témavezető

*Dr. Elekes Károly*

a biológiai tudomány doktora

***PÉCS, 2014***

## 1. BEVEZETÉS

Szárazföldi tüdős csigákban a szaglás a legfőbb szenzoros modalitás, mely meghatároz és befolyásol számos viselkedésformát (Stocker, 1993). Az olfaktórikus érzékelés anatómiájáról, sejtes és funkcionális szerveződéséről ma már számos információval rendelkezünk (Gelperin, 1999; Chase, 2002). Elektrofiziológiai és autoradiográfiás módszerekkel bebizonyították, hogy a csigák tapogatóinak receptor sejtjei részt vesznek szag, illetve mechanoszenzoros információk feldolgozásában is (Chase, 1982). A szaglóhám (olfaktórikus epithelium) a tapogató csúcsának ventrális részén helyezkedik el, ahonnan a perifériás tapogató ganglionban bekövetkező átkapcsolást követően a szaginformáció a központi idegrendszerbe (KIR) kerül. A szaginformáció feldolgozásának központi színtere a szaglóléleby (procerebrum, PC), mely a cerebrális ganglion jellegzetes struktúrája a nyeles szemű tüdős csigák idegrendszerében (Van Mol, 1974). Morfológiai és fiziológiai vizsgálatokkal igazolták, hogy a PC valóban részt vesz a szaglás folyamatában, fontos szerepet tölt be az olfaktórikus információ feldolgozásban, a szagmemória raktározásban és a szag-averzió rögzítésében (Gelperin, 1999, Chase, 2002). Bár korai elektronmikroszkópos vizsgálatok során különböző csiga fajok PC-jében sejtes rétegben szinapszisekat azonosítottak (Zs.-Nagy és Sakharov, 1969), ismereteink hiányosak a sejtes réteg pontos ultrastrukturális megjelenését, valamint részletes szinaptológiáját illetően.

Eltételezve egyes neuropeptidektől és az oktopamintól, a Gastropoda (csiga) idegrendszerben azonosított neurotranszmitterek (pl. acetilkolin, szerotonin, dopamin, glutamát) megegyeznek a gerincesekben leírtakkal (Chase, 2002). Ezek közül a szerotonin (5-HT) a legrégebben felfedezett és kutatatott neurotranszmitterek egyike, egyben az egyik legelterjedtebb szignál molekula a gerinctelenekben (Gerschenfeld, 1973; Gardner és Walker, 1982; Walker és mtsai., 1996). A Gastropoda szaglólérendszerben kimutatták, hogy a PC kiterjedt 5-HTerg innervációval rendelkezik a medulláris neuropil területén (Osborne és Cottrell, 1971; Inoue és mtsai., 2004; Matsuo és mtsai., 2009). Nem ismert azonban a PC-ben az 5-HTerg elemek nagyfeloldású kémiai-neuroanatómiai szerveződése, innervációs mintázata és lehetséges szinaptikus kapcsolatrendszere.

A sejtek elektromos aktivitását fenntartó feszültségfüggő ioncsatornák minden élő sejtben jelen vannak (Kurachi és mtsai., 1999). A feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák alkotják a legnagyobb családot. Alapvető szerepet játszanak az idegsejtek ingerlékenységében, valamint a sejtmembrán potenciál változásai során a repolarizációban (Hille 2001; Conley és Brammar, 1999). A feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna által létrehozott áramot először egy puhatestű, az *Onchidium* idegsejtjében (Hagiwara és mtsai., 1961) azonosították. Habár *Helix aspersa* garat alatti gangliongyűrűjében immunhisztokémiai úton azonosítottak különböző ioncsatornákat (Azanza és mtsai., 2008), egyes, a Gastropoda neuronokban aktívan működő feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák eloszlását, az azokat tartalmazó neuronok funkcionális morfológiáját illetően távolról sem egységesek az ismereteink a teljes *Helix* KIR-ben. A szaglőlebens globulus sejtjeinek feszültségfüggő ioncsatorna rendszereinek megismerése ugyanakkor a szaginformáció feldolgozásának sejtszintű megismerésének is egyik alapvető feltétele lehet.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A fentiek alapján megállapítható, hogy a szárazföldi nyeles szemű csigák szaglőközpontjának (procerebrum, PC) anatómai felépítésével kapcsolatban ismereteink igen behatároltak és hiányosak, beleértve a PC sejtes rétegének ultrastrukturális szerveződését, kapcsolatrendszerét, illetve 5-HTerg rendszerének pontos, projekciós mintázatát és szinaptológiáját. Ugyancsak kevés információ áll rendelkezésünkre a Gastropoda fajokban jelen lévő ioncsatornákról, azok sejtszintű eloszlásáról, kapcsolatrendszeréről, az egyes neuronokban aktívan működő, azok szignalizációs folyamatait meghatározó ionáramokat tartalmazó neuronok, többek között a szaginformáció feldolgozásában részt vevő PC globulus sejtjeinek, ultrastrukturájáról és intercelluláris kapcsolatairól.

Ezért vizsgálataink fő célkitűzései a következők voltak:

1. Újra vizsgáljuk és leírjuk a PC sejtes rétegének ultrastrukturális szerveződését, különös tekintettel a lokális neuropilekre és az ott jelen lévő intercelluláris kapcsolatokra;

2. Részletesen jellemezzük a PC 5-HTerg innervációs rendszerét, különös tekintettel a sejtés réteg innervációjára, a projekciók célpontjaira, és az intercelluláris kapcsolatok különböző formáira;

3. Azonosítsunk feszültségfüggő  $K^+$ -csatornákat a KIR-ben, beleértve a PC-t, meghatározzuk eloszlásukat és funkcionális jellemzőiket.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Kísérleti állatok

Kísérleti állataink felnőtt éticsiga, *Helix pomatia*, és meztelen csiga, *Limax valentianus*, egyedei voltak. Az éticsigákat tavasztól ősziig gyűjtöttük Tihany és Balatonfüred környékén. A *Limax* egyedeket vagy a már előzőleg megfelelően fixált KIR-jeiket a Tokushima Bunri Egyetem Farmakológiai Intézetének (Sanuki, Shido, Kagawa, Japán) tenyészetéből kaptuk.

#### 3.2. Elektronmikroszkópia

A *Helix* és *Limax* KIR-eket izolálásukat követően 2,5 % PFA és 1 % GA keverékével fixáltuk. A preparátumokat 1 %  $OsO_4$ -os utófixálása után növekvő koncentrációjú etilalkohol sorozatban, propilén oxidban víztelenítettük, majd 70%-os etilalkoholban telített uranil acetáttal kontrasztoltuk és végül mintákat Aralditba ágyasztuk. 1  $\mu$ m-es toluidinkékkel festett félvékony metszetek alapján 50-60 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk, ezeket ólomcitráttal festettük 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) eljárásan alapultak. Az 5-HT immunhisztokémiai lokalizációja céljából csak a cerebrális gangliont (PC), míg az ioncsatornák esetében a teljes KIR-t, 4%-os PFA-val fixáltuk, majd kriosztáttal 16  $\mu$ m-es sorozat metszeteket készítettünk. A metszeteket a következő elsődleges antitestekkel inkubáltuk: monoklonális anti-5-HT (1:500-1000); poliklonális nyúl anti- $K_v3.4$  és anti- $K_v4.3$  (1:500 vagy 1:1000) és monoklonális egér anti- $K_v2.1$  (1:500). Ezt követően a preparátumokat a primer antitesteknek megfelelően a következő másodlagos antitesttel inkubáltuk: nyúl anti-szamar IgG konjugálva FITC vagy TRITC (1:200),

vagy biotin-konjugált kecske anti-egér IgG-al vagy anti-nyúl IgG-al (1:200), mely utóbbit avidin-HRP inkubáció követett (1:200). A HRP reakciót 0,05 % 3,3'-DAB és 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében tettük láthatóvá. A metszeteket glicerín 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, melyeket követően immunjelölést nem tapasztaltunk.

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

A *Helix* és *Limax* KIR-eket 2,5 % PFA és 0,1 % GA keverékével fixáltuk, majd a PC-ből (5-HT, K<sub>v</sub>4.3) és a pedális ganglion caudo-medialis lebenyéből (K<sub>v</sub>4.3) 10%-os PFA-s utófixálás után rezgőkéssel 50 µm vastagságú szövetszeleteket készítettünk. A szeleteket 1:500 arányban hígított monoklonális anti-5-HT antitesttel (DAKO) vagy K<sub>v</sub>4.3 antitesttel (Alomone) inkubáltuk. Anti-5-HT esetében 1:50 arányban hígított, HRP-vel kapcsolt másodlagos IgG inkubációt követően az immunhisztokémiai reakciót 0,05 % DAB (Sigma-Aldrich) és 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keverékével hívtuk elő. Az anti-nyúl K<sub>v</sub>4.3 immunreakciót pedig egy lépéses polimer-HRP IHC detekciós rendszerrel vizualizáltuk. Az 1% OsO<sub>4</sub>-os utófixálás után a preparátumokat növekvő koncentrációjú etilalkohol sorozatban víztelenítettük, melynek során 70%-os alkoholban telített uranil acetáttal blokkfestést végeztünk. A szövetszeleteket tárgylemezen Aralditba ágyasztuk és polimerizáció után fénymikroszkópban vizsgáltuk. A jelölt elemeket camera lucida rendszerben követtük és rajzoltuk, majd az EM vizsgálatra érdemes szeleteket vagy területeket újra Aralditba ágyasztuk. 1 µm-es félvékony metszetek alapján 50-60 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk, ólomcitráttal kontrasztoltuk és JEOL 1200 EX elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.5. Western blot vizsgálatok**

K<sub>v</sub>2.1 és K<sub>v</sub>3.4 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 a megfelelő primer

(anti-K<sub>v</sub>2.1, anti-K<sub>v</sub>3.4, anti-K<sub>v</sub>4.3, 24 óra), majd szekunder antitestekkel (HRP-konjugált anti-egér vagy anti-nyúl, 1 óra) inkubáltuk. A membráncsíkokon a specifikus reakciót kemiluminescens technikával, ECL reagenssel, vagy HRP-DAB reakcióval tettük láthatóvá. Mindhárom antitest esetében negatív illetve preabszorpciós kontroll 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). Az 5-HT lokális alkalmazása során az üvegpipettát a neuronok sejttestének közelében ( $\leq 50 \mu\text{m}$ ) helyeztük el. Az 5-HT-t *Limax* fiziológiás oldatban oldottuk fel, mely 0,05% Fast Green-t (Sigma) is tartalmazott az applikálás vizuális ellenőrzése céljából. A *Helix* PC korábban K<sup>+</sup>-csatornákkal szemben immunreaktívnak bizonyult globulus sejtjein áramméréseinket egy inverz mikroszkóp (Leitz Labovert FS) segítségével, egész-sejt konfigurációban végeztük. Az elektrofiziológiai adatok analizálására és feldolgozására, illetve a patch-clamp protokollok generálására az elektromos tulajdonságok rögzítése során pClamp 5.5 programot (Axon Instruments) használtunk. Az egyes áramokat speciális protokollokkal választottuk el egymástól.

#### 3.6.2. Voltage-clamp vizsgálatok

A K<sup>+</sup>-csatornákkal kapcsolatos további elektrofiziológiai méréseinket szintén olyan idegsejteken végeztük, amelyek a K<sup>+</sup>-csatornák immunhisztokémiai vizualizálása során korábban jelölődést mutattak: K<sub>v</sub>4.3 (pedális ganglion, caudo-medialis K<sub>v</sub>2.1 (PC), K<sub>v</sub>3.4 (bukkális ganglion, B2 sejt). Az ionáramokat két mikroelektrodás feszültség-zár (voltage-clamp) módban regisztráltuk. Az áramméréseknél az intracelluláris jelek gyűjtését és feldolgozását Digidata interface és pCLAMP szoftver (Axon Instruments) segítségével végeztük. A kísérletek egy részénél a tranziens K<sup>+</sup>-áram regisztrátumok felvételekor a fiziológiás sóoldatban a következő komponenseket változtattuk meg: tetraetilammonium (TEA, Sigma) 5 vagy 10 mM-ról 15 mM-ra növelve, illetve a NaCl-ot cukorra cserélve. A K<sup>+</sup>-csatornák blokkolására a következő anyagokat használtuk: BDS-II (Alomone), 4-aminopyridine (4-AP, Sigma).

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A globulus sejtréteg ultrastruktúrája és szinaptológiája

*Helix* és *Limax* PC-ben félvékony metszeteken a globulus sejtek rétegében teljes mélységben jellegzetes lokális neuropil régiók voltak megfigyelhetők. Ultrastruktúrális szinten különböző kiterjedésű neuropil egységeket azonosítottunk, melyek fokozatosan felrostozódtak. A kisebb kiterjedésű neuropilek már csak néhány axonprofilt tartalmaztak és sokkal szorosabb kapcsolatot formáltak a közelükben lévő globulus sejtek perikaryonjaival, míg végül az individuális axonális elemek axo-szomatikus kapcsolatokat létesítettek. A PC sejtés rétegének ultrastruktúrális elemzése során az axo-szomatikus kapcsolatok rendszeres és nagy változatosságot mutattak. Specializált és membránspecializációt nem mutató, a globulus sejtek perikaryonjába mélyen beágyazott varikozitások jellemezték az axo-szomatikus kapcsolatokat. A lokális neuropilekben megfigyelt axo-szomatikus és axo-axonikus kapcsolatok mind *Helix*-ben, mind *Limax*-ban is a szinaptikus konfigurációk különböző formáihoz, mint például a divergencia és a preszinaptikus moduláció, kapcsolódtak. Ezen kívül specializációt nem mutató szoros kontaktusok mentén a hírvivő molekulák aktív felszabadulásra utaló excitotikus membránkonfigurációk is megfigyelhetők voltak.

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

A *Helix* PC-ben 50  $\mu\text{m}$  vastag szeleteken feltártuk az 5-HT-immunreaktív (IR) innervációs mintázat jellegzetességeit, melynek kialakításában meghatározó volt a PC területére kívülről belépő, a poszt(meta)cerebrumban eredő vastag axonköteg. A PC területére lépve az 5-HT-IR rostok elágazódtak és innerválták a teljes szaglólélebenyt, mely végső soron egy széleskörű, a szaglási információk feldolgozásában és így a viselkedési válasz kialakításában is meghatározó modulációs rendszert hoz létre. A sejtés rétegben a globulus sejtek individuális axo-szomatikus innervációja az 5-HT lokális szerepére utal.

A *Limax* PC-ben camera lucida követéssel nemcsak sikerült feltárnunk a sejtés réteg eddig nem ismert 5-HT-IR innervációját, de funkcionális jelenlétét, azaz a tüzelő (B) sejtek 5-HT érzékenységét patch-clamp technika segítségével, 1 mM 5-HT lokális applikációját követően is igazoltuk.



Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálataink során feltártuk a *Helix* szaglóközpontban jelen lévő 5-HT-IR elemek ultrastrukturális jellemzőit. Az 5-HT-IR varikozitások gyakran alkottak szoros, de nem specializált membrán kapcsolatokat a perikaryonokkal és agranuláris axon profilokkal a PC-ben, illetve alakítottak ki velük szinaptikus konfigurációkat.

### **4.3. Feszültségfüggő K<sup>+</sup>-csatornák immunhisztokémiai azonosítása és eloszlása *Helix* központi idegrendszerében**

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

K<sub>v</sub>2.1-IR neuronok megfigyelhetők voltak a KIR valamennyi ganglionjában. A PC területén nagyszámú K<sub>v</sub>2.1-IR globulus sejt fordult elő. Nagyobb nagyításban a PC sejtes rétegében a jelöletlen neuronok között a kis immunpozitív varikozitások eloszlása is jól nyomon követhető volt. A jelölt neuronokban az immunreaktivitás sok esetben csak a citoplazma egy kis részében koncentráldott. A neuronok jelentős része vetült a neuropil területekhez.

#### 4.3.2. K<sub>v</sub>3.4 immunreaktív elemek eloszlása

A teljes *Helix* KIR-ben azonosítottunk K<sub>v</sub>3.4-IR neuronokat. A neuronok citoplazmája pont-szerű precipitátumokat tartalmazott, melyek gyakran a sejtek perifériáján, a membrán közelében helyezkedtek el. A jelölt neuronok vastag axonjai a neuropilbe vetültek, ott többszörösen elágaztak. K<sub>v</sub>3.4 immunreaktivitást egyetlen óriásneuron, a pofa ganglion B2 sejtje mutatott. A PC-ben kisszámú jelölt neuront azonosítottunk a sejtes réteg és a terminális neuropil határa mentén.

#### 4.3.3. K<sub>v</sub>4.3 immunreaktív elemek eloszlása

K<sub>v</sub>4.3 immunreaktív neuronok a viscerális ganglion kivételével a teljes KIR-ben előfordultak, melyek a neuropil régiókba számos jelölt rostot küldtek. Nem-neuronális szövetekben is azonosítottunk K<sub>v</sub>4.3-IR elemeket, melyek a ganglionok közelében a kötőszöveti burokkba koncentráldtak, illetve az aorta falában futottak. A pofa ganglionban egy nagyobb jelölt neuroncsoport mellett a B2 óriásneuron ismételt immunreaktívnak bizonyult. A PC-ben az immunpozitív globulus sejtek egy része a sejtes rétegben elszórtan, egy része pedig a sejtes réteg és a medulláris neuropil határán helyezkedtek el, míg a sejtes rétegben szeptum-szerűen futó jelölt

axon kötegek gazdagon elágaztak a neuronok között. A garatalatti ganglion komplex számos  $K_v4.3$ -IR sejtcsoportot tartalmazott, melyek elsősorban a pedális és pleurális ganglionokban helyezkedtek el. Ultrastrukturális szinten a jelölt elemek mind a PC-ben, mind a pedális ganglionban azonos típusúak voltak, számos 80-100 nm-es granuláris vezikulát tartalmaztak és a jelölődés jellege is hasonló volt.

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

A  $K_v2.1$ ,  $K_v3.4$  csatornák analízise során a PC, a teljes KIR, illetve a  $K_v4.3$  csatorna esetében a kötőszöveti burokból készített homogenizátumok elektroforetikus elválasztását és membránra blottolását követően vizsgáltuk az egyes ioncsatornák jelenlétét. A specifikus sávok az irodalom alapján várt molekulaméretben jelentkeztek.  $K_v2.1$  antitest esetében 110 kDa,  $K_v3.4$  antitest esetében 240 kDa, míg a  $K_v4.3$  antitest esetében 73 kDa volt.

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

A  $K_v3.4$  immunreaktivitást mutató pofa ganglion B2 neuronjában gyors, A-típusú  $K^+$ -áramot regisztráltunk. Az áram inaktiválódott 5 mM TEA hozzáadása után, amely a bemenő  $Na^+$ - és a késői egyenirányító  $Ca^{2+}$ -aktiválta  $K^+$ -áramokat is blokkolta. Az A-típusú áramot hatásosan tudtuk blokkolni 4-AP, TEA és BDS-II-vel. A késői egyenirányító áramokat 20 mM TEA hozzáadásával blokkoltuk, míg kisebb koncentrációban alkalmazott (4 mM) 4-AP nem eredményezett jelentős változást. A pedális ganglion caudo-mediális lebenyében az előzőleg  $K_v4.3$  immunreaktivitást mutató neuronokból egy más típusú tranziens A-típusú  $K^+$ -áramot vezettünk el, mely kisebb amplitúdójú és lassabb kinetikájú volt, ugyanakkor áramfeszültség karakterisztikája nagyon hasonlított a gyors tranziens A-áramnál tapasztalhoz. Ez az áram is blokkolható volt 4-AP-nel, míg TEA-ra kevésbé volt érzékeny. Mind voltage-clamp, mind patch-clamp módban sikeresen regisztráltunk  $K^+$ -áramokat a PC globulus sejtjeiből. Voltage-clamp elvezetések során azon sejtek  $K^+$ -áramait vizsgáltuk, melyek előzőleg immunhisztokémiai festések során  $K_v2.1$  illetve  $K_v4.3$  immunreaktivitást mutattak. A neuronok egy részében lassú, A-típusú  $K^+$ -áramot rögzítettünk, de késői egyenirányító áramkomponenst is megfigyeltünk.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaink célja egyes nyeles szemű tüdős csigák szaglőlebenyének (procerebrum, PC), mely a szaginformáció feldolgozásának központi területe, ultrastrukturális és kémiai- neuroanatómiai vizsgálata volt. Elemeztük a PC sejtes rétegének, illetve az extrinsic eredetű 5-HTerg innervációs rendszer projekciós és szinaptikus jellemzőit korrelatív fény- és elektronmikroszkópia, illetve immunhisztokémia segítségével. Munkánk egy további részében immunhisztokémiai és elektrofiziológiai vizsgálatokkal egyes feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák sejtszintű lokalizációját és funkcionális jellemzőit vizsgáltuk. Eredményeinkkel hozzá kívántunk járulni a Gastropoda KIR kapcsolatrendszerének és az azokban jelenlévő egyes hírvivők és intramembrán molekulák szerepének jobb megértéséhez. Eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze.

1. Leírtuk a PC sejtes rétegének ultrastrukturális szerveződését éticsigában (*Helix pomatia*) és egy meztelen csigafajban (*Limax valentianus*). A sejtes rétegben a globulus sejtek között lokális neuropil régiókat azonosítottunk. A lokális neuropilekhez köthető szinaptikus- és nem szinaptikus kapcsolatok jellemzőit; axo-axonikus és axo-szomatikus szinteken azonosítottuk, továbbá feltártunk szinaptikus konfigurációkat, mint a divergencia és a preszinaptikus moduláció, melyek feltehetően meghatározóak a szag információ feldolgozásának szignalizációs útjaiban.
2. Részletesen jellemeztük a PC 5-HTerg innervációs rendszerét fény- és elektronmikroszkópos szinten. A *Helix* PC-ben az 5-HT-IR varikózus rostok sűrűn behálózzák mind neuropilt, mind a sejtes réteget. Feltártuk a *Limax* PC sejtes rétegének eddig nem ismert 5-HTerg innervációját is. Kimutattuk, hogy az 5-HT-IR rostok a PC szinte valamennyi perikaryonját kosárszerűen innerválják. Ultrastrukturális szinten az 5-HT-IR rostok által formált axo-axonikus és axo-szomatikus kapcsolatokat is azonosítottunk. Eredményeink az 5-HT PC-ben betöltött általános modulátoros szerepére utalnak.
3. Három feszültségfüggő  $K^+$ -csatorna ( $K_{v2.1}$ ,  $K_{v3.4}$  és  $K_{v4.3}$ ) jelenlétét mutattuk ki a *Helix* KIR-ben. A három vizsgált  $K^+$ -csatornát tartalmazó neuronok száma viszonylag alacsony volt és eloszlásuk mintázata hasonló volt a ganglionokban. Ugyanakkor egyes sejtsoportokon belül, például a PC-ben, lokalizációjuk eltérő volt, és ez egyes szabályozó folyamatokban, így a szaginformáció feldolgozásában, betöltött differenciált szerepüket veti

fel. Ultrastrukturális szinten a *Helix* KIR egyes területein (PC, pedális ganglion) a  $K_v4.3$ -IR jelölődés egy axon típushoz volt köthető, és ez ugyancsak az egyes  $K^+$ -csatornák szabályozó folyamatokban betöltött eltérő szerepére utal.

**4.** Voltage-clamp eredményeink megerősítették az immunhisztokémiai vizsgálatok során azonosított  $K^+$ -csatornák jelenlétét *Helix* központi neuronokban. 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 sejtjeiben a kifelé egyenirányító áramot és a pedális ganglion  $K_v4.3$ -IR neuronjaiban pedig szintén A-típusú, de lassú kinetikájú  $K^+$ -áramot regisztráltunk. A patch-clamp elvezetések megerősítették a kifelé egyenirányító feszültségfüggő  $K^+$ -áram jelenlétét PC sejtekben, de a neuronokban további, tranziens (A-áram) komponenst is regisztráltunk. Ez arra utal, hogy a szaglási információt feldolgozó hálózatokban mindkét áram típus szerepet játszik.

## 6. Közlemények jegyzéke

### 6.1. 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* 268:87-101. **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**

### 6.2. Az értekezés témájához 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

### **6.3. Egyéb közlemények**

Kiss T, **Battonyai I**, Pirger Z. (2014) Down regulation of sodium channels in the central nervous system of hibernating snails. *Physiol. Behav.* 131:93-98 **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**