

**A szaglórendszer integrációs központja, a procerebrum celluláris és neurokémiai organizációjának vizsgálata nyelesszemű csigákban (*Helix*, *Limax*)**

(A beszámolóban alább azokat a közleményeket tüntetjük fel, melyek benyújtás előtt állnak, vagy kézirat formájában az előkészítés fázisában vannak és még ebben az évben benyújtásra kerülnek.)

A szaginformációk központi feldolgozásáért felelős procerebrum (PC) ultratrakturális vizsgálata során két teresztriális csigafajban, *Helix pomatia*-ban és *Limax valentianus*-ban, kimutattuk, hogy a sejtes rétegben axon nyúlványok a perikaryonokkal közvetlenül érintkező lokális neuropil területeket alkotnak. Az axon profilok szoros, helyenként specializált axo-szomatikus membrán kapcsolatokat létesítenek a PC neuronokkal. A szinaptikus konfigurációk egyszerűbb formái is megfigyelhetők voltak, mint pl. a szinaptikus divergencia, azaz egy varikozitás egyidejű kapcsolata két- vagy több perikaryonnal, vagy perikaryonokkal és további axon profilokkal (szinkronizáció), illetve a preszinaptikus moduláció. Az axo-szomatikus kapcsolatok mentén exocitózisra utaló membrán konfigurációk fordultak elő. Az eredmények a perikaryonális szintű lokális integratív folyamatok szerepét igazolják a szaginformáció feldolgozásában, illetve a szagmemóriához kapcsolódó oszcillációs folyamatok végső kialakításában. Korrelatív fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel vizsgáltuk az **extrinsic eredetű 5-HT immunreaktív rendszert** a *Helix* PC-ben kimutattuk, hogy a globulus sejteket szinte kivétel nélkül szerotonin (5-HT) immunreaktív rostok mintegy periszomatikus hálóként innerválják. Camera lucida technikával követtük az 5-HTerg innerváció arborizációját és kimutattuk, hogy az a teljes procerebrum területét (globulus sejtek és medulláris neuropil) innerválja. Kimutattuk továbbá, hogy a jelölt varikozitások jellegzetes szinaptikus konfigurációkat alkotnak, mindenekelőtt perikaryonok és axonprofilok egyidejű, összekapcsolása (szinkronizációja) révén. A kapcsolatok jelentős része nem mutatott membrán specializációt. Egy másik nyeles-szemű modell faj, a *Limax valentianus* PC-ában kimutattuk, hogy a *Helix* szaglóbelyével ellentétben az 5-HT immunreaktív innerváció a neuropil régió rendkívül finom hálózatos ellátottsága jellemzi, melyből nagyfeloldású képeken axon nyúlványok a globulus sejtek rétegébe is követhetők voltak. Azonosítottuk az 5-HTerg elemek eredetét is a metacerebrum területén, továbbá igazoltuk 5-HT serkentő hatását tüzelő (bursting) globulus sejtek aktivitására. Eredményeink az 5-HT széleskörű modulátoros szerepére utalnak, egyben alapot nyújtanak a szaglóközpont 5-HTerg szabályozásának pontosabb funkcionális jellemzéséhez.

Egy további kísérletsorozatban a PC-re jellemző és feltételezhetően az olfaktórikus memóriáért felelős lokális "field" potenciálok (LFP) oszcillációs aktivitásának **peptiderg (FMRFamid) szabályozását** vizsgáltuk *Limax valentianus*-ban. Igazoltuk, hogy az FMRFamid egy G-protein által közvetített intracelluláris hírvivőrendszeren át csökkenti az oszcillációs frekvenciát. Nagyszámú FMRFa-immunreaktív neuront mutattunk ki a PC sejtes rétegében, melyek az

medulláris neuropilt innerválják. Ugyanakkor a PC extrinsic eredetű FMRFaerg bemeneteit is azonosítottuk a cerebrális ganglion egyéb területeiről, beleértve az óriás C3 sejtet, mely ennek alapján a szaglás és a tapogató mozgató szinkronizációjában is szerepet játszik. A tetrapeptidet kódoló mRNS „splice variant” multiplikált kópiáinak azonosítása során bizonyítottuk, hogy a PC-ben a „kanonikus” tetrapeptid expresszálódik.

*Helix pomatia*, szaglólélemben elemeztük a szagmemória folyamatokat befolyásoló **nitrogén monoxid (NO)erg rendszer** kémiai-neuroanatómiai és neurokémiai jellemzőit, továbbá kapcsolatrendszerét és ultrastruktúráját a NADPH-diaforáz, illetve a NO-szintáz (NOS) lokalizációja alapján. A NOS jelenlétét Western- és dot blot specificitási kísérletekben mutattuk ki PC-ben. Fény és elektronmikroszkópos hisztokémiai (NADPH-diaforáz) és immunhisztokémiai (NOS) módszerekkel, valamint specifikus gyökfogó (DAF-2DA) molekula segítségével lokalizáltuk a NO tartalmú elemeket szövetszeleten és izolált sejtuszpenzióban. Áramlási citometria segítségével tisztáztuk, hogy a PC intrinsic interneuronjai mintegy 90%-a termel NO-t. Az NO-receptor, szolubilis guanilat-cikláz (sGC), valamint a NO-indukált cGMP szintézist is kimutattuk immunhisztokémiai módszerekkel. Morfológiai megfigyeléseink alapján kijelenthető, hogy a PC interneuronjaiban a NO-cGMP jel autokrin természetű. Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a NOS tartalmú sejtek axonjai a mediális neuropilban végződnek. A NOS, szemben a gerincesekben megfigyelttel, kizárólag membránokhoz (mágmembrán, ER, axolemma, kisméretű elektronszegény anyagot tartalmazó vezikula membrán) kötődik. Antitest segítségével azonosítottuk a cGMP-függő proteinkinázt (PKG) és a PKG által foszforilált fehérjéket. A PKG döntően a PC efferens pályáiban volt kimutatható. A NO-sGC-cGMP lokalizációjához hasonló jelölési mintázatot kaptunk foszforilált Akt-szubsztrát és protein kináz A-szubsztrát antitestekkel, mely alapján feltételezzük, hogy a NO-jelátvitel útjában az Akt és PKA is részt vesz. Attraktív illatanyag hatására Akt- és PKA-szubsztrát foszforilációt váltott ki target fehérjéken, melynek erőssége gyengült, miután az állat az illatanyagot kibocsájtó táplálékot megtalálta és evett belőle. Az ismert illat ismételt érzékelésekor és a táplálék fogyasztásakor a target fehérjék foszforilációját nem tapasztaltuk, hasonlóan ahhoz, amikor az állatot repellens illat közegébe helyeztük. Megállapítható, hogy az NO-indukált folyamatok több elemét sikerült azonosítanunk a csiga szaglási folyamatában, melyek közül néhány a gerincesekétől eltérő, új, eddig ismeretlen mechanizmus jelenlétére utal.

**Nacsa K, Elekes K, Serfőző Z.: Subcellular distribution of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the nervous system of an invertebrate. *Cell Tissue Res.*, IF: 3.114 (kézirat)**

**A *Helix* PC sejtek ioncsatornáinak jellemzése során** immunhisztokémiai kísérletekkel kimutattuk, hogy a Na, Ca, és K feszültségfüggő ioncsatornák eltérően lokalizálódnak és expresszálódnak a PC burstölő és nem-burstölő sejtekben. Patch-clamp technika alkalmazásával megállapítottuk továbbá, hogy a PC nagyméretű (10-15 µm) és kisméretű (5-8 µm) sejtei eltérő Na-csatorna altípusokat expresszálnak, amely sejtek megfelelnek a burstölő és nem-burstölő

sejteknek. A burstölő neuronok gyors tranziens és Nav1.9-szerű (perzisztens) Na-ion csatornával rendelkeznek míg a nem –burstölő neuronok lassú tranziens és Nav1.8-szerű Na-ion csatornával rendelkeznek az L-típusú Ca és a Kv4.3 (A-típusú ) tranziens és Kv2.1 ioncsatornákkal együtt. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a PC sejteknek burstölő illetve nem-burstölő tulajdonságait részben az eltérő összetételű ioncsatornák celluláris és szubcelluláris eloszlása határozza meg.

Három kálium (Kv2.1, Kv3.4, Kv4.3,) csatorna előfordulását részletesen elemeztük *Helix pomatia* központi idegrendszerében immunhisztokémiai és elektrofiziológiai módszerekkel. Kimutattuk, hogy az egyes K-csatorna alegységekkel szemben immunreaktív sejtek valamennyi ganglionban előfordultak, noha lokalizációjuk és számbeli jelenlétük eltérő volt. Ezen kívül nem idegi struktúrákban (perineurium és aorta fal) a Kv4.3 csatorna jelenléte ugyancsak megfigyelhető volt. A PC-ben mindhárom Kv-csatorna jelen volt, mindeneelőtt a kisméretű (5-8  $\mu\text{m}$ ) nem tüzelő sejtekben. Ultrastrukturális szinten a Kv4.3 csatorna jelenlétét mind PC, mind pedális neuronok nagy granuláris vezikulákat tartalmazó varikozitásaiban figyeltük meg. A Kv2.1, Kv3.4 és Kv4.3 csatornák megjelenésének specifikusságát Western és dot blot kísérletekkel igazoltuk. Voltage clamp technika segítségével kimutattuk, hogy a Kv3.4 és Kv4.3 csatornákat expresszáló sejtekből elvezetett kifelé irányuló áramokat tranziens komponensek, míg a Kv2.1 immunoreaktív sejteket késői (delayed) áramok jellemezték. A különböző Kv alegységeket tartalmazó neuronok eloszlása és elektrofiziológiai jellemzői alapján feltételezzük, hogy azok specifikus és egymástól eltérő szerepet töltenek be inter/intracelluláris szignalizációs folyamatokban, jól körülhatárolt, részben lokális eseményekhez köthetően. Lokalizációjuk alapján szerepük mind pre-, mind posztzinaptikus perikaryonális és axonális szinten feltételezhető.

**Battonyai I, Krajcs N., Serfőző Z, Kiss T, Elekes K: Potassium channels in the central nervous system of the snail, *Helix pomatia*: localization and physiological characterization. *Neuroscience*, IF: 3.215 (kézirat közlésre történő benyújtás előtt)**

**A szaglószer (tentaculum) térbeli pozicionálása szabályozásának funkcionális anatómiai hátterét** vizsgálva megállapítottuk, hogy a szaglószer megfelelő helyzetbe hozását a csiga a tapogató hajlításának két típusával valósítja meg. Az egyik a hajlítás, mely a kinyújtott tapogató alapjánál lévő forgópont mentén történik, míg a másik típus (quivering és twitching) a tapogató csúcsából indul el és ebben csak a tapogató felső része vesz részt. A különböző típusú hajlásokért az általunk felfedezett három flexor izom (M1, M2, M3) és velük párhuzamosan a tapogató nyél (tegumentalis) izomzata egyes elkülönült szakaszainak kontrakciója felelős. A flexor izmok a szaglószernél erednek és a tapogató nyél alapjánál (forgópontjánál) három különböző ponton tapadnak, így egy térbeli koordináta rendszert jelölnek ki, melynek mentén a tapogató bármilyen irányú mozgása illetve pozicionálása válik lehetővé.

A peritenticularis idegeken (PTn) valamint a szaglóiidegen keresztül történő antero- és retrográd neurobiotin (NB) töltésekkel azonosítottuk a flexor és tegumentális izmok innervációs mintázatát. Kimutattuk, hogy a flexor izmokat és a tegumentális izomzatot a cerebrális neuronok mind elkülönülő, mind közös motoros innervációval látják el. A független innerváció a PTn keresztül az alaptól indul és a tapogató csúcsáig terjed, míg a közös innerváció a szaglóiidegen keresztül a csúcstól az alapig történik. A független pályák a kinyújtott tapogató különböző irányú hajlásaiért, míg a közös pálya a tapogató rövidüléséért és visszahúzásáért felelősek. A beidegző idegeken keresztül történt párhuzamos retrográd Co- és Ni-lysin jelölésekkel kimutattuk, hogy a flexor izmokhoz és a tegumentális izomzathoz axont küldő neuronok a cerebrális ganglion ventrális területén nyolc elkülöníthető csoportba rendeződnek. A flexor izmokon keresztül végzett retrográd NB pályakövetés kimutatta, hogy a tapogató ganglionban helyezkednek el azok a perifériás neuronok, melyek a szagló glomerulusokban történő átkapcsolás után az M2, M3 izmok kontrakcióját a tapogató csúcsból kiindulva kiváltják.

Ultrastukturális vizsgálatokkal feltártuk, hogy mindhárom flexor izmot egy kisszámú, egymástól távol elhelyezkedő, kevés kontraktilis elemet tartalmazó, sima izom szerkezetet mutató rost rendszer alkotja. Az izomrostok felszínét különböző hosszúságú szarkoplazma tüskék jellemzik, melyekkel a rostok helyenként szorosan egymáshoz kapcsolódnak. Az izomrostokban centrálisan a kontraktilis elemekbe ágyazva nagyszámú mitokondrium tömörül. Mindhárom izomban néhány vastagabb axonköteg figyelhető meg, ebből ágaznak le az innerváló varikózus axonok. Utóbbiak szoros, enyhén specializált aktív membránszakaszok mentén képeznek neuromuszkuláris kapcsolatokat. Az ideg-izom kapcsolatok változatos formában valósulnak meg; egyes esetekben egy varikozitás két izomrostot is összekapcsol.

Immuncitokémiai vizsgálatokkal a flexor és a tegumentális izmokban dopamin (DA), 5-HT, acetilkolin (ACh), glutamát (Glu) és FMRFamid immunreaktív axonokat mutattunk ki. Korrelatív fény és elektronmikroszkópos 5-HT immuncitokémia szerint a néhány nagyméretű elektron denz granulumot és számos agranuláris szinaptikus vezikulát tartalmaztak jelölt axonok és varikozitások mind szoros membránkapcsolatokban, mind távoli (modulátoros) pozícióban megfigyelhetők voltak.

A flexor izmok innervációjában résztvevő szignál molekulák közül a Glu, ACh és DA receptorok eloszlását vizsgálva megállapítottunk, hogy anti-NMDA immunjelölés csak axonokon volt jelen, míg a cerebrális ganglionban nagyszámú immunreaktív neuron lokalizálódott. A kolinerg receptorok közül a flexor izmokban az  $\alpha 7$ -es alegységgel rendelkező receptor fordult elő, míg az idegelemekben a 4-es alegység volt megfigyelhető. DA esetében kimutattuk, hogy a flexor izmokban mind a serkentő D1, mind a gátló D2 receptorok csak az innerváló axonokban lokalizálódnak. A cerebrális ganglionban nagyszámú D1 receptort tartalmazó kisméretű neuron volt megfigyelhető. A jelölt neuronok axonokat küldtek a tapogató ganglionon keresztül a flexor

és tegumentalis izmokhoz. D2 receptort tartalmazó neuronok csak kis számban fordultak elő a cerebrális ganglionban.

**Hernádi L, Teyke T, Kiss T: Neuroanatomical background of olfactory stimulus induced local reflexes in the posterior tentacles of the snail, *Helix pomatia*. *Invert. Neurosci*, IF: 1.320, (kézirat közlésre történő benyújtás előtt)**

**Hernádi L, Battonyai I, Serfőző Z, Kiss T, Krajcs N, Teyke T, Elekes K: The monoaminergic system and the regulation of tentacle movements in the snail, *Helix pomatia*. (kézirat)**

***A szaglószer (tentaculum) térbeli pozicionálásának szabályozásáért felelős mozgatórendszer funkcionális fiziológiai és farmakológiai hátterét*** vizsgálva megállapítottuk, hogy a flexor izmok méretükhöz (kb. 100  $\mu\text{m}$  átmérő) képest nagy erő kifejtésre (500  $\mu\text{g}$ ) képesek, ugyanakkor rendkívül elasztikusak, nyugalmi helyzetben nincsenek catch-állapotban (non-catch type muscle, SM). A flexor izom kontraktilis és szabályozó protein tartalmát SDS-PAGE technikával a jellegzetes catch izoméval összehasonlítva megállapítható volt, hogy a fő kontraktilis proteinek (nehéz miozin, aktin és paramiozin) összetétele hasonló, ugyanakkor ellentétben a catch típusú izmokkal (CM) a 115-130 kDa-nál catchin nem figyelhető meg az SM-ben. Egy 26 kDa nem azonosított protein ugyancsak hiányzott az SM-ből. Ugyanakkor az 55-60 és 70-80 kDa-nál megjelenő protein sávok hiányoztak a CM-ben. Tehát a flexor izmok különleges kontraktilis és szabályozó protein összetétellel rendelkeznek, mely magyarázhatja az izom rendkívüli elasztikus tulajdonságait.

A flexor izmok kontraktilis és farmakológiai tulajdonságainak vizsgálatára kidolgoztunk egy izotóniás mérő módszert, mellyel kimutattuk, hogy extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében 40 mM KCl-al és  $10^{-4}$  M ACh-al eltérő mechanizmusokon alapuló kontrakció váltható ki. A magas extracelluláris  $\text{K}^+$  depolarizálta az izmot és megnyitotta a Ca-csatornákat a szarkolemmában. Az ACh viszont kapcsolódott az izommembránban található nikotin típusú receptorokhoz, mely megnyitotta az izommembránban jelen lévő Na-csatornákat, ez pedig stimulálta a Na/Ca pumpát és növelte az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt. Alternatív mechanizmusként az intracelluláris tárolóhelyekről felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  is felmerült. Ennek bizonyítására vizsgáltuk a 40 mM KCl-dal kiváltott kontrakciót  $\text{Ca}^{2+}$  mentes oldatban, valamint az intracelluláris Ca-tárolását befolyásoló ruthen vörös és thapsigargin jelenlétében. Mindkét anyag jelenlétében a 40 mM KCl hatása jelentősen blokkolható volt, azonban a thapsigargin esetében a KCl-dal kiváltott kontrakció 25-30%-a megmaradt. Ez arra utal, hogy a sarcoplasma reticulum ciszternái, valamint a mitokondriumok elégséges Ca-ot tárolnak ahhoz, hogy kontrakciót válthassunk ki Ca-mentes közegben. Ezt további kísérletsorozattal is alátámasztottuk, melynek során az izmot 12 órán át Ca-mentes közegben tartottuk, majd néztük a magas koncentrációjú KCl és ACh hatását. Mindkettő hatástalan volt, míg a koffein, amely felszabadítja az intracelluláris Ca-ot, az izom összehúzódását váltotta ki.

Vizsgáltuk a flexor izmok működését az innervációjában részt vevő szagló illetve a peritentakuláris idegek (PTn) ingerlésével, illetve az idegingerlést követően felszabadult lehetséges transzmitter(ek) szerepét. A szagló ideg ingerlésére az izmok válaszoltak, amely a közvetlen beidegzésre utalt. A ePTn ingerlése az M3 és M2, míg az iPTn ingerlése az M1 és M3 izmok kontrakcióját idézte elő. Az idegingerléssel kiváltott izom kontrakciót ACh illetve Glu közvetíti, mivel extracellulárisan koncentrációfüggő módon és különböző receptorokon hatvamindkettő az izom összehúzódását váltotta ki. Megállapítottuk, hogy a posztszinaptikus (izom) membrán ACh receptorai nikotin típusúak, minthogy a nikotin, TEA és kolin klórid agonista hatásúak voltak. míg a nikotin típusú decamethonium, mytolon, succinylcholine,  $\alpha$ Bgtx, conotoxin-PIVA, hexamethonium és hexamethylene receptor antagonisták blokkolták az ACh-kontraktúrát. A blokkolókkal végzett kísérleteket a szaglóideg ingerlésével kiváltott kontrakció során is elvégeztük és az eredmények egyeztek az ACh-nal kapott adatokkal.

Végül elemeztük egyes monoaminok (5-HT, DA) szerepét a flexor izom működésében. Mindkét hírvivő serkentő transzmitter szerepe feltételezhető, mert mind 5-HT, mind DA képes volt az izom tónust megváltoztatni. A DA enyhe kontrakciót váltott ki, míg az 5HT kettős hatással rendelkezett: kis koncentrációban enyhe kontrakciót nagy koncentrációban relaxációt váltott ki. Hatásuk az ACh-énál lényegesen gyengébb volt, ezért modulátoros hatásuk valószínűsíthető. Az idegingerléssel illetve ACh-nal kiváltott kontrakciót az 5-HT és a DA a flexor izmokban eltérően modulálta, mely azok finomszabályozását teszi lehetővé. A DA hatás preszinaptikus és feltehetően két különböző DA receptoron keresztül valósul meg. Az 5-HT hatása összetettebb, pre- és posztszinaptikus is lehet, közvetlenül befolyásolva az ingerület-kontrakció kapcsolatot az izomban.

**Krajcs N. Hernádi L., Elekes K., Jámbor E., Márk L., Kimura S., Kiss T.: Acetylcholine is an excitatory neurotransmitter candidate in the tentacle flexor muscles responsible for space positioning of the olfactory organs of the snail, *helix pomatia*. *Invert. Neurosci*, *IF: 1.320*, (kézirat közlésre történő benyújtás előtt)**

**Krajcs, N., Hernádi L., Kiss T.: Pharmacology of cholinergic receptors of the snail tentacle muscles responsible for twitching and quivering movements. (kézirat)**