

Az extracelluláris mátrix fejlődése és funkcionális szerveződése csirke és patkány központi idegrendszerében

Doktori értekezés

dr. Gáti Georgina

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Alpár Alán egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Matesz Klára egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Magyar Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Takács József egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Halasy Katalin egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
2. BEVEZETÉS	7
2.1. Az extracelluláris mátrixról általában	7
2.2. A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix szerepe a szinaptikus plaszticitásban és a regenerációban	12
2.3. A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix megjelenési formái. A perineuronális hálók	14
2.3.1. <i>Az amorf alapállomány neuronális kompartmentek körül kondenzáltan külön megjelenési formákat mutat</i>	14
2.3.2. <i>A perineuronális mátrix szerkezete, kémiai heterogenitása, megjelenítésének lehetőségei</i>	14
2.3.3. <i>A perineuronális háló szerepe</i>	17
2.3.4. <i>Neurodegeneratív betegségek és a perineuronális háló kapcsolata</i>	20
3. KÉRDÉSFELVETÉS	23
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	24
4.1 Az extracelluláris mátrix vizsgálata patkány talamuszában	24
4.1.1. <i>Előkészítés immun- és lektinhisztokémiához</i>	24
4.1.2. <i>Az aggregán tengelyfehérje („core protein”) detektálása és lektinhisztokémia</i>	24
4.1.3. <i>Elektronmikroszkópia</i>	25
4.1.4. <i>Kettős immunfluoreszcens festések: anterográd pályajelöléssel kombinált immunhisztokémia</i>	26
4.1.5. <i>Hármas jelölések: anterográd pályakövetés biotinilált dextrán aminnal, HAG7D4 és glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) immunhisztokémia</i>	27
4.2. Az extracelluláris mátrix fejlődése és plasztikus változásainak vizsgálata házi csirke látórendszerében	27
4.2.1. <i>Az állatok szemének letakarása</i>	29

4.2.2. Az afferens depriváció hatásának vizsgálata immunhisztokémiával: a kondroitinszulfát proteoglikánok és a link-protein (CRTL-1) detektálás	29
4.2.3. Az extracelluláris mátrix megjelenése az életkor függvényében: a kondroitinszulfát proteoglikánok, a link protein, az aggregán tengelyfehérje és a hialuronsav detektálása immunhisztokémiával vagy fehérjekötési reakcióval	30
4.2.4. Az extracelluláris mátrix megjelenése az életkor függvényében: lektinhisztokémia	30
4.2.5. Kettős immunhisztokémia: perineuronális hálók előfordulásának vizsgálata a különböző sejtcsoportok körül	31
4.2.6. Képalkotás	32
5. EREDMÉNYEINK	33
5.1. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formája patkány talamuszában	33
5.1.1. A HAGD4 immunoreaktivitás jellemzői patkány talamuszában	33
5.1.2. Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA) lektinreaktivitás jellemzői patkány talamuszában	37
5.1.3. Elektronmikroszkópia	37
5.1.4. Anterográd pályakövetéssel kombinált HAG7D4 és HAG7D4/GAD kettős immunhisztokémia	39
5.2. Az extracelluláris mátrix megjelenése és szerkezete csirke előagyában	41
5.2.1. Az extracelluláris mátrix felépítése csirke agyvelőben	42
a. A csirke középagya intenzív lektinreaktivitást mutat	44
b. Az aggregán-immunoreaktivitás intenzitása az életkor előrehaladtával fokozódik	45
c. A Cat-315 immunoreaktív perineuronális mátrix sok esetben kolokalizál a Kv3.1 β alegységgel rendelkező kálium csatornákkal, de nem vesz körül kolinerg és monoaminerg neuronokat	48
5.3. A kondroitinszulfát proteoglikánok megjelenése független a beérkező inger mennyiségétől csirke látórendszerében	50

6. MEGBESZÉLÉS	56
6.1. Az extracelluláris mátrix a központi idegrendszeri plaszticitás nélkülözhetetlen résztvevője	56
6.2. Köztiagyi mátrixmintázat a kérgi mátrixmintázat függvényében	57
6.3. A házi csirke, mint a fejlett idegrendszerrel született gerinces állat modellje	60
6.4. A házi csirke központi idegrendszeri mátrixának kiépülése nem ingerfüggő folyamat eredménye	63
7. KÖVETKEZTETÉSEK	65
8. ÖSSZEFOGLALÓ	66
9. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	67
10. IRODALOMJEGYZÉK	68
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	92
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	94

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK:

1-B-5: aggregán tengelyfehérje elleni antitest. Az 1-B-5 a klón kódja, az antitest pontos neve Di-delta-0S (0S arra utal, hogy nem szulfatált molekuláról van szó).

AB1031: 1031- es számú klónban termelt monoklonális aggregán tengelyfehérje elleni antitest

ABC: avidin- biotin komplex

AD: nucleus anterodorsalis thalami

AMPA: e32-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl) propionic acid)

AVDL: nucleus anteroventralis thalami, pars dorsolateralis

AVDM: nucleus anteroventralis thalami, pars dorsomedialis

B-HABP: biotinilált hialuronsav-kötő fehérje (biotinilated hyaluronic acid binding protein)

BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumin)

Cat-315: A „cat” a macskára utal, a szám a klónra. Macska aggregán ellen termelt monoklonális antitest.

ChA: kondroitinszulfát A, 2-acetamido-2-dezoxi-3o-(béta-D-glukóz-4 enepiranosziluronsav)-4-o-szulfo-D-galaktóz

ChABC: kondroitináz ABC

ChAT: anti- kolin-acetiltranszferáz

ChB: kondroitinszulfát B, 2-acetamido-2-dezoxi-3o-(béta-D-glukóz-4 enepiranosziluronsav)-6-o-szulfo-D-galaktóz

ChC: kondroitinszulfát C, 2-acetamido-2-dezoxi-3o-(béta-D-glukóz-4 enepiranosziluronsav)-D-galaktóz

CJD: Creutzfeld-Jacob kór

CM: nucleus centromedianus

Crtl-1: porcmátrix protein, cartilage link protein-1

Cy2, 3, 5: karbocianin 2, 3 vagy 5 (carbocyanine)

CSPG: kondroitinszulfát proteoglikán

DAB: 3,3'-diaminobenzidin

DLA: nucleus dorsolateralis anterior

DLG: nucleus geniculatus lateralis dorsalis (dorsal lateral geniculate nucleus)

DMA: nucleus dorsomedialis anterior
DMP: nucleus dorsomedialis posterior
GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
GAD: glutaminsav-dekarboxiláz (glutamic acid decarboxylase)
GAG: glukózaminoglikán
GalNAc: N-acetil-galaktózamin
GLd: nucleus geniculatus lateralis, pars dorsalis
GLv: nucleus geniculatus lateralis, pars ventralis
HAA: Helix aspersa agglutinin (pettyes éticsiga agglutinin)
HAG: humán aggregán (HAG7D4 az általunk használt antitest pontos neve, a 7D4 a klón kódszáma)
HAPLN: hialuronsavat és a proteoglikánokat összekötő kapcsolófehérje (hyaluronan and proteoglycan binding link protein)
Imc: Nucleus isthmi, pars magnocellularis
Iml: nucleus intermediolateralis
Ipc: Nucleus isthmi, pars parvocellularis
LDDM: nucleus dorsolateralis thalami, pars dorsomedialis
LDVL: nucleus dorsolateralis thalami, pars dorsolateralis
LP: nucleus lateralis posterior thalami
LTP: hosszú távú potenciáció (long term potentiation)
MDL: nucleus mediodorsalis thalami, pars lateralis
MDM: nucleus mediodorsalis thalami, pars medialis
MGD: nucleus geniculatus lateralis thalami, pars dorsalis
MGV: nucleus geniculatus medialis thalami, pars ventralis
nBOR: a bazális opticus gyökér magja
P1, P13: kikelés után egy napos, illetve tizenhárom napos (postnatal)
PN: perineuronális háló (perineuronal net)
PO: a talamusz hátsó magcsoportja
Ret: nucleus reticularis
SBA: Soybean Agglutinin (szójabab agglutinin)
TBS: Tris pufferelt fiziológiás sóoldat (Tris-buffered saline)
TH: Tirozin-hidroxiláz

VA: nucleus ventralis anterior thalami

VL: nucleus ventralis lateralis thalami

VLG: nucleus geniculatus ventralis pars lateralis

VM: nucleus ventralis medialis thalami

VPL: nucleus ventralis posterolateralis thalami

VPM: nucleus ventralis posteromedialis thalami

VVA: Vicia villosa agglutinin (szöszös bükköny agglutinin)

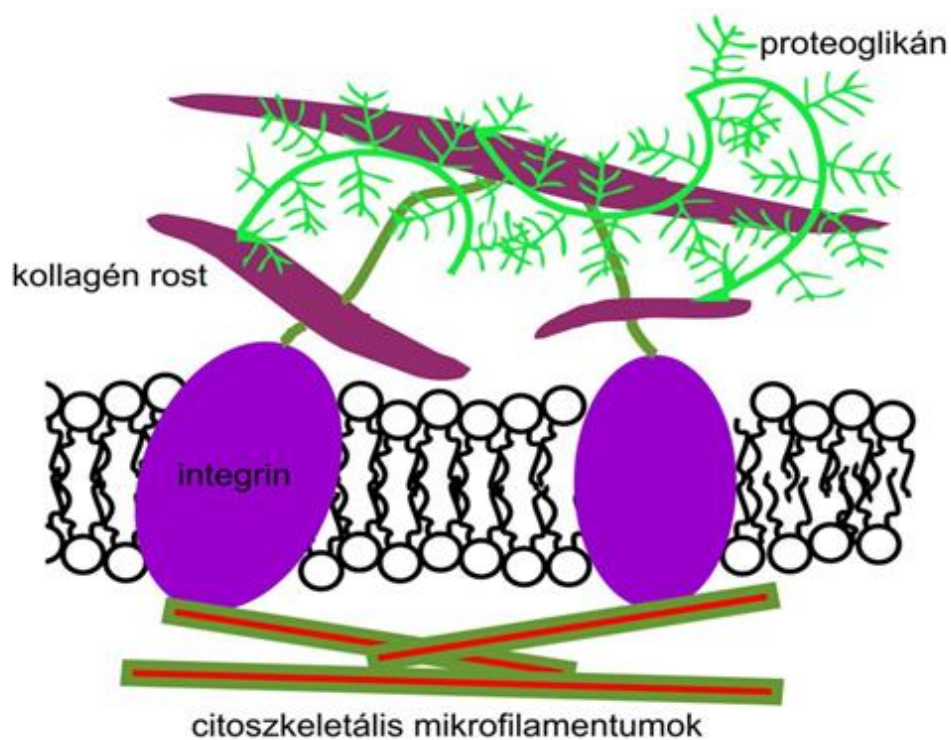
WFA: Wisteria floribunda agglutinin (japán lilaakác agglutinin)

2. BEVEZETÉS

2.1. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIXRÓL ÁLTALÁBAN

Az állati szövetek nem csupán sejtekből állnak. Térfogatuk jelentős hányadát ugyanis makromolekulák hálózata foglalja el, amelyek az extracelluláris mátrixot képezik. Ezen molekulák lokálisan termelődnek, szervezett hálózatot alkotnak, és közeli kapcsolatot létesítenek az őket termelő sejtek felszínével.

Az extracelluláris mátrix fő komponensei – folyadéktartalmán túl - a kötőszöveti rostok és az amorf alapállomány. A kötőszöveti rostok csoportjába olyan fehérje természetű elemek tartoznak, mint például a kollagénrostok. Az extracelluláris mátrix rostjai és a bonyolultan rendezett alapállomány molekulái adhéziós molekulák segítségével sejtfelszíni fehérjékhez (például integrinekhez) kapcsolódnak (Alberts és mtsai 2002, 1. ábra).



1. ábra. Az extracelluláris mátrix és a sejtek kapcsolata.

A kötőszöveteknél már jól ismert extracelluláris mátrix számos komponense a központi idegrendszerben is megtalálható. Egészen közelmúltunkig a központi

idegrendszeri kutatások az extracelluláris mátrix jelenlétét, szerepét gyakorlatilag negligálták, vagy egyenesen tagadták. A tudósok szemléletét sokáig uralta a felfogás, miszerint a központi idegrendszeri szövettan megértésének sarkalatos pontja, hogy nincsen „üres rés” vagy „hézag” a neuronok és gliasejtek között, a celluláris kompartmentek tökéletesen kitöltik a rendelkezésükre álló teret, lehetetlenné téve a legtöbb kötőszövetre jellemző bőséges sejtközötti állomány létezését. Az elmúlt negyven év kutatásai rávilágítottak e dogma helytelenségére.

Ma már tudjuk, hogy az extracelluláris mátrix az agyvelő súlyának körülbelül 20%-át teszi ki (Nicholson és Sykova 1998). A sejtek közötti keskeny, résszerű tereket kitöltő mátrix molekulák már a fejlődő embrióban jelen vannak, a fejlődésben igen fontos szerepet játszanak, a felnőtt központi idegrendszer szinte minden területén megtalálhatóak.

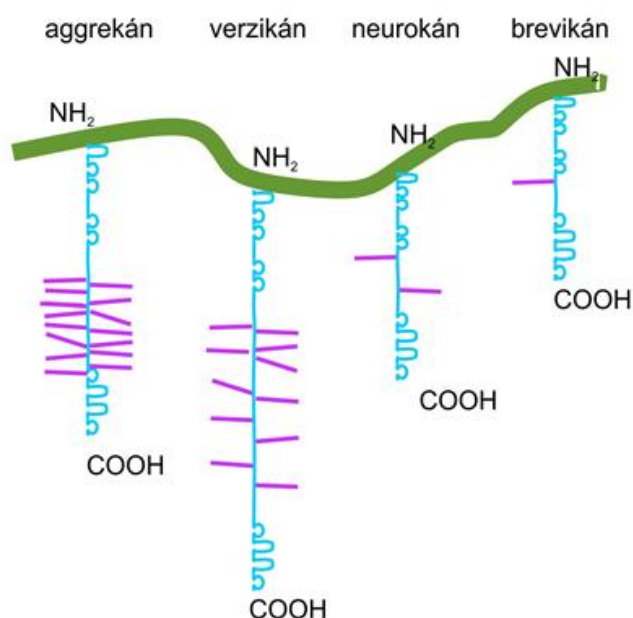
A gerincesek központi idegrendszerében kötőszöveti rostok általában nem fordulnak elő, az amorf alapállomány molekulái vannak a legnagyobb mennyiségben jelen, így a továbbiakban e molekulákat hangsúlyozzuk (Zimmermann és Dours-Zimmermann 2008). Ezen molekulák túlnyomó része proteoglikánok és glikoproteinek, melyek biokémiai szerkezetüket tekintve népes családokat alkotnak.

A proteoglikánok olyan molekulák, melyekben glukózaminoglikánok egy tengelyfehérjéhez (másnéven „core” proteinhez) kapcsolódnak. A glukózaminoglikánok (GAG-ok) ismétlődő diszacharid- egységekből felépülő hosszú, nem elágazódó szénhidrátláncok. A diszacharidot felépítő hexózok típusa, szulfatáltsága és kötéseik milyensége szerint a glukózaminoglikánokon belül megkülönböztetünk keratán-, dermatán-, heparánszulfátot, kondroitinszulfátot, és hialuronsavat (Esko és mtsai, 2009). Míg a kötőszövetekben a keratán- és dermatánszulfátok szerteágazó funkciókkal bírnak (véralvadás, karcinogenezis, mukopoliszaharidózis etc.), a központi idegrendszerben az idegszövet sérülés utáni hegeképződésében játszanak rendkívül fontos szerepet (Li 2013, Zhang 2006). A heparánszulfátok fő sajátossága, hogy a központi idegrendszerben proteoglikánokat képezve a sejthártyához kapcsolódnak, tehát membránkötöttek. Ilyen molekulák például a szindekánok vagy a glipikánok. Az emlősökben 4 féle szindekánt különítettek el, tengelyfehérjükhöz a heparánszulfáton kívül kondroitinszulfát láncok is kapcsolódnak (Bandtlow és Zimmermann 2000, Laemberts és mtsai 2009). A glipikánok még a szindekánoknál is nagyobb variabilitást mutatnak, a központi

idegrendszerben hat formáját különítik el, mely nem csak a felnőtt idegrendszerben, hanem a fejlődő agyvelő és gerincvelő morfogenezisében is szerepet játszik (Lander és mtsai, 1996).

A központi idegrendszerben a kondroitinszulfát proteoglikánok a leggyakoribbak, ezekben értelemszerűen a tengelyfehérjéhez legnagyobb részben kondroitinszulfát láncok kapcsolódnak. A kondroitinszulfátokon belül még megkülönböztetünk ChA- t, B-t és C-t (chondroitinsulphate A, B, C; a közöttük lévő molekuláris különbségeket a rövidítésjegyzéken belül közöljük Yamagata 1967-es közleménye alapján).

A kondroitinszulfát proteoglikánok népes családot alkotnak, melyek közül az idegrendszerben a lektikánok fordulnak elő leggyakrabban. A lektikánok családját alkotják az aggregán, a verzikán, a brevikán és a neurokán (2. ábra). Tengelyfehérjéjükre jellemző egy hialuronsav kötő-, és egy úgynevezett C típusú lektin domén. Így képesek a lektikánok a hialuronsavhoz, a lektin doménen keresztül pedig sejtfelszíni szénhidrátokhoz kapcsolódni (Ruoslahti 1996, Yamaguchi 2000).

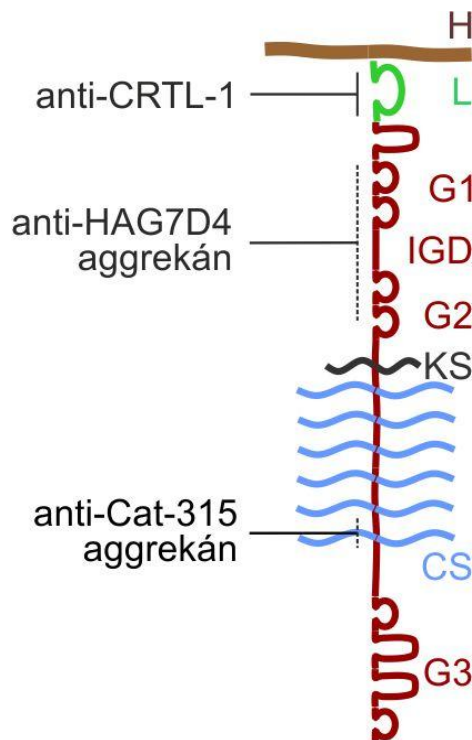


2. ábra: A lektikánok főbb fajtái és általános szerkezetük. (Zimmermann 2000 után, módosítva). A zöld vonal a hialuronsavat, a kék szín a proteoglikánok tengelyfehérjéit, a lila pedig a hozzájuk kapcsolódó GAG láncokat jelöli.

A lektikánok általános felépítését az aggregán molekula példáján mutatjuk be, melyet leginkább a porc alapállományából ismerünk (Watanabe és mtsai 1999). Ez a

molekula a központi idegrendszeri extracelluláris mátrixnak, különösen a perineuronális hálóknak fontos alkotóeleme, kísérleteinkben erre a molekulára fókuszáltunk.

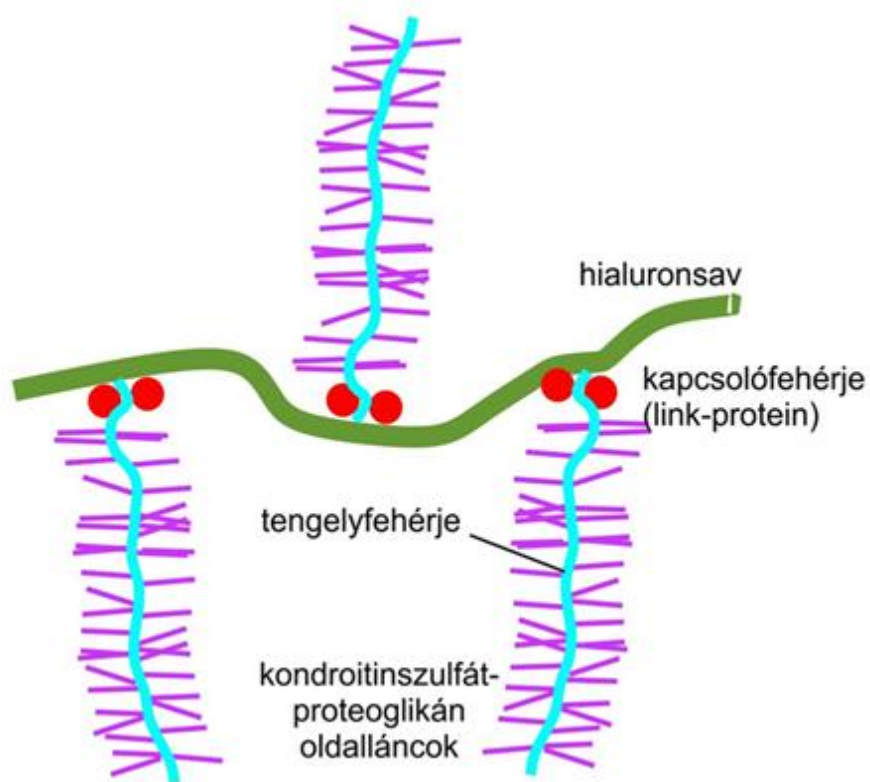
Az aggregán molekula tengelyében egy hozzávetőleg 250 kD molekulatömegű fehérje van, ehhez oldalról kapcsolódnak a kondroitinszulfát és keratánszulfát GAG-láncok (kb. 150). Az egész komplex molekulatömege elérheti az akár 3 millió Da-t is (3.ábra).



3. ábra. Az aggregán molekula sémás szerkezete. Az aggregán egy kapcsolófehérje (zöld színnel jelölve, L: link-protein) segítségével rögzül a hialuronsav lánchoz (barna színnel jelölve, H: hialuronsav). Az ábrán több, az aggregán molekula kimutatására használt antitest támadáspontját ábrázoljuk. Piros színnel az aggregán tengelyfehérjéje szerepel, kék színnel jelöljük a kondroitinszulfát oldalláncokat (CS), feketével pedig a keratánszulfát oldalláncokat (KS). A G1, IGD, G2 és G3 rövidítések a tengelyfehérje különböző doménjeit jelölik. (Lendvai után 2013, módosítva)

A hialuronsav is egy glukózaminoglikán, ezek közül pedig a legegyszerűbb és a legősibb. Diszacharid egysége glükuronsavból és N-acetil-glukózaminból áll. Igen hosszú láncokat képez, melyekben az ismétlődő egységek száma a több ezret is elérheti, molekulatömege pedig több millió dalton is lehet. A hialuronsav eltérően a többi glukózaminoglikán molekulától nem kötődik kovalensen fehérjéhez, így nem képez proteoglikánt (Toole 2000). Több-kevesebb mennyiségben minden szövetben előfordul, sebgyógyulás alkalmával nagy mennyiségben képződik, majd a gyógyulás előrehaladtával fokozatosan lebomlik (Frasher és mtsai 1997; Delpech és mtsai 1989). Lebontását a hialuronidáz enzim végzi, biztosítva ezzel az extracelluláris mátrix fiziológiás átépülését. Nagyméretű, erősen negatív töltésű szénhidrát-polimer, amely az agyi extracelluláris mátrix, ezen belül is a később tárgyalt perineuronális hálók „gerincét” képezi (Deepa és mtsai 2006; Dityatev és mtsai 2010).

A proteoglikánok tengelyfehérjének kezdeti szakasza egy- egy kapcsolófehérje –ún. link-protein segítségével a hialuronsav lánchoz kapcsolódik (Yamaguchi, 1999, 3. és 4. ábra).



4. ábra. A proteoglikánok kapcsolata a hialuronsav lánccal.

Ezeket a kapcsolófehérjéket összefoglaló néven HAPLN rövidítéssel jelölik (hyaluronan and proteoglycan binding link proteins, Spicer és mtsai 2003). A link proteinek családját négy tagra oszthatjuk fel: HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3 és HAPLN4. A HAPLN1 a klasszikus porc link- proteinnek felel meg (Crtl1- cartilage link protein 1, Neame és Barry 1994). A felsoroltak közül egyedül a HAPLN3 hiányzik a központi idegrendszeri parenchymából, legtöbbször az érfalban fordul elő (Ogawa és mtsai 2004).

Az extracelluláris mátrix részeként a glukózaminoglikánok fehérjékhez csatlakozva a proteoglikánok mellett ún. glikoproteineket is létrehozhatnak. A glikoproteinek és proteoglikánok közötti fő különbség a fehérje és szénhidrát tartalom arányában van. A glikoproteinekre általában 1-60 tömegszázalék szénhidrát tartalom jellemző, míg a proteoglikánoknak hosszú (átlagosan 80), elágazásmentes

szénhidrátláncai a teljes molekula tömegének 95%-át is kitehetik (Alberts és mtsai 2002). A központi idegrendszerben a glikoproteinek közül a tenaszcinok a leggyakoribbak, de nélkülözhetetlen komponensek a fibronectin és a laminin is, melyek mint adhezív glikoproteinek kötik össze a mátrixmolekulákat egymással és sejt felszíni fehérjékkel, egy rendkívül bonyolult, mégis rendezett hálózatot létrehozva.

A központi idegrendszerre a tenaszcinok közül leginkább a tenaszcin-C molekula a jellemző, amely különleges, hatfelé ágazódó hexabrachion szerkezetével egyszerre több mátrixkomponenssel valamint sejt felszíni fehérjével képes kapcsolódni (Jones és mtsai 2000). Szerepük a differenciálódott (felnőtt) központi idegrendszerben is kiemelkedő, mert a szinapszisok szerkezetének állandó résztvevői. Dityatev és munkatársai (2011) megfogalmazása szerint a szinapszis egy tetramer struktúra, melynek a preszinaptikus, posztzinaptikus és gliális résztvevőkön kívül a tenaszcinok által hálózattá összekapcsolt extracelluláris mátrix nélkülözhetetlen szereplője. A tenaszcinok ezen felül a sejtek migrációját, mátrixhoz történő adhézióját és differenciálódását (Anlar és mtsai 2012), receptorok és ioncsatornák működését, a szinaptikus plaszticitást és a gliális újräépülést is befolyásolják (Dityatev és Rusakov, 2011).

A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix legnagyobb részét a lektikán, másnéven hialektán család proteoglikánjaiból, illetve a hozzájuk kötődő molekulákból, a hialuronsavból, link proteinből és adhezív glikoproteinekből, ezeken belül pedig leginkább tenaszcinokból épülnek fel (Bandtlow és Zimmermann 2000; Rauch 2004, 2007; Ruoslahti 1996; Yamaguchi 2000). A felnőtt agyvelőben a lektikának a hialuronsavval, valamint tenaszcinokkal interakcióba lépve egy hármas komplexet hoznak létre, amely a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix építőköve és a perineuronális hálókat fogja alkotni (Yamaguchi és mtsai 2000).

2.2. A KÖZPONTI IDEGRENSZERI EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX SZEREPE A SZINAPTIKUS PLASZTICITÁSBAN ÉS A REGENERÁCIÓBAN

Szinaptikus plaszticitás alatt az idegsejtek szinaptikus kapcsolatainak változásait, erősségük illetve hatékonyságuk módosulásait értjük. Ez a jelenség számos idegi folyamat alapja, ez áll a tanulás, emlékezés hátterében, és ennek segítségével

alakítjuk ki szokásainkat, vagy sajátítunk el speciális mozdulatokat. Természetesen az egyedfejlődés során is nagy szükség van rá.

Ma már ismert, hogy a szinapszis, az azt felépítő fehérjerendszerek, állandóan és gyorsan (másodpercek alatt) változnak, flexibilisek és nagyban függenek az előzetesen történt transzmissziós történetektől is. A szinaptikus jelátvitel mértéke ugyanis csökkenthető vagy növelhető külső vagy más szinapszis általi stimulálással. A bekövetkező változások lehetnek átmenetiek vagy tartósak, tarthatnak a másodperc töredékéig, de akár hetekig is.

A hosszú távú hatásra egy 1970-es években végzett kísérlet szolgált bizonyítékkal. Ennek során ugyanis kiderült, hogy a hippocampus serkentő szinapszisainak ismételt aktiválásával a szinapszisok erőssége nő, és a hatás órákig vagy akár napokig is tarthat (Bliss és mtsai 1973). A jelenség a long term, vagy hosszú távú potenciáció (LTP), ami a plaszticitás vélhető celluláris mechanizmusa, és a posztzinaptikus neuron depolarizáció alatti 200 Hz körüli ingerlését követő megnövekedett serkenthetőségének felel meg. Működése a hippocampusban szorosan összefügg a hosszú távú memóriával (Davis és mtsai 2002).

Jelenlegi kutatások azt mutatják, hogy az extracelluláris mátrix makromolekulái a szinaptikus résekben, illetve periszinaptikusan elhelyezkedve a posztzinaptikus sejt transzmitter-vezérelt ioncsatornáinak lokalizációját befolyásolják, meggátolják ezen posztzinaptikus receptorok laterális diffúzióját (Groc és mtsai 2007, Michaluk és mtsai 2009; Dityatev 2010) Az extracelluláris mátrix molekulák jelenléte például csökkenti az AMPA receptorok oldalirányú elmozdulását, valamint hozzájárul az L- típusú Ca^{2+} csatornák aktiválásához is (Frischknecht és mtsai 2009). Ezen receptorok pedig az LTP, tehát a szinaptikus plaszticitás molekuláris folyamatának fontos résztvevői (Alberts és mtsai 2002, Davis és mtsai 2002).

A kondroitinszulfát proteoglikánok barrierként is működnek a központi idegrendszerben. In vitro kísérletekben bizonyított, hogy a lektikán család minden tagja képes szabályozni az axonnövekedést. Amikor például gerincvelői harántlézió után az állatot kondroitináz ABC- tehát kondroitinszulfát A-t, B-t és C-t bontó- enzimmel kezelték, az axonregereráció mértéke a sérült területen jóval nagyobb volt, mint az enzimmel nem kezelt állat esetében (Snow és mtsai 1991; Brittis és mtsai 1992, Yamaguchi és mtsai 1999). Tehát az extracelluláris mátrix az idegszövet sérülés utáni

reinnervációs folyamatait is gátolja. Patkányon végzett unilaterális nigrostriatalis axotómia utáni kondroitináz ABC (ChABC) kezelés elősegítette a megszakított dopaminerg nigrális axonok regenerációját (Moon és mtsai 2001). Megfigyelték továbbá, hogy a gerincvelő hátsó kötegi sérülését követően a kondroitinszulfát proteoglikán (CSPG) molekulák mennyisége megemelkedik, és mivel tudjuk, hogy ezek az axonnövekedést gátolják, akadályozzák a sérült hátsó kötegi rendszer regenerációs folyamatait is (Silver és Miler 2004; Massey és mtsai 2007). ChABC fecskendezése a sérült területre elbontja a proteoglikánokat, és a megszakadt axonok növekedéséhez vezet, így részleges gyógyulást lehetett elérni (Bradbury és mtsai 2002). Sőt, a ChABC kezelés után nemcsak a sérült, hanem az érintetlen axonok is növekedni kezdtek (Barritt és mtsai 2006). A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix ezen kívül a sejtek migrációját is gátolja (Dityatev 2010). Az extracelluláris mátrix különböző neuronális kompartmentek körüli különleges fenotípusait a következő fejezetben részletezzük.

2. 3. A KÖZPONTI IDEGRENDSZERI EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX MEGJELENÉSI FORMÁI. A PERINEURONÁLIS HÁLÓK

2.3.1. *Az amorf alapállomány neuronális kompartmentek körül kondenzáltan külön megjelenési formákat mutat*

Jóllehet az extracelluláris mátrix molekulái az agyszövetben homogéne kiterjedve mindenütt jelen vannak, az idegsejtek kitüntetett részei körül feltűnő sűrűségben is előfordulhatnak. Mindeztidáig két fenotípusát sikerült azonosítani ezeknek a mátrix-aggregátumoknak: a perineuronális hálót, melyek a szomatodendritikus kompartment körül, és a periaxonális hüvelyeket, melyek izoláltan egyes szinapszisok körül találhatóak (Brückner és mtsai 1999, 2008).

2.3.2. *A perineuronális mátrix szerkezete, kémiai heterogenitása, megjelenítésének lehetőségei*

A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix molekulái megjelenhetnek az idegsejtek nyúlványai között diffúzan eloszolva, és egyes neuronok szómáját, proximális dendritjeit, és axon iniciális szegmentjét beborítva, jól szervezett hálózatos

struktúráként, melyeket perineuronális hálónak nevezünk (Hendry és mtsai 1988, Brückner és mtsai 1993, 1996, 2006).

E képződményeket először Camillo Golgi írta le 1893-ban, de nem csak ő, hanem Lugaro, Donaggio, Martinotti, Ramón y Cajal és Meyer is vizsgálta őket (Celio és mtsai 1998). Golgi úgy gondolta, hogy ez a jelenség a neuronok körüli úgynevezett „neurokeratin fűző”, amely megakadályozza az ingerület sejtről sejtre terjedését (Golgi 1873). Ezzel szemben Ramón y Cajal azt állította, hogy ez csupán a festési eljárás mellékterméke, amely a sejten kívüli anyagok kicsapódásából származik. Ez utóbbi igencsak befolyásos személy véleményének köszönhető, hogy a perineuronális hálók iránti tudományos érdeklődés ezzel egy időben alábbhagyott. Megjegyezzük, Cajalnak abban tulajdonképpen igaza volt abban, hogy sejten kívüli anyagok váltak láthatóvá – az extracelluláris mátrix molekulái. Funkcionális fontosságára ugyanakkor nem világított rá.

Az 1960-as évek végén viszont újra felbukkant a téma. Akkoriban ugyanis számos szerző egy bizonyos neuronokat körülvevő, perjódsav- Schiff- pozitív (PAS-pozitív) anyagra hívta fel a figyelmet. Azt feltételezték, hogy ez az anyag valószínűleg negatív töltésű molekulákból áll. Érdekes módon az így leírt szerkezet és a Golgi által jóval korábban leírt jelenség közötti azonosságra nem jöttek rá (Celio és mtsai 1998). Napjainkban már tudjuk, hogy ezek a perineuronális hálók a kifejlett idegrendszer rendkívül fontos komponensei, melyeket számos fajban vizsgáltak, az embert is beleértve (Brückner és mtsai 1993, 1996a, b, 1998, Ohyama és Ojima 1997, Lander és mtsai 2002, Matthews és mtsai 2002, Szigeti és mtsai 2006, Rácz és mtsai 2013).

A perineuronális hálók láthatóvá tételére több módszer is rendelkezésünkre áll. Camillo Golgi a XIX. század végén az ezüstkrómsók precipitációjának módszerével vizsgálta őket. A ma használt egyik leggyakoribb módszer a Wisteria floribundából (WFA, japán lilaakác), Vicia villosából (VVA, szőszös bükköny) vagy szójababból (SBA) származó növényi lektinekkel való jelölés. Ezek a lektinek nagy szelektivitással és affinitással kötődnek a proteoglikánok alfa- és/vagy béta N- acetilgalaktózamin részeihez (Seeger és mtsai 1996, Tsubouchi és mtsai 1996, Guerrero-Tarrago és mtsai 1999). Napjainkban az immunhisztokémia széles körben elterjedt módja a perineuronális hálók jelölésének.

A különböző extracelluláris mátrix-jelölési eljárások fejlődésével egyértelművé vált, hogy különböző fajokban, az idegrendszer egyes régióiban eltérő a perineuronális hálók előfordulása (Ojima és mtsai 1998, Brückner és mtsai 1998a, 2003, Ishii és Maeda 2008; Nakamura és mtsai 2009). Perineuronális hálók sokaságát mutatták ki a látókéregben, valamint a szomatoszenzoros kéregben, ezen belül is leginkább a barrel mező (a bajuszszőrökből érkező jelek receptív mezője) IV. rétegében egerekben, patkányokban és mongol futóegerekben (Brückner és mtsai 1994, Nowicka és mtsai 2003, Bahia és mtsai 2008, Nakamura és mtsai 2009).

A perineuronális hálók összetételüket tekintve szintén variábilisak, és ez utalhat arra, hogy különböző típusú neuronokat ölelnek körül (Deepa és mtsai 2006, Carulli és mtsai 2006). Patkány neokortexében WFA jelöléssel például három különböző típusú neuront borító háló is megjelenik: interneuronok, ritkábban piramissejtek, és elszórtan a VI. rétegben egy GABAerg sejtcsoport (Wegner és mtsai 2003) körül. Patkányban a piramissejtek az interneuronokhoz képest ritkán burkoltak mátrixszal, legnagyobb számban jellemzően a látókéregben, legkisebb számban a szekundér motoros kéregben fordulnak elő (Alpár és mtsai 2006).

Az előbbi, extracelluláris mátrixról szóló fejezetben már említett lektikának a perineuronális hálók egyik legfontosabb komponensei. A perineuronális hálók komponenseit a neuronok és a gliasejtek hozzák létre. Túlnyomóan a glia felelős a tenascin, verzikan, a brevikan és a hialuronsav létrejöttéért (Jaworski és mtsai 1995, Yamada és mtsai 1997), amíg neuronok termelik az egyéb proteoglikánokat, melyek közül szerepét, fontosságát tekintve kiemelkedik az aggregán (Lander és mtsai 1998, Matthews és mtsai 2002, Morawski és mtsai 2010). A neurokánt elősorban asztrociták hozzák létre, bár erre neuronok is képesek (Engel és mtsai 1996, Matsui és mtsai 2002, Jones és mtsai 2003). Patkányagyból származó neuronok *in vitro* készítményein történt vizsgálatok azt igazolták, hogy az aggregánt szintén neuronok termelik (Matthews és mtsai 2002).

A perineuronális hálók kialakulásához az adott neuron aktivitása is szükséges. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a tetrodotoxinnal teljességgel blokkolt neuronális aktivitás mellett nem alakultak ki perineuronális hálók egerek látókérgi neuronjai körül. Ugyanakkor a szelektíven gátolt glutamáterg transzmisszió nem befolyásolja számottevően a burokkal rendelkező neuronok számát. Ebből arra következtettek, hogy

a neuronális aktivitás *per se* feltétele a perineuronális hálók fejlődésének, képződésük ugyanakkor nem kizárólagosan a glutamáterg rendszer működésétől függ (Reimers és mtsai 2007).

Ez a bonyolult perineuronális struktúra határozott, és igen stabil burkot képez a neuronok körül, sajátos mikrokozmoszt hozva létre. Környezetéhez való kapcsolata meglepő módon mindeztidáig nem tisztázott, az uralkodó felfogás szerint a perineuronális hálókat, mint többrétegű struktúrát értelmezik. Ebben a felfogásban az extracelluláris hálózatos mátrixstruktúrát (hialuronsav-kapcsolófehérje-proteoglikán-tenaszcin) mindeztidáig nem feltérképezett transzmembrán fehérjék kapcsolnak a spektrin és ankirin tartalmú intracelluláris citoszkeletális vázhoz (Celio és mtsai 1998). A perineuronális burok összetétele az egyedfejlődés során változik. Rágcsálókban, embrionális korban például jóval kisebb mennyiségben találtak aggregán immunreaktivitást (Matthews és mtsai 2002, Milev és mtsai 1998c), mint csirkében (Schwartz és Domowicz 2004). A korai postnatalis korban az emlős perineuronális hálói többnyire neurokánt, és 1-es típusú vezikánt tartalmaznak (Milev és mtsai 1998). A kifejlett idegrendszerben már a lektikánok családjának egyéb tagjai is dominálnak, mint az aggregán, a 2-es típusú vezikán és a brevikán (Zimmermann és Dours-Zimmermann 2008). Az aggregán, a hialuronsav és a link protein molekulák mRNS-einek nagy mennyiségű termelése („up-regulációja”) egyidőbe esik a perineuronális hálók kialakulásának kezdetével, ezért igen valószínű, hogy különleges szerepet töltenek be a létrejöttükben (Carulli és mtsai 2007).

2.3.3. A perineuronális háló szerepe

A perineuronális háló korai formájának egyik lehetséges feladata az extracelluláris mátrix és az intracelluláris sejt-váz (citoszkeleton) közötti kapcsolat létrehozása (Celio és Blümcke 1994, Wintergerst és mtsai 1996). A parvalbumint tartalmazó GABA-erg (gamma-amino-vajsav) interneuronok citoszkeleton fehérjéi (pl. ankirin B és R-spektrin) a perineuronális komponensek megjelenése előtt válnak kimutathatóvá. Mivel ezek a fehérjék közvetve fontos komponensei a sejt-mátrix kapcsolatnak, Wintergerst és munkatársai (1996) arra jutottak, hogy a citoszkeleton fejlettségi foka valószínűleg befolyásolja a PN fejlődést.

A fejlődő perineuronális hálónak számos más feladatot is tulajdonítanak. Feltételezik, hogy a korai perineuronális háló egyes elemei például képesek növekedési faktorokat vonzani és kötni, ez pedig azt jelentheti, hogy fontos szerepet játszanak az idegsejtek kifejlődésének szabályozásában és stimulálni tudják az axonok növekedését. Például a fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), amely a neuronok túléléséért és a neuritek növekedéséért felelős, a perineuronális hálóban megtalálható (Celio és Blümcke 1994).

Mivel a perineuronális háló bizonyos komponensei a posztnatális szinaptogenesis csúcsa előtt már kimutathatóak, valószínűleg fontos szerepet játszanak a szinaptogenesis szabályozásában is (Milev és mtsai 1998, Popp és mtsai 2003). Ezt a feltételezést *in vitro* kísérletek is alátámasztják, melyek szerint már a szinapszisok kialakulása előtt aggregán-immunoreaktív foltok jelennek meg a sejt kultúrákban lévő idegsejtek felszínén. Az aggregán korai felbukkanása és akkumulációja a sejt felszín extraszinaptikus területein feltehetően „előre kijelöli” a később kialakuló szinapszisok helyét (Dino és mtsai 2006).

A posztnatális fejlődési folyamatok előrehaladtával a perineuronális háló jellemzően egyre összetettebbé válik, és egyre határozottabb burkot von a neuron köré (Rauch 2004). A kifejlett extracelluláris mátrixburok ellenáll a közeledő új neuriteknek (McKeon és mtsai 1991, Niederost és mtsai 1999, Rhodes és Fawcett 2004). Az is bizonyított, hogy a tenascin C és más glikoproteinek is megakadályozzák az interneuronális kapcsolatok kialakulását (Grumet és mtsai 1985, Pesheva és mtsai 1993). Ennek alapján a perineuronális háló barriert képezhet új szinaptikus kapcsolatok kialakulásával szemben.

Mindemellett a kifejlett perineuronális hálók hatásosan csökkentik az illető idegsejtek plasztikus tulajdonságait is, így fontosak a szinapszisok stabilizálásában (Hockfield és McKay 1983, Pizzorusso és mtsai 2002, Berardi és mtsai 2003, Dityatev és Schachner 2003, Rhodes és Fawcett 2004). Rendszerint a posztnatális élet későbbi periódusaiban jelenik meg, gyakran éppen abban az időintervallumban, amikor fennáll az ingerfüggő neuroplaszticitás lehetősége (Pizzorusso és mtsai 2002, 2006, McGee és mtsai 2005, Hensch 2005). A neuronok plaszticitását növelhetjük, ha kondroitináz ABC-t alkalmazunk. A ChABC degradálja a perineuronális hálókat, egyúttal csökkenti a proteoglikánok barrier funkcióját. Ezen kísérletek demonstrálták, hogy ChABC

kezelés után a kifejlett patkányok látókérgében visszaállt a látókérgi dominancia plaszticitása. Ez azt jelenti, hogy a degradáció után a kifejlett állat féloldali szemletakarás után képes volt az eddig domináns oldali látókérgét a másik féltekére cserélni (Pizzorusso és mtsai 2002). Ahogy azt már említettük, erre a váltásra a fiatal állat csak egy bizonyos életkorig képes. Rácz és munkatársai (2013) patkány vestibularis rendszerében tettek megfigyeléseket a perineuronális hálók és a plaszticitás kapcsolatában. Kísérleteikben bizonyították, hogy vestibuláris lézió esetén megváltozik a hialuronsav- és kondroitinszulfát proteoglikán mintázat a vestibularis magok neuronjai körül, mely egybeesik azok spontán aktivitásának újra kialakulásával (Deák és mtsai 2012, Halasi és mtsai 2007). A kísérletek alapján a perineuronális hálók enzimekkel való bontása elősegítheti az idegrendszer funkcionális regenerációját.

Frischknecht és mtsai 2009-ben *in vitro* kísérleteikben úgy tapasztalták, hogy a patkány hippocampalis sejtjeiből készült sejt kultúrát hialuronidáz és ChABC enzimmel kezelve az AMPA-receptorok mobilitása fokozódott. Ebből arra következtettek, hogy a perineuronális háló a neuronok felszínén kompartmenteket képez a receptorok számára, mely csökkenti a receptorok laterális diffúzióját. A rágcsálók primér szomatoszenzoros kérgének rendkívül nagy területét foglalja el az úgynevezett barrel mező, amely a bajusszőrökből érkező információt fogadja. Körülbelül a harmadik posztnatális héten mutathatók ki a perineuronális hálók az itt lévő interneuronok körül, ezek biztosítják a korábban létrejött kapcsolatok stabilitását, így a plaszticitás is gátolt. Korai féloldali depriváció – ez esetben bajusszőrirtás - után a mátrix diffúzabb, elmosódottabb lett a deprivált oldalon, itt a perineuronális hálóból is kevesebb volt. Ezek szerint kapcsolat van a kívülről érkező szenzoros információ mennyisége és a perineuronális hálók felépülési üteme között, egy bizonyos kritikus periódus alatt, ami patkány esetében az első három hét (Bahia és mtsai 2008).

Az előbbieket során említést tettünk az idegrendszeri extracelluláris mátrix molekulák erősen anionos tulajdonságáról. A perineuronális hálók egyéb feladatai ebből a negatív töltésből eredeztethetőek, jöhetnek az irodalom pozitív töltéssel rendelkező perineuronális hálókat is leír (Murakami és mtsai 2001, Murakami és Ohtsuka 2003). Kísérletekkel bizonyított, hogy azokban a GABA-erg interneuronokban, melyeknek határozott perineuronális hálójuk van, kevésbé halmozódik fel lipofuscin, mint a finomabban beburkolt piramissejteketben. Ezen eredmények szerint a kondroitinszulfát

proteoglikánok védelmet nyújtanak a vas-, alumínium-, réz- és cinkionok által okozott oxidatív stressz ellen is (Reinert és mtsai 2003, Morawski és mtsai 2004).

Az imént már említettük, hogy parvalbumin-pozitív GABA-erg interneuronok gyakran rendelkeznek mátrixburokkal. Ezeket „gyorstüzelő interneuronoknak” nevezzük, melyek különleges elektrofiziológiai tulajdonságaikat leginkább a Kv3.1 β alegységgel rendelkező káliumcsatornáknak köszönhetnek. Mivel ezen kationcsatornák perineuronális hálókkal bíró gyorstüzelő interneuronok felszínén fordulnak elő a patkány agyvelő számos területén, Brückner és munkatársai (1993) szerint a perineuronális hálóknak fontos szerepük lehet az idegsejtek kationforgalmában. A Kv3.1 β alegységgel rendelkező káliumcsatornák imént leírt jellegzetes kolokalizációját később egy majomfaj kortexében (*Macaca mulatta*) is leírták (Härtig és mtsai 1999). Génkiütött (knock-out) egerek segítségével még kézzelfoghatóbb bizonyítékokat lehet felmutatni a perineuronális háló fontosságáról. Azok a mutáns egerek, melyekből hiányoztak egyes proteoglikánok, mint a neurokán, brevikán vagy az aggregán, számos rendelleneséget mutattak fejlődésük során, viselkedésükben és a központi idegrendszeri működésükben. Az inaktív brevikán génnel rendelkező egerekben kevésbé expresszálódtak egyes egyéb perineuronális háló komponensek is, leginkább a neurokán, és problémák adódtak a hippocampusz sejtjeiben létrejövő LTP késői fázisának fenntartásában is (Brakebush és mtsai 2002). A neurokán-hiányos egerek viselkedésbeli vagy funkcionális rendellenességet nem mutattak (Zhou és mtsai 2001), az aggregán-hiányos egerek viszont életképtelenek voltak, valószínűleg a fehérje széles körű előfordulása és fontossága miatt (Morawski és mtsai 2010).

2.3.4. Neurodegeneratív betegségek és a perineuronális háló kapcsolata

Neurodegeneratív betegségekkel kapcsolatban szintén sokakban felmerült az extracelluláris mátrix szerepe. Bizonyított ugyanis, hogy a perineuronális háló száma megváltozik több neurodegeneratív betegség kapcsán. A direkt kapcsolat a perineuronális háló és e rendellenességek között mindazonáltal még nem tisztázódott. Ilyen kapcsolat lehetséges a perineuronális háló és a humán idegrendszert érintő prionbetegségek, például a Creutzfeldt-Jacob kór vagy a juhokban leírt sűrűlókór között (Caughey és Raymond 1993). Ezekre az encefalopátiákra jellemző a GABA-erg gátló interneuronok instabilitása és sérülékenysége, ami lehet, hogy a perineuronális háló

korábbi destrukciójának köszönhető. A Creutzfeldt-Jacob kór korai stádiumában ugyanis jellemző, hogy a perineuronális mátrix megfogyatkozik, mielőtt az említett parvalbumin-pozitív interneuronok eltűnnének. Ezzel ellentétben a súrlókóros juhok agyában a perineuronális hálók épek maradnak amellet, hogy a parvalbumin-pozitív interneuronpouáció egyidejűleg megfogyatkozik (Vidal és mtsai 2006). Emellett a súrlókórban érintett sejtek esetében a kondroitinszulfát proteoglikánok jelenléte gátolja a prionok akkumulációját (Caughey és Raymond 1993).

Alzheimer-kór esetében a perineuronális hálók összetételében is változásokat írtak le. Bár a WFA-pozitív perineuronális hálók és az Alzheimer kórra jellemző markerek, mint a tau protein, az amiloid-béta peptid és az aktivált mikroglia markererek nem fordulnak elő együtt (nem kolokalizálnak), jelentős csökkenés figyelhető meg a perineuronális hálóval bíró sejtekben a negatív töltésű N-acetilgalaktózamin oldalláncok mennyiségében (Baig és mtsai 2005). Mivel a perineuronális hálók jelentősek az ionhomeosztázis fenntartásában (Brückner és mtsai 1993, 1996a, b, Härtig és mtsai 1999, 2001, Reinert és mtsai 2003, Morawski és mtsai 2004), hiányosságuk elsősorban funkcionális romlást idéz elő a GABAerg interneuronokban (Baig és mtsai 2005). Ennek megfelelően, mivel protektív szereppel is rendelkeznek, diszfunkciójuk megkönnyítheti az amiloid plakkok felhalmozódását. Kortikális neuronokból álló sejt kultúrát amiloid-béta peptiddel kezelve kiderült, hogy a perineuronális hálóval borított neuronok túlélnek, az ezt nélkülözők pedig elpusztulnak ennek hatására (Miyata és mtsai 2007). Alzheimer kórt modellező transzgen egerekben (Tg2576 egértörzs), az aggregáns termelő neuronokban nem halmozódtak fel amiloid plakkok (Morawski és mtsai 2008). Sőt, a perineuronális hálóval rendelkező neuronok citoskeletális elváltozásokat is kevésbé mutattak a transzgenikus állatokból nyert sejt kultúrában (Morawski és mtsai 2008). Humán agyból készült kettősen jelölt metszetekben kimutatták, hogy a perineuronális burokkal rendelkező idegsejtekben nem jöttek létre neurofibrillum lerakódások még a súlyosan károsodott területeken sem (Brückner és mtsai 1999). A tau fehérje hiperfoszforilációját is leírták perineuronális hálóval nem rendelkező idegsejtekben, idős patkányok kérgi neuronjaiban (Härtig és mtsai 2001). Fontos megemlítenünk, hogy egyes tanulmányok a perineuronális hálók patológiás szerepét írták le Alzheimer kórban: úgy találták, hogy a heparán-szulfát proteoglikánok jelenléte elősegíti a tau fehérje hiperfoszforilációját és a neurofibrillum depozitumok

sejten belüli halmozódását (Goedert és mtsai 1996). Más kísérletek kimutatták a perineuronális hálók amiloid-béta fehérjék transzformációjában betöltött szerepét, ami szintén merőben ellentétes a perineuronális hálók eddig leírt védelmi funkciójával (Hilbich és mtsai 1991).

3. KÉRDÉSFELVETÉS

Jelen értekezésben több aspektusból vizsgáltuk a perineuronális és periszinaptikus mátrix eloszlását és plaszticitásfüggését. Ezek a következők voltak:

1. A patkány eltérő plaszticitással rendelkező kérgi területein eltérő mátrixmintázat látható. Van-e összefüggés az extracelluláris mátrix fejlettségében, mintázatában olyan régiók között, melyek egyazon pálya részei, tehát projekciós kapcsolatban állnak? Más szóval, egy ismertén kevésbé plasztikus kérgi terület, mely sok perineuronális hálóval rendelkezik, olyan köztiagyi/szubkortikális (talamusz) területről kapja-e a bemenetét, melyet hasonló mátrixmintázat/fejlettség jellemez?
2. A periaxonális hüvelyek (axonal coats) a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix újonnan felfedezett megjelenési formái, melyek humán anyagban gátló végződéseik körül jelentek meg. Eddigi feltételezések szerint a perineuronális mátrixot a poszt-szinaptikus sejtek termelik. Itt arra kerestük a választ, hogyan jelentek meg a periaxonális hüvelyek a patkány talamuszában, és lehetséges-e az, hogy őket a preszinaptikus neuron termeli?
3. Ismert, hogy egyes rágcsálókban (egérben és patkányban) jól körülírt, kifejtett perineuronális hálók legkorábban csak három hetes életkorban jelentek meg, amikor az emlős idegrendszerre jellemző plasztikus időszak már lezárult. Hogyan történik a perineuronális hálók fejlődése olyan állatban (házi csirke), amely szinte teljesen differenciált idegrendszerrel születik?
4. Tudjuk, hogy egérben és patkányban a perineuronális hálók fejlődése függ az afferens inger jelenlététől. Utolsó kérdésünk az, hogy ha a fejlett idegrendszerrel született házicsirkében végzünk féloldali funkcionális afferens deprivációt, meg tudjuk-e akadályozni a deprivált oldali mátrixfejlődést?

4. ANYAG és MÓDSZER

4.1 AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX VIZSGÁLATA PATKÁNY TALAMUSZÁBAN

A kísérleteket 16 darab 5 hónapos hím és nőstény Wistar patkányon végeztük. Az állatkísérletek tervezése és kivitelezése az European Communities Council 1996. november 24-i állatkísérleteket szabályozó direktívája (86/609/ECC) és a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi Tanácsadó Testület Állatügyi Etikai Bizottsága által jóváhagyott (#63/2000) kísérleti protokollja szerint történt, amely megfelelt a Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának Járványügyi és Állatvédelmi Osztálya által kiadott útmutatásoknak.

4.1.1. Előkészítés immun- és lektinhisztokémiához

A kísérletre szánt négy állatot Ketaminnal elaltattuk (300mg/ttkg), ezután 0.9 %-os NaCl oldattal, majd 4% paraformaldehidet és 0.1 % glutáraldehidet tartalmazó 0.1 M-os TBS (Tris buffered saline) oldatával transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyvelőket azonnal eltávolítottuk, és 24 órára glutáraldehidet nem tartalmazó fixáló elegyben hagytuk, majd éjszakára 30%-os szacharóz oldatba helyeztük krioprotekció céljából. Az agyvelőből 30 mikrométer vastag koronális metszeteket készítettünk, kriosztát segítségével. Minden első és második metszetet immunhisztokémiára, minden harmadikat lektinhisztokémiára dolgoztuk fel.

4.1.2. Az aggregán tengelyfehérje („core protein”) detektálása és lektinhisztokémia

A metszeteket alaposan átmostuk 0.1 M-os TRIS-pufferben (TBS pH 7.4), majd 0.3%-os Triton-X 100-at tartalmazó TBS-sel kezeltük 60 percig, hogy elősegítsük az antitestek penetrációját. A nem specifikus antitest kötődések elkerülése érdekében a metszeteket 5%-os normál szarászérumot tartalmazó oldatba tettük egy órára szobahőmérsékleten. A metszeteket aggregán tengelyfehérje elleni antitest oldatával inkubáltuk (HAG7D4, Acris, 1:10) szobahőmérsékleten éjszakán át. Ezután a metszeteket 2% marha szérum albumint (BSA) tartalmazó TBS-ben átmostuk, majd 1

órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk biotinilált, számarban termelt egér-elleni IgG ellenanyaggal (1:1000 TBS-ben oldva, Dianova, Hamburg, Németország). A metszeteket ezután az előre elkészített avidin-biotin komplexszel reagáltattuk egy órán át, szintén szobahőmérsékleten (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, 1:1000 TBS-ben). Az immunprecipitátumot nikkkel-ammónium-szulfáttal felerősített (0,05%, Merck, Darmstadt, Németország) 3,3'-diaminobenzidin segítségével tettük láthatvá (DAB, Sigma, St. Louis, MO, 0,025%). Mindez 0,05 M-os TRIS-pufferben (pH 8,0) 0,001%-osra hígított hidrogén peroxid jelenlétében történt. Kontroll kísérletünkben elhagytuk a primér antitestet, ez az immunreaktivitás hiányát eredményezte. A zselatinozott tárgylemezre felhúzott metszeteket DePex-el (Fluka, Dánia) fedtük le.

A lektinhisztokémia során az erre szánt metszeteket TBS-el alaposan átmostuk, majd a nonspecifikus kötések elkerülése érdekében a metszeteket 2%-os marha szérum albumin oldatával blokkoltuk egy órán át. Ezután a metszeteket biotinilált *Wisteria floribunda* agglutininrel reagáltattuk (D-galNac-/lac-/gal-specifikus agglutinin, 25 mikrogramm/ml) szobahőn egy éjszakán át. A metszeteket TBS-ben átmostuk, majd szintén előre elkészített avidin-biotin komplexszel reagáltattuk egy órán át. A precipitátumot szintén nikkkel-ammónium-szulfáttal felerősített 3,3'-diaminobenzidin segítségével tettük láthatvá 0,05 M-os TRIS-pufferben 0,001%-osra hígított hidrogén peroxid jelenlétében. A metszeteket az előbbiekhöz hasonlóan tárgylemezre húztuk fel és fedtük le.

4.1.3. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz két állatot Ketaminnal (300 mg/ttkg) elaltattunk, azokat 0,9 %-os NaCl oldattal, majd 2 % paraformaldehidet és 2 % glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M-os TBS (Tris buffered saline) oldatával transzkardiálisan perfundáltuk. Vibratom segítségével 50 mikrométer vastag koronális metszeteket készítettünk, majd ezeket alaposan átmostuk 0,1 M-os PBS-ben. Ezután az imént leírtaknak megfelelően HAG7D4 immunhisztokémiát alkalmaztunk. A metszeteket egy óráig szobahőmérsékleten 1 %-os ozmium tetroxid oldattal utánfixáltuk, majd dehidráció után Durcupan-ba ágyasztuk (ACM). A talamusz nucleus ventralis posterior-át választottuk ki részletes vizsgálat céljából, így ebből ultravékony

metszeteket készítettünk, ezeket Formvarral fedett gridekre vettük fel, majd Jeol 1200 EMX elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4.1.4. Kettős immunfluoreszcens festések: anterográd pályajelöléssel kombinált immunhisztokémia

Tíz patkány mély narkózisát ketamin (100 mg/ttkg), xylazin (5mg/ttkg) és atropin (0,1 mg/ttkg) elegyével biztosítottuk. Az állatot sztereotaxiás készülékre helyeztük, fejét rögzítettük, majd fejbőre alá helyi érzéstelenítésként 0,1 ml Xylonest injekciót adtunk (Astra-Zeneca GmbH, Wedel, Germany). Ezután részlegesen eltávolítottuk a bal falcsontot, majd Hamilton fecskendő segítségével biotinilált dextrán amint (0,3 mikroliter 20 %-os BDA, 10.000 MW, Molecular Probes, Eugen, OR) juttattunk az állatok egyes agyterületeire Paxinos és Watson sztereotaxiás atlasza (1998) alapján. Ezen területek a következők voltak: a nucleus gracilis és cuneatus, a nucleus sensorius principalis nervi trigemini, kisagymagok, nucleus reticularis thalami és a szomatoszenzoros kéreg. Mindegyik régiót két-két állatban vizsgáltuk meg. A műtétek után két héttel az állatokat mély altatásban transzkardiálisan perfundáltuk, először fiziológias (0,9%) sóoldattal majd ezt követően fixálóval (4%-os formadehid 0,1 M-os foszfát-pufferben oldva, pH 7.4). Az agyvelőket egy éjszakán át utánfixáltuk ugyanebben az oldatban, majd 24 órára 30%-os szacharóz oldatba helyeztük. Ezután 30 mikrométeres koronális metszeteket készítettünk kriosztát segítségével. A metszeteket alaposan átmostuk TBS-el, majd 5% normál szarászérumot tartalmazó oldatba tettük egy órára, hogy elkerüljük a nonspecifikus kötődések létrejöttét. Ezután a metszetek egy éjszakát át időztek az aggregán tengelyfehérje-elleni antitest (HAG7D4) oldatában. Az előbbi műveletek mindegyike szobahőmérsékleten történt. A metszeteket ezután fluoreszcens festékkel, karbocianinnal (Cy2) konjugált extravidin (1:400; Sigma-Aldrich) és Cy3- konjugált szarásban termelt egér-ellenes immunglobulin (1:500; Dianova) keverékével reagáltattuk. A metszeteket végül felhúztuk tárgylemezre és szárítás után DePeX-szel fedtük.

4.1.5. *Hármas jelölések: anterográd pályakövetés biotinilált dextransz aminnal, HAG7D4 és glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) immunhisztokémia*

Amint azt említettük, néhány metszetet hármasszjelölésre szántunk. Ezeket szintén az imént leírt oldatokban mostuk és blokkoltuk, majd szobahőmérsékleten éjszakára HAG7D4 antitestet és nyúlban termelt GAD-ellenes antitestet (anti-GAD-65/67, 1:5000; Sigma, Hamburg, Germany) keverékébe helyeztük. Másnap a metszeteket Cy2-konjugált extravidin (1:400; Sigma-Aldrich), Cy3-al konjugált számarban termelt egér antitest ellenes immunglobulin (1:500; Dianova), és Cy5- konjugált számarban termelt nyúl antitest elleni immunglobulin (1:400; Dianova) oldatával reagáltattuk. A metszeteket ezután szintén alaposan átmostuk, tárgylemezekre húztuk, majd DePeX-el fedtük. Az alkalmazott antitesteket és lektineket az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat: Patkányban végzett kísérleteinkben használt antitestek és lektinek összefoglaló táblázata

	Mit jelöl?	Cég	Faj	Hígítás	Referenciák
<i>Antitestek</i>					
Anti- aggregán HAG7D4	Aggregán tengelyfehérje	Acris	egér, mk	1:10	Brückner (2008)
Anti- GAD- 65/67	GAD	Sigma	nyúl, pk	1:5000	Brückner (1996)
<i>Lektin</i>					
WFA	GalNAc	Sigma	biotinilált	1:50	Härtig (1992)
mk- monoklonális, pk- poliklonális, GAD-gamma-amino-dekarboxiláz, GalNAc-N-acetil-galaktózamin					

4.2. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX FEJLŐDÉSE ÉS PLASZTIKUS VÁLTOZÁSAINAK VIZSGÁLATA HÁZI CSIRKE LÁTÓRENDSZERÉBEN

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz különböző életkorú házi csirkéket (*Gallus domesticus*, Hunnia broiler hibridek, Bábolna Kft., Magyarország) perfundáltunk. Az extracelluláris mátrix életkorfüggő fejlődését három háromnapos, hat darab tizenhárom napos állatot, és hat darab egynapos állaton (naposcsibe) vizsgáltuk (a későbbiekben ezeket P13 és P1-nek rövidítjük, lásd a 2. táblázatban). Az állatokat ketrecekben, normál állatházi körülmények között tartottuk, majd fenti életkorukban a később ismertetett módon perfundáltuk. További hat kiscsirkén (három egyhetes állaton és három naposcsibén) megkezdtük a szem letakarását, a módszert alább ismertetjük. A naposcsibék szemét a beszállítás után azonnal lefedtük (pontos

életkoruk kikelés után 18 és 24 óra közé esett). Ezeket az állatokat papírdobozokban szállították, minimális megvilágítással. További hat, újonnan kikelt (nevezzük ez esetben 0 naposnak) állat már intézetünkben kelt ki, a tojásokat a Bábolna Kft.-től szereztük be. A tojásokat az inkubátorban a kikelés napjáig teljes sötétségben tartottuk, kikelés után az állatok szemét azonnal letakartuk. A szem letakarását elhanyagolható megvilágítás mellett, sötétben végeztük. A felhasznált állatok számát és életkorát az 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat: A kísérletben felhasznált házicsirkék száma és életkora

Állat életkora	Rövidítés	Darabszám	Kísérlet típusa
1 napos	P1	6	Az extracelluláris mátrix kialakulása az életkor függvényében
13 napos	P13	6	
3 hónapos	-	3	
frissen kikelt	P0	6	Az afferens depriváció hatása a perineuronális hálók kialakulására
1 napos	P1	3	
1 hetes	P7	3	



5. ábra. A képen egy naposcsibét láthatunk, aminek a fejét fekete, rugalmas szövetrel takartuk be. A csőrnek és a megkímélt szemnek az anyagon réseket hagytunk nyitva. A deprivált szemet a letakarás előtt letapasztottuk és dupla rétegű fényt át nem eresztő fekete szövetrel szintén letakartuk.

4.2.1. Az állatok szemének letakarása

Az állatoknak a jobb, illetve bal szemét véletlenszerűen takartuk le. A deprivált oldalt minden állat esetében az agyvelő kivétele után feljegyeztük. A szem letakarása a következőképpen történt: sötétben nevelkedett, majd szinte teljes sötétségben kikelt naposcsibék szemhéját fekete tapasszal minimális megvilágítás mellett azonnal leragasztottuk, az idősebb állatok szemhéját pedig összevarrtuk, majd mind a frissen kikelt, mind az idősebb csirkék fejét kétrétegű, fényt át nem eresztő, puha, rugalmas fekete anyaggal szintén befedtük. Az anyaggal az állat egész fejét betakartuk, a másik

szemének, illetve csőrének nyílást készítettünk, hogy ne akadályozzuk a táplálkozásban (5. ábra). A csirkék ezután három hétig éltek standard körülmények között.

4.2.2. Az afferens depriváció hatásának vizsgálata immunhisztokémiával: az aggregán és a link-protein (CRTL-1) detektálása

A különböző életkorokban letakart szemű állatokat Ketaminnal elaltattuk, 0.9%-os NaCl oldattal majd 4% -os paraformaldehid oldattal (mely tartalmazott glutáraldehidet is 0,1%-os hígításban) transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyvelőket azonnal eltávolítottuk, majd ugyanilyen koncentrációjú formaldehid oldatban utófixáltuk további 24 órán át. Ezután 30%-os szacharóz oldatba helyeztük egy éjszakára krioprotekció céljából. Kriosztát segítségével 30 mikrométeres koronális sorozatmetszeteket készítettünk, melyekből minden negyedik és ötödik metszetet használtuk fel. A metszeteket TBS-el (0.1 M TBS, pH 7,4) alaposan átöblítettük, 0,3%-os TBS- ben oldott Triton X 100-zal előkezeltük, hogy elősegítsük az antitestek penetrációját. Ezután a nem specifikus kötések elkerülése érdekében a metszeteket 5%-os normál szamár szérum oldatával blokkoltuk egy órán át. A metszeteket monoklonális aggregán ellenanyaggal (Cat315, Dr. R. T. Matthews, SUNY, Syracuse, NY, USA, lásd Matthews és mtsai 2002), vagy kecskében termelt anti-humán link-protein (CRTL-1, másnéven hHAPLN1) elleni ellenanyaggal (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, 1:400) reagáltattuk. Ezek után a metszeteket 2%-os TBS-ben oldott bovin szérum albumin oldatával átmostuk, és szamárban termelt egér-elleni, illetve szamárban termelt kecske-elleni biotinilált immunglobulin oldatában inkubáltuk (mindkettő 1:1000-es hígításban, Dianova). A kötődések helyét avidin-biotin komplex segítségével jelöltük, a metszeteket 1 óráig hagytuk az elegyben. Az immunprecipitátumot nikkkel-ammónium-szulfáttal felerősített 3,3'- diaminobenzidin segítségével tettük láthatvá 0.05 M-os Tris-pufferben 0.001%-osra hígított hidrogén peroxid jelenlétében. Kontroll kísérletünkben elhagytuk a primér antitestet, ez az immunreaktivitás hiányát eredményezte. A metszeteket végül zselatinózott tárgylemezekre húztuk fel, majd DePeX-szel fedtük le. Mindez szobahőmérsékleten történt.

4.2.3. Az extracelluláris mátrix megjelenése az életkor függvényében: a link protein, az aggregán tengelyfehérje és a hialuronsav detektálása immunhisztokémiával vagy fehérjekötési reakcióval

Az állatokat az előbb ismertetett módon perfundáltuk, az agyvelőkből kriosztát segítségével 30 mikrométeres sorozatmetszeteket észítettünk. A metszeteket az előző pontban leírtaknak megfelelően mostuk és blokkoltuk normál szarvaszérummal. Ahhoz, hogy az 1-B-5 antitest sikeresen penetrálhasson az aggregán tengelyfehérjén található specifikus kötőhelyére, a metszetet 60 percig kondroitináz ABC-vel reagáltattuk (*Proteus vulgaris*, Sigma, Deisehofen) 0,5 U/ml koncentrációban (TBS-ben oldva, pH 8,0). A metszeteket ezután reagáltattuk a monoklonális aggregán tengelyfehérje elleni antitestekkel, a Cat315-el és az 1-B-5-el (Chemicon Cat-315, 1:1000 és ICN, 1-B-5, 1:800), valamint a kecskében termelt poliklonális anti-humán CRTL-1 ellenanyaggal (hHAPLN1, R&D Systems Inc., Minneapolis, 1:400). Az utóbbi, vagyis a CRTL-1 elleni antitestet rekombináns humán hialuronsavat és proteoglikánokat (leginkább aggregánt) összekötő kapcsolófehérje (link protein) ellen termeltették (Neame és Barry 1994, Carulli és mtsai 2007). A metszetek egy másik részét emellett a szintén aggregán tengelyfehérjét jelölő AB1031 és HAG7D4 antitestekkel reagáltattuk (AB1031, Millipore, 1:1000 és HAG7D4, Acris, 1:10). Ezután a metszeteket 2%-os marha szérum albumin oldatában átmostuk, majd biotinilált, szarvasban termelt egér vagy kecske IgG elleni savóval (1:1000, Dianova) inkubáltuk egy óráig szobahőmérsékleten, majd az előző pontokban leírtaknak megfelelően DAB-reakciót végeztünk kontroll kísérlet mellett, ezután a metszeteket lefedtük.

A hialuronsavat egy fehérjekötési reakcióval tettük láthatóvá, melyben a kapcsolódó proteint biotinnel konjugálták (B-HABP biotinilated hyaluronic acid binding protein). A metszeteket a már ismertetett módon avidin-biotin komplexszel reagáltattuk, majd DAB-reakcióval tettük láthatóvá.

4.2.4. Az extracelluláris mátrix megjelenése az életkor függvényében: lektinhisztokémia

Lektinhisztokémiára szánt metszeteinket alaposan átmostuk TBS-ben, majd 2%-os marha szérum albuminban inkubáltuk a nem specifikus kötődések megelőzése céljából egy órán keresztül szobahőmérsékleten. A metszeteket biotinilált WFA-val,

HAA- val, VVA-val és SBA- val reagáltattuk (mindegyiket 25 µg/ml koncentrációban). Utána a metszeteket TBS-ben átmostuk, majd avidin-biotin komplexben inkubáltunk szobahőmérsékleten egy órán át. A reakciót szintén 3,3'-diamino-benzidin segítségével tettük láthatóvá, amit nikkell ammónium szulfáttal erősítettünk fel (0,05% Merck) 0,05 M-os TRIS pufferben (pH 8,0) oldott 0,001%-os hidrogén peroxid jelenlétében. A metszeteket végül zselatinizált tárgylemezekre húztuk fel, majd lefedtük.

4.2.5. Kettős immunhisztokémia: perineuronális hálók előfordulásának vizsgálata a különböző sejtsoportok körül

Az előagyból és az agytörzsből származó metszeteinket a 4.2.2. fejezetben leírtaknak megfelelően mostuk és blokkoltuk normál szarászérummal. Ezt követően Cat-315 és kolin- acetiltransferáz elleni (ChAT, AB 144, 1:100, Chemicon), illetve Cat-315 és tirozin- hidroxiláz ellenes ellenanyagok keverékével (TH, AB152, 1:1000, Chemicon) reagáltattuk. Emellett végeztünk kettős jelölést a Cat-315 és a Kv3.1β káliumcsatorna alegység elleni antitest- keverékkel (1:2000, Alomone Labs), és a Cat-315 és B-HABP keverékkel is (1:50, Cape Cod). A metszetek szobahőmérsékleten pihentek egy éjszakán át az oldatokban. Ismételt mosás után a preparátumokat Cy2-vel konjugált szarászérummal egér elleni IgM, Cy3-al konjugált szarászérummal termelt kecske-elleni IgG, vagy Cy3-al konjugált kecskében termelt nyúl elleni IgG-vel reagáltattuk. A metszeteket tárgylemezekre húztuk, megszárítottuk, majd DePeX-szel fedtük. Az életkorfüggő mátrixfenotípus vizsgálata során felhasznált ellenanyagokat az alábbi táblázatokban foglaljuk össze (3. és 4. táblázat):

3. táblázat: Csirkében használt antitestek és lektinek összefoglaló táblázata (mk: monoklonális, pk: poliklonális)

	Cég	Faj	Hígítás	Referenciák
<i>Antitestek</i>				
Cat- 315	Millipore	egér, mk	1:1000	Matthews és mtsai (2002)
1-B-5	ICN	egér, mk	1:800	Bückner és mtsai (2008)
Anti humán CRTL- 1 (hHAPLN1)	R&D	kecske, pk	1:400	Carulli és mtsai (2007)
Anti- aggregán AB1031	Millipore	egér, mk	1:1000	Brückner és mtsai (2006)
Anti- aggregán HAG7D4	Acris	egér, mk	1:10	Brückner és mtsai (2008)
Anti- kolin acetiltranszferáz (ChAT)	Millipore	kecske, pk	1:100	Brückner és mtsai (2008)
Anti- tirozin hidroxiláz (TH)	Millipore	nyúl, pk	1:1000	Brückner és mtsai (2008)
Anti Kv3.1 β	Alomone	nyúl, pk	1:2000	Härtig és mtsai (1999)
<i>Lektinek</i>				
Wisteria Floribunda agglutinin (WFA)	Sigma	biotinilált	1:50	Härtig és mtsai (1992)
Helix aspersa agglutinin (HAA)	Sigma	biotinilált	1:50	Härtig és mtsai (1992)
Vicia Villosa agglutinin (VVA)	Sigma	biotinilált	1:50	Härtig és mtsai (1992)
Szójabab agglutinin (SBA)	Sigma	biotinilált	1:50	Härtig és mtsai (1992)
<i>Fehérje</i>				
Hyaluronan-binding protein (B-	Cape cod	biotinilált	1:50	Delpech és mtsai (1989)

4. táblázat: Házi csirkében használt ellenanyagok és lektinek kötődési helyei

Antitestek	Kötődés helye
Cat- 315	aggregán tengelyfehérje
1-B-5	aggregán tengelyfehérje
Anti humán CRTL- 1 (hHAPLN1)	kapcsolófehérje (link protein)
Anti- aggregán AB1031	aggregán tengelyfehérje
Anti- aggregán HAG7D4	aggregán tengelyfehérje
Anti- kolin acetiltranszferáz (ChAT)	kolin acetiltranszferáz
Anti- tirozin hidroxiláz (TH)	tirozin hidroxiláz
Anti- Kv3.1 β	Kv3.1 β káliumcsatorna alegység
<i>Lektinek</i>	
Wisteria Floribunda agglutinin (WFA)	D-galNAc-/lac-/gal
Helix aspersa agglutinin (HAA)	D-galNAc-/glcNAc
Vicia Villosa agglutinin (VVA)	D-galNAc
Szójabab agglutinin (SBA)	D-galNAc-/gal
<i>Fehérje</i>	
Hyaluronan-binding protein (B-	hialuronsav

4.2.6. Képalkotás

A DAB-reakcióval megjelenített immunperoxidáz jelölt metszeteket fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A többszörös immunjelöléssel illetve pályakövetéssel kombinált kettős immunjelöléseket epifluoreszcens mikroszkóppal vagy konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (NIKON-BIORAD) végeztük intézetünkben. Elektronmikroszkópos vizsgálódásainkat JEOL1200 EMX berendezéssel vizsgáltuk.

5. EREDMÉNYEINK

5.1. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX ELOSZLÁSA ÉS MEGJELENÉSI FORMÁJA PATKÁNY TALAMUSZÁBAN

Ismeretes, hogy a patkány kérgi régióiban az extracelluláris mátrix és a perineuronális hálók eloszlása inhomogén. Mivel tudjuk, hogy a kifejlett perineuronális hálók befolyásolják a szinaptikus plaszticitást, a neocortexben megfigyelt mátrixmintázat jellemző az adott régióra. Ez azt jelenti, hogy azok a területek, amelyek ismertén plasztikusabbak, halványabb, kevésbé kiforrott perineuronális hálózattal rendelkeztek, mint azok a régiók melyekre a szinaptikus plaszticitás kevésbé jellemző (Brückner és mtsai 1999). Így merült fel bennünk a kérdés, megismétlődik-e a kéregben tapasztalt mintázat az eddig nem vizsgált fő kéreg alatti kapcsolóállomásban, a talamuszban?

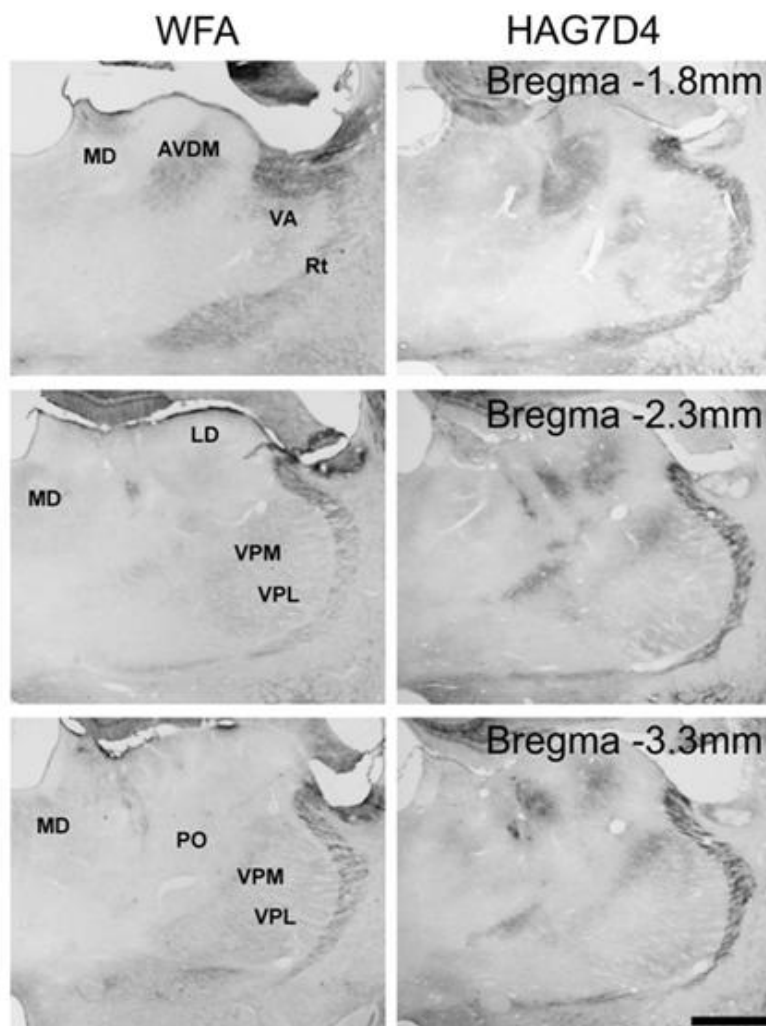
5.1.1. A HAGD4 immunoreaktivitás jellemzői patkány talamuszában

Szériametszeteinken változatos aggregán-pozitív struktúrákat és eloszlást találtunk patkány talamuszában. A perineuronális hálókön kívül, amiket különböző magokban különböző gyakorisággal azonosítottunk, egy másik lokalizáció is megjelent, melyet Brückner és mtsai periaxonális hüvelyként („axonal coat”-ként) azonosítottak (Brückner és mtsai 2008). A diffúz mátrix jelölődési intenzitása, a perineuronális hálók gyakorisága és a periaxonális hüvelyek előfordulása a patkány talamusz magjaiban változatos képet mutatott (5. táblázat, 6. ábra).

5. táblázat: Patkány talamusz HAG7D4-immunoreaktív aggregátum tartalmú extracelluláris mátrixának eloszlása.

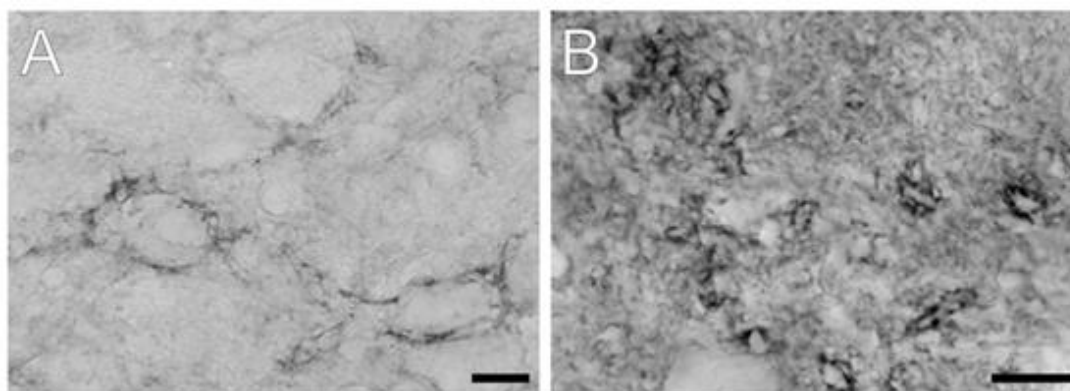
Terület	Perineuronális hálók		Periaxonális hüvelyek		Diffúz mátrix
	Jelerősség	Gyakoriság	Jelerősség	Gyakoriság	
Talamusz					
Elsődleges „relé” magok					
<i>Érző magok</i>					
VPL	+	n.a.	++	+++	++
VPM	+	n.a.	++	+++	++
PO	0	0	++	+	+
DLG	0	0	0	0	0
VLG	+	+	n.a.	n.a.	++
MGD	0	0	n.a.	n.a.	+
MGV	+	+	++	+	++
<i>Motoros magok</i>					
VA	0	0	+	++	++
VL	+	+	++	++	++
VM	++	+	++	+	++
<i>Asszociációs magok</i>					
MDM	0	0	0	0	+
MDL	0	0	+	+	+
AD	0	0	0	0	0
AVDM	++	+	++	++	++
AVDL	0	0	++	+	0
LDDM	0	0	0	0	0
LDVL	0	0	+	++	0
LP	+	0/+	+	+	0/+
<i>Intralamináris magok</i>					
Ret	+++	+++	+++	+++	++++
Iml	++	+++	+++	++	++
CM	++	+++	+++	++	++
A perineuronális és periaxonális mátrix, valamint a diffúz mátrix jelintenzitása illetve előfordulása: ++++ nagyon erős/nagyon gyakori, +++ erős/ gyakori, ++ közepes, + gyenge/ ritka, 0 nem látható. n.a.: biztonsággal nem azonosítható					

A kérgi területekhez képest ritkábban előforduló perineuronális hálók (7A ábra) azonosítása után figyelmünk a periaxonális hüvelyek felé fordult, melyek előbbiektől teljesen önállóan jelentek meg (7B ábra). Leginkább apró hólyagokra, lemezekre hasonlítottak, melyek közepén nem láttunk immunoreaktív mátrixot, méretük és alakjuk azt sejtették, hogy ezen bemélyedések egy-egy bouton fogadnak magukba. A periaxonális hüvelyek főként 3-8 darabos csoportokban, ritkábban egyedül fordultak elő. Csoportos megjelenés esetén egymáshoz meglehetősen közel, egyes helyeken szinte összekapcsolódva találtuk őket. Néhol egymás után sorban, láncszemekként mutatkoztak, máskor inkább kerekesebb csokor formájában (7B ábra).



6. ábra: WFA lektinreaktivitás és HAG7D4 immunoreaktivitás patkány talamusz koronális metszetein. WFA és HAG7D4 jelöléssel a nucleus reticularis területén találtuk a legerősebb reakciót. Az elülső, a medialis és a dorsalis magok gyengén jelölődtek. A ventrobazális komplex magjai, leginkább a VPL és a VPM (nucleus ventralis posteromedialis és posterolateralis) erősebben immunoreaktívak. A retikuláris mag kifejezetten erős immunoreaktivitást mutatott, a medialis és a VA/VL magok közepesen, a VPL és a VPM erősen immunoreaktívak voltak. AVDM, az anteroventrális mag dorsomedialis része; LD, nucleus dorsalis lateralis; MD, nucleus dorsomedialis; PO, hátsó magcsoport; Rt, nucleus reticularis; VA, nucleus ventralis anterior. Lépték= 500 μ m.

Perineuronális hálókat és periaxonális hüvelyeket a legtöbb talamuszmagban tudtunk azonosítani az eltérő erősséggel festett diffúz mátrixba ágyazva. Észrevehető különbségek voltak attól függően, hogy mely magokban, illetve ezeken belül mely szubdivíziókban vizsgáltunk (5. táblázat, 6. ábra). Ha általánosságban nézzük a mátrix festődését, a legerősebb aggregán immunoreaktivitást a retikuláris és az intralaminaris talamuszmagokban tapasztaltuk. Az elülső illetve a mediális talamuszmagok igen gyengén festődtek, a dorzális magok szintén gyenge immunoreaktivitást mutattak, bár a mátrix előbb leírt két megjelenési formája – a periaxonális hüvelyek és a perineuronális hálók - ezekben a magokban, a diffúz mátrix minimális immunoreaktivitása miatt, feltűnően jól ábrázolódtak. A talamusz ventrális magcsoportjának különböző részeiben is sok különbséget találhattunk. Az elülső motoros talamuszmagokban jól kivehetőek voltak a periaxonális hüvelyek illetve perineuronális hálók, amint ez a HAG7D4 immunreakcióról készült fényképeken látható. A hátsó ventrális magokban, különösen a nucleus ventralis posteromedialisban jóval nagyobb számban fedeztük fel a periaxonális hüvelyeket (7B ábra), mint az itt gyengébben és kisebb számban jelölt perineuronális hálókat.



7. ábra. A: HAG7D4-immunoreaktív finom rajzolatú perineuronális hálók a patkány talamusz ventrobazalis komplexének ventrolateralis magjában. **B:** Apró, 2-5 mikrométer átmérőjű HAG7D4 immunoreaktív periaxonális hüvelyek a patkány talamusz nucleus ventralis posteromedialisában. A képletek a perineuronális hálóktól függetlenül jelentek meg. Lépték= 10 μ m.

A corpus geniculatum laterale dorzális területéről szinte teljesen hiányzott az immunoreaktivitás, míg a ventrális részen feltűnő perineuronális hálókat találtunk. A corpus geniculatum mediale-ban hasonlóan heterogén eloszlást találunk: a dorzális terület alig mutatott immunoreaktivitást, míg ventrálisan perineuronális hálókat, periaxonális hüvelyeket többször találtunk.

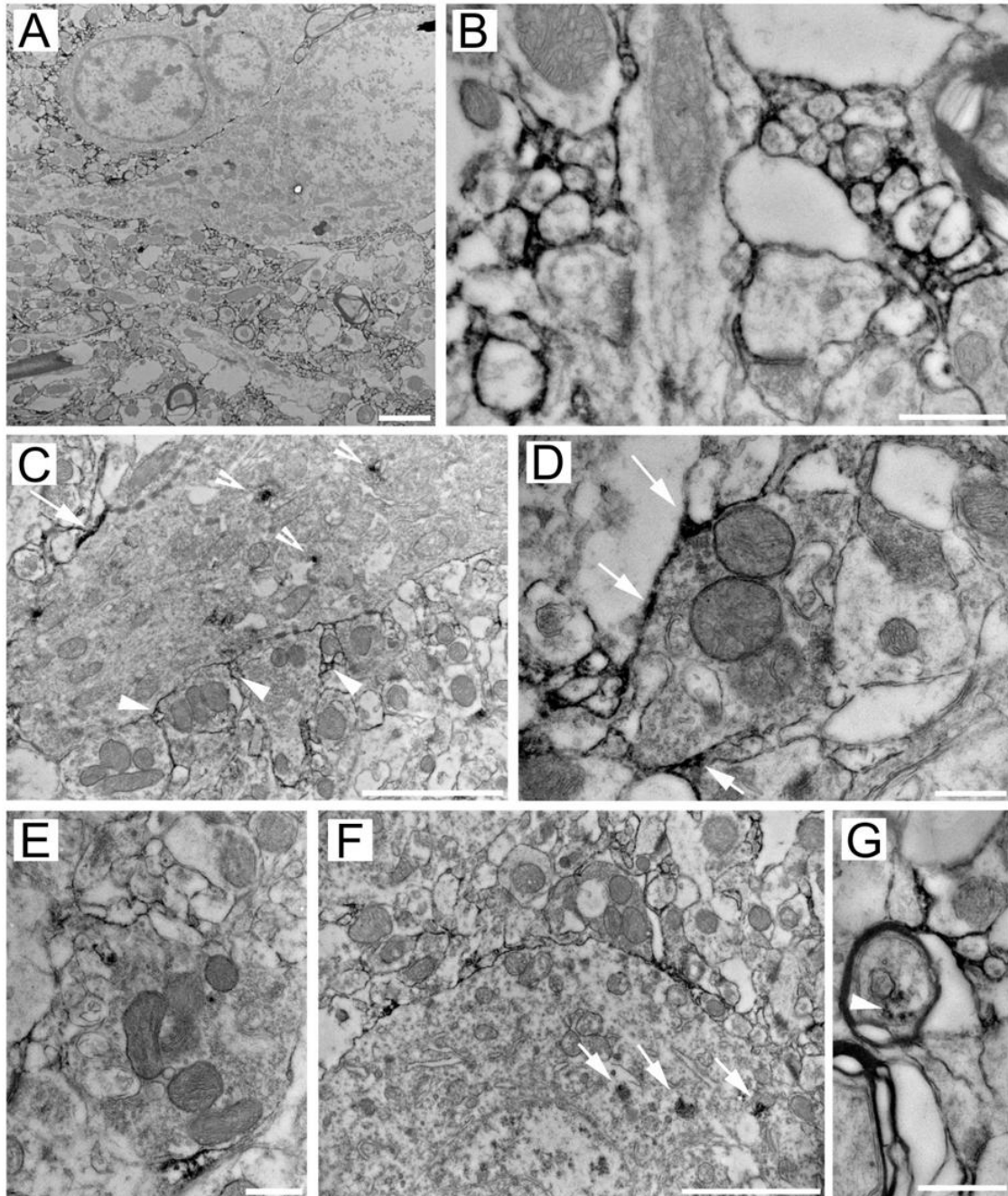
5.1.2. Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA) lektinreaktivitás jellemzői patkány talamuszában

A talamusz különböző magcsoportjaiban látott aggregán-térkép nagyon hasonlított az azonos területekről nyert WFA-lektintérképhez (6. ábra). Mind perineuronális hálókat, mind periaxonális hüvelyeket azonosítottunk a különböző talamuszmagokban. Az elülső és medialis talamuszmagok gyengén festődtek, csak az anteroventrális mag dorsomediális részében (AVDM) láttunk jól azonosítható periaxonális hüvelyeket és perineuronális hálókat egy, az előzőekhez képest valamivel kevésbé intenzív diffúz mátrixszon belül. Ellentétben a HAG7D4 immunfestéssel jelölt metszetekkel, a dorzolaterális mag egyik divíziójában sem láttunk lektinreaktivitást. A ventrális motoros magok elülső illetve medialis területei intenzíven jelölődtek, bár ez a jel gyengébb volt, mint a HAG7D4-el jelölt készítményben. A szenzoros magok festődésének erőssége gyakorlatilag az előzőleg tárgyalt immunreakcióval megegyező volt, valamennyivel erőteljesebb reaktivitással a nucleus ventralis posterolateralisban. A corpus geniculatum mediale és laterale festődése az aggregánnal jelölt metszetekéhez igen hasonló volt.

5.1.3. Elektronmikroszkópia

A talamusz ventrobasisalis magcsoportjában számos helyen találtunk HAG7D4 immunoreaktív profilokat változatos neuronális kompartmentekhez kapcsoltnak (8A ábra). A jelölt mátrixformákat többször az axonok preterminális szakasza körül, gyűrűszerű formában találtuk meg, ezek minden bizonnyal periaxonális hüvelyek voltak, melyek 5-10 tagú csoportokban fordultak elő (8B ábra). A neuronok dendritjei körül is gyakran találtunk immunoreaktív mátrixot, számos esetben axodendritikus kapcsolatok körül (8C ábra). Ezek a szinapszisok legnagyobbbrészt lapos vezikulákat tartalmaztak, ezért vélhetően gátló funkcióval bírnak (8D ábra). A nagyobb méretű specifikus excitatorikus, illetve a kisebb méretű kortikotalamikus terminálisok csak a legritkább esetekben rendelkeztek önálló mátrixburokkal (8E ábra). Azonosítottunk finom rajzolatú perineuronális hálókat is (8F ábra). További tapasztalatunk, hogy nem csak a neuronális kompartmentek körül, hanem jellemzően azokon belül is egyértelmű immunoreaktivitást találtunk (8C,F ábra). A sejttetek (8F) illetve a dendritek mellett

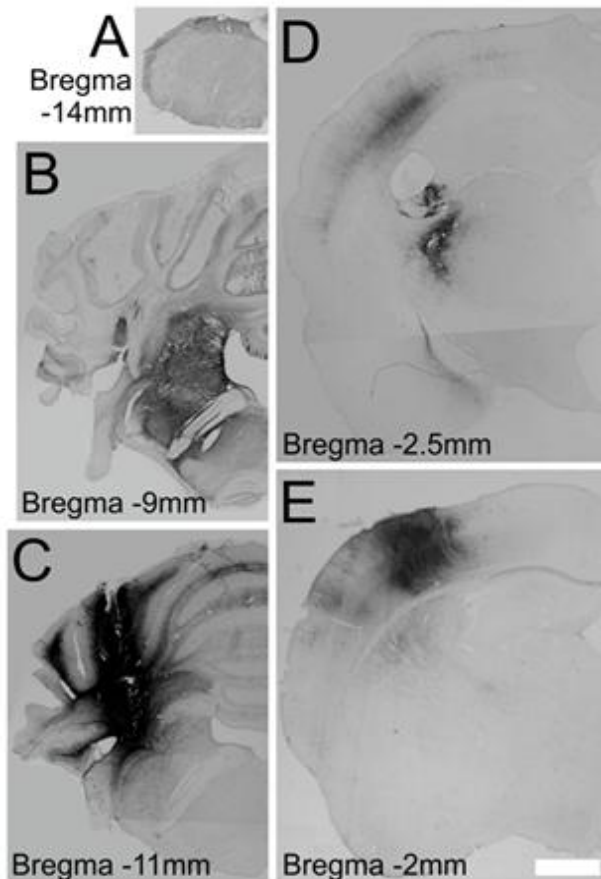
(8C) a myelinhüvellyel bíró axonokon belül is több esetben találtunk aggregán immunoreaktivitást (8G ábra).



8. ábra: A képeken a HAG7D4 immunoreaktivitás különböző előfordulási helyeit láthatjuk a patkány nucleus ventralis posteromedialisában. A: áttekintő kép a HAG7D4 immunoreaktivitásról a VPM diffúz mátrixában. B: az axonok myelinhüvellyel nélküli preterminalis szakaszainak csoportja jellemzően immunoreaktív mátrixszal borított. C: dendritikus részlet jelölt mátrixszal borítva (nyíl) az axodendritikus junctionál is (nyílhegy). A megszakított nyílhegyek a dendriten belüli immunoreaktivitást jelölik. D: Egy axodendritikus szinapszis lapos vezikulákkal a preszinaptikus oldalon, jelölt mátrixszal körülveve (nyilak). E: Egy nagy axonális végződéssel rendelkező elsődleges afferens ritka példája mely szintén immunoreaktív mátrixszal borított. F: vékony perineuronális háló egy sejttest körül, amelyben immunoreaktivitást találtunk (nyilak). G: Myelinhüvellyel borított axon, melyben szintén HAG7D4 pozitívitást detektáltunk (nyílhegy). Lépték= 2 μ m az A, C, F ábrán, 500 nm a B, D, E, G ábrákon.

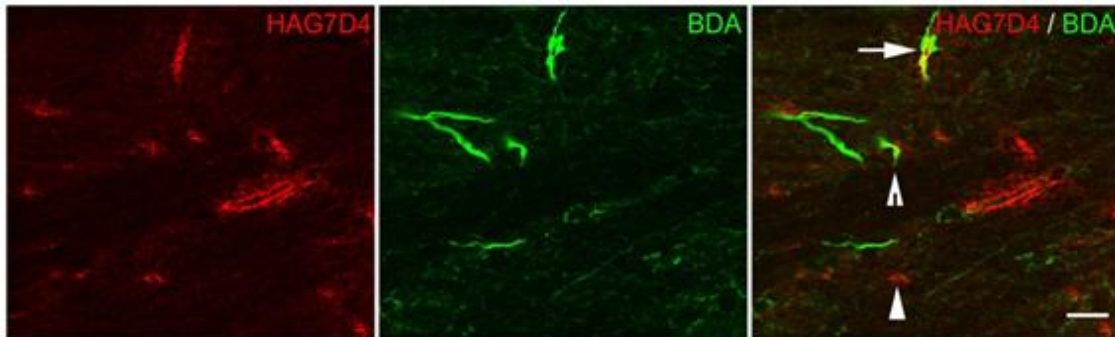
5.1.4. Anterográd pályakövetéssel kombinált HAG7D4 és HAG7D4/GAD immunhisztokémia

Miután elektronmikroszkóppal sikerült kimutatnunk immunoreaktív mátrixot boutonok körül, feltettük a kérdést, hogy honnan érkezhettek ezek a terminálisok. Mivel az immunoreaktív periaxonális hüvelyek leggyakrabban a talamusz ventrális magcsoportjában jelentek meg, azokat az agyterületeket, magokat injektáltunk anterográd pályakövető anyaggal (biotinilált dextrans aminnal), amelyek vagy a talamusz ezen területen elhelyezkedő motoros - nucleus ventralis anterior és ventralis lateralis (VA/VL) - magjaiba, vagy a szenzoros (VPL, VPM, PO) magjaiba projiciálnak. Ezzel igyekeztünk demonstrálni az axon végfácskák preterminális részeinek, valamint a végbunkóknak az extracelluláris mátrix molekuláihoz való sajátos viszonyát. Az injektált területek a következők voltak: a kisagy magok, a nucleus gracilis és cuneatus, a nervus trigeminus fő szenzoros magja (nucleus sensorius principalis nervi trigemini), a nucleus reticularis thalami, illetve a szenzoros kéreg (9. ábra).

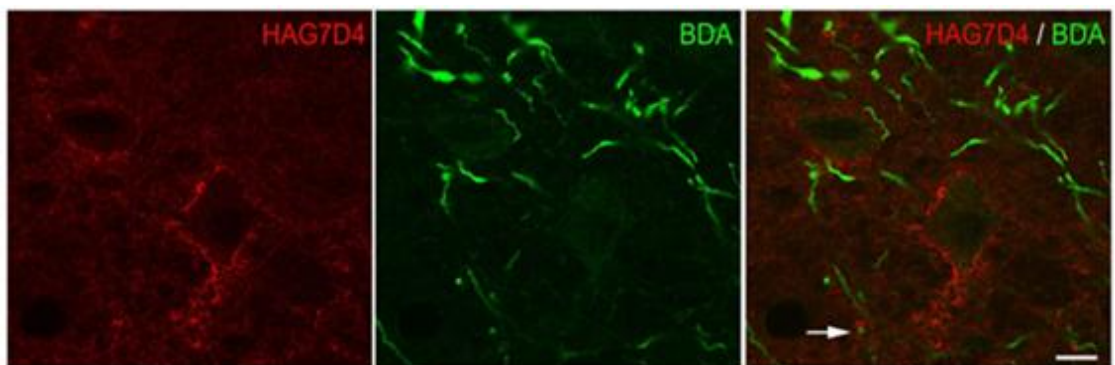


9. ábra: A képek a BDA beadási helyeit mutatják a patkány agyvelő megfelelő koronális metszetein. A: Nucleus gracilis és cuneatus B: Nucleus sensorius principalis nervi trigemini, C: Kisagy magok D: nucleus reticularis thalami E: barrel kéreg. Lépték= 1mm.

A kisagy magokból, főként a nucleus dentatusból a thalamusz VA/VL magjaiba felszálló rostok végződése körül több esetben azonosítottunk mátrixakkumulációt (10. ábra)



10. ábra: A patkány thalamusz nucleus ventralis anteriorja és lateralis HAG7D4- el halványan jelölődött extracelluláris mátrixszal bír. A kisagy magokból érkező anterográd pályakövetéssel jelölt végzések nagyrészt „csupaszon” maradtak. A nyíl egy extracelluláris mátrixszal körülvevő végződésre mutat. Lépték=10 µm.

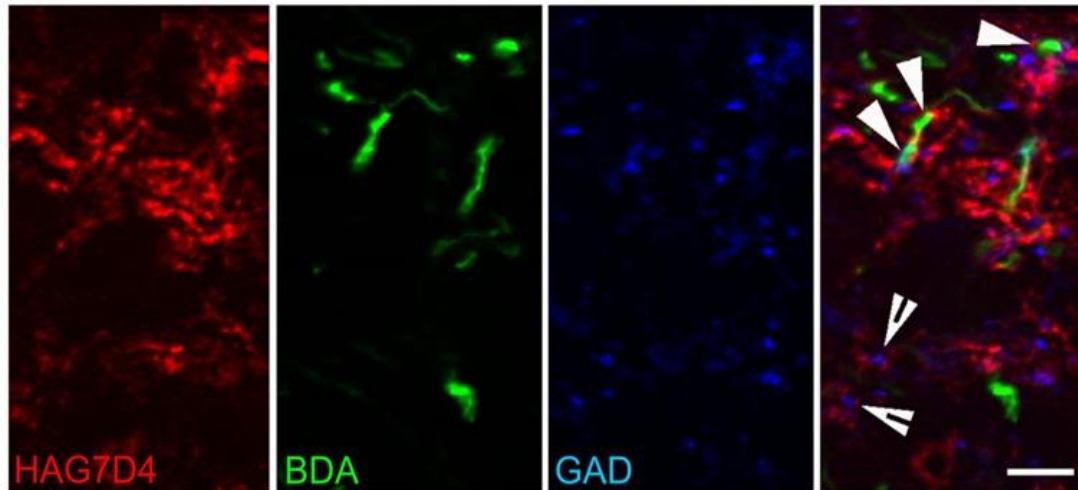


11. ábra: Példák a végzések körüli perineuronális hálókól független extracelluláris mátrixra a patkány nucleus ventralis posteromedialisában. A nyíl olyan helyre mutat, ahol több jelölt végződés esik egybe egy hosszabb HAG7D4- pozitív profillal, ami valószínűleg egy dendrit- részlet. A nyílhegy olyan kerekded képletre (valószínűleg periaxonális hüvelyre) mutat, amely független a jelölt végzésekétől, míg a megszakított nyílhegy olyan helyre mutat, ahol a jelölt végzések közvetlenül mátrix közelében helyezkednek el. Lépték=10 µm.

A nucleus gracilisből és a nucleus cuneatusból a VPL magba felszálló rostokat is csupán sporadikusan vette körül aggregátum-immunoreaktív mátrix. Hasonló megállapításra jutottunk a trigeminalis magból érkező boutonok esetében is (11. ábra). A nucleus reticularis thalamiból érkező, valamint a szomatoszenzoros kéregből leszálló apróbb terminálisok körül nem láttunk mátrixburkokat.

Hármas jelöléseink, melyeket HAG7D4 és GAD jelölésekkel kombinált anterográd pályakövetéssel végeztünk arra világítottak rá, hogy periaxonális hüvelyek mind az afferens végzések, mind GAD-immunoreaktív profilok körül megtalálhatóak (12. ábra). A GAD rövidítés a glutaminsav-dekarboxiláz enzimre utal, amely GABA-

erg gátló interneuronokban van jelen. Nagy számban találtunk a jelölt afferensektől és gátló végződésektől független periaxonális hüvelyeket is.



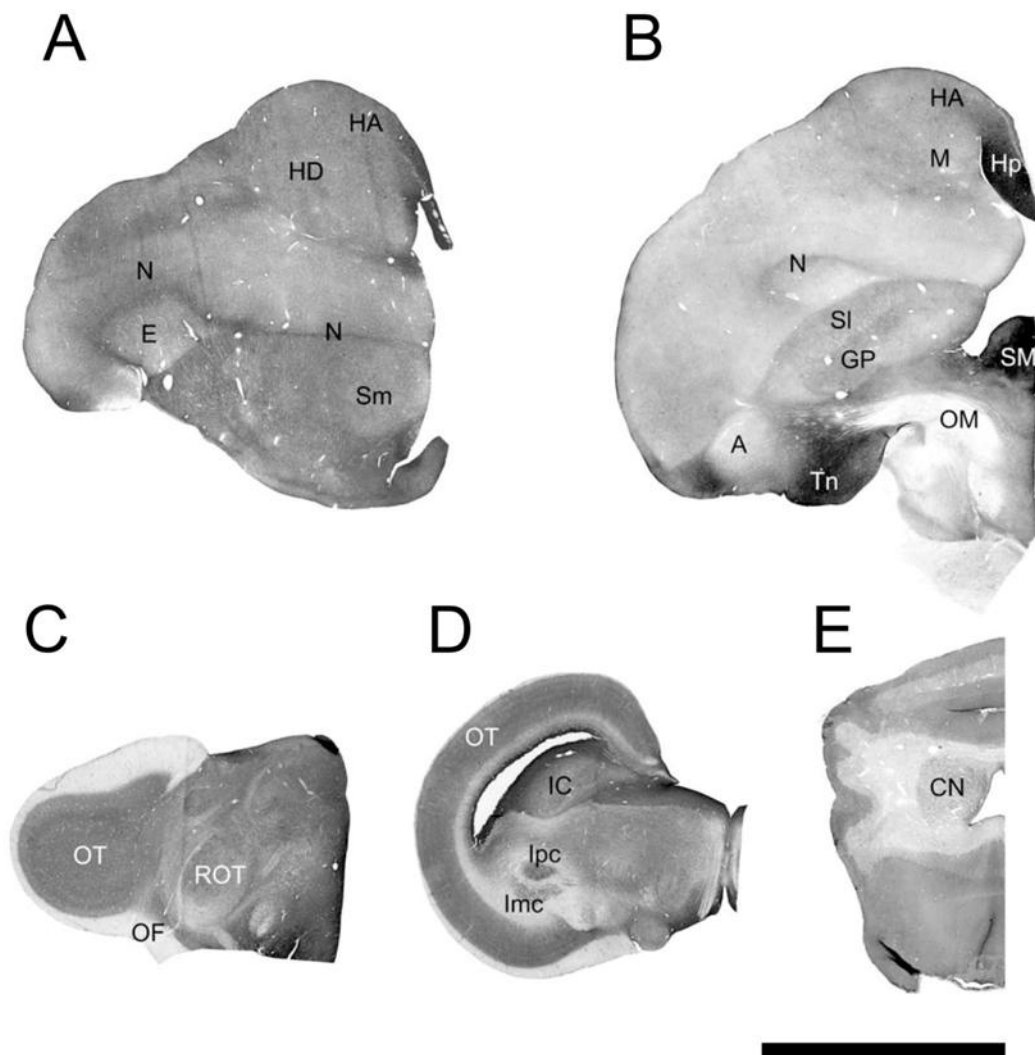
12. ábra: Patkány VPM- ben végzett hármas jelölés. A HAG7D4 immunoreaktív extracelluláris mátrix és az anterográd pályakövetéssel jelölt végzések a GAD- immunoreaktív profilokkal együtt láthatóak. A nyílhegyek olyan jelölt végzésekre mutatnak melyek HAG7D4 immunoreaktív mátrix közvetlen közelében helyezkednek el, míg a megszakított nyílhegyek mátrixszal borított GAD immunoreaktív végzéseket jelölnek. Lépték= 5 μ m.

5.2. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX MEGJELENÉSE ÉS SZERKEZETE CSIRKE ELŐAGYÁBAN

Ismert, hogy fészekhagyó madarakban az idegrendszer differenciálódása és a szinaptikus kapcsolatok kialakulása már a fejlődés korai szakaszában rendkívül gyorsan megtörténik. A házicsirkének kikelés után azonnal alkalmazkodnia kell környezetéhez, idegrendszerének fejlődése valószínűleg emiatt zajlik ekkora sebességgel (Tömböl 1988, 1995; Siskén és mtsai 1993). Ezzel ellentétben több vizsgált emlős faj agyvelejében jóval több idő, és emellett megfelelő mennyiségű afferens inger szükséges a mátrix kiépüléséhez a teljes fejlettség eléréséhez (Nakagawa és mtsai 1987, Yamamoto és mtsai 1988, Murakami és mtsai 1997, Brückner és mtsai 2000, Köppe és mtsai 1997, Kalb és Hockfield 1988, Guimaraes és mtsai 1990). Ezért voltunk kíváncsiak arra, hogy csirkében ez a rendkívül gyors fejlődés vajon függ-e a tojásból való kikelés után eltelt időtől vagy a bejövő inger intenzitásától?

5.2.1. Az extracelluláris mátrix felépítése csirke agyvelőben

Vizsgálatainkban a perineuronális hálók és a diffúzan kiterjedő extracelluláris mátrix megjelenésére koncentráltunk, amit legmegbízhatóbban a Cat-315 és az 1-B-5 antitestekkel, valamint lektinfestéssel tudtunk detektálni (13. ábra, 14. ábra, 6. táblázat). A Cat-315 és 1-B-5 immunoreaktivitás a különböző agyterületeken szinte ugyanolyan celluláris és regionális formában jelent meg. Ezt a mintázatot már az első postnatalis napon detektáltuk. Már ekkor jól láthatóak voltak a perineuronális hálók, egy szintén jól kivehető diffúz mátrixon belül (15. ábra). A 13 napos állatokban már jelentősen emelkedett jelintenzitást láttunk, de egészen tisztán és élesen kirajzolódó perineuronális hálókat csak felnőtt állatokban figyelhettünk meg (15. ábra). Jól elkülönülő lektin-jelölt (HAA, SBA, VVA vagy WFA) perineuronális hálókat csak a felnőtt állat közepagyában figyelhettünk meg (14. ábra). A festések összehasonlítását a 6. táblázatban részletezzük. A humán- és rágcsáló aggregán tengelyfehérje (core) proteint jelölő HAG7D4-el és AB1031 antitesttel kezelt metszeteken nem detektáltunk immunoreaktivitást.



13. ábra: Az extracelluláris mátrix regionális elrendeződése kifejlett csirke agyvelőben. Az extracelluláris mátrixot Cat315 aggregán tengelyfehérje elleni antitesttel jelöltük. Az immunoreaktivitást a nagyagy, a köztiagy, a középagy és kisagy számos területén megvizsgáltuk: A-E. (A) A hyperpallium apicale (HA), a hyperpallium densocellulare (HD), a nidopallium (N), a medialis striatum (Sm) erősen jelölődött, míg az entopallium (E) gyengébben. (B), A mesopallium (M), a striatum laterale (Sl), a nucleus taeniae (Tn), a nucleus septalis medialis (Sm), és globus pallidus (GP) erősebb immunopozitivitása jól elkülönül az arcopallium gyengébb szignáljától. (C) A legtöbb köztiagyi mag és a tectum opticum is erősen jelölődött (ROT = nucleus rotundus, OT = tectum opticum, OF = optikus rostok, OM= tractus optico-mesencephalicus). (D) Az iztmikus mag kis- és nagysejtes részei, valamint a colliculus inferior (IC) erőteljesebben kirajzolódtak. (E) A kisagyban a kisagyi magok (CN) valamint a stratum moleculare intenzív immunoreaktivitásával erős kontrasztban áll a gyengébben jelölődött granularis réteg. Lépték= 5 mm.

6. táblázat: A különböző jelölések régiók szerinti eloszlása kifejtett házi csirkében

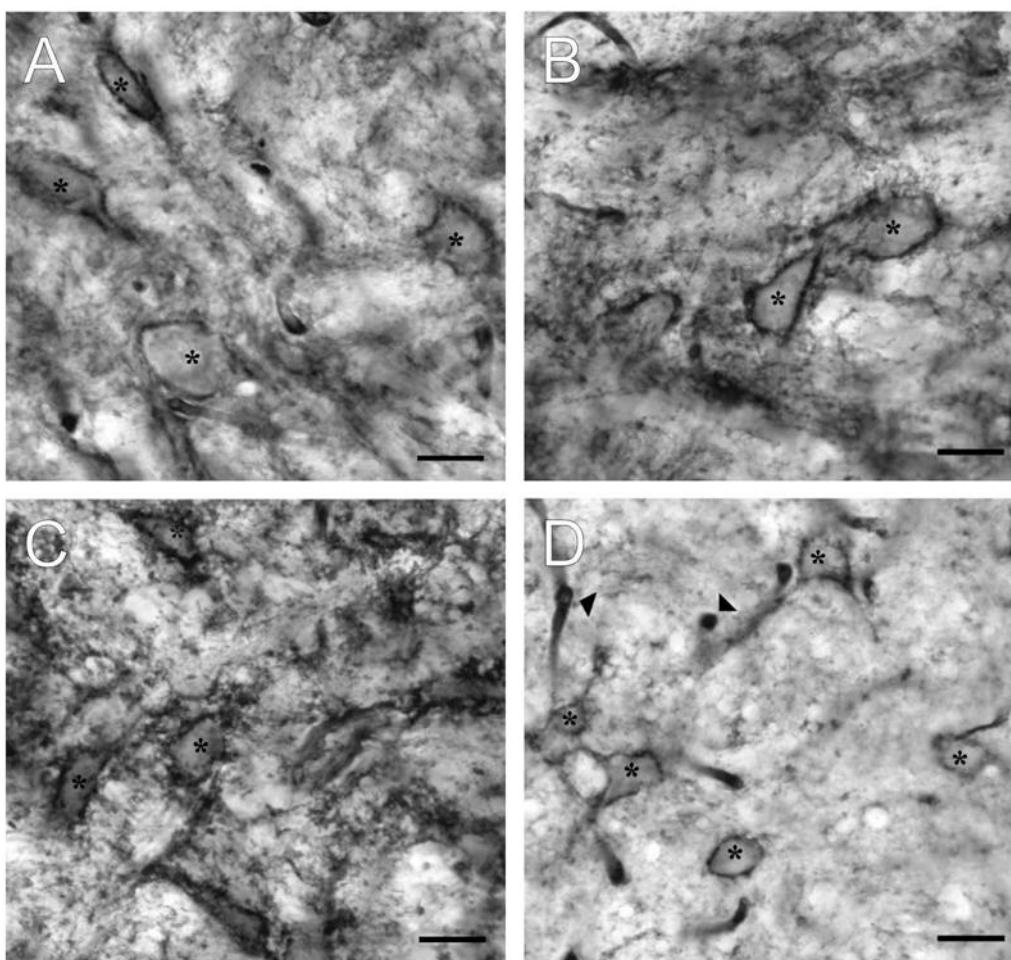
	Cat- 315	1- B- 5	CRTL- 1	Milyen lektinnel jelölődött?
Telencephalon régiói	++ ++++	- ++ ++++	- 0, +	0, + (HAA, SBA)
Köztiagy				
Nucleus rotundus, nucleus subrotundus	+++	+++	+++	0, + (HAA, SBA)
Középagy				
Nucleus isthmi, pars magnocellularis	++	++	++++	++++ (HAA, SBA, VVA)
Nucleus isthmi, pars parvocellularis	++++	++++	++++	++ (HAA, SBA, VVA)
Tectum opticum (10–11. réteg sejtjei)	++++	++++	++++	+++ (SBA)
Nucleus tegmenti pedunculopontinus	++	++	+++	+++ (WFA)
Nucleus pretectalis	++++	++++	++++	+ (HAA, SBA)
Nucleus subpretectalis	++	++	++++	+ (HAA, SBA)
Colliculus inferior	+++	+++	+++	+ (HAA, SBA)
Nucleus ruber	+++	+++	++	0
Kisagy				
Purkinje sejtek	+++	+++	+++	0
Stratum moleculare (csak a diffúz mátrix jelölődött)	+++	+++	++	0
Golgi sejtek	+	+	0	0
Kisagymagok	++++	++++	+++	0

A táblázatban alkalmazott nomenklatúra a 2004- es Avian Brain Nomenclature Forum- on meghatározott terminológiának felel meg. A mátrix jelölődésének intenzitását a következőképpen jeleztük: +++++, nagyon erős; ++++, erős; ++, közepes; + gyenge; 0 nincs.

a. A csirke középagya intenzív lektinreaktivitást mutat

A házi csirke előagyja meglehetősen gyengén jelölődött lektinokkal. Ezzel ellentétben a középagy jól elkülönülő területei, mint például az isztnikus mag nagysejtes része és kissejtes részei jól láthatóan jelölődtek HAA, SBA és VVA lektinokkal (14A,B,C ábra). A tectum opticum tizedik-tizenegyedik rétegeinek fuziform neuronjai szelektíven csak SBA-val jelölődtek (14D ábra). Az imént említett magok egyike sem mutatott ugyanakkor WFA-lektinreaktivitást, ez alól csak a nucleus tegmenti pedunculopontinus volt kivétel, az erre való magyarázat további kutatások témáját képezheti.

Számos területen megfigyeltük, hogy az idegrostok mentén a lektinreaktív extracelluláris mátrix kirajzolta a Ranvier- befűződések helyeit. Ez egybecsengett az emlősökben (oposszumban és macskában) leirtakkal (Brückner és mtsai 1993, Schweizer és mtsai 1993).



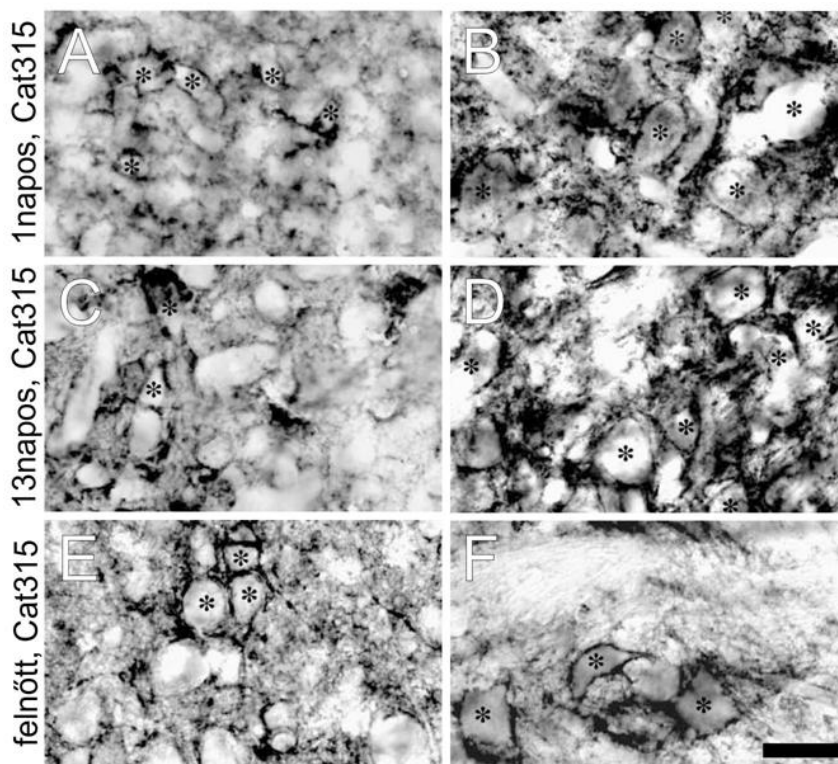
14. ábra: Lektinreaktív perineuronális hálók. A különböző növényi lektinek összehasonlítása a felnőtt házi csirke iztmikus magjában: (A) HAA, (B) SBA, (C) VVA. D kép: a tectum opticum 10- edik rétegének fuziform neuronjai körüli SBA aktivitás. A háromszögek erősen jelölődött erekre mutatnak. A fekete csillagok jól kivehető perineuronális hálóval körülvett sejtesteket jelölnek. Lépték = 30 μ m.

b. Az aggregán-immunoreaktivitás intenzitása az életkor előrehaladtával fokozódik

Mivel a Cat315-immunoreaktivitás a csirke agyvelő valamennyi területén megbízható mátrixjelölést adott, a különböző életkorokban ezt az antitestet használtuk a mátrix fejlődésének követésére, és ezzel a jelöléssel vizsgáltuk a telencephalon részeit.

A csirke előagy, középagya és kisagya egyenlőtlen Cat315 eloszlást mutatott (7. Táblázat, 13. ábra). A diffúzan eloszló mátrix az agyvelő minden területén jelölődött, viszont a területek között intenzitásbeli különbségeket fedeztünk fel (13. ábra). Azok az agyterületek melyek nagyon kevés sejtestet tartalmaznak gyakorlatilag immunoreaktivitást sem mutattak, vagy csak rendkívül keveset. Az egynapos állatok agyában nagyon halványan jelölődtek a perineuronális hálók, sok esetben szemcsés szerkezetet mutattak, vagy csupán foltokban fedték a sejtesteket (15A, B ábra). Az

immunoreaktivitás a 13 napos állatokban csak kicsit volt fokozottabb a P1 agyakhoz képest (15C, D ábra), és a különböző agyterületek megtartották a rájuk jellemző relatív jelölődési intenzitást. Egyedüli változást ebből a szempontból a hyperpallium apicale és densocellulare (hyperstriatum accessorium et dorsale) esetében tapasztaltunk. Az említett két terület a P13 agyakban egyforma intenzitással jelölődött, míg a P1 agyakban jól látható intenzitásbeli különbséget láttunk közöttük. Általában tehát elmondhatjuk, hogy P13 agyakban a perineuronális hálók sokkal karakteresebbek és teljesebbek voltak, valamint jobban elkülönültek a diffúz mátrixtól (15C,D ábra).



15. ábra: Cat-315 immunoreaktív perineuronális hálók a fejlődő és a felnőtt házicsirke agyvelőjében (A- F ábrák). Példák a telencephalonból (neostriatum intermedium) a bal oldali oszlopban, valamint a mesencephalonból (isztmikus mag nagysejtes része) a jobb oldali oszlopban. A metszetek 1 napos (A és B ábra), 13 napos (C és D ábra), valamint felnőtt állatokból készültek (E és F ábra). A fekete csillagok jól kivehető perineuronális hálókkal körülvevett sejttesteket jelölnek. Lépték= 20 μ m.

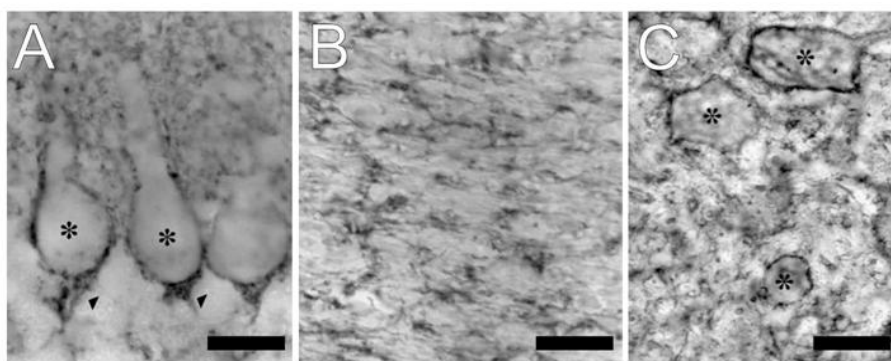
7. táblázat: A házicsirke különböző agyterületeinek mátrixintenzitása Cat-315 immunfestés után

Régió	1 napos	13 napos	Felnőtt
<i>Telencephalon</i>			
Hyperpallium apicale (Hyperstriatum accessorium)	+++	+++	++++
Hyperpallium densocellulare (Hyperstriatum dorsale)	++	+++	+++
Mesopallium (Hyperstriatum ventrale)	+++	+++	++++
Nidopallium frontale (Neostriatum frontale)	++	++	+++
Nidopallium intermedium (Neostriatum intermedium)	+++	+++	++++
Nidopallium caudale (Neostriatum caudale)	+++	+++	++++
Striatum mediale (Lobus parolfactorius)	+++	+++	++++
Entopallium (Ectostriatum centrale)	+	+	++
Perientopalliális öv (Ectostriatum periphericum)	+++	+++	++++
Striatum laterale (Palaeostriatum augmentatum)	+++	+++	++++
Globus pallidus (Paleostriatum primitivum)	+	+	++++
Arcopallium (Archistriatum)	++	++	+++
<i>Hippocampus</i>			
Nucleus septalis medialis	++	++	++++
Nucleus teniae	++	++	++++
<i>Köziagy</i>			
Nucleus rotundus (laterális része)	+++	+++	++++
Nucleus rotundus (mediális része)	++	++	+++
Nucleus triangularis	++	++	++
Nucleus dorsolaterális anterior (DLA)	++	++	+++
Nucleus dorsomedialis anterior (DMA)	++	++	+++
Nucleus dorsomedialis posterior (DMP)	+++	+++	+++
Nucleus geniculatus lateralis, pars ventralis (GLv)	+++	+++	+++
Nucleus geniculatus lateralis, pars dorsalis (GLd)	+++	+++	+++
<i>Középgagy</i>			
Tectum opticum (minden réteg)	+++	+++	++++
Nucleus praetectalis	++	++	++++
Nucleus subpretectalis	+	++	++
Nucleus ovoidalis	+	++	++
A bazális opticus gyökér magja (nBOR)	++	++	++
Nucleus isthmi, pars magnocellularis (Imc)	+	+++	++
Nucleus isthmi, pars parvocellularis (Ipc)	+++	+++	++++
Nucleus ruber	+	+++	+++
<i>Cerebellum</i>			
Purkinje sejtek	++	+++	++++
Stratum moleculare (csak a diffúz mátrix festődött)	++++	++++	++++
Golgi sejtek	0	0	+
Kisagymagok	+	++	+++
A táblázatban alkalmazott nómenklátúra a 2004- es Avian Brain Nomenclature Forum- on meghatározott terminológiának felel meg. A mátrix jelölésének intenzitását a következőképpen jeleztük: +++++, nagyon erős; +++, erős; ++, közepes; + gyenge; 0 nincs.			

A Cat-315 immunoreaktivitás a három éves kifejlett állatban jelentősen erősebb volt, mint a 13 napos állatban mind a sejtestek körül, mind a diffúzan eloszló mátrixot tekintve (15E, F ábra). Ugyanakkor a perineuronális hálók jobban elkülönültek, élesebben és kontrasztosabban látszódtak a köztük lévő diffúz mátrixhoz képest, mint a

P1 vagy P13 agyvelőkben. A perineuronális hálók leginkább a sejttest körül jelentek meg, és csak ritkán fordultak elő a dendritek proximális szakaszain (15E, F, 16A ábra). Ellentétben a korábban egérben, oposszumban vagy emberben tapasztaltakkal (Brückner és mtsai 1999, 2000, 2006), az axonok kezdeti szakaszai csak kivételes esetekben rendelkeztek mátrixburokkal a csirke elő- és középgagyában.

Az extracelluláris mátrix különböző fenotípusait a kisagyban különösen jól szemügyre vehettük. A Purkinje sejtek jól látható, sötét rajzolatú perineuronális hálókkal voltak körülvéve, így a pericelluláris kosarak helye is sok esetben láthatóvá vált (16A ábra). A felnőtt egyedekből készült metszeteken a Purkinje sejtek dendritjei is jól kivehetőek voltak az őket borító mátrix miatt. A Ranvier-befűződések helyeit számos esetben megfigyelhettük a fehérállományban az intenzív aggregáció-immunoreaktivitásuk miatt (16B ábra). A kisagymagok perineuronális hálói élesen elkülönülő profilokként mutatkoztak a perikarionok körül (16C ábra).



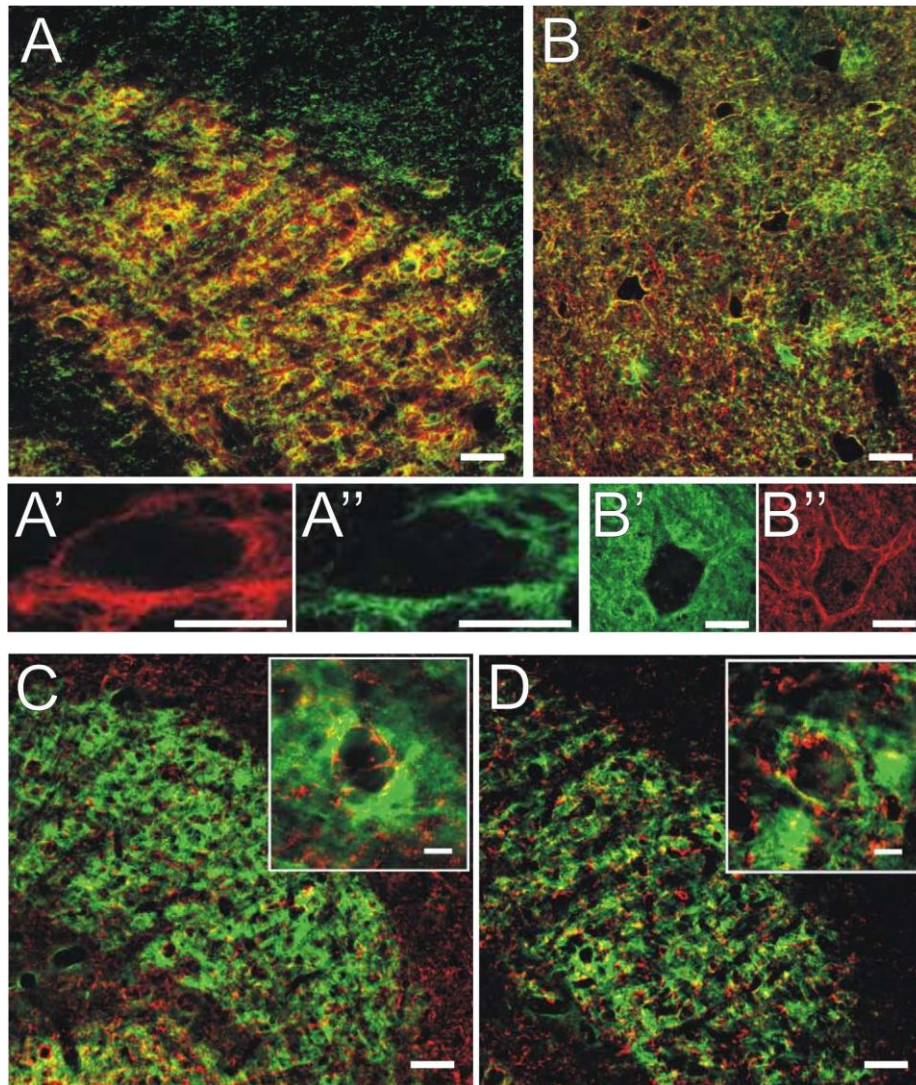
16. ábra: A csillagokkal jelölt Purkinje sejtek sejttestét (csillagok) és dendritjeit finom Cat-315 immunoreaktív perineuronális mátrix rajzolja körül kifejlett házicsírkében. A kosársejtek axonkollaterálisait szintén kirajzolja a jelölt mátrix (háromszögek). Cat-315 jelöléssel a Ranvier-befűződések is felismerhetők a fehérállományban (B ábra). B- HABP festéssel jelölt perineuronális hálók a kisagyi magok sejttestjei körül (csillagok a C ábrán). Lépték= 10 μ m.

c. A Cat-315 immunoreaktív perineuronális mátrix sok esetben kollokalizál a Kv3.1 β alegységgel rendelkező kálium csatornákkal, de nem vesz körül kolinerg és monoaminerg neuronokat

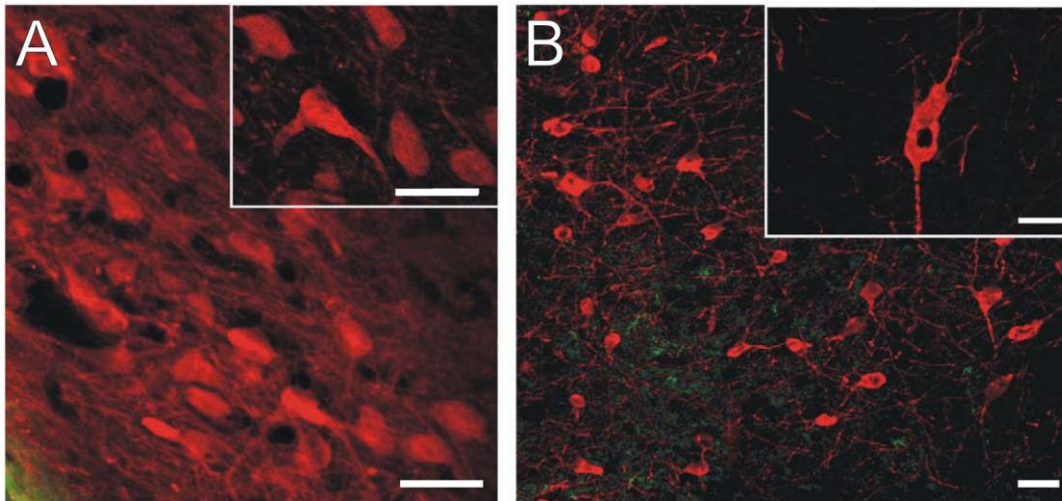
Kettős jelöléseinkben megmutattuk, hogy az iztmikus mag nagysejtes részében (Imc), illetve a tectum opticum 10. és 11. rétegében a Cat315-el jelölt perineuronális hálók kolokalizáltak a feszültségfüggő káliumcsatornákkal (17A ábra). Ezt a jelenséget már az egészen fiatal állatokban is megfigyelhettük (17C, D ábra). A Cat-315 immunoreaktív mintázat szinte teljesen egybeesett a B-HABP-vel jelölt területekkel. A

B-HABP mind a nagy-, mind a kis molekulatömegű hialuronsav láncokat jelöli (a hialuronsav molekulatömege 5000 és 20 millió Da között mozog, 17B ábra).

Ezzel ellentétben a ventralis pallidum kolin acetil-transzferáz-immunoreaktív kolinerg neuronjai (Li és Sakaguchi 1997) illetve az agytörzsi tirozin-hidroxiláz-immunoreaktív monoaminerg neuronok elkülönültek a Cat315-immunoreaktív profiloktól (18. ábra).



17. ábra: Kettős immunhisztokémiai jelölés, mellyel bemutatjuk a feszültségfüggő káliumcsatornák KV3.1 β alegységének (piros színnel) a Cat-315 immunoreaktivitással (zöld) való közvetlen egymás melleti viszonyát/kolokalizációját a házicsirke isztmikus magjának nagysejtes részében. A': a jelölt neuronok nagyobb nagyítással. A'' kép: ugyanazon neuron Cat-315 immunoreaktivitása. Cat-315 pozitív perineuronális hálók egybeestek a hialuronsavat jelölő B-HABP festéssel. B': Ugyanazon Cat-315 pozitív neuron B-HABP-vel jelölve (B'') C és D: Kettős jelölések, melyeken tanulmányozhatjuk a Cat-315 immunoreaktivitást (zöld) és a feszültségfüggő káliumcsatornák KV3.1 β alegységének (piros) kolokalizációját az isztmikus magban az egynapos (C), és a 13 napos (D) állatban. Léptékek=A, C, D: 50 μ m, B= 30 μ m az A', A'' és B', B'' képeken pedig 10 μ m.



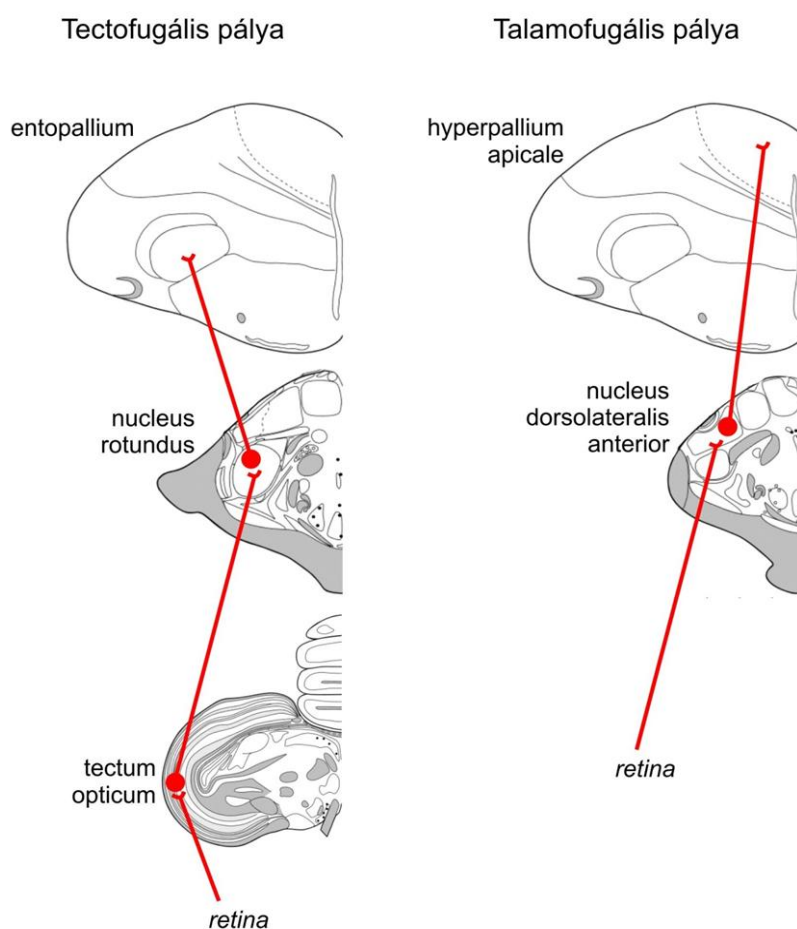
18. ábra: A házicsirkében a ventrális pallidum kolinerg (piros) neuronjai (A), valamint az agytörzs monoaminerg (piros) neuronjai (B) körül nem találtunk Cat-315 immunreaktivitást (zöld). Az inszertek olyan felvételeket mutatnak, ahol a kolinacetil-transzferáz (A) illetve tirozin-hidroxiláz immunjel háttérét visszaszorítottuk, hogy láthatóvá válhassanak finom rajzolatú perineuronális hálók (ilyet nem detektáltunk). Lépték = 20 μm , az inszertekben pedig 10 μm .

5.3. A KONDRITINSZULFÁT PROTEOGLIKÁNOK MEGJELENÉSE FÜGGETLEN A BEÉRKEZŐ INGERMENNYSÉGTŐL CSIRKE LÁTÓRENDSZERÉBEN

Vizsgált emlősökben, mint macskában és hörcsögben az extracelluláris mátrix kiépülése ingerfüggő folyamat, amit több szenzoros rendszerben is vizsgáltak, bizonyítottak (Kalb és Hockfield 1988, Guimaraes és mtsai 1990). Naposcsibékben az agyvelő neuronjai gyakorlatilag teljesen differenciáltak. Feltettük a kérdést, hogy együtt jár-e ez a neuronális fejlettség az őket körülvevő mátrix kialakulásával, vagy további specifikus afferens ingerek szükségesek ahhoz. Az afferens deprivációt a látórendszerben végeztük, melynek pályáit, felépítését célszerűnek látjuk eredményeink felsorolása előtt röviden ismertetni. A könnyebb megértés és olvashatóság megkönnyítése érdekében ezt ezen a helyen végezzük el, nem a bevezetés fejezetben.

Madarakban a vizuális információ két pályán, a tectofugális és talamofugális pályákon éri el az előagyat (19. ábra). A tectofugális pályán az opticus rostok a chiasma opticumban történt teljes kereszteződésük után jutnak el az ellenoldali tectum opticumba (Gamlin és mtsai 1988, Garey és mtsai 1991), innen az információ a köztiagyi nucleus rotundusba (Benowitz és mtsai 1976, Hodos és mtsai 1966, Ngo és mtsai 1992) majd az előagyi entopalliumba kerül (Egedi és Tömböl 1993). A tectalis jelátvitel finomhangolásában döntő szerepet játszanak az isztnikus magok, melyek

gátló afferenseket bocsátanak a tectum opticumba (Tömböl és mtsai 2005). Jóval kevesebb opticus rost veszi az irányt a talamofugális pálya felé, melyek a köztiagyi nucleus dorsolateralis anteriorban való átkapcsolás után kerülnek az előagyi hyperpallium apicaleba (Edinger és mtsai 1899, Miceli és mtsai 1990). Figyelmünket két okból is a tectofugális pályára koncentráltuk: e pálya állomásain a perineuronális mátrix biztonsággal, morfológiailag jól differenciálható, másrészt ezen a pályán halad a látórostok túlnyomó része.



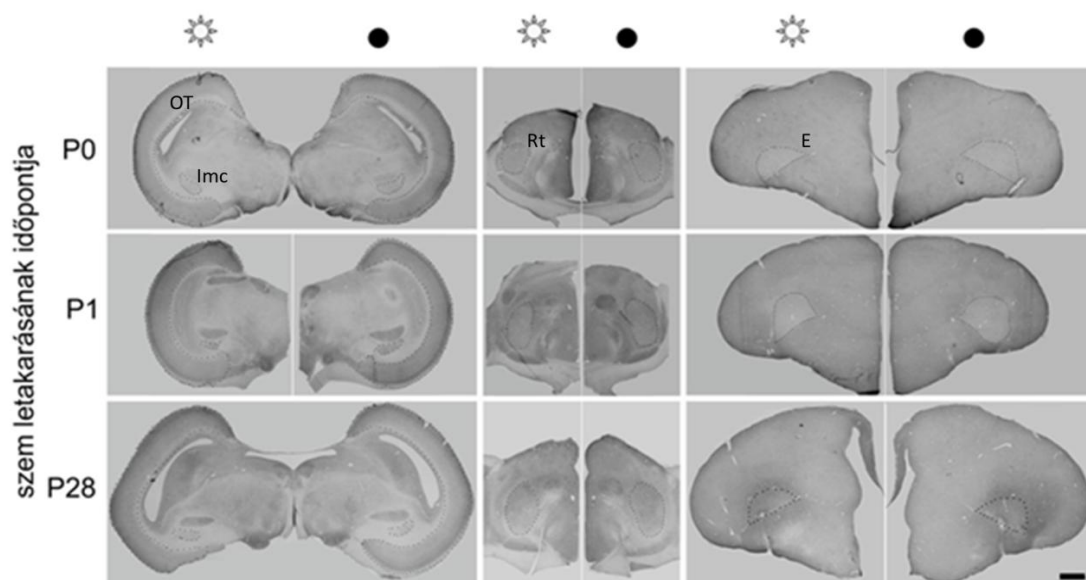
Forrás: <http://avianbrain.org/atlas.html>, módosítva

19. ábra: A házicsirke tectofugális és talamofugális pályája.

Az extracelluláris mátrix megjelenésének jellemzőit mindhárom, a módszerek fejezetben említett házi csirke csoportban megvizsgáltuk. A teljesség kedvéért ezt a három csoportot ismét leíránk: az első csoportban a frissen kikelt csibéket, a másodikban 1 napos csibéket, a harmadikban egyhetes csirkéknek fedtük le egyik

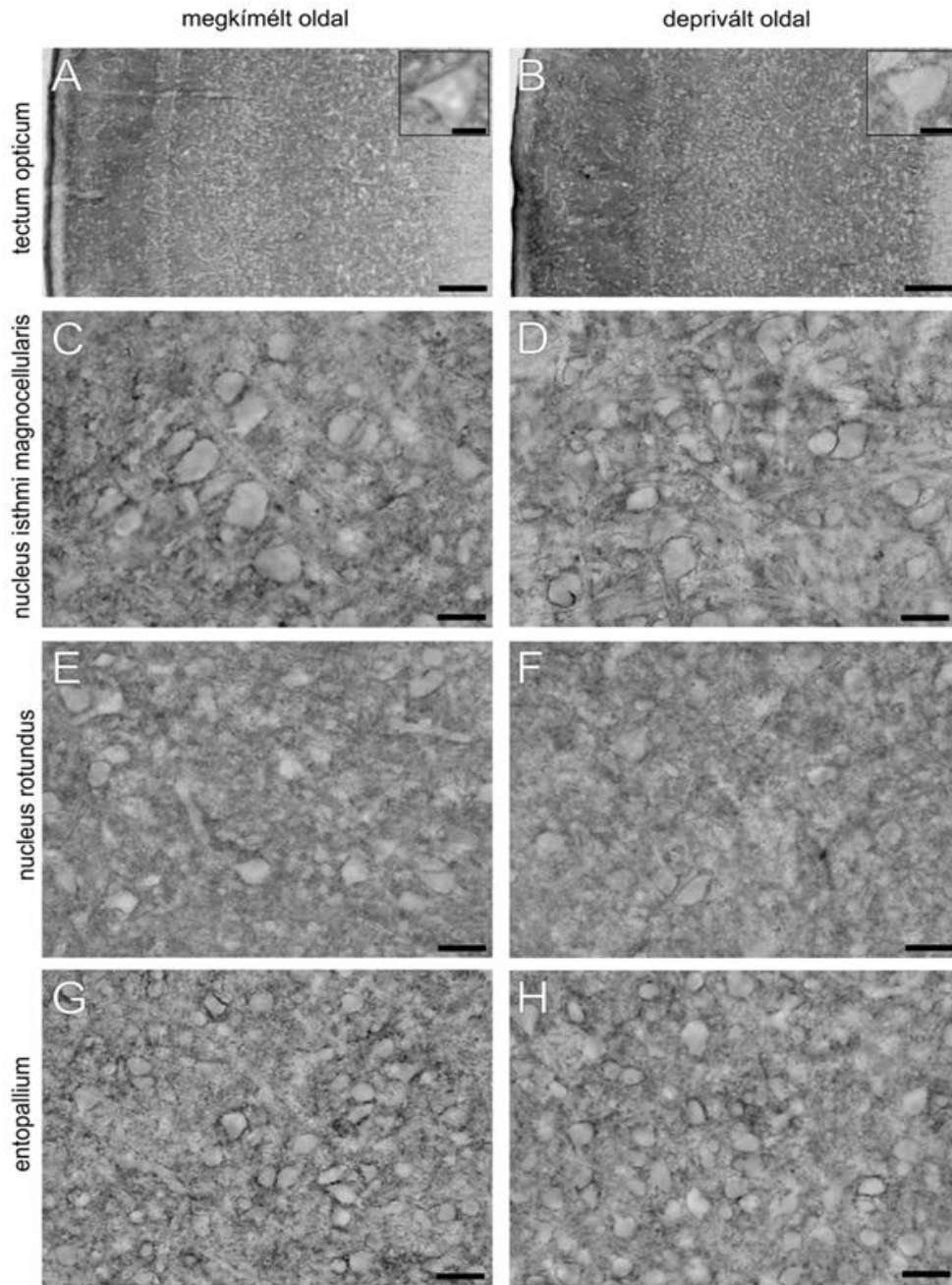
szemüket, majd három héttel később vizsgáltuk meg kezelésünk hatását. Mindhárom csoportban leírtuk a mátrix jellemzőit a következő területeken: a közepagygi tectum opticumban és nucleus isthmi pars magnocellularisban (Imc, a tectum opticum legfőbb modulátor neuroncsoportját tartalmazza), a köztiagy nucleus rotundusában, valamint az entopalliumban. Mivel a házi csirke látópályája a chiasma opticumban csaknem száz százalékban kereszteződik, a letakart szemmel ellentétes oldali (kontralaterális) agyterületeket, mint deprivált oldalt hasonlítottuk össze a megkímélt oldallal. A perineuronális halókat és a diffúzan eloszló mátrix hátteret aggregán tengelyfehérje- (Cat-315) és link-protein ellen termelt (CRTL-1) antitestekkel jelenítettük meg. A diffúz mátrix az előbbi antitesttel jelölve különös részletességgel jelent meg.

Az extracelluláris mátrix afferens depriváció utáni változásait két ábrán ismertetjük. A 20. ábrán a különböző életkorban lefedett szemű állatokból nyert mintákat mutatjuk CRTL-1 festéssel, három héttel a beavatkozás után. Láthatjuk, hogyan néz ki kis nagyítással a vizsgált régiókban megjelenő CRTL-1 immunoreaktivitás a deprivált és a megkímélt oldalon a látópálya állomásain. A képeken szembeűnő, hogy a mátrix immunoreaktivitásában gyakorlatilag nem volt számottevő különbség a két oldal között.



20. ábra: A csirke tectofugális pályarendszerének állomásain- a közepagyban (bal oldalon), a köztiagyban (középen) és a telencephalonban (jobb oldalt)- a diffúz mátrix CRTL- immunorekatívásában nem különbözik a megkímélt és a deprivált oldal. Az állatok itt három hétig éltek túl a szemletakarástól számítva. A vizsgált területeket a nulla napos állatokból származó képeken egy- egy féltekében vékony vonallal körülrajzoltuk. Rövidítések: tectum opticum- OT, nucleus isztmikus nagysejtes része – Imc, nucleus rotundus- Rt. Lépték: 1 mm. Az állatok perfúziója 3 héttel a szemletakarás után történt.

A 21. ábrán nagy nagyítással mutatjuk be a tecto- és talamofugalis pálya extracelluláris mátrixának felépítését azokban az állatokban, melyek szemét rögtön kikelésük után lefedtünk (ezek a tojások sötétben nevelkedtek, az állatok sötétben keltek ki).



21. ábra: A metszetek 21 napos csirkékből készültek, melyeknél kikelés után rögtön elvégeztük az egyik oldali szem letakarását. A Cat-315 immunoreaktivitás azt mutatja, hogy a perineuronális hálók mindenhol egyformán érett formában vannak jelen a tectofugalis rendszer vizsgált területein, mint a tectum opticum, az isthmikus mag nagysejtes része, a nucleus rotundus és az entopallium. A kisebb képek a két felső sarokban a tectum opticum perineuronális hálóit ábrázolják a 10/11. rétegben. A lépték a tectum opticumban 80 μ m, az inszertekben 10 μ m, az Imc-ben, a nucleus rotundusban és az entopalliumban 20 μ m.

A Cat-315 ellenanyagot használva intenzíven festődött, jól kivehető perineuronális hálókat találtunk mind a deprivált, mind a megkímélt oldalon, a tectum opticumban, a nucleus isthmi pars magnocellularisban, a nucleus rotundusban és az entopalliumban (21. ábra).

Az antitestekkel jelölt diffúz mátrix mindkét esetben erősen festődött, mind a megkímélt, mind a letakart oldalon gyakorlatilag ugyanolyan mértékben. Nagyon enyhe intenzitásbeli különbségeket csupán elvétve tapasztaltunk a megkímélt, illetve a letakart szem oldalán. Ez a hasonlóság a különböző életkorokban készült metszetekre is jellemző volt, mind a diffúz mátrixot, mind a perineuronális hálókat tekintve (20. ábra). Minden vizsgált régióban, tehát a tectum opticumban, az isztmikus mag nagysejtes részében, a nucleus rotundusban és az entopalliumban a CRTL-1 és a Cat-315-el jelölt mátrix immunoreaktivitása mind a letakart szem oldalán, mind a megkímélt oldalon szinte egyforma mintázattal rendelkezett (20-21. ábrák).

A tectum opticumban, különösen a 10. és 11. rétegben jól felismerhető perineuronális hálókat láthattunk amellet, hogy a diffúz mátrix szintén erősen jelölődött (21A,B ábra). A nucleus isthmi pars magnocellularisban a diffúz mátrixot illetően mást tapasztaltunk, ez jóval gyengébben festődött, míg jól kivehető perineuronális hálókat találtunk a nagyméretű sejttestek körül (21C,D ábra). A nucleus rotundus perineuronális hálói halványabbak voltak, de mindkét oldalon tisztán ábrázolódtak (21E,F ábra). Végül az entopallium extracelluláris mátrixa mindkét féltékében szinte teljesen hasonló festődéssel jelent meg (21G, H ábra). Itt találtuk a legjobban kivehető perineuronális hálókat. Készítményeinkre jellemző, hogy a Cat315 pozitivitás leginkább a sejttest körül jelent meg, a dendritek proximális szakaszain halványabb, finomabb mátrixállományt találtunk. Ez eltér attól a megfigyeléstől, melyet Brückner és munkatársai emlősökben leírtak (Brückner és mtsai 1996b).

A nulla órás, tehát a tojásból frissen kikelt állatokhoz hasonlóan, egynapos és 28 napos állatokon is végeztünk unilaterális fénydeprivációt, extracelluláris mátrixukat hasonlóan három héttel később vizsgáltuk. Ezen idősebb állatok egyik populációjában sem találtunk fenotípusos eltérést a talamo- vagy a tectofugalis pályák kapcsolóállomásain (20. ábra). A diffúz mátrix szerkezete, sűrűsége, valamint a perineuronális hálók felépítése szintén egyforma volt mind a letakart, mind a megkímélt szem oldalán minden vizsgált régióban.

Összegezve, a látópálya minden vizsgált állomásán mindkét oldalon megegyező immunhisztokémiai megfigyeléseket tettünk, különbséget az egyes életkorokban készült metszetek intenzitásában sem találtunk a deprivált és megkímélt oldalak között. Ez az eredmény teljesen eltér attól a ingerfüggő mátrixfejlődéstől, melyet az eddig vizsgált emlősöknél (macska, patkány, hörcsög) már több szenzoros rendszerben bizonyítottak (Kalb és Hockfield 1988, Guimaraes és mtsai 1990, Brückner és mtsai 1996b).

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX A KÖZPONTI IDEGRENSZERI PLASZTICITÁS NÉLKÜLÖZHETETLEN RÉSZTVEVŐJE

Egészen 1971-ig szinte teljesen figyelmen kívül hagyták a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix létezését (Tani és Ametani 1971). Az utolsó négy évtized robbanásszerű fejlődést hozott a téma kutatásában: szerteágazó funkciókat kezdtek tulajdonítani ennek az eddig tulajdonképpen tagadott központi idegrendszeri szereplőnek. Az extracelluláris mátrix pontos funkciójának felderítése meglehetősen hosszú és lassú folyamat, hiszen ez a számos alkotóelemből álló rendszer rendkívüli komplexitással bír. Az egyes extracelluláris mátrix komponensek és a különböző sejtes folyamatok, mint a sejtosztódás (Stipp és mtsai 1994), a migráció (Franco és Müller 2011), az axonnövekedés (Lakatosova és Ostatnikova 2012), és a szinapszisok kialakulása közti kapcsolat (Pyka és mtsai 2011) már számos kísérletben bizonyított.

Munkánk a perineuronális extracelluláris mátrix plasztikus aspektusait vizsgálta több szempontból és kérdéssel, különböző fajokban. Első kérdéskörünk arra irányult, hogy a projekciós kapcsolatban lévő, különböző plaszticitású köztiagyi-kérgi területek hasonló mátrixmintázatot mutatnak-e patkányban. Továbbá megvizsgáltuk, hogyan fejlődik a perineuronális mátrix olyan gerincesben, háziacsirkében, amelynek központi idegrendszere világra jövetelével csaknem teljes funkcionális és anatómiai érettséget mutat. Következő lépésben pedig arra kerestük a választ, függ-e ez a specifikus afferens inger meglététől. Ezt a két kérdést azért tettük fel, mert a klasszikus emlős kísérleti állatokban, így egerekben és patkányokban a perineuronális mátrix kiépülése a differenciált idegrendszerben ingerfüggően jelenik meg.

6.2. KÖZTIAGYI MÁTRIXMINTÁZAT A KÉRGI MÁTRIXMINTÁZAT FÜGGVÉNYÉBEN

Ismert, hogy az extracelluláris mátrix eloszlása a központi idegrendszerben nem homogén, hanem az adott régió funkcionális tulajdonságaitól függ (Brückner és mtsai 1996a,b, 1999, 2008). Ezen tanulmányok leginkább a perineuronális hálók megjelenésének gyakoriságát vizsgálták. Kimutatták, hogy az elsődleges szenzoros és motoros kéreg jóval nagyobb számban tartalmaz perineuronális hálókat, mint a másodlagos- vagy asszociációs kérgi területek, illetve mint azon régiók, melyek plasztikus tulajdonságaikról ismertek (Hockfield és McKay 1983, Hendry és mtsai 1988, McGuire és mtsai 1989, Hausen és mtsai 1996, Brückner és mtsai 1999, 2008).

A talamusz az utolsó kapcsolóállomás a kéregbe tartó afferensek számára, emiatt merült fel bennünk, hogy a talamuszmagok mátrixfelépítésében tükröződik az általuk képviselt kérgi mező mátrixszerkezete. Jelen vizsgálatunkban szeretnénk volna megmutatni az összefüggést a mátrix felépítése és az adott talamikus régió plasztikus tulajdonságai között. A talamuszmagok három nagy csoportját vetettük vizsgálat alá: megvizsgáltuk az elsődleges szenzoros és motoros kapcsoló magokat, az asszociációs magokat, és a nemspecifikus retikularis és intralamináris magokat.

A széles körben alkalmazott lektin- és aggregán tengelyfehérje jelölést használva az extracelluláris mátrix halványan festődő diffúz állományként jelent meg a patkány talamuszában. Ebben az amorf állományban jól körülírt perineuronális hálókat csak ritkán tudtunk azonosítani, a mátrix általánosságban csupán halvány, amorf intercelluláris állományként jelent meg, mely körülrajzolta a neuronok helyét. A számos kérgi- és agytörzsi mintázattal ellentétben az extracelluláris mátrix egy más, jellegzetes szerveződést mutatott: nagy számban találtunk periaxonális hüvelyeket, melyekről Brückner és munkatársai számoltak be először (Brückner és mtsai 2008). Ezek a struktúrák a patkány talamikus magjaiban 2-7 fős csoportokban, csokrokat alkotva jelentek meg.

Az asszociációs magokban az extracelluláris mátrix különösen gyengén jelölődött. A mediodorzális magban (MD) gyakorlatilag alig találtunk immunoreaktív állományt, csakúgy, mint az elülső, valamint az oldalsó talamuszmagokban. Ezen magok limbikus magokként ismertek a ventrális előagyi (Groenewegen 1988, Kuroda és

Price 1991, Ray és Prince 1992), valamint hippocampalis (Swanson és Cowan 1977, Sikes és mtsai 1977, Seki és Zyo 1984, Shibata 1992) kapcsolataik miatt, és itt kapcsolódnak át a limbikus rendszer szenzoros afferensei is (Thomson és Robertson 1987). Az asszociációs talamusz magokban észlelt gyenge mátrixreaktivitás utalhat ezek plasztikus tulajdonságaira, hiszen a célpontjaik is olyan limbikus struktúrák, melyek jellemzően plasztikusak (Barbas 1995, Sapolsky 2003).

A principális relémagok szintén alacsony mátrixreaktivitást mutattak, viszont itt lényeges eltéréseket tapasztaltunk az asszociációs magokhoz képest. Amellett, hogy e magokban a diffúz- és perineuronális mátrixreaktivitás is valamivel fokozottabb, gyakran láttunk periaxonális hüvelyeket a nucleus ventromedialis, ventrolateralis, valamint a nucleus ventralis posterolateralis, és -posteromedialis magokban. A szenzoros magokban talált perineuronális hálók szinte alig kivehetőek, a periaxonális hüvelyek viszont igen gyakoriak voltak. Különösen gyakran talákoztunk ezekkel a struktúrákkal a VPL és VPM magokban, a hátsó magcsoportban (PO) már ritkábban bukkantak fel.

A periaxonális hüvelyek jelenléte feltételezéseink szerint összefügg a vizsgált régiók funkcionális tulajdonságaival, hiszen a VPM és a VPL a legszigorúbb szomatotópia szerint szerveződött kapcsolómagok az agyban. A PO, mivel többféle modalitást továbbít a szenzoros és motoros magok felől, magjai komplexebb stimulusoknak vannak kitéve (LeDoux és mtsai 1987). A PO tehát plasztikusabb helyről kap információt, ezzel pedig jól korrelál a kevésbé kiépített mátrixhálózatával.

A specifikus érzőmagok mátrixreaktivitásával kapcsolatban elletmondásos eredményeink születtek. A hallószervből érkező direkt afferensek átkapcsolásáért felelős mag, a nucleus geniculatus medialis ventrális része hasonlóan a szomatoszenzoros rendszer magjaihoz (VPL, VPM) erősen immunoreaktív mátrixszal rendelkezik. A nucleus geniculatus ventralis dorsalis részében ugyanakkor immunoreaktív mátrixot szinte egyáltalán nem találtunk, pedig ez szigorúan rendszerezett retinotópiával rendelkezik a primér vizuális kéreg felé. Erre a jelenségre nem találtunk magyarázatot.

A GABA-erg gátló neuronok ismertek arról, hogy perineuronális hálót termelnek maguk köré. Különösen jellemző ez azokra a gyorstüzelő idegsejtekre, melyek nagy mennyiségben tartalmazzák a parvalbumin nevű kalciumkötő fehérjét. A mátrix ritkább

megjelenése az asszociációs és principális relémagokban ezért összefüggésbe hozható a GABA-erg interneuronok ritka előfordulásával, hiányával is (Ohara és mtsai 1983, Harris és Hendrickson 1987). A corpus geniculatum laterale dorzális részében megfigyelt teljes mátrixhiányra pedig az szolgálhat magyarázattal, hogy az itt lévő GABA-erg interneuronok (Ohara és mtsai 1983) nem expresszálják a parvalbumin kalciumkötő fehérjét (Lüth és mtsai 1993). Kísérleteinkben az is kiderült, hogy a perineuronális hálók jelenléte nem függ kizárólagosan a parvalbumin immunoreaktivitástól, hiszen a parvalbumint nem expresszáló talamuszmagokban is találtunk immunoreaktív hálókat, még ha csak kisebb mennyiségben is. A nucleus reticularisban viszont intenzív immunoreaktivitást találtunk a parvalbumin-pozitív interneuronok körül, ami egybecseng a perineuronális hálók jellegzetes előfordulási preferenciájával (Härtig és mtsai 1992).

A patkány talamuszban végzett vizsgálatainkban különös figyelmet fordítottunk a periaxonális hüvelyekre. Méretük, alakjuk, és jellegzetes csoportos megjelenésük alapján arra következtetünk, hogy ezek idegvégződéseket, axonterminálisokat és preterminális axonszakaszokat körülölelő mátrixakkumulációk. Brückner és munkatársai hasonló struktúrákat találtak humán agyvelőben (Brückner és mtsai 2008). Ezen eredményeinket elektronmikroszkópos vizsgálatokkal erősítettük meg: mátrixakkumulációt valóban találtunk az axonok végződése körül, perineuronális hálót nélkülöző sejtek felszínén. Szinte csak kisméretű szinapszisok körül találtunk immunoreaktív mátrixot, a nagyméretű specifikus afferensek közvetlen környezete nagyrészt aggregán-mentes maradt. Következő lépésben ezért arra kerestük a választ, hogy más specifikus vagy nonspecifikus afferensek mely csoportja(i) burkoltak periaxonális aggregán mátrixhüvelyekkel. Ezért anterográd pályakövetéssel kombinált többszörös immunjelöléssel megvizsgáltuk a kisméretű kortikotalamikus végződéseket, és a gátló szinapszisokat körülvevő mátrixállományt. Úgy találtuk, hogy kortikotalamikus végzések nem, míg gátló végzések több esetben aggregán-burokban nyugodtak. Mivel a periaxonális hüvelyek leggyakrabban a talamusz ventrobazalis komplexében jelentek meg, *in vivo* anterográd pályakövetés segítségével láthatóvá tettük az ide tartó afferens rostokat. A specifikus afferens végzések (lemniscus medialis, trigeminotalamikus vagy cerebellotalamikus afferensek) körül ezzel a megközelítéssel mérsékelt számban találtunk jelölt mátrixot. Ez nem volt

meglepő eredmény annak fényében, hogy a specifikus afferensek nagyobb méretűek, mint az azonos területen talált periaxonális hüvelyek.

Brückner és munkatársai 1999-es munkájukban arra a megfigyelésre jutottak, hogy a kevésbé plasztikus területek nagyobb sűrűségben tartalmaznak perineuronális hálókat, és az általános mátrix reaktivitás is kifejezettebb. Ennek alapján következtettünk arra, hogy az aggregán-immunoreaktív mátrix jelenléte, felépítése a patkány talamusz magjaiban összhangban van a vele kapcsolatban álló kérgi régió mátrixmintázatától, annak plaszticitását visszatükrözheti. Az extracelluláris mátrix molekulái ritkán állnak össze perineuronális hálókka a patkány talamuszában, viszont kiterjedt mátrixként szinte mindenütt jelen vannak. Jellemzően az axonok myelinhüvely nélküli, preterminalis szakaszai, axodenderitikus junkciók, és néhány gátló terminális körül találtunk mátrixfelhalmozódást. Mivel elektronmikroszkópos vizsgálataink során több esetben láttunk terminálisokat borító mátrixreaktivitást perineuronális hálót nélkülöző sejtek felszínén, valamint axonokon belül is, így feltételezzük, hogy az aggregán termeléséért mind a prae- mind a postszinaptikus sejt felelős.

6.3. A HÁZICSIRKE, MINT A FEJLETT IDEGREDSZERREL SZÜLETETT GERINCES ÁLLAT MODELLJE

Immunhisztokémiai és lektinhisztokémiai vizsgálatok megmutatták, hogy a perineuronális hálók az agytörzsben egészen hét napos korig, a cortexben pedig 14 napos korig nem fejlődnek ki egérben (Nakagawa és mtsai 1987, Yamamoto és mtsai 1988, Murakami és mtsai 1997, Brückner és mtsai 2000) és patkányban (Köppe és mtsai 1997b). A vizsgált emlős fajokban az előbb leírt életkorok után megjelent kezdetleges perineuronális hálók is igen halványan jelölődtek, alig lehetett elkülöníteni őket a környező mátrixtól, végleges formájukat pedig csak hetekkel később érték el (Brückner és mtsai 2000). Ismert, hogy patkány cortexében az idegsejtek dendritfája három hetes életkorra fejlődik ki teljesen (Wise és mtsai 1979, Juraska 1982, Miller 1981), amikor az elsődleges szinaptogenesis már kiteljesedett (Payne és mtsai 1988, De Felipe és mtsai 1997). Ezek szerint ezekben a rágsálókban tapasztalt viszonylag késői mátrixfejlődés összefüggésbe hozható a mátrix szinapszisok fejlődésében betöltött gátló-szabályozó

szerepével, tehát az agy funkcionális érettségének elérésében betöltött funkciójával (Dityatev és Schachner 2003).

Munkánkban részletes leírást adtunk a perineuronális hálók fejlődéséről a házi csirke agyában különböző életkorokban. Célunk az volt, hogy olyan állatban vizsgáljuk meg a mátrix fejlődését, melyben az idegrendszer érése rendkívül gyors ütemben zajlik. A fészekhagyó madarak -mint a házi csirke- neuronjai már rögtön a kikelés után szinte maximális érettséget mutatnak. A neuronok dendritfája ekkora már maximális fejlettséget mutat, a dendrittüskék száma igen magas, bár a felnőtt állatokra jellemző szintet még nem éri el (Tömböl 1988, 1995). Ez valószínűleg azért történik így, mert a házi csirkék fészekhagyó életmódja azonnali funkcionális érettséget követel (Corner és Bakhuis 1969, Lippe 1995, Rogers 1993).

Vizsgálataink szerint a csirke agyvelőjének neuronjai körüli mátrixburok már az első postnatalis napon jelen van. A perineuronális hálók e korai formáinak többsége igen halvány, finom rajzolatú. Emellett számos területen már szinte teljesen érett fenotípusú perineuronális hálókat is megfigyelhetünk.

A patkányhoz hasonlóan (Brückner és mtsai 2000) a csirkeagyban detektált extracelluláris mátrixmolekulák diffúzan infiltrálják az agyszövet egészét, mielőtt még a perineuronális hálók fejlődése befejeződne. A mátrix molekuláinak általános eloszlása az első két hét során nem változik számottevően, de a perineuronális hálók körülirtabbá, karakteresebbé válnak ez idő alatt, a sejtek körvonalait is élesebben rajzolják ki. Ebből arra következtetünk, hogy idővel a mátrixmolekulák sejttest körüli akkumulációja fokozódik. Ennek megfelelően három éves állatokban a perineuronális hálók még határozottabban kirajzolódtak, de emellett a diffúz mátrix is intenzívebben jelölődött. A megfigyelés, hogy a perineuronális hálók teljesen kifejlett formájukat csak felnőtt korra éri el, azt jelentheti, hogy a neuronális fejlődés, de különösen a szinapszisok kiépülése még nem fejeződött be az első két hétben, és a perineuronális hálók fejlődése a neuro- és szinaptogenezis további fázisát is kíséri. Összességében megállapítjuk, hogy a vizsgált rágcsálókkal ellentétben a fészekhagyó madarakban kikelés után azonnal megkezdődik a perineuronális hálók felépülése.

Ismert, hogy több vizsgált emlős fajban a perineuronális hálók megjelenése a fejlődés során időben egy rosztrokaudális grádiens követ. Ez azt jelenti, hogy a fejlődés korai fázisában a perineuronális hálók először az agytörzsben jelennek meg, és később

kezdenek kialakulni a rostrálisabb agyterületeken (Köppe és mtsai 1997). Ez az időbeni és térbeli sorrend a vizsgált fajok központi idegrendszeri szinaptogenezisének ütemével összhangban áll (Blue és Parnavelas 1983). Munkánkban bizonyítottuk, hogy a házicsirke agyában hiába találtunk eltéréseket az extracelluláris mátrix mintázatában az egyes régiók között, ezen eltérések függetlenek voltak a vizsgált terület rostromaudális helyzetétől. A fészekhagyó madarak (házi csirke) agyának rostrális régióiban és középagyi magjaiban már az első életnapon, mondhatni egy időben jelentek meg a perineuronális hálók.

Tanulmányunkban megmutattuk, hogy az extracelluláris mátrix alapvető szerveződése a madarak és emlősök idegrendszerének evolúciós fejlődése során több, alapvető szempontból megegyezik. Házicsirkében a perineuronális hálókat ugyanazokkal az immunhisztokémiai és hisztokémiai módszerekkel tudtuk megjeleníteni, amelyekkel korábban azt már egerekben és patkányokban sikerült (Brückner és mtsai 1998, Milev és mtsai 1998, Härtig és mtsai 1993). Nagyon jellemző példa, hogy bizonyos emlősök (patkány, egér, rhesus makákó) agyában a perineuronális hálók gyakran olyan gyorsüzelő interneuronok körül találhatóak, melyek feszültségfüggő kálium-csatornákkal rendelkeznek (Härtig és mtsai 1999). Az ilyen csatornákkal rendelkező gyorsüzelő neuronok, amelyek ismertén időkódoló tulajdonságokkal rendelkeznek, és korábban a házi csirke tectum opticumának 10. és 11. rétegében valamint a nucleus isthmi magnocellularisban azonosítottak (Wang és mtsai 2006), eredményeink szerint szintén perineuronális hálókkal borítottak. További hasonlóság az emlősökben és házicsirkében találtak között, hogy csakúgy, mint a vizsgált emlős fajokban, a házicsirke agyában sem találtunk perineuronális hálókat monoaminerg és kolinerg neuronok körül.

Végül megjegyezzük, hogy több homológ agyterületen (Reinert és mtsai 2003) a perineuronális hálók eloszlása, gyakorisága, előfordulása, fenotípusa hasonlóan alakult. Példaképp említjük, hogy ellentétben a legtöbb előagyi területtel a madár globus pallidusa szelektíven csak link-proteinnel jelölődött, ez pedig megegyezik az emberben találtakkal (Brückner és mtsai 2008). Ehhez hasonlóan a nucleus ruber és a kisagyi magok bővelkedtek jól struktúrált, fejlett perineuronális hálókkal, és ez mind a madár, mind a patkány, mind az emberi agyvelőre igaz (Morawski és mtsai 2009, Seeger és mtsai 2004, Brückner és mtsai 2008).

6.4. A HÁZI CSIRKE KÖZPONTI IDEGRENSZERI MÁTRIXÁNAK KIÉPÜLÉSE NEM INGERFÜGGŐ FOLYAMAT EREDMÉNYE

Miután megvizsgáltuk, hogyan fejlődik az extracelluláris mátrix a házi csirke agyvelejének különböző régióiban, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ez a rendkívül gyors mátrixfejlődés aktivitásfüggő folyamat-e. Vizsgálatainkban a látórendszerre koncentráltunk. Bizonyítottuk, hogy a házi csirke látórendszerének állomásain a mátrix fejlődése a féloldali deprivációtól függetlenül zajlott le.

Több munkacsoport adatai is arra utalnak, hogy a tojásban már megindul a központi idegrendszeri mátrix fejlődése. Ismert, hogy a kondroitinszulfát proteoglikánok befolyásolják a magok kialakulását és a neuritek növekedését az idegrendszer fejlődése során (Domowicz és mtsai 2003, Zacharias és Rauch 2006). Idegsejtkultúrákat vizsgálva megállapították, hogy hiányos, foltos aggregátum tartalmú hálózat jelenik meg a fejlődő neuronok felszínén jóval azelőtt, mielőtt a szinapszisok kialakultak volna. Az így felfedezett aggregátum-immunoreaktív területek nem mutattak immunoreaktivitást szinaptikus markerekkel. Ezek szerint a neuronok felszíne már „előre felkészül” a szinapszisok fogadására (Dino és mtsai 2006). Schwartz és Domowicz 2004-ben megfigyelték, hogy a csirke embrionális fejlődése során az aggregátum molekula a hetedik és a tizenharmadik embrionális napok között expresszáldott, és feltételezték, hogy a későbbiekben fontos szerepet tölt be a gliasejtek fejlődésében. A tenaszcinokról kimutatták, hogy a fejlődés során csak átmenetileg jelennek meg, és bizonyos sejtek axonjainak növekedését irányítják (Bartsch és mtsai 1995, Derr és mtsai 1998, Tucker és mtsai 1999). Ezek a korábbi adatok jelen eredményeinkkel összevetve arra utalnak, hogy a tojásban meginduló, feltételezhetően ingerfüggetlen mátrixfejlődés nagyrészt független marad a tojásból való kikelés után is.

Mivel az átmenetileg megjelenő azonos oldali retinotectalis rostok korán felszívódnak a csirke embrionális fejlődése során (McLoon és Lund 1982), tudjuk, hogy naposcsibékben a látópálya már teljes mértékben keresztvezet. Ezért féloldali deprivációnál biztosak lehetünk abban, hogy a deprivált oldali tectum opticum gyakorlatilag semmilyen afferens ingert nem kapott azokban az állatokban, melyek sötétben nevelkedtek, és szemüket kikelés után azonnal letakartuk. Viszont azt is

tudjuk, hogy látópálya későbbi közti- és előagyi állomásai minimális ellenoldali innervációval is rendelkeznek (Egedi és Tömböl 1993, Ngo és mtsai 1994), így e területeken nem tudtuk teljes mértékben biztosítani a beérkező vizuális információ hiányát.

Előbbiekben tisztáztuk, hogy jóllehet az extracelluláris mátrix nagyon gyorsan fejlődik a csirke agyvelőjében, a perineuronális hálók az egy napos állatokban még éretlen fenotípusúak voltak, a következő hetekben mentek keresztül további fejlődésen, érésen. Tisztázni szeretnénk volna azt, hogy vajon szükséges-e az afferens inger folyamatos jelenléte a perineuronális hálók teljes kifejlődéséhez ebben a fiatal életkorban. Három héttel később a kezelt állatokat vizsgálva az előzőekben tapasztalt eredményre jutottunk: semmilyen eltérést nem találtunk a megkímélt és a deprivált oldal mátrixmintázata között. Macskában tett megfigyelések szerint minimális fényinger elegendő a látórendszer nagymérvű funkcionális és morfológiai éréséhez (Gary-Bobo és mtsai 1991, Takács és mtsai 1992). Eszerint lehetséges, hogy a házicsirkében egy kezdeti inger (trigger) aktiválni képes az extracelluláris mátrix kaszkádszerű fejlődését, hiszen a kísérletünkben felhasznált naposcsibék a tojáson keresztül, és kikelésük után is láttak fényt. Ezért jutott eszünkbe az, hogy olyan csibékben vizsgáljuk meg a mátrix fejlődését, melyeket embrionális korukban is végig teljes sötétségben neveltünk, sötétben keltettünk, kikelésük után pedig azonnali féloldali szemletakarást alkalmaztunk. Ebben az esetben sem tapasztaltunk semmilyen zavart a mátrix fejlődésében. Az így kezelt állatok extracelluláris mátrixa semmiben nem különbözött a többi vizsgált populációban tapasztaltakkal. Ez ellentétben áll a macskában és hörcsögben, mint vizsgált emlős fajokban megfigyeltekkel, ahol fiatal állatokban a perineuronális hálók és mátrix kifejlődéséhez szükség volt valamilyen afferens ingerre (Kalb és Hockfield 1988, Guimaraes és mtsai 1990).

Akkor sem tapasztaltunk semmilyen immunhisztokémiailag kimutatható változást a két félteke mátrixmintázata között, amikor felnőtt állatokban alkalmaztuk a féloldali szemletakarást. Ez megegyezik azzal az eredménnyel, amit szintén felnőtt emlősállatoknál (macskában és egerben) alkalmazott funkcionális deprivációs kísérletek során tapasztaltak (Sur és mtsai 1988, McRae és mtsai 2007). Ez alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a kialakult extracelluláris mátrix fennmaradásához nincs szükség folyamatos afferens ingerre.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink a neuronális extracelluláris mátrix plasztikus aspektusait vizsgálta több szempontból és kérdéssel, különböző fajokban.

(1) A patkány talamuszában talált eredményeinket összehasonlítva a patkány kérgi struktúráinak ismert mátrixmintázatával a következő megállapításra jutottunk: az aggregán-immunoreaktív mátrix gyakorisága függ a vele kapcsolatban álló kérgi régió mátrixmintázatától. Úgy találtuk, hogy a projekciós kapcsolatban lévő köztiagi és kortikális struktúrák az adott rendszer plaszticitását tükrözik vissza.

(2) Megállapítottuk, hogy a patkány talamuszában az extracelluláris mátrix molekulái ritkán alkotnak perineuronális hálókat, kiterjedt mátrixként mindenhol jelen vannak, jellemzően azonban az axonok myelinhüvely nélküli, preterminalis szakaszain kondenzálódnak. Mivel aggregán-immunoreaktivitást ultrastrukturális vizsgálataink sejtestben, dendritben, de mielinhüvelyes axonban is igazoltak, feltételezzük, hogy az aggregán termeléséért mind a pre- mind a posztzinaptikus sejt felelős lehet.

(3) Különböző életkorú házicsirke agyakban talált eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az aggregán alapú perineuronális mátrix a tojásból való kikelés után már jelen van. A mátrixmolekulák sejtest körüli akkumulációja az életkorral fokozódik, mivel a perineuronális hálók az idő előrehaladtával körülírtabbá, karakteresebbé válnak. A megfigyelés, hogy a perineuronális hálók teljesen kifejlett formájukat csak felnőtt korra érik el, azt jelentheti, hogy a szinapszisok kiépülése még nem fejeződött be az első két hétben, és a perineuronális hálók fejlődése a neuro- és szinaptogenezis további fázisát is kíséri.

(4) Bizonyítottuk, hogy a házi csirke látórendszerének állomásain a mátrix fejlődése a féloldali afferens deprivációtól függetlenül zajlott le. Ez alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy az extracelluláris mátrix kialakításához és fennmaradásához nincs szükség folyamatos afferens ingerre. Arra következtetünk, hogy a madár agyában a mátrix eloszlása genetikailag és nem ingerfüggően determinált.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

Az állatok központi idegrendszerében a sejtés elemek közötti teret az extracelluláris mátrix molekulái töltik ki. E molekulákat a neuronok és a gliasejtek közösen termelik. Kutatásunkban a mátrix két különleges megjelenési formájára figyeltünk: egyrészt a sejttesteket és proximális dendriteket burkoló perineuronális hálókra, valamint a közelmúltban azonosított, az axonok preszinaptikus részét körülvevő periaxonális hüvelyekre. A perineuronális hálók fontos szerepet töltenek be a sejtek védelmében, ionhomeosztázisuk fenntartásában, a sejtmembrán receptorainak eloszlásában és a szinapszisok stabilizációjában; ugyanakkor alig tudunk valamit az izolált periaxonális hüvelyek funkciójáról. Munkánkban a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix plaszticitással kapcsolatos aspektusait vizsgáltuk több szempontból, több állatfajban, eltérő életkorokban. A mátrix összetevői közül az aggregán molekulára koncentráltunk, mivel ismert, hogy ez a proteoglikán a perineuronális mátrix nélkülözhetetlen alkotója, amit neuronok termelnek. Vizsgálatainkban egyszeres és többszörös immunhisztokémiai jelöléseket, fény-, konfokális lézer szkennings- és elektron mikroszkópiát használtunk. Első kérdéscsoportunk a mátrix plaszticitását patkányban vizsgálta. Anterográd pályakövetéssel kombinált többszörös immunhisztokémiával arra kerestük a választ, hogy az egymással projekciós kapcsolatban álló köztiagyi és kérgi struktúrák a plaszticitásuknak megfelelő mátrixfejlettséget mutatnak-e. Leírtuk a patkány talamuszának mátrixképletét, és úgy találtuk, hogy a mátrix kiépültsége a kérgi és köztiagyi struktúrákban az adott régió plaszticitását tükrözi. Megállapítottuk, hogy az aggregán molekula termelésére, így a mátrix kiépítésére, mind a prae- mind a posztzinaptikus sejt képes lehet. Kísérleteink második felében a házicsirke agyának mátrixára koncentráltunk; mivel ennek a fajnak az egyedei, szemben a legtöbb eddig vizsgált emlőssel, világrajöttek után szinteteljes neuroanatómiai és funkcionális fejlettséget mutatnak. Megállapítottuk, hogy a házicsirke jól fejlett mátrixszal születik, jöllehet az további posztnatális differenciálódást mutat. Féloldali szemletakarással elért afferens deprivációval megfigyeltük, hogy a mátrix kialakulása független az afferens inger, jelenlététől. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a házicsirke agyvelő mátrixának kiépülése genetikailag determinált folyamat, független az afferens inger jelenlététől, ez pedig ellentétes a vizsgált emlősökben tapasztaltakkal.

9. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

The central nervous system of vertebrates is not solely composed of cells. A substantial part of its volume is extracellular space, which is filled by the meshwork of the extracellular matrix. This matrix is composed of a variety of proteins and polysaccharides, which are secreted locally by neurons and glial cells. We focused on two specialized matrix forms: the well known perineuronal nets surrounding the cell bodies and the proximal neurites, and the so called axonal coats ensheating the synaptic and perisynaptic axonal compartments. Perineuronal nets are thought to be responsible for many functions; they protect neurons from stress, help to maintain their ionic milieu or stabilize synapses. At the same time, our knowledge about the functional properties of axonal coats is rather limited. Here we examined the plastic aspects of perineuronal matrix in two species and at different ages using experimental neuroanatomy. As a main matrix component, we labelled the aggrecan molecule which is produced by neurons. Extracellular matrix components were visualized by single and multiple immunohistochemistry using light- and confocal laser scanning microscopy and electronmicroscopy. In the first part of our experiments we investigated the connections between brain plasticity and extracellular matrix in the thalamus of the rat using anterograde track tracing and multiple immunofluorescent labelling. We mapped the matrix structure of the rat thalamus and found that the distribution of aggrecan-based extracellular matrix is dependent on the role and plastic properties of the nucleus and its corresponding cortical structure. In addition, we suggest that the aggrecan molecule loads from both pre- and postsynaptic sides. In our further experiments, we focused on the extracellular matrix of the central nervous system of the chick. In chickens, perineuronal nets show very fast maturation which is probably due to the rapid establishment of neuronal morphology and the immediate functional performance of the animals. We show, that perineuronal nets can be identified very early, already on the first postnatal day in the chick brain, however they thicken and complete with aging. We also proved that extracellular matrix maturation is not principally determined by light activation in the visual centers of chicks after monocular light deprivation. We conclude that the establishment of the chick brain matrix is genetically determined and largely independent of the presence of afferent stimuli, in sharp contrast to experiences in mammals.

10. IRODALOMJEGYZÉK

A

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. Part V: Cells in their social context Chapter 19: Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix: The Extracellular Matrix of Animals. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

Alpár A, Gartner U, Härtig W, Brückner G. 2006. Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res*, 1120: 13-22.

Anlar B, Gunel-Ozcan A. (2012) Tenascin-R: role in the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol*, 9: 1385-1389.

B

Bahia CP, Houzel JC, Picanço-Diniz CW, Pereira A Jr. (2008) Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation. *J Comp Neurol*, 510: 145-157.

Baig S, Wilcock GK, Love S. (2005) Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 110: 393-401.

Balmer TS, Carels VM, Frisch JL, Nick TA. (2009) Modulation of perineuronal nets and parvalbumin with developmental song learning. *J Neurosci*, 29: 12878-12885.

Bandtlow CE, Zimmermann DR. (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev*, 80: 1267-1290.

Barbas H. (1995) Anatomic basis of cognitive–emotional interactions in the primate prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*, 19: 499-510.

Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB, Bradbury EJ. (2006) Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci*, 26: 10856-10867.

Bartsch S, Husmann K, Schachner M, Bartsch U. (1995) The extracellular matrix molecule tenascin: expression in the developing chick retinotectal system and substrate properties for retinal ganglion cell neurites in vitro. *Eur. J. Neurosci*, 7: 907-916.

Benowitz LJ, Karten HJ. (1976) Organization of the tectofugal visual pathway in the pigeon: A retrograde transport study. *J Comp Neurol*, 167: 503-520.

Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L. (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci*, 26: 369-378.

Bliss T, Gardner-Medwin A. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232: 357-74.

Blue ME., Parnavelas JG. (1983) The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J. Neurocytol*, 12: 697-712.

Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416: 636-640.

Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Böckers TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED, Fässler R. (2002) Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol*, 22: 7417-7427.

Brittis PA., Canning DR and Silver J. (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*, 225: 733-736.

Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. (1993) Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, 8: 183-200.

Brückner G, Seeger G, Brauer K, Härtig W, Kacza J, Bigl V. (1994) Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. *Brain Res*, 658: 67-86.

Brückner G, Bringmann A, Köppe G, Härtig W, Brauer K. (1996a) In vivo and in vitro labelling of perineuronal nets in rat brain. *Brain Res*, 720: 84-92.

Brückner G, Härtig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K. (1996b) Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol*, 25: 333-346.

Brückner G, Härtig W, Seeger J, Rübsamen R, Reimer K, Brauer K. (1998) Cortical perineuronal nets in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): a distribution pattern contrasting with that shown in placental mammals. *Anat Embryol*, 197: 249-262.

Brückner G, Hausen D, Härtig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. (1999) Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92: 791-805.

Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M. (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol*, 428: 616-629.

Brückner G, Grosche J, Hartlage-Rübsamen M, Schmidt S, Schachner M. (2003) Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat*, 26: 37-50.

Brückner G, Pavlica S, Morawski M, Palacios AG, Reichenbach A. (2006) Organization of brain extracellular matrix in the Chilean fat-tailed mouse opossum *Thylamys elegans* (Waterhouse, 1839). *J Chem Neuroanat*, 32: 143-158.

Brückner G, Morawski M, Arendt T. (2008) Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience*, 151: 489-504.

C

Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW. (2006) Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol*, 494: 559-577.

Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. (2007) Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol*, 501: 83-94.

Caughey B, Raymond GJ. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, 67: 643-650.

Celio MR, Blümcke I. (1994) Perineuronal nets - a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Rev*, 19: 128-145.

Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. (1998). Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci*, 21: 510-515.

Corner MA, Bakhuis WL. (1969) Developmental patterns in the central nervous system of birds. V. Cerebral electrical activity, forebrain function and behavior in the chick at the time of hatching. *Brain Res*, 13: 541-555.

D

Deák Á, Bácskai T, Gaál B, Rácz É, Matesz K. (2012) Effect of unilateral labyrinthectomy on the molecular composition of perineuronal nets in the lateral vestibular nucleus of the rat. *Neurosci Lett*, 513: 1-5.

De Felipe J, Marco P, Fairen A, Jones EG. (1997) Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cereb Cortex*, 7: 619-634.

Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem*, 281: 17789-17800.

Delpech B, Delpech A, Brückner G, Girard N, Maingonnat C. Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. In: Evered, D., Whelan, J. (szerk.), *The Biology of Hyaluronan*. Ciba Foundation Symposium 143. John Wiley & Sons, Chichester, 1989: 208-232.

Derr LB, McKae LA, Tucker RP, (1998) The distribution of tenascin-R in the developing avian nervous system. *J Exp Zool*, 280: 152-164.

Dino MR, Harroch S, Hockfield S, Matthews RT. (2006) Monoclonal antibody Cat-315 detects a glycoform of receptor protein tyrosine phosphatase beta/phosphacan early in CNS development that localizes to extrasynaptic sites prior to synapse formation. *Neuroscience*, 142: 1055-1069.

Dityatev A, Schachner M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. Review *Nat Rev Neurosci*, 4: 456-468.

Dityatev A, Brückner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M. (2007) Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol*, 67: 570-588.

Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. (2010) Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci*, 11: 503-12.

Dityatev A, Rusakov DA. (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 21: 353-9.

Domowicz MS, Mangoura D, Schwartz NB, (2003) Aggrecan regulates telencephalic neuronal aggregation in culture. *Brain Res*, 143: 207-216.

E

Edinger L, Wallenberg A. (1899) Untersuchungen über das Gehirn der Taube. *Anat Anz*, 15: 245-271.

Egedi G, Tömböl T. (1993) A Phaseolus lectin anterograde tracing study of the rotundo-telencephalic projections in the domestic chick. *J Hirnforsch*, 34: 317-333.

Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. Cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*, 366: 34-43.

Esko JD, Kimata K, Lindahl U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. Chapter 16 in: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME: *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

F

Flaumenhaft R, Rifkin DB. (1991) Extracellular matrix regulation of growth factor and protease activity. *Curr Opin Cell Biol*, 3: 817-823.

Frasher JR, Laurent TC, Laurent UB. (1997) Hyaluronan: it's nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242: 27-33.

Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 12: 897-904.

G

Gamlin PD, Cohen DH. (1988) Retinal projections to the pretectum in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*, 269: 1-17.

Garey LJ, Dreher B, Robinson SR. The organisation of the visual thalamus. In: Dreher B, Robinson SR: *Neuroanatomy of the visual pathways and their development*. CRC Press, Inc. Boca Raton Ann Arbor, Boston, 1991.

Gary-Bobo E, Przybylski J, Saillour P. (1991) Development of selective properties in visual cortical cells of dark-reared kittens after a brief visual experience: quantitative analysis. *Eur J Neurosci*, 1239 (Suppl. 4), 55.

Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. (2010) Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*, 170: 1314-27.

Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 383: 550-553.

Golgi C (1893) *Intorno all' origine del quarto nervo cerebrale e una questione istofisiologica che a questo argomento si collega*. *Rend R Accad Lincei* 2: 379-389.

Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. (2008) Elevated matrix metalloproteinase-9 and degradation of perineuronal nets in cerebrocortical multiple sclerosis plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67: 888-899.

Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P. (2007) NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci*, 27: 10165-10175.

Groenewegen HJ. (1988) Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience*, 24: 379-431.

Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM. (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 8075-8079.

Guerrero-Tarrago M, Yuste VJ, Iglesias M, Pérez J, Comella JX. (1999) Binding patterns of lectins with GalNAc specificity in the mouse dorsal root ganglia and spinal cord. *J Neurocytol*, 28: 75-84.

Guimäraes A, Zaremba S, Hockfield S. (1990) Molecular and morphological changes in the cat lateral geniculate nucleus and visual cortex induced by visual deprivation are revealed by monoclonal antibodies Cat-304 and Cat-301. *J Neurosci*, 10: 3014-3024.

H

Bácskai T, Veress G, Halasi G, Deák A, Rácz E, Székely G, Matesz K. (2008) Dendrodendritic and dendrosomatic contacts between oculomotor and trochlear motoneurons of the frog, *Rana esculenta*. *Brain Res Bull*, 75: 419-23.

Harris RM, Hendrickson AE. (1987) Local circuit neurons in the rat ventrobasal thalamus—a GABA immunocytochemical study. *Neuroscience*, 21: 229–236.

Härtig W, Brauer K, Brückner G. (1992) Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*, 3: 869-872.

Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mader M, Reichenbach A, Brückner G. (1999) Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res*, 842: 15-29.

Härtig W, Singer A, Grosche J, Brauer K, Ottersen OP, Brückner G. (2001) Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Res*, 899: 123-133.

Hausen D, Brückner G, Drlicek M, Härtig W, Brauer K, Bigl V. (1996) Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *Neuroreport*, 7: 1725-1729.

Hendry SH, Jones EG, Hockfield S, McKay RD. (1988) Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *J Neurosci*, 8: 518-542.

Hensch TK. (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6: 877-888.

Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL, Beyreuther K. (1991) Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol*, 218: 149-163.

Hockfield S, McKay RD. (1983) A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 5758-5761.

Hockfield S, McKay RD, Hendry SH, Jones EG. (1983) A surface antigen that identifies ocular dominance columns in the visual cortex and laminar features of the lateral geniculate nucleus. *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol*, 48: 877-889.

Hodos W, Karten HJ. (1966) Brightness and pattern discrimination deficits in the pigeon after lesions in the nucleus rotundus. *Exp Brain Res*, 2: 151-167

I

Ishii M, Maeda N. (2008) Spatiotemporal expression of chondroitin sulfate sulfotransferases in the postnatal developing mouse cerebellum. *Glycobiology*, 18: 602-614.

J

Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S (1995) The CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB is expressed in ventricular zones coincident with gliogenesis. *J Neurosci*, 15: 1352-1362.

Jones FS, Jones PL. (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*, 218: 235-59.

Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH. (2003) Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci*, 23: 9276-9288.

Juraska JM. (1982) The development of pyramidal neurons after eye opening in the visual cortex of hooded rats: a quantitative study. *J Comp Neurol*, 212: 208-213.

K

Kalb RG, Hockfield S. (1988) Molecular evidence for early activity-dependent development of hamster motor neurons. *J Neurosci*, 8: 2350-2360.

Malenka R: Synaptic plasticity, Chapter 11 in Davis KL, Charney D, Coyle J, Nemeroff C *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress: An Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2002: 147-157.

Köppe G, Brückner G, Brauer K, Härtig W, Bigl V. (1997) Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Res*, 288: 33-41.

Kuenzel WJ, Masson M. A stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London, 1998.

Kuroda M, Price JL. (1991) Synaptic organization of projections from basal forebrain structures to the mediodorsal thalamic nucleus of the rat. *J Comp Neurol*, 303: 513-533.

L

Lambaerts K, Wilcox-Adelman SA, Zimmermann P. (2009) The signaling mechanism of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol*, 21: 662-669.

Lander AD, Stipp CS, Ivins JK. (1996) The glypican family of heparan sulfate proteoglycans: major cell-surface proteoglycans of the developing nervous system *Perspect Dev Neurobiol*, 3: 347-358.

Lander C, Kind P, Maleski M, Hockfield S. (1997) A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *J Neurosci*, 17: 1928-1939.

Lander C, Zhang H, Hockfield S. (1998) Neurons produce a neuronal cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci*, 18: 174-183.

LeDoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, Reis DJ. (1987) Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*, 264: 123-146.

Lendvai D, Morawski M, Négyessy L, Gáti G, Jäger C, Baksa G, Glasz T, Attems J, Tanila H, Arendt T, Harkany T, Alpár A. (2013) Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease: *Acta Neuropathologica*, 125: 215-229.

Li HP, Komuta Y, Kimura-Kuroda J, van Kuppevelt TH, Kawano H. (2013) Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain. *J Neurotrauma*, 30: 413-25.

Li R, Sakaguchi H. (1997) Cholinergic innervation of the song control nuclei by the ventral paleostriatum in the zebra finch: a double-labeling study with retrograde fluorescent tracers and choline acetyltransferase immunohistochemistry. *Brain Res*, 763: 239-246.

Lippe WR. (1995) Relationship between frequency of spontaneous bursting and tonotopic position in the developing avian auditory system. *Brain Res*, 703: 205-213.

Lüth HJ, Winkelmann E, Celio MR. (1993) Light- and electron microscopic localization of parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat. *J Hirnforsch*, 34: 47-56.

M

Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU. (1996) Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol*, 3: 273-290.

Massey JM, Amps J, Viapiano MS, Matthews RT, Wagoner MR, Whitaker CM, Alilain W, Yonkof AL, Khalyfa A, Cooper NG, Silver J, Onifer SM. (2007) Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury creates a barrier to axonal regeneration overcome by chondroitinase ABC and neurotrophin-3. *Exp Neurol*, 209: 426-445.

Matesz K, Módis L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bácskai T, Székely G. (2005) Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull*, 66: 526-31.

Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. (2002) Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci*, 22: 7536-7547.

Matsui F, Kawashima S, Shuo T, Yamauchi S, Tokita Y, Aono S, Keino H, Oohira A. (2002) Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. *Neuroscience*, 112: 773-781.

McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM. (2005) Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science*, 309: 2222-2226.

McGuire PK, Hockfield S, Goldman-Rakic PS. (1989) Distribution of cat-301 immunoreactivity in the frontal and parietal lobes of the macaque monkey. *J Comp Neurol*, 288: 280-296.

McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci*, 1: 3398-3411.

McLoon SC, Lund RD. (1982) Transient retinofugal pathways in the developing chick. *Exp Brain Res*, 45: 277-284.

McRae PA, Rocco MM, Kelly G, Brumberg JC, Matthews RT. (2007) Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*, 27: 5405-5413.

McRae, PA, Rocco MM, Kelly G, Brumberg JC, Matthews RT. (2007) Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. *J Neurosci*, 27: 5405-5413.

Miceli D, Marchand L, Repérant J, Rio JP. (1990) Projections of the dorsolateral anterior complex and adjacent thalamic nuclei upon the visual Wulst in the pigeon. *Brain Res*, 518: 317-323.

Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D, Kaczmarek L. (2009) Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci*, 29: 6007-6012.

Milev P, Chiba A, Haring M, Rauvala H, Schachner M, Ranscht B, Margolis RK, Margolis RU. (1998a) High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *J Biol Chem*, 273: 6998-7005.

Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU. (1998) Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 207-212.

Miller M, (1981) Maturation of rat visual cortex. I. A quantitative study of Golgi impregnated pyramidal neurons. *J Neurocytol*, 10: 859-878.

Miyata S, Nishimura Y, Nakashima T. (2007) Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res*, 1150: 200-206.

Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW. (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci*, 4: 465-466.

Morawski M, Brückner MK, Riederer P, Brückner G, Arendt T. (2004) Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol*, 188: 309-315.

Morawski M, Pavlica S, Seeger G, Grosche J, Kouznetsova E, Schliebs R, Brückner G, Arendt T. (2008) Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*, 7: 1254-6.

Morawski M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Arendt T. (2010) Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions typically affected in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169: 1347-63.

Murakami T, Ohtsuka A. (2003) Perisinaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. *Arch Histol Cytol*, 66: 195-207.

Murakami T, Ohtsuka A, Matsuoka H, Taguchi T, Murakami T, Abe K, Ninomiya Y. (2001) Intensely positively charged perineuronal nets in the adult rat brain as detected by staining with anionic iron colloid. *Arch Histol Cytol*, 64: 45-50.

Murakami T, Murakami T, Hong LJ, Su WD, Piao DX, Mahmut N, Ohtsuka A. (1997) Perineuronal sulfated proteoglycans and cell surface glycoproteins in adult and newborn mouse brains, with special reference to their postnatal developments. *Arch Histol Cytol*, 60: 347-354.

N

Nakagawa F, Schulte BA, Wu JY, Spicer SS. (1987) Postnatal appearance of glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Dev Neurosci*, 9: 53-60.

Nakamura M, Nakano K, Morita S, Nakashima T, Oohira A, Miyata S. (2009) Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex. *Brain Res*, 1252: 117-129.

Neame PJ, Barry FP. (1994) The link proteins. *EXS*, 70: 53-72.

Ngo DT, Németh A, Tömböl T. (1992) Some data on GABAergic innervation of nucleus rotundus in chicks. *J Hirnforsch*, 33: 335-355.

Ngo TD, Davies DC, Egedi G, Tömböl T. (1994) A Phaseolus lectin anterograde tracing study of the tectorotundal projections in the domestic chick. *J Anat*, 184: 129-136.

Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. (1998) *Trends Neurosci*, 21: 207-15.

Niederost BP, Zimmermann DR, Schwab ME, Bandtlow CE. (1999) Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci*, 19: 8979-8989.

Nowicka D, Liguz-Leczna M, Skangiel-Kramska J. (2003) A surface antigen delineating a subset of neurons in the primary somatosensory cortex of the mouse. *Acta Neurobiol Exp*, 63: 185-195.

O

Ogawa H, Oohashi T, Sata M, Bekku Y, Hirohata S, Nakamura K, Yonezawa T, Kusachi S, Shiratori Y, Ninomiya Y. (2004) Lp3/Hapln3, a novel link protein that co-localizes with versican and is coordinately up-regulated by platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells. *Matrix Biol*, 5: 287-98.

Ohara PT, Lieberman AR, Hunt SP, Wu JY. (1983) Neural elements containing glutamic acid decarboxylase (GAD) in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat; immunohistochemical studies by light and electron microscopy. *Neuroscience*, 8: 189-211.

Ohyama J, Ojima H. (1997) Labeling of pyramidal and nonpyramidal neurons with lectin *Vicia villosa* during postnatal development of the guinea pig. *J Comp Neurol*, 389: 453-468.

Ojima H, Sakai M, Ohyama J (1998) Molecular heterogeneity of *Vicia Villosa*-recognized perineuronal nets surrounding pyramidal and nonpyramidal neurons in the guinea pig cerebral cortex. *Brain Res*, 786: 274-280.

Oohira A, Katoh-Semba R, Watanabe E, Matsui F. (1994) Brain development and multiple molecular species of proteoglycan. *Neurosci Res*, 20: 195-207.

P

Paxinos G *The Rat Nervous System* (Third Edition) Elsevier Inc, 2004. ISBN: 978-0-12-547638-6.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain brain in stereotaxic coordinates*, 4th edition, San Diego: Academic Press, 1998.

Payne B, Pearson H, Cornwell P, (1988) Development of visual and auditory cortical connections in the cat. In: Peters A, Jones EG (Szerk.), Cerebral Cortex, Vol. 7: Development and Maturation of Cerebral Cortex. Plenum Press, New York, 309-389.

Pesheva P, Gennarini G, Goridis C, Schachner M. (1993) The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. *Neuron*, 10: 69-82.

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298: 1248-1251.

Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, Maffei L. (2006) Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 8517-8522.

Popp S, Andersen JS, Maurel P, Margolis RU. (2003) Localization of aggrecan and versican in the developing rat central nervous system. *Dev Dyn*, 227: 143-149.

R

RÁCZ E, GAÁL B, KECSKÉS S, MATESZ K. (2013) Molecular composition of extracellular matrix in the vestibular nuclei of the rat. *Brain Struct Funct*.

Rauch U. (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Moll Life Sci*, 61: 2031-2045.

Rauch U, 2007. Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans*, 35: 656-660.

Ray JP, Price JL. (1992) The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol*, 323: 167-197.

Reimers S, Hartlage-Rübsamen M, Brückner G, Rossner S. (2007) Formation of perineuronal nets in organotypic mouse brain slice cultures is independent of neuronal glutamatergic activity. *Eur J Neurosci*, 25: 2640-2648.

Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Gutarun O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, Jarvis ED. (2004) Avian Brain Nomenclature Forum. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol*, 473: 377-414.

Reinert T, Morawski M, Arendt T, Butz T. (2003) Quantitative microanalysis of perineuronal nets in brain tissue. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 210: 395-400.

Rhodes KE, Fawcett JW. (2004) Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat*, 204: 33-48.

Rogers LJ. (1993) The molecular neurobiology of early learning, development, and sensitive periods, with emphasis on the avian brain. *Mol Neurobiol*, 7: 161-187.

Ruoslahti E. (1996) Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, 6: 489-492.

S

Sapolsky RM. (2003) Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res*, 28: 1735-1742.

Schwartz NB, Domowicz M. (2004) Proteoglycans in brain development. *Glycoconj J*, 21: 329-341.

Schweizer M, Streit WJ, Müller CM. (1993) Postnatal development and localization of an N acetylgalactosamine containing glycoconjugate associated with nonpyramidal neurons in cat visual cortex. *J Comp Neurol*, 329: 313-327.

Seeger G, Lüth HJ, Winkelmann E, Brauer K. (1996) Distribution patterns of Wisteria floribunda agglutinin binding sites and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human visual cortex: a double-labelling study. *J Hirnforsch*, 37: 351-366.

Seki M, Zyo K. (1984) Anterior thalamic afferents from the mamillary body and the limbic cortex in the rat. *J Comp Neurol*, 229: 242-256.

Shibata H. (1992) Topographic organization of subcortical projections to the anterior thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 323:117-127.

Sikes RW, Chronister RB, White LE Jr. (1977) Origin of the direct hippocampus-anterior thalamic bundle in the rat: a combined horseradish peroxidase-Golgi analysis. *Exp Neurol*, 57: 379-395.

Sisken BF, Zwick M, Hyde JF, Cottrill CM (1993) Maturation of the central nervous system: comparison of equine and other species. *Equine Vet J Suppl*, 14: 31-34.

Silver J, Miller JH. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 5: 146-156.

Snow DM, Watanabe M, Letourneau PC and Silver J. (1991) A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Development*, 113: 1473-1485.

Spicer AP, Joo A, Bowling RA Jr. (2003) A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J Biol chem*, 278: 21083-21091.

Sur M, Frost DO, Hockfield S. (1988) Expression of a surface-associated antigen on Y-cells in the cat lateral geniculate nucleus is regulated by visual experience. *J Neurosci*, 8: 874-882.

Swanson LW, Cowan WM. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol*, 172: 49-84.

Szigeti ZM, Matesz K, Székely G, Felszeghy S, Bácskai T, Halasi G, Mészár Z, Módos L. (2006) Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. *J Comp Neurol*, 496: 819-831.

T

Takács J, Saillour P, Imbert M, Bogner M, Hámori J. (1992) Effect of dark rearing on the volume of visual cortex (areas 17 and 18) and number of visual cortical cells in young kittens. *J Neurosci Res*, 32: 449-459.

Tani E, Ametani T. (1971) Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *J Ultrastruct Res*, 34: 1-14.

Thompson SM, Robertson RT. (1987) Organization of subcortical pathways for sensory projections to the limbic cortex. II. Afferent projections to the thalamic lateral dorsal nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 265: 189-202.

Toole BP. (2000) Hyaluronan is not just a goo! *J Clin Invest*, 10: 335-6.

Tömböl T. (1988) Comparative study of the early postnatal chicken and pigeon brain. A Golgi-study of telencephalon and cerebellum. *J Hirnforsch*, 29: 557-567.

Tömböl T. Golgi structure of telencephalon of chicken. Abaevó Press, Budapest, 1995.

Tömböl T, Eyre MD, Alpár A, Németh A. (2005) The axon arbourisation of nuclei isthmi neurons in the optic tectum of the chick and pigeon. A Golgi and anterograde tracer-study. *Anat Embryol*, 209: 371-80.

Tsubouchi Y, Tsubouchi M, Hitomi S, Ohtsuka A, Murakami T. (1996) Perineuronal sulfated proteoglycans in the adult rat brain: histochemical and electron microscopic studies. *Acta Med Okayama*, 50: 237-241.

Tucker RP, Hagios C, Chiquet-Ehrismann R. (1999) Tenascin-Y in the developing and adult avian nervous system. *Dev Neurosci*, 21: 126-133.

V

Vidal E, Bolea R, Tortosa R, Costa C, Domenech A, Monleón E, Vargas A, Badiola JJ, Pumarola M. (2006) Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains. *J Virol Methods*, 136: 137-146.

W

Wang Y, Luksch H, Brecha NC, Karten HJ. (2006) Columnar projections from the cholinergic nucleus isthmi to the optic in chicks (*Gallus gallus*): a possible substrate for synchronizing tectal channels. *J Comp Neurol*, 494: 7-35.

Wegner F, Härtig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Brückner G. (2003) Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol*, 184: 705-714.

Wintergerst ES, Vogt Weisenhorn DM, Rathjen FG, Riederer BM, Lambert S, Celio MR. (1996) Temporal and spatial appearance of the membrane cytoskeleton and perineuronal nets in the rat neocortex. *Neurosci Lett*, 209: 173-176.

Wise SP, Fleshman Jr JW, Jones EG. (1979) Maturation of pyramidal cell form in relation to developing afferent and efferent connections of rat somatic sensory cortex. *Neurosci*, 4: 1275-1297.

Y

Yamada H, Fredette B, Shitara K, Hagihara K, Miura R, Ranscht B, Stallcup WB, Yamaguchi Y (1997) The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J Neurosci*, 17: 7784-7795.

Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem*, 243: 1523-35.

Yamaguchi Y. (1996) Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspect Dev Neurobiol*, 3: 307-317.

Yamaguchi Y. (1999) Chondroitin sulfate proteoglycans in the nervous system. In: *Proteoglycans: Structure, Biology and Molecular Interactions*, Iozzo R (Szerk.) Marcel Dekker, New York, 379-403.

Yamaguchi Y. (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57: 276-289.

Yamamoto M, Marshall P, Hemmendinger LM, Boyer AB, Caviness Jr VS. (1988) Distribution of glucuronic acid-and-sulfate-containing glycoproteins in the central nervous system of the adult mouse. *Neurosci Res*, 5: 273-298.

Z

Zacharias U, Rauch U. (2006) Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology. *J Cell Sci*, 119: 3456-3466.

Zhang H, Uchimura K, Kadomatsu K. (2006) Brain keratan sulfate and glial scar formation. *Ann N Y Acad Sci*, 1086: 81-90.

Zhou XH, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, Krug M, Seidenbecher CI, Boeckers TM, Rauch U, Buettner R, Gundelfinger ED, Fässler R. (2001) Neurocan is dispensable for brain development. *Mol Cell Biol*, 21: 5970-5978.

Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*, 130: 635-653.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Elsőszerzős közlemények (a dőlt betűvel szedettek a dolgozat alapját képezik):

1. Gáti G, Morawski M, Lendvai D, Jäger C, Négyessy L, Arendt T, Alpár A. *Distribution and classification of aggrecan-based extracellular matrix in the thalamus of the rat. J Neurosci Res. 2010 Nov 15;88(15):3257-66. IF: 2.958*

2. Gáti G, Morawski M, Lendvai D, Matthews RT, Jäger C, Zachar G, Arendt T, Alpár A. *Chondroitin sulphate proteoglycan-based perineuronal net establishment is largely activity-independent in chick visual system. J Chem Neuroanat. 2010 Nov; 40(3):243-7. IF: 2.121*

3. Gáti G, Lendvai D.

A „ruha” teszi a neuront – az extracelluláris mátrix különböző megjelenési formái gerincesek központi idegrendszerében. „Dress” makes the neuron – different forms of the extracellular matrix in the vertebrate central nervous system. *Orv Hetil. 2013 Jul 1; 154 (27): 1067- 73.*

Társ szerzős közlemények (a dőlt betűvel szedettek a dolgozat alapját képezik):

1. Lendvai D, Morawski M, Négyessy L, Gáti G, Jäger C, Baksa G, Glasz T, Attems J, Tanila H, Arendt T, Harkany T, Alpár A. *Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2012 Feb, 125(2):215-29 IF: 9.734*

2. Alpár A, Ueberham U, Lendvai D, Naumann N, Rohn S, Gáti G, Arendt T, Gärtner U. *Activity-induced dendrite and dendritic spine development in human amyloid precursor protein transgenic mice. Int J Dev Neurosci. 2011 Apr; 29(2):107-14. IF: 2.418*

3. Morawski M, Alpár A, Brückner G, Fiedler A, Jäger C, Gáti G, Stieler JT, Arendt T. *Chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in chicken (Gallus domesticus) brain. Brain Res. 2009 Jun 12; 1275:10-23. IF: 2.463*

Poszterek:

1. Gáti G, Morawski M, Brückner G, Lendvai D, Jäger C, Négyessy L, Arendt Th, Alpár A. Distribution of chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in the thalamus of the rat. FENS Forum Abstracts, vol.5, A127.11, FENS Forum, Amsterdam, 2010.

2. Gáti G, Lendvai D, Morawski M, Arendt Th, Brückner G, Alpár A. Extracellular matrix establishment is largely activity-independent in chick visual system. Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract: IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010.

3. Lendvai D, Gáti G, Morawski M, Arendt Th, Brückner G, Gärtner U, Alpár A. Constitutively enhanced p21Ras activity promotes dynamic extracellular matrix establishment. Frontiers in Systems Neuroscience. Conference Abstract: IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010.

4. Alpár A, Morawski M, Brückner G, Jäger C, Gáti G, Arendt Th. Postnatal development of chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in chicken (*Gallus domesticus*) brain. 4th ESN Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders. In: Journal of Neurochemistry Vol. 110, Suppl. 1, p.70., 2009.

5. Gáti G, Morawski M, Brückner G, Arendt T, Alpár A. A periszinaptikus régió extracelluláris mátrixának vizsgálata patkány agyvelőben. A Magyar Anatómus Társaság XV. kongresszusa, Budapest, 2009. június 11-13.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkám során rengeteg segítséget kaptam.

Legelőször Dr. Alpár Alánnak szeretném megköszönni, hogy gyakorlatvezetőmként, majd harmadéves koromtól kezdve témavezetőmként támogatott. Biztatására jelentkeztem TDK- majd később PhD hallgatónak. Neki köszönhetem, hogy megtapasztalhattam az oktató- és kutatómunka értékét és szépségeit. Lelkesedése és kitartása példaértékű számomra. Végtelen türelemmel vezetett be a kutatómunka rejtelmeibe, időt és energiát nem kímélve tanított és segített engem.

Köszönetet mondok Dr. Csillag András Professzor Úrnak, hogy PhD munkámat az intézetben végezhettem. Köszönöm a kedvességét és hogy mindenben támogatott eddigi pályám során.

Köszönöm Dr. Kálmán Mihály Professzor Úrnak, hogy elvállalta a házi opponens szerepét.

Szeretném megköszönni Dr. Négyessy Lászlónak az elektronmikroszkópos munka elemzésében nyújtott segítségét.

Köszönöm laborunk szakasszisztensének, Németh Andreának a precíz munkáját. Szeretném továbbá megköszönni Deák Szilviának és Fehér Zsuzsának a műtéti asszisztenciában nyújtott segítségét.

Köszönöm Szekér Annának a lelki támogatást és a gazdasági ügyeim intézését. Köszönöm Horváth Péterné Terinek, hogy ügyes- bajos dolgokban mindig számíthattam a segítségére.

Köszönettel tartozom az intézet összes dolgozójának, különösen a Palkovits laboratórium, és a Szentágothai János laboratórium munkatársainak. Kérdéseimmel, kéréseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk.

Végül szeretném megköszönni a Lipcsei Egyetem Paul Flehsig Intézet munkatársainak, különösen Dr Markus Morawski-nak és Dr. Wolfgang Härtig-nek, hogy a témán együtt dolgozhattunk.