

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

Doktori tézisek

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

BEVEZETÉS

Az állati szövetek nem csupán sejtekből állnak. Térfogatuk jelentős hányadát olyan 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 számos komponense a központi idegrendszerben is megtalálható. 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. Ezen molekulák túlnyomó részét a proteoglikánok és a glikoproteinek alkotják, melyek népes családokat alkotnak.

A proteoglikánok olyan molekulák, melyekben glukózaminoglikánok egy tengelyfehérjéhez kapcsolódnak. A glukózaminoglikánok (GAG-ok) ismétlődő diszacharid- egységekből felépülő hosszú, nem elágazódó szénhidrátláncok. A glukózaminoglikánokon belül megkülönböztetünk keratán-, dermatán-, heparán-, és kondroitinszulfátot, valamint hialuronsavat. A legtöbb vizsgált emlős központi idegrendszerében a kondroitinszulfát proteoglikánok, azokon belül is az úgynevezett lektikánok a leggyakoribbak. Kísérleteinkben ezen molekulák közül az aggregánra koncentráltunk, mivel erről ismert, hogy neuronok termelik. Az aggregán molekula tengelyfehérjéinek kezdeti szakasza egy kapcsolófehérje-úgynevezett link-protein- segítségével egy hialuronsav lánchoz kapcsolódik. Az extracelluláris mátrix részeként a glukózaminoglikánok fehérjékhez csatlakozva a proteoglikánok mellett glikoproteineket is létrehozhatnak.

A központi idegrendszeri extracelluláris mátrix a lektikánokon kívül legnagyobb részben a hozzájuk kötődő molekulákból, a hialuronsavból, link proteinekből és adhezív glikoproteinekből, ezeken belül pedig leginkább tenaszcinokból épülnek fel.

A kondroitinszulfát proteoglikánoknak számos funkciót tulajdonítanak a központi idegrendszerben: többek között a szinaptikus résekben, illetve periszinaptikusan elhelyezkedve befolyásolják a posztszinaptikus sejt transzmitter-vezérelt ioncsatornáinak lokalizációját, meggátolják e receptorok laterális diffúzióját. Ezen receptorok közt vannak az LTP (hosszú távú potenciáció), tehát a szinaptikus plaszticitás molekuláris folyamatának fontos résztvevői.

A kondroitinszulfát proteoglikánok barrierként működnek a központi idegrendszerben. *In vitro* kísérletekben bizonyították, hogy a lektikán család minden tagja képes szabályozni az axonnövekedést, az idegszövet sérülés utáni reinnervációs folyamatait gátolják. Patkányon végzett unilaterális nigrostriális axotómia utáni kondroitináz ABC (ChABC- kondroitinszulfátokat bontó enzim) kezelés elősegítette a megszakított dopaminerg nigrális axonok regenerációját. Megfigyelték, hogy a gerincvelő hátsó kötegi sérülését követően a kondroitinszulfát proteoglikán molekulák mennyisége megemelkedik, és mivel tudjuk, hogy ezek az axonnövekedést gátolják, akadályozzák a sérült hátsó kötegi rendszer regenerációs folyamatait is. ChABC fecskendezése a sérült

területre elbontja a proteoglikánokat, és a megszakadt axonok növekedéséhez vezet, így részleges gyógyulást lehetett elérni.

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

A perineuronális hálókat először Camillo Golgi írta le 1893-ban, de nem csak ő, hanem Lugaro, Donaggio, Martinotti, Ramón y Cajal és Meyer is vizsgálta őket. Napjainkban már tudjuk, hogy ezek a perineuronális hálók a kifejlett idegrendszer rendkívül fontos komponensei, melyeket számos fajban vizsgáltak, az embert is beleértve.

A perineuronális hálók összetételüket tekintve variábilisak, és különböző típusú neuronokat ölelnek körül. Ez a bonyolult perineuronális struktúra határozott, és igen stabil burkot képez a neuronok körül, sajátos mikrokörnyezetet hozva létre. Patkány neokortexében lektinhisztokémiai reakciókkal például három különböző típusú neuront borító háló is megjelenik: interneuronok, ritkábban piramissejtek, és elszórtan a VI. rétegben egy GABA-erg sejtcsoport körül. A parvalbumin-pozitív GABA-erg (tehát gátló) interneuronok gyakran rendelkeznek mátrixburokkal. Ezeket „gyorstüzelő interneuronoknak” nevezzük, melyek különleges elektrofiziológiai tulajdonságaikat leginkább a Kv3.1 β alegységgel rendelkező káliumcsatornáknak köszönhetik. E kationcsatornák perineuronális hálókkal bíró gyorsüzelő interneuronok felszínén fordulnak elő a patkány agyvelő számos területén. Patkányban a piramissejtek az interneuronokhoz képest ritkán burkoltak mátrixszal, legnagyobb számban jellemzően a látókéregben, legkisebb számban a szekundér motoros kéregben fordulnak elő.

A lektikánok a perineuronális hálók legfontosabb komponensei, melyet a neuronok és a gliasejtek termelnek. A posztnatális fejlődési folyamatok előrehaladtával a perineuronális hálók jellemzően egyre összetettebbé válnak, és egyre határozottabb burkot vonnak a neuronok köré. A kifejlett extracelluláris mátrixburok ellenáll a közeledő új neuriteknek, tehát a perineuronális hálók barriert képeznek az új szinaptikus kapcsolatok kialakulása ellen.

Mindemellett a kifejlett perineuronális hálók az idegsejtek plasztikus tulajdonságait is csökkentik, így fontosak a szinapszisok stabilizálásában is. Rendszerint a posztnatális élet későbbi periódusaiban jelennek meg, gyakran abban az időintervallumban, amikor fennáll az ingerfüggő neuroplaszticitás lehetősége. A ChABC degradálja a perineuronális hálókat, egyúttal csökkenti a proteoglikánok barrier funkcióját. Kísérletek demonstrálták, hogy ChABC kezelés után a kifejlett patkányok látókérgében visszaállt a látókérgi dominancia plaszticitása, a perineuronális hálók enzimekkel való bontása így elősegítheti az idegrendszer funkcionális regenerációját. Mások a somatoszenzoros kéreg barrel mezőjében figyelték meg a perineuronális hálók diffúzzá válását és számának

csökkenését bajuszszőr irtás után, mely az afferens inger jelenléte/mennyisége és a perineuronális mátrix kiépülése közötti kapcsolatra világít rá.

Neurodegeneratív betegségekkel kapcsolatban szintén sokakban felmerült a perineuronális hálók szerepe. Alzheimer kórban elhunyt emberekből nyert mintákon kimutatták, hogy a perineuronális burokkal rendelkező idegsejtekben nem jöttek létre neurofibrillum lerakódások még a súlyosan károsodott területeken sem, amit megfelelő transzgen egérmodellekben további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokkal is alátámasztottak.

CÉLKITŰZÉSEK

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

1. Ismert, hogy a patkány eltérő plaszticitással rendelkező kérgi területein eltérő mátrixmintázat látható. Egyik célunk volt kideríteni, hogy van-e összefüggés az extracelluláris mátrix fejlettségében, mintázatában olyan régiók között, melyek egyazon pálya részei, tehát projekciós kapcsolatban állnak. Más szóval, egy kevésbé plasztikus kérgi terület, mely sok perineuronális hálóval rendelkezik, olyan köztiagyi/szubkortikális (talamusz) területről kapja-e a bemenetét, melyet hasonló mátrixfejlettség jellemez?
2. A periaxonális hüvelyek a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix újonnan felfedezett megjelenési formái, melyek humán anyagban gátló végződésük körül jelentek meg. Eddigi feltételezések szerint a perineuronális mátrixot a posztzinaptikus sejtek termelik. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkkal, és anterográd pályakövetéssel kombinált immunjelöléssel arra kerestük a választ, hogyan jelentek meg a periaxonális hüvelyek a patkány talamuszában, és lehetséges-e az, hogy azokat a preszinaptikus neuron termeli?
3. Ismert, hogy rágcsálókban (egérben és patkányban) jól körülírt, kifejlett 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 patkányban a perineuronális hálók fejlődése függ az afferens inger jelenlététől. Utolsó kérdésünk az, hogy ha a fejlett idegrendszerrel született házi csirkében végzünk féloldali funkcionális afferens deprivációt, meg tudjuk-e akadályozni a deprivált oldali mátrixfejlődést?

MÓDSZEREK

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 (22.1/3453/003/2009).

Az extracelluláris mátrix vizsgálata patkány talamuszában

A kísérleteket 16 darab 5 hónapos hím és nőstény Wistar patkányon végeztük. A patkány talamuszában lévő extracelluláris mátrix feltérképezéséhez lektin-, és immunhisztokémiai jelöléseket alkalmaztunk. A glukózaminoglikán oldalláncok N-acetil-galaktózamin részéhez erősen kötődik a Wisteria Floribunda agglutinin nevű lektin, mely az extracelluláris mátrix egyik legszélesebb körben használt markere. Az immunjelölésekhez aggregán tengelyfehérje elleni antitestet (HAG7D4), majd biotinilált szekundér antitesteket és avidin-biotin komplexet alkalmaztunk. Mindkét reakciót nikkel-ammónium-szulfáttal felerősített 3,3'-diaminobenzidin segítségével tettük láthatvá. Az így készült metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során szintén HAG7D4 immunhisztokémiát alkalmaztunk. A talamusz nucleus ventralis posterior-ját választottuk ki részletes vizsgálat céljából.

Kettős immunfluoreszcens festések során anterográd pályajelöléssel kombinált immunhisztokémiát alkalmaztunk. Anterográd pályakövető anyagként biotinilált dextrán amint, az extracelluláris mátrix jelöléséhez aggregán tengelyfehérje elleni antitestet (HAG7D4-et) használtunk.

Hármas jelölések során anterográd pályakövetéssel kombinált HAG7D4 és glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) immunhisztokémiát alkalmaztunk, hogy az aggregán immunreaktivitást a gátló terminálisokkal, és a talamusz afferenseivel együtt tanulmányozhassuk.

Az extracelluláris mátrix vizsgálata csirke agyvelőben

Az extracelluláris mátrix fejlődésének és plasztikus változásainak vizsgálatához különböző életkorú házi csirkéket (*Gallus domesticus*, Hunnia broiler hibridek, Bábolna Kft., Magyarország) perfundáltunk. Az extracelluláris mátrix életkorfüggő fejlődését három darab három hónapos, hat darab tizenhárom napos állaton, és hat darab naposcsibén vizsgáltuk. Az állatokat ketrecekben, normál állatházi körülmények között tartottuk, majd fenti életkorukban perfundáltuk. További hat kiscsirkén (három egyhetes állaton és

három naposcsibén) megkezdtük a féloldali szem letakarását. 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-P0) 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.

Az extracelluláris mátrix életkorfüggő megjelenésének vizsgálatához a kapcsolófehérjét (CRTL-1) és az aggregán tengelyfehérjét többféle antitest segítségével (Cat-315, 1-B-5, HAG7D4, AB1031), a hialuronsavat pedig fehérjekötési reakcióval tettük láthatóvá. Emellett lektinhisztokémiát is végeztünk, melynek során a kondroitinszulfát proteoglikánok oldalláncait különböző lektinekkel (Wisteria Floribunda agglutinin, Helix aspersa agglutinin, Vicia Villosa agglutinin, Soybean agglutinin) jelöltük.

Kettős immunhisztokémiai jelölésekkel a perineuronális hálók előfordulását kolinerg és monoaminerg sejtcsoportok körül is megvizsgáltuk. Emellett kettős immunhisztokémiát is alkalmaztunk, hogy egyszerre tegyük láthatóvá az aggregán-tartalmú perineuronális hálókat (Cat-315 anti-aggregán antitesttel) és a KV3.1 β alegységgel rendelkező káliumcsatornákat.

Az afferens depriváció hatását immunhisztokémiai módszerekkel mutattuk ki. Ezek során az aggregán tengelyfehérjét a Cat-315 nevű ellenanyaggal, a kapcsolófehérjét anti-CRTL-1 ellenanyaggal detektáltuk.

Képalkotás

A DAB-reakcióval megjelenített 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.

EREDMÉNYEK

A HAGD4 immunoreaktivitás és Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA) lektinhisztokémia jellemzői patkány talamuszában

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

A kérgi területekhez képest ritkábban előforduló perineuronális hálók azonosítása után figyelmünk a periaxonális hüvelyek felé fordult, melyek előbbiektől teljesen önállóan jelentek meg. 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.

Perineuronális hálókat és periaxonális hüvelyeket a legtöbb talamuszmagban tudtunk azonosítani az eltérő erősséggel festett diffúz mátrixba ágyazva. Jelentős különbségek voltak attól függően, hogy mely magokban, illetve ezeken belül mely szubdivíziókban vizsgáltunk. Ha általánosságban nézzük a mátrix festődését, a legerősebb aggregátumokban 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. A hátsó ventrális magokban, különösen a nucleus ventralis posteromedialisban jóval nagyobb számban fedeztük fel a periaxonális hüvelyeket, mint az itt gyengébben és kisebb számban jelölt perineuronális hálókat.

A talamusz különböző magcsoportjaiban látott aggregátum-térkép nagyon hasonlított az azonos területekről nyert WFA-lektintérképhez. Mind perineuronális hálókat, mind periaxonális hüvelyeket azonosítottunk a különböző talamuszmagokban, az előzőekhez hasonló gyakorisággal.

Elektronmikroszkópia

A talamusz ventrobazalis magcsoportjában számos helyen találtunk HAG7D4 immunoreaktív profilokat változatos neuronális kompartmentekhez kapcsoltnak. 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. A neuronok dendritjei körül is gyakran találtunk immunoreaktív mátrixot, számos esetben axodendritikus kapcsolatok körül. Ezek a szinapszisok legnagyobb részben lapos vezikulákat tartalmaztak, ezért vélhetően gátló funkcióval bírnak. A nagyobb méretű specifikus excitatorikus, illetve a kisebb méretű kortikotalamikus terminálisok csak a legritkább esetekben rendelkeztek önálló mátrixburokkal. Azonosítottunk finom rajzolatú perineuronális hálókat is. További tapasztalatunk, hogy nem csak a neuronális kompartmentek körül, hanem

jellemzően azokon belül is egyértelmű immunoreaktivitást találtunk. A sejtestek illetve a dendritok mellett a myelinhüvellyel bíró axonokon belül is több esetben találtunk aggregált immunoreaktivitást.

Anterográd pályakövetéssel kombinált HAG7D4 és HAG7D4/GAD immunhisztokémia

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.

A kisagy-magokból, főként a nucleus dentatusból a talamusz VA/VL magjaiba felszálló rostok végződése körül több esetben azonosítottunk mátrixakkumulációt, hasonlóképpen a nucleus gracilisból és a nucleus cuneatusból a VPL magba felszálló rostok, vagy a trigeminus magból a VPM magba felszálló rostvégzések körül.

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.

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 házi csirkének kikelés után azonnal alkalmazkodnia kell környezetéhez, idegrendszerének fejlődése valószínűleg emiatt zajlik ekkora sebességgel. Ezzel ellentétben több vizsgált emlős faj agyvelejében jóval több idő, és emellett megfelelő mennyiségű afferens inger szükséges a mátrix kiépüléséhez a teljes fejlettség eléréséhez. 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?

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. 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 posztnatális napon detektáltuk. Már ekkor jól láthatóak voltak a perineuronális hálók, egy szintén jól kivehető diffúz mátrixon belül. A 13 napos állatokban már jelentősen emelkedett jelintenzitást láttunk, de egészen tisztán és élesen kirajzolódó perineuronális hálókat csak felnőtt állatokban figyelhettünk meg. Jól elkülönülő lektin-jelölt (HAA, SBA, VVA vagy WFA) perineuronális hálókat csak a felnőtt állat középagyában figyelhettünk meg. A humán- és rágcsáló aggregán tengelyfehérjét jelölő HAG7D4 és AB1031 antitesttel kezelt metszeteken nem detektáltunk immunoreaktivitást.

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.

A csirke előagya, középagya és kisagya egyenlőtlen Cat-315 eloszlást mutatott. A diffúzan eloszló mátrix az agyvelő minden területén jelölődött, viszont a területek között intenzitásbeli különbségeket fedeztünk fel. Azon agyterületek melyek nagyon kevés sejttestet tartalmaznak gyakorlatilag immunoreaktivitást sem mutattak, vagy csak rendkívül keveset. Az egy napos állatok agyában nagyon halványan jelölődtek a perineuronális hálók, sok esetben voltak szemcsés szerkezetűek, vagy csupán foltokban fedték a sejttesteket. Míg a különböző agyterületek megtartották a rájuk jellemző relatív jelölődési intenzitást, a P13 agyakban a perineuronális hálók sokkal karakteresebbek és teljesebbek voltak, valamint jobban elkülönültek a diffúz mátrixtól. Ez a folyamat tovább erősödött a harmadik hónap végére.

A perineuronális hálók leginkább a sejttest körül jelentek meg, és csak ritkán fordultak elő a dendritek proximális szakaszain. Ellentétben a korábban egérben, oposszumban vagy emberben tapasztaltakkal, az axonok kezdeti szakaszai csak kivételes esetekben rendelkeztek mátrixburokkal a csirke elő- és középagyában.

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. A felnőtt egyedekből készült metszeteken a Purkinje sejtek dendritjei is jól kivehetőek voltak az őket borító mátrix miatt. A Ranvier-befűződések helyeit is számos esetben megfigyelhettük a fehérállományban az intenzív aggregán-immunoreaktivitásuk miatt. A kisagymagok perineuronális hálói élesen elkülönülő profilokként mutatkoztak a perikarionok körül.

A Cat-315 immunoreaktív perineuronális mátrix sok esetben kollokalizál a kálium csatornákkal, de nem vesz körül kolinerg és monoaminerg neuronokat

Kettős jelöléseinkben megmutattuk, hogy az isztmikus mag nagysejtes részében (Imc), illetve a tectum opticum 10. és 11. rétegében a Cat315-el jelölt perineuronális hálók kolokalizáltak a Kv3.1 β alegységgel rendelkező feszültségfüggő káliumcsatornákkal. Ezt a jelenséget már az egészen fiatal állatokban is megfigyelhettük. Ezzel ellentétben a ventralis pallidum kolin acetil-transzferáz immunoreaktív kolinerg neuronjai illetve az agytörzsi tirozin-hidroxiáz-immunoreaktív monoaminerg neuronok elkülönültek a Cat315-immunoreaktív profiloktól. Ezen megfigyelések jelentősége az, hogy összecseng a korábban vizsgált emlősökben tapasztaltakkal, és egy filogenezisben megőrzött sejtbológiai sajátosságra hívja fel figyelmünket.

A kondroitinszulfát proteoglikánok megjelenése független a beérkező inger mennyiségétől csirke látórendszerében

Vizsgált emlősökben, mint macskában és hörcsögben az extracelluláris mátrix kiépülése ingerfüggő folyamat, amit több szenzoros rendszerben is vizsgáltak, bizonyítottak. 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 el.

Az extracelluláris mátrix megjelenését a tectofugalis pálya fő állomásain és szabályozó magjaiban, így a tectum opticumban, a nucleus rotundusban, az entopalliumban és a nucleus isthmi pars magnocellularisban vizsgáltuk. 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. 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 hálókat és a diffúzan eloszló mátrix háttérrel aggregált tengelyfehérje- (Cat-315) és link-protein ellen termelt (CRTL-1) antitestekkel jelenítettük meg.

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. Az antitestekkel jelölt diffúz mátrix mindkét esetben erősen festődött, mind a megkímélt, mind a letakart oldalon gyakorlatilag ugyanolyan mértékben. Nagyon enyhe intenzitásbeli különbségeket csupán elvéve 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.

Minden vizsgált régióban, tehát a tectum opticumban, az isztnikus 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.

A tectum opticumban, különösen a 10. és 11. rétegben jól felismerhető perineuronális hálókat láthattunk amellet, hogy a diffúz mátrix szintén erősen jelölődött. 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. A nucleus rotundus perineuronális hálói halványabbak voltak, de mindkét oldalon tisztán ábrázolódtak. Végül az entopallium extracelluláris mátrixa mindkét féltekében szinte teljesen hasonló festődéssel jelent meg.

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. 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.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink a neuronális extracelluláris mátrix plasztikus aspektusait vizsgálta több szempontból és kérdésfelvetéssel, 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 mátrixmintázattól. 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 sejttestben, dendritben, de mielinhüvelyes axonban is igazoltak, feltételezzük, hogy az aggregán termeléséért mind a pre-mind a posztszinaptikus 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 sejttest 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.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:

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. 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

Az értekezés alapját nem képező eredeti közlemények:

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. 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.

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.

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.

Nemzetközi folyóiratban megjelent absztrakt:

1. 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.