Az extracelluláris mátrix morfológiai analízise az ember központi idegrendszerében

Doktori tézisek

dr. Lendvai Dávid

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományok Doktori Iskola

Témavezető:	**Dr. Alpár Alán,** egyetemi docens, Ph.D.
Hivatalos bírálók:	**Dr. Matesz Klára,** egyetemi tanár, az MTA doktora
	Dr. Nagy Nándor , egyetemi adjunktus, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke:	**Dr. Röhlich Pál,** egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai:	**Dr. Halasy Katalin** egyetemi tanár, az MTA doktora
	Dr. Takács József, C.Sc.

Budapest
2014

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. 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 központi idegrendszerben az idegsejtek, gliasejtek és azok nyúlványai közötti szűk teret kitöltő extracelluláris mátrix több komponensű struktúra, amely a neuron és a glia közös terméke. Előfordulása, összetétele az idegrendszerben eltérő, ugyanakkor változékony is, mert a funkcionális változások a mátrix megjelenésében vagy éppen eltűnésében, átalakulásában jól követhetők. Ma már ismert, hogy az agyvelő állományának 20%-át az extracelluláris mátrix tölti ki. A gerincesek központi idegrendszerében, az amorf alapállomány molekulái vannak a legnagyobb mennyiségben jelen, így a továbbiakban ezekre a molekulákra fektetünk hangsúlyt.

Az extracelluláris mátrixot felépítő molekulák osztályokba sorolhatók. Fontos csoportjuk a poliszacharid láncokból felépülő glükózaminoglikánok (GAG-ok). A glükózaminoglikánok kovalensen kötődhetnek fehérjékhez, létrehozva egy másik csoportot, a proteoglikánokat. A glukózaminoglikánok 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 aggrekánra koncentráltunk, mivel erről ismert, hogy neuronok termelik. Az aggrekán 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 legnagyobbrészt a hozzájuk kötődő molekulákból, a hialuronsavból, link proteinből és adhezív glikoproteinekből, ezeken belül pedig leginkább tenaszcinokból épülnek fel.

Jóllehet az extracelluláris mátrix molekulái az agyszövetben homogénen kiterjedve mindenütt jelen vannak, bizonyos típusú neuronok

teste és proximális dendritjei körül aggregátumokat hoznak létre. Az így létrejött struktúrát perineuronális hálónak nevezzük. Ez a „öltözék” rendkívül fontos szerepet tölt be az idegsejtek életében. Az extracelluláris mátrix újabban leírt formája, izoláltan az axonok végbunkói köré rakódik le, melyet periaxonális hüvelyeknek nevezünk.

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 rendkívül fontos funkciókkal rendelkeznek. Fontosak az extracelluláris tér és az intracellulárisan található sejtváz közti kapcsolat létrehozásában. Jelentős szerepet játszanak az ionhomeosztázis fenntartásában, gyakran találhatóak gátló interneuronok körül. Védelmet nyújtanak a neurodegeneratív folyamatokkal szemben és szabályozó szerepük van a szinaptogenezis során. Az is bizonyított, hogy a kifejlett extracelluláris mátrix ellenáll a közeledő neuriteknek, valamint, hogy csökkenti az idegsejtek plasztikus tulajdonságait. A plasztikus tulajdonságok alatt az idegsejtek szinaptikus kapcsolatainak változásait, erősségük, illetve hatékonyságuk módosulásait értjük.

A következőkben leírt kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogyan jelenik meg a extracelluláris mátrix az ember központi idegrendszerében.

Az emberi gerincvelő különböző szakaszainak mátrix felépítését és morfológiai sokféleségét vizsgáltuk. Tanulmányoztuk a perineuronális hálók kapcsolatát az alapvető mátrixkomponensekkel. A többszörös jelölések kimutattuk az extracelluláris mátrix különböző neuronális-, neurotraszmitter- és receptor altípusokhoz való viszonyát. Rávilágítottunk, hogy a perineuronális hálók illetve a periszinaptikus hüvelyek hol és milyen mennyiségben fordulnak elő.

Az ember külső térdestestében kapott eredményeink meglepő fordulatot hoztak, mivel eredményeink az eddig emlősökben kapott eredményektől eltérnek.

A humán hippocampusban elkészítettük kondroitinszulfát proteoglikán tartalmú mátrixtérképet. Olyan perineuronális hálókat figyeltünk meg, melyek az emberben a korábbi – emlősökben tapasztalt – adatoktól eltérően más idegsejteket borítanak.

CÉLKITŰZÉSEK

Az emlősök központi idegrendszerének extracelluláris mátrixát több fajban vizsgálták. Hasonló ismeretek humán mintákon csak hiányosan és korlátozottan állnak rendelkezésre. Munkánkkal ezt az űrt kívántuk pótolni; három, a központi idegrendszer eltérő felépítésű és hierarchiájú területére irányítottuk figyelmünket, hogy ott az extracelluláris mátrix és annak korábban ismertetett komplex megjelenési formáit, kémiai heterogenitását feltérképezhessük. Ebben a perineuronális mátrix legfőbb komponensét, a kondroitinszulfát proteoglikánok családjába tartozó aggrekánt és brevikánt vizsgáltuk.

1. A gerincvelőben folytatott terápiás törekvések arra összpontosítanak, hogy az axonregenerációt az extracelluláris mátrix bontásával megkönnyítsék. Ezek a vizsgálatok figyelmen kívül hagyják a neuronok közvetlen környezetét alkotó szomatodendritikus kompartmentet. Arra kerestük a választ, milyen neurokémiai összetételű perineuronális és periszinaptikus mátrix állomány található a gerincvelő különböző neuroncsoportjai és terminálisai körül, és mindez mutat-e eltéréseket a különböző morfológiai és neuroanatómiai funkciókkal bíró szegmensek között.

2. A köztiagyban a külső térdestestre fordítottuk figyelmünket, mert ezen a területen előzetes, áttekintő vizsgálataink során igen kis számban találtunk perineuronális hálókat. Feltettük a kérdést, hogy egy közismerten aplasztikus, kapcsolóállomásként szolgáló agyterület milyen kompartmentalizáltságú extracelluláris mátrixot alakít ki neuronjai körül.

3. A humán hippokampuszban folytatott munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogyan szerveződik egy köztudottan plasztikus kérgi agyterület mátrixösszetétele az emberi idegrendszerben, találunk-e filogenetikai különbségeket más emlősökben tapasztaltakhoz. Megvizsgáltuk, milyen neuroncsoportok és milyen természetű szinapszisok körül találunk fokális mátrixakkumulációt.

MÓDSZEREK

Humán minták

Az emberi szövetmintákat a Semmelweis Egyetem II. számú Pathológiai Intézete bocsátotta rendelkezésünkre, azok felhasználása a Semmelweis Egyetem etikai engedélyével történt. Mintáinkat olyan tetemekből kaptuk, amelyek kórtörténetükben semmilyen neurodegeneratív betegség jelét nem mutatták.

Agymintáinkat egy 15 és egy 18 óra PMD idejű tetemből, gerincvelő mintáinkat egy 12 és egy 15 óra PMD idejű tetemből nyertük.

Fixálás

A humán mintákon legtöbbször alkalmazott immerziós fixálás helyett az érpályán keresztül fixáltuk a központi idegrendszer szerveit. Az agy- és gerincvelőt először *in situ*, az artériás és vénás rendszerbe illetve a gerincvelő esetén a szubarachnoideális térbe vezetett kanülön keresztül perfúziós fixálóoldattal tartósítottuk.

Metszés

A mintáink egy részét fény-, immunfluoreszcens vizsgálatra dolgoztuk fel, ehhez 40 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A festésre szánt mintákat krioprotekció után kriosztáttal metszettük le.

Nemspecifikus endogén peroxidáz aktivitás csökkentése, blokkolási lépés

A fénymikrószkópos vizsgálatra feldolgozott metszeteket foszfát pufferben (PB) történt többszöri mosás után metanolban oldott H_2O_2 oldatába helyeztük azért, hogy az endogén peroxidáz aktivitást csökkentsük. További előkezelésként nátrium-borohidridben, hogy a képződött aldehidek mennyiségét redukáljuk. Ezt követte a blokkolási lépés, amit szarvasmarha szérum albumint, kazeint és normál szamár szérumot tartalmazó tritonos PB-ben végeztünk azért, hogy elkerüljük a nem-specifikus szekunder antitestkötést.

Lektinhisztokémia

A szabadon úszó metszeteket PB-ben higított biotinilált Wisteria floribunda agglutininnel (WFA) reagáltattuk egy éjszakán át, szobahőmérsékleten. PB-ben történt mosás után a szövetet avidin-biotin komplexbe helyeztük. Az összekapcsolódott avidin-biotin komplexet (ABC) egy kromogén, a 3,3'-diaminobenzidin segítségével (DAB) csapadék formájában tettük láthatóvá nikkel-ammónium-szulfát

jelenlétében azért, hogy a reakció intenzívebb legyen. Többszörös PB-rel történt mosás után a metszeteket zselatin bevonatú tárgylemezre húztuk fel.

Immunhisztokémia

A metszeteket éjszakán keresztül inkubáltuk a hígított primer ellenanyagokkal normál szamár szérumot tartalmazó tritonos PB oldatában. Többszörös immunjelölések esetén a primer antitesteket ugyanazon oldatban (koktélban) hígítottuk.

Aggrekán és brevikán alapú tengelyfehérje primer antitestekkel való detektálása

Az aggrekán tartalmú mátrixot monoklonális, az aggrekán tengelyfehérjét felismerő HAG7D4, Cat-301 és Cat-315 ellenanyagokkal, valamint az aggrekán kapcsolófehérjét felismerő, anti-CRTL-1 ellenanyaggal tettük láthatóvá. A mátrix brevikán komponensét brevikán ellenes ellenanyaggal, a tenaszcin molekulát pedig tenaszcin ellenes antitesttel jelenítettük meg. A hialuronsavat fehérje-kötési reakcióval tettük láthatóvá. A szabadon úszó metszeteket Streptomyces hyalurolyticusból izolált hialuronidáz enzimmel előkezeltük, majd specifikus biotilinált-hialuronsavkötő fehérjével reagáltattuk.

Szinaptikus markerek és a neuronok dendritjeinek primer antitestekkel való jelölése

Szinaptikus markerként, anti-glutamát-dekarboxiláz 65/67 antitestet, 1-es típusú vezikuláris glutamát transzporter ellenes antitestet vagy anti-parvalbumin antitestet használtunk. A neuronok azonosítására anti-kolin-acetiltranszferáz antitestet, anti-P anyag ellenes antitestet, a gamma-amino-vajsav (GABA) receptor ellenes antitestek közül a monoklonális $GABA_A$ ß2 ellenanyagot, a glicin receptor (Gly-R) ellenes antitestek közül pedig a monoklonális GlyR4a antitestet használtuk.

A neuronok dendritjeinek láthatóvá tételéhez SMI 311 antitestet, a gliasejtek megjelenítéséhez gliális fibrilláris savas protein (GFAP) ellenes antitestet használtunk.

Az epitópok fénymikroszkópos elemzéshez való láthatóvá tétele egyszeres jelölésekben

A primer antitest oldatát metszeteinkről eltávolítottuk, azokat PB-rel többször átmostuk. Ezután 60 percig biotinilált, szamárban termelt egér-, nyúl- vagy kecske ellenes immunglobulin savóval reagáltattuk (szekunder

antitest). Ismételt mosási lépések után a metszeteket az előre elkészített avidin-biotin komplekszel (ABC) reagáltattuk egy órán át szobahőmérsékleten. Az immunprecipitátumot nikkel-ammónium-szulfáttal felerősített DAB segítségével tettük láthatóvá. A fénymikroszkópos vizsgálatra szánt metszeteket zselatinozott tárgylemezre húztuk fel, és DePex-szel fedtük le.

Többszörös immunfluoreszcens jelölések

A kettős- és hármas immunfluoreszcens jelölésekhez a felsorolt szinaptikus vagy neuronális markereket az aggrekán vagy brevikán ellenes antitestekkel kombináltuk. A metszeteket ezután különböző fluoreszcens szekunder ellenanyagokkal, így többféle színű karbocianinnal (Cy2, Cy3, Cy5) konjugált szamárban termelt egér, nyúl vagy kecske elleni immunglobulinok keverékével reagáltattuk. A metszeteket végül felhúztuk tárgylemezekre és szárítás után glicerol zselatinnal fedtük le.

Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos feldolgozás során a külső térdestestből és a hippokampusz CA1 régiójából vibratómmal 50µm vastag metszeteket készítettünk, majd ezeket alaposan átmostuk 0,1 M-os PB-ben. Ezt követően a korábban ismertetett módon a külső térdestest esetében HAG7D4, míg a hippokampusz esetében HAG7D4 és brevikán immunjelölést végeztünk. A metszeteket 1 órán át ozmium-tetroxid oldatával szobahőmérsékleten utánfixáltuk, majd dehidrálás után Durcupan-ba ágyaztuk. A gyantába ágyazott mintákból ultravékony metszeteket készítettünk, ezeket Formvarral hártyázott gridekre vettük fel.

Képalkotás

Az immunperoxidázzal jelölt metszeteinket Nikon fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Bio-Rad Radiance 2100 Rainbow konfokális lézer szkenning mikroszkópot használtunk az immunfluoreszcensen jelölt minták vizsgálatához. Ultravékony metszeteinket JEOL1200 EMX elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk.

EREDMÉNYEK

Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formái az emberi gerincvelőben

Általános immunhisztokémiai megállapítások

A perineuronális és periszinaptikus extracelluláris mátrix a humán gerincvelőben jellegzetes regionális eloszlást mutat, nagy strukturális és kémiai sokszínűség jellemzi. A kondroitinszulfát proteoglikán alapú extracelluláris mátrix jellemzését a reprezentatív gerincvelői szegmensek analízisére alapoztuk. Különböző citokémiai markereket használtunk a mátrixkomponensek és a neuronok azonosítására.

Öt alapvető extracelluláris mátrixkomponenst vizsgáltunk a kémiai heterogenitás feltérképezéséhez: hialuronsav, aggrekán, brevikán, CRTL-1 (HAPLN-1, link protein) és a tenaszcin komponenseket. Hialuronsav és tenaszcin tartalmú extracelluláris mátrixot az emberi gerincvelő fehér- és szürkeállományában majdnem mindenütt találtunk. Figyelemre méltó, hogy a *substantia gelatinosa* területén gyengén vagy egyáltalán nem tapasztalhatunk hialuronsav immunrekativitást. Megfigyeléseink azt mutatták, hogy a tenaszcin festődés a hátsó szarv területén intenzív, különösen a gerincvelő háti, ágyéki és keresztcsonti szakaszán. Elsősorban aggrekán, brevikán és CRTL-1 pozitív aggregátumokat figyeltünk meg a neuronok szómája, dendritjei és axonterminálisai körül. Ezek a szürkeállományban koncentrálódtak, megkímélve a fehérállományt. Perineuronális hálókat leginkább aggrekán immunoreaktivitásuk alapján azonosítottunk. Ezzel szemben a brevikán és a CRTL-1 a disztális dendritszakaszok mentén fordult elő.

Munkánk során a gerincvelő szakaszainak részletes immunhisztokémiai elemzését is elvégeztük. Összehasonlítottuk egymással a gerincvelő különböző szegmenseinek mátrixösszetételét. Legfontosabb megfigyeléseink, hogy a gerincvelő hátsó szarvában hiányzik az aggrekán-immunreaktivitás, a CRTL-1 és a brevikán jelen van a *substantia gelatinosa* területén, azonban a Lissauer-zónában nem mutatkozik, a Clarke-Stilling- és intermediomediális magok jól elhatárolódnak az idegsejtek körül található vastag perineuronális hálók révén és számos elülső szarvi motoneuron van körülvéve perineuronális hálókkal.

Perineuronális hálók jellemzően a gerincvelő távoli kapcsolatokkal bíró régióiban találhatóak, így a szürkeállomány ventrális és oldalsó szarvában kiterjedt aggrekán immunreaktivitást találtunk. A perineuronális hálóval rendelkező magok közé tartozik a Clarke-Stilling mag, az intermediomediális mag és az elülső szarvi nagy motoneuronok csoportja.

Míg ezek a magok különböző – motoros, szenzoros vagy vegetatív – rendszerek részei, közös jellemzőjük, hogy távolra projíciáló neuronokat tartalmaznak. Ez ellentétben áll a legtöbb agyi régióban találtakkal, ahol a perineuronális hálók interneuronok és nem principális sejtek körül fordulnak elő. A „kapcsolat" a hosszú axonnal rendelkező neuronok és a perineuronális hálók között azonban korántsem kizárólagos, mivel például az intermediolaterális magokban vannak olyan neuronok, amelyek nem rendelkeznek perineuronális háló borítékkal.

A hátsó szarvat nagyszámú afferens rost éri el, amelyek a Lissauer-zónán keresztülhatolnak a szürkeállományba. Megfigyeltük, hogy itt izolált mátrix aggregátumok jelennek meg, amelyek a mi készítményeinken CRTL-1 vagy brevikán tartalmú periaxonális hüvelyként tűnnek fel, feltehetően szinapszisok körül.

Az extracelluláris mátrix kapcsolata specifikus neuronokkal, neurotranszmitterekkel és receptorokkal

Az extracelluláris mátrix különböző neuron típusaival, neurotranszmitterekkel és receptor típusokkal való kapcsolatainak vizsgálatához a gerincvelő nyaki szakaszát választottuk. A legszembetűnőbb neuronpopulációt a nagy kolinerg motoneuronok alkották, amelyek a gerincvelő elülső szarvában csoportosulnak. A legtöbb ilyen neuront (nyaki szegmens: 71%, mellkasi szegmens: 64%; ágyéki szegmens: 64%, szakrális szegmens: 81%) aggrekán-immunreaktív perineuronális háló vette körül, különböző intenzitással borítva a szomatodendritikus szakaszt. Mindazonáltal nem minden ChAT-immunreaktív neuron rendelkezett perineuronális hálóval és a perineuronális hálók sem kizárólagosan kolinerg neuronok körül mutatkoztak. Ezzel ellentétben a brevikán-immunreaktív mátrix a dendritek disztálisabb részén jelent meg nagy intenzitással; jellemzően azonban periaxonális hüvelyekként jelentek meg a neuronok felszíne mentén.

Nagy számban találtunk Gly-R immunreaktivitást a gerincvelő szürkeállományának egész területén, de azok nem kolokalizáltak a HAPLN-1-immunreaktív profilokkal. Ezzel ellentétben a brevikán-immunreaktív periaxonális hüvelyek kolokalizációt mutattak Gly-R-kal. A nagy motoneuronok dendritjei mentén láthatóak a HAPLN-1-immunreaktív profilok, amelyek átfedtek a $GABA_A$-immunreaktivitással.

A serkentő szinapszisok vizsgálatához 1-es típusú vezikuláris glutamáttranszporter (VGLUT-1) ellenes antitestet használtunk. A VGLUT-1-immunoreaktivitás a gerincvelő szürkeállományában mindenütt fellelhető volt. CRTL-1-immunoreakció kirajzolta dendritszakaszokon, azzal kollokalizálva többször is találtunk VGLUT-1-immunfestett profilokat.

A CRTL-1 homogén immunreaktivitása alacsony volt a hátsó szarv I és II laminájában, ami lehetővé tette számunkra, hogy a P-anyag immunreaktivitást mutató területeket körülvevő periszinaptikus mátrixot vizsgáljuk. Nem találtunk kolokalizációt vagy közeli kapcsolatot a P-anyag-immunfestett rostok és a CRTL-1-immunreaktív mátrix profilok között.

Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formái az ember külső térdestestében

A különböző mátrixkomponensek ellen termelt antitestek részleges, de nem teljes átfedéssel jelenítették meg a külső térdestest sejtes elemei körül megjelenő extracelluláris mátrixot.

Legfontosabb megfigyelésünk az volt, hogy olyan tipikus perineuronális hálókat, amiket a gerincesek központi idegrendszerében – köztük az emberében – korábban leírtak, a külső térdestestben nem találtunk, az immunfestés gyenge volt az idegsejtek szómája körül. Kis ovoid alakú periaxonális hüvelyeket azonosítottunk a térdestest különböző rétegeiben. Ez éles kontrasztban áll azon korábbi, más emlősökben végzett tanulmányokkal, melyek szerint a kondroitinszulfát proteoglikán alapú extracelluláris mátrix más emlősök külső térdestestjében perineuronális hálók formájában jelenik meg. A periaxonális hüvelyek tömegesen jelentek meg a proximális- és intermedier dendritek körül, kirajzolva a neuronok dendritjeinek kontúrját.

WFA lektinhisztokémiai jelöléssel sem perineuronális hálók, sem periaxonális hüvelyek nem festődtek a *corpus geniculatum lateraleban*. A lektinjel hiánya azonban nem a szövet vagy fixálási folyamat hibája, mivel több tipikus perineuronális hálót fedeztünk fel a – a külső térdestesttől dorzálisan elhelyezkedő – *pulvinar thalamiban*. Ezt anti-aggrekán immunfestéssel (HAG7D4) szintén azonosíthattuk.

Aggrekán tengelyfehérje kimutatása HAG7D4 anti-aggrekán immunreakcióval

Mind a parvo-, mind a magnocelluláris rétegekben találtunk HAG7D4-immunoreaktivitást. A magnocelluláris rétegek látványosan erősebben festődtek. A nagysejtes rétegekben (1. és 2. réteg) a dendriteket a periaxonális hüvelyek körvonalazzák, néhány esetben igen hosszan (közel 30-40 μm-es szakaszon). Másrészről a periaxonális hüvelyek véletlenszerűen és elszórtan is megjelentek a külső térdestestben. Erős immunreaktivitású perineuronális hálókat az 1. és 2. magnocellularis rétegek közötti interlamináris rétegben azonosítottunk. A parvocelluláris

rétegekben sokkal gyengébb homogén háttérjelet tapasztaltunk, viszont ennek köszönhetően felfedeztünk néhány perineuronális hálót. A neuronok periszomatikus része nem, azonban a dendritek kontúrja tisztán kivehető volt.

A peridendritkus mátrix nem összefüggően festődött. A peridendritikus hüvelyeket 40-50 µm vagy annál hosszabb szakaszon lehetett követni a dendritek mentén. A látszólag egyenletes eloszlású, független, nem csoportosuló periaxonális hüvelyekkel nem találkoztunk olyan gyakran, mint a magnocelluláris rétegekben.

CRTL-1 immunreaktivitás jellemzői a külső térdestestben

A CRTL-1-immunreaktivitás során kapott eredményeink hasonlítottak, de nem teljesen azonosak a HAG7D4 immunfestés eredményeivel. A magnocelluláris rétegekben erősen immunreaktív periaxonális hüvelyekkel találkoztunk. A periaxonális hüvelyek a legtöbb esetben látszólag rendezetlenül helyezkedtek el, azonban a dendriteken láncokat formáltak és szinaptikus végződések soraira emlékeztettek. A parvocelluláris rétegben csak nagyon kevés, gyengén festődő mátrixelemmel találkoztunk. Ezek a képletek sokszor nehezebben azonosítható periaxonális hüvelyek voltak, melyek rövid láncokba rendeződtek és hasonlítottak a maximum 10-20 µm hosszan követhető, HAG7D4-immunreaktív peridendritikus mátrixmintázatra. Jóllehet CRTL-1 immunfestéssel nem láttunk olyan jól kivehető neuronális kontúrokat, mint a HAG7D4-immunhisztokémiával, a tipikus immunreaktív struktúrák mindkét esetben periaxonális hüvelyek voltak.

Cat-301 és Cat-315 immunreaktivitás jellemzői

A Cat antitestek között a Cat-315 nyújtotta a legegyedibb immunfestést. A magnocelluláris rétegekben kis periaxonális hüvelyek foglaltak helyet, vékony, rövid (15 µm hosszúságú) periaxonális hüvely láncolatokat hoztak létre. A parvocelluláris rétegekben a perikarionok közötti terület nagyon halványan festődött, azonban így találkoztunk – más immunfestéssel nem detektálható – vékony, rostszerű struktúrákkal is. Egyes esetekben úgy tűnt, hogy dendritikus szakaszok körvonalazódnak, immunreaktivitás ugyanakkor alig voltak kivehető a sejttestek körül. A magnocelluláris rétegben a HAG7D4- és CRTL-1-immunreaktív profilokhoz hasonló struktúrákat láttunk, mindazonáltal nem sikerült teljes biztonsággal azonosítani a dendritek tengelyét, ezért a neuronális formák csak néhol sejlettek fel a diffúz mátrixban.

A Cat-301 festéssel gyenge periszomatikus és erősebb peridendritikus jelet tapasztaltunk a nagysejtes rétegekben és hasonló, de

bizonytalanul azonosítható profilokat a kissejtes rétegben. Mindazonáltal periaxonális hüvelyeket mind a parvo-, mind a magnocelluláris rétegekben láttunk.

Az aggrekán kolokalizációja más extracelluláris mátrix markerekkel

Konfokális lézermikroszkóppal végzett vizsgálataink szerint a HAG7D4-immunreaktív periaxonális hüvelyek nagy része kolokalizál a CRTL-1-immunreaktív struktúrákkal. Ezzel szemben ritkán azonosítottunk HAG7D4/Cat-315 kettősen immunreaktív struktúrát a magnocelluláris rétegekben. Ez valószínűleg azt jelentheti, hogy a Cat-315 antitest nem csak az aggrekán tengelyfehérjét ismeri fel, hanem egy másik epitópot, melynek gliális eredetét már korábban gyanították.

Szinaptikus markerek megjelenése az aggrekán-immunreaktív struktúrák közvetlen szomszédságában

Kettős immunfluoreszcens jelöléseink azt mutatták, hogy a HAG7D4-immunpozitív struktúrák több esetben VGLUT-1-t tartalmazó profilok közvetlen szonszédságában találhatók. A GAD-immunreaktív profilok – amelyek száma kevesebb volt – gyakrabban mutattak átfedést a HAG7D4-immunreaktív struktúrákkal. Viszonylag kevés PV-immunpozitív struktúra tűnt fel a HAG7D4-immunreaktivitás közelében. Kvantitatív méréseink azt mutatták, hogy a VGLUT-1, illetve a PV-immunreaktív profilok kis hányada (4-6%) van szoros kapcsolatban a HAG7D4-immunpozitív periaxonális hüvelyekkel, míg ez az arány 38%-ra nőtt a GAD pozitív profilok esetében.

A különböző extracelluláris mátrix komponensek kapcsolata a neuronális vagy gliális struktúrákkal

A HAG7D4 és a Cat-315 immunfestés hasonló fenotípusú, de feltételezhetően különböző struktúrákhoz kapcsolódik. Az SMI-311-immunreaktív dendritek mentén számos HAG7D4-immunreaktív periaxonális hüvelyt azonosítottunk. Ezzel szemben a Cat-315-immunjelölt profilok néha GFAP-immunpozitív struktúrákkal is kolokalizáltak.

Elektronmikroszkópia

Ultrastrukturális szinten HAG7D4 immunreaktivitást a szóma körül kevésbé, inkább a dendritek proximális szakaszai körül tudtunk azonosítani. Immunoreaktivitásra utaló elektrondenzitást a sejten kívüli térben találtunk. Ezek a vékony, jelölt mátrix akkumulációk több esetben axodendritikus junkciók és néhány esetben a gliális struktúrák közvetlen közelében voltak láthatóak.

Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formája az emberi hippokampuszban

Aggrekán-immunreaktivitás az ember hippokampuszának extracelluláris mátrixában

Az aggrekán eloszlását a tengelyfehérjéhez kötődő AB1031 és Cat-301, valamint az N-terminálishoz kötődő HAG7D4 antitestekkel vizsgáltuk.

A hippokampusz minden területén detektáltunk perineuronális hálókat, ezek a különböző régiókban és azok rétegeiben eltérő módon fordultak elő.

A perineuronális hálók AB1031-, Cat-301- és HAG7D4-immunoreaktivitása gyakran, de nem minden esetben fedett át, piramissejtek körül azonban egyik antitestünkkel sem sikerült megjeleníteni azokat. Perineuronális hálókat leggyakrabban a CA1 régióban lehetett látni, különösen a stratum oriensben, multipoláris neuronok körvonalát kirajzolva. Míg a piramissejtek rétege nagyrészt aggrekán immunonegatív volt, sok multi- vagy bipoláris morfológiai megjelenésű perineuronális hálót azonosítottunk a stratum radiatum és lacunosum-moleculare rétegekben. Az entorhinális kérget a principális réteg intenzív mátrix pozitivitása tette könnyen felismerhetővé.

Különböző fenotípusú perineuronális hálókat azonosítottunk, így éles kontúrú „klasszikus” és „diffúz” altípusokat, melyek létezésére korábbi tanulmányok már utaltak. Az AB1031-, Cat-301- vagy HAG7D4-immunreaktív mátrix hüvelyeket alakított ki a dendritek mentén, melyeket több mint 50 μm hosszan, egészen a második- és harmadik dendritarborizációig követni tudtunk. Aggrekán-immunreaktív mátrixszal körülvett axon iniciális szegmenseket, mint vékony, a szómából vagy az elsőrendű dendrit legproximálisabb részéből eredő struktúraként azonosítottunk. Elektronmikroszkópos vizsgálataink azt mutatták, hogy aggrekán-immunreaktív mátrix a posztszinaptikus dendriteket és dendritikus tüskéket borította, csak alkalmanként húzódva rá az axonterminálisokra, vagy preszinaptikus axon szakaszokra, izolálva ezzel a teljes szinapszist.

CRTL-1-immunoreaktivitás periaxonális hüvelyeket alkot a serkentő és gátló szinapszisok körül

A CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek réteg- és régiospecifikus eloszlást mutattak a hippokampuszban. Az aggrekán eloszlásával összehasonlítva a CRTL-1-immunfestett perineuronális hálók a CA1 régióban kevésbé gyakran fordultak elő, inkább

a stratum oriens és radiatum rétegekre korlátozódtak. Ezek éles kontúrú, "klasszikus" típusú perineuronális hálók voltak, kiterjedt peridendrikus hüvellyel. A CA2 régióban a stratum oriensben és radiatumban találtunk perineuronális hálókat. Erős, diffúz immunoreaktivitást figyeltünk meg a CA2 régióban, mely jól elhatárolta a szomszédos CA1 és CA3 régiókat egymástól.

Ez a megállapítás alátámasztja a korábbi – rágcsálókban leírt – adatokat, amely szerint sűrű extracelluláris mátrix proteoglikán és lektin aktivitás észlelhető ugyanezen területen. Ezzel szemben az anti-aggrekán immunfestéseinkkel összehasonlítva perineuronális hálókkal a CA3 régió minden rétegében találkoztunk és axon iniciális szegmenseket is észleltünk. A perineuronális mátrix immunoreaktivitás sokszor csak a sejttest körüli részre korlátozódott, a dendritek nem rajzolódtak ki. Az entorhinális kéregben prominensen jelölt „szigetek" tűntek fel a külső principális rétegben. A gyrus dentatus hilusa sok perineuronális hálót tartalmazott, ugyanitt nagyszámú, 1-3µm átmérőjű, erős denzitású periaxonális hüvellyel is találkoztunk a szemcsés réteg hiláris határán. A periaxonális hüvelyek hasonló gyakorisággal fordultak elő az enthorinális kéregben is, számuk jóval meghaladta a CA régiókban tapasztalt mennyiséget. Ultrastrukturális elemzés azt mutatta, hogy CRTL-1-immunpozitivitás fellelhető mielinizált axonokban, leggyakrabban azonban az axonterminálisok köré korlátozódik, beleértve a szinapszisokat. Ehhez csatlakozó, konfokális lézer szkenning mikroszkóppal végzett vizsgálataink azt bizonyították, hogy perineuronális hálókba ágyazottan mind VGLUT-1-immunreaktív serkentő, mind GAD-immunreaktív gátló szinapszisok előfordulnak, nem csupán a szómán, de disztálisabb dendritszakaszokon is. Ezek után felvetettük a kérdést, hogy vajon a szinapszisok képesek-e periaxonális hüvelyt kialakítani periszomatikus vagy peridendritikus mátrix hiányában. A gyrus dentatus hiláris régiójában sikerült is azonosítani olyan egyedülálló preszinaptikus struktúrákat, melyeket CRTL-1-immunreaktív periaxonális hüvely burkolt be.

A brevikán (50 kDa fragmensének) felhalmozódása a periaxonális hüvelyekben

A brevikán proteolitikus hasítása után egy N-terminális (50kDa) és egy intermedier/C-terminális (90 kDa) fragmens keletkezik. Jelen eredményeinkhez a brevikán 50 kDa-os fragmense ellen termelt antitestet használtuk azért, hogy kimutathassuk, a humán hippokampusz brevikán tartalmú extracelluláris mátrix mintázata teljesen eltér az eddig leírt hippokampális mátrixtérképektől.

Perineuronális hálók csak szórványosan fordultak elő a CA régiókban, a stratum oriens és radiatum rétegekben. Ehelyett a brevikán-immunreaktív struktúrák túlnyomórészt periaxonális hüvelyekként jelentek meg, gyöngysorszerűen rendeződve a gyrus dentatus hilaris oldalán. Hasonlóan nagy számban találtunk periaxonális hüvelyeket az entorhinalis kéregben, és jóval kisebb sűrűségben a CA1-CA3 mezőkben (jóllehet a stratum lacunosum-molecularebban hiányoztak) valamint a subiculum területén. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok igazolták azt a feltevésünket, hogy a brevikán-immunreaktív periaxonális hüvelyek szinapszisokat vesznek körül. Bizonyítottuk, hogy a brevikán tartalmú extracelluláris mátrix profilok beborítják az egyes szinapszisokat anélkül, hogy összefüggő mátrix aggregátumokat hoznának létre posztszinaptikus dendriten vagy szómán. Az ultrastruktúra vizsgálata arra is fényt derített, hogy brevikán immunreaktivitás a mielinizált axonokban is jelen van. Ez az eredmény arra utal, hogy a periaxonális hüvelyeket a preszinaptikus neuronok is termelhetik.

Parvalbumin-, calretinin- és calbindin-immunpozitív hippokampális interneuronok körüli perineuronális hálók

Humán hippokampusz mintáinkban azt tapasztaltuk, hogy parvalbumin-immunreaktív interneuronokat gyakran vesz körül aggrekán tartalmú perineuronális háló.

Hasonlóan magas arányt állapítottunk meg a stratum oriensben található CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálók esetében is, ugyanakkor a stratum radiatumban nem találtunk a parvalbumin-immunfestett neuronok körül CRTL-1-immunreaktív periszomatikus mátrixállományt. A calretinin- és calbindin-immunpozitív neuronok körül az alacsonyabb rendű emlősökben hiányoznak a perineuronális hálók. Ezzel ellentétben az emberi hippokampuszban a calretinin-immunopozitív neuronok egy alpopulációja körül aggrekán tartalmú, vagy a CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálók megtalálhatóak voltak, és kivételes esetekben calbindin D28k-immunreaktív interneuronok körül is.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az ember központi idegrendszerének extracelluláris mátrixa regionális különbségeket mutat eloszlásában és fenotípusában.

1. Megállapítottuk, hogy humán gerincvelőben a perineuronális hálókban és periaxonális hüvelyekben markánsan jelen van az aggrekán és a brevikán alapú extracelluláris mátrix. A gerincvelő teljes kraniokaudális kiterjedését elemezve kimutattuk, hogy perineuronális hálók jellegzetesen a hosszú axonú neuronokkal bíró magokban fordulnak elő, függetlenül attól, milyen rendszerhez vagy pályához tartoznak. Izolált periaxonális hüvelyeket nagy számban azonosítottunk a hátsó szarvban, melyek ugyanakkor szabadon hagyták a fájdalomérző afferenseket. A nyaki, mellkasi, ágyéki és keresztcsonti szakaszokon nagymértékben hasonló mátrix mintázattal találkoztunk.

2. Az emberi külső térdestestben talált extracelluláris mátrix a többi vizsgált emlős fajokkal merőben eltérő eloszlást mutatott. Mind ezekkel, mind a kérgi területekkel tapasztaltakkal ellentétben a perineuronális mátrix nem szerveződik hálókba. Úgy találtuk, hogy a dendriteken végződő szinapszisokat borító periaxonális hüvelyek körvonalazzák az idegsejtek nyúlványait. A magnocelluláris rétegek – szemben a parvocelluláris rétegekkel – intenzív mátrix immunreaktivitást mutattak.

3. Az ember hippokampusz formációjában kimutattuk, hogy principális sejtek körül nem fordul elő perineuronális háló. Az interneuronok csoportján belül nem csak a parvalbumin tartalmú, gyorstüzelő kosár- és csillársejtek, hanem a calretinin- és calbindin-pozitív interneuronok körül is megfigyeltünk perineuronális hálókat. Mindezen megállapítások az emberi hippokampuszra specifikus megfigyelések, az eddigi általános érvényűnek elismert filogenetikai megállapításokkal nem megegyezőek. Kimutattuk, hogy a periaxonális hüvelyek eloszlása szélsőségesen különböző, azok a gyrus dentatusban és az entorhinális kéregben fordulnak elő nagy sűrűségben. Ultrastrukturális elemzéssel annak a lehetőségére világítottunk rá, hogy a periszinaptikus mátrixösszetevőket a preszinaptikus neuron is termelheti.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények:

Lendvai D, Morawski M, Brückner G, Négyessy L, Baksa G, Glasz T, Patonay L, Matthews RT, Arendt T, Alpár A. (2012) Perisynaptic aggrecan-based extracellular matrix coats in the human lateral geniculate body devoid of perineuronal nets. J Neurosci Res, 90: 376-387.

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 Neuropathol. 125(2):215-29.

Jäger C*, Lendvai D*, Seeger G, Brückner G, Matthews RT, Arendt T, Alpár A, Morawski M. (2013) Perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in the human spinal cord. Neuroscience. 238:168-84.

Gáti G, Lendvai D. The "dress" makes the neuron - different forms of the extracellular matrix in the central nervous system of vertebrates. (2013) Orv Hetil. 1067-73.

Az értekezés alapját nem képező eredeti közlemények:

Gáti G, Morawski M, Lendvai D, Jäger C, Négyessy L, Arendt T, Alpár A. (2010) Distribution and classification of aggrecan-based extracellular matrix in the thalamus of the rat. J Neurosci Res, 88: 3257-3266.

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

Alpár A, Ueberham U, Lendvai D, Naumann N, Rohn S, Gáti G, Arendt T, Gärtner U. (2011) Activity-induced dendrite and dendritic spine

development in human amyloid precursor protein transgenic mice. Int J Dev Neurosci. 107-14.

Poszterek:

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.

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.

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