

Az extracelluláris mátrix morfológiai analízise az ember központi idegrendszerében

Doktori értekezés

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

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| 1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK | 5 |
| 2. BEVEZETÉS | 8 |
| 2.1. Az extracelluláris mátrixról általában | 8 |
| 2.2. Az extracelluláris mátrix építőkövei | 9 |
| 2.2.1. Glükózaminoglikánok..... | 10 |
| 2.2.2. Glikoproteinek..... | 12 |
| 2.2.3. Proteoglikánok..... | 13 |
| 2.2.3.1 A lektikán család..... | 14 |
| 2.2.3.2. A lektikánok megoszlása különböző szövetekben..... | 16 |
| 2.2.3.3. A lektikánok szerepe a fejlődő idegrendszerben..... | 16 |
| 2.2.3.4. Lektikánok a differenciált idegszövetben..... | 17 |
| 2.2.4. Az aggregán és brevikán, mint a perineuronális hálók gerince..... | 18 |
| 2.2.4.1. Az aggregán molekula..... | 18 |
| 2.2.4.1.1. Az aggregán felépítése és szerepe..... | 18 |
| 2.2.4.1.2. Az aggregán lehetséges orvosi vonatkozásai..... | 21 |
| 2.2.4.2. A brevikán molekula..... | 21 |
| 2.2.4.3. Az extracelluláris mátrix kondenzált formái: a perineuronális háló és a periaxonális hüvely..... | 25 |
| 3. KÉRDÉSFELVETÉS | 29 |
| 4. ANYAG ÉS MÓDSZER | 30 |
| 4.1. Humán minták | 30 |
| 4.2. Fixálás | 30 |
| 4.3. Metszés | 31 |
| 4.4. Nemszpecifikus endogén peroxidáz aktivitás csökkentése, blokkolási lépés | 31 |
| 4.5. Lektinhisztokémia | 31 |
| 4.6. Immunhisztokémia | 32 |
| 4.6.1. Aggregán és brevikán alapú tengelyfehérje primer antitestekkel való detektálása..... | 32 |
| 4.6.2. Szinaptikus markerek és a neuronok dendritjeinek jelölése primer antitestekkel..... | 32 |
| 4.6.3. Az epitópok fénymikroszkópos elemzéshez való láthatóvá tétele egyszeres jelölésekben..... | 33 |
| 4.6.4. Többszörös immunfluoreszcens jelölések..... | 33 |
| 4.7. Elektronmikroszkópia | 37 |
| 4.8. Képkötés | 37 |
| 4.9. Kvantitatív adatok | 37 |
| 4.9.1. A HAG7D4-immunreaktív periaxonális hüvelyek szinaptikus markerek körüli gyakoriságának megállapítása a külső térdestestben..... | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4.9.2. Kvantitatív analízisek a hippocampusban | 38 |
| 4.9.3. Perineuronális hálók feltérképezése a hippocampusban | 38 |
| 5. EREDMÉNYEK | 39 |
| 5.1. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formái az emberi gerincvelőben | 39 |
| 5.1.1. Általános immunhisztokémiai megállapítások..... | 39 |
| 5.1.2. A gerincvelő szakaszainak részletes immunhisztokémiai jellemzése..... | 41 |
| a. Nyaki szakasz..... | 41 |
| b. Mellkasi szakasz | 43 |
| c. Ágyéki szakasz | 44 |
| d. Keresztcsonti szakasz..... | 46 |
| 5.1.3. Az extracelluláris mátrix kapcsolata specifikus neuronokkal, neurotranszmitterekkel és receptorokkal..... | 46 |
| 5.2. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formái az ember külső térdestestében | 51 |
| 5.2.1. Aggregán tengelyfehérje kimutatása HAG7D4 anti-aggregán immunreakcióval | 52 |
| 5.2.2. CRTL-1 immunreaktivitás jellemzői a külső térdestestben | 54 |
| 5.2.3. Cat-301 és Cat-315 immunreaktivitás jellemzői | 54 |
| 5.2.4. Az aggregán kolokalizációja más extracelluláris mátrix markerekkel..... | 56 |
| 5.2.5. Szinaptikus markerek megjelenése az aggregán-immunreaktív struktúrák közvetlen szomszédságában..... | 58 |
| 5.2.6. A különböző extracelluláris mátrix komponensek kapcsolata a neuronális vagy gliális struktúrákkal | 58 |
| 5.2.7. Elektronmikroszkópia | 59 |
| 5.3. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formája az emberi hippocampusban | 60 |
| 5.3.1. Aggregán-immunreaktivitás az ember hippocampusának extracelluláris mátrixában..... | 60 |
| 5.3.2. CRTL-1-immunreaktív periaxonális hüvelyek serkentő és gátló szinapszisok körül..... | 63 |
| 5.3.4. Parvalbumin-, calretinin- és calbindin-immunpozitív hippocampális interneuronok körüli perineuronális hálók | 68 |
| 6. MEGBESZÉLÉS | 71 |
| 6.1. Gerincvelő | 71 |
| 6.1.1. Az extracelluláris mátrixkomponensek eloszlása és az interszegmentális különbségek | 72 |
| 6.1.2. Az extracelluláris mátrix kapcsolata speciális neuronokkal, transzmitterekkel és receptorokkal..... | 73 |
| 6.1.3. Az extracelluláris mátrix aggregátumok jelentősége a gerincvelőben. Klinikai aspektusok..... | 74 |
| 6.2. Külső térdestest | 75 |
| 6.2.1. Az emberi külső térdestest kondroitinszulfát proteoglikán alapú extracelluláris mátrixának szerkezete | 75 |
| 6.3. Hippocampusz | 78 |

| | |
|--|------------|
| <i>6.3.1. A parvalbumin-immunreaktív interneuronok rétegbeli előfordulásoktól függően különbözhetnek perineuronális mátrixukban.....</i> | <i>79</i> |
| <i>6.3.2. Perineuronális hálók calretinin és calbindin tartalmú interneuronok körül is előfordulhatnak.....</i> | <i>79</i> |
| <i>6.3.3. A periaxonális hüvelyek a hilus régióban.....</i> | <i>80</i> |
| <i>6.3.4. A kondroitinszulfát proteoglikánok expressziója Alzheimer-kórban – az értekezéshez kapcsolódó, kollaborációban végzett kísérletek.....</i> | <i>81</i> |
| 7. KÖVETKEZTETÉSEK | 83 |
| 8. ÖSSZEFOGLALÓ | 85 |
| 9. SUMMARY | 87 |
| 10. IRODALOMJEGYZÉK..... | 89 |
| 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE..... | 110 |
| 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 111 |

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

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

ABC: avidin-biotin komplex (avidin-biotin complex)

ACAN: aggregán gén (aggrecan gene)

ADAMTS4: dizintegrin és metalloproteáz thrombospondin motívumokkal 4 (disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4)

ax: axon

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

BSA: szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)

BEHAB: agyi hialuronsav kötő fehérje (brain-enriched hyaluronic acid binding protein)

CA 1-4: Ammon-szarv régiók (*cornu Ammonis*)

Cat-301, Cat-315, Cat-316: A „cat” a macskára utal, a szám a klónra. Macska aggregán ellen termelt monoklonális antitest.

CD44: sejtfelszíni antigén 44 izoforma

ChABC: kondroitináz ABC (chondroitinase ABC)

ChAT: kolin-acetiltranszferáz (choline-acetyltransferase)

Cl: Clarke-féle oszlop

CRP-D: komplement szabályozó protein-D (complement regulatory protein domain-D)

CRTL-1: porcmátrix protein-1 (cartilage link protein-1)

CS: kondroitin szulfát (chondroitin sulfate)

CS-GAG: kondroitinszulfát-glükózaminoglikán (chondroitin sulfate glycosaminoglycan)

CSPCP: porc specifikus proteoglikán tengelyfehérje (cartilage-specific proteoglycan core protein)

CSPG: kondroitin-szulfát proteoglikán (chondroitin sulfate proteoglycan)

CSPG1: porc specifikus proteoglikán-1 (cartilage-specific proteoglycan -1)

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

DAB: 3,3'-diaminobenzidin (3,3' diaminobenzidin)

d: dendrit

EC: entorhinális kéreg (enthorinal cortex)
ECM: extracelluláris mátrix (extracellular matrix)
EGF: epidermalis növekedési faktor (epidermal growth factor)
erk1/Met: extracelluláris szignál mediált kináz/met proto-onkogén (extracellular-signal-regulated kinase-1 /hepatocyte growth factor receptor)
EPS: külső principális réteg (external principal stratum)
f: funiculus
G-1,2,3: globuláris domén-1, 2, 3 (globular domain-1, 2, 3)
GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
GAD65/67: glutaminsav-dekarboxiláz 65/67 (glutamic acid decarboxylase 65/67)
GAG: glükózaminoglikán (glucose-aminoglycane)
GD: *gyrus dentatus*
GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein)
Gly-R: glicinreceptor (glycine receptor)
GPI: glükozilfoszfatidilinositol (glycosylphosphatidylinositol)
gran: *stratum granulosum*
HAG: humán aggregán (human aggrecan)
HAPLN: hialuronsavat és proteoglikánt összekötő kapcsolófehérje (hyaluronan and proteoglycan binding link protein)
HAS-1,2,3: hialuronsav szintáz-1,2,3 (hyaluronan synthases-1,2,3)
Ig: immunglobulin
IGD: interglobuláris domén (interglobular domain)
Imm: intermediomediális
IPS: belső principális réteg (internal principal stratum)
KS: keratán szulfát (keratan sulfate)
L: Lissauer-zóna
lm: *stratum lacunosum moleculare*
mol: *stratum moleculare*
NF 186: neurofaszcin 186
NCBA: National Center for Biotechnology Information
ori: *stratum oriens*
PB: foszfátpuffer (phosphate buffer)

PMD: posztmortem idő (*post mortem* delay)

PV: parvalbumin, alacsony molekulásúlyú kalcium-kötő albumin fehérje (parvalbumin, calcium-binding albumin protein with low molecular weight)

paras: *parasubiculum*

pres: *presubiculum*

pros: *prosubiculum*

pyr: *stratum pyramidale*

rad: *stratum radiatum*

RHAMM: hialuronsav receptor (receptor for hyaluronic acid-mediated motility)

S, sub: szubikulum (*subiculum*)

s: szóma

SG: *substantia gelatinosa*

SMI 311: általános neuronális neurofilamentum marker (pan-neuronal neurofilament marker monoclonal antibody)

sp: dendrittüske (spine)

TBS: Tris-pufferelt fiziológiás sóoldat (tris-buffered saline)

TH: trozin-hidroxiláz (tyrosine hydroxylase)

VGAT: vezikuláris GABA transzporter (vesicular GABA transporter)

VGLUT1: 1-es típusú glutamát transzporter (vesicular glutamate transporter 1)

WFA: japán lilaakác agglutinin (*Wisteria floribunda* agglutinin)

„...Az itt lévő preparátumok idegsejtjeinek szerveződésében két sajátosság azonnal felismerhető: az egyik a külső felszínre vonatkozik, míg a másik a sejtmembránon belülré...”

Camillo Golgi; Società Medico Chirurgica, Padova 1898. április

2. BEVEZETÉS

2.1. Az extracelluláris mátrixról általában

Az extracelluláris mátrix (ECM) az állati szövet sejteken kívüli része, amely a sejteknek szerkezeti támaszt nyújt, és emellett számos egyéb – fiziológiás vagy patológiás – folyamatban tölt be kiemelten fontos szerepet. Ilyen például az embrionális fejlődés, a gyulladás, a véralvadás, a sebgyógyulás, a tumor metasztázis képzés, az angiogenezis és egyes belső szervek fibrotikus átalakulása.

Az extracelluláris mátrix a kötőszöveti rostok és az amorf alapállomány mellett, igen nagy mennyiségben tartalmaz folyadékot. A kötőszöveti rostok családja jól ismert, tagjai például a fehérjékből felépülő kollagénrostok. Az extracelluláris mátrix rostjai és az alapállomány molekulái jól szervezett hálózatot hoznak létre a sejtek között, melyekhez úgynevezett adhéziós molekulák segítségével kapcsolódnak (Alberts és mtsai 2002). A múltban végzett kutatások kétségbe vonták az extracelluláris mátrix jelenlétét a központi idegrendszerben, ugyanis igen sokáig tartotta magát a szemlélet, hogy nincsen „üres tér” a neuronok és gliasejtek között, a sejtjes elemek teljesen kitöltik a rendelkezésükre álló teret.

Ma már ismert, hogy az agyvelő állományának 20%-át az extracelluláris mátrix tölti ki (Nicholson és Sykova 1998). A gerincesek központi idegrendszerében az amorf alapállomány molekulái vannak a legnagyobb mennyiségben jelen (Zimmermann és Dours-Zimmermann 2008), így a továbbiakban ezekre a molekulákra fektetünk hangsúlyt. Ezen molekulák túlnyomó része proteoglikánok és glikoproteinek, melyek biokémiai szerkezetüket tekintve népes családokat alkotnak.

A változatosság a különböző típusú mátrixmolekulák mennyisége és szerveződésének módja között az adott szövetben lenyűgöző sokszínűséget mutat, az adott szövet funkcionális követelményeihez alkalmazkodik. Ennek a sokszínűségnek a hátterében a szénhidrátok kombinálhatóságának széles palettája rejlik.

A szénhidrátok szerepével foglalkozó glikobiológia tudománya a közelmúltban robbanásszerű fejlődésen ment keresztül. A tudományterület fejlődésének jelentős akadályát jelentették a szénhidrátok szintézisének és szerkezetük meghatározásának módszertani nehézségei. Az utóbbi néhány évtized jelentős technológiai fejlesztéseinek köszönhetően lehetővé vált a szénhidrátok változatos és komplex világának, valamint fiziológiás és patológiás körülmények között betöltött biológiai szerepének alaposabb megismerése.

A szénhidrátok összetettsége felépítésükből kifolyólag – kapcsolódási kombinációik révén – rendkívül sokszínű lehet. A szénhidrátok végleges formáját a glikozil-transzferáz (szénhidrát átvivő) és glikozidáz (szénhidrát eltávolító) enzimek alakítják ki. A glikoziláció a leggyakoribb poszttranszlációs módosítások egyike, szerepét azonban még kevésbé ismerjük. Jelentőségét hangsúlyozza az a megfigyelés, hogy a sejtek alapvető működéséhez szükséges fehérjék és lipidek igen nagy része glikozilált (az emberi fehérjék 50–70%-a). A szénhidrátstruktúrák bonyolultságukból kifolyólag hatalmas biológiai információtartalommal rendelkeznek. Alapvetően befolyásolhatják a sejtek működését: a sejten belüli, sejtek közötti és a sejt-sejtközötti állományban zajló (extracelluláris mátrix) kölcsönhatásokat, jelátviteli utakat, illetve az immunrendszer folyamatainak működését is (Marth és Grewal 2008).

Az extracelluláris mátrix szerkezete nem állandó, átalakulásaival folyamatosan alkalmazkodik a körülményekhez. Lebontásáért proteázok, főként a mátrix metalloproteázok a felelősek, újraképződése pedig mindig az aktuális körülményekhez igazodik. Ma már azt is tudjuk, hogy az extracelluláris mátrix a központi idegrendszeren belül milyen fontos folyamatokban tölt be kiemelt szerepet. Szabályozza azon sejtek működését, amelyekkel kapcsolatba kerül (Pyka és mtsai 2011), szerepe van a sejtek túlélésében (Morawski és mtsai 2010a), fejlődésében (Ida és mtsai 2006), migrációjában (Gu és mtsai 2009) és proliferációjában (Ariza és mtsai 2010). Bár az extracelluláris mátrix megértése még korántsem teljes, összetevőinek feltérképezése és vizsgálata az utóbbi néhány évtized kutatásainak köszönhetően jelentősen előremozdult.

2.2. Az extracelluláris mátrix építőkövei

Az extracelluláris mátrixot felépítő molekulák osztályokba sorolhatók. Fontos csoportjuk a poliszacharid láncokból felépülő glükózaminoglikánok. Ezek kovalensen

kötődhetnek fehérjékhez, létrehozva egy másik csoportot, a proteoglikánokat. Fehérjékkel társulva rostos szerkezetű proteineket is alkothatnak, mint: a kollagént, az elasztint, a fibronektint és a laminint. A proteoglikán molekulák a kötőszövetben egy erősen hidratált gélszerű „alapállományt” alkotnak, ebbe rostos szerkezetű fehérjék vannak beleágyazva, ilyen például a kollagén.

2.2.1. Glükózaminoglikánok

A glükózaminoglikánok elágazó poliszacharid láncok, amelyek diszacharid egységekből épülnek fel. Azért ez a nevük, mert az ismétlődő diszacharid egységekben az egyik molekula mindig amino-szénhidrát (N-acetilglükózamin, vagy N-acetilgalaktózamin), míg a másik molekula általában egy uronsav (glükuronsav, vagy iduronsav). Mivel gyakran tartalmaz karboxil-, vagy szulfocsoportot, ezért a glükózaminoglikánok a leginkább anionos jellegű molekulák, amelyeket az állati sejtek termelnek.

A diszacharidot felépítő hexózok típusa, szulfatáltsága és kötéseik milyensége alapján a glükózaminoglikánokon belül megkülönböztetünk (1) hialuronsavat (vagy más néven hialuronátot), (2) kondroitin- (Hámori és mtsai 1974), (3) dermatán-, (4) heparán- és (5) keratánszulfátokat (Esko és mtsai 2009). Ezek a glükózaminoglikánok általában túl merevek ahhoz, hogy olyan glomeruláris szerkezetet vegyenek fel, mint egy polipeptid lánc, ezen felül még hidrofilek is. Így a glükózaminoglikánok a relatív tömegükhöz képest nagymértékben képesek kitölteni a rendelkezésükre álló teret, és már igen kis koncentrációban képesek úgynevezett gél alkotni. A negatív töltések nagy sűrűsége vonzza a kationokat, elsősorban a nátrium ionokat, amelyről ismert, hogy ozmotikusan aktív, így nagy mennyiségű vizet képesek megkötni a mátrixban. A mátrix funkciói lényegében a kis és közepes molekulák megsűrítése, a nagy molekulák távoltartása. Egyfajta térfenntartó szerepet tölt be. Míg a kötőszövetekben a keratán- és dermatánszulfátok szerteágazó funkciókkal bírnak (például: véralvadás, karcinogenezis), a központi idegrendszerben az idegszövet sérülés utáni hegképződésében játszanak rendkívül fontos szerepet (Zhang és mtsai 2006, Li és mtsai 2013). A heparánszulfátok a központi idegrendszerben olyan proteoglikánokat képeznek, amelyek a sejthártyához kapcsolódnak, ezeket szindekánoknak nevezzük.

Az extracelluláris mátrix kutatásának egyik „gyenge pontja” volt a hialuronsav kutatás, elsősorban módszertani okok miatt. A hialuronsav szerkezetének és biológiájának kutatása az 1930-as évekre tekint vissza, ekkor izolálta Meyer és Palmer szarvasmarha szemgolyójának üvegtestéből (Meyer és Palmer 1934).

A hialuronsav a legegyszerűbb glükózaminoglikánok közé tartozik. Ez egy szabályosan ismétlődő sorozata – glükuronsav és N-acetil-glükózamin – több ezer diszacharid egységnek, amely változó mennyiségben található meg a felnőtt szervezet legtöbb szövetében és folyadékában, az embrionális élet korai szakaszában pedig különösen nagy mennyiségben van jelen. A hialuronsav jellegzetességei eltérnek a többi glükózaminoglikánétól. Ez az egyetlen, amelyik nem tartalmaz szulfatált szénhidrátokat és minden diszacharid egysége azonos hosszúságú (több ezer cukor monomer). További eltérés, hogy a többi mátrixelem a sejtek citoplazmájában szintetizálódik, míg a hialuronsav szintéziséért sejt felszínhez kötött enzimkomplex a felelős. Ezek az úgynevezett hialuronszintáz enzimek (Weigel és mtsai 1997). A hialuronsavnak korábban csak azt a szerepet tulajdonították, hogy ellenáll a nyomóerőknek a szövetekben és az ízületekben. Azonban fontos, hogy az embrionális fejlődés során létrehoz egy sejtmentes teret, térkitöltő szerepe van és itt lehet kihasználni azon tulajdonságait, hogy térbeli szerkezete (azaz a molekula alakja) formálható. A hialuronsav szintézise gyakran a hám bazális oldalán történik, ebbe a sejtmentes térbe később sejtek vándorolhatnak. Ez segíti elő például a szív, a szaruhártya és számos más szerv formájának kialakulását. Amikor a sejtek migrációja véget ér, a felesleges hialuronsavat a hialuronidáz enzim bontja le. A hialuronsav ezen kívül szerepet játszik a sejt migrációban, a mátrix alkotóinak összekapcsolásában, génexpressziók szabályozásában illetve a plaszticitásban is (Szigeti és mtsai 2006, Kochlamazashvili és mtsai 2010, Deák és mtsai 2012). A hialuronsav sokrétű funkciói éppen abban rejlenek, hogy milyen interakciókat alakít ki más molekulákkal, beleértve a fehérjéket és a proteoglikánokat. Az extracelluláris mátrixban található proteoglikánok és glikoproteinek egy csoportja rendelkezik hialuronsavat specifikusan kötő motívummal (úgynevezett link modul), amelynek segítségével komplex aggregátumokat hoznak létre az extracelluláris térben.

A hialuronsav további biológiai sajátossága, hogy ligandként tud kapcsolódni receptorokhoz, ilyen a CD44 (Cluster of Differentiation 44) vagy a RHAMM (receptor

for hyaluronic acid mediated motility) receptor. A CD44 receptor sokoldalúsága az idegrendszerben is megmutatkozik. Az agy idegsejtjeiben különböző izoformákat sikerült kimutatni. A gliasejtek közül az asztrocitákban, a Bergmann gliában, illetve a Schwann-sejtekben, a standard izoforma expresszálódik (Kaaijk és mtsai 1997). A fejlődő idegrendszerben az asztrociták egyik korai sejtmarkere a CD44 receptor melynek szerepe egyelőre ismeretlen (Alfei és mtsai 1999). Egy ismert idegrendszeri daganat az úgynevezett schwannoma (2. típusú neurofibromatózis) a CD44 receptor által mediált folyamat defektusából adódik, a CD44-hialuronsav kötése a Schwann-sejtek proliferációját gátolja, differenciációját segíti (Morrison és mtsai 2001). Továbbá az is ismeretes, hogy az egémbriók *chiasma opticumában* a retinából benövő axonok irányításában van jelentős szerepe (Lin és Chan 2003). A CD44 receptor ideg regenerációban betöltött szerepét még nem ismerjük, azonban egérben, az axonsérült motoneuronokban már sikerült kimutatni (Jones és mtsai 2000). A RHAMM receptor az erk1/Met1 komplexet (Extracellular signal-regulated kinase 1/methyltransferase protein 1) aktiválva a mitózist segíti elő (Hall és mtsai 1995, Zhang és mtsai 1998, Crainie és mtsai 1999). Elsősorban az oligodendroglóban és a parvalbumint tartalmazó neuronokban fordul elő (Lynn és mtsai 2001). A fentiek alapján arra lehet következtetni, hogy a RHAMM receptor és ligandja – a hialuronsav – fontos szerepet tölt be a jelátvitelben és a citoskeletális regulációban.

A később tárgyalt proteoglikánok tengelyfehérjéinek kezdeti szakasza egy-egy kapcsolófehérje – úgynevezett link-protein segítségével képes a hialuronsav lánchoz kapcsolódni (Yamaguchi 1999). Ezeket a kapcsolófehérjéket összefoglaló néven HAPLN (hyaluronan and proteoglycan binding link proteins, Spicer és mtsai 2003) rövidítéssel illetik. A link-proteinek családja négy tagból áll: HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3 és HAPLN4. A HAPLN1 a klasszikus porcmátrix protein 1-es típusa (CRTL-1, cartilage link protein-1) (Neame és Barry 1994). A felsoroltak közül egyedül a HAPLN3 hiányzik a központi idegrendszeri parenchymából, más szövetekben legtöbbször az érfalban fordul elő (Ogawa és mtsai 2004).

2.2.2. Glikoproteinek

Az extracelluláris mátrix részeként, a glükózaminoglikánok fehérjékhez csatlakozva a proteoglikánok mellett úgynevezett glikoproteineket is létrehozhatnak. A

glikoproteinek és proteoglikánok közötti fő különbség a fehérje és szénhidrát tartalom arányában rejlik. A glikoproteinekre általában 1-60 tömegszázalék szénhidráttartalom 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 fibronektin és a laminin is, amelyek mint adhezív glikoproteinek összekötik a mátrixmolekulákat egymással és sejt felszíni fehérjékkel, létrehozva egy rendkívül bonyolult, azonban rendezett hálózatot.

A központi idegrendszerben 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 Jones 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 Gunel-Ozcan 2012), a receptorok és ioncsatornák működését, a szinaptikus plaszticitást és a gliális újraépülést is befolyásolják (Dityatev és Rusakov 2011).

2.2.3. Proteoglikánok

Korábban már említettük a proteoglikánokat, amelyek olyan glikolizált fehérjék, amelyekhez kovalens kötéssel glükózaminoglikán oldalláncok kötődnek. A proteoglikánokat általában könnyű megkülönböztetni a glikoproteinektől a cukoroldalláncaik milyensége és mennyisége alapján. Meghatározás szerint a proteoglikánoknak legalább egy oldallánca glükózaminoglikán kell, hogy legyen. A glükózaminoglikán oldalláncok azok, amelyek döntően befolyásolják a proteoglikánok fiziko-kémiai tulajdonságait, ezáltal biológiai szerepüket. Mint korábban említettük, a glükózaminoglikán molekulák szulfatált poliszaharidok, amelyek diszacharid egységekből épülnek fel. A diszacharid egyik építőeleme glükuronsav, vagy

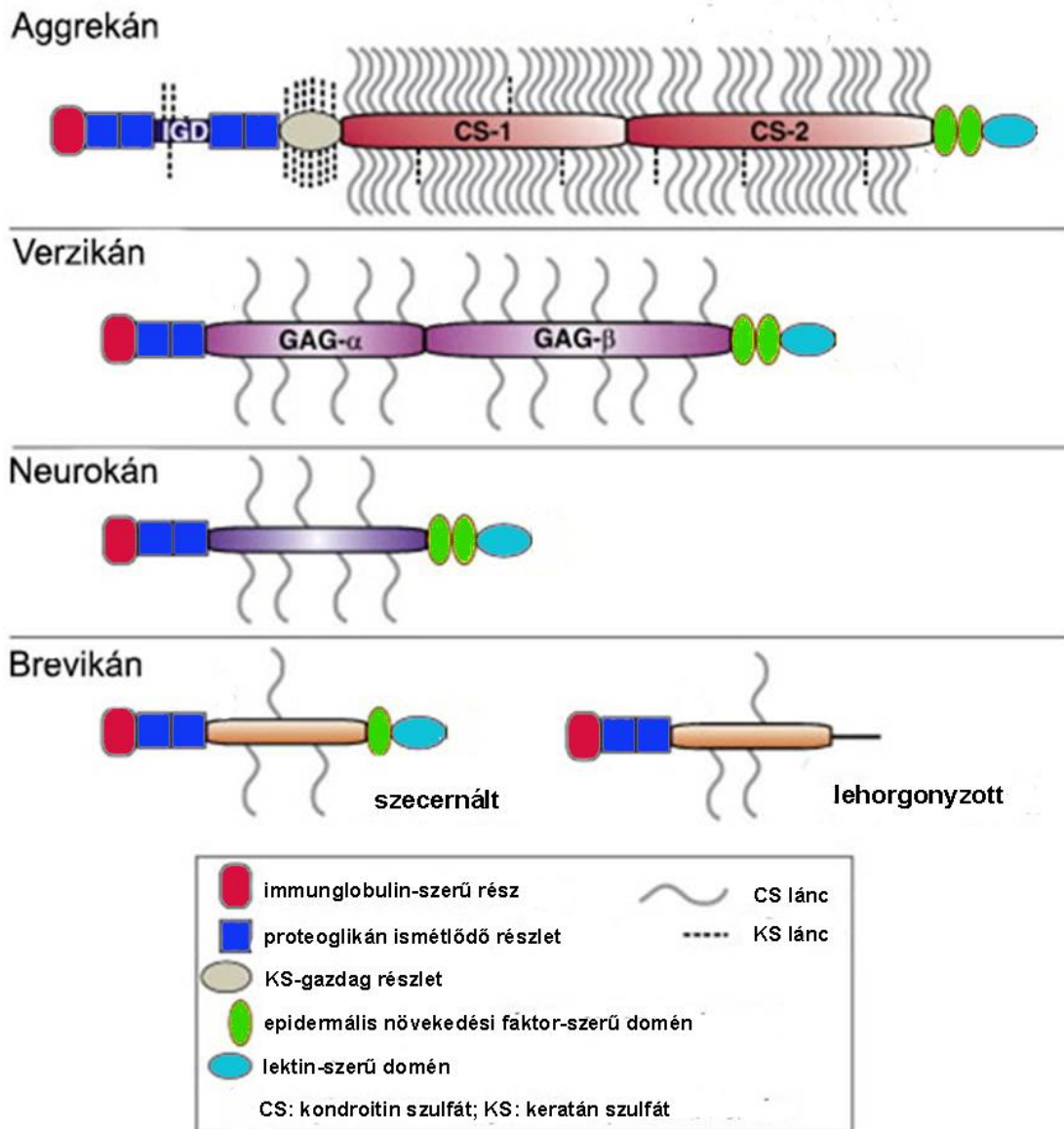
galakturonsav, míg a másik eleme egy hexózamin. A heparánszulfát ehhez nagyon hasonló szerkezetű, azzal a különbséggel, hogy az N-acetilgalaktóزامint N-acetilglükózamin helyettesíti. A proteoglikánok glükózaminoglikán oldalláncainak szulfatáltsága anionos karaktert kölcsönöz a molekulának.

A molekula tengelyét egy központi fehérje – úgynevezett tengelyfehérje vagy core protein – alkotja, amely tartalmazhat egy hialuronsavkötő link modult. Azokat a proteoglikánokat, amelyek képesek hialuronsavat kötni, lektikánoknak nevezzük. Ez a tengelyfehérje egy szerin oldalláncán valósul meg, ahol az imént említett link tetraszaharidhoz csatlakozik, ez szolgál alapul a poliszaharidlánc épüléséhez, amit egy specifikus glikozil-transzferáz enzim végez. E folyamatok a Golgi apparátusban zajlanak, mindeközben módosul a molekula kovalens kötések sorozatos létrejötte révén. Az úgynevezett epimerizáció megváltoztatja a kapcsolt szubsztituensek konfigurációját az egyes szénatomok körül, míg a szulfatálódás növeli a negatív töltések számát.

2.2.3.1 *A lektikán család*

A lektikánok olyan kondroitin-szulfát proteoglikánok, amelyek egyszerre több extracelluláris mátrixmolakulához képesek kötődni, mint a hialuronsav, a link protein vagy a tenaszcin (Ruoslahti 1996, Bandtlow és Zimmermann 2000, Yamaguchi 2000, Rauch 2004, Rauch 2007). A lektikán családba négy proteoglikán tartozik: az aggregán, a verzikán, a neurokán és a brevikán (1. ábra).

A felnőtt agyvelőben a lektikánok a hialuronsavval, valamint tenaszcinokkal interakcióba lépve egy hármas komplexet hoznak létre, amely a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix építőköve, mely a neuronok körül kondenzálódhat, úgynevezett perineuronális hálókat alkothat (Yamaguchi 2000). Elsőként az aggregánt izolálták patkány porcszövetéből (Doege és mtsai 1987), majd a verzikánt humán fibroblaszt tenyészetből (Zimmermann és Ruoslahti 1989). Ma már tudjuk, hogy a központi idegrendszerben is előfordulnak. Később a csak az idegrendszerben előforduló neurokánt és brevikánt írták le patkány és szarvasmarha agyában (Rauch és mtsai 1992, Zhang és mtsai 1998). A lektikánok központi fehérjéje minden esetben tartalmaz két globuláris domént, egy N-terminális (G1) és egy C terminális (G3) domént, a centrális szénhidrátkötő domén mellett (1. ábra). Ezek a proteoglikánok a G1 domén segítségével kapcsolódnak a hialuronsavhoz, mivel itt találunk két link modult az immunglobulin-szerű hurok mellett.



1. ábra: A lektikán családba tartozó 4 proteoglikán: aggrekán, verzikán, neurokán, brevikán.

Forrás: Heather Stanton, James Melrose, Christopher B. Little, Amanda J. Fosang, (2011) Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812: 1616-1629 után, módosítva (CS: kondroitinszulfát, KS: keratánszulfát, GAG: glükózaminoglikán)

Hosszára és glikoziláltságára nézve a centrális domén a legváltozatosabb a lektikánokban. A verzikán tartalmazza a leghosszabb (mintegy 1700 aminosav), míg a brevikán a legrövidebb (300 aminosav) centrális domént. A centrális domén tartalmazza az összes glükózaminoglikán kötőhelyet. A proteoglikánok tengelyfehérjéjéhez eltérő

számú és típusú glükózaminoglikán lánc csatlakozhat. A glükózaminoglikánok heterogenitása miatt nehéz azonosítani és osztályozni a proteoglikánokat a „szénhidrátmintázatuk” szempontjából. Ezért rekombináns DNS technika alkalmazásával meghatározták a tengelyfehérjék szekvenciáit, melynek során kiderült, hogy azok szintén rendkívül sokfélék. Egy típuson belül néhány kisebb családot különíthetünk el. Sokukban megtalálható egy vagy több domén, amelyek homológok más, az extracelluláris mátrixban vagy a plazmamembránban található fehérjékkel. Ezek alapján talán a legjobb úgy tekinteni a proteoglikánokra, mint egy sokszínű, erősen glikozilált glikoproteinek csoportjára, amelynek feladatait egyaránt közvetítik a tengelyfehérje és a glükózaminoglikánláncok fiziko-kémiai tulajdonságai.

2.2.3.2. A lektikánok megoszlása különböző szövetekben

Minden egyes lektikán jellemző szöveti eloszlást mutat. Az aggregátum legnagyobb mennyiségben a porcszövetben található, de megtalálható más kötőszövetben is, csakúgy, mint az idegszövetben (Schwartz és mtsai 1996). A verzikán a leggyakrabban előforduló lektikán, így az idegszövetben is megtalálható (Bignami és mtsai 1993, Braunewell és mtsai 1995). Immunhisztokémiai kimutatható mennyiségű brevikánt és neurokánt eddig csak az idegrendszerben találtak (Yamada és mtsai 1994, Jaworski és mtsai 1995, Seidenbecher és mtsai 1995, Jaworski és mtsai 1996), azonban az NCBI (National Center for Biotechnology Information) UniGene adatbázisa szerint más szövetekben is kimutatható. A lektikánok az idegrendszer fejlődése során is változatos expressziós mintázattal rendelkeznek (Milev és mtsai 1998). A patkány központi idegrendszerére jellemző, hogy benne a fejlődés során folyamatosan növekszik mind a lektikánok mennyisége, mind pedig a proteoglikán pozitív területek nagysága.

2.2.3.3. A lektikánok szerepe a fejlődő idegrendszerben

Az eddigi tanulmányok a lektikánok barrier szerepét igazolják a sejtmigrációban és az axon növekedésében (Cooper és Steindler 1989, Mckeon és mtsai 1991, Oakley és Tosney 1991, Perris és mtsai 1991, Brittis és mtsai 1992, Engel és mtsai 1996, Mckeon és mtsai 1999). Jellemzi az axonnövekedésben betöltött szerepüket az, hogy ha

organotipikus retina sejt kultúrában a lektikánokat kondroitináz enzimmel elbontották, a sejtek axonjai véletlenszerű irányokba kezdtek növekedni (Brittis és mtsai 1992). Az *in vitro* vizsgálatok eddig mindegyik lektikán esetében úgy találták, hogy azok gátolják az axon növekedését (Plenderleith és Snow 1990, Friedlander és mtsai 1994, Braunewell és mtsai 1995, Yamada és mtsai 1997), azonban a gátlás pontos mechanizmusát nem ismerjük. Az utóbbi vizsgálatok eredményeként egyre inkább terjed az a feltételezés, hogy a központi fehérjék befolyásolja a lektikánok neuritek növekedésére gyakorolt hatását. Az aggregátum *in vitro* gátolja a ganglionléc sejtjeinek migrációját, mely tulajdonságot főleg a G1 domén hialuronsav kötő helyének köszönhető (Plenderleith és Snow 1990). Ezekről a – részleteiben jelenleg ismeretlen – folyamatokról kialakult képzet meglehetősen módosítják a lektikánok alternatív hasítással keletkező izoformáinak vizsgálataiból kapott eredmények. Újabb adatok szerint a kondroitinszulfát oldalláncot kötő központi domének alternatív hasítással történő elvesztése (ezek a nem proteoglikán izoformák) teljesen megváltoztatja a molekula viselkedését. Ilyen a verzikán v3 izoformája, valamint a brevikán egyik újabban leírt variánsa. Ezen nem-proteoglikánok ellentétes hatással bírnak, vagyis az axonok növekedését serkentik (Zako és mtsai 1995). Ezek az izoformák elsősorban a G3 doménhez kötött sejtmembrán glikolipidek által fejtik ki hatásukat (Miura és mtsai 1999).

2.2.3.4. Lektikánok a differenciált idegszövetben

A lektikánok mennyisége a differenciált idegszövetben nagyobb, mint embrionális korban. Ismert, hogy az N (G1) és C (G3) terminális (G1 és G3) domének segítségével a lektikánok két további molekulával létesítenek kapcsolatot (úgynevezett „linker” funkció). Az idegrendszerre jellemző extracelluláris mátrix sok tekintetben eltér az egyéb szövetekben találtaktól. A nagy sejtsűrűség miatt az extracelluláris tér szűk, és csak néhány helyen találunk olyan klasszikus extracelluláris mátrix aggregátumokat, mint a kollagén és a fibronectin (Carbonetto és mtsai 1988, Rutka és mtsai 1988, Gatchalian és mtsai 1989). Ezzel szemben a proteoglikánok nagy mennyiségben vannak jelen az idegrendszerben (Margolis és Margolis 1993) a gliasejtek és neuronok közötti intercelluláris térben, ahol perineuronális hálókat hoznak létre (Celio és Blümcke 1994, Celio és mtsai 1998, Matesz és mtsai 2005, Gaál és mtsai 2013, Rácz és mtsai 2013). Kimutatták, hogy lektikánokat reaktív asztrociták is

termelnek központi idegrendszeri sérülés után (Mckeon és mtsai 1991, Mckeon és mtsai 1999). Ezek alapvető komponensei a hialuronsav, a lektikánok és a tenaszcin-R (a fejlődő- és érett központi idegrendszerben megtalálható forma), melyek komplexet hoznak létre, és a szinaptogenezis fizikai barrierjét képezik, és egyben a már meglévő szinapszisok rögzítésére szolgálhatnak (Celio és Blümcke 1994).

2.2.4. Az aggregán és brevikán, mint a perineuronális hálók gerince

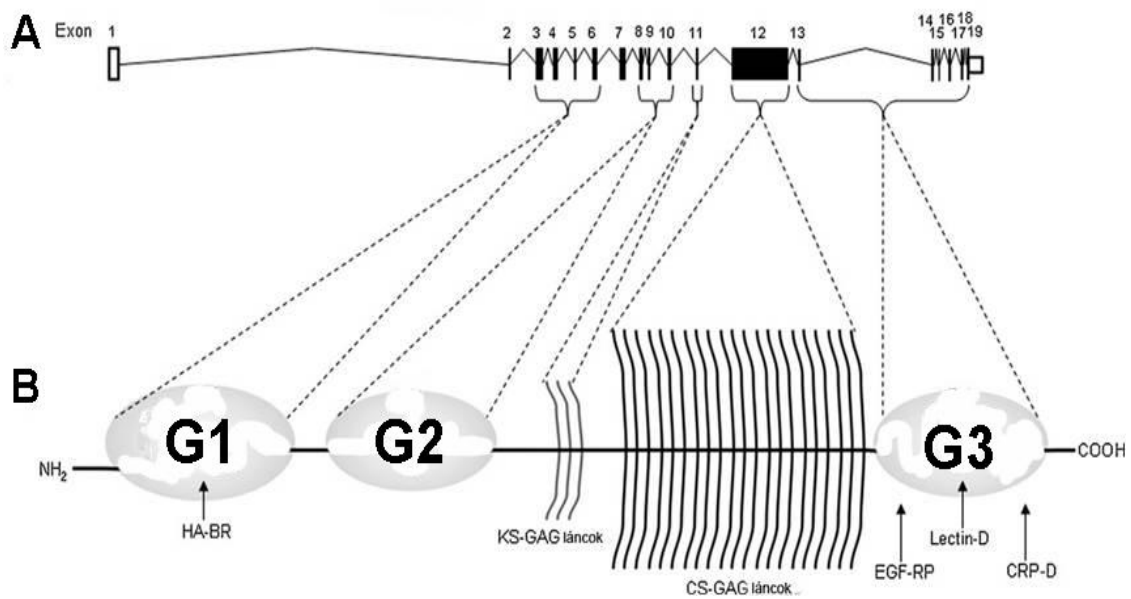
Vizsgálataink során az aggregán és brevikán megjelenésének részletes leírására törekedtünk az ember központi idegrendszerének különböző területein. Ennek megfelelően e két molekula a szerkezetét kívánjuk részletesen ismertetni.

2.2.4.1. Az aggregán molekula

A nagy aggregátumokat létrehozó proteoglikánt – az aggregánt - már két évtizeddel ezelőtt kimutatták, mivel nagy mennyiségben található a porcszövet alapállományában. Az aggregán (más néven cartilage-specific proteoglycan core protein, CSPCP, CSPG1) egy kondroitinszulfát proteoglikán (chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG). Az úgynevezett ACAN (aggrecan gene) gén kódolja (Doerge és mtsai 1990). Aggregán hiányában nem épülnek fel perineuronális hálók (Hockfield és mtsai 1990, Brückner és mtsai 1993, Matthews és mtsai 2002, Giamanco és mtsai 2010, Morawski és mtsai 2010b, Morawski és mtsai 2012b).

2.2.4.1.1. Az aggregán felépítése és szerepe

Az aggregánt kódoló ACAN gén az emberben a 15. kromoszóma q26.1 doménjén található, 19 exon kódolja (2. ábra) (Kiani és mtsai 2002).



2. ábra: Az aggrekán kromoszómális helyzetete, a kódoló exon fehérje és az aggrekán protein felépítése. Az aggrekán exonja, annak kódoló és nem kódoló részei (A). Az aggrekán sematikus diagramja (B). Forrás: M. Morawski és mtsai / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 44 (2012) 690– 693 után, módosítva (G1,2,3: globular domain, globuláris domén, HA-BR: hyaluronic acid binding region, hialuronsavkötő régió, KS-GAG: keratan sulfate glycosaminoglycan, keratánszulfát glükózaminoglikán, CS-GAG: chondroitin sulfate glycosaminoglycan, kondroitinszulfát glükózaminoglikán, EGF-RP: epidermal growth factor-like domain, epidermális növekedési faktorszerű domén, Lektin-D: lectin domain, lektin domén, CRP-D: complement regulatory protein domain, komplement szabályozó protein domén)

A fehérjét 2454 aminosav építi fel, molekulatömege körülbelül 250 kDa. A 3-6. exonok kódolják az első (G1), illetve a 8-10. exonok a második (G2) globuláris domént. Ezen G1-G2 domének tartalmazzák az korábban említett link-protein kötő domaint. A molekulát kódoló 11 és 12-es exonok kódolják a kondroitin-szulfát oldalláncok kötéséért felelős fehérjéket. A 11-es exon az elsődleges keratán-szulfát kötőhelyet, míg a 12-es exon egy nagyon hosszú szakaszt kódol. Itt kötődnek a fehérje központi részéhez a kondroitinszulfát molekulák. A 13-18. exonok egy szelektin szerű domént kódolnak, ez hozza létre a sejtfelszínnel való kapcsolatot és két EGF (epidermal growth factor)-szerű domén ismétlődésből áll. Hasonlóan a legtöbb proteoglikánhoz, az aggrekán molekula szerkezete egy üvegmosó kefére hasonlít, amelynek terminális régióit globuláris fehérjék, míg középső részét glükózaminoglikánok foglalják el.

Az aggregán molekula N-terminális vége gyengén a link protein segítségével kötődik a hialuronsavhoz. A C-terminális vég egyéb mátrixproteinekkal képes kötődni, többek között a tenascin-R-rel, fibulinnal, illetve szulfatált glikolipidekkel. Az agyban előforduló aggregánt ezen tulajdonságai teszik alkalmassá arra, hogy úgynevezett kvaterner makromolekulákat alkosson, és a sejt felszínhez kapcsolódva perineuronális hálókat hozzon létre. A központi idegrendszerben az aggregán mind térben, mind pedig időben egyaránt szabályozott módon termelődik. Patkány központi idegrendszerében például az embrionális időszak alatt csak igen kis koncentrációban mutatható ki, majd ezt követően a posztnatális időszak alatt a koncentrációja sokszorosára nő (Milev és mtsai 1998, Matthews és mtsai 2002). A koncentrációemelkedés körülbelül a 21. napig tart, majd ezen – vagy kissé alacsonyabb – szinten marad a felnőttkorban (Matthews és mtsai 2002). Erre alapozták sikerrel azokat a kísérleteket, melyek az aggregán posztnatális időszakban zajló plasztikus folyamatokban betöltött szerepét bizonyították (Hockfield és mtsai 1990, Brückner és mtsai 2000).

Az aggregán az agyban a perineuronális hálók építőköve, az idegsejtek szómája, proximális dendritszakaszai és az axoneredési domb körül halmozódik fel (Brückner és mtsai 2006). Perineuronális hálók csak bizonyos neuronpopulációk körül detektálhatóak, melyről munkánk további fejezeteiben értekezünk. Az aggregán polianionos karaktere magához vonzza a környezetéből a kationokat és a vizet (Hardingham és Bayliss 1990). A további fizikai sajátosságait a hozzácsatolt kondroitinszulfát glükózaminoglikán láncok adják azzal, hogy gél-sűrítő szerepet töltenek be (Hardingham és Bayliss 1990). Az aggregán legszélesebb körben elfogadott lehetséges funkciói a felnőtt központi idegrendszerben a következők:

- az ionhomeosztázis fenntartása a perineuronális hálóval burkolt úgynevezett gyorstüzelő neuronok körül (Brückner és mtsai 1993, Härtig és mtsai 1999, Morawski és mtsai 2004a, Morawski és mtsai 2010b, Morawski és mtsai 2012b).
- a szinaptikus kapcsolatok stabilizálása (Hockfield és mtsai 1990), amelynek eredményeként fontos szerepet tölt be a plaszticitást mutató idegrendszer működésében (Pizzorusso és mtsai 2002, Merae és mtsai 2007, Frischknecht és mtsai 2009, Wlodarczyk és mtsai 2011).

- neuroprotektív szerep az oxidatív stressz csökkentésén keresztül, redox-aktív kationok semlegesítése révén (Morawski és mtsai 2004a, Morawski és mtsai 2010a, Morawski és mtsai 2012b).

2.2.4.1.2. Az aggregán lehetséges orvosi vonatkozásai

Az aggregán fokozott expressziója és a perineuronális hálók kialakulása egybeesik a plaszticitás csökkenésével az agyban. A legutóbbi tanulmányok azt találták, hogy a kondroitinszulfát láncok eltávolítása újra aktiválja a plasztikus folyamatokat, új szinapszisok kiépülését (Pizzorusso és mtsai 2002, Frischknecht és mtsai 2009, Gogolla és mtsai 2009, Carulli és mtsai 2010), továbbá fontos szerepet tölthet be a memória folyamatok javulásában (Gogolla és mtsai 2009, Carulli és mtsai 2010).

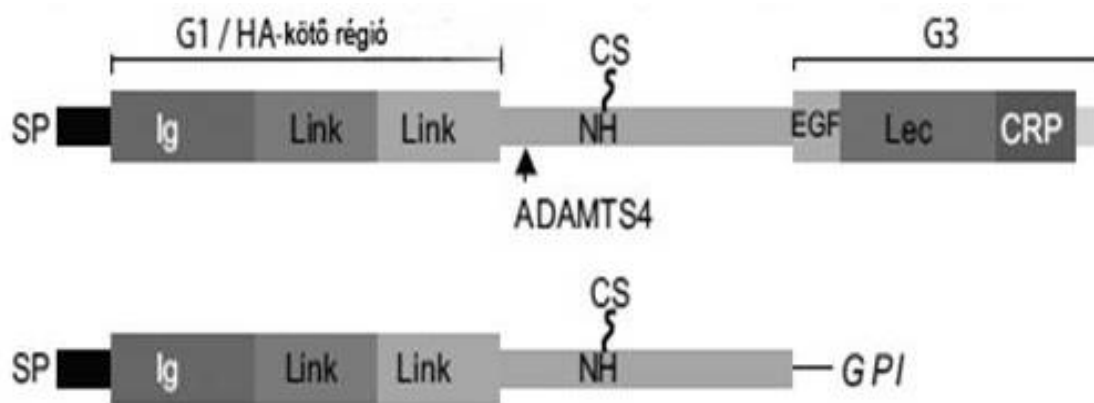
Korábbi munkák azt is kimutatták, hogy azok az idegsejtek, melyek perineuronális hálóval bírnak, jobbak ellenállnak az olyan neurodegeneratív betegségeknek, mint például az Alzheimer-kór (Brückner és mtsai 1999, Morawski és mtsai 2004a, Morawski és mtsai 2010a, Morawski és mtsai 2012b). Ezek az eredmények felvetik az aggregán és a perineuronális hálók lehetséges neuroprotektív szerepét.

A terápiás beavatkozások jelenleg az extracelluláris mátrix lebontását célozzák. A központi idegrendszerben van endogén mátrix-lebontó aktivitás, ezt a funkciót különböző proteázok (például mátrix metalloproteázok) látják el (Gilbert és mtsai 2011). A jövőbeni terápiák az agyi plaszticitás megváltoztatására, vagy a neurológiai sérülésből eredő regenerációra irányulnak – ezek a beavatkozások mindazonáltal még csak az elméleti orvostudomány berkeiben működnek. Érdelemes trauma utáni regenerációt az erőfeszítések ellenére mindeztidáig nem sikerült elérni.

2.2.4.2. A brevikán molekula

A brevikán kiemelten fontos a proteoglikánok között az emlősök központi idegrendszerében (Frischknecht és Gundelfinger 2012, Rác és mtsai 2013). A perineuronális hálók fontos összetevője kulcsszerepet tölt be a szinapszisok kialakulásakor az úgynevezett kritikus időszakban (az időintervallum, amelyben a központi idegrendszer különösen plasztikus és érzékeny a környezeti ingerekre és

amelyben gyors fejlődésre képes), és hozzájárul az egyensúly megteremtéséhez a plaszticitás és a kialakult kapcsolatok megtartása között (Morawski és mtsai 2012b). A brevikán felfedezése három – egymástól független – laboratóriumban történt. Míg a Hockfield labor és a Yamaguchi labor új, idegi hialuronsavkötő proteoglikánok után kutatva azonosította a brevikánt (Jaworski és mtsai 1994, Yamada és mtsai 1994), addig Seidenbecher kutatócsoportja is azonosította azt, amikor új, szinapszisokhoz asszociált fehérjéket kerestek (Seidenbecher és mtsai 1995). A brevikán név arra utal, hogy a lektikánok családjának legrövidebb (a latin *brevis* jelentése rövid) tagja (1. és 3. ábrák) (Yamada és mtsai 1994). Szinonimája a BEHAB, ami egy mozaikszó (brain-enriched hyaluronic acid binding protein, Jaworski és mtsai 1994), egyben tükrözi a hialuronsavhoz való viszonyát.



3. ábra: A brevikán fehérjére jellemző súlyzó alak. Forrás: R. Frischknecht, C.I. Seidenbecher / The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 44 (2012) 1051-1054 után, módosítva (G1/G3: globuláris domén 1,3, HA: hyaluronic acid, hialuronsav, Ig: immunglobulin domain, immunglobulin domén, Link: link domain, link fehérje domén, CS: chondroitin sulfate, kondroitinszulfát, EGF-RP: epidermal growth factor-like domain, epidermális növekedési faktorszerű domén, Lec: lectin domain, lektin domén, CRP-D: complement regulatory protein domain, komplement szabályozó protein domén, ADAMTS4: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4, dizintegrin és metalloproteáz trombospondin 4-es motívummal, GPI: glycosylphosphatidylinositol, glükózilfoszfátidilinozitol)

2.2.4.2.1. A brevikán felépítése és szerepe

Ez a proteoglikán az aggregánhoz hasonlóan egy súlyzószerű szerkezeti vázzal rendelkezik, amely tartalmaz egy N-terminális globuláris tartományt (G1), ami a hialuronsavhoz kötődik, egy központi kondroitinszulfát kötő szakaszt, és egy a C-terminális szakaszhoz kötődő globuláris domént, amit G3 doménnek nevezünk (3. ábra). Ellentétben az aggregánnal, a brevikán nem tartalmaz G2 domént. A G1 tartomány tartalmaz egy immunglobulin-szerű (Ig) hurkot, ezt követi két link fehérje-szerű modul. A G3 domén tartalmaz egy epidermális növekedési faktor-szerű modult, egy C-típusú lektin-szerű domént és egy komplement szabályozó protein modult. A középső rész tartalmaz egy nem-homológ régiót, ahol valószínűleg kondroitinszulfát rögzítési helyek találhatóak (Yamada és mtsai 1994). Ellentétben más lektikánokkal, a brevikán molekulák jelentős hányada nem glikozilált formában van jelen, ezért a brevikánt egy "részmunkaidős proteoglikánnak" tekintik (Yamada és mtsai 1994). A brevikán a lektikán család egyetlen tagja, amelynek létezik egy alternatív splicing által GPI-horgonyzott formában megjelenő izoformája (Seidenbecher és mtsai 1995). Ez az izoforma tartalmazza a G1 és a nem homológ tartományokat, ezt követi egy GPI horgony, így nem található rajta G3 tartomány, amely egy sejthez kötött hialuronsav kötő régió. Ez az izoforma azonban egy ritka változat, az mRNS átiratok kevesebb, mint 1%-át alkotják (John és mtsai 2006).

A brevikán csak a központi idegrendszerben termelődik (Yamada és mtsai 1994), ami az egyedfejlődés során szabályozottan zajlik. Újszülött patkányokban alig detektálható, a születés utáni első héten koncentrációja fokozatosan növekszik, míg el nem éri a felnőttkorra jellemző szintet (Seidenbecher és mtsai 1998). A brevikánt a gliasejtek és a neuronok közösen termelik (Yamada és mtsai 1994, Seidenbecher és mtsai 1998, John és mtsai 2006). Ezt hippocampusz kultúrákban is megerősítették, ahol a brevikán fehérje megtalálható volt mind a neuronok, mind pedig a gliasejtek Golgi apparátusában, valamint neuronális- vagy asztrocitatenyészetekből nyert lizátumokban (Hamel és mtsai 2005, John és mtsai 2006). Ezzel bizonyítást nyert, hogy a brevikán mindkét sejttypusban szintetizálódik és szekretálódik, majd később részt vesz a neuronok körüli mátrix felépítésében (Carulli és mtsai 2006), közvetlenül kötődve a sejtek felszínéhez (Hedstrom és mtsai 2007, Frischknecht és mtsai 2009).

A brevikán számos mátrix metalloproteáz szubsztrátja (Nakamura és mtsai 2000). Hasítási helyeket a G1 és G3 tartományok között azonosítottak. A hialuronsav N-terminálisához csatolt fragmensek körülbelül 50, míg a C-terminális fragmentumok kb. 80 kD-osak. Mindkét fragmentum nagy mennyiségben mutatható ki agyi homogenizátumban (Yamada és mtsai 1994, Seidenbecher és mtsai 1995, Matthews és mtsai 2000). A legfontosabb brevikánt hasító proteáz az ADAMTS4 nevű fehérje (Nakamura és mtsai 2000). A brevikánt specifikus helyen hasítja, ami megegyezik az aggregán hasítási helyével, ez a glutamin³⁹⁵ és szerin³⁹⁶ között található (Nakamura és mtsai 2000).

Brevikán tartalmú mátrixot megfigyelték közvetlenül a neuronális kompartment körül is. Így a brevikán jelen van az axon iniciális szegmens körül, amit *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is sikerült kimutatni (John és mtsai 2006, Hedstrom és mtsai 2007). Ez a mátrix depozitum még azt megelőzően épül fel, hogy hialuronsav kimutatható lenne a sejtenyészetben. Ebből arra következtettek, hogy a brevikán axon iniciális szegmens körüli lerakódása közvetlenül sejt felszíni receptorhoz való kötődés révén valósul meg (Frischknecht és mtsai 2009). Hasonlóképp közvetlen kölcsönhatást sikerült kimutatni a brevikán és a neurofascin 186 (NF186) glikoprotein között, ez utóbbi axon iniciális szegmensek területén magas koncentrációban van jelen (Hedstrom és mtsai 2007). Ennek megfelelően a NF186 fehérje transzkripciójának szuppressziója esetén nem rakódik le brevikán az iniciális szegmens körül (Hedstrom és mtsai 2007), amiből arra következtethetünk, hogy a brevikán teremt kapcsolatot az extracelluláris mátrix és az iniciális szegmensben található NF186 fehérje között. Ezt támasztja alá az a megállapítás, hogy brevikán akkumulációk a Ranvier-féle befűződésekben is előfordulnak, amelynek fehérje összetétele nagyon hasonlít az axon iniciális szegmenséhez. A nagy átmérőjű axonok Ranvier-féle befűződésénél azt tapasztalták, hogy a brevikán hiánya az extracelluláris mátrix átrendeződéséhez vezet (Bekku és mtsai 2009). Az ilyen átrendeződésnek funkcionális következményei továbbra is feltérképezetlenek.

2.2.4.2.2. A brevikán lehetséges orvosi vonatkozásai

A központi idegrendszer homogéнен eloszló brevikán állománya fontos klinikai vonatkozással bír. A traumás agysérüléseket és azok súlyos következményeit csak korlátozott mértékben képes a központi idegrendszer helyreállítani, ezt a folyamatot a kondroitinszulfát proteoglikánok nagyban gátolják. A brevikánról bebizonyították, hogy termelése a kísérletes neurodegeneratív állatmodellekben fokozódik az entorhinális kérget érintő elváltozásokban (Schafer és mtsai 2008), gerincvelő sérülésben (Jones és mtsai 2003), vagy a hátsó gyökér átmetszése után (Beggah és mtsai 2005). A brevikán és neurokán génjének együttes kiütése után (double-knockout) egerekben azt sikerült kimutatni, hogy a hátsó gyökér belépési zónájában az axon újránövekedése fokozódik. Azonban ez csak akkor volt megfigyelhető, ha a perifériás idegsérülést megelőző rizotómia révén aktiválódott az érintett neuronok intrinzik növekedési programja (Quaglia és mtsai 2008). Ezek a kísérletek azt is bizonyították, hogy a brevikán hozzájárul a nem-permisszív környezethez, annak eltávolítása szükséges, de nem elégséges feltétele az axonális növekedésnek.

2.2.4.3. *Az extracelluláris mátrix kondenzált formái: a perineuronális háló és a periaxonális hüvely*

Az elmúlt tizenöt évben az új biológiai és immunhisztokémiai technikák megjelenésének köszönhetően a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix körül folyó kutatások új impulzust kaptak. A kutatók figyelmé az extracelluláris mátrix egy vékony rácsszerű borítékára irányult, amely egyes neuronpopulációk szómája és dendritjei körül akkumulálódik különböző agyterületeken. Ezek az úgynevezett perineuronális hálók, amelyek története több mint, egy évszázada kezdődött el, és első, de nem utolsó sorban Golgi nevéhez köthető. Az 1870 és 1910 közötti időszakot két iskola – a retikuláris teória és a neuron teória – vitája uralta, amelynek epicentrumában a központi idegrendszer szerveződése állt. A korai 1870-es években általánosan elfogadott tény volt, hogy az idegszövet felépítésében a protoplazma nyúlványok (későbbi dendritek) és a tengelynyúlványok (későbbi axonok) vesznek részt. Az első utalás, ami az idegszövet perineuronális hálóra vonatkozott, Golgi közleményeiben lelhető fel. Először a gerincvelő és a IV. agyideg kapcsán tesz róluk említést. Camillo Golgi munkássága mérföldkövet jelentett a sejtbiológiában, amiért leírta – a neve által fémjelzett – intracelluláris kompartmentet (Golgi 1893). Kevésbé ismert tény azonban,

hogy a mondandója első felében elhangzott utalás már előrevetítette egy, a sejtmembránon kívül elhelyezkedő, finom, mozaikszerű, hálózatos felépítésű struktúra létezését, ami körülvesz egyes idegsejteket. Ez a struktúra borítékszerűen veszi körül az idegsejtek szómáját illetve dendritjeit. Nem csak Golgi, hanem még sokan mások is vizsgálták a perineuronális hálókat. Lugaro makákó majom kisagyának granuláris rétegében a kosársejtek körül írta le (Lugaro 1895). Donaggio a perineuronális hálót mellsőszarvi motoneuronok körül azonosította kutya gerincvelő elülső szarvában. Ő volt az első, aki a hálók finomszerkezetével foglalkozott és feltételezte annak gliális eredetét és stabilitásban betöltött szerepét, valamint részletezte annak filamentózus szerkezetét (Donaggio 1898,1901). Ramón y Cajal leírta macska *cerebellumban* és *telencephalonban* a neuronok körül (Cajal, 1898). Martinotti, aki Golgi híres „fekete reakcióját” alkalmazta az idegszövet sajátosságainak tanulmányozására a gerincvelőben írta le a perineuronális hálókat (Martinotti, 1897). Meyer pedig azt gondolta, hogy a perineuronális hálók a neuronok axonjának terminális arborizációi, és fontos szerepet játszanak az ingerület terjedésében (Meyer 1897, 1899). Golgi szerint, ez a hálózat egy úgynevezett neurokeratin „fűző”, amely az ingerület terjedését megakadályozza, tehát szigetelő funkcióval rendelkezik. Ezzel szemben Ramón y Cajal feltételezése szerint a perineuronális hálók csupán a festési eljárás melléktermékei, amely a sejten kívüli térben található anyagok véletlenszerű kicsapódásaiból származnak – az alkalmazott technikát (a Golgi impregnációt) tekintve ebben Cajalnak tulajdonképpen igaza volt, az ezüst-nitrát valóban extracelluláris molekulákat precipitált. A perineuronális hálók iránti érdeklődés egészen az 1960-as évekig elhalványodott. Ekkor értekeztek többen is egy, a neuronokat körülvevő perijódsav-Shiff pozitív anyagról, ami küllemre a perineuronális hálóknak felelt meg. Érdekes része a történetnek az, hogy az említett szerkezet és a Golgi által már jóval korábban leírt jelenség közötti azonosságra sokáig nem jöttek rá (Celio és mtsai 1998).

Franz Nissl és Alois Alzheimer tekintettek elsőként neuropatológiai szemmel a perineuronális hálók morfológiája felé, melyről Carlo Besta tesz említést – „A perineuronális hálók viselkedése bizonyos kóros idegrendszer folyamatokban” – 1911-ben (Besta 1911). Belloni és Donaggio Alzheimer típusú demenciákban és az agyszövet egészére kiterjedő gliózisban és pszichiátriai kórképekben beszámoltak arról, hogy a perineuronális hálók érintettek a degeneratív elváltozásokban, a perineuronális hálók

mérete csökkenhet vagy megvastagodhat (Belloni 1933; Donaggio 1931). Besta számos átfogó beszámolót közölt a perineuronális hálókról különböző agyi régiókban és fajokban. Belloni aprólékos morfológiai tanulmányokat végzett az emberi perineuronális hálókkal. Kutatásait felnőtt agykéregben és egy öt hónapos magzat agyában végezte, emellett foglalkozott a perineuronális hálók szerkezetével számos degeneratív cerebropátiában. Besta és Belloni (Besta 1911; Belloni 1933) nevét a neurológusok azon szűk csoportja között jegyzik, akik kísérletet tettek arra, hogy megfejtse a pszichológiai jelenségek mögött rejlő mechanizmusokat mind normál, mind kóros körülmények között.

Az elmúlt tíz évben a perineuronális hálók vizsgálata a morfológiai vizsgálatok után a kísérletes manipulációk irányába terelődött. A kísérletek korábbi csoportja a diffúz mátrix elbontását célozta, abban a reményben, hogy axon növekedést tudnak elősegíteni a sérült területen. Így kísérletesen bizonyítást nyert, hogy a hialuronidáz enzimrel való emésztés után a sértett patkány látóidegben a látóideg axonjai növekedésnek indulnak (Tona és Bignami 1993). Más kísérletek kifejezetten a perineuronális hálók vizsgálatára irányultak. Például HIV fertőzésben a vírus preferensen megfertőzi a mikroglia sejtet, amelyek ennek hatására – többek között – proteázokat szabadítanak fel és ezek lebontják a környező sejtek körüli extracelluláris mátrixot (Belichenko és mtsai 1997b). A Rett szindrómában szenvedő betegek központi idegrendszerében a perineuronális hálók által képzett köpeny a kérgi területeken jelentősen átalakul; expressziójuk a motoros kéregben fokozódik, míg más kérgi régiókban való előfordulásuk csökkent (Belichenko és mtsai 1997a). Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél a perineuronális hálók szerepe kiemelten az érdeklődés középpontjába került, mivel neuroprotektív hatásúakról számoltak be (Brückner és munkatársai 1999).

Napjaink kutatásai bebizonyították, hogy a perineuronális hálók rendkívül sok funkcióval rendelkeznek. Fontosak az extracelluláris tér és az intracellulárisan található sejtvezeték közötti kapcsolat létrehozásában (Sayed és mtsai 2002). Jelentős szerepet játszanak az ionhomeosztázis fenntartásában, gyakran találhatóak gyorstüzelő neuronok körül. Védelmet nyújtanak a neurodegeneratív folyamatokkal szemben (Brückner és mtsai 1999, Miyata és mtsai 2007, Morawski és mtsai 2010a), és szabályozó szerepük van a szinaptogenezis során (Pizzorusso és mtsai 2002, Berardi és mtsai 2003,

Frischknecht és Gundelfinger 2012). Az is bizonyított, hogy a kifejlett vagy sérülés után képződött extracelluláris mátrix ellenáll a közeledő neuriteknek (Mckeon és mtsai 1991, Niederost és mtsai 1999), és csökkenti az idegsejtek plasztikus tulajdonságait (Hockfield és mtsai 1983, Pizzorusso és mtsai 2002). A plasztikus tulajdonságok alatt az idegsejtek szinaptikus kapcsolatainak változásait, erősségük, illetve hatékonyságuk módosulásait értjük. A következőkben leírt kísérleteink elsősorban azt a kérdéskört érintik, hogyan jelenik meg az extracelluláris mátrix az ember központi idegrendszerének különböző részein.

A közelmúltban napvilágot látott egy másik mikroszkopikus morfológiai struktúra, a periaxonális hüvely (axonal coat) leírása (Brückner és mtsai 2008). Ez a mátrixakkumuláció izoláltan, individuális szinapszisok körül alakul ki. Napjainkban a perineuronális hálók és a periaxonális hüvelyek külön entitást képviselnek a neurocitológiában. A perineuronális hálóknak elváltozásainak kiemelt szerepet tulajdonítanak a korunkat sújtó neurodegeneratív betegségekben. Kutatásaink és eredményeink e két struktúra leírására összpontosult az emberi központi idegrendszer különböző, plasztikus és nem plasztikus területein.

3. KÉRDÉSFELVETÉS

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 aggregánt 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 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 téréstestre fordítottuk figyelmünket, mert ezen a területen előzetes, áttekintő vizsgálataink során igen kis számban találtunk perineuronális hálókat. Feltettük a kérdést, hogy egy közismerten apasztikus, kapcsolóállomásként szolgáló agyterület milyen kompartmentalizáltágú extracelluláris mátrixot alakít ki neuronjai körül.
3. A humán hippocampusban folytatott munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogyan szerveződik egy köztudottan plasztikus kérgi terület mátrixösszetétele az emberi idegrendszerben, találunk-e filogenetikai különbségeket más emlősökben tapasztaltakhoz. Megvizsgáltuk, milyen neuroncsoportok és milyen természetű szinapszisok körül találunk fokális mátrixakkumulációt.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Humán minták

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

A degeneratív folyamatok meggyorsítják az extracelluláris mátrix szénhidrát oldalláncainak lebomlását, rontják az extracelluláris mátrix lektinhisztokémiai és immunhisztokémiai megjeleníthetőségét. Ennek megfelelően olyan szöveteket dolgoztunk fel, melynek posztmortem ideje (postmortem delay, PMD, a halál beállta után eltelt idő a fixálás megkezdéséig) 20 óra alatt volt. Agymintáinkat egy 15 és egy 18 óra PMD idejű tetemből, gerincvelő mintáinkat egy 12 és egy 15 óra PMD idejű tetemből nyertük.

4.2. 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 (arteria carotis interna, arteria vertebralis, sinus sagittalis superior) illetve a gerincvelő esetén a szubarachnoideális térbe vezetett kanülön keresztül perfúziós sóoldattal (0,9% NaCl) átmostuk, majd fixálóoldattal 2% paraformaldehidet és 2% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M, pH 7.4 Tris-puffer sóoldattal (TBS) tartósítottuk.

Az agyvelőből a hippokampusz formációt és a külső térdestestet tartalmazó blokkot vágtuk ki mindkét oldalán. A gerincvelőből 15 mm vastag – haránt síkban elmetszett – szakaszokat távolítottunk el a nyaki, mellkasi, ágyéki és keresztcsonti szelvényekből (a tájékozódásban a megfelelő ideggyökök nyújtottak segítséget). A mintákat 2% paraformaldehidet tartalmazó TBS pufferben 4 napig 4 °C-on utófixáltuk.

4.3. Metszés

A mintáink egy részét fény-, immunfluoreszcens vizsgálatra dolgoztuk fel, ehhez 40 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A festésre szánt mintákat krioprotekció után (30% szaharóz oldat, 4 °C, 48 óra) kriosztáttal metszettük le.

4.4. Nemspecifikus endogén peroxidáz aktivitás csökkentése, blokkolási lépés

A fénymikroszkópos vizsgálatra feldolgozott metszeteket 0,1M, pH 7.4 foszfát pufferben (PB) történt többszöri mosás után 60%-os metanolban oldott 2%-os töménységű H₂O₂ oldatába (Reanal, Budapest, Magyarország) helyeztük 60 percig azért, hogy az endogén peroxidáz aktivitást csökkentsük. További előkezelésként 30 percig mostuk metszeteinket szobahőmérsékleten 1%-os nátrium-borohidridben (Merck Millipore, Darmstadt, Németország), hogy a képződött aldehidek mennyiségét redukáljuk. Ezt követte a blokkolási lépés, amit 2%-os szarvasmarha szérum albumint (bovine serum albumin, BSA, Sigma, St. Louis, USA), 0,3% kazeint (Sigma, St. Louis, USA) és 5%-os normál szamar szérumot (normal donkey serum, NDS, Sigma, St. Louis, USA) tartalmazó tritonos PB-ben végeztünk 90 percen át szobahőmérsékleten azért, hogy elkerüljük a nem-specifikus szekunder antitestkötést.

4.5. Lektinhisztokémia

A szabadon úszó metszeteket PB-ben hígított biotinilált Wisteria floribunda agglutininnel (WFA, 25 µg/ml, Sigma, St. Louis, USA) reagáltattuk egy éjszakán át, szobahőmérsékleten. PB-ben történt mosás után a szövetet avidin-biotin komplexbe helyeztük 1 óra hosszan (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA; 1:1000). Az összekapcsolódott avidin-biotin komplexet (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, USA) egy kromogén, a 3,3'-diaminobenzidin segítségével (DAB, 0,025%, Sigma, St. Louis, USA) csapadék formájában tettük láthatóvá nikkell-ammónium-szulfát (0,05%, Merck, Darmstadt, Németország) jelenlétében azért, hogy a reakció intenzívebb legyen. Többszörös PB-rel történt mosás után a metszeteket zselatin bevonatú tárgylemezre húztuk fel, száradás után felszálló alkoholsorral dehidráltuk, majd DePeX-szel (Fluka, Budapest, Magyarország) lefedtük.

4.6. Immunhisztokémia

A metszeteket éjszakán keresztül inkubáltuk a hígított primer ellenanyagokkal 2%-os normál számár szérumot tartalmazó tritonos PB oldatában. A humán szövetekben használt ellenanyagok részletes listáját az alábbi táblázatok tartalmazzák (1. táblázat, 2. táblázat, 3. táblázat). Többszörös immunjelölések esetén a primer antitesteket ugyanazon oldatban (koktéliban) hígítottuk.

4.6.1. Aggrecán és brevikán alapú tengelyfehérje primer antitestekkel való detektálása

Az aggrecán tartalmú mátrixot monoklonális, az aggrecán tengelyfehérjét felismerő HAG7D4 (1:10, Acris, Herford, Németország), Cat-301 és Cat-315 (mindkettő 1:1000, Millipore, Bedford, USA) ellenanyagokkal, valamint az aggrecán kapcsolófehérjét felismerő, anti-CRTL-1 ellenanyaggal (1:400, R&D Systems, Minneapolis, USA) tettük láthatóvá. A mátrix brevikán komponensét brevikán ellenes ellenanyaggal (1:1000, R. Matthews készítette és bocsátotta rendelkezésünkre, Matthews és mtsai 2000), a tenascin-R molekulát pedig tenascin ellenes antitesttel (1:50, R&D Systems) jelenítettük meg. A hialuronsavat fehérje-kötési reakcióval tettük láthatóvá. A szabadon úszó metszeteket *Streptomyces hyalurolyticus*-ból (50 egység / ml 0,1 M PB-ben, pH = 5,0, Sigma, St. Louis, USA) izolált hialuronidáz enzimmel 4 órán át 37 °C-on előkezeltük, majd specifikus biotilinált- hialuronsavkötő fehérjével (biotinylated hyaluronan binding protein, B-HABP, Amsbio, Abingdon, Egyesült Királyság) reagáltattuk.

4.6.2. Szinaptikus markerek és a neuronok dendritjeinek jelölése primer antitestekkel

Szinaptikus markerként, anti-glutaminsav-dekarboxiláz 65/67 antitestet (GAD, 1:5000, Sigma), 1-es típusú vezikuláris glutamát transzporter ellenes antitestet (VGLUT1, 1:10000, Synaptic Systems, Goettingen, Németország), vagy anti-parvalbumin antitestet (PV, 1:5000, Swant, Belinzona, Svájc) használtunk. A neuronok azonosítására anti-kolin-acetiltranszferáz (ChAT, 1:200, Millipore, Darmstadt, Németország) antitestet, anti-P anyag ellenes antitestet (substance-P, 1:100, Accurate Chemicals, Westbury, USA), a gamma-amino-vajsav (GABA) receptor ellenes

antitestek közül a monoklonális GABA_A β 2 ellenanyagot (1:200, Millipore), a glicin receptor (Gly-R) ellenes antitestek közül pedig a monoklonális GlyR4a antitestet (1:100, Synaptic Systems Goettingen, Németország) használtuk.

A neuronok dendritjeinek láthatóvá tételéhez SMI 311 (1:1000, Sternberger Monoclonals, Baltimore, USA) antitestet, a gliasejtek megjelenítéséhez gliális fibrilláris savas protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP, 1:2000, Dako, Glostrup, Dánia) ellenes antitestet használtunk.

4.6.3. Az epitópok fénymikroszkópos elemzéshez való láthatóvá tétele egyszeres jelölésekben

A primer antitest oldatát metszeteinkről eltávolítottuk, azokat PB-rel többször átmostuk. Ezután 60 percig biotinilált, számarban termelt egér-, nyúl- vagy kecske ellenes immunglobulin savóval reagáltattuk (szekunder antitest). Ismételt mosási lépések után a metszeteket az előre elkészített ABC-vel reagáltattuk egy órán át szobahőmérsékleten (Vectastain Elite ABC kit, Vector). Az immunprecipitátumot nikkell-ammónium-szulfáttal felerősített (0,05%, Merck) 0,025%-os DAB (Sigma) segítségével tettük láthatóvá. Mindez 0,05 M-os TRIS-pufferben (pH 8,0) 0,001%-osra hígított H₂O₂ oldat (Reanal) jelenlétében történt. Kontroll kísérletünkben elhagytuk a primér antitestet, ez az immunreaktivitás hiányát eredményezte. A fénymikroszkópos vizsgálatra szánt metszeteket zselatinózott tárgylemezre húztuk fel, és DePex-szel (Fluka) fedtük le.

4.6.4. Többszörös immunfluoreszcens jelölések

A kettős- és hármas immunfluoreszcens jelölésekhez a felsorolt szinaptikus vagy neuronális markereket az aggregán vagy brevikán ellenes antitestekkel kombináltuk. A metszeteket ezután különböző fluoreszcens szekunder ellenanyagokkal, így többféle színű karbocianinnal (Cy2, Cy3, Cy5) konjugált számarban termelt egér, nyúl vagy kecske elleni immunglobulinok (1:500; Dianova, Hamburg, Németország) keverékével reagáltattuk. A metszeteket végül felhúztuk tárgylemezre és szárítás után glicerol zselatinnal fedtük le.

1.táblázat: A humán gerincvelőben használt markerek összefoglaló táblázata.

| Detektált komponens | Antitestek | Cég | Faj | Hígítás | Referenciák |
|-----------------------------------|--|-------------------|----------------------|----------|---------------------------|
| mátrixösszetevők | | | | | |
| N-acetilgalaktózamin | biotilínált Wisteria floribunda agglutinin (WFA) | Sigma | | 5mg/ml | Härtig és mtsai (1992) |
| Link protein-1 | anti-CRTL- 1 (hHAPLN1) | R&D Systems Inc. | kecske, poliklonális | 1:400 | Carulli és mtsai (2007) |
| Aggrecán tengelyfehérje | anti-aggrecán (HAG7D4) | Acris | egér, monoklonális | 1:10 | Brückner és mtsai (2008) |
| Brevikán | anti-brevikán (50 kD fragmens) | R.T. Matthews | nyúl, monoklonális | 1:20000 | Matthews és mtsai (2000) |
| Hialuronsav | biotilínált hialuronsav-kötő fehérje (B-HABP) | Cape Cod | egér, monoklonális | 10 mg/ml | Carulli és mtsai (2007) |
| Tenascin-R | anti-tenascin-R | R&D Systems Inc. | egér, monoklonális | 1:50 | Brückner és mtsai (2003) |
| neuronális markerek | | | | | |
| Parvalbumin | anti-PV28 | Swant | nyúl, poliklonális | 1:1000 | Celio és Heizman (1981) |
| GABA _A receptor | anti-GABA _A receptor β 2,3 lánc | Millipore | egér, monoklonális | 1:200 | Ma és mtsai (2011) |
| Kolin-acetiltransferáz | anti-kolin-acetiltransferáz (anti-Chat) | Millipore | kecske, poliklonális | 1:500 | Morawski és mtsai (2010c) |
| Glicin receptor | anti-glicin receptor klón (GlyR4a) | Synaptic Systems | egér, monoklonális | 1:100 | Baer és mtsai (2009) |
| P-anyag (Substance P) | anti-substance-P | Accurate Chemical | nyúl, monoklonális | 1:100 | Kozsurek és mtsai (2009) |
| 1-es típusú glutamát transzporter | anti-1-es típusú glutamát transzporter 1(VGLUT1) | Synaptic Systems | nyúl, poliklonális | 1:500 | Takamori és mtsai (2000) |

2. táblázat: A külső térdestestben használt antitestek és lektinek összefoglaló táblázata

| detektált komponens | antitestek | Cég | Faj | Hígítás | Referenciák |
|-----------------------------------|--|-----------------------|----------------------|---------|---------------------------|
| Aggrecán tengelyfehérje | anti Cat-301 | Millipore | egér, monoklonális | 1:1000 | Matthews és mtsai (2002) |
| Aggrecán tengelyfehérje | anti Cat-315 | Millipore | egér, monoklonális | 1:1000 | Bückner és mtsai (2008) |
| Aggrecán tengelyfehérje | anti-aggrecán HAG7D4 | Acris | egér, monoklonális | 1:10 | Brückner és mtsai (2008) |
| Link protein-1 | anti-CRTL- 1 (hHAPLN1) | R&D Systems Inc. | kecske, poliklonális | 1:400 | Carulli és mtsai (2007) |
| 1-es típusú glutamát transzporter | anti-vezikularis glutamát transzporter 1(VGLUT1) | Synaptic Systems | nyúl, poliklonális | 1:10000 | Kaneko és Fujijama (2002) |
| glutamát-dekarboxiláz | anti-glutamát dekarboxiláz (GAD) | Sigma | kecske, poliklonális | 1:5000 | Brückner és mtsai (2008) |
| neurofilamentum | anti-Pan-neuronális neurofilament marker (SMI-311) | Sternberg Monoclonals | nyúl, poliklonális | 1:1000 | Ulfing és mtsai (1998) |
| Gliális fibrilláris savas fehérje | anti-gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) | Dako | nyúl, poliklonális | 1:2000 | Eng (1985) |
| Parvalbumin | anti-parvalbumin | Swant | nyúl, poliklonális | 1:5000 | Celio és Heizman (1981) |
| lektinek | | | | | |
| N-acetilgalaktózamin | biotilínált Wisteria floribunda agglutinin (WFA) | Sigma | | 5mg/ml | Härtig és mtsai (1992) |

3. táblázat: Az emberi hippokampuszban alkalmazott ellenanyagok összefoglaló táblázata.

| detektált komponens | Antitestek | Cég | Faj | Hígítás | Referenciák |
|---|--|--------------------|----------------------|----------|---------------------------|
| mátrixösszetevők | | | | | |
| Link protein-1 | anti-CRTL-1 (hHAPLN1) | R & D Systems Inc. | kecske, poliklonális | 1:200 | Carulli és mtsai (2007) |
| Aggrekán tengelyfehérje | anti-aggrekán (HAG7D4) | Acris | egér, monoklonális | 1:10 | Brückner és mtsai (2008) |
| Aggrekán tengelyfehérje | anti-aggrekán (AB1031) | Millipore | nyúl, poliklonális | 1:1000 | Giamanco és mtsai (2010) |
| Aggrekán tengelyfehérje | anti-Cat-301 | Millipore | egér, monoklonális | 1:1000 | Matthews és mtsai (2002) |
| Brevikán | anti-brevikán | Santa Cruz | kecske, poliklonális | n.a. | Lendvai és mtsai (2012) |
| Brevikán | anti-brevikán (50kDa fragmens) | R. T. Matthews | nyúl, poliklonális | 1:2000 | Matthews és mtsai (2000) |
| lektinek | | | | | |
| N-acetilgalaktózamin | biotilínált Wisteria floribunda agglutinin (WFA) | Sigma | | 25 µg/ml | Morawski és mtsai (2011) |
| neuronpopulációk azonosítására szolgáló markerek | | | | | |
| Calbindin | anti-Calbindin (D-28k) | SWant | egér, monoklonális | 1:2000 | Celio és mtsai (1990) |
| Calretinin | anti-Calretinin | SWant | kecske, poliklonális | 1:2000 | Schwaller és mtsai (2003) |
| Glutamát dekarboxiláz | anti-glutamát dekarboxiláz (GAD) | Sigma | nyúl, poliklonális | 1:5000 | Brückner és mtsai (2008) |
| mikrotubulus asszociált fehérje-2 | anti-mikrotubulus asszociált fehérje-2 (MAP2) | Sigma | egér, monoklonális | 1:200 | Binder és mtsai (1996) |
| Parvalbumin | anti-parvalbumin | SWant | nyúl, poliklonális | 1:5000 | Celio és mtsai (1990) |
| vezikuláris GABA transzporter (VGAT) | anti-VGAT | Synaptic Systems | nyúl, poliklonális | 1:500 | Härtig és mtsai (2003) |
| 1-es típusú glutamát transzporter | anti-vezikuláris glutamát transzporter (VGLUT1) | Synaptic Systems | nyúl, poliklonális | 1:5000 | Kaneko és mtsai (2002) |

4.7. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos feldolgozás során a külső térdestestből és a hippocampusz CA1 régiójából vibratómmal 50 µm 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 hippocampusz esetében HAG7D4 és brevikan immunjelölést végeztünk. A metszeteket 1 órán át ozmium tetroxid (Reanal) 1%-os oldatával szobahőmérsékleten utánfixáltuk, majd dehidráció után Durcupan-ba (Fluka) ágyaztuk. A legtöbbször alkalmazott uranil-acetáttal végzett kontrasztosítási lépést kihagytuk. Ez ugyanis a membránokat erősen elektronenz struktúrává teszi, mely az ehhez közvetlen kapcsolódó mátrix immunjelet attól megkülönböztethetlenné tenné. A gyantába ágyazott mintákból ultravékony metszeteket készítettünk, ezeket Formvarral hártályozott gridekre vettük fel.

4.8. Képkészítés

Immunperoxidáz reakcióval készült, egyszeres immunhisztokémiai jelöléseinket Zeiss Axiovert 200 fénymikroszkóppal elemeztük. Azokat a metszeteket, melyeken többszörös immunfluoreszcens jelöléseinket végeztünk, konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (Biorad, Hercules, USA) vizsgáltuk. Az ultrastruktúrát JEOL 1200 EMX típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük.

4.9. Kvantitatív adatok

Mennyiségi analízist a humán külső térdestestben és a hippocampuszban végeztünk.

4.9.1. A HAG7D4-immunreaktív periaxonális hüvelyek szinaptikus markerek körüli gyakoriságának megállapítása a külső térdestestben

Ezeket a mennyiségi vizsgálatokat kettősen immunjelölt jelölt metszeteken végeztük, ahol HAG7D4 immunjelölést VGLUT1, GAD vagy PV immunjelöléssel kombináltunk. Első lépésben a HAG7D4-immunreaktív periaxonális hüvellyel borított

VGLUT1-, GAD- vagy PV-immunreaktív profilokat számoltuk meg. Második lépésben a periaxonális hüvelyeket számoltuk meg manuálisan ugyanazon, de egycsatornás szürkeárnyalatosra konvertált képeken. Utolsó lépésben a VGLUT1-, GAD- vagy PV-immunreaktív profilok számát határoztuk meg a másik csatorna szürkeárnyalatosra konvertált képein, ugyanezen mérőkeretben, mind manuálisan, mind digitálisan, az UTHSCSA Image Tool 3.00 szoftver segítségével. A periaxonális hüvelyekkel körülvett szinapszisok számát összevetettük az összes szinaptikus profil számával, abból hányadost képeztünk.

4.9.2. Kvantitatív analízisek a hippocampuszban

Mennyiségi analíziseinket két mintán végeztük. A periaxonális hüvelyek kvantitatív analízisét a CRTL-1 és brevikan immunfestett metszeteinken hajtottuk végre a Neurolucida program segítségével. Méréseinket öt metszeten végeztük, egy metszeten régióként (*subiculum*, *Cornu Ammonis*: (CA1, CA2, CA3, CA4); *gyrus dentatus* (GD); *enthorinalis cortex* (EC)) három helyről. A három mért adatot (egységnyi területtel rendelkező mérőkeretre jutó profilok száma) az adott régióban átlagoltuk. Majd az öt metszeten mért (átlag) adatot átlagoltuk. Végül a két agyvelőből vett átlagok átlagát átlagoltuk, innen kaptuk a szórás értékét. Sémás ábráinkon (22. és 23. ábrák A₂ részei) a periaxonális hüvelyek helyzetét, relatív sűrűségét képileg is demonstráltuk).

A parvalbumin és calretinin immunreaktív sejtek perineuronális hálózhoz való viszonyát a hippocampusz CA1 régiójában vizsgáltuk Cat-301, parvalbumin és calretininnel többszörösen immunfestett metszeteiken. Interneuron típusonként ötven sejt körül vizsgáltuk meg a perineuronális hálók meglétét, majd a hálózaló bíró sejtek arányát meghatároztuk.

4.9.3. Perineuronális hálók feltérképezése a hippocampuszban

Az aggregán-, CRTL-1 fehérje- vagy brevikan tartalmú perineuronális hálókat a Neurolucida programmal térképeztük fel. A keret-léptető funkció lehetővé tette, hogy ezeket a struktúrákat a hippocampusz formáció egész területén helyük és pontos számuk alapján megjeleníthessük. Ezt (a 22. és 23. ábrák A₁ részein) ábráink sémás részein képileg ábrázoltuk.

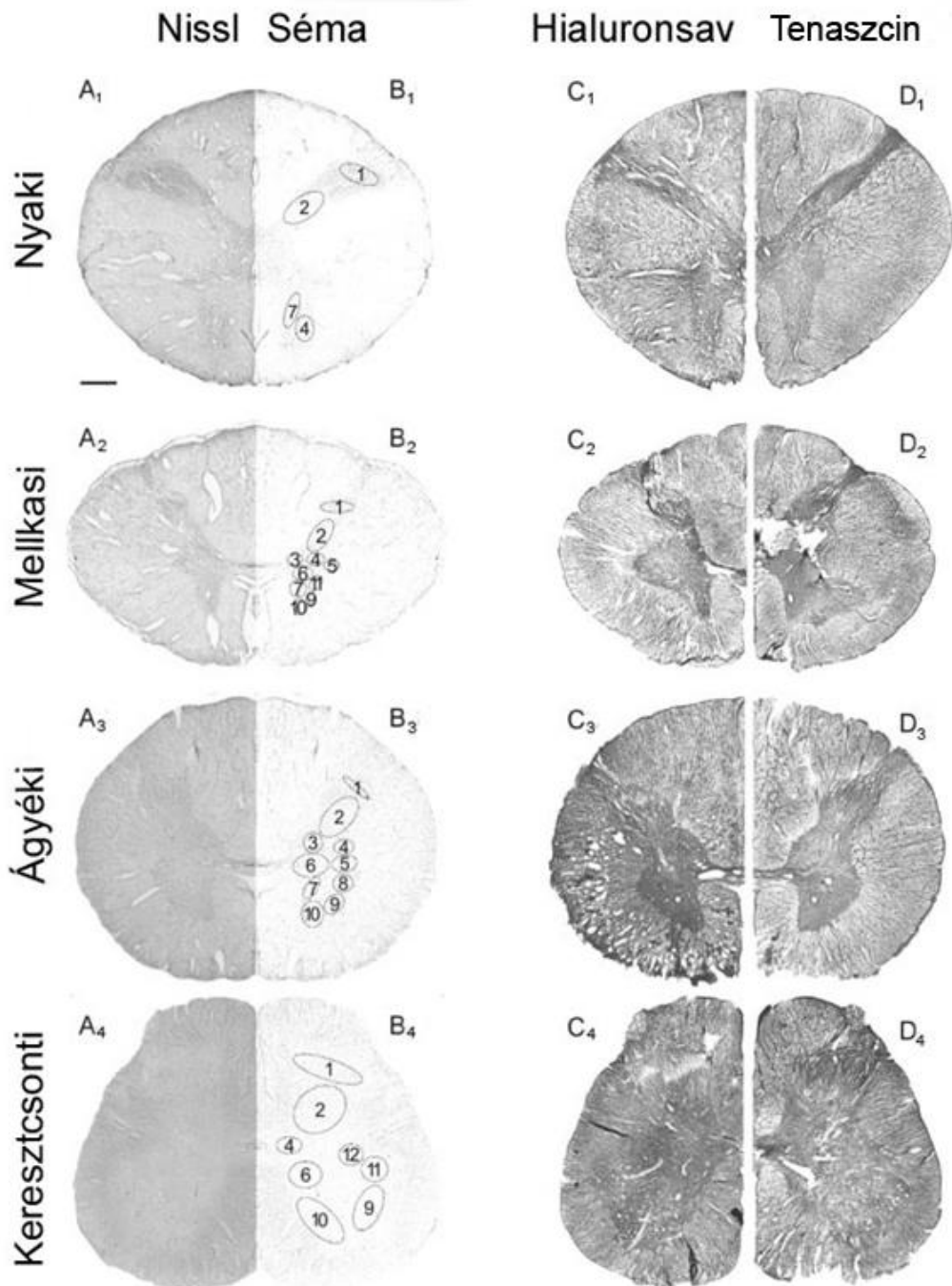
5. EREDMÉNYEK

5.1. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formái az emberi gerincvelőben

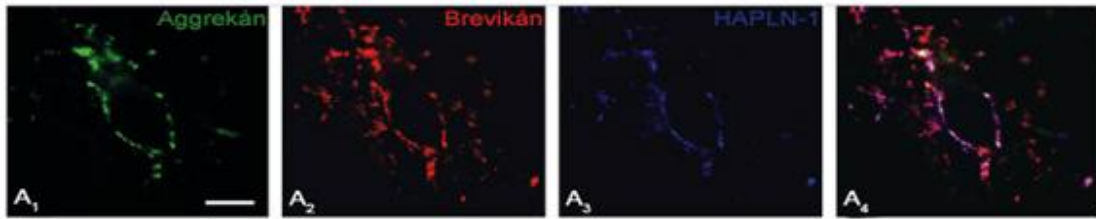
5.1.1. Általános immunhisztokémiai megállapítások

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 analizésére alapoztuk (4. ábra). Különböző citokémiai markereket használtunk a mátrixkomponensek és a neuronok azonosítására (1. táblázat).

Öt alapvető extracelluláris mátrixkomponenst vizsgáltunk a kémiai heterogenitás feltérképezéséhez: hialuronsav, aggregán, 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 immunreaktivitást (4. ábra C₂–C₄). Megfigyeléseink azt mutatták, hogy a tenaszcin festődés a hátsó szarv területén intenzív, különösen a gerincvelő háti, ágyéki és keresztcsonti szakaszán (4. ábra D₂–D₄). Elsősorban aggregán, brevikán és CRTL-1 pozitív aggregátumokat figyeltünk meg a neuronok szómája, dendritjei és axonterminálisai körül (5. és 6. ábrák). Ezek a szürkeállományban koncentráálódtak, megkímélve a fehérállományt. Perineuronális hálókat leginkább aggregán immunoreaktivitásuk alapján azonosítottunk. Ezzel szemben a brevikán és a CRTL-1 a disztális dentritszakaszok mentén fordult elő (5. ábra).



4. ábra: Nissl festés, sematikus ábra, hialuronsav és tenaszcin festések átnézeti képei, a gerincvelő különböző szakaszai. Nissl festés képei (A₁-A₄) a sematikus ábrákkal kiegészítve (B₁-B₄), amelyek bemutatják a fő magokat az emberi gerincvelő nyaki, mellkasi, ágyéki és keresztcsonti szegmenseiben. A számok a következő képleteket jelölik: 1: *substantia gelatinosa*, 2: *nucleus proprius*, 3: Clarke oszlop, 4: vegetatív neuronokat tartalmazó szürkeállomány, 5: *nucleus intermediomediális*, 6: *nucleus intermediolateralis*, 7: *nucleus dorsomedialis*, 8: *nucleus dorsolateralis*, 9: *nucleus ventrolateralis*, 10: *nucleus ventromedialis*, 11: *nucleus retrodorsolateralis*, 12: szakrális paraszimpatikus mag. Lépték = 1mm.



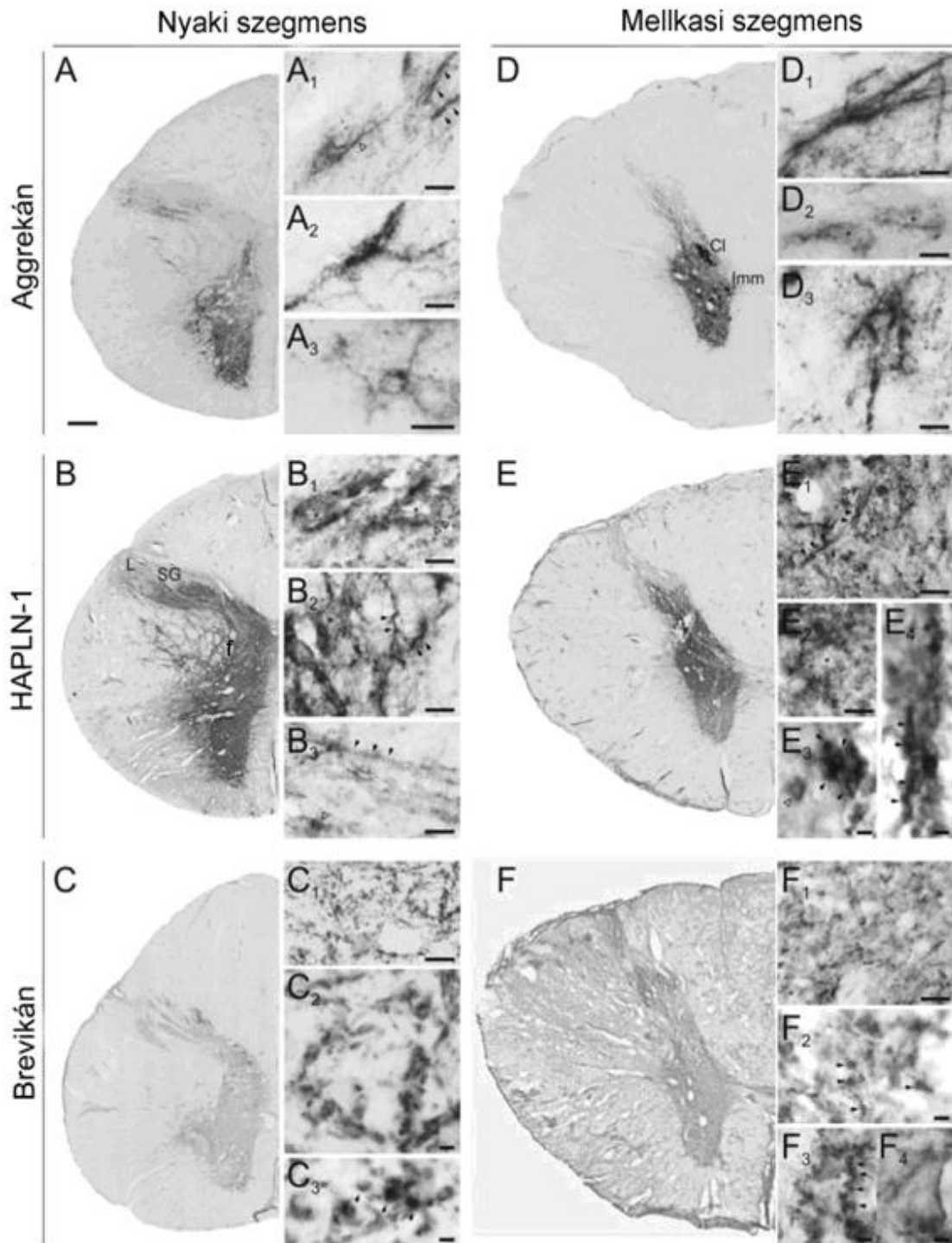
5. ábra: Perineuronális hálók a humán gerincvelőből és a fő extracelluláris mátrixösszetevők. A gerincvelő mellső szarvából származó neuront körülvevő extracelluláris mátrix fluoreszcens képe azt mutatja, hogy a különböző mátrixkomponensek, mint az aggrekán, a brevikan vagy a HAPLN-1 részben átfednek egymással (A₄). Egy vékony típusú, aggrekán tartalmú perineuronális háló látszik (A₁). A brevikan és a HAPLN-1 nagymértékben átfednek az axon iniciális szegmens körül (A_{2,3}). Lépték = 100 μ m.

5.1.2. A gerincvelő szakaszainak részletes immunhisztokémiai jellemzése

a. Nyaki szakasz

A cervikális szakaszon az aggrekán alapú perineuronális hálók uralták a szürkeállományt (6. ábra A-A₃). Az idegsejtek szómáját vékony (6. ábra A₁), erős (6. ábra A₂), vagy épp diffúz (6. ábra A₃) aggrekán alapú perineuronális hálók vették körül, nagyobb gyakorisággal a szürkeállomány elülső szarvi és centrális területén. A dendritek proximális szakaszai igen gyakran az őket borító mátrix aggregátumok révén váltak láthatóvá (6. ábra A₁).

A mátrixmintázat más képet adott CRTL-1 immunhisztokémiai festés után. A hátsó szarvban mutatott erős immunreakció hirtelen megszűnt a substantia gelatinosa, továbbá az úgynevezett Lissauer zóna területén (6. ábra B). A fehérállomány oldalsó kötegének mediális része határozottan elkülönült CRTL-1 immunfestéssel, míg az aggrekán és brevikan festéssel jelöletlen maradt (6. ábra A, C). Nagyobb nagyítással kiderült, hogy a perineuronális mátrix csipkeszerűen megjelenő, kis kerek struktúrákból, periaxonális hüvelyekből áll (6. ábra B₁₋₂), amelyeket 10-15 μ m-en keresztül lehetett követni mindhárom szarv diffúz mátrixában (6. ábra B₂). Különösen jól ábrázolódtak ezek a struktúrák a substantia gelatinosában, ahol a gyenge diffúz mátrix festődés lehetővé tette számunkra a periaxonális hüvelyek nagyszámú azonosítását (6. ábra B₃).



6. ábra: Aggrekán, brevikán és HAPLN-1(CRTL-1) festések átnézeti képei a nyaki és mellkasi szegmensekben. (A) A gerincvelő nyaki szegmensében a hátsó szarv gyenge, a mellső szarv erős immunreaktivitást mutatott. A perineuronális hálóknak vékony (A_1), robosztus (A_2) vagy diffúz (A_3) típusa látható, amelyek jellegzetesen a mellső szarvban jelentek meg. (B) A hátsó és a mellső szarv azonos mértékben volt HAPLN-1 immunreaktív, majd a reaktivitás hirtelen megszűnt a substantia gelatinosa területén (SG) és a Lissauer zónában (L). A HAPLN-1 immunreaktív mátrixaggregátumok kötegeket rajzoltak ki a fehérállomány oldalsó funikulusában (f). A perineuronális hálókat (B_1 , B_2 ,

csillag) vastag csoportokba rendeződött mátrix aggregátumok, részben pedig vékony (1 μm) gyűrű formájú (B üres nyílak) profilok hozták létre. Gyakran azonosítottunk 10-15 μm hosszan elnyúló, gyöngysorra emlékeztető struktúrákat (B₂, nyílhegyek). Tekintettel a gyenge diffúz mátrixfestődésre, hosszan elnyúló (nyílhegy), vagy egyedülálló periaxonális hüvelyekkel (üres nyílhegyek) lehetett találkozni a *substantia gelatinosa* területén (B₃). (C) A szürkeállományt a B50 (brevikán) immunreaktív periaxonális hüvelyek töltötték ki (C₁). A periaxonális hüvelyek véletlenszerűen körülrajzoltak perikarionokat (C₂), vagy rendezetlen csoportokba szerveződtek (C₃, nyílhegyek). (D) A mellkasi szegmensekben az aggregátum immunreaktív perineuronális hálók kirajzolták a Clarke oszlopot (Cl) nagyobb nagyítás: D₁ és az intermediomedialis magot (Imm a D ábrán, a nagyobb nagyítás: D₃). Perineuronális hálókat a nucleus propriusban is találtunk (D₂). (E, F) Mellkasi szegmensek összefoglaló megállapításai és a nyaki szegmensek CRTL-1 és B50 immunofestése. HAPLN-1 immunreaktív apró gyűrű alakú profilok által kialakított hüvelyek (E₁ nyílhegyek) egyedülállóan (E₁, E₃, üres nyílhegyek) vagy kis csokrok (E₃, nyílhegyek) formájában jelentek meg. Perineuronális hálók csak elvétve fordultak elő (E₂). A B50 immunreaktív periaxonális hüvelyeket, amelyek nagy számban kitöltik a szürkeállományt (F₁), önállóan (F₂), avagy láncokat formálva (F₃) figyeltünk meg. Nagyon ritkán találtunk csak perineuronális hálókat (F₄). Lépték = 150 μm (A-F alacsony nagyítású képek), 10 μm (A₁₋₃, B₁₋₃, C₁, D₁₋₃, E₁₋₂), 5 μm (C₂₋₃, E₃₋₄, F₃₋₄).

A tipikus perineuronális hálók jelenlétét nem tapasztaltuk a brevikán festés során. Mindhárom szarvban apró struktúrákat lehetett felfedezni, ami gyengén festődött jelleget kölcsönzött a szürkeállománynak (6. ábra C). Ezek a képletek periaxonális hüvelyekre emlékeztettek, ilyen struktúrákat a humán agyvelőben elektronmikroszkóppal is azonosítottunk (jelen disszertáció 5.2. és 5.3. fejezetei). A 2-5 μm méretű, kerek vagy ovális képleteket (6. ábra C₁) néhány esetben szómák körül lehetett látni (6. ábra C₂), vagy kisebb-nagyobb csoportokba szerveződve (6. ábra C₃).

b. Mellkasi szakasz

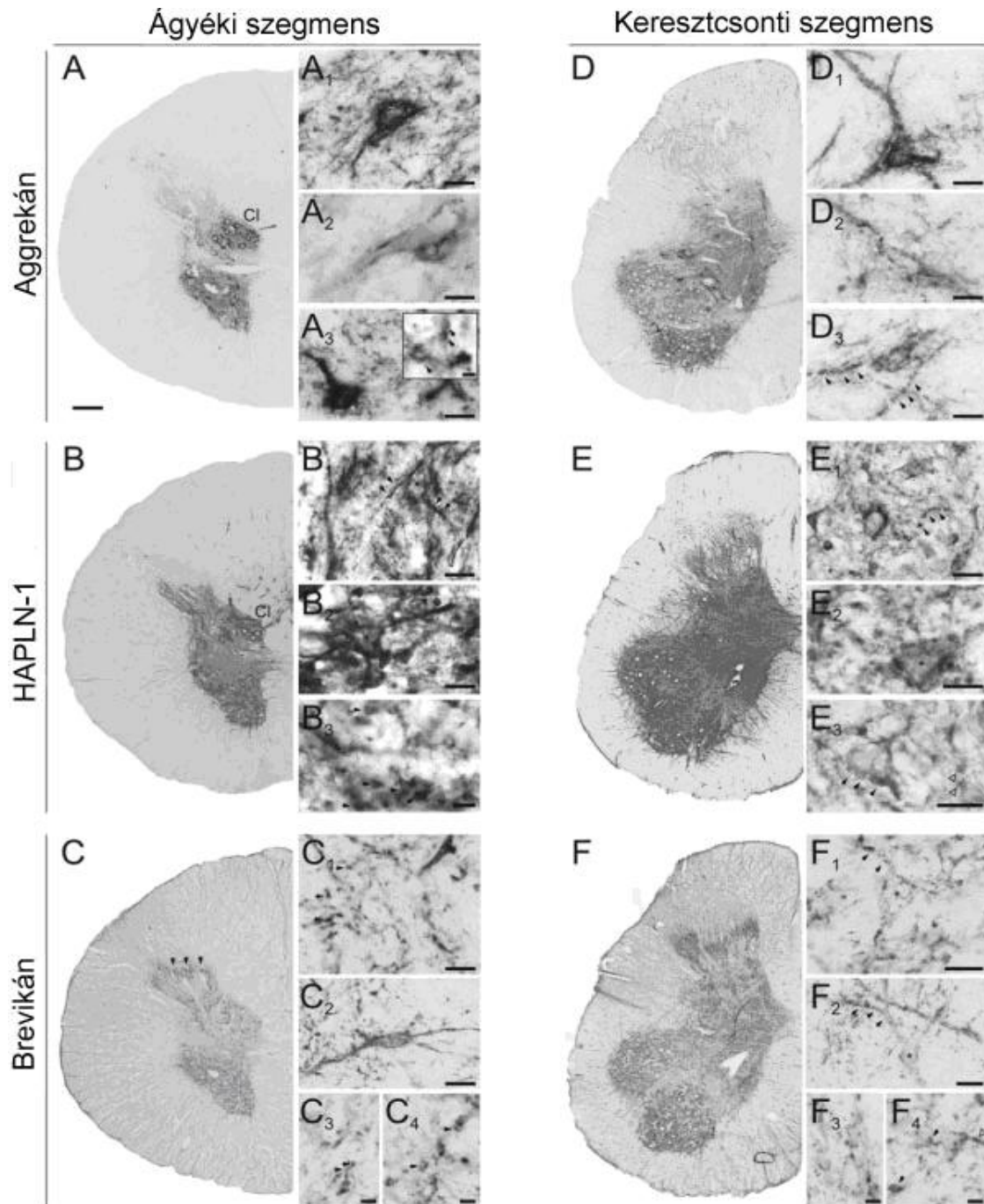
A nyaki szegmensben leírtakhoz képest a mellkasi szegmensben a perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek eloszlása is különböző volt (6. ábra D–F). Két terület feltűnően kirajzolódott a sűrűn elhelyezkedő és erősen festődő aggregátum-immunreaktív perineuronális hálók miatt (6. ábra D). A Clarke oszlop magjait (6. ábra D₁) és az intermediolaterális magoszlop magjait (6. ábra D₃) erősen festődő, vastag aggregátum-immunreaktív perineuronális hálók borították, ugyanakkor halványan festődő perineuronális hálókat találtunk a nucleus proprius gyengén festődő állományában is (6.

ábra D₂). Hasonlóan a cervikális szelvényhez, perineuronális hálókat az elülső-, oldalsó- és hátsó szarvban is megfigyeltünk, ez utóbbiban ritkábban.

A CRTL-1 immunfestéssel a ventrolaterális magoszlopban (6. ábra E_{1,3,4}) és az oldalsó szarvban (6. ábra E₂) igen sok 3-5 µm átmérőjű kerek képlet figyelhető meg, amelyek valószínűleg periaxonális hüvelyek. Heterogén csoportokat kialakítva (6. ábra E₁) elszórtan egyesével, vagy csokrokra emlékeztető módon rendeződve (6. ábra E₃), vagy egy vonal mentén felfűzve 10-20 µm hosszan – feltételezhetően dendritek mentén (6. ábra E_{1,4}) – fordultak elő. Azonosítottunk – periszomatikusan inkomplett – CRTL-1 immunreaktív perineuronális hálókat is (6. ábra E₂). Hasonló struktúrák festődnek az anti-brevikán antitesttel az intermediolaterális (6. ábra F₁₋₂) és ventrolaterális (6. ábra F₃₋₄) magokban, nem mutatva preferenciát a szürkeállományi eloszlásban. A nyaki szakasztól eltérő módon, a fehérállomány oldalsó kötegében nem találtunk CRTL-1 immunpozitivitást (6. ábra E).

c. Ágyéki szakasz

A gerincvelő ágyéki szakaszán nagy számban találtunk - így a Clark-féle magoszlopban – aggregán- és CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálókat (7. ábra A, B). A nucleus propriusban (7. ábra A₂) halványan jelölt hálókat lehetett látni. Aggregán immunopozitív perineuronális hálókat találtunk továbbá az elülső szarv dorsolaterális (7. ábra A₁) és ventromediális (7. ábra A₃) területein. Ellentétben a nyaki vagy a mellkasi szelvényekkel, a ventromediális magban (7. ábra B₁) és a Clarke oszlopban (7. ábra B₂), a CRTL-1 ellenes antitest igen nagy számban jelenített meg perineuronális hálókat. Periaxonális hüvelyeket a teljes ágyéki szürkeállomány területén azonosítottunk, ezek brevikán és link protein-1 pozitívak voltak (7. ábra B₁-B₃, C₁-C₄). A brevikán pozitív periaxonális hüvelyek különböző méretben jelentek meg: láttunk kisebbeket (1-2 µm-es átmérő) és nagyobbakat (3-5 µm-es átmérő), melyek területenként homogén populációkat alkottak. Brevikán-immunreaktív perineuronális hálókat csak ritkán azonosítottunk (7. ábra E₂).



7. ábra: Aggregán, brevikan és HAPLN-1 (CRTL-1) festések összefoglaló ábrái a gerincvelő ágyéki és keresztcsonti szegmenseiből. Az ágyéki szegmensekben, az aggregán immunreaktív és a HAPLN-1 immunreaktív perineuronális hálók körvonalazták a Clarke oszlop (Cl) magcsoportját (A, B). Az aggregán-immunreaktív perineuronális hálók igen gyakran fordultak elő a dorsolaterális (A₁) és ventromediális (A₃, nyílhegyek a kis kerek képletekre mutatnak) magokban, halványan festődő fenotípusokat a nucleus propriusban figyeltünk meg (A₂). A HAPLN-1 immunreaktív perineuronális hálókkal leginkább a ventromediális magokban (B₁, a csillag szómát jelöli, a nyílhegy a proximális dendritszakaszt borító mátrixra mutat) és a Clarke oszlop magcsoportjában (B₂). A periaxonális hüvelyek CRTL-1 (B₃, nyílhegyek) és a B50 (brevikan) (C₁, nyílhegyek) immunreaktivitást mutattak, amelyek

kisebb (C_3 , nyílhegyek) vagy nagyobb (C_4 , nyílhegyek) egységeket formáltak. Mint azt a többi szegmensben is tapasztaltuk, brevikán immunreaktív perineuronális hálók ritkán fordulnak elő (C_2). A periaxonális hüvelyek jellemzően a substantia gelatinosa határán jelentek meg (C , nyílhegyek). Aggregán immunoreaktivitás a keresztcsonti szakaszon (D). Perineuronális hálók különböző típusai (D_{1-3} , nyílhegyek a peridendritikus hüvelyre mutatnak). Az erős HAPLN-1 immunoreaktivitást mutató diffúz mátrixban, a periaxonális hüvelyek rövid láncolata (E_1 , nyílhegyek) vagy önálló megjelenése (üres nyílhegyek az E_3 képen), illetve a perineuronális hálók (csillag az E_{2-3} képeken) több alkalommal felismerhetők. A perineuronális mátrixaggregátumok szintén felismerhetők a brevikán immunfestéssel (F_{1-3}), mint brevikán immunreaktív peridendritikus hüvelyek (nyílhegyek az F_{1-2} ábrán). (F_4) Nem csak periaxonális hüvelyek (nyílhegyek), hanem peridendritikus hüvelyek (üres nyílhegyek) is könnyen felismerhetők a szürkeállományban (F_4). Lépték = 1 mm (A-F alacsony nagyítású képek), 10 μ m (A_{1-3} , B_{1-2} , C_{1-2} , D_{1-3} , E_{1-3}), 5 μ m (B_3 , C_{3-4} , F_{3-4}) 2 μ m (melléklet az A_3 képen).

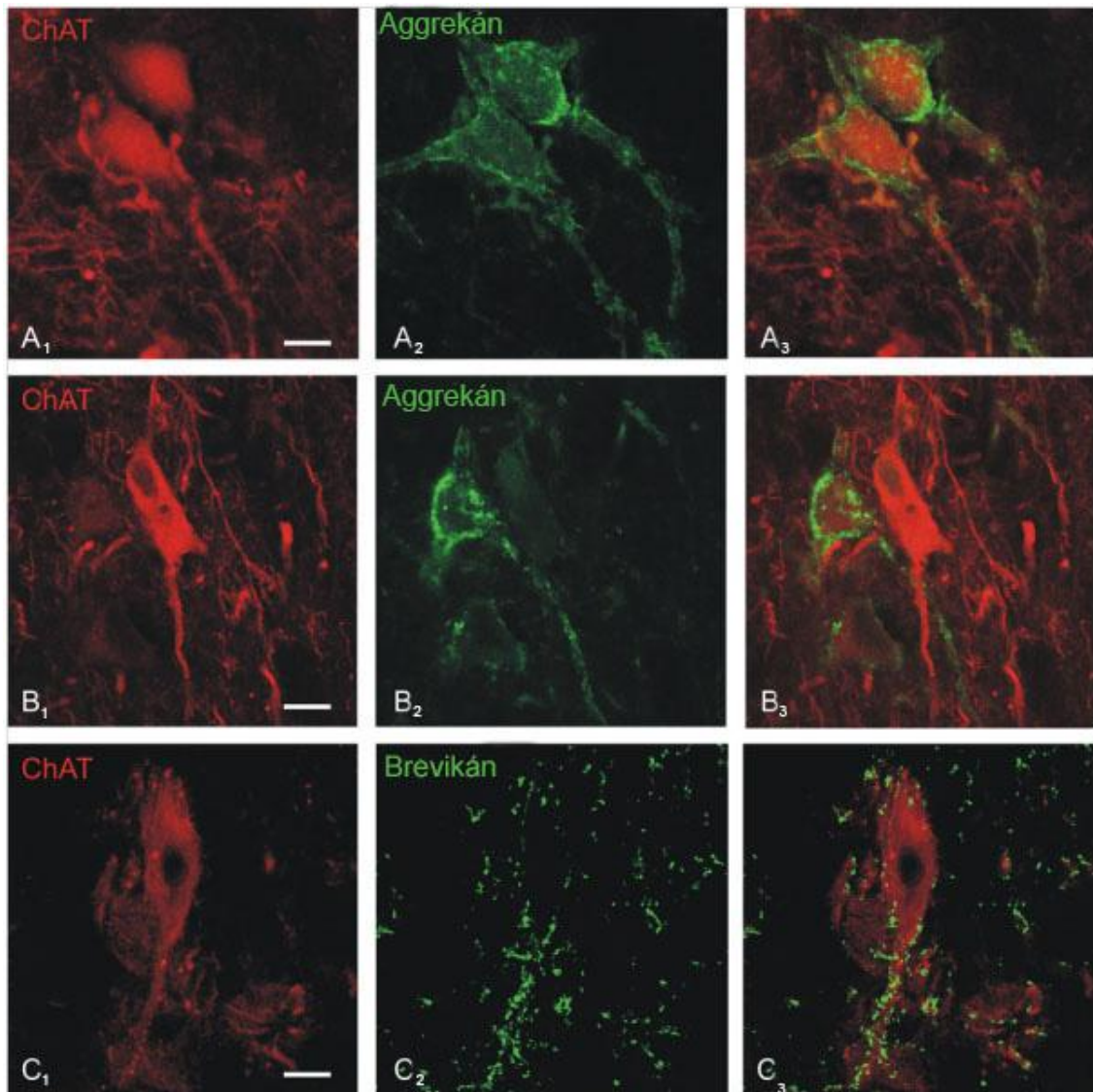
d. Keresztcsonti szakasz

A legkaudálisabb szegmense a gerincvelőnek a megvastagodott szürkeállományáról könnyen felismerhető. Különböző mátrixfestések azt mutatták, hogy az aggregán, a CRTL-1 protein és a brevikán immunpozitív struktúrák egyenletes eloszlásúak az elülső- és az oldalsó szarvban (7. ábra D–F). Aggregán festéssel a többi szelvényhez hasonlóan találtunk erősebb immunreaktivitású (7. ábra $D_{1,3}$), illetve gyengébb immunreaktivitású (7. ábra D_2) perineuronális hálókat. A CRTL-1 pozitivitás mellett perineuronális hálókat (7. ábra E_{1-3}) vagy periaxonális hüvelyek finom láncolatát (7. ábra E_1) többször is megfigyeltük. Az összes többi gerincvelői szegmensben a brevikán antitest jelölte legerőteljesebben a periaxonális hüvelyeket (7. ábra F_{1-4}). A szómák körül finomszerkezetű brevikán-immunreaktív hálókat találtunk (7. ábra F_{1-3}), amely gyakran a peridendritikus hüvelyekben is folytatódott (7. ábra $F_{2,4}$).

5.1.3. Az extracelluláris mátrix kapcsolata specifikus neuronokkal, neurotranszmitterekkel és receptorokkal

Az extracelluláris mátrix különböző neurontípusokkal, neurotranszmitterekkel és receptortípusokkal 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%) aggregán-immunreaktív perineuronális háló vette körül,

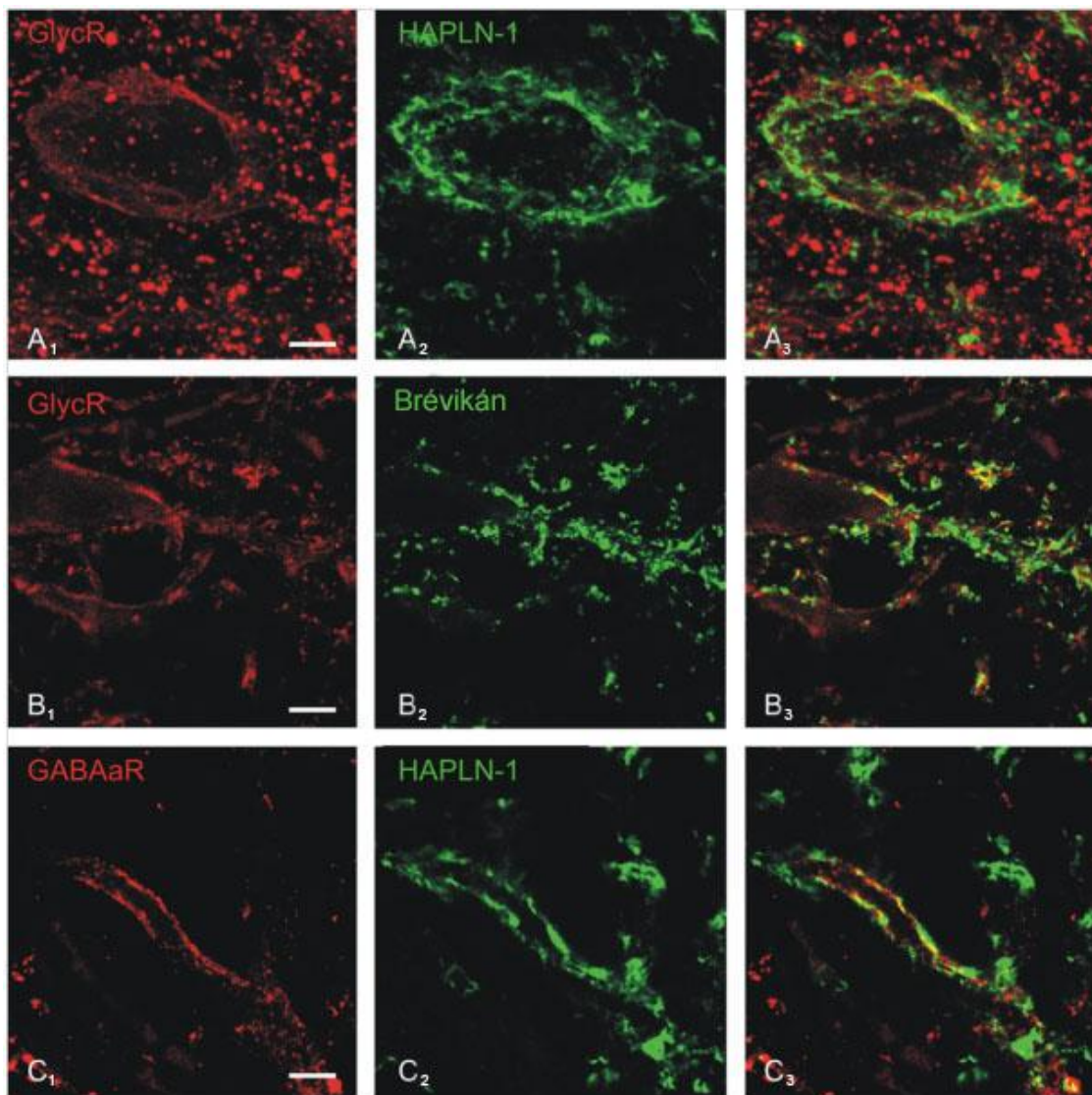
különböző intenzitással borítva a szomatodendritikus szakaszt (8. ábra A₁₋₃). Mindazonáltal nem minden ChAT-immunreaktív neuron rendelkezett perineuronális hálóval és a perineuronális hálók sem kizárólagosan kolinerg neuronok körül mutatkoztak (8. ábra B₁₋₃). Ezzel ellentétben a brevikán-immunreaktív mátrix a dendritek disztálisabb részén jelent meg nagy intenzitással; jellemzően azonban periaxonális hüvelyekként jelentek meg a neuronok felszíne mentén (8. ábra C₁₋₃).



8. ábra: Extracelluláris mátrix és a kolinerg neuronok a gerincevelőben. A legtöbb mellsőszarvi motoneuron rendelkezik aggrekán alapú perineuronális hálóval (A₁₋₃). Azonosítottunk olyan azonos nagyságú neuronokat, amelyek gyenge vagy semleges ChAT (kolinacetil-transzferáz)-immunoreaktivitással bírtak, illetve találtunk olyan tisztán kolinerg neuronokat, amelyek nem rendelkeztek perineuronális hálóval (B₁₋₃). Néhány, a nagy kolinerg neuronok közül brevikán-immunreaktív periaxonális hüvelyekkel lépett kapcsolatba (C₁₋₃), ezeket a disztális dendritszakaszok

körül lehetett azonosítani. Az első oszlopban (A_1, B_1, C_1) kolinerg neuronok láthatók, míg a második oszlop ábrái az ezeket körülvevő aggregátum (A_2, B_2) és brevikán (C_3) immunreaktív perineuronális hálót mutatja. Az utolsó oszlopban (A_3, B_3, C_3) az összevont immunreaktív képek táthatóak. Lépték = 100 μm .

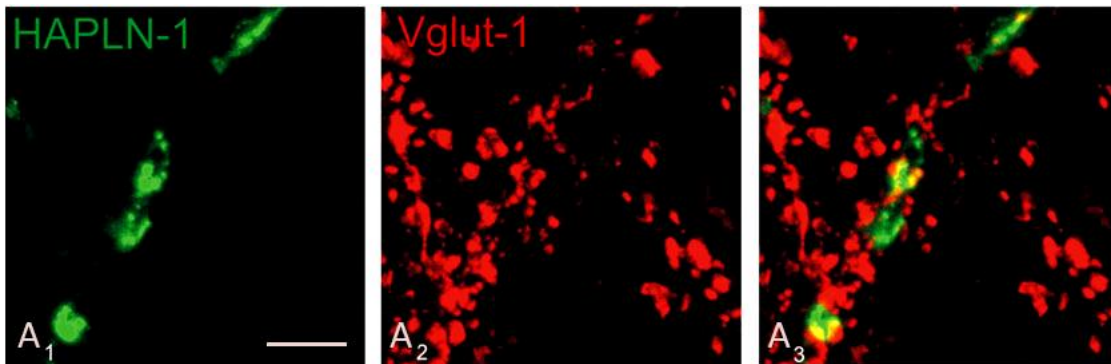
Nagy számban találtunk Gly-R immunreaktivitást a gerincvelő szürkeállományának egész területén, de azok nem kolokalizáltak a HAPLN-1-immunreaktív profilokkal (9. ábra A_{1-3}). Ezzel ellentétben a brevikán-immunreaktív periaxonális hüvelyek kolokalizációt mutattak Gly-R-kal (9. ábra B_{1-3}). A nagy motoneuronok dendritjei mentén láthatóak a HAPLN-1-immunreaktív profilok, amelyek átfedtek a GABA_A -immunreaktivitással (9. ábra C_{1-3}).



9. ábra: Extracelluláris mátrix és a gátló neurotranszmitterek receptorai. A glicinreceptor széles körben elterjedve helyezkednek el a szürkeállományban, többé-kevésbé átfedés nélkül a HAPLN-1

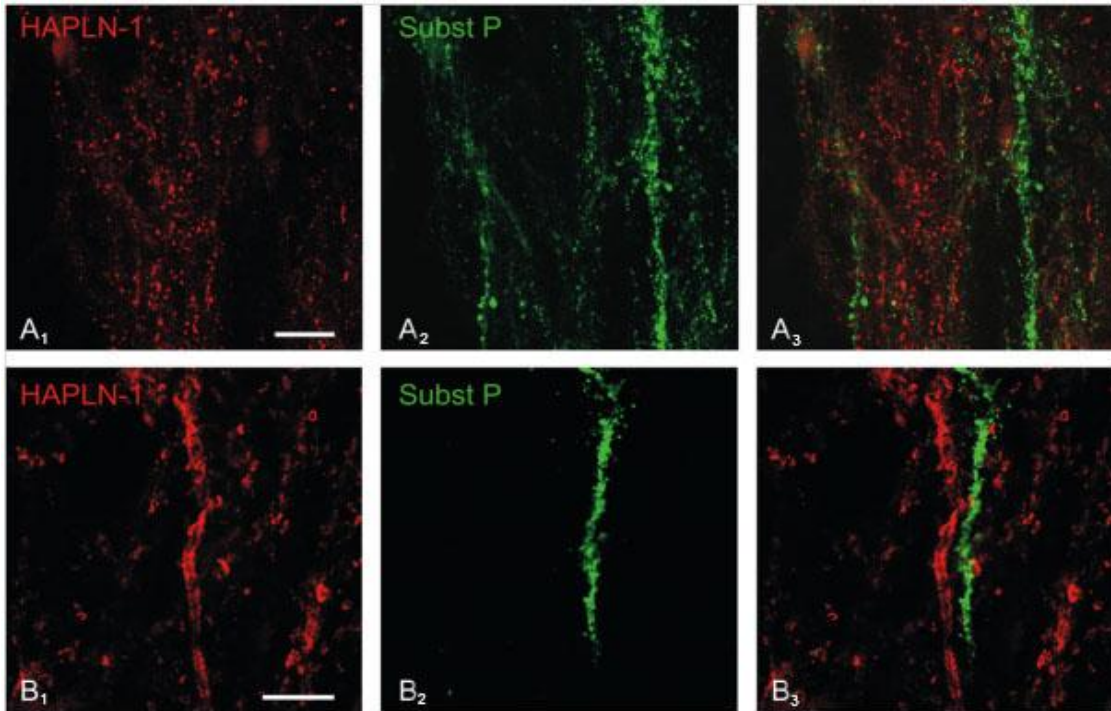
immunreaktív struktúrákkal (A₁₋₃). Néhány kolinerg neuron erős kolokalizációt mutatott glicinreceptorokkal és a brevikán immunreaktív struktúrák feltehetőleg a szinapszisokhoz asszociált periaxonális hüvelyeket reprezentálják (B₁₋₃). A GABA_A receptorok HAPLN-1 immunreaktív struktúrák mentén helyezkedtek el (C₁₋₃). Lépték = 50 µm (A₁₋₃), 10 µm (B₁₋₃, C₁₋₃).

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 kolokalizálva többször is találtunk VGLUT-1-immunfestett profilokat (10. ábra A₁₋₃).



10. ábra: Extracelluláris mátrix és a serkentő neurotranszmitterek receptorai. HAPLN-1 (CRTL-1) pozitív dendrithüvelyek VGLUT-1 (1-es típusú vezikuláris glutamáttranszporter)-immunreaktív profilok közvetlen közelében Lépték = 20 µm.

A CRTL-1 homogén immunreaktivitása alacsony volt a hátsó szarv I és II laminájában (6. ábra B, E és 7. ábra B, E), 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 (11. ábra A₁₋₃, B₁₋₃).

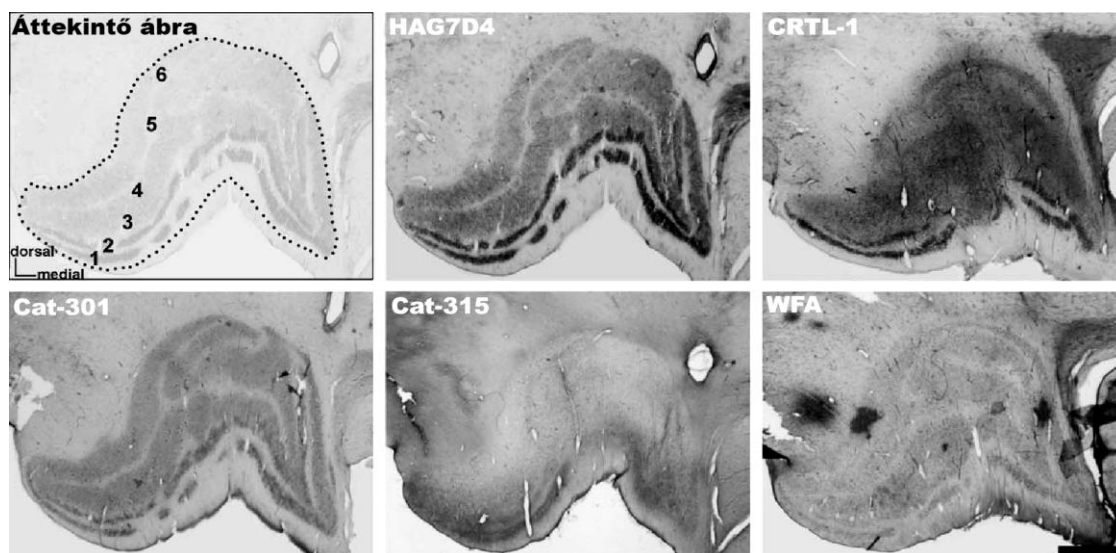


11. ábra: Az extracelluláris mátrix és a Substance-P előfordulása hátsó szarvban. A HAPLN-1 (CRTLN-1) és Substance-P immunreaktív profilok közel vannak egymáshoz, azonban nem mutatnak átfedést a gerincvelő hátsó szarvában (A₁₋₃, B₁₋₃). Lépték = 500 µm (A₁₋₃), 200 µm (B₁₋₃).

5.2. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formái az ember külső térdestestében

A különböző mátrixkomponensek ellen termelt antitestek (2. táblázat) részleges, de nem teljes átfedéssel jelenítették meg a külső térdestest sejtes elemei körül megjelenő extracelluláris mártixot.

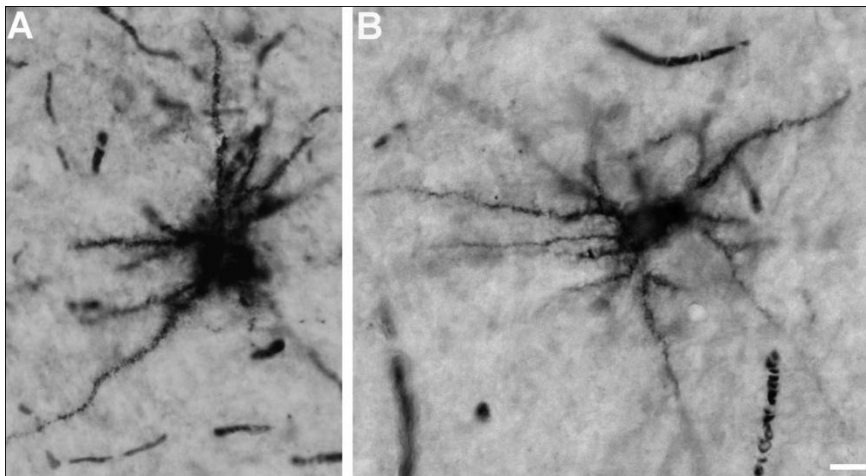
Legfontosabb megfigyelésünk az volt, hogy olyan tipikus perineuronális hálókat, amiket a gerincesek központi idegrendszerében – köztük az emberében – korábban leírtak, a külső térdestestben nem találtunk, az immunfestés gyenge volt az idegsejtek szómája körül. Kis ovoid alakú periaxonális hüvelyeket 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 (Hendry és mtsai 1984, Yin és mtsai 2006, Baldauf 2010). A periaxonális hüvelyek tömegesen jelentek meg a proximális- és intermedier dendritek körül, kirajzolva a neuronok dendritjeinek kontúrját. Az immunfestések és lektinfestés áttekintő eredményeit a 12. ábra foglalja össze.



12. ábra: Átnézeti kép az emberi külső térdestest réteges szerkezetéről. Kis nagyítású képek a kondroitinszulfát proteoglikán alapú immunjelölésekről, CRTL-1 protein-immunoreaktivitásról, illetve a lektin (WFA) festésről. A ventrálisan elhelyezkedő magnocelluláris rétegek a HAG7D4, CRTL-1, Cat-301 és Cat-315 antitestekkel való jelölés során erősebb immunreaktivitást mutattak, mint a dorsális

parvocelluláris rétegek. Lépték = 1 mm.

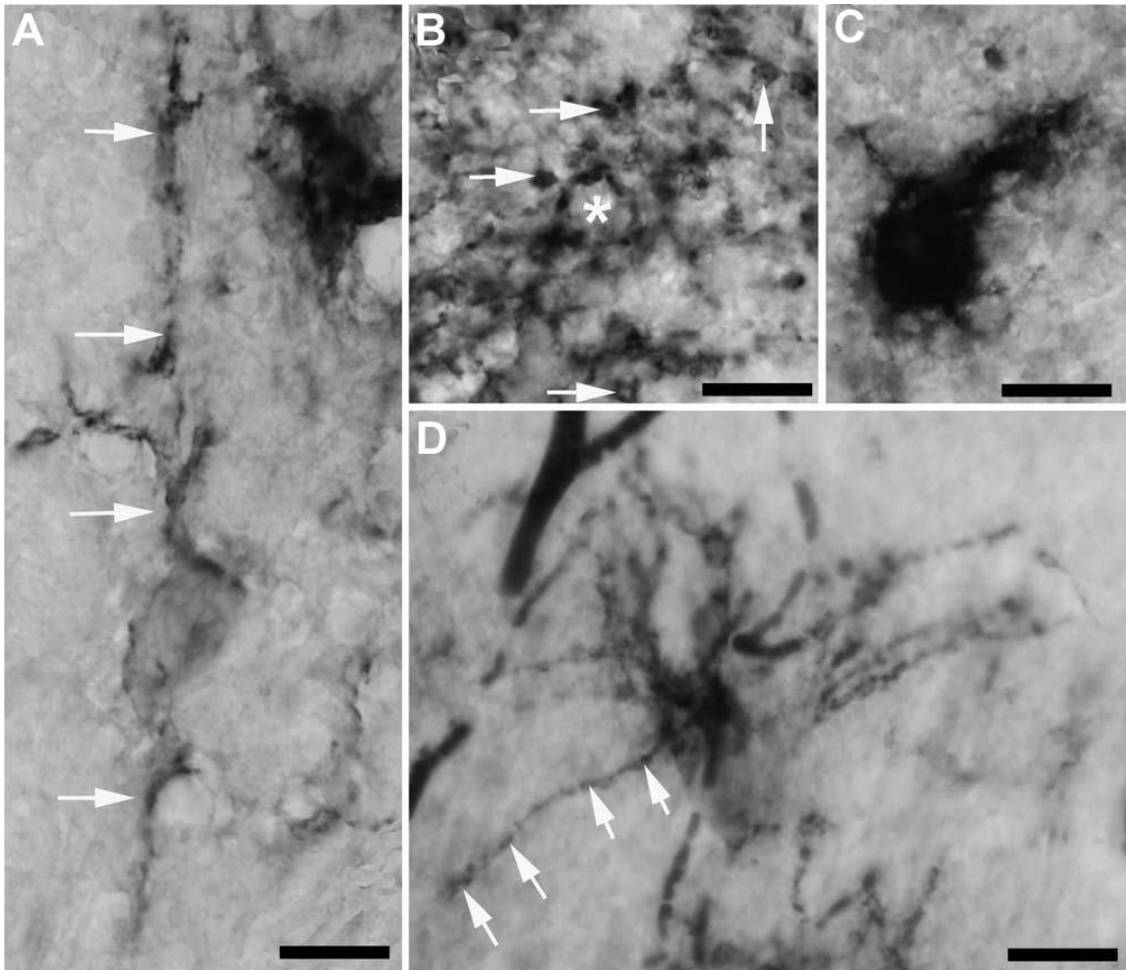
WFA lektinhisztokémiai jelöléssel sem perineuronális hálók, sem periaxonális hüvelyek nem festődtek a *corpus geniculatum lateraleban*. A lektinjel hiánya azonban nem a szövet vagy fixálási folyamat hibája, mivel több tipikus perineuronális hálót fedeztünk fel a – a külső térdestesttől dorzálisan elhelyezkedő – *pulvinar thalamiban* (13. ábra A). Ezt anti-aggrekán immunfestéssel (HAG7D4) szintén azonosíthattuk (13. ábra B).



13. ábra: Tipikus perineuronális hálók a talamusz pulvinár területéről. Erős periszomatikus és peridendritikus jelölés, WFA lektinhisztokémia használata mellett (A) vagy HAG7D4 immunhisztokémiával (B). Lépték = 10 μ m.

5.2.1. Aggrekán tengelyfehérje kimutatása HAG7D4 anti-aggrekán immunreakcióval

Mind a parvo-, mind a magnocelluláris rétegekben találtunk HAG7D4-immunreaktivitást. A magnocelluláris rétegek látványosan erősebben festődtek (12. ábra). A nagysejtes rétegekben (1. és 2. réteg) a dendriteket a periaxonális hüvelyek körvonalazták, néhány esetben igen hosszan (közel 30-40 μ m-es szakaszon) (14. ábra A). Másrészt a periaxonális hüvelyek véletlenszerűen és elszórtan is megjelentek a külső térdestestben (14. ábra B). Erős immunreaktivitású perineuronális hálókat az 1. és 2. magnocellularis rétegek közötti interlamináris rétegben azonosítottunk (14. ábra C). 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 (14. ábra D) volt.

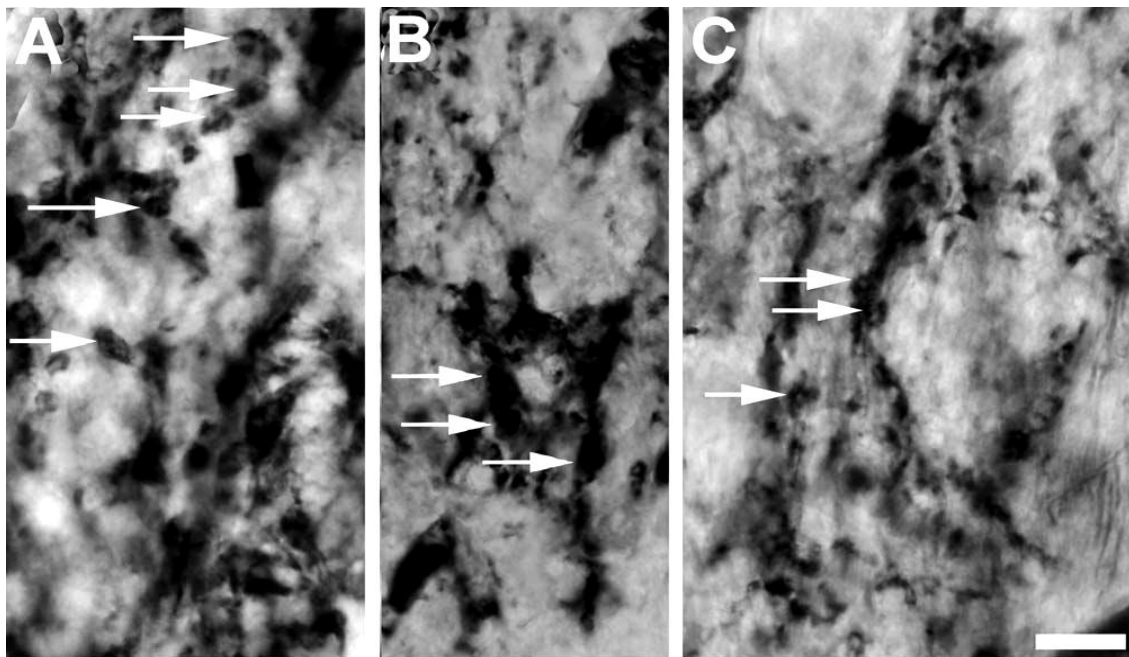


14. ábra: HAG7D4 immunreaktív képek az ember külső térdestestének területéről. A nyílhegyek olyan periaxonális hüvelyekre mutatnak, amelyek dendritek körül jelennek meg, vagy olyanokra, amelyek perikaryonokat vesznek körül (B, a csillag a sejttestet jelöli). A képek a magnocelluláris rétegből származnak. Nagyon erősen festődő perineuronális hálókat a magnocelluláris rétegek közötti interkaláris rétegekben lehetett látni (C). A parvocelluláris rétegben szintén talákoztunk olyan neuronokkal, amelyek dendritjeit periaxonális hüvelyek láncolata rajzolja ki (D, a nyílhegyek csak egy dendritet ábrázolnak), azonban szómáját csak gyengén körvonalazza. Lépték = 15 μ m.

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

5.2.2. *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 (15. ábra A, B). 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 hosszán követhető, *HAG7D4*-immunreaktív peridendritikus mátrixmintázatra (15. ábra C). Jóllehet *CRTL-1* immunfestéssel nem láttunk olyan jól kivehető neuronális kontúrokat, mint a *HAG7D4*-immunhisztokémiával, a tipikus immunreaktív struktúrák mindkét esetben periaxonális hüvelyek voltak.

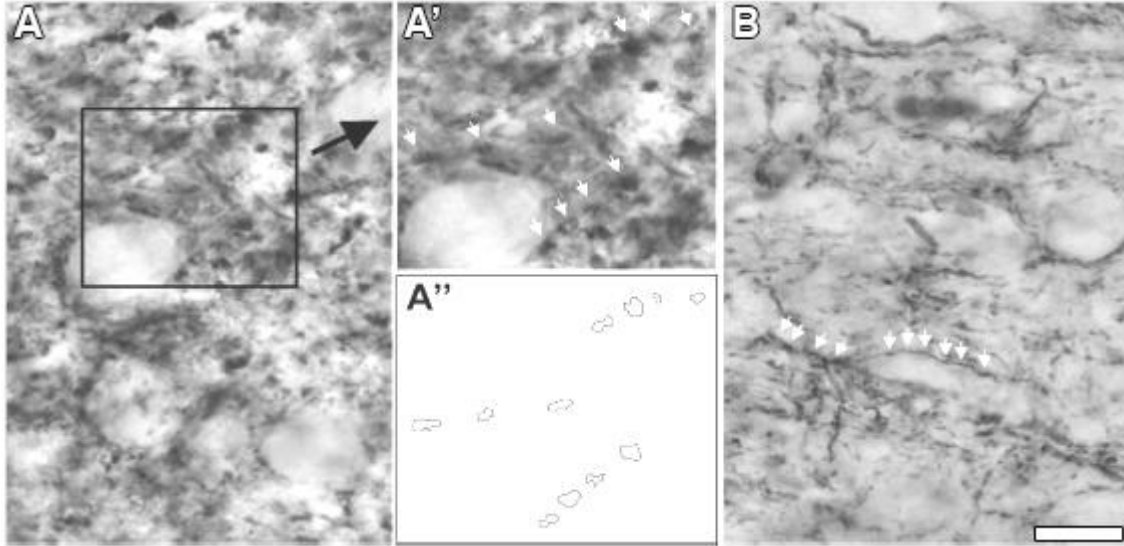


15. ábra: Erős, *CRTL-1*-immunreaktivitást mutató periaxonális hüvelyek (nyílhegyek) a külső térdestest magnocelluláris rétegéből (A, B). A parvocelluláris rétegben (C) ritkábban, de szintén előfordulnak a periaxonális hüvelyek (nyílhegyek). Lépték = 10 μm .

5.2.3. *Cat-301* és *Cat-315* immunreaktivitás jellemzői

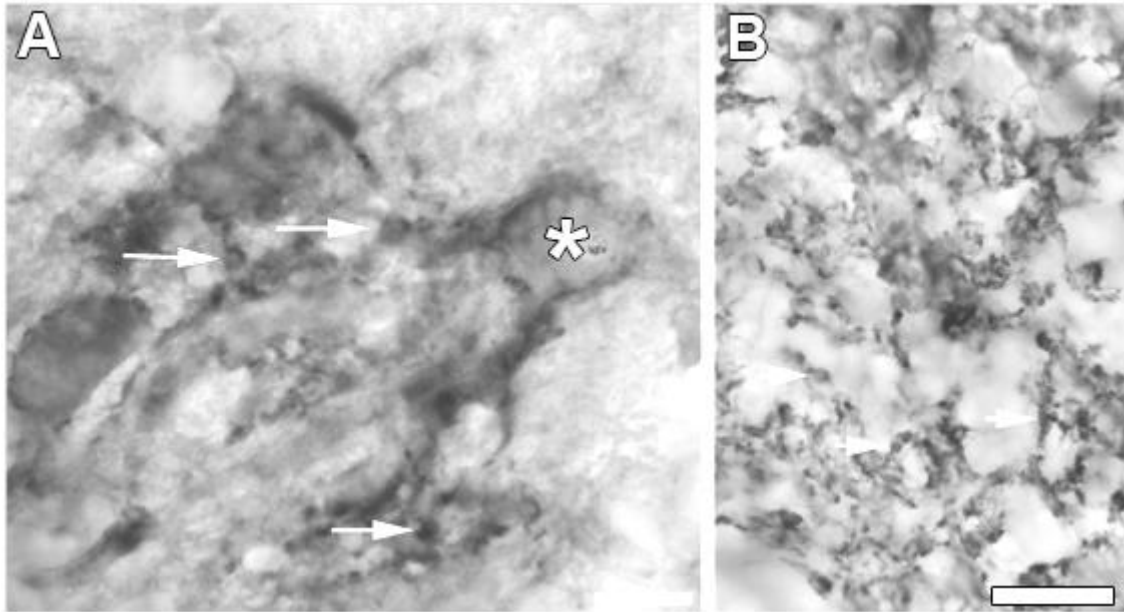
A *Cat* antitestek között a *Cat-315* nyújtotta a legegységesebb immunfestést. A magnocelluláris rétegekben kis periaxonális hüvelyek foglaltak helyet (16. ábra A–A’),

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 (16. ábra B).



16. ábra: Cat-315 immunjelölés a magno- és parvocelluláris rétegekben. Az A ábra bekeretezett területét elkülönülve mutatja az A' kép illetve az A'' ábra sematikus rajza. Az A' képen látjátó nyilak a periaxonális hüvelyeket mutatják, amelyek sematikusán láthatók az A'' képen. A B ábra vékony rostszerű struktúrákat mutat (nyílhegyek), amelyek a periaxonális hüvelyek láncolatai a külső térdestest parvocelluláris rétegében. Lépték = 10 μm .

Egyes esetekben úgy tűnt, hogy dendritikus szakaszok körvonalazódnak, immunreaktivitás ugyanakkor alig volt 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.

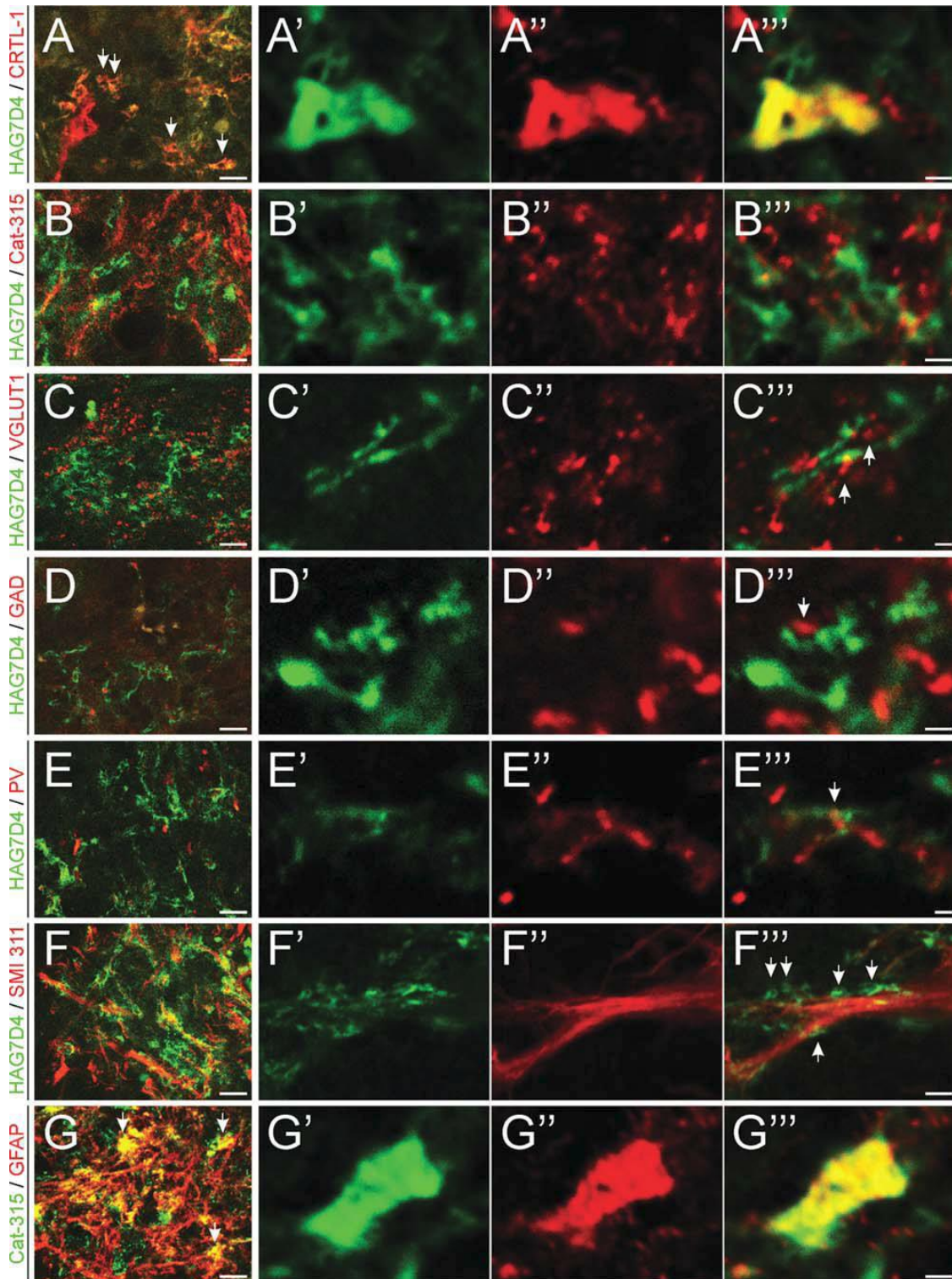


17. ábra: Cat-301 (aggrekán) immunreaktivitás a magno- és parvocelluláris rétegekben. A nyílhegyek az immunreaktív periaxonális hüvelyeket mutatják a külső térdestest magnocelluláris rétegében (A). A jelölt extracelluláris mátrix felhalmozódása halványan körvonalazza a sejtet (csillag). A parvocelluláris részben (B) az immunjelölés nem egyértelmű, mindazonáltal a periaxonális hüvelyek néhány esetben azonosíthatók (nyílhegyek). Lépték = 10 μ m.

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 (17. ábra A, B) láttunk.

5.2.4. 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 (18. ábra A–A’’’). 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 (18. ábra B–B’’’), hanem egy másik epitópot, melynek gliális eredetét már korábban gyanították (Dino és mtsai 2006, Morawski és mtsai 2009).



18. ábra: Kettősen jelölt metszetek kolokalizációt vagy közelséget mutattak a kondroitinszulfát proteoglikán alapú immunreaktivitás és a szinaptikus vagy dendritikus makerek között a külső térdestest magnocelluláris rétegében. A-tól G-ig kis nagyítású képek, míg az A'-tól G'''-ig a nagy nagyítású képek láthatóak. A legtöbb periaxonális hüvely és a peridendritikus mátrix metszetei HAG7D4 CRTL-1 koimmunreaktívak (nyilak az A képen, reprezentatív kettősen-jelölt periaxonális hüvelyek az A'-A''' képeken láthatók). Ezzel ellentétben, a HAG7D4 és Cat-315 pozitív struktúrák kolokalizációját nem

sikerült azonosítani a külső térdestestben (B-B'''). Összehasonlítva a VGLUT-1 pozitív struktúrák nagy számát és relatíve kis százalékukat, amelyek a HAG7D4 pozitív struktúrákhoz asszociálnak (C-C''', nyilak), a kevesebb GAD pozitív elem jellemzően gyakrabban tűnt fel a HAG7D4 immunjelölt struktúrák mellett (D-D''', nyilak). A PV immunjelölés során csak néhány esetben volt nyilvánvaló azok a HAG7D4 profilokhoz való közelsége (E-E'''). A SMI-311 antitesttel jelölt dentriteket néhány esetben beborították HAG7D4 pozitív hüvelyek (F-F''', nyilak a peridendritikus hüvelyekere mutatnak HAG immunpozitív profilok mellett). A GFAP és Cat-315 immunjelölés a külső térdestest magnocelluláris rétegben volt látható (nyilak a G ábrán, a G-G''' ábrák a reprezentatív kettősen jelölt profilokat mutatják). Ugyanakkor egyszeresen jelölt profilok mind a Cat-315, illetve mind a GFAP esetében láthatóak (G). Léptékek = 10 µm A-G; 1 µm: A'-E', G'-G'''; 5 µm az F'-F''' ábrán.

5.2.5. *Szinaptikus markerek megjelenése az aggregán-immunreaktív struktúrák közvetlen szomszédságában*

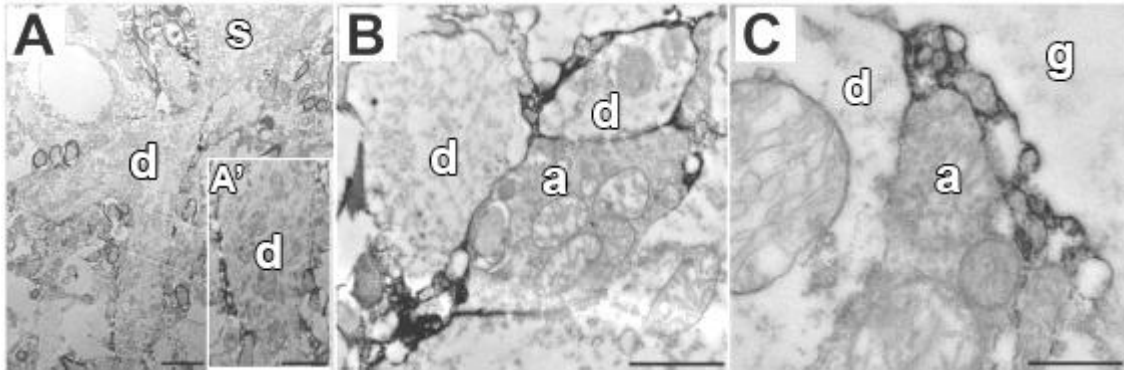
Kettős immunfluoreszcens jelöléseink azt mutatták, hogy a HAG7D4-immunpozitív struktúrák több esetben VGLUT-1-t tartalmazó profilok közvetlen szomszédságában találhatóak (18. ábra C-C'''). A GAD-immunreaktív profilok (Ariza és mtsai) – amelyek száma kevesebb volt – gyakrabban mutattak átfedést a HAG7D4-immunreaktív struktúrákkal (18. ábra D-D'''). Viszonylag kevés PV-immunpozitív struktúra tűnt fel a HAG7D4 immunreaktivitás közelében (18. ábra E-E'''). 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.

5.2.6. *A különböző extracelluláris mátrix komponensek kapcsolata a neuronális vagy gliális struktúrákkal*

A HAG7D4 és a Cat-315 antitest hasonló fenotípusú, de feltételezhetően különböző struktúrákhoz kapcsolódik. Az SMI-311-immunreaktív dendritek mentén számos HAG7D4-immunreaktív periaxonális hüvelyt azonosítottunk (18. ábra F-F'''). Ezzel szemben a Cat-315-immunjelölt profilok néha GFAP immunpozitív struktúrákkal is kolokalizáltak (18. ábra G-G''').

5.2.7. Elektronmikroszkópia

Ultrastrukturális szinten HAG7D4 immunreaktivitást a szóma körül kevésbé, inkább a dendritek proximális szakaszai körül azonosítottunk (19. ábra A). Immunoreaktivásra utaló elektrondenzitást a sejten kívüli térben találtunk. Ezek a vékony, jelölt mátrixakkumulációk több esetben axodendritikus junkciók (19. ábra B) és néhány esetben a gliális struktúrák (19. ábra C) közvetlen közelében voltak láthatóak.



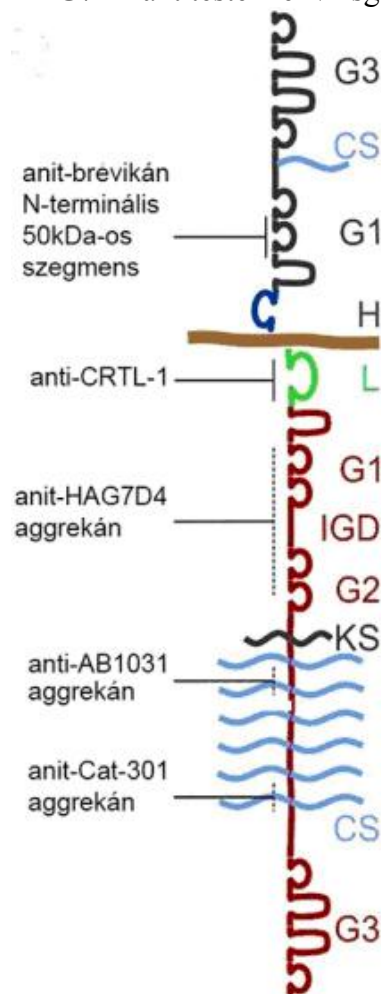
19. ábra: A dendritek proximális szakaszai körül megfigyelhető a HAG7D4 pozitív mátrix keskeny akkumulációja, a szóma körül ugyanakkor nem. A-A': az inszert egy nagy nagyítású képet mutat a dendrit (d) jobb ágának alsó szakaszából, amely körül akkumulálódik a HAG7D4 mátrix. Az axodendritikus junkciók körül gyakran figyelhető meg HAG7D4 immunreaktivitás (B). Immunreaktív mátrix gliatlapok körül (C). s: szóma; d: dendrit; a: axon terminális; g: glia. Léptékek = 2 μm az A ábrán; 1 μm az inszerten és a B ábrán; 500 nm a C ábrán.

5.3. Az extracelluláris mátrix eloszlása és megjelenési formája az emberi hippokampuszban

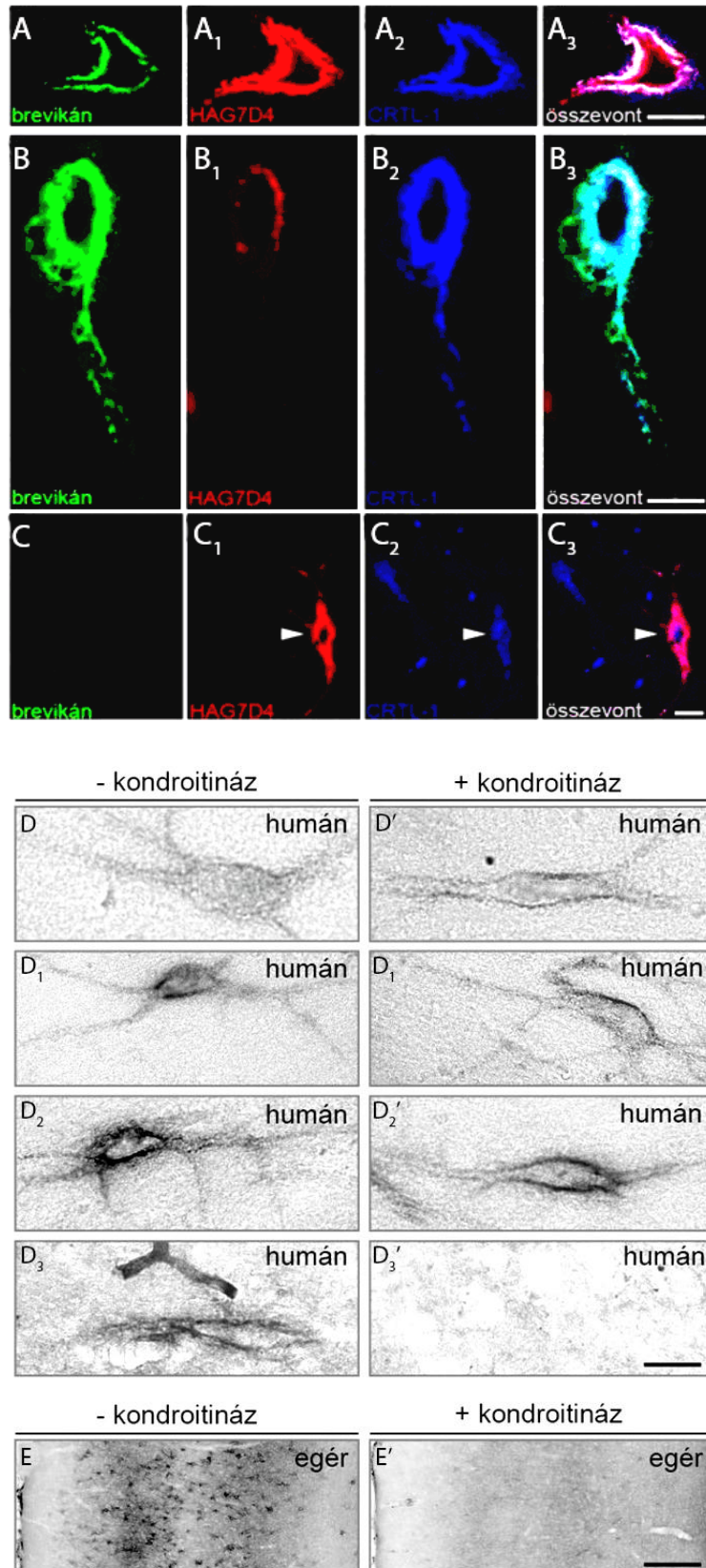
A humán hippokampuszban használt antitesteket a 3. táblázat foglalja össze.

5.3.1. Aggrecán-immunreaktivitás az ember hippokampuszának extracelluláris mátrixában

Az aggrecán eloszlását a tengelyfehérjéhez kötődő AB1031 és Cat-301, valamint az N-terminálisához kötődő HAG7D4 antitestekkel vizsgáltuk (20. ábra).



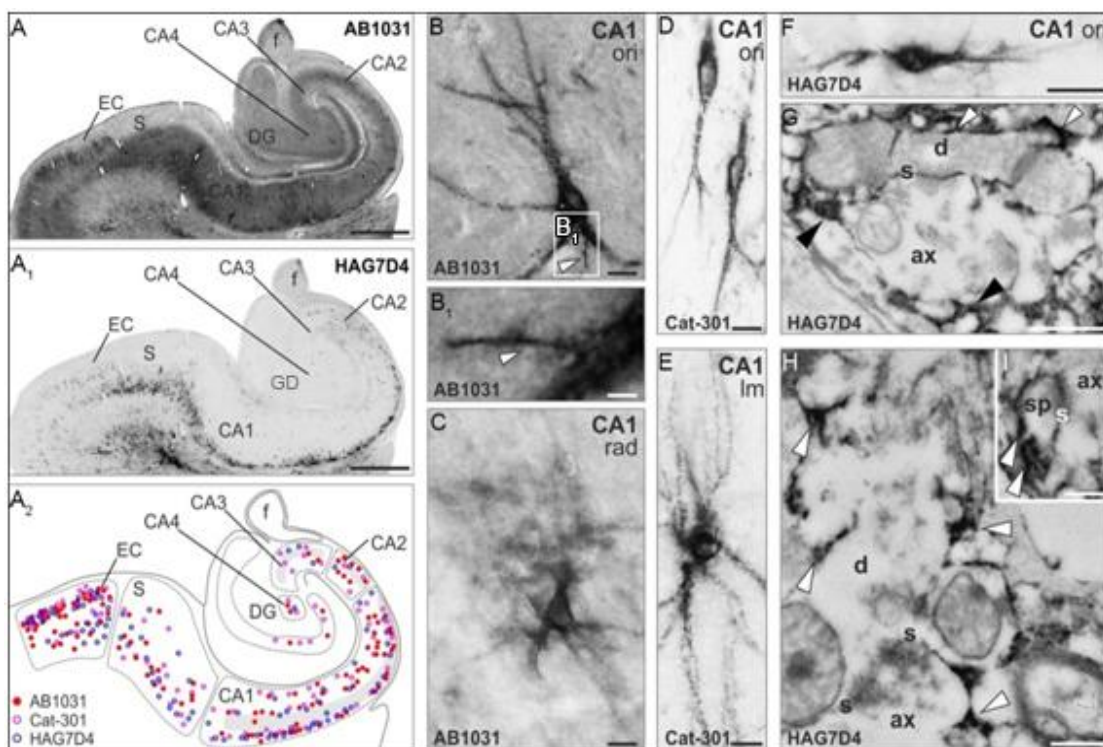
20. ábra: A hialuronsav alapú extracelluláris mátrix komponensek molekuláris azonosítása. Az aggrecán, brevikan és hialuronsav molekuláris kapcsolata. A folytonos vonalak az antitestek által felismert epitópok helyét jelölik. A szaggatott vonalak a vélt antitestfelismerő helyeket jelképezik. CS: kondroitin szulfát láncok, G1/G2: N-terminális globuláris domének, G3: C-terminális globuláris domének, IGD: interglobuláris domén, KS: keratánszulfát láncok, L: CRTL-1, link protein.



21. ábra A hialuronsav alapú extracelluláris mátrix komponensek molekuláris azonosítása. A-C₃ A különböző extracelluláris mátrixkomponensek kolokalizációja a hippocampális neuronok körül. A-A₃ A perineuronális hálók többnyire aggregáns (HAG7D4) és CRTL-1-t (link protein-1-t, nyílhegyek)

tartalmaznak, brevikánt ritkábban, melyre itt példát mutatunk. *B-C₃* Példák a brevikán (50kDa) immunreaktív / aggregán (HAG7D4) immunreaktív / CRTL-1 immunreaktív perineuronális hálók hagyományos típusára. *D-D₃'* A posztmortem hippokampusz kondroitináz enzimmel való emésztése nem változtatja meg az aggregán immunreaktív perineuronális hálók megjelenését, azonban teljesen megszünteti a WFA-pektin jelölést (*E₃-E₃'*). *E-E'* A WFA jelölés hiánya megerősítette a kondroitináz emésztés hatékonyságát az egyidejűleg feldolgozott egérgyagban. Lépték = 100 μ m (*E, E'*), 10 μ m (*B₃, C₃, D-D₃'*), 5 μ m.

A hippokampusz minden területén detektáltunk perineuronális hálókat, ezek a különböző régiókban és azok rétegeiben eltérő módon fordultak elő (22. ábra A–A₂).



22. ábra: Az aggregán tartalmú perineuronális hálók eloszlása a humán hippokampusz területén (A–A₂). Az AB1031 immunreaktív (A, piros teli körök az A₂ ábrán), Cat-301-immunreaktív (üres rózsaszín körök az A₂ ábrán) és a HAG7D4-immunreaktív (A₁, üres kék körök az A₂ ábrán) perineuronális hálók a hippokampusz különböző régióiban és az entorhinális kéregben (EC). A szürke árnyékolás az A₂ ábrán CA1–CA3 területén lévő piramis sejtek rétegét jelöli. B–C az AB1031-immunreaktív perineuronális hálók különböző fenotípusos megjelenése. Mind a „klasszikus” éles kontúrú (B), mind pedig a diffúz (C) perineuronális hálókat sikerült azonosítanunk a hippokampusz formáció területén. Sok esetben láttuk az axon iniciális szegmenseket (nyílhegyek a B és B₁ ábrán). D–E Cat-301-immunreaktív perineuronális hálók főként a stratum oriensben és lacunosum-molecularéban helyezkedtek el, és beborították az elsődleges, másodlagos vagy harmadlagos dendriteket. F HAG7D4-immunreaktív perineuronális mátrix a

CA1 stratum oriens (ori) rétegéből. *G,H* Az ultrastrukturális analízis azt mutatta, hogy a HAG7D4 immunreaktív mátrix axonokat (ax) (nyílhegy), de a leginkább dendriteket vesz körül (üres nyílhegyek) a CA1 területén. *I* Az axon-tüske szinapszisokat a tüske oldalán HAG7D4-immunreaktív extracelluláris mátrix borítja be. GD: *gyrus dentatus*, CA1-CA4: *Cornu Ammonis* áréák, S: *Subiculum*, EC: *enthorinal cortex*, f: *fimbria hippocampi*, ori: *stratum oriens*, rad: *stratum radiatum*, lm: *lacunosum-moleculare*, ax: axon, d: dendrit, s: szóma, sp: dendrit tüske. Lépték = 500 μm (A-A₁), 10 μm (B-F), 4 μm (B₁), 500 nm (G), 250 nm (H, I).

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 (22. ábra A₂). Perineuronális hálókat leggyakrabban a CA1 régióban láttunk (22. ábra A-F), különösen a stratum oriensben, multipoláris neuronok körvonalát kirajzolva (22. ábra A-A₂, B, D, F). Míg a piramissejtek rétege nagyrészt aggregán immunonegatív volt, sok multi- vagy bipoláris morfológiai megjelenésű perineuronális hálót azonosítottunk a stratum radiatum és lacunosum-moleculare rétegekben (22. ábra C, E). Az entorhinális kérget a principalis réteg intenzív mátrix pozitivitása tette könnyen felismerhetővé (22. ábra A–A₂) (Braak és Braak 1992).

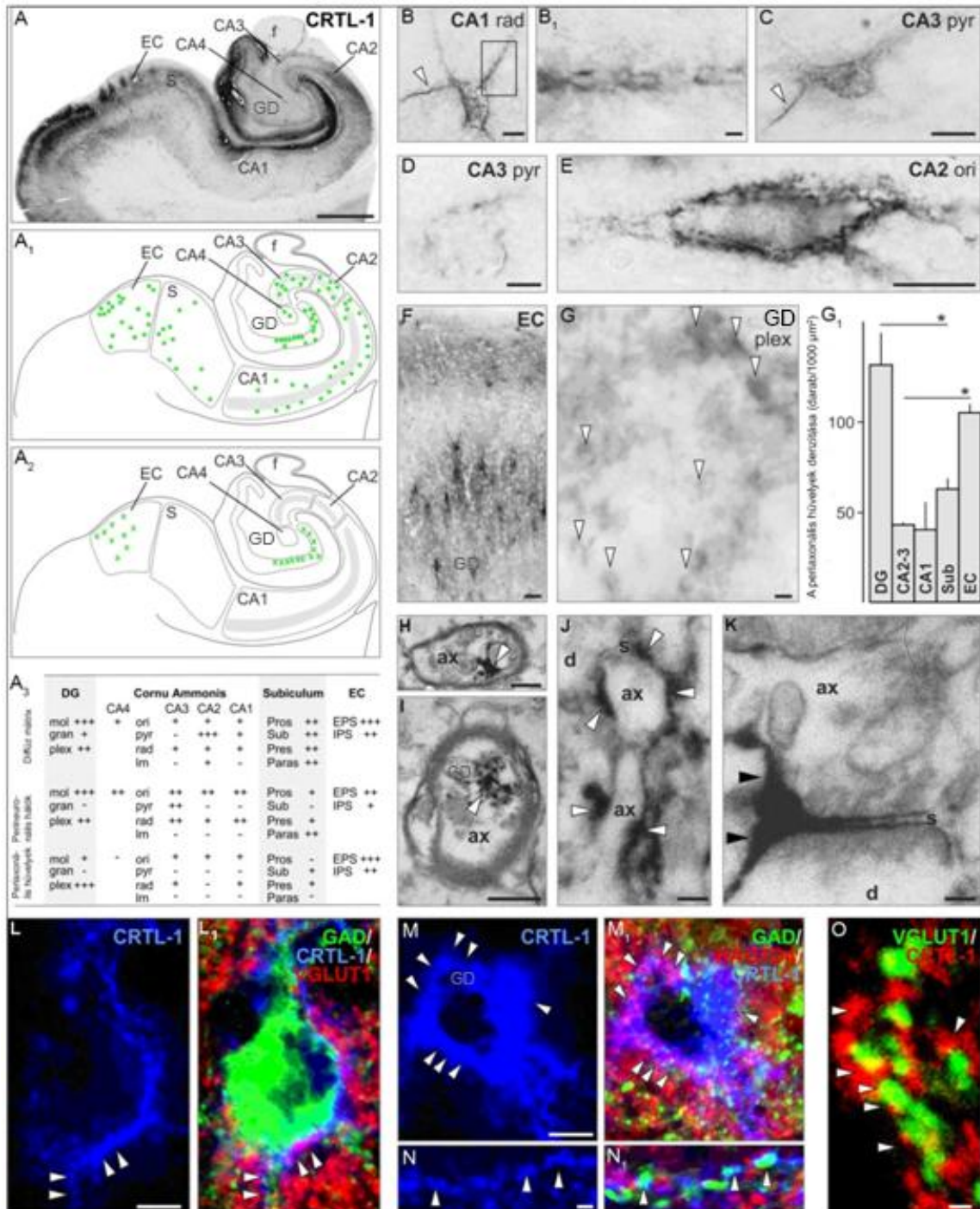
Különböző fenotípusú perineuronális hálókat azonosítottunk, így éles kontúrú „klasszikus” és „diffúz” altípusokat, melyek létezésére korábbi tanulmányok már utaltak (Wegner és mtsai 2003). Az AB1031-, Cat-301- vagy HAG7D4-immunreaktív mátrix hüvelyeket alakított ki a dendritek mentén, melyeket több mint 50 μm hosszán, egészen a második- és harmadik dendritarborizációig követni tudtunk (22. ábra B-F). Aggregán-immunreaktív mátrixszal körülvevett axon iniciális szegmenseket, mint vékony, a szómából vagy az elsőrendű dendrit legproximálisabb részéből eredő struktúraként azonosítottunk (22. ábra B, B₁). Elektronmikroszkópos vizsgálataink azt mutatták, hogy aggregán-immunreaktív mátrix a posztszinaptikus dendriteket és dendritikus tüskéket borította (22. ábra G-I), csak alkalmanként húzódva rá az axonterminálisokra, vagy preszinaptikus axon szakaszokra, izolálva ezzel a teljes szinapszist (22. ábra G–I).

5.3.2. *CRTL-1*-immunreaktív periaxonális hüvelyek serkentő és gátló szinapszisok körül

A CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek réteg- és régióspecifikus eloszlást mutattak a hippocampusban (23. ábra A-A₃). Az aggregán 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 (23. ábra B, B₁). A CA2 régióban (23. ábra A, A₁) a stratum oriensben és radiatumban (23. ábra E) találtunk perineuronális hálókat. Erős, diffúz immunoreaktivitást figyeltünk meg a CA2 régióban, mely jól elhatárolta a szomszédos CA1 és CA3 régiókat egymástól (23. ábra A).

Ez a megállapítás alátámasztja a korábbi – rágsálókban leírt – adatokat, amely szerint sűrű extracelluláris mátrix proteoglikán- és lektin aktivitás észlelhető ugyanezen területen (Brückner és mtsai 1994, Brückner és mtsai 2003). Az anti-aggregán immunfestéseinkben tapasztalt eredményeinkkel szemben a CA3 régió minden rétegben talákoztunk perineuronális hálókcal és axon iniciális szegmenseket is észleltünk (23. ábra C). A perineuronális mátrix immunoreaktivitás sokszor csak a sejtestt körüli részre korlátozódott, a dendritek nem rajzolódtak ki (23. ábra D). Az entorhinális kéregben prominensen jelölődött „szigetek” tűntek fel a külső principális rétegben (Braak és Braak 1992) (23. ábra F). A gyrus dentatus hilusa sok perineuronális hálót tartalmazott (23. ábra A₃), ugyanitt nagyszámú, 1-3 μ m átmérőjű, erős denzitású periaxonális hüvellyel is talákoztunk a szemcsés réteg hiláris határán (23. ábra G, G₁). A periaxonális hüvelyek hasonló gyakorisággal fordultak elő az entorhinális kéregben is, számuk jóval meghaladta a CA régiókban tapasztalt mennyiséget (23. ábra G₁). Az ultrastrukturális elemzés szerint a CRTL-1-immunpozitivitás fellelhető mielinizált axonokban (23. ábra H, I), leggyakrabban azonban az axonterminálisok köré korlátozódik, beleértve a szinapszisokat (23. ábra J, K). Ehhez csatlakozó, konfokális lézer szkennig mikroszkóppal végzett vizsgálataink azt bizonyították, hogy perineuronális hálókba ágyazottan mind VGLUT-1-immunreaktív serkentő, mind GAD-immunreaktív gátló szinapszisok előfordulnak (23. ábra L-M₁), nem csupán a szómán, de disztálisabb dendritszakaszokon is (23. ábra N, N₁). Ezek után felvetettük a kérdést, hogy vajon a szinapszisok képesek-e periaxonális hüvelyt kialakítani periszomatikus vagy peridendrikus mátrix hiányában. A gyrus dentatus hiláris régiójában sikerült is

azonosítani olyan egyedülálló preszinaptikus struktúrákat, melyeket CRTL-1-immunreaktív periaxonális hüvely burkolt be (23. ábra O).



23. ábra: CRTL-1 (link protein-1) tartalmú perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek. A-A₂ CRTL-1 eloszlás az emberi hippocampusban. Perineuronális hálók a nempiramidális rétegekben találhatóak (A₁), CRTL-1 immunreaktív periaxonális hüvelyeket (A₂) a gyrus dentatus területén (GD) és az entorhinális kéregben (EC) találtunk. A szürke árnyékolás a CA1-től a CA3-ig terjedő piramissejtek rétegét jelöli. A₃ A CRTL-1 eloszlás és denzitás szemikvantitatív analízise (- nem detektálható, +/+/+/+,

alacsony/közepes/magas gyakorisága) a gyrus dentatusban (GD), az ammonszarv (CA) áréában, a subiculumban (S) és az entorhinális kéregben (EC). *B-C* Perineuronális hálók a CA1 stratum radiatumából (rad) és a CA3 stratum pyramidale-ből (pyr). Az axon iniciális szegmens gyakran körvonalazódott (nyílhegyek). *B₁* peridendritikus hüvely. *D* Mátrix aggregátum a CA3 régióból, ami a periszomatikus régióra korlátozódik. *E* Periszomatikus és proximális dendritszakaszok körüli jel a CA2 régió stratum oriens-ből (ori). *F* Perineuronális hálók az EC külső és belső principális rétegéből (EPS/IPS). *G* Periaxonális hüvelyek (üres nyílhegyek) a GD hilusából. *G₁* a periaxonális hüvelyek koncentrációja a GD és az EC területén volt a legmagasabb. *H-I* CRTL-1 immunreaktivitás a mielinizált axonokban. *J-K* A CRTL-1 immunreaktív mátrix koncentrációja az axonterminálisok körül (üres nyílhegyek), vagy a szelektíven a szinapszisok körül (nyílhegyek). *L-M₁* GAD-immunreaktív vagy VGLUT1 immunreaktív profilok (nyílhegyek) a klasszikus (*L, L₁*), vagy a diffúz (*M, M₁*) típusú CRTL-1 immunreaktív perineuronális hálókba ágyazódva. *N, N₁* HAG7D4 immunreaktív/CRTL-1 immunreaktív peridendritikus hüvelyek beborítják a GAD-immunreaktív terminálisokat (nyílhegyek). *O* CRTL-1-immunreaktív periaxonális hüvelyek a VGLUT-1-immunreaktív serkentő szinapszisokat veszik körül. *G₁* átlag ± standard hiba (Koyama és mtsai 2004), **p*<0.05. GD: gyrus dentatus, CA1-CA4: Cornu Ammonis áréák, S: Subiculum, EC: entorhinal cortex, f: fimbria hippocampi, ori: stratum oriens, rad: stratum radiatum, lm: lacunosum moleculare, plex: stratum plexiforme, pyr: stratum pyramidale ax: axon, d: dendrit, s: szóma. Lépték = 500 µm (A), 20 µm (F), 10 µm (B, C, L-L₁, M-M₁), 5 µm (D, E), 250 nm (I), 100 nm (H, J, K).

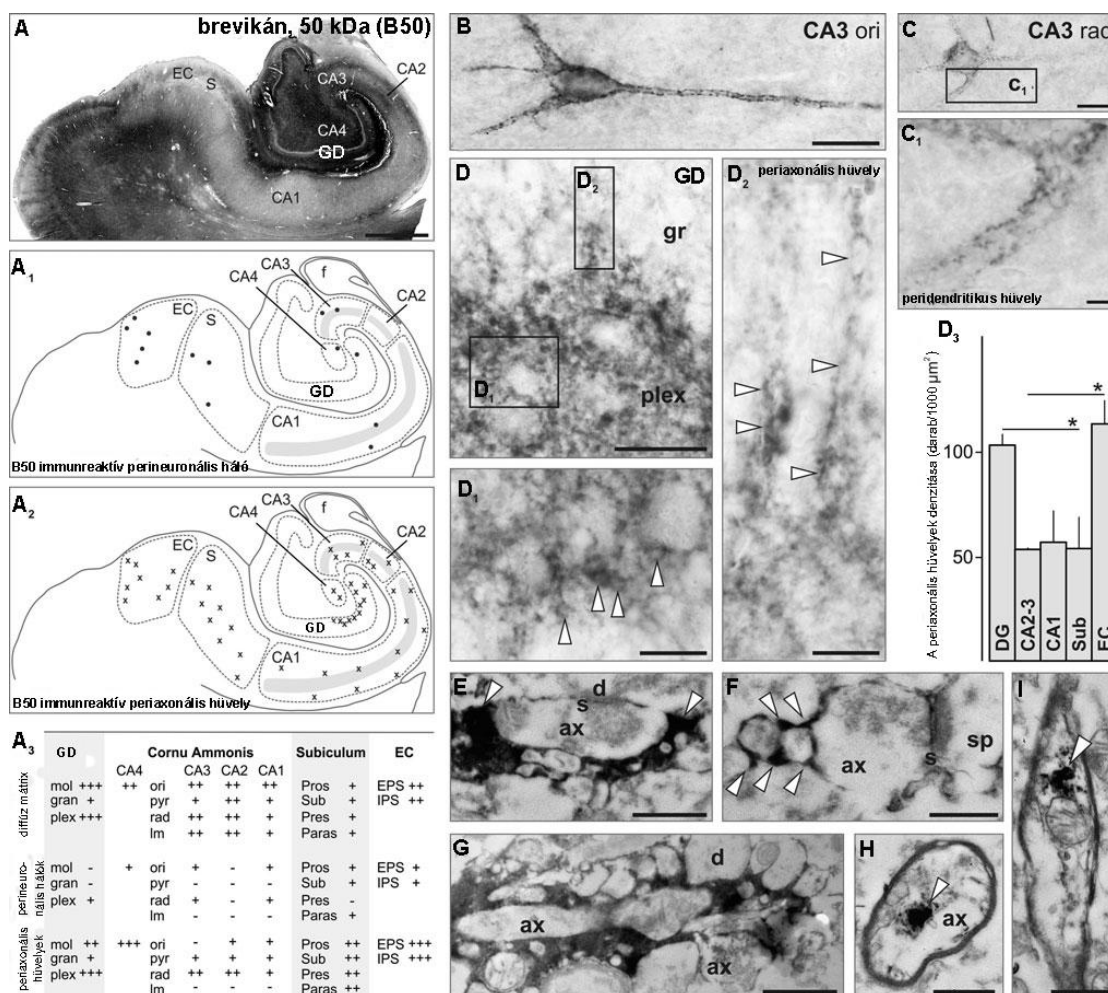
5.3.3. A brevikán (50 kDa fragmensének) felhalmozódása a periaxonális hüvelyekben

A brevikán proteolitikus hasítása után egy N-terminális (50kDa) és egy intermedier/C-terminális (90 kDa) fragmens keletkezik (Matthews és mtsai 2000). Jelen eredményeinkhez a brevikán 50 kDa-os fragmense ellen termelt antitestet használtuk hogy kimutathassuk, a humán hippocampusz brevikán tartalmú extracelluláris mátrix mintázatának eltérését az eddig leírt hippocampális mátrixterképektől (24. ábra A–A₃).

Perineuronális hálók (24. ábra B-C) 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 (24. ábra D-D₃). Hasonlóan nagy számban találtunk periaxonális hüvelyeket az entorhinalis kéregben, és jóval kisebb sűrűségben a CA1-CA3 mezőkben (jóllehet a stratum lacunosum-moleculareban hiányoztak) valamint a subiculum területén (24. ábra D-D₃). 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 posztzinaptikus dendriten vagy szómán (24. ábra E–G).

Az ultrastruktúra vizsgálata arra is fényt derített, hogy brevikán immunreaktivitás a mielinizált axonokban is jelen van (24. ábra H, I). Ez az eredmény arra utal, hogy a periaxonális hüvelyeket a preszinaptikus neuronok is termelhetik.



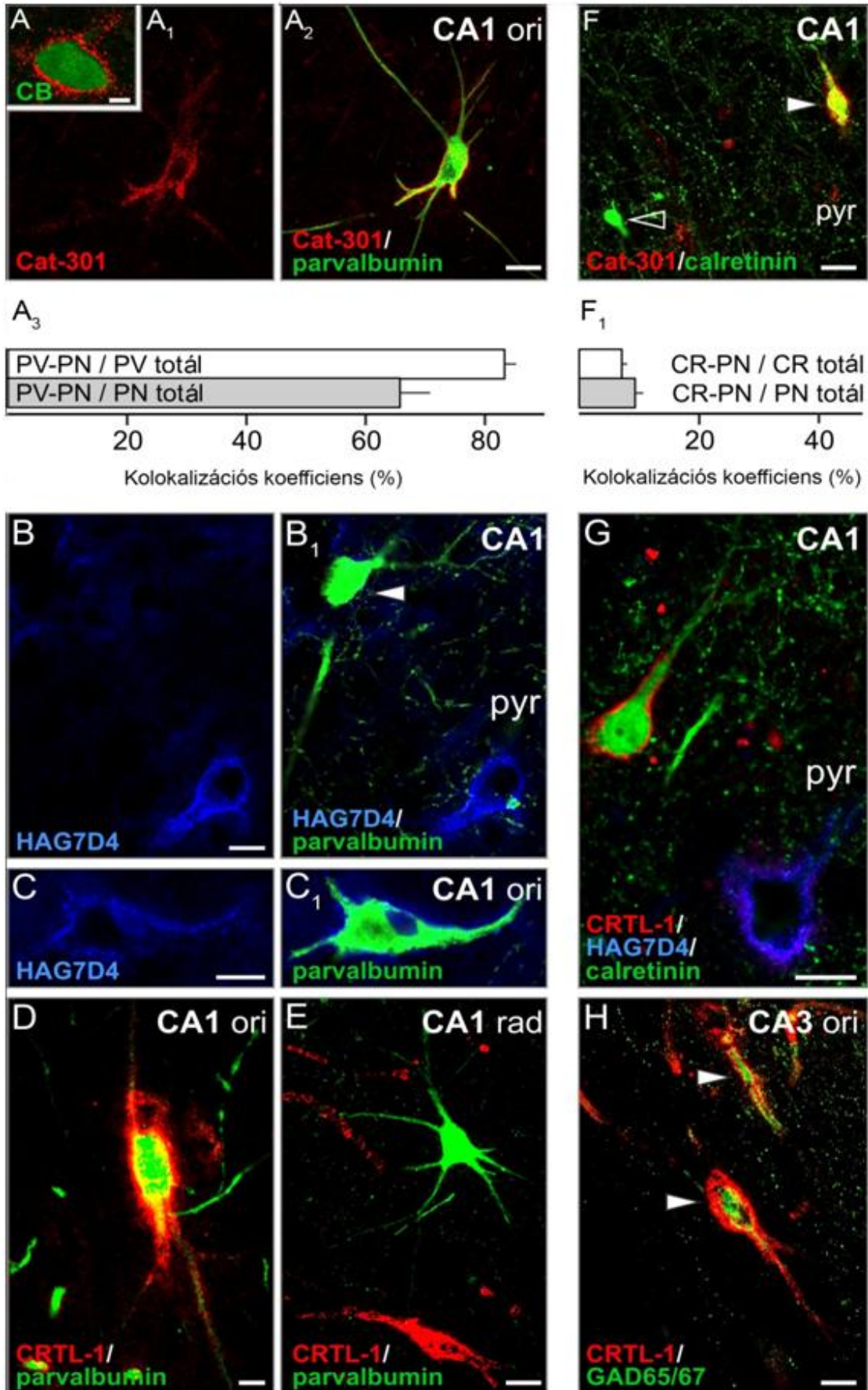
24. ábra: A brevikán periaxonális hüvelyeket jelöl a humán hippocampusban A Átnézeti kép a brevikán immunreaktivitásról a humán hippocampus formációjában. A perineuronális hálók (A₁) és periaxonális hüvelyek (A₂) eloszlásának sémája. A szürke árnyákolás a piramidális réteget jelöli. A₃ A brevikán eloszlás és sűrűség szemikvantitatív analízise (- nem detektált, +/+/+/, alacsony/közepes/magas gyakorisága) a gyrus dentatusban (GD) (McKeon és mtsai 1991), a cornu ammonis (CA) mezőiben, a subiculumban (S) és az entorhinális kéregben (EC). B-C Típusos perineuronális hálók a CA3 mező stratum oriensében (ori;B) és radiátumban (rad;C). Az inszert (C₁) a peridendritikus hüvelyt mutatja. D-D₂ periaxonális hüvelyek (nyílhegyek) a GD (McKeon és mtsai 1991) hiláris határán. D₂ Periaxonális hüvelyek láncai a szemcsesejt rétegben. D₃ A periaxonális hüvelyek sűrűsége a GD-ban és az EC-ben volt a legmagasabb. E-G Brevikán immunreaktív periaxonális hüvelyek jellegzetesen a szinapszisok preszinaptikus kompartmentjét borítják be (nyílhegyek). H-I A brevikán, intracellulárisan is

megjelenik az axonokban. D_3 A periaxonális hüvelyek regionális sűrűsége a humán hippocampusban. Átlag \pm standard hiba (Koyama és mtsai 2004), * $p < 0.05$. GD: *gyrus dentatus*, CA1-CA4: *Cornu Ammonis* áréák, S,Sub: *Subiculum*, Pres: *presubiculum* Pros: *prosubiculum*, Pras: *parasubiculum*, EC: *enthorinal cortex*, f: *fimbria hippocampi*, ori: *stratum oriens*, rad: *stratum radiatum*, gran: *stratum granulosum*, plex: *stratum plexiforme*, Im: *lacunosum moleculare*, pyr: *stratum pyramidale*, ax: axon, d: dendrit, s: szóma, sp: dendrit tüske. Lépték = 500 μm (A), 10 μm (B,C), 5 μm (D), 4 μm (C, D_1 , D_2), 500 nm (E-H).

5.3.4. *Parvalbumin-, calretinin- és calbindin-immunpozitív hippocampális interneuronok körüli perineuronális hálók*

Humán hippocampusz mintáinkban azt tapasztaltuk, hogy parvalbumin-immunreaktív interneuronokat gyakran vesz körül aggregán tartalmú perineuronális háló (25. ábra A₁-C₁).

Hasonlóan magas arányt állapítottunk meg a stratum oriensben található CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálók esetében is (25. ábra D), ugyanakkor a stratum radiatumban nem találtunk a parvalbumin-immunfestett neuronok körül CRTL-1-immunreaktív periszomatikus mátrixállományt (25. ábra E). A calretinin- és calbindin-immunpozitív neuronok körül az alacsonyabb rendű emlősökben hiányoznak a perineuronális hálók (Drake és mtsai 1991, Celio és mtsai 1998). Ezzel ellentétben az emberi hippocampuszban a calretinin-immunopozitív neuronok egy alpopulációja körül aggregán tartalmú (25. ábra F, F₁), vagy a CRTL-1-immunreaktív (25. ábra G) perineuronális hálók megtalálhatóak voltak, és kivételes esetekben calbindin D28k-immunreaktív interneuronok körül is (25. ábra A).



25. ábra: Perineuronális hálók parvalbumin, calbindin és calretinin tartalmú neuronok körül. *A* Aggrekán kolokalizál a calbindinnel (CB) a CA4-es áréában. *A₁-C₁* Aggrekán tartalmú perineuronális hálók parvalbumin-immunreaktív neuronok körül. *A* nyílhegy egy parvalbumin immunreaktív interneuronra mutat, amit nem vesz körül perineuronális háló. *A₃* A parvalbumin-immunreaktív neuronok (PV totál) nagy részét (83%) beborítják a Cat-301-immunreaktív perineuronális hálók (PV-PN), míg az összes perineuronális hálót hordozó neuronnak csupán 66%-a (PN totál) mutatott parvalbumin-immunreaktivitást (PV-PN). *D, E* CRTL-1-immunreaktív perineuronális hálók parvalbumin-immunreaktív neuronokat vesznek körül a stratum oriens területén (ori; *D*) a stratum radiátumban (rad) azonban nem (*E*). *F* Perineuronális hálók calretinin-immunreaktív neuronokat borítanak be (nyílhegy). Az üres nyíl egy calretinin immunreaktív neuronra mutat, amely nem rendelkezik perineuronális háló borítékkal. *F₁* perineuronális hálót viselő calretinin-immunreaktív neuronok (CR-PN) aránya alacsony volt (7%, az összes calretinin immunreaktív sejt közül és 9% az összes hálóval rendelkező neuron közül). *G* CRTL-1 immunreaktív/HAG7D4-immunreaktív perineuronális hálók körülvesznek egy calretinin-immunreaktív CA1 régióban elhelyezkedő neuront. *H* GAD-immunreaktív neuron szómáját és nyúlványait CRTL-1-immunreaktív perineuronális mátrix borítja (nyílhegyek). *A₃, F₁* átlag ± standard hiba (Koyama és mtsai 2004), **p*<0.05. Lépték = 10 μm (*A₁-H*), 2 μm (*A*).

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Gerincvelő

Munkánkban a humán gerincvelő teljes kraniokaudális kiterjedésében leírtuk a fő extracelluláris mátrix komponensek – úgymint a hialuronsav, aggregán, brevikán, CRTL-1 és a tenaszcin – eloszlását és fenotípusos megjelenését. Ezek a molekulák a legfontosabb komponensei a központi idegrendszer extracelluláris mátrixának. Úgy találtuk, hogy a perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek kémiai heterogének, és igen eltérő eloszlást mutatnak a gerincvelő magjaiban, területein, különböző neuronpopulációkhoz kapcsolódva találjuk őket.

A korábban megfigyelteknek megfelelően (Kalb és Hockfield 1988, Bertolotto és mtsai 1996, Takahashi-Iwanaga és mtsai 1998, Deepa és mtsai 2006, Galtrey és mtsai 2008) a jelentősebb extracelluláris mátrix összetevőket két nagy csoportra lehet felosztani. Az első csoportba az aggregán, a brevikán és a CRTL-1 tartozik, ezek lényegében a szürkeállományra korlátozódnak, perineuronális és periszinaptikus helyzetűek. Ez az eloszlási minta azt jelenti, hogy az aggregán, a brevikán és a CRTL-1 fontos szerepet játszanak a perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek kialakításában. A második csoportba a hialuronsav és a tenaszcin-R molekulák tartoznak, ezek nem csak a szürkeállomány perineuronális hálóiban és a periaxonális hüvelyekben, hanem amorf állományként a fehérállományban is előfordulnak. Újszülött patkányban a tenaszcin-R és a hialuronsav szintetizáló enzimet kódoló messenger RNS expresszió alapján azt feltételezték, hogy a mátrix ezen, mindenütt jelenlévő képviselői sokkal korábban jelennek meg, mint az aggregán, brevikán vagy a CRTL-1. Ez azt is jelenti, hogy időben megelőzik a perineuronális hálók és a periaxonális hüvelyek kialakulását (Fawcett 2009), és vélhetően egyéb, általános szerepet is játszanak a központi idegrendszer felépítésében és funkciójában.

A mátrix komponensek heterogenitást mutatnak celluláris és kompartmentális szerveződésükben. Ennek jelentősége valószínűleg abban rejlik, hogy az aggregán, a brevikán és a CRTL-1 molekulák különböző funkciókért felelősek a sejt felszínén és az azon található végződéseik körül. E tekintetben (Frischknecht és mtsai 2009) megfigyelték, hogy az extracelluláris mátrix eltávolítása az AMPA receptorok laterális diffúziójához, ami pedig a szinaptikus plaszticitás rövid távú megváltozásához vezet. Új

megfigyelés, hogy a sejt felszínén található extracelluláris mátrix kompartmentizálódik és elválasztja egymástól a szomszédos szinapszisokat, így befolyásolhatja a szinaptikus receptorok és ioncsatornák elhelyezkedését és funkcióját (Blosa és mtsai 2013). Az emberi gerincvelőben található aggregátumok masszív periszomatikus és peridendritikus lerakódásokat képez a neuronok körül, elősegíti ezzel a szinapszisok stabilizációját, ahogy azt Hockfield és mtsai (1990) feltételezték vagy épp diffúziós gátat nyújthat a pozitív töltésű ionok számára (Morawski és mtsai 2012b, Blosa és mtsai 2013). A gerincvelőben fellelt brevikan-immunreaktivitás ezzel szemben a szinaptikus végződéseket borítva erős periaxonális hüvelyeket hoz létre a gerincvelő szürkeállományában. Feltételezésünk szerint ez a szinaptikus résen belül tartja/korlátozza a neurotranszmittereket depolarizáció után, valamint stabilizálja a receptorok eloszlását a neuron membránján. A hialuronsav és CRTL-1 szürkeállományában betöltött szerepéről azt feltételezzük, hogy összeköttetést biztosít az aggregátum és brevikan fehérjék között, lévén igen gyakran mutatott átfedést a perineuronális hálóknak és periaxonális hüvelyekben ezekkel a fehérjékkel.

6.1.1. Az extracelluláris mátrixkomponensek eloszlása és az interszegmentális különbségek

Az extracelluláris mátrix komponenseivel kapcsolatban legfontosabb megfigyeléseink, hogy (1) a gerincvelő hátsó szarvában hiányzik az aggregátum-immunreaktivitás, (2) a CRTL-1 és a brevikan jelen van a substantia gelatinosa területén, azonban a Lissauer-zónában nem mutatkozik (Hámori és mtsai 1974), (3) a Clarke-Stilling- és intermediomediális magok jól elhatárolódnak az idegsejtek körül található vastag perineuronális hálók révén csakúgy, mint (4) számos elülső szarvi motoneuron.

Perineuronális hálók jellemzően a gerincvelő távoli kapcsolatokkal bíró régiókban találhatóak, így a szürkeállomány ventrális és oldalsó szarvában kiterjedt aggregátum 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 projiciáló neuronokat tartalmaznak. Ez ellentétben áll a legtöbb agyi régióban találtakkal, ahol a

perineuronális hálók interneuronok és nem principális sejtek körül fordulnak elő (Brückner és mtsai 1994). A „kapcsolat” a hosszú axonnal rendelkező neuronok és a perineuronális hálók között azonban korántsem kizárólagos, mivel az intermediolaterális magokban vannak olyan neuronok, amelyek nem rendelkeznek perineuronális háló borítékkal.

A hátsó szarvat nagyszámú afferens rost éri el amelyek a Lissauer-zónán keresztül hatolnak a szürkeállományba (Todd és mtsai 2002). Megfigyeltük, hogy itt izolált mátrix aggregátumok jelennek meg, amelyek a mi készítményeinken CRTL-1 vagy brevikan tartalmú periaxonális hüvelyként tűnnek fel, feltehetően szinapszisok körül. Azt gondoljuk, hogy ezen periaxonális hüvelyek az afferens szinapszisok körül elősegíthetik a szinaptikus integritás fenntartását, és ígéretes célpontjai lehetnek klinikai vizsgálatoknak és terápiáknak.

6.1.2. Az extracelluláris mátrix kapcsolata speciális neuronokkal, transzmitterekkel és receptorokkal

Az agyi régiók és azok neuronjai eltérő extracelluláris mátrix mintázattal rendelkeznek. A perineuronális hálók elsősorban interneuronokat (Brückner és mtsai 1994) – ezen belül főként az úgynevezett „gyorstüzelő” interneuronokat (Härtig és mtsai 1992) – vesznek körül. A perineuronális hálók azonos neurokémiai tulajdonsággal rendelkező neuronokhoz való viszonya feltűnően különbözik az agy és a gerincvelő területén. Így míg a kolinerg neuronok a striatumtól ventrálisan elhelyezkedő bazális előagyban mentesek a perineuronális háló borítéktól (Brauer és mtsai 1993, Adams és mtsai 2001), az emberi gerincvelő kolinerg motoneuronjai többsége perineuronális mátrixszal van körülvéve.

A kolinerg neuronok a leszálló motoros pályák utolsó neuronjai, axonjai a harántcsíktolt izomrostokon végződnek (Clara 1959). A neuronokon végződő afferensek ezért különös jelentőséggel bírnak, „utolsó esély”-ként vehetnek részt a „végső kiadott parancs” modulációban. Az idegsejtek tüzelési mintázatát a gátló szinapszisok szabályozzák (Freund és Buzsáki 1996). Ezek a gátló terminálisok GABA vagy glicin neurotranszmitterekkel működnek. A gátló afferensek hatékonyan befolyásolják a motoneuronok működését, azok finomhangolását (Geyer és mtsai 1987). Megfigyeléseink szerint mind a gátló végzések, mind a gátló szinapszisok mátrixszal

borított struktúrák, peridendritikus hüvelyekkel és/vagy izolált periaxonális hüvelyekkel borítottak.

A hátsó szarv területére különféle rostok érkeznek a perifériáról. A gerincvelő hátsó szarvában a nociceptív primer afferensek P-anyagot (substance-P) használnak ingerületátvivő anyagként (Todd és mtsai 2002), a csillapíthatatlan fájdalom szindrómában és azok terápiájában ez a protein kiemelt jelentőséggel bír. Klinikai jelentőségük miatt kiemelt fontossággal bírnak ezek a lassú vezetésű rostok, amelyek substance-P-t használnak ingerületátvivő anyagként a fájdalom szignálátvitelben. Annak ellenére, hogy nagyszámú periaxonális hüvely található ebben a régióban, a substance-P-immunopozitív rostok és terminálisok nagyrészt mentesek a perisznaptikus mátrix aggregátumoktól. Ez arra utalhat, hogy szemben más modalitásokkal, a fájdalomérző rostok mátrixmintázatukban is elkülönülnek a többi afferenstől.

6.1.3. Az extracelluláris mátrix aggregátumok jelentősége a gerincvelőben. Klinikai aspektusok

A sérült emberi gerincvelő funkcióinak helyreállítása egy régóta áhított cél, melyet az axonregeneráció hiánya és a csekély plaszticitás nagyban megnehezít. Különösen is a sérülés után fellépő reaktív gliózis akadályozza a regenerációt. Ilyenkor ugyanis az asztrociták és az oligodendrociták nagy mennyiségben termelnek lektikánokat, ami a negatív töltésű oldalláncok repulzív hatása révén az axonális regeneráció fő akadályát fogja jelenteni. Külön vizsgálták a tenaszcin-R szerepét, mely barriert képez a regenerálódó axonok útjában; tenaszcin-R knock-out állatokban a funkció sokkal könnyebben helyreállt (Deckner és mtsai 2000, Viapiano és Matthews 2006, Busch és Silver 2007). A központi idegrendszeri plaszticitás csökkenésének egyik oka az extracelluláris mátrix kiépülése, lerakódása mind az idegrostok mentén, mind az idegsejtek és dendritek körül. Megfigyelték, hogy a felnőtt központi idegrendszer plaszticitása különösen azokon a területeken korlátozott, amelyek nagyszámú perineuronális hálóval borított sejtet tartalmaznak, ilyenek például a primer szenzoros agyterületek (Brückner és mtsai 1999). Azok a perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek, amelyek a kritikus időszak végén formálódnak, különböző plaszticitást gátló kondroitinszulfát proteoglikánokat tartalmaznak (a felnőtt központi idegrendszer főként aggregánt és brevikánt). A differenciált központi idegrendszer plaszticitási szintjéről és különösen a gerincvelőben azt mutatták ki, hogy kondroitináz kezeléssel reaktiválható.

Ez egy olyan enzim, amely szelektíven eltávolítja a kondroitinszulfát glükózaminoglikán láncokat a proteoglikánokról (melyek túlnyomórészt az aggregán molekulán találhatóak). A periszomatodendritikus kompartmentet tekintve egy ilyen kezelés képes beindítani új kapcsolatok kialakulását a sérült gerincvelő neuronjain (Fitch és Silver 2008, Fawcett és Curt 2009, Bradbury és Carter 2010, Kwok és mtsai 2011, Bartus és mtsai 2012).

Azok a kezelések, amelyek a plaszticitás növelésére irányulnak, a rehabilitációs terápiák központjában állnak. Ezzel együtt nem szabad elfelejtenünk, hogy mellékhatásokat is okozhatnak, lévén a kondroitinszulfát proteoglikánok számos, részleteiben még nem is ismert funkcióval is bírnak. Eredményeink ezeket a hiányokat igyekeztek pótolni, mely a jövőbeli terápiás koncepciók kialakításában is hasznos segítségül szolgálhat.

6.2. Külső térddestest

6.2.1. Az emberi külső térddestest kondroitinszulfát proteoglikán alapú extracelluláris mátrixának szerkezete

Az immunreaktív struktúrák fenotípusos megjelenése ellentétben áll a korábban, más emlősökben tapasztaltakkal, melyek perineuronális hálókat azonosítottak ezen az agyterületen (Hendry és mtsai 1984, Yin és mtsai 2006, Baldauf 2010). Hasonlóan a HAG7D4- vagy a CRTL-1-immunjelölésekhez a Cat-immunfestések eredményei is azt sugallják, hogy az emberi külső térddestest extracelluláris mátrixa egyedi szerkezettel bír és ez eltérő szerveződési elvre utalhat.

Ennek megjelenítésére az aggregán-alapú extracelluláris mátrixot többféle, az aggregán tengelyfehérje ellen termelt antitestet használtunk, amely a perineuronális extracelluláris mátrix legfőbb alkotóeleme (Koppe és mtsai 1997, Brückner és mtsai 1998, Brückner és mtsai 2000, Yamaguchi 2000, Matthews és mtsai 2002). Arra a megállapításra jutottunk, hogy az emberi oldalsó térddestestből a tipikus perineuronális hálók hiányoznak. Ez nem a posztmortem idő miatti álnegatív eredmény, mert a pulvinar thalamiban mind lektinhisztokémiával, mind immunhisztokémiával sikerült azonosítanunk ilyen képleteket. Ezzel ellentétben gyöngyfüzérszerűen csoportosuló mátrix lerakódásokat sikerült azonosítanunk aggregán immunhisztokémiával, leginkább

dendritek, ritkábban sejttestek körül. Ez a jellegzetes fenotípusos elrendeződés legtisztábban a HAG7D4 immunfestéssel volt kimutatható, mely a dendritek mentén kirajzolta a neuronok kontúráját a magno- és a parvocelluláris rétegben is. Ez a mindeddig példa nélküli fenotípusos elrendeződés ellentétben áll azon emlősökben tett korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint a *corpus geniculatum laterale* neuronjai körül a mátrixállomány perineuronális hálóként szerveződik (Yin és mtsai 2006, Baldauf 2010), illetve a kondroitinszulfát proteoglikán alkotóelem és a perineuronális hálók megjelenése közötti feltétlen ok-okozati kapcsolattal (Carulli és mtsai 2010, Kwok és mtsai 2010).

Kettős jelölésű vizsgálatok és elektronmikroszkópos megfigyelések segítségével kimutattuk, hogy az aggregán-immunreaktív mátrix hüvelyek valóban dendritek mentén sorakoznak, és mind a serkentő, mind a gátló szinapszisok – különösen utóbbi – körül előfordulnak. Ez a jellegzetes fenotípusú extracelluláris mátrix, vagyis a perineuronális háló hiánya, illetve a mátrix lokális periszinaptikus felhalmozódása azt a korábban bemutatott hipotézist támasztja alá, hogy a periszinaptikus extracelluláris mátrixot a preszinaptikus sejt termelheti (Brückner és mtsai 2008, Gáti és mtsai 2010, Morawski és mtsai 2010b). Ez a feltevés a patkány talamuszának vizsgálata során alakult ki, ahol szinte teljesen hiányoznak a perineuronális hálók, ugyanakkor a talamikus afferensek körül periaxonális hüvelyeket azonosítottunk (Gáti és mtsai 2010).

A periaxonális hüvely emberi oldalsó térdestestben betöltött szerepe a jelen anatómiai tanulmány alapján egyelőre nehezen határozható meg. Abból kiindulva, hogy ezek a mátrix aggregátumok feltűnően egyenként és izoláltan fordulnak elő, feltételezzük, hogy egyedi, izolált mátrixburkokat képeznek egyetlen szinapszisnak. A legújabb kutatási eredmények azt igazolják, hogy az extracelluláris mátrix az AMPA receptorok fizikai diffúzióját gátolja a posztszinaptikus oldalon (Frischknecht és mtsai 2009). Bár néhány esetben kimutattunk aggregán tartalmú mátrixot serkentő szinapszisok körül, a periaxonális hüvelyek jellemzően gátló szinapszisok körül fordultak elő. Az aggregán tartalmú periaxonális hüvely barriert hozhat létre a szinapszisok szelektív csoportjai körül, melynek működésbeli jelentőségét további tanulmányoknak kell tisztázniuk. Az emberi oldalsó térdestest extracelluláris mátrix szerkezetét más megvilágításba helyezte a Cat-315 antitest használatával készült

immunhisztokémia. Bár a patkányokon végzett *in situ* hibridizációs kísérletek szerint a az aggregán elsődleges forrása a neuron (Matthews és mtsai 2002), az emberi külső térdestest konfokális lézer mikroszkóppal történő vizsgálata arra engedett következtetni, hogy a Cat-315 antitesttel megfestett extracelluláris mátrix összetevői gliális struktúrákhoz is köthetők. Ez összhangban lehet azokkal az eredményekkel, melyek szerint emberi látóidegfőből tenyésztett asztrociták (Hernandez és mtsai 2002), embrionális csirkeagyi gliasejtek (Domowicz és mtsai 2008) és gerincvelő vagy agykérgi asztrociták (Asher és mtsai 1995, Afshari és mtsai 2010) *in vitro* képesek aggregán termelésére. Szemben a korábbi eredményekkel (Lander és mtsai 1998), saját eredményeink azt a hipotézist támasztják alá, hogy a Cat-315 antitest a foszfakán nevű proteoglikánt is jelöli (Dino és mtsai 2006), melyet köztudottan a gliasejtek állítanak elő. Véleményünk szerint ugyanakkor nem jelenti azt, hogy a Cat-315 antitest a perineuronális hálók esetében foszfakánt, és esetlegesen nem aggregánt jelölt volna; az első leírások igazolták, hogy a Cat-315 antitest az aggregánt felismeri, és aggregán knock-out egerekben immunhisztokémiával nem tudtak perineuronális hálókat kimutatni (Matthews és mtsai 2002).

A magno- és parvocelluláris rétegek közötti eltérő mátrix reaktivitást jelen anatómiai eredményeink alapján még nem tudjuk megmagyarázni. Korábbi tanulmányok beszámoltak arról, hogy a magno- és a parvocelluláris rétegek eltérő extracelluláris mátrix intenzitása nem a neuronok összetételének tudható be, mert az mindkét típusú rétegben nagyban azonos (Braak és Braak 1984). Ugyanakkor a szinaptikus szerkezet és összetétel a különböző típusú rétegekben különbözik, mert a triádoknak több dendrodendritikus szinapszisa van (F szinapszis) a magno-, mint a parvocelluláris rétegben (Hámori és mtsai 1974, Winfield 1979, Wilson és Hendrickson 1981). Bár a gátló axonvégződés összekapcsolható a kodroitinszulfát proteoglikán alapú extracelluláris mátrixszal, nem gondoljuk, hogy önmagában a nagyobb mennyiségű gátló axonvégződés okozná a mátrix intenzitásának figyelemre méltó megváltozását a magno- és a parvocelluláris rétegek között. További funkcionális vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megfejtsük ezeknek a különleges, izolált periszinaptikus mátrix aggregátumoknak a forrását és jelentőségét.

6.3. Hippokampusz

A tanulási folyamatban, információk és események memórizálásában nélkülözhetetlen szerepet játszó hippokampuszt nagyfokú szinaptikus plaszticitás, újraépülési képesség jellemzi. Ez a plaszticitási képesség mindazonáltal rendkívül érzékennyé teszi a hippokampális neuronokat stresszben és öregedésben (Lander és mtsai 1998). A perineuronális hálók mind a szinapszisok kialakulásában, mind a fenntartandó szignáltraszdukcióban szerepet játszhatnak, az extracelluláris mátrix fokális perineuronális felhalmozódása ugyanis stabilizálja az új szinaptikus kapcsolatokat (Pizzorusso és mtsai 2002, Berardi és mtsai 2003). A differenciálódott perineuronális hálók megvédik a neuronokat az excitotoxicitástól, oxidatív stressztől, illetve az Alzheimer-kór során bekövetkező béta-amiloid felhalmozódástól (Brückner és mtsai 1999, Morawski és mtsai 2004a, Morawski és mtsai 2012b). Az emberi hippokampuszban található perineuronális hálók neokortikális területekhez viszonyított alacsony sűrűsége (Brückner és mtsai 1999) nemcsak az információ áramlásért felelős serkentő és gátló szinapszisok gyors átalakulási rátájáért („turnover”) lehet felelős, de az emberi hippokampusz sérülékenységet is tükrözheti.

Az emberi hippokampuszban található kondroitinszulfát proteoglikán tartalmú extracelluláris mátrix mintázatára vonatkozóan megállapítottuk, hogy a hippokampális principális sejtek körül teljes mértékben hiányoznak a perineuronális hálók. Ez eddig új megfigyelés, mert kis számban ugyan, de több emlős esetében is kimutathatóak perineuronális hálóval körülölelt piramis sejtek (Brückner és mtsai 1999, Schuppel és mtsai 2002). Megállapítottuk, hogy a parvalbumin-immunreaktív kosársejteken kívül a calretinin-immunreaktív és calbindin-immunreaktív interneuronokat is körülveheti perineuronális háló (Hámori és mtsai 1974, Drake és mtsai 1991, Celio és mtsai 1998). Végül úgy találtuk, hogy izolált periaxonális hüvelyek igen nagy számban figyelhetőek meg szinapszisok körül a gyrus dentatus hiláris részén és az entorhinális kéregben, melyek a legsérülékenyebb és legplasztikusabb területei a hippokampusznak (Koyama és mtsai 2004), itt halmozódnak fel először intracellulárisan neurofibrilláris kötegek Alzheimer-kórban (De Calignon és mtsai 2012).

6.3.1. *A parvalbumin-immunreaktív interneuronok rétegbeli előfordulásoktól függően különbözhetnek perineuronális mátrixukban*

A kosár- és csillársejtek egyik fő immunhisztológiai jellemvonása, hogy egy parvalbumin nevű kalcium kötő fehérjét expresszálnak (Katsumaru és mtsai 1988, Freund és Buzsáki 1996). Humán hippocampusz mintáinkban megerősítettük azokat a más vizsgált emlős fajokban tett megfigyeléseket, hogy a gyorsüzelő, parvalbumin-immunreaktív interneuronokat gyakran veszi körül aggregátum tartalmú perineuronális háló (Celio és mtsai 1998, Härtig és mtsai 1999).

Az emberi hippocampuszban CRTL-1-tartalmú perineuronális hálót parvalbumin-immunreaktív interneuronok körül csak a stratum oriensben mutattunk ki, a stratum radiatumban nem. A CRTL-1-immunreaktív perineuronális háló szelektív hiánya a stratum radiatumban található parvalbumin-immunreaktív sejtek körül az emberi agyban lévő parvalbumin-immunreaktív interneuronok egyik újabb altípusának létezésére utalhat. Ugyanakkor meg kell említenünk, hogy parvalbumin tartalmú interneuronok a stratum radiatumban kis számban figyelhetőek meg (Freund és Buzsáki 1996), más területen sem vesz körül minden parvalbumin immunreaktív sejtet perineuronális háló (Härtig és mtsai 1994) és a parvalbumin tartalmú sejtek heterogének HAG7D4-immunoreaktivitásukban. Feltételezzük, hogy az extracelluláris mátrix kémiai heterogenitása – még az interneuronok egy alosztályában is – a perineuronális háló kialakulása és meghatározott interneuronok körüli felépülése közötti kapcsolatra utalhat.

6.3.2. *Perineuronális hálók calretinin és calbindin tartalmú interneuronok körül is előfordulhatnak*

Az emlősökben folytatott eddigi tanulmányok szerint a calretinin tartalmú interneuronok körül nem alakulnak ki perineuronális hálók (Drake és mtsai 1991, Celio és mtsai 1998). Ezzel szemben – jóllehet ritkábban, mint a parvalbumin tartalmú sejteknél – calretinin-immunreaktív interneuronok kondroitinszulfát proteoglikán tartalmú perineuronális hálóval voltak borítottak a humán hippocampuszban. Sima felszínű dendritjeik és a moharost-régió kívüli elhelyezkedésük arra utal, hogy ezek a perineuronális hálóval körülvett calretinin tartalmú sejtek interneuronok, melyek más interneuronokkal teremtenek kapcsolatot (Freund és Buzsáki 1996). Ezek a mátrixburokkal körülvett calretinin tartalmú interneuronok az emberi hippocampuszra

specifikus sejtek is lehetnek, mert az eddig vizsgált emlősökben nem írtak le ilyen populációt.

6.3.3. *A periaxonális hüvelyek a hilus régióban*

A perineuronális háló az idegsejt szomatodendritikus kompartmentje körül kialakult olyan mátrixköpeny, mely a szinaptikus kapcsolatok számára helyeket hagy szabadon (Celio és mtsai 1998), ezzel segítve a szinapszisok stabilizálását (Pizzorusso és mtsai 2002, Frischknecht és mtsai 2009). A humán hippocampusban azt találtuk, hogy a vélhetően posztzinaptikus sejt által termelt periszomatikus extracelluláris mátrixban mind serkentő, mind gátló szinapszisok nagy számban vannak beágyazva. Mindazonáltal a perineuronális hálóba ágyazott szinapszisok csak töredékei az összes szinaptikus kapcsolatnak. Ezen nagyszámú fennmaradó szinapszis saját fokális mátrixhüvellyel bírhat. Ilyen periaxonális hüvelyeket azonosítottak először törzsdúcokban (Brückner és mtsai 2008) és a talamuszban (Lendvai és mtsai 2012), különösen gátló szinapszisok körül. Eredményeink szerint mind CRTL-1 fehérje tartalmú, mind brevikán tartalmú periaxonális hüvelyek is beboríthatnak nem periszomatikus szinapszisokat az emberi hippocampusban. A CRTL-1 fehérje- artalmú periaxonális hüvelyeket serkentő preterminálisok körül, típusosan a gyrus dentatus hiláris részén figyeltük meg a CA3 stratum radiatum rétegével határosan. A periaxonális hüvelyek nagy sűrűsége azt sugallja, hogy ezek a moharostok kollaterálisai körül fordulhatnak elő.

A posztzinaptikus neuronokra általában úgy tekintenek, mint a periszinaptikus mátrix forrására, különösen, ha periszomatikus (gátló) szinapszisok vannak a perineuronális háló aggregátumába ágyazva (Celio és mtsai 1998). Az izolált periaxonális hüvelyek és a mielinizált axonban elektronmikroszkóppal azonosított CRTL-1 fehérje- és brevikán-immunoreaktivitás azonban arra utal, hogy periszinaptikus mátrixösszetevők a preszinaptikus sejt felől, anterograd axonális transzporttal is szállíthatnak a célrégióba.

6.3.4. A kondroitinszulfát proteoglikánok expressziója Alzheimer-kórban – az értekezéshez kapcsolódó, kollaborációban végzett kísérletek

Ebben a fejezetben szeretném megemlíteni azokat az eredményeket, melyek munkámhoz kapcsolódva, de kollaborációban születtek. Ezekben a vizsgálatokban az extracelluláris mátrix változásait követtük Alzheimer kórban.

Az Alzheimer-kórban tapasztalt kognitív hanyatlás egyik fő oka a szinaptikus integritás károsodása (Crews és Masliah 2010). A perineuronális hálók és periaxonális hüvelyek teremtik meg a „micromilieu”-t az általuk körülvevett neuronok számára. Ezért bármilyen változás az extracelluláris mátrix molekuláris heterogenitásában előidézheti az idegsejtek működési megváltozását, károsodását. Mindeddig ellentétes adatokat közöltek az extracelluláris mátrix Alzheimer-kórban történő változásairól. Korai stádiumú Alzheimer-kórban a kondroitinszulfát proteoglikánok mennyiségének drámai növekedése figyelhető meg (Suzuki és mtsai 1965). Ezzel szemben a lektin kötődés (például WFA) jelentősen csökken Alzheimer-kórban (Kobayashi és mtsai 1989, Baig és mtsai 2005), bár ez valószínűleg egyszerűen a posztmortem idő függvénye (Morawski és mtsai 2012b). Legújabban úgy találták, hogy a kérgi és szubkortikális területeken lévő kondroitinszulfát proteoglikán alapú extracelluláris mátrix mennyisége és mintázata érdemben nem változik (Jenkins és Bachelard 1988, Morawski és mtsai 2010a, Morawski és mtsai 2012b), és ezt megfelelő transzgenikus állatmodellben is megerősítették (Morawski és mtsai 2010b). Mivel az arhikortex (így az entorhinális kéreg és a hippocampusz) különösen érzékeny az öregedésre és neurodegenerációra (Mcewen 1999), feltételeztük, hogy Alzheimer-kórban ennek a területnek megváltozhat az aggregáció és/vagy brevikáció expressziója.

Széles körben elfogadott és jelen eredményeink által is alátámasztott tény, hogy a perineuronális háló megkíméli az őket viselő neuronokat az Alzheimer kórra jellemző citoskeletális degenerációtól (Brückner és mtsai 1999). Ezt a feltételezést alátámasztja a kéreg alatti neuronok (pl. *nucleus basalis* Meynert, *raphe* magok vagy *locus coeruleus*) sebezhetősége, mivel ezen neuronok körül csak ritkán látni perineuronális hálókat (Morawski és mtsai 2010a). Közös munkánkban egy új mátrix kompartmentalizációról, a periaxonális hüvelyekről mutattunk ki fontos megfigyelést. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a preszinaptikus neuron – mint a periszinaptikus mátrix valószínűsíthető forrása – hozzájárul a kondroitinszulfát

proteoglikánok termelésével a periaxonális hüvelyek létrehozásához, ezáltal megőrizve a szinapszisok szerkezeti integritását, függetlenül a posztszinaptikus (dendritikus) citoskeleton patológiás folyamataitól.

Közösen tett megfigyeléseink szerint a periaxonális hüvelyek strukturálisan is stabilak maradnak az Alzheimer-kór progressziója alatt a hippocampusban. A periszinaptikus mátrix aggregátumok jelenléte szenilis plakkok közelében és hiperfoszforilált tau-fehérjében gazdag posztszinaptikus dendriteken (melyek az Alzheimer-kór fő hisztopatológiai markerei) nem csupán egy szerkezeti mátrixmaradvány helyét jelzi. Ezt a feltételezést az indokolja, hogy ezekben a struktúrákban kimutattuk a vezikuláris transzporterek (glutamát és GABA transzporterek) jelenlétét, mely funkcionáló szinapszisok meglétére utal. A proteinmintákon mért magasabb brevikan- és CRTL-1 protein szint azt is jelentheti, hogy a sejtek fokozott mátrixprotein termeléssel reagálnak a kóros állapotra, megvédendő szinapszisaikat.

Összességében arra következtetünk, hogy a periaxonális hüvelyek a hippocampusban egy jellegzetes neurokémiai összetételű és a periszinaptikus régióra koncentrálódó mátrixstruktúrát alkotnak, mely függetleníti az interneuronális kapcsolatokat a patológiás folyamatoktól, ezzel segítve az információáramlást az idegsejtek között.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

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

1. Megállapítottuk, hogy humán gerincvelőben a perineuronális hálókbán és periaxonális hüvelyekben markánsan jelen van az aggregán és a brevikan alapú extracelluláris mátrix. A gerincvelő teljes kraniokaudális kiterjedését elemezve kimutattuk, hogy perineuronális hálók jellegzetesen a hosszú axonú neuronokkal bíró magokban fordulnak elő, függetlenül attól, hogy azok 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 hálókbá. Úgy találtuk, hogy a dendriteken végződő szinapsziszokat borító periaxonális hüvelyek körvonalazzák az idegsejtek nyúlványait. A magnocelluláris rétegek – szemben a parvocelluláris rétegekkel – intenzív mátrix immunreaktivitást mutattak.
3. Az ember hippocampusz formációjában kimutattuk, hogy principális sejtek körül nem fordul elő perineuronális háló. Az interneuronok csoportján belül nem csak a parvalbumin tartalmú, gyorsüzelő kosár- és csillársejtek, hanem a calretinin- és calbindin-pozitív interneuronok körül is megfigyeltünk perineuronális hálókat. Mindezen megállapítások az emberi hippocampuszra 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.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

Az ember központi idegrendszerét felépítő sejtek közötti szűk teret az extracelluláris mátrix molekulái töltik ki, melyet a neuronok és a gliasejtek termelnek. Célkitűzésünk során a mátrix két különleges megjelenési formájára fordítottuk figyelmünket: a neuronok szómáját és a dendritek proximális részét borító perineuronális hálókra, illetve a nemrégiben azonosított, az axonok preszinaptikus részét borító periaxonális hüvelyekre. Munkánk során a központi idegrendszeri extracelluláris mátrix megjelenését vizsgáltuk a gerincvelőben és további két agyterületen, a külső térdestestben és a hippokampuszban. A mátrixot felépítő molekulák közül a tenaszcin és a hialuronsav mellett két proteoglikánra – az aggregánra és a brevikánra – koncentráltunk, mivel ismert, hogy az aggregán a perineuronális mátrix elengedhetetlen alkotója, amit a neuronok termelnek, a brevikán pedig a periaxonális hüvelyekben található, és a neuronok és gliasejtek is termelhetik. Vizsgálatainkhoz egyszeres és többszörös immunhisztokémiai festéseket, fény-, konfokális lézer szkennig- és elektronmikroszkópiát használtunk. A gerincvelőben folytatott kísérleteink során 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. Megállapítottuk, hogy a humán gerincvelőben a perineuronális hálókból és periaxonális hüvelyekben markánsan jelen van az aggregán és a brevikán alapú extracelluláris mátrix. A perineuronális hálók, szemben az agyvelőben találtakkal, jellegzetesen hosszú axonú neuronokat tartalmazó magokban fordulnak elő, míg a periaxonális hüvelyek a hátsó szarv területén szabadon hagyták a fájdalomérző afferenseket. Kiválasztottunk egy apasztikus területet – a köztiagyi külső térdestestet –, ahol arra kerestük a választ, hogy egy ilyen agyterület milyen kompartmentalizáltságú extracelluláris mátrixot alakít ki neuronjai körül. A külső térdestest állományában – emberben egyedi módon – a perineuronális mátrix nem szerveződik hálókba, a dendriteken végződő szinapsziszokat borító periaxonális hüvelyek körvonalazzák az idegsejtek nyúlványait. A humán hippokampuszban folytatott munkánk során pedig arra voltunk kíváncsiak, hogyan szerveződik egy köztudottan plasztikus kérgi agyterület mátrixösszetétele az emberi idegrendszerben, találunk-e filogenetikai különbségeket más emlősökben

tapasztaltakhoz. Az ember hippocampusz formációjában kimutattuk, hogy principális sejtek körül nem fordul elő perineuronális háló. Az interneuronok csoportján belül nem csak a parvalbumin tartalmú, hanem a calretinin- és calbindin-pozitív interneuronok körül is megfigyeltünk perineuronális hálókat, ez eltér az eddigi filogenetikai megállapításoktól. Ultrastrukturális elemzéssel arra világítottunk rá, hogy a periszinaptikus mátrix összetevőket a preszinaptikus neuron is termelheti.

9. SUMMARY

The central nervous system is not only composed of cells but harbours a wide variety of matrix molecules in the narrow extracellular space. This matrix contains a variety of proteins and polysaccharides which are produced locally by neurons and glial cells. We focused on two specialized matrix forms: the well known perineuronal nets surrounding cell bodies and proximal dendrites, and the so-called axonal coats encapsulating 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. We have been investigating the appearance of the extracellular matrix in the spinal cord and two other different areas, the lateral geniculate body and the hippocampus of humans. We focused on the aggrecan molecule which is produced by neurons and the brevican molecule which is the common product of neurons and glial cells. Aggrecan is a characteristic component of perineuronal nets whilst brevican of axonal coats. We found that extracellular matrix components were visualized by single and multiple immunohistochemistry using light- and confocal laser scanning microscopy and electronmicroscopy. In the spinal cord, we surveyed the neurochemical make-up of perineuronal- and perisynaptic matrix around distinct neuronal subsets and synaptic terminals in the neuroanatomically and functionally different cranio-caudal segments. We found that aggrecan and brevican are indispensable components of perineuronal nets, typically present around neurons with long axons of the spinal cord. Despite their large number, periaxonal coats remained undetected around nociceptive afferents in the dorsal horn. In the brain, we have selected an aplastic area – the lateral geniculate body of the diencephalon – to diagram the phenotypic appearance of extracellular matrix around neurons. Uniquely in human, the perineuronal matrix is not organised in perineuronal nets, instead, the neurons are outlined by axonal coats. Lastly, in the human hippocampus we investigated the compartmentalization of the extracellular matrix in a cortical area typically known for its plastic properties. In contrast to findings in investigated mammals, principal cells remained invariably uncovered by perineuronal nets. Within the group of interneurons not only the parvalbumin-containing, but calretinin- and calbindin-positive cells were surrounded by perineuronal nets, highlighting phylogenetic differences. Ultrastructural

analysis suggested that the perisynaptic matrix components can be produced not only by the post-, but by the presynaptic neuron as well, challenging long-standing dogmas about the establishment and chemical heterogeneity of the extracellular matrix of the central nervous system.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Adams I, Brauer K, Arelin C, Härtig W, Fine A, Mader M, Arendt T, Bruckner G. (2001) Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia. *Neuroscience*, 108: 285-298.

Afshari FT, Kwok JC, White L, Fawcett JW. (2010) Schwann cell migration is integrin-dependent and inhibited by astrocyte-produced aggrecan. *Glia*, 58: 857-869.

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. In. Garland Science, New York, 2002.

Alfei L, Aita M, Caronti B, De Vita R, Margotta V, Medolago Albani L, Valente AM. (1999) Hyaluronate receptor cd44 is expressed by astrocytes in the adult chicken and in astrocyte cell precursors in early development of the chick spinal cord. *Eur J Histochem*, 43: 29-38.

Anlar B, Gunel-Ozcan A. (2012) Tenascin-r: Role in the central nervous system. *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 1385-1389.

Ariza CA, McHugh KP, White SJ, Sakaguchi DS, Mallapragada SK. (2010) Extracellular matrix proteins and astrocyte-derived soluble factors influence the differentiation and proliferation of adult neural progenitor cells. *J Biomed Mater Res A*, 94: 816-824.

Asher RA, Scheibe RJ, Keiser HD, Bignami A. (1995) On the existence of a cartilage-like proteoglycan and link proteins in the central nervous system. *Glia*, 13: 294-308.

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

Baldauf ZB. (2010) Dual chemoarchitectonic lamination of the visual sector of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience*, 165: 801-818.

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

Bartus K, James ND, Bosch KD, Bradbury EJ. (2012) Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Exp Neurol*, 235: 5-17.

Beggah AT, Dours-Zimmermann MT, Barras FM, Brosius A, Zimmermann DR, Zurn AD. (2005) Lesion-induced differential expression and cell association of neurocan, brevican, versican v1 and v2 in the mouse dorsal root entry zone. *Neuroscience*, 133: 749-762.

Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T. (2009) Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of ranvier in the CNS. *J Neurochem*, 108: 1266-1276.

Belichenko PV, Hagberg B, Dahlstrom A. (1997a) Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol*, 93: 50-61.

Belichenko PV, Miklossy J, Celio MR. (1997b) HIV-1 induced destruction of neocortical extracellular matrix components in AIDS victims. *Neurobiol Dis*, 4: 301-310.

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

Bertolotto A, Manzardo E, Guglielmone R. (1996) Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfated proteoglycan in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res*, 283: 283-295.

Bignami A, Perides G, Rahemtulla F. (1993) Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain. *J Neurosci Res*, 34: 97-106.

Blosa M, Sonntag M, Brückner G, Jäger C, Seeger G, Matthews RT, Rubsamén R, Arendt T, Morawski M. (2013) Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body--implications for physiological functions. *Neuroscience*, 228: 215-234.

Brückner G, Brauer K, HArtig 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, Bringmann A, HArtig W, Koppe G, Delpech B, Brauer K. (1998) Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase abc in the adult rat brain. *Exp Brain Res*, 121: 300-310.

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

Braak H, Braak E. (1984) Neuronal types in the neocortex-dependent lateral territory of the human thalamus. A golgi-pigment study. *Anat Embryol (Berl)*, 169: 61-72.

Braak H, Braak E. (1992) The human entorhinal cortex: Normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci Res*, 15: 6-31.

Bradbury EJ, Carter LM. (2010) Manipulating the glial scar: Chondroitinase abc as a therapy for spinal cord injury. *Brain Res Bull*, 84: 306-316.

Brauer K, Härtig W, Bigl V, Brückner G. (1993) Distribution of parvalbumin-containing neurons and lectin-binding perineuronal nets in the rat basal forebrain. *Brain Res*, 631: 167-170.

Braunewell KH, Pesheva P, McCarthy JB, Furcht LT, Schmitz B, Schachner M. (1995) Functional involvement of sciatic nerve-derived versican- and decorin-like molecules and other chondroitin sulphate proteoglycans in ecm-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. *Eur J Neurosci*, 7: 805-814.

Brittis PA, Canning DR, Silver J. (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*, 255: 733-736.

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, 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, Hartlage-Rubsamen 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, Szeoke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J. (2006) Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience*, 138: 365-375.

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.

Busch SA, Silver J. (2007) The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 17: 120-127.

Carbonetto S, Harvey WJ, Douville PJ, Whelan L. (1988) Cellular and molecular models of neuron-matrix adhesion in nerve fiber growth. *Prog Brain Res*, 78: 347-352.

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, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW. (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, 133: 2331-2347.

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

Cooper NG, Steindler DA. (1989) Critical period-dependent alterations of the transient body image in the rodent cerebral cortex. *Brain Res*, 489: 167-176.

Crainie M, Belch AR, Mant MJ, Pilarski LM. (1999) Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (rhamm) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: Identification of three distinct rhamm variants. *Blood*, 93: 1684-1696.

Crews L, Masliah E. (2010) Molecular mechanisms of neurodegeneration in alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 19: R12-20.

de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL, Hyman BT. (2012) Propagation of tau pathology in a model of early alzheimer's disease. *Neuron*, 73: 685-697.

Deak A, Bacskai T, Gaál B, Rácz E, 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.

Deckner M, Lindholm T, Cullheim S, Risling M. (2000) Differential expression of tenascin-c, tenascin-r, tenascin/j1, and tenascin-x in spinal cord scar tissue and in the olfactory system. *Exp Neurol*, 166: 350-362.

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.

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, Rusakov DA. (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 21: 353-359.

Doege K, Sasaki M, Horigan E, Hassell JR, Yamada Y. (1987) Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J Biol Chem*, 262: 17757-17767.

Doege K, Sasaki M, Yamada Y. (1990) Rat and human cartilage proteoglycan (aggrecan) gene structure. *Biochem Soc Trans*, 18: 200-202.

Domowicz MS, Sanders TA, Ragsdale CW, Schwartz NB. (2008) Aggrecan is expressed by embryonic brain glia and regulates astrocyte development. *Dev Biol*, 315: 114-124.

Drake CT, Mulligan KA, Wimpey TL, Hendrickson A, Chavkin C. (1991) Characterization of vicia villosa agglutinin-labeled GABAergic interneurons in the hippocampal formation and in acutely dissociated hippocampus. *Brain Res*, 554: 176-185.

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. (2009) Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans.

Fawcett J. (2009) Molecular control of brain plasticity and repair. *Prog Brain Res*, 175: 501-509.

Fawcett JW, Curt A. (2009) Damage control in the nervous system: Rehabilitation in a plastic environment. *Nat Med*, 15: 735-736.

Fitch MT, Silver J. (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*, 209: 294-301.

Freund TF, Buzsáki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470.

Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. (1994) The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules ng-cam/11/nile and n-cam, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 125: 669-680.

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.

Frischknecht R, Gundelfinger ED. (2012) The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity. *Adv Exp Med Biol*, 970: 153-171.

Gáti G, Morawski M, Lendvai D, Jager C, NAgyessy 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.

Gaál B, Rácz E, Juhasz T, Hollo K, Matesz C. (2013) Distribution of extracellular matrix macromolecules in the vestibular nuclei and cerebellum of the frog, *rana esculenta*. *Neuroscience*.

Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. (2008) Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-r in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, 27: 1373-1390.

Gatchalian CL, Schachner M, Sanes JR. (1989) Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin(j1), n-cam, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, 108: 1873-1890.

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.

Geyer SW, Gudden W, Betz H, Gnahn H, Weindl A. (1987) Co-localization of choline acetyltransferase and postsynaptic glycine receptors in motoneurons of rat spinal cord demonstrated by immunocytochemistry. *Neurosci Lett*, 82: 11-15.

Giamanco KA, Morawski M, Matthews RT. (2010) Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*, 170: 1314-1327.

Gilbert AM, Bikker JA, O'Neil SV. (2011) Advances in the development of novel aggrecanase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*, 21: 1-12.

Gogolla N, Caroni P, Luthi A, Herry C. (2009) Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, 325: 1258-1261.

Gu WL, Fu SL, Wang YX, Li Y, Lu HZ, Xu XM, Lu PH. (2009) Chondroitin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway. *BMC Neurosci*, 10: 128.

Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, Lange LA, Wang C, Curpen GD, Savani RC, Greenberg AH, Turley EA. (1995) Overexpression of the hyaluronan receptor rhamm is transforming and is also required for h-ras transformation. *Cell*, 82: 19-26.

Hamel MG, Mayer J, Gottschall PE. (2005) Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes. *J Neurochem*, 93: 1533-1541.

Hámori J, Pasik T, Pasik P, Szentágóthai J. (1974) Triadic synaptic arrangements and their possible significance in the lateral geniculate nucleus of the monkey. *Brain Res*, 80: 379-393.

Hardingham T, Bayliss M. (1990) Proteoglycans of articular cartilage: Changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum*, 20: 12-33.

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

Härtig W, Brauer K, Bigl V, Brückner G. (1994) Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Res*, 635: 307-311.

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.

Hedstrom KL, Xu X, Ogawa Y, Frischknecht R, Seidenbecher CI, Shrager P, Rasband MN. (2007) Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol*, 178: 875-886.

Hendry SH, Hockfield S, Jones EG, McKay R. (1984) Monoclonal antibody that identifies subsets of neurones in the central visual system of monkey and cat. *Nature*, 307: 267-269.

Hernandez MR, Agapova OA, Yang P, Salvador-Silva M, Ricard CS, Aoi S. (2002) Differential gene expression in astrocytes from human normal and glaucomatous optic nerve head analyzed by cDNA microarray. *Glia*, 38: 45-64.

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 Pt 2: 877-889.

Hockfield S, Kalb RG, Zaremba S, Fryer H. (1990) Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 55: 505-514.

Huang L, Grammatikakis N, Yoneda M, Banerjee SD, Toole BP. (2000) Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem*, 275: 29829-29839.

Ida M, Shuo T, Hirano K, Tokita Y, Nakanishi K, Matsui F, Aono S, Fujita H, Fujiwara Y, Kaji T, Oohira A. (2006) Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *J Biol Chem*, 281: 5982-5991.

Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. (1994) Behab, a new member of the proteoglycan tandem repeat family of hyaluronan-binding proteins that is restricted to the brain. *J Cell Biol*, 125: 495-509.

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.

Jaworski DM, Kelly GM, Piepmeier JM, Hockfield S. (1996) Behab (brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines. *Cancer Res*, 56: 2293-2298.

Jenkins HG, Bachelard HS. (1988) Glycosaminoglycans in cortical autopsy samples from alzheimer brain. *J Neurochem*, 51: 1641-1645.

John N, Krugel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Seidenbecher CI. (2006) Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci*, 31: 774-784.

Jones FS, Jones PL. (2000) The tenascin family of ecm glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn*, 218: 235-259.

Jones LL, Liu Z, Shen J, Werner A, Kreutzberg GW, Raivich G. (2000) Regulation of the cell adhesion molecule cd44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. *J Comp Neurol*, 426: 468-492.

Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH. (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol*, 182: 399-411.

Kaaijk P, Pals ST, Morsink F, Bosch DA, Troost D. (1997) Differential expression of cd44 splice variants in the normal human central nervous system. *J Neuroimmunol*, 73: 70-76.

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

Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K. (1988) Immunocytochemical study of gabaergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res*, 72: 347-362.

Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res*, 12: 19-32.

Kobayashi K, Emson PC, Mountjoy CQ. (1989) Vicia villosa lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in alzheimer-type dementia. *Brain Res*, 498: 170-174.

Kochlamazashvili G, Henneberger C, Bukalo O, Dvoretzkova E, Senkov O, Lievens PM, Westenbroek R, Engel AK, Catterall WA, Rusakov DA, Schachner M, Dityatev A. (2010) The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic l-type ca(2+) channels. *Neuron*, 67: 116-128.

Koppe G, Brückner G, Härtig W, Delpech B, Bigl V. (1997) Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochem J*, 29: 11-20.

Koyama R, Yamada MK, Fujisawa S, Katoh-Semba R, Matsuki N, Ikegaya Y. (2004) Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 24: 7215-7224.

Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW. (2010) In vitro modeling of perineuronal nets: Hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J Neurochem*, 114: 1447-1459.

Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW. (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol*, 71: 1073-1089.

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

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

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: 413-425.

Lin L, Chan SO. (2003) Perturbation of cd44 function affects chiasmatic routing of retinal axons in brain slice preparations of the mouse retinofugal pathway. *Eur J Neurosci*, 17: 2299-2312.

Lynn BD, Turley EA, Nagy JI. (2001) Subcellular distribution, calmodulin interaction, and mitochondrial association of the hyaluronan-binding protein rhamm in rat brain. *J Neurosci Res*, 65: 6-16.

Margolis RK, Margolis RU. (1993) Nervous tissue proteoglycans. *Experientia*, 49: 429-446.

Marth JD, Grewal PK. (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol*, 8: 874-887.

Matesz C, Modis L, Halasi G, Szigeti ZM, Felszeghy S, Bacskai T, Szekely G. (2005) Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. *Brain Res Bull*, 66: 526-531.

Matthews RT, Gary SC, Zerillo C, Pratta M, Solomon K, Arner EC, Hockfield S. (2000) Brain-enriched hyaluronan binding (behab)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (adamts) family member. *J Biol Chem*, 275: 22695-22703.

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.

McEwen BS. (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 22: 105-122.

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*, 11: 3398-3411.

McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR. (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci*, 19: 10778-10788.

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.

Meyer K, Palmer J. (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biology and Chemistry*, 107: 629-634

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.

Miura R, Aspberg A, Ethell IM, Hagihara K, Schnaar RL, Ruoslahti E, Yamaguchi Y. (1999) The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. *J Biol Chem*, 274: 11431-11438.

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

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

Morawski M, Alpar A, Bruckner G, Fiedler A, Jager C, Gati G, Stieler JT, Arendt T. (2009) Chondroitin sulfate proteoglycan-based extracellular matrix in chicken (*gallus domesticus*) brain. *Brain Res*, 1275: 10-23.

Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Arendt T. (2010a) Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in alzheimer's disease. *Neuroscience*, 169: 1347-1363.

Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Kunzle H, Arendt T. (2010b) Aggrecan-based extracellular matrix shows unique cortical features and conserved subcortical principles of mammalian brain organization in the madagascan lesser hedgehog tenrec (*echinops telfairi martin*, 1838). *Neuroscience*, 165: 831-849.

Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Matthews RT, Arendt T. (2012b) Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol*, 22: 547-561.

Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Ponta H, Herrlich P. (2001) The *nf2* tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with *cd44*. *Genes Dev*, 15: 968-980.

Nakamura H, Fujii Y, Inoki I, Sugimoto K, Tanzawa K, Matsuki H, Miura R, Yamaguchi Y, Okada Y. (2000) Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (*adamts4*) at different sites. *J Biol Chem*, 275: 38885-38890.

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

Nicholson C, Sykova E. (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci*, 21: 207-215.

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.

Oakley RA, Tosney KW. (1991) Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. *Dev Biol*, 147: 187-206.

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*, 23: 287-298.

Perris R, Krotoski D, Lallier T, Domingo C, Sorrell JM, Bronner-Fraser M. (1991) Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development. *Development*, 111: 583-599.

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.

Plenderleith MB, Snow PJ. (1990) The effect of peripheral nerve section on lectin binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*, 507: 146-150.

Pyka M, Wetzel C, Aguado A, Geissler M, Hatt H, Faissner A. (2011) Chondroitin sulfate proteoglycans regulate astrocyte-dependent synaptogenesis and modulate synaptic activity in primary embryonic hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 33: 2187-2202.

Quaglia X, Beggah AT, Seidenbecher C, Zurn AD. (2008) Delayed priming promotes CNS regeneration post-rhizotomy in neurocan and brevican-deficient mice. *Brain*, 131: 240-249.

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

RAUCH U, KARTHIKEYAN L, MAUREL P, MARGOLIS RU, MARGOLIS RK. (1992) Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem*, 267: 19536-19547.

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

RAUCH U. (2007) Brain matrix: Structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans*, 35: 656-660.

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

RUTKA JT, HALL J, GIBLIN JR, DOUGHERTY DV, EDWARDS MS, STERN R, ROSENBLUM ML. (1988) Partial characterization of a soluble mitogenic factor from medulloblastoma. *J Neurosurg*, 68: 251-258.

SAYED R, MUBARAK W, OHTSUKA A, TAGUCHI T, MURAKAMI T. (2002) Histochemical study of perineuronal nets in the retrosplenial cortex of adult rats. *Ann Anat*, 184: 333-339.

SCHAFFER R, DEHN D, BURBACH GJ, DELLER T. (2008) Differential regulation of chondroitin sulfate proteoglycan mRNAs in the denervated rat fascia dentata after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neurosci Lett*, 439: 61-65.

SCHUPPEL K, BRAUER K, HÄRTIG W, GROSCHE J, EARLEY B, LEONARD BE, BRÜCKNER G. (2002) Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res*, 958: 448-453.

Schwartz NB, Domowicz M, Krueger RC, Jr., Li H, Mangoura D. (1996) Brain aggrecan. *Perspect Dev Neurobiol*, 3: 291-306.

Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fassler R, Garner CC, Gundelfinger ED. (1995) Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem*, 270: 27206-27212.

Seidenbecher CI, Gundelfinger ED, Bockers TM, Trotter J, Kreutz MR. (1998) Transcripts for secreted and gpi-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *Eur J Neurosci*, 10: 1621-1630.

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.

Suzuki K, Katzman R, Korey SR. (1965) Chemical studies on alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 24: 211-224.

Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bacskai T, Halasi G, Meszar Z, Modis L. (2006) Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. *J Comp Neurol*, 496: 819-831.

Takahashi-Iwanaga H, Murakami T, Abe K. (1998) Three-dimensional microanatomy of perineuronal proteoglycan nets enveloping motor neurons in the rat spinal cord. *J Neurocytol*, 27: 817-827.

Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C, Forrest L. (2002) Projection neurons in lamina i of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J Neurosci*, 22: 4103-4113.

Tona A, Bignami A. (1993) Effect of hyaluronidase on brain extracellular matrix in vivo and optic nerve regeneration. *J Neurosci Res*, 36: 191-199.

Toole BP. (1990) Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol*, 2: 839-844.

Viapiano MS, Matthews RT. (2006) From barriers to bridges: Chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol Med*, 12: 488-496.

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.

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. (1997) Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, 272: 13997-14000.

Wilson JR, Hendrickson AE. (1981) Neuronal and synaptic structure of the dorsal lateral geniculate nucleus in normal and monocularly deprived macaca monkeys. *J Comp Neurol*, 197: 517-539.

Winfield DA. (1979) An electron microscopic study of neurones in the lateral geniculate nucleus of the monkey labelled by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 178: 213-220.

Wlodarczyk J, Mukhina I, Kaczmarek L, Dityatev A. (2011) Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Dev Neurobiol*, 71: 1040-1053.

Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. (1994) Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem*, 269: 10119-10126.

Yamada K, Yamada T, Sasaki T, Rahemtulla F, Takagi M. (1997) Light and electron microscopical immunohistochemical localization of large proteoglycans in human tooth germs at the bell stage. *Histochem J*, 29: 167-175.

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

Yin ZQ, Crewther SG, Wang C, Crewther DP. (2006) Pre- and post-critical period induced reduction of cat-301 immunoreactivity in the lateral geniculate nucleus and visual cortex of cats y-blocked as adults or made strabismic as kittens. *Mol Vis*, 12: 858-866.

Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K, Kimata K. (1995) Expression of pg-m(v3), an alternatively spliced form of pg-m without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues. *J Biol Chem*, 270: 3914-3918.

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

Zhang S, Chang MC, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. (1998) The hyaluronan receptor rhamm regulates extracellular-regulated kinase. *J Biol Chem*, 273: 11342-11348.

Zimmermann DR, Ruoslahti E. (1989) Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J*, 8: 2975-2981.

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

Lendvai D, Morawski M, Bruckner G, Negyessy L, Baksa G, Glasz T, Patonay L, Matthews RT, Arendt T, Alpar 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.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt témavezetőmnek Dr. Alpár Alánnak szeretnék köszönetet mondani, hogy megtisztelt a bizalmával, meghívott kutatólaborjába doktorandusz hallgatónak. Neki köszönhetem, hogy megtapasztalhattam az oktató- és kutatómunka értékét és szépségeit. Szakmai tudása, témavezetése, önzetlen segítségnyújtása példaértékű és követendő mintául szolgál számomra. Végtelen türelemmel segített keresztül a kutatómunka nehézségein és kudarcain, időt és energiát nem kímélve tanított és támogatott engem.

Köszönetet mondok Dr. Csillag András Professor Úrnak azért, hogy lehetővé tette számomra azt, hogy a PhD munkámat az Anatómiai Intézet falai között végezhessem el. Köszönöm a feltétlen kedvességét, az itthon és külföldön eltöltött idő alatti szakmai és anyagi támogatását.

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

Szeretném megköszönni Dr. Négyessy Lászlónak az elektronmikroszkópos munka elemzésében nyújtott hallatlan segítségét. Köszönöm Dr. Kántor Orsolyának, hogy bármikor fordulhattam Hozzá tanácsért.

Köszönöm a segítséget dr. Gáti Gerorgina kolléganőmnek, akivel együtt vészeltük át a hallgatói lét „viszontagságait”!

Dr. Baksa Gábornak és Dr. Glasz Tibornak akik a humán anyagokat biztosították számunkra. Hasonlóképpen Major Attila boncmesternek az anyagok kivételében nyújtott segítségért.

Köszönöm laborunk szakasszisztensének, Németh Andreának a precíz munkáját. Szeretném továbbá megköszönni Deák Szilviának a műtéti asszisztenciában nyújtott segítségét. Köszönöm Horváth Péterné Terinek, hogy bármikor és bármiben számíthattam a segítségére.

Köszönöm édesanyámnak, Szekér Annának a lelki támogatást.

Köszönettel tartozom az Anatómia 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 Flechsig Intézet munkatársainak, különösen Dr. Markus Morawski-nak, Dr. Gert Brückner Professzor úrnak és Dr. Thomas Arendt Professzor Úrnak, hogy biztosították számomra a németországi tanulmányutat és képzést, továbbá azt, hogy több témában kollaborálhattunk. Hasonlóképpen hálával tartozom a Karolinska Intézetből Dr. Harkány Tibor Professzor Úrnak a kollaborációban nyújtott segítségért.