

AZ EXTRACELLULÁRIS MAKROMOLEKULÁK SZEREPE A KÖZPONTI IDEGRENSZER FEJLŐDÉSÉBEN

Mészár Zoltán

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS



TÉMAVEZETŐK: DR. MÓDIS LÁSZLÓ, DR. MATESZ KLÁRA

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Debrecen, 2008

Tartalomjegyzék

| | |
|---|-----------|
| Rövidítések jegyzéke | 4 |
| 1. Bevezetés | 5 |
| 2. Irodalmi áttekintés | 6 |
| 2.1. A neuruláció folyamata | 6 |
| 2.1.1. Primer neuruláció | 6 |
| 2.1.2. Szekunder neuruláció | 8 |
| 2.1.3. A velőcső differenciálódása | 9 |
| 2.1.4. Szövetátrendeződés a központi idegrendszerben | 12 |
| 2.1.5. Neuronok differenciációja | 14 |
| 2.1.6. Az axonnövekedés szabályozása | 17 |
| 2.1.7. Synaptogenesis | 20 |
| 2.2. Extracelluláris mátrix molekulák az idegrendszerben | 21 |
| 2.2.1. A hialuronsav | 21 |
| 2.2.2. Proteoglikánok | 25 |
| 2.2.3. Glikoproteinek | 31 |
| 3. Célkitűzések | 33 |
| 4. Anyagok és módszerek | 34 |
| 4.1. Állatkísérletek, állatkísérletekhez szükséges engedélyek | 34 |
| 4.2. Hisztokémiai vizsgálatok | 35 |
| 4.2.1. Preparátumok készítése | 35 |
| 4.2.2. A hialuronsav kimutatása | 35 |
| 4.2.3. Immunohisztokémiai reakciók | 36 |
| 4.3. Biokémiai módszerek | 37 |
| 4.3.1. mRNS szintű vizsgálatok | 37 |
| 4.4. Optikai denzitometriai mérések | 38 |
| 4.5. Statisztikai módszerek | 39 |
| 5. Eredmények | 41 |
| 5.1. A hialuronsav vizsgálata a fejlődés során | 41 |
| 5.1.1. A bHABC hisztokémiai reakciók specifikusságának vizsgálata, kontroll kísérletek | 41 |
| 5.1.2. Hialuronsav akkumuláció a gerincvelő különböző fejlődési szakaszaiban | 41 |
| 5.1.3. A hialuronsav réteges eloszlási mintázata HH23 stádiumú gerincvelőben | 44 |
| 5.1.4. A hialuronsav akkumulációja differenciálódó neuronok körül | 45 |
| 5.1.5. A hialuronsav különböző megoszlási profilja az axonok körül a központi és perifériás idegrendszerben | 46 |
| 5.1.6. Hialuronsav-szintázok és receptorok expressziója a fejlődő gerincvelőben | 48 |
| 5.2. A kondroitin-szulfát proteoglikánok vizsgálata a fejlődő gerincvelőben | 49 |
| 5.2.1. Kondroitin-szulfát eloszlása az életkor függvényében | 49 |
| 5.2.2. Lectinok és a phosphacan expressziójának alakulása az életkorral | 52 |
| 5.2.3. A phosphacan expressziós mintázata a csirkeembrió gerincvelőben | 52 |
| 5.3. A hialuronsav változása a nervus vestibularis regenerációja során | 55 |
| 5.3.1. A hialuronsav normál eloszlása a béka idegrendszerében | 55 |
| 5.3.2. A hialuronsav mennyisége változott a belépési zónában az axotomiát követően .. | 55 |
| 5.3.3. A hialuronsav és változása a nucleus vestibularis medialisban | 56 |
| 5.3.4. A hialuronsav eloszlásának és relatív mennyiségének változása a nucleus vestibularis lateralisban | 58 |
| 5.3.5. A hialuronsav eloszlási mintázatának változása az operált és ép oldalon | 59 |
| 6. Megbeszélés | 60 |
| 6.1. A hialuronsav a fejlődő gerincvelőben | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2. A hialuronsav változása az ideggeneráció során..... | 62 |
| 6.2.1.A belépési zóna bHABC reakció optikai denzitásának változása..... | 62 |
| 6.2.2. A HA optikai denzitásának változása a vestibularis magokban (NVM és NVL) .. | 63 |
| 6.2.3. A HA változása az ép és operált oldali vestibularis magokban és a belépési zónában..... | 65 |
| 6.3. A kondroitin-szulfát proteoglikánok a fejlődő idegrendszerben..... | 65 |
| 6.4. Konklúzió | 69 |
| 7. Összefoglalás | 71 |
| 8. Summary | 72 |
| 9. Köszönetnyilvánítás | 73 |
| 10. Irodalomjegyzék | 74 |
| 11. Saját közlemények jegyzéke | 97 |
| 12. Melléklet: az értekezést megalapozó közlemények különlenyomatai..... | 99 |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|--|---|
| ANOVA: analysis of variance | MHP: medial hinge point |
| BDNF: brain derived growth factor | MMP: mátrix metalloproteináz |
| bHABC: biotinylated hyaluronan binding complex | MuSK: muscle specific kinase |
| BMP: bone morphogenetic protein | MZ: marginalis zóna |
| CRP: complement regulatory protein | N-CAM: neural cell adhesion molecule |
| CS: kondroitin-szulfát | Ng-CAM: neural glial cell adhesion molecule |
| DAB: diamino- benzidin | NGF: nerve growth factor |
| Dab-1: Disabled-1 | NT: neurotrophin |
| DLHP: dorsolateral hinge point | NVL: nucleus vestibularis lateralis |
| ECM: extracelluláris mátrix | NVM: nucleus vestibularis medialis |
| EGF: epithelial growth factor | PBS: phosphate-buffered saline |
| FGF: fibroblast growth factor | PCNA: proliferating cell nuclei antigen |
| GAG: glukózaminoglikán | PCR: polymerase chain reaction |
| GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz | PG: proteoglikán |
| HA: hialuronsav | PNN: perineuronal net |
| HAS: hialuronsav-szintáz | RHAMM: receptor for hyaluronan mediated motility |
| HB-GAM/PTN: heparin binding growth association molecule/pleiotrophin | Robo: roundabout |
| HH: Hamburger és Hamilton | ROI: region of interest |
| HLT: hialuronsav-lektikán-tenascin-R komplex | RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| HYAL: hialuronidáz gén | Shh: sonic hedgehog |
| Hyal: hialuronidáz enzim | TGF- β : transforming growth factor beta |
| Isl: islet | TZ: tanasionalis zona |
| LYVE: lymphatic endothelial hyaluronan receptor | VZ: ventricularis zóna |

1. Bevezetés

Az idegrendszer fejlődéséről, valamint az extracelluláris mátrix (ECM) molekuláris szerkezetéről az elmúlt években számos új adatot közöltek. A molekuláris morfológiai módszerek szelektivitásának és szenzitivitásának fokozásával lehetőség nyílt az ECM egyes komponenseinek vizsgálatára olyan szövetekben is, amelyekben ezek kis koncentrációban vannak jelen, így a központi idegrendszerben. Margolis és Margolis (1979) könyvének megjelenése – ez mérföldkő volt az idegrendszeri ECM kutatás szempontjából – óta számos olyan információ gyűlt össze, amelyek felhívják figyelmet az egyes ECM komponensek szerepének fontosságára az idegrendszer fejlődésében, regenerációban, az idegrendszeri plaszticitás kialakításában, és fenntartásában.

Ma már senki sem tartja a minden szövetben előforduló ECM-et passzív „ragasztóanyagának”. Az ECM komponensei a sejtekkel és egymással kölcsönhatásban álló komplex rendszert képeznek. Az ECM és a kromatin közti szignalizációs út magyarázza, hogy az ECM befolyásolja a benne élő sejtek génexpresszióját, fenotípusát. Nem véletlenül jelentett komoly stimulust ez az új szemlélet a sejt és fejlődésbiológiának. (Hay 1990).

Az ECM kutatás egyik „gyenge pontja” a hialuronsav kutatás volt módszertani okok miatt. Noha ez volt az első olyan GAG molekula, melynek szerkezetét biokémikusok leírták (Meyer és Palmer 1934), több fiziológiai hatását és klinikai alkalmazását is közölték (Balázs 1970), a molekula konzervatív szerkezete miatt annak megbízható *in situ* kimutatása hosszú ideig váratott magára.

Intézetünkben – ahol mind az ECM, mind a neurobiológiai kutatásoknak vannak nemzetközileg elismert eredményei – az elmúlt években indultak el vizsgálatok a központi és perifériás idegrendszerben található ECM komponensek előfordulásának, lehetséges funkcióinak feltárására. Ennek az interdiszciplináris tudományterületnek a „fehér foltjai”, különösen a hialuronsav és proteoglikán kutatások inspirálták a mi munkánkat is.

Néhány új eredményünk megértése érdekében szükségesnek éreztem az idegrendszer fejlődésének valamint az ECM alkotóinak részletesebb tárgyalását is. Az irodalmi áttekintés azon részei, amelyek nem kötődnek szorosan az eredményeinkhez, dőlt karakterrel szedve olvashatók.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A neuruláció folyamata

A velőcső kialakulása két – egymástól teljesen eltérő – módon zajlik. Az egyik a primer neuruláció, amely ectodermális eredetű. A folyamat első lépéseként a környező sejtek indukciós hatására az ectoderma középső része neuroectodermává alakul. A neuroectodermát alkotó sejtek elkülönülve az ectodermától egy időben viszonylag gyorsan lezajló folyamat révén csövévé záródnak az embrió hossz tengelyében, mely a környező mesodermába lesz beágyazva. A velőcső kialakulásának másik lehetséges útja az ún. szekunder neuruláció, mely mesodermális eredetű. Ennek során a későbbi velőcső sejtjei a környező mesenchymalis sejtekből fűződnek le az embrió hossz tengelyében. Minden gerinces fajra jellemző, hogy a velőcső cranialis része primer, míg a caudalis rész szekunder neurulációval fejlődik, mely egyesülni fog. Ezek aránya azonban fajonként változó: a madarakban például az első 28 somitapár előtti szelvény (vagyis a hátsó végtag előtti rész) primer neurulációval fejlődik. A két különböző módon fejlődő velőcső határ az emlősökben a szakrális gerincvelői szegmentum elején található.

2.1.1. Primer neuruláció

A primer neuruláció folyamata a kétéltűekben, hüllőkben madarakban és az emlősökben hasonló mechanizmusok révén valósul meg. Röviddel a velőlemez kialakulása után a lemez szélei megvastagszanak, majd felfelé türemkednek kialakítva a velősáncot. Ezzel együtt a velőlemez középső része egy U alakú barázdává formálódik, gyakorlatilag jobb és baloldalra osztva ezzel az embriót. A velőlemez szélei ezután a középvonal felé mozdulnak el, majd a két szél összeolvadása után a velőlemez velőcsövévé záródik. A velőlemez legszélső seltpopulációja összeolvadás után dorsalis helyzetbe kerül, és a ganglionlécet (crista neuralis) alakítja ki.

Ezek alapján elmondható, hogy a primer neurulációnak négy fő – térben és időben átfedést mutató – lépése van: 1., a velőlemez kialakulása, 2., a velőlemez megvastagodása, 3., a velőbarázda és velősánc kialakulása, 4., a velőlemez záródása velőcsövévé.

2.1.1.1. A velőlemez kialakulása és megvastagodása

A neuruláció folyamata az ectoderma kitüntetett részének megvastagodásával veszi kezdetét, amely lényegében az ectoderma köbös sejtjeinek hengeressé alakulását jelenti. Ezek a hengerhám sejtek, a velőlemez sejtjei mintegy kiemelkednek a környező laposabb

ectodermális sejtek közül. A folyamatot ismereteink szerint az ectoderma alatt levő mesoderma, a gerinchúr (vagy a kopoltyúbél endoderma a feji régióban) szignalizálja. (Keller és mtsai, 1992)

A csirkeembrióban ez a folyamat a keltetés első 24 órájában történik meg (Hamburger-Hamilton 6. stádium, HH6 st.) és a teljes ectoderma mintegy fele vesz részt a velőlemez kialakításában (Hamburger és Hamilton, 1992). A velőlemez növekedése fej-farok (anterior-posterior) irányban lényegesen erőteljesebb lesz az ún konvergens megnyúlás miatt, így a záródása majdan csőalakot fog eredményezni. A konvergens megnyúláshoz szükséges faktorok magában a velőlemezben vannak jelen, amit az is bizonyít, hogy az izolált velőlemezben is létrejön. A velőbarázda formálódásához azonban már szükséges a leendő bőrectoderma is (Jacobson és Moury 1995; Moury és Schoenwolf, 1995).

2.1.1.2. A velőlemez behúzódnása, a velőbarázda kialakulása

A velőlemez behúzódnásának folyamata tulajdonképpen annak zsanérszerű záródását jelenti egy kitüntetett terület körül. Ezek az ún. csuklópánt sejtek – amelyek szorosan érintkeznek a környező sejtekkel – a velőlemez középvonalában található, és a velőlemez Hensen csomó előtti részéből származnak (Catala és mtsai 1996, Schoenwolf 1991). A behúzódnás alkalmával ezek a csuklópánt sejtek (MHP: medial hinge point) a chorda dorsalishez kapcsolódnak és annak indukáló hatására laposabbá és ék alakúvá válnak. Laterálisan ettől a fordulási centrumtól kialakul egy-egy újabb csuklópánt sejtpopuláció (DLHP: dorsolateral hinge point) hasonló alakváltozással a mediális sejtekhez, azzal a különbséggel, hogy itt az indukciót a felszíni ectoderma végzi el. Ezen sejtek alakváltozása a velőlemez alakváltozását fogja eredményezni. Az alakváltozás alapja a sejtek mikrotubulusainak és mikrofilamentumainak átrendeződése. A mikrotubulusok a sejtek ellaposodásáért, míg a mikrofilamentumok a sejtek apikális végének rövidüléséért felelős. E jelenség jelátviteli folyamatait nem ismerjük teljes egészében, azonban tudjuk, hogy az MHP sejtek átalakulása sonic hedgehog (Shh) és heparán-szulfát proteoglikánokhoz kötött (Ybot-Gonzalez és mtsai 2002, Yip és mtsai 2002), míg a DLHP sejtek a BMP2-t (bone morphogenic protein) gátló noggin szignalizációs útvonalat követik (Ybot-Gonzalez és mtsai, 2002, 2007). Ezen folyamatok mellett a velőbarázda invaginációja is bekövetkezik főként a DLHP sejtek és a bőrectoderma kapcsolódása, illetve a velőbarázdtól oldalt levő ectoderma sejtek középre történő vándorlása miatt.

2.1.1.3. A velőcső kialakulása

A velőcső a velőbarázda jobb és bal oldali lemezének összeolvadásával jön létre. Néhány fajban az összeolvadásban részt nem vevő sejtek lesznek a ganglionléc sejtjei. A madárembrióban a ganglionléc sejtjei addig nem migrálnak, amíg a velőcső nem záródott. Az emlősökben azonban a ganglionléc migrációja különbséget mutat a velőcső craniális végén (a leendő agyi részen) és a leendő gerincvelő területén, amely szerint a ganglionléc sejtek már a velőcső záródása előtt is migrálnak, de csak a craniális végén (Nichols 1981; Erickson és Weston 1983). A velőcső záródása nem egyszerre történik a velőcső teljes hosszában. A HH6 stádiumú csirkeembrió velőcsővének craniális vége már teljesen záródott, amikor a caudális vég még a gastrulatio állapotában van. A csirkében a velőcső záródása a későbbi középagy területén kezdődik el, ellentétben az emlősökével, ahol a velőcső záródása egyszerre több ponton kezdődik (Golden és Chernoff 1993; Van Allen és mtsai 1993). A velőcső záródás után két végén nyitott, az elülső véget neuroporus anterior-nak, míg a hátsót neuroporus posterior-nak nevezzük. A záródás egyik feltétele a Pax3 jelenléte, amely autonóm módon hat (Mansouri és mtsai 2001). Ezen kívül a BMP, Shh és egy openbrain nevű fehérje is fontos faktoroknak bizonyultak kísérletekben (Selleck és mtsai 1998; Günther és mtsai 1994). A velőcső a záródása után elválik a felszíni ectodermától, amely a velőcső N-cadherin és N-CAM expressziója miatt következik be, és így ezek a sejtek nem tudnak tovább kapcsolódni a bőrectodermához azok E-cadherin expressziója miatt (Detrick és mtsai 1990; Bronner-Fraser és mtsai 1992).

2.1.2. Szekunder neuruláció

A szekunder neuruláció a csirkében a 28. somita szintje utáni gerincvelői szelvényekre jellemző, amely tulajdonképpen a későbbi lumbalis, sacralis és farok szegmenseit jelenti (Catala és mtsai 1995, 1996). Kialakulása a felszíni ectoderma alatt levő mezenchima sejtek összetömörödésével kezdődik, kialakítva ezzel a velőhúrt, amelyek közepén egy üreg keletkezésével alakul ki aztán a velőcső. A kétélűekben és a madarakban a blastoporus dorsalis involúciója helyett ventrális növekedésnek indul, amelynek a végét chordoneuralis hajlásnak nevezzük (Pasteels 1937) és a velőlemez valamint a chorda dorsalis leghátsó részének prekursor sejtjeit tartalmazza. A farok végén levő sejtek is a blastoporus dorsalis ajakból származnak, és ezek a sejtek a canalis neurentericust alakítják ki. Ennek a csatornának a proximális része az anus-szal fúziónál, míg a distális része canalis ependymalis-szá fejlődik (Gont és mtsai 1993). A szekunder neurulációban résztvevő molekulák közül a Tbx6.1 és a chordin érdemel említést (LeDouarin 2001). A sejt felszíni molekulák közül N-CAM-hoz

kötött formában N-acetylglukóزامint és polysziálsavat tudtak kimutatni csirke és egérembriókban (Griffith és Wiley 1989; Griffith és Wiley 1991).

2.1.3. A velőcső differenciálódása

A velőcső differenciálódása három - időben egyszerre zajló – folyamat révén valósul meg. Makroszkópos szinten a velőcső cranialis végének intenzívebb növekedése és annak befűződése jellemzik az agyhólyagok megjelenését. Szöveti szinten a differenciálódás során különböző sejtpopulációk jönnek létre, amelyek elfoglalják az egyes sejtpopulációkra jellemző eloszlásukat az agyban és a gerincvelőben. Végül meg kell említeni a sejt szintű differenciálódást, amely során a velőcsőben levő őssejtek különböző típusú idegsejteket és gliasejteket hoznak létre. Ezen folyamatok az összes gerincesben alapvetően hasonló módon zajlanak le, azonban a különböző fajok között az agy komplexitásának különböző mértéke miatt jelentős fejlettségbeli eltéréseket mutat.

2.1.3.1. Rostrocaudalis (anterior-posterior) differenciáció

A velőcső kezdetben egyenes, azonban annak elülső része jelentős változásokon megy keresztül az agyhólyagok kialakulása révén. A differenciálódás kezdetén három primer agyhólyagot tudunk megkülönböztetni. A legrostralisabban az előagy (prosencephalon) fejlődik, mögötte a középagy (mesencephalon), majd hátrébb az utóagy (rhombencephalon) található, amely a gerincvelőben folytatódik. A primer agyhólyagokon további befűzések keletkeznek a differenciálódás során, melyek közül a prosencephalon a rostralis telencephalon hemispheriumainak hólyagjaivá, illetve a caudalis diencephalon hólyaggá válik szét. A diencephalon lateralis részén még egy kisebb hólyag – a szemhólyag – is megjelenik, amely a későbbi retinát fogja adni. A mesencephalon már nem képez újabb agyhólyagokat, ürege az aqueductus cerebri megmarad a kifejlett egyedben is. A korai csirkeembrióban (HH23) a mesencephalon és a szem hólyagja a legnagyobb az összes közül mutatva azt, hogy a látórendszer és a hozzá tartozó szemmozgató agyidegek magvai (melyek a mesencephalonban található) fejlődnek ki legelőször. A rhombencephalon két másodlagos agyhólyaggá válik: az elülső metencephalonná és a caudalis myelencephalon hólyaggá. A metencephalon a későbbi pons és cerebellum telepét adja, míg a nyúltvelő a myelencephalonból fejlődik.

A rhombencephalon rostrocaudalisán a gerincvelőhöz hasonló szegmentumokból áll, melyeket rhombomereknek nevezünk. Az idegsejtek a rhombomereken belül szabadon migrálhatnak a fejlődés során, azonban a rhombomerek között nem (Guthrie és Lumdsen 1991). A rhombomereknek ezen kívül a fejlődéstani sorsa is különböző. A crista neuralis-ból

érzőganglionok fejlődnek, amelyek a rhombomerek felett helyezkednek el dorsalisán. Az agyidegi magvak első generációja a 2., 4. és a 6. (r2, r4, r6) rhombomerben található a korai csirkeembrióban (HH16) (Lumdsen és Keynes 1989). A nervus trigeminus és ganglionja az r2, a nervus facialis és a vestibulocochlearis az r4 míg a nervus glossopharyngeus az r6 szegmentumból fejlődik.

Az agyhólyagok méretbeli növekedése kezdetben drasztikus méreteket ölt, főként a csirkeembrióban, ami kb 30 szoros térfogatváltozást jelent a 3. (HH20) és 5. (HH26) embrionális napok között, míg a gerincvelőben lényegesen kisebb a térfogat növekedés. E változások elsősorban nem a velőcső rostralis felének nagyobb mértékű proliferációjával magyarázhatók, hanem a velőcső üregében levő eltérő nyomásviszonyokkal. Ez a nyomáskülönbség úgy jön létre, hogy a velőcső ürege a leendő agy-gerincvelői határon elzáródik (Schoenwolf és Desmond 1984; Desmond és Schoenwolf 1986; Desmond és Field 1992). Az elzárt terület a fejlődésnek csak későbbi periódusában nyílik ki újra.

A velőcső anterior-posterior irányú differenciálódása homeobox gének szabályozása alatt áll.

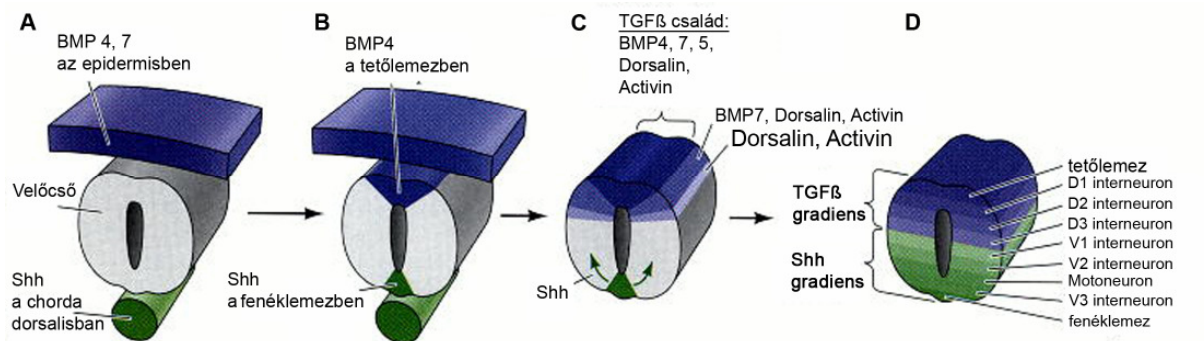
2.1.3.2. A velőcső dorso-ventrális differenciálódása

A velőcső dorso-ventrális irányban polarizált. A gerincvelőben a dorsalis rész a sensoros neuronoktól kap bemenetet, míg a ventrális gerincvelő-félben a motoneuronok találhatóak. A kettő között interneuronok találhatóak, melyek a sensoros és motoros információk feldolgozásáért felelősek. Ezen dorso-ventrális polaritás kialakulásáért a velőcső közvetlen környezetében levő szövetek a felelősek (1. ábra). A ventrális sejtek differenciálódását a chorda dorsalis, míg a dorsalis oldalon levőket pedig az epidermis által termelt paracrin módon ható faktorok irányítják. A chorda dorsalisban Shh fehérje, míg az epidermisben a TGF- β (transforming growth factor) családba tartozó fehérjék (BMP4 és 7) termelődnek, amelyek elsősorban felelősek a dorso-ventrális differenciálódásért. Mindkét esetben ezek a paracrin faktorok másodlagos szignalizációs központok kialakulását indukálják a velőcsőben. A Shh a velőcső ventrális pólusán az MHP sejtek differenciálódását segíti fenéklemez sejtekké, amelyben ugyancsak Shh kezd el termelődni. A Shh és más MHP által termelt faktorok a velőcsőben koncentráció gradienst alakítanak ki, ahol ezen faktorok a ventrális pólushoz legközelebb találhatóak a legnagyobb koncentrációban (Roelink és mtsai 1995; Briscoe és mtsai 1999).

A velőcső dorsalis részének sorsát a TGF- β szupercsaládba tartozó fehérjék közül főként a BMP 4 és 7, dorsalin és activin szabályozzák (Liem és mtsai 1995, 1997, 2000). Kezdetben az

epidermis BMP4-et és 7-et termel, amelyek a velőcsőre hatva ott egy másodlagos szignalizációs központot alakítanak ki, vagyis BMP4 termelést indukálnak a velőcső legfelső részében, a tetőlemezben. A tetőlemez által termelt BMP4 aztán további, a TGF- β szupercsaládba tartozó fehérjék kaszkádszerű termelődését indítják el a velőlemez többi sejtjeiben. A velőcsőben a TGF- β fehérjékből hasonló dorsoventrális koncentráció gradiens alakul ki, mint ahogy az a Shh esetében történik. Ez esetben azonban a legdorsalisabban levő sejtek környezetében találjuk a legnagyobb TGF- β koncentrációt és ezek a sejtek is kapják meg leghamarabb a szignált.

A paracrin faktorok koncentrációjuktól függően a velőcső sejtjeiben különböző transzkripciós faktorok termelését indukálják. Azok a sejtek, melyek a fenéklemezhez a legközelebb vannak – és ezért a legnagyobb koncentrációjú Shh illetve a legkisebb koncentrációjú TGF- β szignált kapják – Nkx6.1 és Nkx2.2 transzkripciós faktorokat termelnek és ventrális idegsejteké differenciálódnak (V3). Ezekből a sejtekből differenciálódnak majd a gerincvelőben a commissuralis premotor interneuronok is. A következő sejtcsoport sejtjei már kisebb koncentrációjú Shh szignált kapnak és motoneuronokká differenciálódnak. Ezekből a sejtektől dorsalisán a ventrális interneuronok (V1, V2) csoportjai következnek (Lee és Pfaff 2001; Muhr és mtsai 2001).



1. ábra. A velőcső dorso-ventrális specifikációja. (A) A velőcső két szignalizációs központ irányítása alatt áll: a chorda dorsalis és az ektoderma. (B) Az ektoderma és a chorda dorsalis növekedési faktorok termelését indukálják a tetőlemezben és a fenéklemez sejtjeiben, másodlagos szignalizációs központot kialakítva ezzel. (C) Ezen másodlagos szignalizációs központok növekedési faktorai koncentráció gradienst alakítanak ki dorso-ventralisan. (D) A neuroprogenitor sejtek specifikációja ezen növekedési faktorok koncentrációinak függvénye lesz (Jessell 2000. után módosítva).

A Shh jelentőségét a velőcső dorso-ventrális differenciációjában kísérlettel bizonyították. Ha a chorda dorsalis egy darabját a velőcső laterális oldalára ágyazták be, annak indukációs hatására egy másodlagos fenéklemez alakult ki a velőcső laterális oldalán. Ezekből a sejtekből indukációs hatásra két újabb motoneuron populáció alakult ki. Hasonló eredményeket kaptak

sejtkultúrában is (Echelard és mtsai 1993; Roelink és mtsai 1994). A kísérlet fordítva is eredményes volt, ugyanis idejében eltávolítva a chorda dorsalist, megelőzhető volt az MHP fenéklemez sejtekké történő differenciációja (Placzek és mtsai 1990; Yamada és mtsai 1991, 1993). A fenéklemez és a chorda dorsalis szükséges indukciós struktúra a gerincvelő és az agytörzsi motoneuronok differenciálódásához, amely azonban ezek hiányában is megtörténik, viszont annak sebessége lényegesen lassúbb ütemű lesz (Sohal és mtsai 1995; Artinger és Bronner-Fraser 1993).

2.1.4. Szövetátrendeződés a központi idegrendszerben

A központi idegrendszerben az idegsejtek lehetnek réteges elrendeződésűek, illetve idegmagokat alkothatnak. A különböző rétegben és magokban található neuronok különböző neuronális kapcsolatokkal és funkcióval bírnak. Ezek a rétegek és idegmagvak az eredeti velőcsövet alkotó egyetlen sejtréteg, a germinális neuroepitélium sejtjeinek osztódásával és azt követő migrációval jönnek létre. A germinális neuroepitélium sejtjei adják a lumen felőli felszínt, amely azonban kiterjed a velőcső külső felszínéig, tulajdonképpen egy többmagsoros hengerhámot alkotva, amelyben a sejtmagok pozíciója a sejtek sejtciklusa szerint változik (Sauer 1935). A sejtek S fázisban vannak a lumentől legtávolabb, míg a mitózisban lévők a legközelebb. Radioaktív timidin jelöléssel kimutatták, hogy egyes sejtek a mitózis után nem lépnek be az S fázisba, amely arra utalt, hogy ezek a leánysejtek differenciálódásnak indultak (Fujita 1964, 1966; Jacobson 1968). A sejtosztódás mindig vertikális irányultságú, ezért a leánysejtek minden esetben érintkezni fognak a lumennel. Egyesek a differenciálódás folyamatába lépve radialis irányba kezdik meg migrációjukat, míg a többi sejt összejt marad (Chenn és McConnell 1995; Hollyday 2001). Azt az időpontot nevezzük egy neuron vagy gliasejt születésnapjának, amikor utolsó mitózis után a differenciálódó leánysejt keletkezik. A neuronok és gliasejtek eltérő időben differenciálódnak. Általános elv az, hogy a korábban lefűződő neuronok migrálnak a lerövidebb távolságra a lumentől, így a később differenciálódó neuronoknak át kell hatolniuk a korábban differenciálódott neuronok rétegén, kialakítva ezzel a rétegzettségét a központi idegrendszerben (Letourneau 1977; Jacobson 1991).

2.1.4.1. A gerincvelő és a medulla oblongata organizációja

A lumenközeli sejtek összejt maradnak a fejlődés teljes időszakában, míg az ettől radialis irányban levő sejtek a differenciálódó sejtek. Az összejt rétegét (későbbi ependyma sejtek rétege) ventrikuláris vagy germinatív zónának, míg a differenciálódó sejtek rétegét

intermedier zónának nevezzük. Az intermedier zóna éretlen neuronokat és gliasejteket tartalmaz. A neuronok kapcsolatokat igyekeznek egymással teremteni, és axonjaikat elsősorban radiális irányba növesztik ki, létrehozva ezzel egy sejtekben szegényebb marginális vagy köpenyzónát. Az intermedier zónában találjuk tehát az érésben levő neuronokat, így ezt szürkeállománynak is nevezzük, míg a köpenyzóna alkotja a gerincvelő fehérállományát. A gerincvelő kötőszövetes külső borítása, az agyhártyák kialakulása a fejlődés azon szakaszában indul meg, amikor a gerincvelő három fő rétege már megfigyelhető (Jacobson 1991). A gerincvelőn a ventrális és a dorsalis fél kissé elkülönül egymástól, amit a gerincvelő lateralis részén futó sulcus limitans is jelez. A dorsalis fél sensoros inputokat fogad, míg a ventrális fél az effektor motoros funkciók szolgálatában áll.

2.1.4.2. A cerebellum organizációja

Az agyban is megfigyelhetiünk a gerincvelőhöz hasonló rétegzettséget. Ez a rétegzettség azonban lényegesen módosul a sejtek különböző migrációja, proliferációja és szelektív apoptózisa révén. A cerebellumban az idegi prekursor sejtek a marginális zónába migrálnak, és csoportosulva a kisagy magokat hozzák létre. Minden egyes kisagy mag funkcionális egységként működik, ún. relé állomásokat hoznak létre a cerebellum és más agyterületek között. A prekursor sejtek másik csoportja a germinatív zónából a velőcsőnek egészen a külső felszínéig vándorol és egy másodlagos germinatív központot hoz létre, melynek rétegét stratum granulosum externum-nak nevezzük. Ezek a sejtek aztán BMP hatására visszavándorolnak az intermedier zónába és szemcsesejtekké differenciálódnak (Alder és mtsai 1999). Ezen idő alatt a ventrikuláris zónából a kisagy többi neuronjai és gliasejtjei lefűződnek, többek közt a Purkinje sejtek is. A Purkinje sejtek az intermedier és a marginális zóna határán foglalják el helyüket és Shh faktor termelésükkel szabályozzák a kisagy többi sejtjeinek differenciálódását. Az Shh faktor a stratum granulosum externum sejtek proliferációját gátolja és differenciálódását segíti (Wallace 1999). Mivel a Purkinje sejtek az egyedüli projekciós neuronjai a kisagy kéregnek, így azok normális differenciálódása és migrációja a kisagy normális működésének kulcsa. Az agyban általánosan a gliasejtek segítik a neuronokat helyes pozíciójuk elérésében, mégpedig úgy, hogy az idegsejtek a radialisan helyezkedő glianyúlványokat használják migrációjuk aljzataként (Rakic 1972; Hatten 1990). A kisagyban ezeket a radier gliasejteket Bergmann gliának hívjuk (Hatten 1990; Komuro és Rakic 1992). A neuronnak a gliához történő rögzülését sejtadhéziós molekulák segítik. Egyik legfontosabb sejtadhéziós molekula az astrotactin, amely nélkül a neuron nem tud kapcsolódni a Bergmann gliához (Edmondson és mtsai 1988; Fischell és Hatten 1991).

Astrotactin hiányos (knock out) egerekben kóros Purkinje sejt fejlődés mutatható ki, és az állatok koordinációs zavarokkal rendelkeznek (Adams 2002). A különböző mutánsok azok jellemző tüneteivel jól körülírhatók. A *reelin* gén mutációját mutató knock out például a *reeler* (tántorgó) egér.

2.1.4.3. A cerebrum organizációja

A gerincvelőben megismert három zóna a nagyagy fejlődése során is módosul. A nagyagy differenciálódása két útvonalat követ: egyrészt vertikálisan a rétegek kialakításával, másrészt pedig horizontálisan, anatómiailag (szövettanilag) több, mint 40 különböző agyterületet hozva ezzel létre. A rétegzettség kialakulása a cerebellumhoz hasonló módon zajlik, vagyis a ventriculáris zónából a radier glia sejtek segítségével neuroblast sejtek migrálnak a felszín felé létrahozva a neocortex állományát. A neocortex hat rétegét lehet fejlődéstanilag elkülöníteni, amelynek kialakulása elhúzódik a gyermekkor közepéig. Minden neuronréteg a cortex-ben morfológiailag és neuronális kapcsolataiban is különbözik a többi rétegtől. Ennek megfelelően a 4. réteg neuronjai elsősorban a thalamus-tól fogadnak bemenetet, míg a 6. réteg idegsejtjei a thalamusba küldik rostjaikat. Mai ismereteink szerint az, hogy egy idegsejtnek melyik rétegben kell differenciálódnia nem genetikailag determinált, minthogy a horizontális specifikációjuk sem. Mindig a ventriculáris zónához közelebbi rétegek alakulnak ki először, vagyis a későbbi réteget alkotó sejteknek át kell haladniuk a már korábban kialakult sejtrétegeken (Rakic 1974). A neuronok rétegbeli elhelyezkedésének sorsa csak a későbbiek során dől el, amikor a legkorábbi rétegek már kialakultak. Így egy korai cortex 6. rétegéből származó neuroblast egy 2. rétegét kialakító cortexbe transzplantálva a 2. rétegbe fog migrálni, ami arra utal, hogy a rétegbeli elhelyezkedés csak az utolsó döntés eredménye lesz (McConnell és Kaznowski 1991; Frantz és McConnel 1996). Nem ismerjük a sejtek ezen késői sorsának pontos mechanizmusait, azonban a különböző sejtadhéziós molekulák expressziója az egyes rétegekben nagy jelentőséggel bír (Matsunami és Takeichi 1995).

2.1.5 Neuronok differenciációja

Az agyban és a gerincvelőben található neuronok és a gliasejtek döntő többsége (oligodendroglia sejtek, astrocyták és radier glia sejtek) is a ventriculáris zóna ependyma sejtjeiből származnak, amelyek differenciációs sorsa nagymértékben a környezetüktől függ (Rakic és Goldman 1982; Turner és Cepko 1987). A központi idegrendszerben a neuronok (és a gliasejtek) morfológiája nagyon nagymértékben változó, sőt azok dendritfája az egyed egész élete során, de főleg születés után változik. Másik fontos differenciációs lépés az idegsejtek

axonnövekedése (sprouting). Az ideg növekedése tulajdonképpen az axon végének, a növekedési kúpnak a filopodium típusú növekedése. E folyamat során a növekedési kúpon mikrotüskék (microspike) jelennek meg, amelyben microfilamentumok (actin) találhatóak a tüskék hosszirányával párhuzamosan. Az actin polymerizációját gátló cytochalazin B kezeléssel meg lehet akadályozni a mikrotüskék kialakulását (Yamada és mtsai 1971; Forscher és Smith 1988). Magában az axonban a neurofilamentumok mellett mikrotubulusok vannak, amit az is bizonyít, hogy az idegsejtek axonjai colchicin kezelésre visszahúzódnak. Ahhoz, hogy az axon növekedni tudjon a növekedési kúp mikrotüskéinek aljzatra van szüksége, amely lehet egy másik sejt, vagy sejtközötti állomány. Az axon nem fog tudni növekedni, ha a növekedési kúp nem tud ilyen módon előre haladni (Lamoureux és mtsai 1989). A mikrotüskék ezen kívül érzékelő funkciót is betöltenek, amelyek folyamatosan „informálják” a neuront a mikrokörnyezetükről (Davenport és mtsai 1993). Ez az alapja annak, hogy az axonok megtalálják a beidegzési céljukat.

Az idegsejtek morfológiai differenciálódásuk mellett neurotranszmitterük szerint is különválnak. Ez feltételezi a különböző neurotranszmitterek bioszintéziséhez szükséges enzimeket kódoló gének aktiválását. A későbbiek során az idegsejtek tovább differenciálódnak beidegzési targetjük szerint, kialakítva ezzel az idegrendszer sejtjeinek rendkívüli változatosságát.

Ennek megfelelően Goodman és Doe (1993) a neurogenézist 8, időben egymás után zajló fázisra különítette el: (1) a neuroectoderma kialakulása indukció hatására, (2) neuronok és gliasejtek lefűződése a progenitor sejtektől, (3) a sejtek differenciációja, (4) az axon növekedési kúp irányítása a beidegzési target felé, (5) synapsis kialakulása az idegsejt és targetje között, (6) az idegsejtek túlélési faktorokat kötnek receptoraik segítségével, amely meggátolja azok apoptózisát és biztosítja a további differenciálódást, (7) synapsisok kompetitív átrendeződése, (8) folyamatos synaptikus plaszticitás az egyed egész élete során. Az első két fázis az előző fejezetek során már tárgyalásra került, a további lépéseket az értekezésem eredményeinek tárgyalásakor fogok utalni, mivel a későbbi fejlődés során lezajló folyamatok vizsgálata jelenti munkám egyik alapját.

2.1.5.1. Neuronok diverzifikációja, sorstérképük kialakulása

A neuronok specifikációja hierarchikus módon zajlik. Az első döntés az, hogy egy ectodermális sejt neuronális irányba differenciálódik. A következő lépésben eldől, hogy milyen típusú neuron lesz egy adott idegsejtből. Lehetséges opciók ezen a szinten:

motoneuron, sensoros vagy sensoros inputot fogadó neuron, commissuralis neuron vagy egyéb egyik csoportba sem sorolható neuronok.

A velőcső dorsalis felének kialakulása a BMP szignál gátlásával történik meg, majd a neuron irányba való differenciálódás során döntő szerepet játszik az ún. juxtacrin módon ható Notch-Delta szignalizációs útvonal (Chitnis és mtsai 1995; Wang és mtsai 1998). Az idegsejtípusok kialakulása főként azok lefűződési helyeitől, illetve idejétől függ (lásd motoneuronok ill kortikális rétegzettség). A motoneuronok kialakulása a Shh hatás függvényében történik, mégpedig két jól elkülöníthető korai és késői fázisban (Ericson és mtsai 1996). A korai Shh hatás során a ventrolaterális határon levő sejtek ventrális helyzetű neuronokká differenciálódnak, míg a későbbi fázisban ezek a sejtek motoneuronokká differenciálódnak, ugyancsak Shh indukációs hatásra. A korai Shh válaszáért főként a chorda dorsalis, míg a későbbi válaszáért a fenéklemes szekréciója felelős. A Shh a motoneuronok differenciálódása során koncentráció függő módon különböző transzkripciós faktorok expresszióját indukálja (Ericson és mtsai 1992; Tanabe és mtsai 1998).

A következő differenciációs fázisban az idegsejtek a nekik megfelelő beidegzési specificitást vesznek fel. Ez azt jelenti egy motoneuron esetében, hogy különböző izmokat fognak beidegezni. Ez egyrészt függ a motoneuronok kialakulási helyétől, melyet antero-posterior irányban a Hox gének határoznak meg, másrészt pedig lefűződési idejüktől, amit a korábban lefűződött sejtek retinsav termelése szignalizál. A motoneuronok különböző időben kapott retinsavra különböző transzkripciós faktorok termelésével válaszolnak, melyeket a Hox génekhez hasonló Lim gének kódolnak (Sockanathan és Jessell 1998). A különböző migrációs hely és a lefűződési idő a motoneuronok három nagy csoportját alakítja ki (mediális, laterális, Terni-féle idegmagok), melyek különböznek azok cadherin expressziójukban (Landmesser 1978; Hollyday 1980; Price és mtsai 2002). Ezek a sejtcsoportok a gerincvelőben magoszlopokba rendeződnek targetjeiknek megfelelően. A thoracalis szakaszon így a laterális magoszlop sejtjeinek axonjai a vázizmokhoz (a mediális csoport az axialis izmokhoz, a laterális csoport az intercostalis izmokhoz), míg a Terni oszlop sejtjeinek axonjai a ganglion sympathicum-hoz futnak. A nyaki és a lumbalis gerincvelői szakaszokon laterális és medialis magoszlopot tudunk megkülönböztetni. A laterális oszlop a végtag izmait idegzi be oly módon, hogy a mediális magcsoport a ventrális, míg a laterális magcsoport a dorsális izmokat (Tosney és mtsai 1995). Ugyanakkor mediális magoszlop az axiális izmok beidegzéséért lesz felelős.

A neuronok target-specifikussága azok axonjainak perifériás megjelenése előtt eldől, amelyek a továbbiakban már nem változtathatók meg (Lance-Jones és Landmesser 1980). A

target specifikus motoneuronok differenciálódása LIM proteinek segítségével történik migrációjuk során (Tsushida és mtsai 1994; Sharma és mtsai 2000). Ennek megfelelően az axialis izmokat beidegző motoneuronok Lim-3, Isl-1 (islet) és Isl-2 expressziót is mutatnak, míg az intercostalis és végtagizmokat beidegző motoneuronok csupán Isl-1 és Isl-2-t expresszálnak. A preganglionaris sympathicus motoneuronok főként Isl-1 expressziót mutatnak és csak kismértékben Isl-2-t. Mindezen differenciálódási folyamatot megelőzően a motoneuron progenitor sejtek PAX6 expressziójukat követően tranziensen MNR2-t expresszálnak majd csak ezután válnak szét különböző LIM proteinek által meghatározott szubpopulációkra (Tanabe és mtsai 1998).

2.1.6. Az axonnövekedés szabályozása

Az első elméletek szerint minden kinövő axon további növekedésének irányát a legelőször kinövő axon, a pionir axon adja meg (Harrison 1910). Az elmélet szerint a pionir axonok az embrionalis élet korai szakaszában indulnak növekedésnek, amikor még egy felnőtt állatban a viszonylag távolabbi beidegzési területek is csupán néhány mm távolságra vannak. Azonban ezzel még nem lehet magyarázni azt, hogy az axonok csak a nekik megfelelő beidegzési terület irányába növekednek. Az ideg és az általa ellátott terület kialakulása a motoneuronok és a sensoros neuronok esetében is hasonló módon, egy háromlépéses folyamat eredményeképpen megy végbe (Goodman és Shatz 1993). Az első lépésben az ideg abba a régióba jut el, ahol a beidegezni kívánt területe megtalálható (útszelekció). A második lépésben, ha az ideg elérte a megfelelő régiót megtalálja azt a sejtpopulációt, melyekkel képes synapsisok alkotására (target szelekció). Ezt követően a harmadik lépésben ezen sejtpopulációban csupán néhány (sok esetben csak egy) sejt lesz az, amelyekkel az ideg tényleges synapsist létesít (cím szelekció).

Az első két lépés a neuronok synapticus aktivitásától független folyamat, azonban a harmadik lépés folyamatában az aktív neuronok kölcsönhatására van szükség az egymással átfedő beidegzési területtel rendelkező axonok finomhangolása végett. Az axonok tehát synapticus aktivitás nélkül is megtalálják a rendeltetésüknek megfelelő beidegzési területet. Ezt úgy bizonyították, hogy kaliforniai götte graftokat (amely neuronális aktivitást gátló tetrodotoxint tartalmaz) helyeztek más szalamadra embriókba, melynek eredményeképpen az állatok végtagjainak beidegzése nem szenvedett zavart, jóllehet blokkolva volt a neuronális aktivitásuk (Twitty és Johnson 1934; Twitty 1937). Hasonló eredményeket kaptak zebraadánió mutánsokban is, melyekben a neurotranszmitter receptorok működését gátolták (Westerfield

1990). Ezen eredmények alapján bizonyított, hogy az idegsejtek axonjait a környezete rányítja célja felé attraktív és repulzív faktorok segítségével.

2.1.6.1. Az axonnövekedés segítése attraktív molekulák segítségével

Az axon növekedést segítő molekulák általánosan a növekedési kúp adhézióját segítik. Ez lehet sejtadhéziós molekula egy, az axonvéghez közeli sejten, vagy extracelluláris mátrix (ECM) molekula, melyet az axont övező sejtek termelnek. Az ECM molekulák tipikus adhéziós szubsztrátot jelentenek a migráció során. Az axon növekedési kúp előnyben részesíti azokat a felszíneket, amelyekhez erősebben tudnak kötődni, mint a szomszédos gyengébb adhezív tulajdonsággal bíró area-hoz. Ezek a mikroszkópikus útvonalak irányítják az axonokat a targetjük felé való növekedésükben (Akers és mtsai 1981; Gundersen és mtsai 1987). Az első ilyen ECM molekula, melyet a retinából kinövő axonok útvonalain kimutattak a laminin volt (Cohen és mtsai 1987; Liesi és Silver 1988), majd in vitro kísérletben is bizonyítást nyert a laminin axon növekedést irányító szerepe (Letourneau és mtsai 1988).

2.1.6.2. Az axonnövekedés irányítása a növekedési kúp speciális gátlásával

A ganglion spinale sensoros sejtjei és a motoneuronok axonjai is kizárólag a sclerotom elülső részén tudnak áthatolni, a hátsón át gátolt a növekedésük (Davies és mtsai 1990). Ezen átnövő axonok növekedési kúpjaiban Eph receptor található, mely ephrin nevű fehérjére érzékeny, amely a sclerotom hátsó részében expresszálódik és gátolja a növekedési kúp migrációját (Wang és Anderson 1997; Krull és mtsai 1999). Az ephrinek mellett a membránhoz kötött semaphorin fehérjék is szerepet játszanak a növekedési kúp specifikus gátlásában. Azoknál a neuronoknál van jelentős hatása, amelyek differenciálódása során nem egyenes vonalban kell növekedniük, hanem valahol el kell fordulniuk. A semaphorin 1 hatását először rovarok végtagjaiban mutatták ki (Kolodkin és mtsai 1992, 1993), míg semaphorin 2 expressziót a drosophila thoracalis izmában (Matthes és mtsai 1995) detektálták. A semaphorin 3 vagy más néven collapsin madarakban és emlősökben található és a sensoros ganglionok centralis nyúlványait irányítja a gerincvelő belépési zónája felé (Luo és mtsai 1993). A neuronok többsége a szürkeállomány hátsó szarvában végződik az ott levő semaphorin expresszió gátló hatása miatt. A sensoros idegsejtek egy kisebb csoportja azonban nem érzékeny a gerincvelő semaphorin 3 expressziójára, így befutnak a szürkeállomány elülső szarvába, ahol neurotrophin 3 expressziót lehet kimutatni (Messersmith és mtsai 1995; Marx 1995). Az tehát, hogy a primer afferensek milyen mélyen hatolnak be a gerincvelő szürkeállományába azok semaphorin 3 érzékenységtől függ elsősorban. Az axonok

behatolásának mértékét meghatározó semaphorin 3 jelentőségét a cortex és a striatum neuronális kapcsolataiban is feltárták, amely hasonló elv alapján zajlik, mint a gerincvelőbe belépő primer afferensek esetében (Marín és mtsai 2001). A semaphorin 3 ugyanakkor lehet chemoattractáns is, mégpedig gyakran a dendritfa növekedés esetén (Polleux és mtsai 2000).

2.1.6.3. Axonnövekedést segítő molekulák

2.1.6.3.1. Netrin és netrin receptorok

A commissuralis idegsejtek ventrális migrációját segíti a gerincvelőben. A gerincvelő ventrális részében netrin-2, míg a fenéklemezben netrin-1 expressziót találunk (Serafini és mtsai 1994). A ventrálisan növekedő commissuralis axonok először netrin-2 gradienst igényelnek növekedésükhöz, majd ez teszi érzékennyé a sejteket netrin-1 gradiensre. A netrin gradiens kialakításában az ECM molekuláknak döntő szerepet tulajdonítanak. Másfelől pedig a netrin asszociációja különböző ECM molekulákkal módosíthatja azok fiziológiai hatását, melyekre a különböző idegsejtpopulációk eltérő módon reagálhatnak. Így például a retina ganglionsejtjei netrin-1 gradiens segítségével nőnek az agy megfelelő területeibe, melynek perifériáján laminin található, ami gátolja az axonok kilépését a nervus opticusból. A netrin kombinációja a lamininnal tehát gátló hatású a ganglionsejtek axonnövekedésére (Höpker és mtsai 1999). A netrinnel nagy homológiát mutató UNC fehérjék C. elegans-ban egymással kölcsönhatásban válhatnak ki axonnövekedést vagy gátlást sejtípustól függően (Leonardo és mtsai 1997; Hong és mtsai 1999). A netrin és homológjai ezen kívül önállóan is lehetnek chemorepulzív hatásúak. Tipikus példája ennek a nervus trochlearis, melynek perikarionjai ventrálisan találhatóak az axonok pedig dorsálisan lépnek ki, azért mert ventrálisan a fenéklemez által termelt netrin-1 gátolja a trochlearis axonok ventrális növekedését (Colamarino és Tessier-Lavigne 1995). A netrinek receptoraik révén hatnak az axon növekedési kúpra, melyek mutációjával egy jellemző kórkép alakul ki, a rostralis cerebellaris malformatio (Ackerman és mtsai 1997; Leonardo és mtsai 1997).

2.1.6.3.2. Slit proteinek

A slit fehérjéket Drosophila melanogasterben fedezték fel, gerincesekben három homológját ismerjük. Hatásukat gátlás útján fejtik ki, mégpedig úgy, hogy receptoruk a Roundabout (Robo) az erre érzékeny idegsejtek növekedési kúpjában expresszálódik. Drosophilában az idegsejtek axonjait gátolja a kontralateralis oldalra való átnövekedésben úgy, hogy a középvonali sejtek slit fehérjét termelnek. A commissuralis neuronok le tudják küzdeni ezt a gátlást olyan módon, hogy növekedési kúpjukban tranziens módon gátolt a Robo

expressziója, majd a középvonal kereszteződése után ismét bekapcsol a Robo gén (Brose és mtsai 1999; Kidd és mtsai 1999). A gerincesekben a slit fehérjék a nervus olfactorius kereszteződésében, a commissura anterior kialakulásában játszanak szerepet (Pini 1993; Brose és mtsai 1999; Li és mtsai 1999).

2.1.6.4. Target szelekció

A target szelekción azt a folyamatot értjük, amikor egy idegsejt növekedési kúpja eléri a rendeltetésének megfelelő szövetben azt a sejtpopulációt, amelyikkel synaptikus kapcsolatot fog alkotni. A beidegezni kívánt sejtpopuláció által termelt chemoattraktív vagy éppen repulzív fehérjék segítik az axonokat, hogy elérjék azokat. Ezeket a chemoattraktánsokat neurotrphin fehérjéknek hívjuk, ide tartoznak az ideg növekedési faktor (NGF), agy növekedési faktor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) és a neurotrophin-4/5 (NT-4/5). Ezen fehérjék jellemző tulajdonsága, hogy szűk az a koncentráció intervallum, melyen belül vonzást vagy taszítást jelentenek az idegekre (Paves és Saarma 1997). Az érző ganglionsejtek centralis nyúlványaira például az NT-3 vonzást jelent, míg a BDNF taszítást.

2.1.7. Synaptogenesis

Amikor az axon növekedési kúpja eléri a targetet hozzákapcsolódik annak sejtmembránjához, majd az axonterminális megtelik synaptikus vezikulákkal, amit a kétoldali synaptikus membránok megvastagodása követ. A neuromuscularis kapcsolatok esetében az axonterminális agrin által kötődik az izomsejt membránjához és az izomsejt membránban a szétszórva jelen levő acetilkolin receptorokat a synaptikus részbe integrálja. A synaptikus részben a laminin izotípusa megváltozik; β 2-laminin expresszálódik, ez leállítja a további axonnövekedést (Martin és mtsai 1995; Noakes és mtsai 1995). Neuron-neuron kapcsolatokban a laminin szerepét az N-cadherin végzi, amely az axon növekedési kúpban levő vezikulákból ürül a leendő synaptikus részbe (Tanaka és mtsai 2000). Egy izomrosttal mindig több axon alkot synapsist kezdetben, majd az axonok versengenek a targetért és a végén egy axon marad, a többi vissz húzódik (Purves és Lichtman 1980; Thompson és mtsai 1983; Colman és mtsai 1997). Azok a neuronok, melyek nem tudnak synapsisokat alkotni, szükségszerűen elpusztulnak apoptózissal. Ez a folyamat velejárója a normális idegrendszeri fejlődési folyamatnak. Az hogy az apoptózis milyen mértékben érint egy adott idegsejtpopulációt nagyban függ az adott idegrendszeri terület fejlettségétől, és az adott fajtól. Általános szabály, hogy minél magasabb helyet foglal el egy adott faj az evolúciós ranglétrán, illetve minél fejlettebb az adott agyterület, annál nagyobb arányú az apoptózissal elpusztuló

neuronok aránya a fejlődés során (Patterson 1992). Az idegsejtek apoptózisát az általuk beidegzett szövet szabályozza úgy, hogy ún. túlélési faktorokat termelnek az ideg számára. Azok az idegek, melyek nem kerülnek kontaktusba targetjükkel, és ezáltal nem részesülnek az általuk termelt túlélési faktorokból apoptózissal elpusztulnak. A túlélési faktorok azok a neurotrofinok, melyek a target szelekció során segítik a növekedési kúp és a beidegzésre váró szövet egymásra találását (Pearson és mtsai 1983). Ezen faktorokat érintő megbetegedések az érintett idegsejtpopuláció idő előtti elpusztulásával járnak. Így alakul ki a striatum BDNF hiányával a Huntington kór (Guillin és mtsai 2001; Zuccato és mtsai 2001), vagy a GDNF (glia növekedési faktor) hiányában a Parkinson kór (Lin és mtsai 1993).

2.2. Extracelluláris mátrix molekulák az idegrendszerben

2.2.1. A hialuronsav

A hialuronsav szerkezetének és biológiájának kutatása az 1930-as évekre nyúlik vissza, amikor Karl Meyer és munkatársa John W. Palmer (1934) szarvasmarha szemgolyójának üvegtestéből izolálta ezt az anionos karakterű, vizes oldatban átlátszó polysaccharidot. Szerkezete viszonylag egyszerű: D-glukuronsav és N-acetyl-D-glukozamin disaccharid lineáris $\beta(1-4)$ polymerje. Ez a struktúra nagyon hasonló a kitin (N-acetyl-D-glukozamin $\beta(1-4)$ polymer) felépítéséhez, ez a szerkezeti hasonlóság evolúciós szempontból a hialuronsav bioszintézisét végző – későbbiekben részletezett – glycosyltransferáz enzimek közös eredetére utal (Takeo és mtsai 2004). A hialuronsav fizikai tulajdonságait tekintve azonban nagymértékben eltér a kitintől, főként abban, hogy jelentős vízmegkötő kapacitással rendelkezik, így a hialuronsavban gazdag biológiai struktúrák egyben erősen hidratáltak is (üvegtest, köldökzsín, synovialis folyadék). A sejtek sejtadhéziós molekuláik segítségével tudnak a hialuronsavhoz kötődni, így a szövetekben szerepet játszik a sejt-sejt és a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat létesítésében (Toole 1990; Toole 2000). Az extracelluláris mátrixban található proteoglikánok és glikoproteinek egy csoportja rendelkezik hialuronsavat specifikusan kötő motívummal (link modul), melynek segítségével komplex aggregátumokat hoznak létre az extracelluláris térben. További biológiai sajátossága a hialuronsav ligandum funkciója receptorokhoz való kötődése révén.

Mindezen tulajdonságokat figyelembe véve a hialuronsav alapvetően háromféle módon lehet befolyással a sejtek életére: egyrészt vizet és ionokat köt meg, növelve ezzel az extracelluláris mátrix arányát egy szövetben, másrészt más extracelluláris molekulákat megkötve vesz részt a ECM organizációjában, harmadrészt pedig közvetlenül receptorhoz való

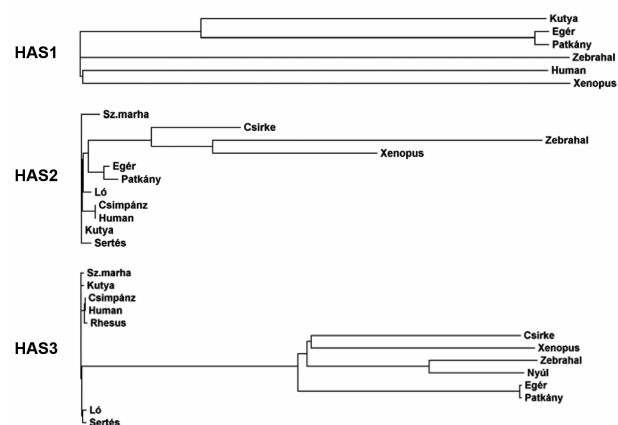
kötődése révén jelátviteli folyamatokban vehet részt. A biológiai szerepe azonban változó lehet a polymer hosszának függvényében is, amely az hialuronsav-szintáz enzimek izotípusaitól és a lebontást végző hialuronidázok aktivitásától függ.

A hialuronsav mennyiségének és minőségének szabályozását egy adott szövet megoldhatja egyrészt szintézisének, másrészt pedig a lebontást végző hialuronidáz enzimek regulációja útján.

2.2.1.1. A hialuronsav-szintázok és hialuronidázok

A hialuronsav szintéziséért felelős enzim a hialuronsav-szintáz (HAS) (Weigel és mtsai 1997.). Ezen transzglykozidázok közé sorolt enzim több tulajdonságában is egyéni sajátosságokkal rendelkezik. Az állatvilágban a HAS a gerincesekben jelenik meg először és 3 egymástól enzimatis tulajdonságaiban eltérő izoenzim tagja van (HAS1, HAS2 és HAS3). Ezen túlmenően néhány baktériumfaj (Streptococcus, Pasteurella) és vírus (Clorella virus) is rendelkezik HAS enzimmel, melyekből 1. és 2. osztálybelieket lehet megkülönböztetni. Fehérje szekvenciájuk nagymértékben eltér a gerincesekben található enzimekétől (kb 25%-os hasonlóság), így nagyon valószínű, hogy párhuzamosan alakultak ki az evolúció során egy közös ősgénből, amely a növényvilágban cellulóz-szintázzá, az ízeltlábúakban pedig kitin szintázzá alakulhatott (DeAngelis 1999.). A gerinces fajok között a HAS fehérjék nagymértékben hasonlóak, filogenetikailag közel állnak egymáshoz (2. ábra).

2. ábra. A hialuronsav szintáz enzimek filogenetikai fája protein-szekvencia hasonlóság alapján (Phylip v3.61 programmal készült: <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>). Az ábrán látható, hogy az emlősök HAS2 és HAS3 szekvenciái filogenetikailag nagyon közel állnak egymáshoz.



Ez a tény kétféle spekulációt enged, mely egyrészt azt mutathatja, hogy egy közös HAS ősgénből fejlődhettek ki – amely a gerincesekben jelenve meg elsőként – még viszonylag fiatal géneket foglal magába (Spicer és McDonald 1998.). Másrészt viszont rávilágíthat a hialuronsav fontosságára az állati szervezetben, hiszen a szintéziséért felelős enzimek nem nagyon tolerálják a mutációkat.

A HAS enzimatisági tulajdonságai is figyelmet érdemlőek. Szinte egyedülálló módon egyetlen enzimfehérje elegendő a hialuronsav szintéziséhez (Takeo és mtsai 2004.). Ez azt jelenti, hogy egy enzimfehérje képes kétféle katalitikus folyamatot is alternálva végezni: β -1,3(HA-GlcUA) transzferáz és β -1,4(HA-GlcNAc) transzferáz. A HAS sejtben való lokalizációját tekintve transzmembrán enzim, 6 transzmembrán és 2 membránhoz kötött doménnel rendelkezik. Az enzim a citoplazmában szintetizálja a hialuronsav láncot, melynek növekedése során át kell juttatni a hidrofób membránon. Azonban a 6 transzmembrán domén önmagában nem elég ahhoz, hogy csatornát formáljon, így a funkcionális HAS enzimek kardiolipin molekulák segítségével tudnak csatornát alkotni. A HAS ezen kívül rendelkezik hialuronsav kötő doménnel is, amely a saját maga által szintetizált molekulához kötődik, így maga az enzim sejtadhéziós molekula szerepét is betölti.

A HAS aktivitását befolyásoló faktorok közül eddig csupán néhányat ismerünk. A sejtdenzitás, és ezzel összefüggésben a proliferáció egy adott szövetben nagymértékben módosítja a HAS aktivitását. Fibroblaszt kultúrákban alacsony sejtdenzitásnál, amikor a sejtproliferáció és sejtmotilitás nagymértékű nagy HAS aktivitást és hialuronsav akkumulációt lehet regisztrálni, míg nagy sejtsűrűség esetén ennek az ellenkezője tapasztalható (Mutoka és mtsai 1987; Itano és mtsai 2002). A citokinek közül az interleukin 1β , a növekedési faktorok közül a TGF β családba tartozó fehérjék és a PDGF is fokozza a HAS aktivitását protein kináz C β útján, amely azonban nagymértékben független a HAS *de novo* szintézisétől (Heldin és mtsai 1992; Anggiansah és mtsai 2003; Wang és mtsai 2005). A HAS egyik gátlószere a 4-methylumbelliferon (Kakizaki és mtsai 2004).

A központi idegrendszerben az eddig vizsgált gerincesekben mind a HAS1, HAS2 és HAS3 enzim megtalálható (NCBI UniGene EST adatbázisából). A hialuronsav eredete az idegrendszerben nem ismert, egyes adatok szerint gliasejtek (Asher és Bignami 1991), mások szerint pedig idegsejtek termelik (Carulli és mtsai 2006) és a funkciójára is csak elméletek léteznek. Egyik elmélet szerint szerepe van az idegsejtek körüli más ECM molekulák kötése általi organizációjában (Ruoslahti 1996). Másrészt szerepét kimutatták CD44 receptor mediált jelátviteli folyamatokban az axon sprouting-ban (Bausch 2006).

2.2.1.2. Hialuronsav receptorok

A CD44 a legismertebb HA receptor. Transzmembrán fehérje, amely emberben 10 exonból áll, de alternatív splicinggal potenciálisan további 11 exont tartalmazhat. A CD44 molekula regulációja elsősorban ezen alternatív exonok meglétének szabályozása révén valósulhat meg. Sejtes lokalizációja szerint membránhoz kötött, a molekula nagyobb része az

extracelluláris domén, amely az alternatív exonokat is tartalmazhatja, míg a kisebbik része a citoplazmába nyúlik be. A citoplazmatikus doménje a citoskeletonhoz (F-aktinhoz) tud kötődni, ún. ERM fehérjék segítségével. Az extracelluláris domén tartalmazza a hialuronsav kötő ún. link-modult (Arg41, Arg78 és Tyr42, Tyr79) (Bajorath és mtsai 1998). A CD44 a hialuronsavon kívül más ECM molekulákat (osteopontin, fibronektin, kollagén I és IV) is képes megkötni, igazi multiligandumos receptor (Carter és Wayner 1988; Jalkanen és Kalkanen 1992; Weber és mtsai 1996). A hialuronsavat mindegyik isoforma képes kötni, de affinitása változó az izoformák között. A fibronektint azonban csak azok az izoformák tudják kötni, melyek tartalmazzák a kondroitin-szulfát kötőhellyel bíró v8-v11 exonokat (Tanabe és Saya 1994; Yu és Toole 1996). Ezen kívül ko-receptorként is funkcionálhat, ahol TGF β , ErbB4, c-Met és más receptorokhoz kötődhet azok aktivitását regulálva ezzel (Bourguignon és mtsai 1997, 2002; Orian-Rousseau és mtsai 2002; Yu és mtsai 2002; Ito és mtsai 2004a, b). Kapcsolódva mátrix-metalloproteinázokkal és hialuronidáz-2-vel szerepet játszik az ECM molekulák lebontásában is (Culty és mtsai 1992; Yu és mtsai 1999, 2002; Mori és mtsai 2002). A CD44 sokoldalúsága az idegrendszerben is megmutatkozik. Az agy idegsejtjeiben a v4, v5 és v10 izoformát sikerült kimutatni, míg a gliasejtek közül az astrocytáknak, a Bergmann gliában és a Schwann-sejtekben mutat expressziót a standard isoforma (Kaaijk és mtsai 1997). Egyik ismert schwannoma (2. típusú neurofibromatózis) kialakulása CD44 által mediált folyamat defektusából adódik, azt sugallva, hogy a CD44-hialuronsav kötése a Schwann sejtek proliferációját gátolja, differenciációját segíti (Morrison és mtsai 2001). A fejlődő idegrendszerben az astrocyták egyik korai sejtmarkere a CD44, szerepét nem ismerjük (Alfei és mtsai 1999), míg ismeretes, hogy az egémbriók chiasma opticumában a retinából benövő axonok irányításában van jelentős szerepük (Lin és Chan 2003). Az ideg regenerációban betöltött szerepét nem ismerjük, azonban axon-sérült motoneuronokban kimutatták a CD44 jelenlétét (Jones és mtsai 2000).

A hialuronsav receptorok egy másik csoportját képezi a csak mintegy tíz éve ismert RHAMM (receptor for hyaluronic acid mediated motility). Nem rendelkezik a klasszikus link-modullal, helyette egy BX₇B szekvencia jelenti a hialuronsav kötő részét a molekulának. A B lizin vagy arginin lehet, míg a X bármely nem savas oldalláncot tartalmazó aminosav. A RHAMM egy sejt felszíni és intracelluláris receptor, mely aktiválja az erk1/Met1 komplexet mitózist segítve ezzel (Hall és mtsai 1995; Zhang és mtsai 1998; Crainie és mtsai 1999). Az emberi RHAMM gén 15 exonból áll, melyből az 5. alternatív hasítással kivágódhat, ekkor beszélünk v5 vagy b izoformáról. A v5 isoforma akkor jelenik meg, ha sejteket izolálunk illetve szövetsérülés utáni állapotokban vagy akkor, ha ún. small-GTPáz-ok (ras) aktiválódnak,

melyek a sejtmigrációban töltenek be fontos szerepet (Wang és mtsai 1996; Assmann és mtsai 1998). A RHAMM a központi idegrendszerben is megtalálható, elsősorban oligodendroglóban és parvalbumint tartalmazó neuronokban fordul elő (Lynn és mtsai 2001). A fentiek alapján arra lehet következtetni, hogy a RHAMM és fő ligandja, a HA fontos szerepet játszik a központi idegrendszeri sejt-jelátvitelben és citoszeletális regulációban.

A RHAMM és CD44 mellett ismertek egyéb hialuronsavat kötő receptorok is. Ilyen a LYVE-1 (lymphatic endothelial hyaluronan receptor), mely a fő receptor a nyirokszervekben, de tulajdonképpen minden ér endothélben expresszálódik. A szerepéről keveset tudunk, feltételezhetően a hialuronsav transzcitózissal történő szekréciójában vesz részt (Prevo és mtsai 2001; Mandriota és mtsai 2001).

2.2.1.3. A hialuronsav lebontása, hialuronidázok

A hialuronidáz gének két csoportba rendeződnek kromoszóma lokalizációjuk és funkciójuk alapján. Összesen 6 hialuronidáz gént ismerünk a gerincesekben (HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, PHYAL1, SPAM1). Ezek közül a HYAL4 egy pszeudogén, nincs terméke. A PHYAL1 és SPAM1 a testicularis hialuronidázok génje, nem ismert más előfordulási helyük. A sejtek körüli hialuronsav lebontásáért a Hyal2 és 1 közösen felelősek (Csoka és mtsai 2001), mégpedig úgy, hogy a sejtek membránjához kötött Hyal2 enzim CD44 receptorral komplexet alkotva az extracelluláris térben levő CD44 által kötött hialuronsavat hasítja, majd az endocitózissal bekerül a citoplazmába. Az endoszómák hialuronsav fragmentjei lizoszómákhoz kapcsolódva az ott levő Hyal1 enzim segítségével bontódnak le. A hialuronidáz enzimek működésüket tekintve tehát nagyon hasonlítanak a mátrix metalloproteinázokhoz.

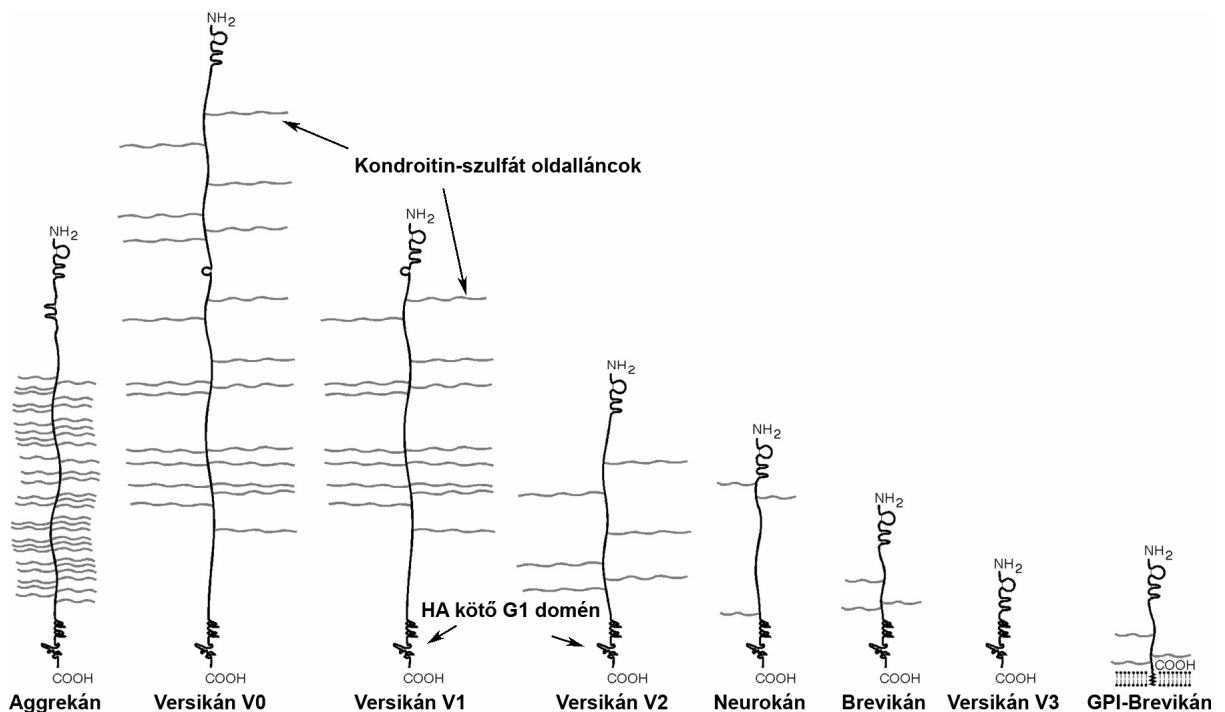
2.2.2. Proteoglikánok

A proteoglikánok glikozilált fehérjék, melyekhez kovalens kötéssel glukózaminoglikán (GAG) molekulák kötődnek. A molekula fehérje komponensét központi fehérjének hívjuk, mely tartalmazhatja a hialuronsav kötő link modult. A hialuronsavat kötő proteoglikánokat lektikánoknak nevezzük. A GAG oldalláncok azok, melyek döntően befolyásolják a proteoglikánok fiziko-kémiai tulajdonságait, ezáltal biológiai szerepüket. A GAG molekulák szulfatált polyszaccharidok, melyek diszaccharid egységekből épülnek fel. A diszaccharid egyik építőeleme glukuronsav vagy galacturonsav, míg a másik eleme egy hexózamin. A kondroitin szulfát szulfatált glükuronsav/induronsav-N-acetil-galaktózamin polymerből áll. A heparán-szulfát ehhez nagyon hasonló szerkezetű, annyi különbséggel, hogy az N-acetil-

galaktóزامint N-acetil-glükózamin helyettesíti. A proteoglikánok GAG oldalláncainak megfelelően erősen szulfatáltak, amely anionos karaktert kölcsönöz a molekulának.

2.2.2.1. A lektikánok

A lektikánok kondroitin-szulfát proteoglikánok, melyek hialuronsavhoz tudnak kötődni, valamint más ECM molekulákhoz, köztük tenascin-R-hez. A családba 4 PG tartozik: aggregkán, versikán, neurokán és brevikán (3. ábra). Elsőként az aggregkánt izolálták porcszövetből (Doege és mtsai 1987), majd a versikánt fibroblast tenyészeből (Zimmermann és mtsai 1989), melyekről ma már tudjuk, hogy a központi idegrendszerben is előfordulnak. Később az idegrendszerben előforduló neurokánt és brevikánt írták le (Rauch és mtsai 1992; Yamada és mtsai 1994).



3. ábra. A lektikánok struktúra-modellje (Bandtlow és Zimmermann 2000. után módosítva). A lektikánok kondroitin-szulfát oldalláncai mennyisége változóak.

A lektikánok központi fehérjéje („core protein”) minden esetben tartalmaz 2 globuláris domént, egy N-terminális (G1) és egy C terminális (G3) domént, a centrális, szénhidrát kötő centrális domén mellett. Ezek a proteoglikánok a G1 domén segítségével kapcsolódnak a hialuronsavhoz, mivel itt találunk 2 link modult az immunoglobulin-szerű hurok mellett. Az aggregkán molekulában a G1 domén közelében egy újabb globuláris domént találunk, mely ugyancsak 2 link modult tartalmaz Ig-szerű hurok nélkül. A centrális domén mutatja a legnagyobb változatosságot a lektikánok között, hosszukra és glykoziláltságukra nézve. A

versikán tartalmazza a leghosszabb (mintegy 1700 aminosav), míg a brevikán a legrövidebb (300 aminosav) centralis domént. A centrális domén tartalmazza az összes lehetséges glukózaminoglikán kötőhelyeket, amely gyakorlatilag a szerin-glicin dipeptidek számát jelenti a központi fehérjében. Az aggregán képes a legtöbb (kb. 120) oldalláncot kötni, míg a versikán kb. 20 és a neurokán kb. 7, addig a brevikán csupán 3 kötőhellyel rendelkezik. Az aggregán és versikán keratán szulfát kötőhellyel rendelkező szubdoménnel is rendelkezik a G2 domén közelében (Antonsson és mtsai 1989), mely domén egyébiránt a rágcsálókban hiányzik. A G3 domén három funkcionálisan fontos régiót tartalmaz: egyrészt egy (brevikán) vagy két kópia (neurokán, versikán) EGF-szerű, másrészt CRP-szerű (complement regulatory protein) szekvenciákat, harmadrészt pedig C-típusú lektin domént. Ezen G3 domén egyik ligandja a tenascin-R, mely fontos szerepet tölt be a lektikánok térbeli orientációjában (Faissner 1997; Schachner és mtsai 1994). A lektikánok közül azonban nem mindegyik képes funkcionálisan komplexet alkotni a tenascin-R-rel. Erre leginkább a brevikán képes, míg a neurokán kevésbé (Aspberg és mtsai 1997). Így nem meglepő az sem, hogy a tenascin-R és a brevikán gyakran kolokalizációt mutat az agy különböző területeiben (Hagihara és mtsai 1999). A C-típusú lektin domén egyszerű szénhidrátokat és GAG-okat köt (Saleque és mtsai 1993; Halberg és mtsai 1988; Aspberg és mtsai 1997). Ezekon kívül a C-típusú lektin doménhez glykolipidek is kötődhetnek, melyek segítségével a lektikánok a sejt membránhoz lehetnek mintegy kihorgonyozva (Miura és mtsai 1999). A neurokán G3 doménja főként tenascin-C-vel tud kapcsolódni, hasonló módon a brevikán-tenascin-R kapcsolathoz (Gurmet és mtsai 1994; Milev és mtsai 1997). A tenascin-C mellett a neurokán képes kötődni az idegrendszerben előforduló következő sejtadhéziós molekulákhoz: N-CAM, Ng-CAM/L1, Nr-CAM, contactin, HB-GAM, amphoterin (Gurmet és mtsai 1993; Friedlander és mtsai 1994; Milev és mtsai 1998).

2.2.2.1.1. A lektikánok megoszlása különböző szövetekben

A lektikánok szöveti eloszlása jellemző mintázatot mutat minden egyes proteoglikánra nézve. Az aggregán legnagyobb mennyiségben a porcszövetben található, de megtalálható más kötőszövetben is, csakúgy mint az idegszövetben (Schwartz és mtsai 1996). A versikán a legáltalánosabban előforduló lektikán a szövetekben, így az idegszövetben is (Bignami és mtsai 1993; Braunewell és mtsai 1995). Szövettanilag kimutatható mennyiségű brevikánt és neurokánt eddig csak az idegrendszerben találtak (Yamada és mtsai 1994; Seidenbecher és mtsai 1995; Jaworski és mtsai; 1995, 1996), azonban az NCBI UniGene EST adatbázisa szerint más szövetekben is találunk némi expressziót. Az idegrendszer fejlődése során is

változatos expressziós mintázattal rendelkeznek a lektikánok (Milev és mtsai 1998). Általánosan elmondható, hogy a patkány agy fejlődése során az embriótól a kifejlett korig folyamatosan növekszik mind a lektikánok mennyisége, mind pedig a PG pozitív területek nagysága. A versikánál kivétel az, hogy különböző alternatív hasítással keletkezett variánsait ismerjük (Schmalfeldt és mtsai 1998; Yamada és mtsai 1997).

2.2.2.1.2. A lektikánok szerepe a fejlődő idegrendszerben

Funkcióját tekintve az eddigi tanulmányok a lektikánok barrier szerepét igazolják a sejt migrációban, és az axon növekedésében (Engel és mtsai 1996; Perris és mtsai 1991; Oakley és Tosney 1991; Brittis és mtsai 1992). Nagyon jól példázza az axon növekedésében betöltött szerepét az, hogy ha kondroitináz enzimmel elbontották a lektikánokat retina organoid kultúrában, azok axonjai random irányban történő növekedést mutattak (Brittis és mtsai 1992). Az *in vitro* vizsgálatok eddig mindegyik lektikán esetében úgy találták, hogy gátolja az axon növekedését (Friedlander és mtsai 1994; Braunewell és mtsai 1995; Yamada és mtsai 1997; Snow és mtsai 1990, 1991), azonban a gátlás pontos mechanizmusát nem ismerjük. Az utóbbi vizsgálatok eredményeképpen egyre inkább terjed az a feltételezés, hogy a lektikánok és más kondroitin-szulfát proteoglikánok központi fehérjéje alapvetően befolyásolja a neuronok nyúlványainak növekedésére gyakorolt hatását. Az aggregátum a crista neuralis sejtek migrációját gátolja *in vitro*, amely tulajdonságot főleg a G1 domén hialuronsav kötő helye hordozza (Snow és mtsai 1990). Ezen részleteiben nem ismert folyamatokról kialakult képet meglehetősen módosítja a lektikánok alternatív hasítással keletkező izoformáinak vizsgálataiból kapott eredmények. Újabb adatok szerint a kondroitin-szulfát oldalláncot kötő központi doménjének alternatív hasítással történő elvesztése (ezek a nem proteoglikán izoformák) teljesen megváltoztatja a molekula viselkedését. Ilyen a versikán V3 izoformája valamint a brevikán újabban leírt variánsa. Ezen nem-proteoglikánok ellentétes hatással bírnak, vagyis az axonok növekedését facilitálják (Zako és mtsai 1995). Ezek az izoformák elsősorban a G3 doménhez kötött sejtmembrán glykolipidek által fejtik ki hatásukat (Miura és mtsai 1999).

2.2.2.1.3. Lektikánok a differenciált idegszövetben, a perineuronális háló

A lektikánok mennyisége a differenciált idegszövetben nagyobb, mint embrionalis korban. Ismert, hogy az N és C terminális (G1 és G3) doménok segítségével 2 másik molekula között létesít közvetett kapcsolatot (ún. linker funkció). Az idegrendszerre jellemző ECM sok tekintetben eltér más szövetekétől. Egyrészt a nagy sejtdenzitás miatt, kicsi az extracelluláris

tér aránya, másrészt összetételét tekintve lényegesen eltér a többi szövetétől. Ennek megfelelően az idegrendszerben nem vagy csak néhány helyen találunk olyan klasszikus ECM alkotókat, mint a kollagének és a fibronectin (Sanes 1989; Rutka és mtsai 1988; Carbonetto 1984). Ezzel szemben a proteoglikánok nagy mennyiségben jelen vannak az idegrendszerben (Margolis és Margolis 1993). Ezen molekulák a glia és neuronok közötti intercelluláris térben találhatóak, melyet perineuronális hálónak (PNN) nevezünk (Celio és Blümcke 1994; Celio és mtsai 1998). Ennek alapján a PNN alapösszetétele a hialuronsav-lektikán-tenascin-R komplex (HLT). A PNN-ben jelen levő lektikánok mennyiségével a HLT modell szerint leírható a PNN kompaktságának változása (ábra). Minél kompaktabb a PNN annál nagyobb fizikai barriert jelent a synaptogenesis számára, egyben a már meglévő synapsisok rögzítésére szolgálhat az elmélet szerint (Celio és Blümcke 1994).

2.2.2.2. A phosphacan

A phosphacan nem lektikán típusú kondroitin-szulfát proteoglikán, mely jellemzően előfordul az idegszövetben. Szerkezetét tekintve mintegy 500 kDa mértű PG, mely alternatív hasítással keletkezett variánsai függvényében rendelkezhet 4 (3F8) vagy kevesebb kondroitin vagy keratán szulfát oldallánccal. A phosphacan protein-tirozin-foszfataz doménal rendelkezik, mely enzimatiságokkal bír és alternatív hasítással jön létre (Maurel és mtsai 1994; Sakurai és mtsai 1996). A molekula N-terminális végén karbo-anhidráz szerű, valamint III típusú fibronectin domének találhatóak. A phosphacan az idegrendszerben neuronok sejtadhéziós molekuláihoz kötődve található meg (Maurel és mtsai 1994; Maeda és mtsai 1995; Garwood és mtsai 1999). Nagy affinitással kötődik Ng-CAM-hoz és N-CAM-hoz, míg lamininhoz, fibronectinhez viszont kevésbé a kollagénekhez. A tirozin-foszfataz ligandját az idegszövetben nem ismerjük pontosan, valószínűleg a tenascin és sejtadhéziós molekulák lehetnek. A phosphacan a fejlődő idegrendszerben eltér a lektikánoktól, vagyis nem barrier funkcióval, hanem az axon növekedését segítő funkcióval bír (Faissiner és mtsai 2000; Garwood és mtsai 1999). Ez az axon növekedését segítő funkció a phosphacan karbo-anhidráz doménje és a contactin, illetve más Ig-szuperfamilia tagjaihoz tartozó adhéziós molekulák kölcsönhatása révén valósul meg (Sakurai és mtsai 1997; Peles és mtsai 1995).

2.2.2.3. Heparán-szulfát proteoglikánok

2.2.2.3.1. Szindekánok és glypikánok

A szindekánok transzmembrán heparán-szulfát proteoglikánok, mely csoport 4 tagot számlál (szindekán 1, 2, 3 és 4). Mind a 4 szindekán a kis molekulatömegű PG-k közé tartozik,

mivel tömegük nem éri el az 50 kDa-t. Az idegrendszerben a heparánszulfát PG-k a primer neurulációhoz szükségesek a mediális csuklópánt sejtek behúzódásához (Yip és mtsai 2002). A szindekán-1 slit/robo útvonal szerint bizonyos neuronok axon növekedését irányítja (Rhiner és mtsai 2005). A szindekán 2 jelentős szereppel bír az idegrendszerben, mivel a dendrittüskék kialakulásához szükséges (Ethell és Yamaguchi 1999), mely az ephrin receptoron keresztüli szignalizációs útvonalon hat (Ethell és mtsai 2001). A szindekán-3 az idegrendszerben a legnagyobb mennyiségben előforduló szindekán. A növekedő axonokban éppúgy jelen van, mint a differenciált idegsejtekben (Carey 1996; Rauvala és mtsai 2000; Kaksonen és mtsai 2002). A szindekán-4 PG-t eddig proliferáló sejtek körül tudták kimutatni a fejlődő idegrendszerben, szerepét azonban nem ismerjük pontosan (Ford-Perriss és mtsai 2003).

A glipikánok a szindekánokhoz hasonló transzmembrán proteoglikánok, melyek 5 tagot számlálnak. Molekulatömegük 50 kDa körül mozog, 14 lehetséges heparán-szulfát kötőhellyel rendelkeznek. Ezen kívül a C-terminális glykozilfoszfatidilinozitol horgonyt tartalmaz. A fejlődő idegrendszerben a glipikánok jellemzően a sejtek apikális felszínén expresszálódnak sejt és életkor specifikus módon, és többnyire FGF által közvetített jelátviteli utakat regulálják (Luxardi és mtsai 2007).

2.2.2.3.2. Agrin

Az agrin egy nagy, kb. 200 kDa tömegű proteoglikán, melyet legelőször a neuromuszkuláris kapcsolatok kialakulásánál írtak le (Cole és Halfter 1996). A fehérje szerkezetére jellemző a laminin G domén, Ca kötő domén, laminin típusú EGF szerű domén, follistatin szerű domén és az N terminális agrin domén. Funkciója szerint az izom-ideg synapsisok kialakulásakor expresszálják az idegsejtek, hogy a postsynaptikus acetilkolin és más receptorokat aggregálják a synapsis kialakulását segítve ezzel (Campanelli és mtsai 1991). Az agrin az izomsejtek membránjában levő izom specifikus kináz (MuSK) receptoron keresztül fejt ki hatását (Glass és mtsai 1996), amely a citoskeletális fehérjék regulációja útján vesz részt az acetilkolin receptorok reorganizációjában (Wang és mtsai 2003). Nem teljesen ismerjük az agrin funkcióját a kifejlett idegszövetben, azt azonban tudjuk, hogy az agrin más szövetekben, mint az idegszövet is jelentős expressziót mutat (NCBI UniGene EST alapján), így például a vese glomerulusok membrana basalisában is (Groffen és mtsai 1998). Ezen kívül leírták szerepét T sejtek aktivációjában, mint immunológiai synaptikus molekula (Khan és mtsai 2001) Feltételezhetően a sejt-ECM kapcsolat kölcsönhatásának szabályozásában lehet szerepe lamininnel való kötődése révén.

2.2.3. Glikoproteinek

2.2.3.1. Laminin

A laminin az idegrendszerben nagy jelentőséggel bír, főként annak fejlődése során. Ahogyan arról az előző fejezetben is szó esett, az axon növekedéséhez szükséges faktor. Ezen kívül sokrétű biológiai funkciót tulajdonítanak neki, így szerepet játszik a sejtadhézióban és migrációban, a differenciációban és a tumor metasztázisban is (Suzuki és mtsai 2005). A laminin fehérje szerkezeti heterotrimer, 3 egymástól különböző láncból tevődik össze: alfa, béta és gamma lánc. Így egy 3 rövid és 3 hosszú karral rendelkező komplexet alkot. A laminin láncok különböző gének által kódoltak és multidoménnal rendelkeznek. A laminin láncoknak több izoformája ismert. Különböző alfa, béta és gamma láncok izoformáinak kombinációi igen variabilisek heterotrimereket alkothatnak. Elnevezésük arab számokkal történik felfedezésük sorrendjében (pl.: $\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$ heterotrimer a laminin1). A biológiai funkciójuk a különböző laminin izoformáknak kevésbé ismert, bár a különböző megoszlási mintázatuk más más funkcióra utal. Ez főként a $\beta 1$ láncsal rendelkező laminin izoformákra igaz. A $\beta 1$ lánc 7 strukturális doménnal rendelkezik. Főként azokban a szövetekben fordul elő, melyekben membrana basalis található. A sejtadhézióban van fontos szerepe (Mecham 1991).

2.2.3.1. Fibronektin

A fibronektin egy nagy molekulatömegű glikoprotein (kb 250 kDa), mely körülbelül 5% szénhidrátot tartalmaz. A szövetekben multimer formában található, mely integrinek segítségével a sejtek felszínéhez, valamint egyéb ECM (kollagén, fibrin, heparán-szulfát) alkotóhoz tud kötődni, regulálva ezzel a sejt-ECM és ECM-ECM kapcsolatokat. Alternatív hasítással keletkezett izoformáiból potenciálisan 20 lehet. A fibronektin a központi idegrendszerben elsősorban olyan helyeken található meg, ahol intenzív axon növekedés van. In vitro vizsgálatok alapján elsősorban az idegsejtek adhesióját és az axonok növekedését serkenti (Lander 1987). A fibronektint az astrocyták expresszálják felnőtt korban, illetve átmenetileg a fejlődés során is (Stewart és Pearlman 1987). A fibronektin fontos szereppel bír a perifériás idegek regenerációjában.

2.2.3.2. Tenascin

A tenascinok multimer formában előforduló glikoproteinek. Méretük 150-250 kDa körül mozog. A molekulacsaládot 5 tenascin képviseli: C, R, W, X és Y. Az idegrendszeri

előfordulásukat tekintve a tenascin-C, R és Y bírnak jelentőséggel (Erickson 1993). Szerkezetükre jellemző, hogy több domént is tartalmaznak (EGF-szerű, fibronectin, fibrinogén domének). A tenascinok lektikánokhoz és integrinekhez tudnak kötődni, így fontos szerepet játszanak a sejtadhézióban. Idegsérülést követően emelkedik a tenascin-C szintje, ezért azt feltételezik, hogy a tenascinoknak fontos szerepe van prekursor sejtek migrációjában, az axonok növekedésében illetve a guidance-ban (Joester és Faissner 2001).

2.2.3.3. Reelin

A reelin egy nagyméretű, 388 kDa tömegű ECM alkotó, mely dominánsan az idegrendszerben fordul elő (D’Arcangelo és mtsai 1995). A reelin domén segítségével a molekula lipoprotein receptorokat (Vldlr és Apoer 2) köt, és a Disabled-1 (Dab-1) intracelluláris szabályzó fehérje foszforilációját eredményezve fontos szerepet játszik a központi idegrendszer sejtrétegeinek kialakulásában (Trommsdorf és mtsai 1999; Magdelano és mtsai 2002). A telencephalonban a Cajal-Retzius sejtek és a marginalis zónában levő más sejtek termelik, míg a kisagyban a szemcsesejtekre jellemző, ahogyan arról már a kisagy fejlődése kapcsán esett szó. A gerincvelőben eddig a hátsószarvi neuronpopulációk (Akopians és mtsai 2008) és a vegetatív motoneuronok migrációjában találták úgy (Yip és mtsai 2000), hogy a reelinnek fontos szerepe van. Genetikailag 2 allélját mutatták ki, a vad típust és a lissencephalia-t okozót (Hong és mtsai 2000).

3. Célkitűzések

Az ECM-sejt kapcsolatáról a központi idegrendszerben még viszonylag keveset tudunk. Az idegsejtek körül levő makromolekuláknak szerepe van az idegrendszer kialakulásában és regenerációjában. Munkánkban hangsúlyt helyeztünk a HA, mint egyik fő mátrixalkotó változásának nyomon követésére két különböző kísérleti modellben. Első kísérletsorozatunkban a HA és a HA-val közvetlenül vagy közvetve kapcsolódó proteoglikánok expressziós mintázatát figyeltük meg a gerincvelő embrionális fejlődése során azért, hogy többet tudjunk meg ezen molekulák lehetséges szerepéről a neuronális differenciáció során. Ezzel fontos adatokhoz juthatunk az idegi regeneráció alapmechanizmusainak megértéséhez. Másik kísérletsorozatunkban az idegregeneráció során az ECM struktúrájában bekövetkező változásokat követtük nyomon béka állatmodellen, mely újabb fontos adatokkal szolgálhat az idegregeneráció alapmechanizmusának megértéséhez.

Mindezen információk figyelembevételével munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. A HA eloszlási mintázat megfigyelése fejlődő csirkeembriók gerincvelő telepeiben hisztokémiai reakcióval különböző neuronális és differenciációs markerek mellett.
2. Ugyanezen életkorú csirkeembriók gerincvelő telepeiben a HA szintéziséért felelős hialuronsav-szintáz enzimek expressziós mintázatának és termékeinek detektálása biokémiai módszerekkel.
3. A HA kötődő kondroitin-szulfát proteoglikánok és a phosphacan expressziójának nyomon követése a hialuronsav változásának függvényében az embrionális gerincvelőben immunohisztokémiai és biokémiai módszerek segítségével.
4. *In vivo* kísérleti modellben a HA eloszlás változásának nyomon követése a vestibularis ideg átvágását követő regeneráció során békában hisztokémiai vizsgálatokkal kombinált optikai denzitometriai mérések segítségével.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Állatkísérletek, állatkísérletekhez szükséges engedélyek

A gerincvelő fejlődése során változó sejtközötti állomány tanulmányozását csirkeembriókon végeztük. A csirkeembriót gyakorta használják fejlődéstani kutatásokra, különösen a fejlődő idegrendszer vizsgálatára alkalmas. Ennek oka részben annak könnyű beszerezhetősége, illetve az, hogy jól ismerjük az embrió fejlődése során bekövetkező főbb változásokat, mivel a fürj embrióval kimérákat lehet vele létrehozni. Ezzel a módszerrel már a molekuláris biológiai technikák (pl.: knock in és out) széles körű elterjedése előtt felderítették a csirkeembrió őssejtjei sorstérképének alakulását. A hisztokémiai és biokémiai vizsgálatokhoz különböző fejlettségi stádiumban levő csirkeembriókat gyűjtöttünk, melyeket a Hamburger és Hamilton (HH) által közölt (1992) tanulmányuk szerint határoztunk meg. Az általunk gyűjtött legfiatalabb embrió HH8 volt, amely a keltetés 20. órájában tart és jellemző rá a velőlemez velőcsővé való záródása előtti állapot. A legidősebb gyűjtött embrió a keltetés 8. napjára jellemző HH39 stádium volt.

Az idegrendszer regenerációjának nyomon követését a sejtközötti állomány változásának függvényében kecskebékán (*Rana esculenta*) végeztük. A kísérleti modellben a nervus vestibulocochlearis ideg primer afferensei által beidegzett agytörzsi vestibularis magokban vizsgáltuk az extracelluláris mátrix összetételének és struktúrájának változását annak regenerációja során. A békát ezekben a kísérletekben optimális választásnak gondoljuk, mivel egyrészt jól ismerjük a vestibuláris ideg főbb kapcsolatait, másrészt korábbi vizsgálataink során laboratóriumunkban már elkészítettük az egészséges béka központi idegrendszerének hialuronsav térképét (Szigeti és mtsai 2006), amely az idegrendszeri ECM egyik fő alkotója. További előnye a békának, hogy a központi idegrendszere is képes a regenerációra. A vestibulocochlearis ideg sérülését követő funkció kiesés, majd a regenerációt követően a funkció visszaállítása is könnyedén regisztrálható a béka testtartásán. A béka, mint modellállat hátrányaként megemlíthető annak körülményesebb beszerzése, illetve a tény, hogy a kételtűekben kapott eredmények közvetlenül nem extrapolálhatók emlős, elsősorban humán szövetekre. A kapott kísérleti adatok azonban jelentős információval járulhatnak hozzá az idegrendszer regeneráció alapmechanizmusának megértéséhez.

A békákat a nervus vestibulocochlearis sérülését célzó átvágásához az állatokat altattuk MS222 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) bőrön át való alkalmazásával. A nervus vestibulocochlearist feltártuk, majd az agytörzsbe való belépéstől kb 1 mm-re distalisan, de a

ganglion vestibularetol medialisán átvágtuk. Az átvágott idegvégeket egymáshoz illesztettük, majd a műtétet követően a vágott nyálkahártya egyesítését sebragasztóval végeztük. A műtétet követően az állatokat 11 °C-on tartottuk, majd a műtétet követő 3-84 napokon (9 periódusban) hisztokémiai módszer segítségével vizsgáltuk a HA változásán keresztül az ECM struktúrájának változását a vestibularis magok idegsejtjei körül és az ideg ún. belépési zónájában. A kísérletsorozathoz összesen 96 állatot használtunk, melyből 64-nek (ebből 39 élt túl) vágtuk át az egyik (rend szerint a jobb) oldali nervus vestibulocochlearisát. Ezekből 45-öt (27 túlélőt) hisztokémiai vizsgálatokra készítettünk elő, míg 19-et (12 túlélőt) nervus vestibulocochlearis regenerációjának vizsgálatára neurobiotinnal való feltöltés segítségével. 27 állaton áloperációt végeztünk, míg 5 állatot nem operáltunk.

Az állatkísérletek végzéséhez szükséges Debreceni Egyetem Munkahely Állatkísérleti Bizottsága által kiadott engedéllyel rendelkezünk, melynek száma: 22/2001 DE MÁB.

4.2. Hisztokémiai vizsgálatok

4.2.1. Preparátumok készítése

A hisztokémiai vizsgálatokat paraffinba ágyazott 5 µm vastag szövettani metszeteken végeztük. A különböző fejlettségű csirkeembriókat tojásból való izolációjuk után fiziológias sóoldatban mostuk, majd jéghideg Sainte-Marie (1962) fixálószerben egy éjszakán át fixáltuk 4 °C-on. Ezen alkohol tartalmú fixáló alkalmazásával meg tudtuk őrizni a szövetekben a vizes fixálókkal könnyen kimosható hialuronsavat és más ECM alkotókat. Fixálás után az embriókat 70%-os etanolban mostuk, majd felszálló alkoholsorral történő vízelvonást követően paraffinba ágyaztuk és keresztmetszeteket készítettünk az alsó thoracalis illetve a felső lumbalis gerincvelői szakaszokon.

A béka vestibularis ideg átvágása és azt követő regenerációs idő után az állatokat MS222 segítségével túlaltattuk, majd az agytörzsüket izoláltuk és fiziológias sóoldatban megfosztottuk agyburkaitól. Az így elkészült preparátumokat Sainte-Marie fixálóval fixáltuk az embriókhoz hasonló módon, majd dehidrálásukat követően paraffinba ágyaztuk azokat. A hialuronsav változását horizontális síkban készült agytörzsi sorozat-keresztmetszeteken követtük nyomon, melyek metszési síkjába estek a vestibularis magok.

4.2.2. A hialuronsav kimutatása

A hialuronsavat egy arra specifikus hisztokémiai reakcióval mutattuk ki szövettani metszetekben. A felhasznált specifikus próbánkat a finnországi Kuopioi Egyetem Anatómia Intézetéből kaptuk (Raija Tammi és Markku Tammi professzoroktól). A biotinnal jelzett

próba a hialuronsav polyszacharid 10 diszacharid egységből álló oligoszacharidjához kötődik specifikusan, amely a szarvasmarha aggregán proteoglikán molekula központi fehérjének hialuronsav kötő, ún. G1 doménjéből származik. A paraffinba ágyazott metszeteken, rehidráálásuk után PBS-ben hígított 5 µg/ml próbát egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltunk. Az inkubációt követő mosások után peroxidázzal konjugált Extravidint (1:1000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) alkalmaztunk, majd DAB peroxidáz enzim szubsztrát assayt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtunk a bekötődött biotinilált próba láthatóvá tételéhez. A HA fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatához a bekötődött próbát Alexa 488 vagy Alexa 555 konjugált streptavidint (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) használtunk.

4.2.3. Immunohisztokémiai reakciók

4.2.3.1. Proliferáló és differenciálódó sejtek kimutatása

A proliferáló sejteket PCNA elleni monoklonális antitesttel detektáltuk (1:500, Chemicon, Temecula, CA, USA). A PCNA fehérje az S fázisban levő sejtek magjában expresszálódik, ahol DNS-hez kötődve a végrehajtó egység faktoraként funkcionál a delta DNS polimeráz működése során.

A sejt differenciáció különböző fázisaiban levő embrionális gerincvelői sejteket azok homeobox gének expressziójára specifikus antitestek segítségével mutattuk ki. A postmitotikus neuronok Lim1 és 2 homeodomén expressziót mutatnak, melyek kimutatására Lim1,2 monoklonális antitestet használtunk (1:100, DSHB, Iowa City, IA, USA).

Az MNR2 fehérjét a csirkében korai szomatikus motoneuron prekursor sejtekben találjuk. Kimutatásukra monoklonális antitestet használtunk (1:50, DSHB, Iowa City, IA, USA).

A paraffinba ágyazott csirkeembrióból készült metszeteket rehidráálás után a PBS-ben hígított elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően háromszor váltott PBS-sel mostuk 10-10 percig szobahőmérsékleten. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat esetén egér elleni másodlagos antitestet használtunk (1:500), mely Alexa 488 fluorokrómmal volt konjugálva (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), kombinálva fluoreszcens bHABC hisztokémiai és kondroitin-szulfát immunohisztokémiai reakcióval. A metszeteket majd mosást követően DAPI magfestőt tartalmazó száradó Vectashield fedő médiummal és fedőlemezzel fedtünk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

4.2.3.2. Intermedier filamentumok megjelölése

Az egyes neuronok illetve gliasejtek és prekurzoraik citoplazmájának megfestésére a citoszkeletont alkotó tubulin ellenes monoklonális antitestet (1:100 Chemicon, Temecula, CA, USA) használtunk. Az immunreakciót az előzőekben leírt séma szerint fluorescens második antitesttel tettünk láthatóvá, melyet kombináltunk hialuronsav hisztokémiai és kondroitin-szulfát immunohisztokémiai reakcióval.

A idegsejt axonok kimutatására neurofilament ellenes antitesteket használtunk. A HH23 stádiumig a 68 kDa (1:200, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), míg a későbbi embrió idegeiben a 200 kDa (1:200, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) tömegű neurofilament volt kimutatható. Az immunohisztokémiai reakció kivitelezése a fentebb vázolt séma szerint történt.

4.2.3.3. Kondroitin-szulfát és phosphacan kimutatása

A hialuronsavat kötő lektikának mindegyike a kondroitin-szulfát oldallánccal rendelkezik, melyek kimutatását a csirkeembrió szövettani metszeteiben kondroitin-szulfát elleni monoklonális antitesttel (1:500, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) mutattuk ki. A phosphacan kimutatásához annak központi tengelyfehérjéje elleni monoklonális antitestet használtunk (1:100, Chemicon, Temecula, CA, USA). A metszeteket az elsődleges antitesttel 4 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd PBS-sel történő mosást követően Alexa-488 vagy Alexa-568 konjugált egér IgM elleni második antitestet használtunk (1:1000, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

4.3. Biokémiai módszerek

4.3.1. mRNS szintű vizsgálatok

4.3.1.1. RNS izolálása gerincvelő izolátumokból

Különböző fejlettségi stádiumú (HH16, HH23, HH28, HH34 és HH39) csirkeembriókból ProtectRNA-vel (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) kezelt PBS oldatban gerincvelő szakaszokat izoláltunk. A teljes RNS izolálását kb. 10-15 mg szövetmintából Qiagen Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével végeztük a gyártó cég által javasolt eljárás szerint.

4.3.1.2. RT-PCR

A tisztított RNS-ből 2 ug mennyiséget használtunk cDNS szintézishez, amelyhez Qiagen Omniscript (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) reverz transzkriptáz kitet használtunk fel a gyártó által javasolt protokoll szerint. A PCR reakcióhoz 0,2 ug cDNS-t használtunk fel. Az amplifikációt GoTaq polimeráz enzimmel végeztük (Promega, Mannheim, Germany). A 35 ciklus a következő lépéseket tartalmazta: 94 °C 50 sec, 52-63 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 sec. A felhasznált génspecifikus primerek szekvenciája a pontos hibridizációs hőmérséklettel a táblázatban láthatók, melyek tervezését Primer3 (Rozen és Skaletsky 2000) szoftverrel végeztük az NCBI szekvencia adatbázisból letöltött templatok alapján.

1. táblázat. A PCR-hez használt oligonukleotid primerek főbb paraméterei

| Gén NCBI ref No. | Sense primer | Antisense primer | Ta (°C) | Ampli- kon (nt) |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| Has2 AF_106940 | 5' -GAGACGACAGGCATCTAACTAAC-3' | 5' -AAGACTTTTATCAGGCCCACTAA-3' | 52 | 330 |
| Has3 XM_425137 | 5' -CCAACAGACCCGCTGGAGCA-3' | 5' -ACCGTCAACAGGAAGAGGAGGATG-3' | 58 | 192 |
| Aggrekán XM_001232949 | 5' -TGTTACATCGACAGGCTAAAGGG-3' | 5' -AAGCGTGATGCCGTGACAGA-3' | 63 | 304 |
| Brevikán XM_423655 | 5' -GTGCCTCCTTGCCAGTCTTCCAG-3' | 5' -GGTCCACCACGCCGTAGTTCCT-3' | 63 | 405 |
| Neurokán NM_204740 | 5' -GGCGCTCGCTATGCACTGACCTT-3' | 5' -TCCCGTGCGTAGCAGTAGACATCGTA-3' | 63 | 269 |
| Versikán NM_204787 | 5' -CGCTGTGATGTGATGATGG-3' | 5' -TGCTCTGGGCTTGCTATG-3' | 52 | 167 |
| GAPDH NM_204305 | 5' -CTGCCAGAACATCATCCCA-3' | 5' -CACGGTTGCTGTATCCAACTCAT-3' | 52 | 366 |

4.4. Optikai denzitometriai mérések

A HH23 stádiumban a HA rétegzettség kialakulását optikai denzitometriás mérések segítségével is vizsgáltuk. Ezeken a metszeteken bHABC hisztokémiai reakciót végeztünk, melyet DAB-reakcióval tettünk láthatóvá. A digitális képeket transzmissziós fénymikroszkóphoz (Olympus AX 70, Japan) kapcsolt hűtéssel rendelkező CCD kamerával (Olympus DP 70, Japan) készítettük, monokróm megvilágítás mellett ($\lambda=492\pm 5$ nm). A rendszer kalibrációja után a HA reakció intenzitását mértük, amely arányosan változik a HA

viszonylagos koncentrációjával, amelynek alkalmazásáról kutatócsoportunk már korábban beszámolt (Felszeghy és mtsai 2000). A mért területet (region of interest, ROI) Image J szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) segítségével jelöltük ki. A mérésekhez 10 párhuzamos metszetet vettünk, melyeken 5-5 egymástól független ROI-t (területe $250 \mu\text{m}^2$) jelöltünk ki a gerincvelő három különböző helyén: a ventrikuláris zónában, az intermedier zónában és a köpenyzónában. A háttér – ami a bHABC negatív kontroll reakcióját jelenti – kivonása után a mikroszkóp és a kamera beállítását nem változtattuk meg a digitális felvételek elkészítése során, melyekből a ROI integrált, DAB reakció által fedett intenzitás átlagértékeit mértük (ez adta a „grey level” értéket). Ezekből az értékekből optikai denzitás értékeket számoltunk.

A bHABC reakció által fedett területeket a sejt denzitás értékeivel korrigáltuk. A sejt denzitást a gerincvelőben párhuzamos metszeteken hematoxylinnal festett preparátumokon mértük, melyeket a sejtek citoplazmájának szegmentálása után kalkuláltunk. A méréseket és a szegmentálást Adobe Photoshop (Verzió: 8.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) szoftver segítségével végeztük. Ezen kapott számadatokat végül Ms Excel (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) segítségével kivontuk a összes ROI-ból, megkapva így a sejtek által nem foglalt terület százalékos nagyságát. A lumbalis gerincvelő három területén mért bHABC reakció optikai denzitás értékeit végül korrigáltuk az extarcellularis tér százalékos nagyságával.

A HA változásának nyomon követését a béka vestibulocochlearis ideg regenerációja során is hasonló optikai denzitometriai mérések segítségével végeztük el. Minden esetben állatonként 2-5 digitális képet készítettünk a VIII. agyideget tartalmazó agytörzsi keresztmetszetekből, külön az operált és a nem operált oldalról, melyhez Nikon Eclipse 800 (Japan) mikroszkóphoz szerelt hűtött Spot RT Slider (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) digitális kamerát használtunk. A méréshez a primer afferensek átmeneti zónájából (tanasitionalis zona, TZ), a nucleus vestibularis medialisból (NVM) és a lateralisból (NVL) választottunk ki területeket ($\text{ROI}=400 \mu\text{m}^2$), mely magok határai korábbi leírásokból már ismertek (Matesz 1979; Birinyi és mtsai 2001).

4.5. Statisztikai módszerek

A gerincvelő három régiójában mért optikai denzitás és a sejtdenzitás adatok összehasonlítását Mann-Whitney -féle U-teszttel végeztük PAST (Hammer és mtsai 2001) statisztikai szoftver segítségével.

A béka VIII. agyideg regenerációját vizsgáló kísérleteinkben – mivel adataink csak kis eltéréseket mutattak – először ellenőriztük, hogy van-e szignifikáns különbség az agytörzs

egy adott magjának HA reakció intenzitásában, ha egy állat ugyanazon idegmag különböző helyén mérünk, vagy más állatból származó mintákon végzünk méréseket. Ehhez a vizsgálathoz a tractus solitarius HA reakciójának intenzitását mértük meg. Ez a képlet egyfelől könnyen beazonosítható a metszeteken és homogén struktúra, másrészt pedig ez a terület rendelkezik a leggyengébb HA intenzitással. Az intenzitásértékeket kéttényezős variancia analízissel (ANOVA) elemeztük és nem találtunk szignifikáns különbséget sem az azonos ($P > 0,29$), sem pedig a különböző ($P > 0,34$) állatokból származó metszetek között. Így a későbbiek során a vestibularis magok és a primer afferensek belépési zónájának vizsgálatakor nem tettünk különbséget sem az egy állatból származó, sem pedig a különböző állatokból származó identikus struktúrákat viselő metszetek között.

A BHABC hisztokémiai reakció intenzitását az operációt követő egyes napokon kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze, miután vizsgálataink szerint az adatok normáleloszlást követtek. Az adatok normál eloszlását két kritérium szerint teszteltük: (1) $0,9 < \text{medián}/\text{átlag} < 1,1$ és (2) $3 \times \text{standard deviáció} < \text{átlag}$. A varianciák egyenlőségét F-próba segítségével ellenőriztük. Az intenzitás változások tendenciáját lineáris regressziós egyenesek meredekségének mérésével vizsgáltuk, míg az ép és operált oldalak közötti HA intenzitásbeli változások lehetséges összefüggéseit Fischer féle megfelelési próbával vizsgáltuk. A statisztikai vizsgálatokhoz MS Excel (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA) és GraphPad Prism (Verzió: 4.00 GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) szoftvereket használtuk.

5. Eredmények

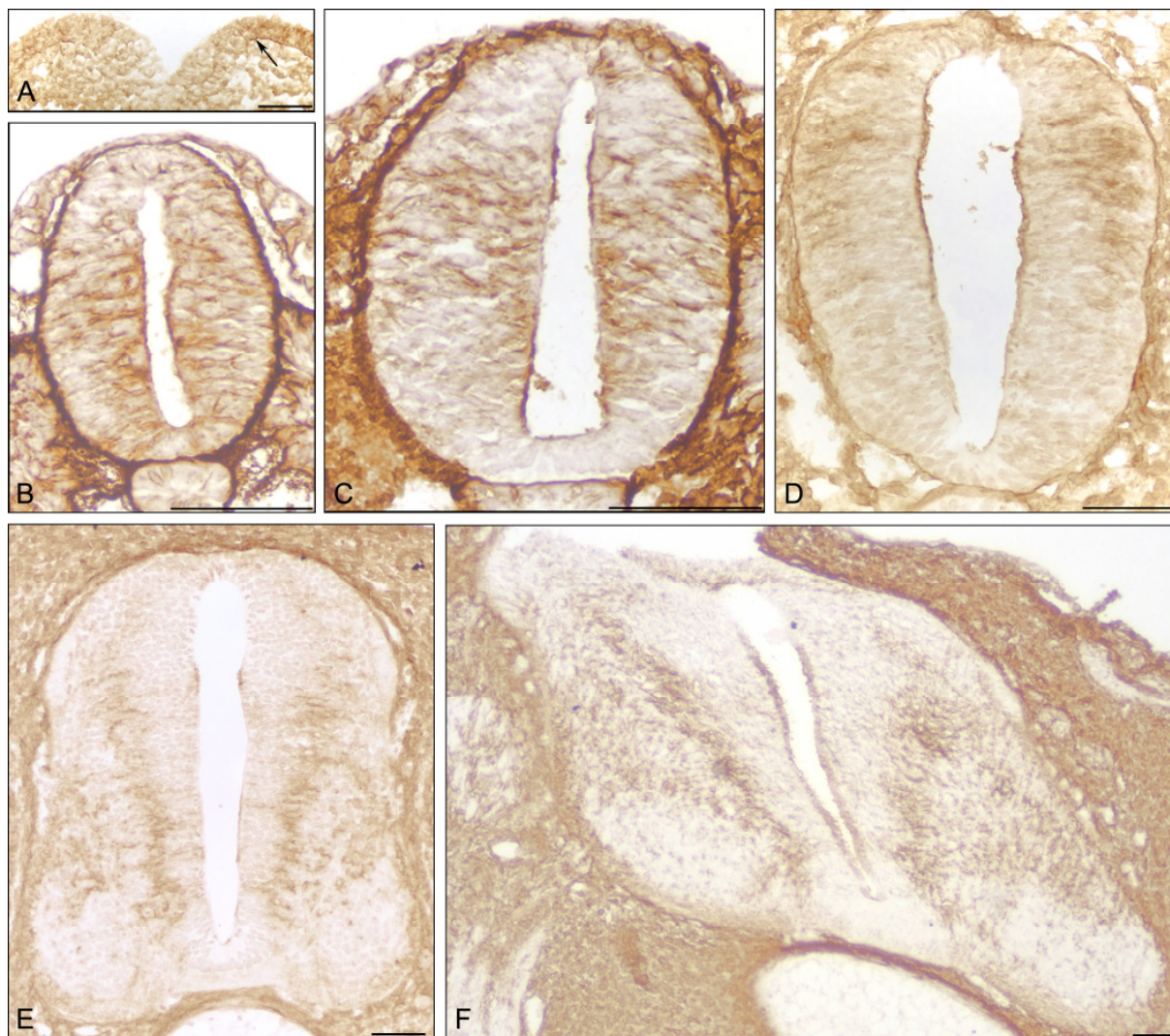
5.1. A hialuronsav vizsgálata a fejlődés során

5.1.1. A bHABC hisztokémiai reakciók specifikusságának vizsgálata, kontroll kísérletek

A hisztokémiai reakciók specifikusságát mind csirkeembriókon, mind pedig a békán megvizsgáltuk. Csirkékben, mivel teljes embrió keresztmetszeteket készítettünk az idősebb (HH34) korú egyedek csigolyatestének porcosodó alapján mutattunk ki hialuronsavat. Békákon a sternum porcos részén végeztünk bHABC hisztokémiai reakciót, amely jelölést mutatott a territorialis és az interterritorialis mátrixban. A hisztokémiai reakció negatív kontrolljaként három párhuzamos kísérletet végeztünk el: 1., bHABC nélkül, a hívórendszer kontrolljaként, 2., bHABC próbával, de a metszetből streptomycies hialuronidáz emésztéssel eltávolítottuk a hialuronsavat, 3., bHAPC próbával, melynek oldatához hialuronsavat adtunk. Ezen reakciók elvégzése után egy esetben sem kaptunk jelet.

5.1.2. Hialuronsav akkumuláció a gerincvelő különböző fejlődési szakaszaiban

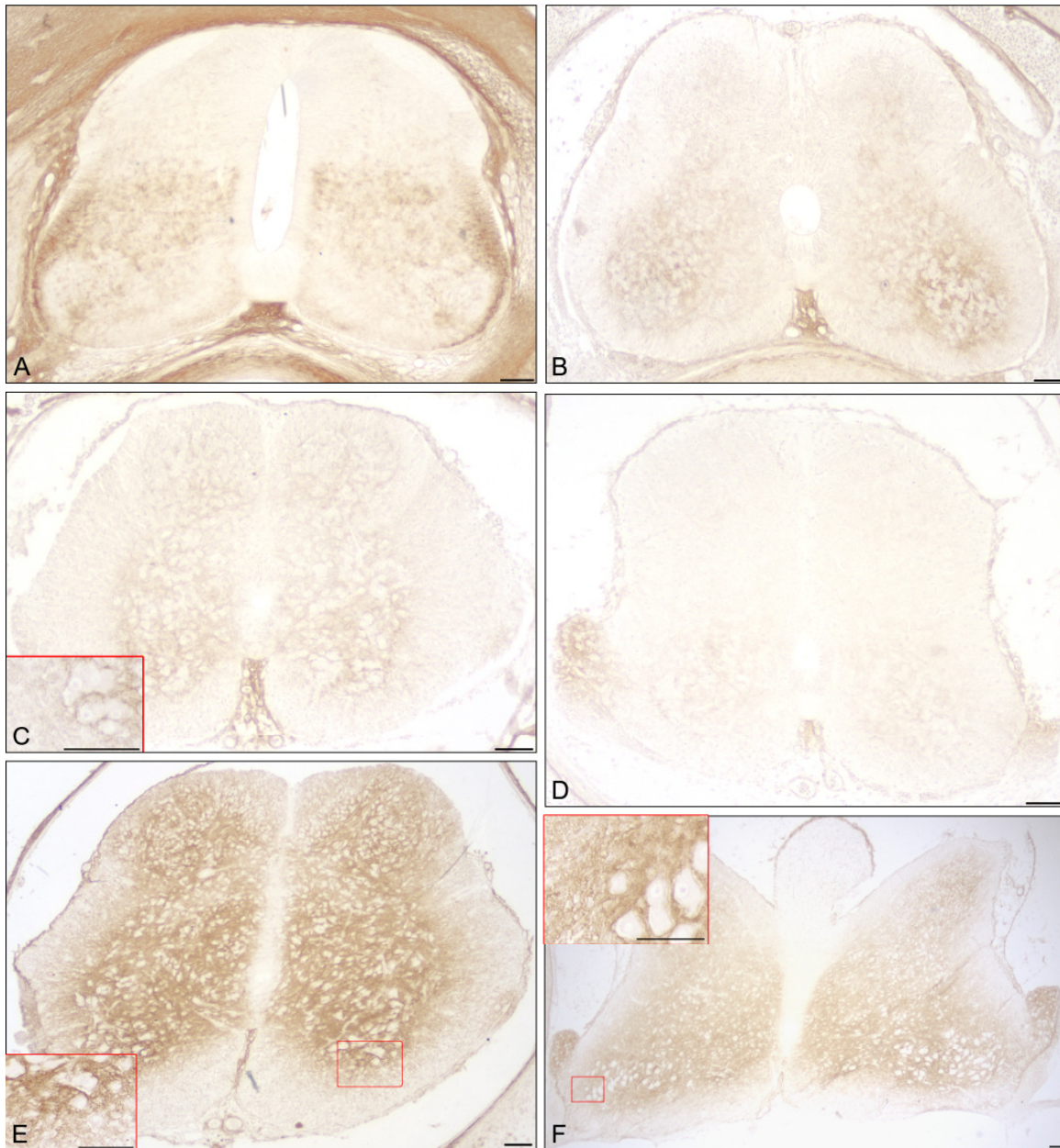
A hialuronsav már egészen korán, a HH8 stádiumú gerincvelőben kimutatható (4. ábra A) és csaknem az egész fejlődés során megtalálható. A neuruláció elején a velőlemezek megfelelő területen a sejteket látszólag kevesebb HA veszi körül, míg a velőlemeztől lateralisán a felszíni ektoderma és az alatta levő mezoderma határán jól látható HA pozitivitás látható, vagyis a két csíralemezt kifejezett hialuronsavban gazdag lamina basalis-hoz hasonló ECM választja el egymástól (4. ábra A, nyíl). A velőlemez csővé záródása után, a hialuronsav mintázata a gerincvelőben megváltozik, egy meglehetősen diffúz jelleget ölt, mely jól nyomon követhető a HH11 stádiumban (4. ábra B). A gerincvelőt egy erős HA pozitivitást mutató réteg választja el a környezetétől. Érdekes módon a chorda dorsalis és a fenéklemes összetapadásánál is kimutatható a HA jelenléte. A gerincvelő sejtjei körül inkább a szárny és az alaplemezben mutatnak pozitivitást, azoknak is a canalis centralis felé eső rétegeiben. A későbbi stádiumokban (HH12-18) a gerincvelő sejtjei körüli HA mintázata mindinkább a szárnylemez felé tolódik, amely változások tulajdonképpen néhány órán belül lezajlanak (4. ábra C és D).



4. ábra. A hialuronsav eloszlási mintázata a (A) HH8, (B) HH11, (C) HH14, (D) HH16, (E) HH23 és (F) HH28 stádiumú csirembrió gerincvelő keresztmetszetekben. A HA eloszlása változik az életkorral, az ábrák bemutatják a fiatalabb (B, C, D) stádiumok diffúz HA reakciójának réteges mintázattá való változását a HH23 (E) stádiumban. (A) a nyíl az ektoderma és a mezoderma határát mutatja. Skála 50 μ m.

A HA eloszlási mintázata jelentősen megváltozik a HH23 stádium elérésekor (4. ábra E); mediolateralis rétegződést mutat. Medialisan a hialuronsavban szegény ventrikuláris régiót egy hialuronsavban gazdag régió követ, amely aztán mérséklődni látszik a laterális köpenyzónában, ahogy annak részletezésére a következő részben kerül sor. Érdekesen alakul a fenéklemez és tetőlemez sejteinek hialuronsav mintázata. Az idegsejtek differenciálódásáért felelős fenéklemez sejtei sonic hedgehog faktort termelnek, ezen sejtek körül hialuronsavban szegény régiót látunk, ide értve a chorda dorsalist is. A tetőlemez azon sejtei körül, melyek TGF β családba tartozó diffúzibilis növekedési faktorokat termelnek gazdag hialuronsav tartalmat találunk. Ez a rétegzettség viszonylag sokáig, a HH28 stádiumig figyelhető meg (4. ábra F). Az ilyen életkorú embriókban már elkülöníthető a gerincvelő

fehérállománya, melyek HA pozitivitása sajátosan alakul. A belépési zóna minden esetben HA-ban szegénynek mutatkozott, míg a funiculus lateralis HA-ban gazdag. A funiculus anteriorban mérsékelt HA pozitivitást találtunk.



5. ábra. A hialuronsav eloszlási mintázata a különböző stádiumú csirembrió gerincvelő keresztmetszetekben: (A) HH29, (B) HH35 cervicalis, (C) HH37 cervicalis, (D) HH37 lumbalis, (E) HH39 cervicalis és (F) HH39 lumbalis. A HA akkumulációjának csökkenése következik be a korai stádiumokat követően a gerincvelőben (A, B). Ezt követően a HA akkumuláció növekszik, mely a cervicalis szakaszokon (C, E) előbb és intenzívebben jelentkezik, mint a lumbalison (D, F). Skála 50 μ m.

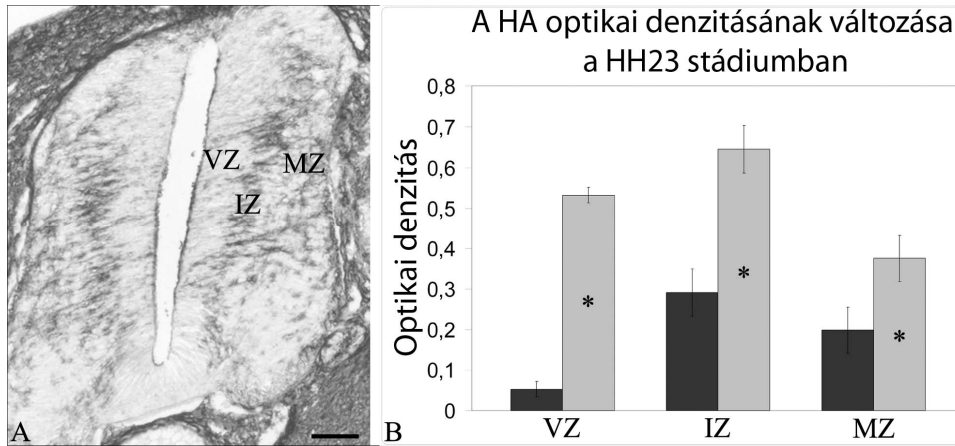
A szürkeállomány rétegzettsége megszűnik, a hialuronsavban gazdag ECM csak egyes sejtek körül található meg a HH29 stádiumban (5. ábra A). Az alaplemez szürkeállománya és

a funiculus lateralis gazdagabb hialuronsavban. A belépesi zóna ebben az életkorban sem mutat jelölődést.

A hialuronsav csaknem eltűnik a HH34 stádiumban, míg a HH35 stádiumban (5. ábra B) is csupán a cervicalis szakaszokon tudtuk kimutatni főként a nagyobb motoneuronok körül. Ez a rostro-caudalis gradiens jellemző lesz még a HH37 stádiumban is (5. ábra C és D), majd megszűnni látszik a HH39 fejlettségű embriókban (5. ábra E és F). A hialuronsav reakció lefedettsége látszólag a HH34 stádiumtól fokozatos növekedést mutatott a HH39 stádium eléréséig. A sejtes megoszlásra jellemző lesz, hogy az egyes sejtek körül szemmel láthatóan egy koncentráltabb jelet lehet felfedezni, míg a sejtektől távolabb kevésbé erős a jel. Ez a kép valószínűleg a formálódó hialuronsavban gazdag perineuronális hálót mutatja az idegsejtek körül.

5.1.3. A hialuronsav réteges eloszlási mintázata HH23 stádiumú gerincvelőben

Ahogy arról az előzőekben is szó volt a hialuronsav eloszlási mintázata lényeges változást mutat a HH23 stádiumban az előző életkorokhoz képest. Egy diffúzan jelenlevő hialuronsav jól látható réteges elrendeződési mintázattá alakul a HH23 stádiumú kor elérésére (6. ábra A). Mivel a hialuronsav döntő részben az extracelluláris térben kimutatható, ezért megvizsgáltuk, hogy ez a jellegzetes hialuronsav eloszlási mintázat kialakulása összefüggésbe hozható-e a sejtdenzitás mediolateralis irányban történő változásával. A ventrikuláris zónában találtuk a leggyengébb jelet, majd ezt egy lateralisan levő hialuronsavban gazdag intermedier zóna követte. Lateralisan a köpenyzónában egy mérsékelten hialuronsavban gazdag régiót találunk. Az ezen a zónákban tett megfigyeléseinket optikai denzitometriai mérések segítségével is igazoltuk (6. ábra B). A sejtek denzitása a medialisán levő ventrikuláris zónában a legnagyobb, így egyben itt a legkisebb az extracelluláris tér nagysága is. Annak eldöntésére, hogy az intermedier zónában látszólag nagyobb mennyiségben jelen levő hialuronsav az extracelluláris tér növekedése miatt vagy az ott levő sejtek akkumulációja miatt van, sejtdenzitással korrigált hialuronsav optikai denzitást mértünk. A mérési adatok alapján elmondhatjuk, hogy a hialuronsav nem elsősorban az extracelluláris tér növekedése miatt több, hanem sokkal valószínűbb, hogy azt az intermedier zónában levő sejtek termelik nagyobb mennyiségben.

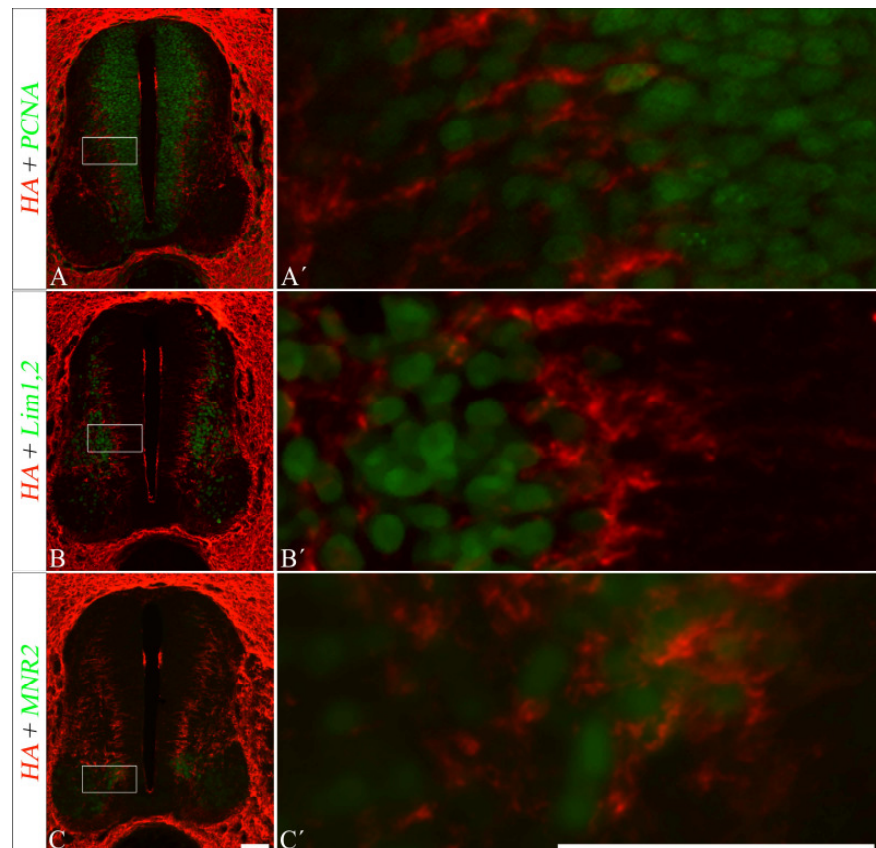


6. ábra. A hialuronsav eloszlási mintázata a HH23 st-ban. (A) A gerincvelő keresztmetszeti képe a bHABC reakcióval. (B) Optikai denzitások változásai a ventricularis zónában (VZ), az intermedier zónában (IZ) és a marginalis zónában (MZ). Az intermedier zónában megnövekedett HA akkumulációt figyelhetünk meg (A), amely nem elsősorban az extracelluláris tér növekedéséből adódik, hanem az ott levő sejtek fokozott HA termelésének a következménye (B). A csillaggal jelölt oszlopok sejtdenzitással korrigált értékek ($P < 0,01$). Skála: 20 μ m.

5.1.4. A hialuronsav akkumulációja differenciálódó neuronok körül

Vizsgáltuk, hogy a HH23 stádiumú csirkeembrió gerincvelő intermedier zónájában mely sejtek körül lehet látni a megnövekedett hialuronsav akkumulációt. Ehhez fluoreszcens kettős

7. ábra. A hialuronsav akkumulációja a különböző sejtpopulációk körül a HH23 stádiumban. Fluoreszcens kettős jelöléssel a HA a vörös, a PCNA (A, zöld), a Lim1,2 (B, zöld) és MNR2 (C, zöld) látható. A kerettel jelölt részek az A', B' és C' ábrán láthatók felnagyítva. A proliferáló PCNA pozitív sejtek és a differenciálódó MNR2 és Lim1,2 pozitív sejtek rétegei között az intermedier zóna fokozott HA akkumulációját figyelhetjük meg. Skála: 20 μ m.

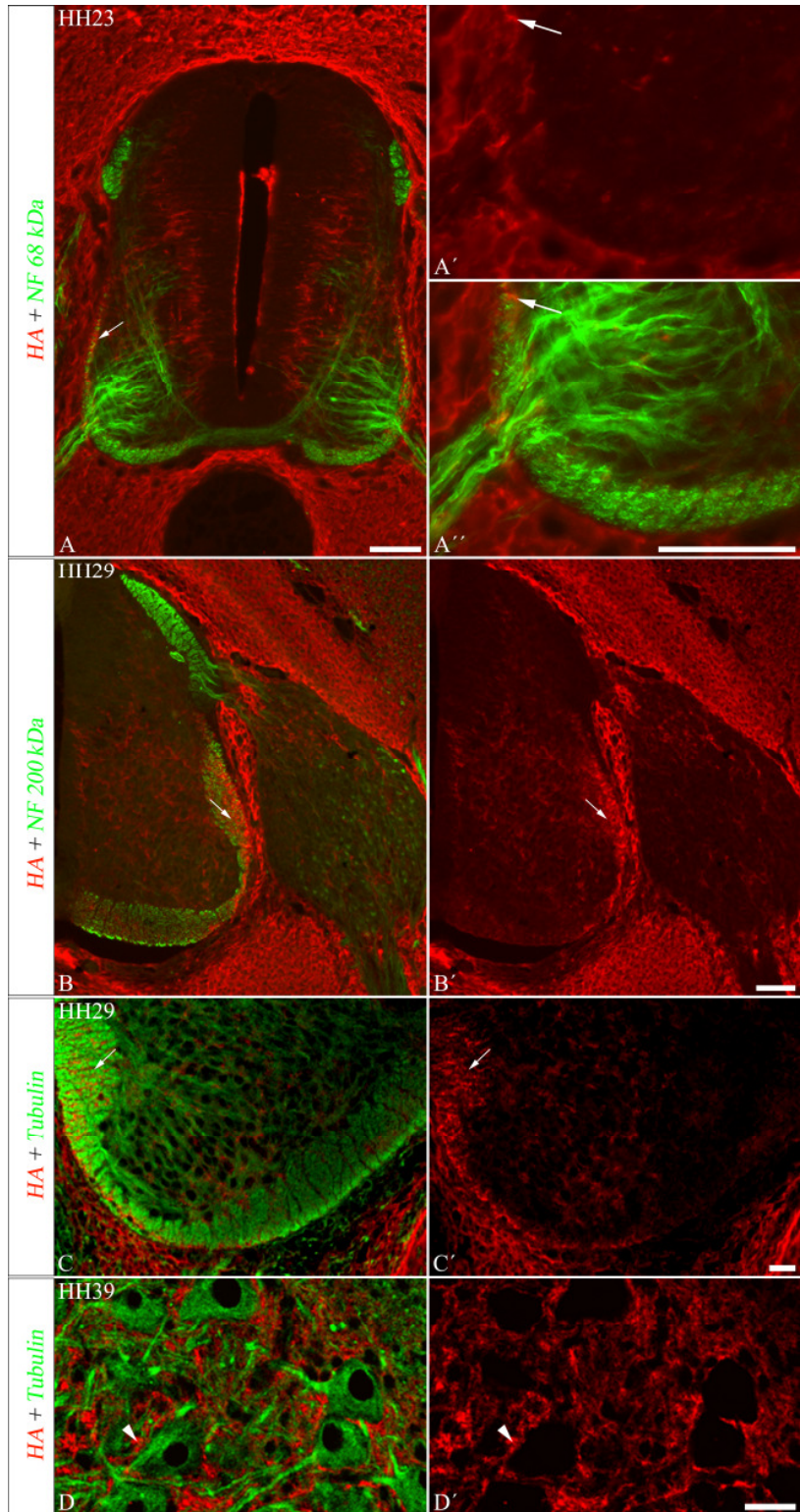


jelöléseket végeztünk, melyben fluorescens bHABC hisztokémiát kombináltuk immunofluorescens jelöléssel (7. ábra.). A proliferáló PCNA pozitív sejtek (7. ábra A) a ventrikuláris zónától terjednek az intermedier zónáig, éppen addig a területig, ahol a hialuronsavban gazdag régió található. Ezen sejtek rétegétől lateralisán Lim1,2 immunopozitív sejtek rétege látható (7. ábra B), mely a differenciálódó postmitotikus neuronokra jellemző. A gerincvelő ventralis oldalán levő motoneuron prekursor sejtek legkorábban MNR2 homeodomén expressziójukról ismerhetők fel (7. ábra C). Ezen sejtek lokalizációja teljesen egybeesik a hialuronsavban gazdag intermedier zónával.

5.1.5. A hialuronsav különböző megoszlási profilja az axonok körül a központi és perifériás idegrendszerben

Az axonokat neurofilament tartalmuk alapján immunofluorescens módon jelöltük a fehérállomány korai (HH23) és későbbi (HH29) fejlődési szakaszában, melyet kombináltunk fluorescens bHABC hisztokémiai reakcióval (8. ábra). A perifériás idegekben nem tudtunk hialuronsavat kimutatni (8. ábra A, A', A'', B, B'), míg az érző ganglionokban igen (8. ábra B, B'). A belépési zóna ugyancsak hialuronsavban negatívnak bizonyult. Hialuronsav akkumuláció a központi idegrendszerben levő axonokban megfigyelhető, bár különböző mértékben. Mindkét vizsgált stádiumban a funiculus lateralis mutat erős hialuronsav pozitívítást, míg a funiculus anterior kevésbé. Az elülső gyökér is hialuronsavban negatív volt, ezért megvizsgáltuk hogy eredő sejtjeik, a motoneuronok körül hogyan alakult a hialuronsav pozitívítás (8. ábra C, C', D, D'). A metszeteket kettős jelzéssel; tubulin elleni monoklonális antitesttel illetve fluorescens bHABC hisztokémiai reakcióval történt jelöléssel konfokális mikroszkópban vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a motoneuronok az életkor előrehaladtával egyre több hialuronsavat tartalmazó matrixban találhatók. A HH39 stádiumban a motoneuronok, azok proximális dendritjeivel együtt már teljesen körbevettek hialuronsavban gazdag ECM-mel.

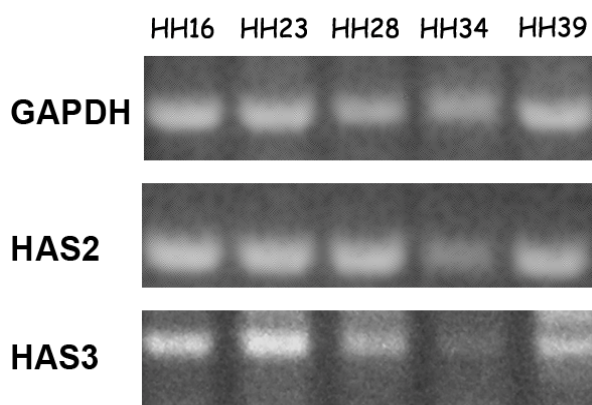
8. ábra. A hialuronsav kapcsolata az idegrostokkal a központi és a perifériás idegrendszerben. A (A) HH23 stádiumból, (B, C) HH29 stádiumból és a (D) HH39 stádiumból származó gerincvelői kersztmetszeteken fluoreszcens kettős jelölések láthatók. A HA a vörös a (A, B) neurofilament és a (C, D) tubulin immunreakciót zöld szín jelzi. Az A' és az A'' panelek az A panelen levő gerincvelő ventrolateralis részét mutatja felnagyítva. A B', C', és D' panelek csak a HA reakciót mutatják a baloldali képekből. Intenzív HA reakciót lehet megfigyelni a funiculus lateralisban (A, B, C paneleken levő nyilak). (C, D) konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek a HA reakciót (vörös) és a tubulin (zöld) immunoreaktív területeket mutatják a gerincvelő ventrolateralis részén a HH29 (C) és HH39 (D) stádiumokban. A tubulinnal jelzett idegsejtek perikaryonjai és azok proximális dendritjei körül levő HA akkumuláció fokozódását figyelhetjük meg az idősebb gerincvelőben (D panelen levő nyílhegy). A ggl az érzőgangliont jelöli. Skála: 20 μ m.



5.1.6. Hialuronsav-szintázok és receptorok expressziója a fejlődő gerincvelőben

Ismert, hogy a különböző hialuronsav-szintáz izoenzimek különböző mérettartományba eső hialuronsavat szintetizálnak. A HAS2 és HAS1 a nagy molekulású, míg a HAS3 egy nagyságrenddel kisebb molekulású HA-t szintetizál. Ezért RT-PCR segítségével megvizsgáltuk a hialuronsav-szintázok expresszióját ugyanazon fejlettségi stádiumokból vett homogenizátumokból. Eredményeink azt mutatták, hogy mind a nagy móltömegű HA láncot szintetizáló HAS2, mind pedig a kisebb láncok szintéziséért felelős HAS3 jelen van a gerincvelőben a vizsgált stádiumokban (9. ábra). Ezen technika ugyan nem alkalmas pontos kvantitatív vizsgálatra, megfigyelhető azonban a HAS2 és HAS3 expressziójának folyamatos csökkenése a legfiatalabb stádiumtól az életkor előrehaladtával, míg a HH34 stádiumban nagyságrendekkel kisebb expressziója, és a HH39 stádiumban azonban a HAS2 és HAS3 expressziójának ugrásszerű növekedése figyelhető meg. A HA szintázok expressziójának változása hűen követi a bHABC hisztokémiával megfigyelt változását a HA-nak.

9. ábra. A hialuronsav-szintázok PCR amplifikációt követő gélelektroforetikus képe a HH16, HH23, HH28, HH34 és HH39 stádiumú csirkeembriók gerincvelő izolátumaiból. Referencia: GAPDH (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz). Minden vizsgált stádiumban ki tudtuk mutatni a HAS2 és HAS3 mRNS jelenlétét a gerincvelőből. A HH34 stádium HAS2 és főleg a HAS3 expresszió csökkenése figyelhető meg.

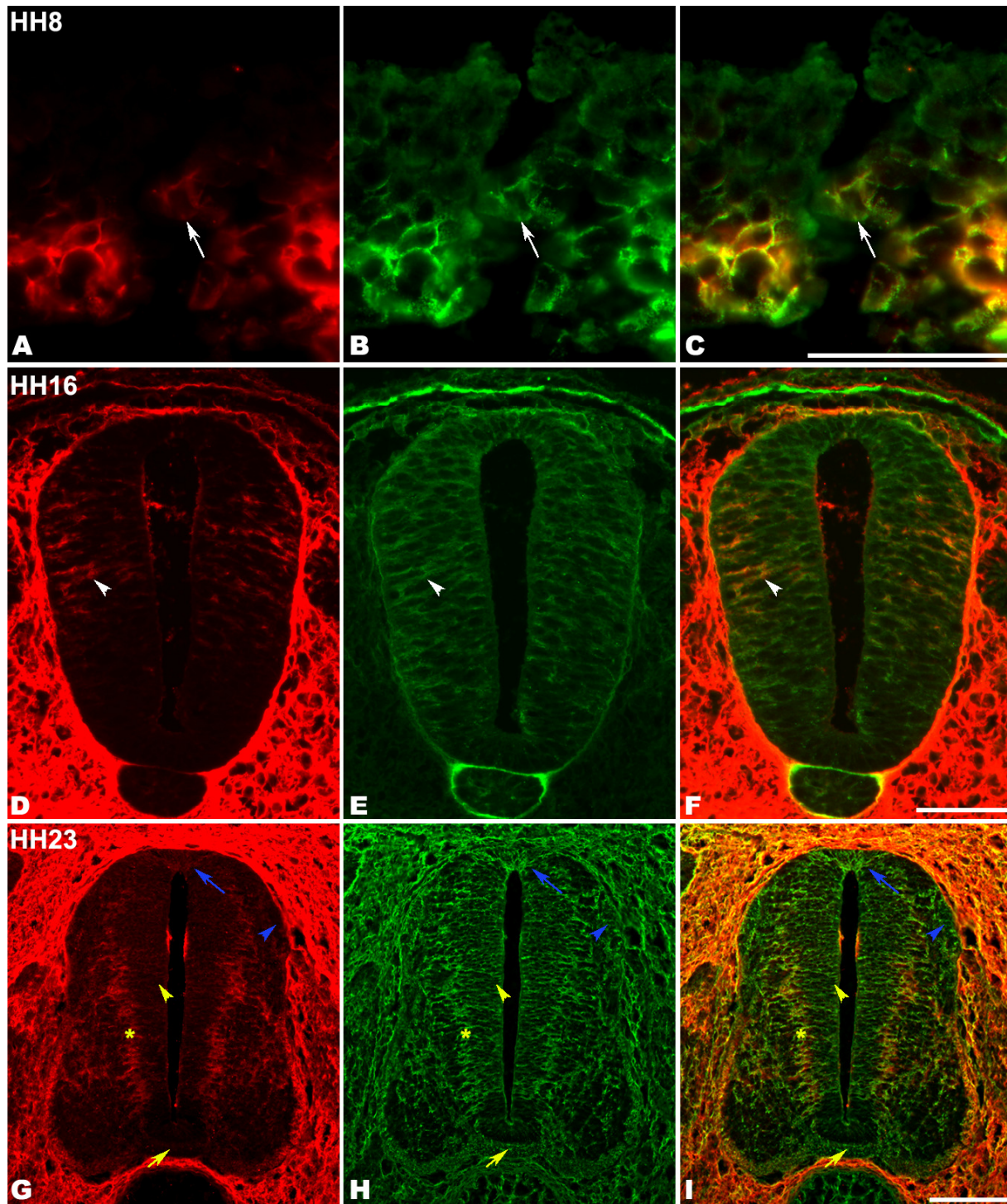


A hialuronsav leggyakoribb receptorai a CD44 és a RHAMM expresszióját is vizsgáltuk a gerincvelő fejlettségének különböző stádiumaiban, hogy következtethessünk a hialuronsav lehetséges funkciójára a csirkeembrió fejlődő idegrendszerében. Jóllehet RT-PCR segítségével kimutatható némi CD44 expresszió, azonban immunohisztokémiai jelet 2 különböző antitestet is használva csak a HH37 és HH39 stádiumokban lehet látni a középvonal mentén levő sejtekben (folyamatban levő kísérletek).

5.2. A kondroitin-szulfát proteoglikánok vizsgálata a fejlődő gerincvelőben

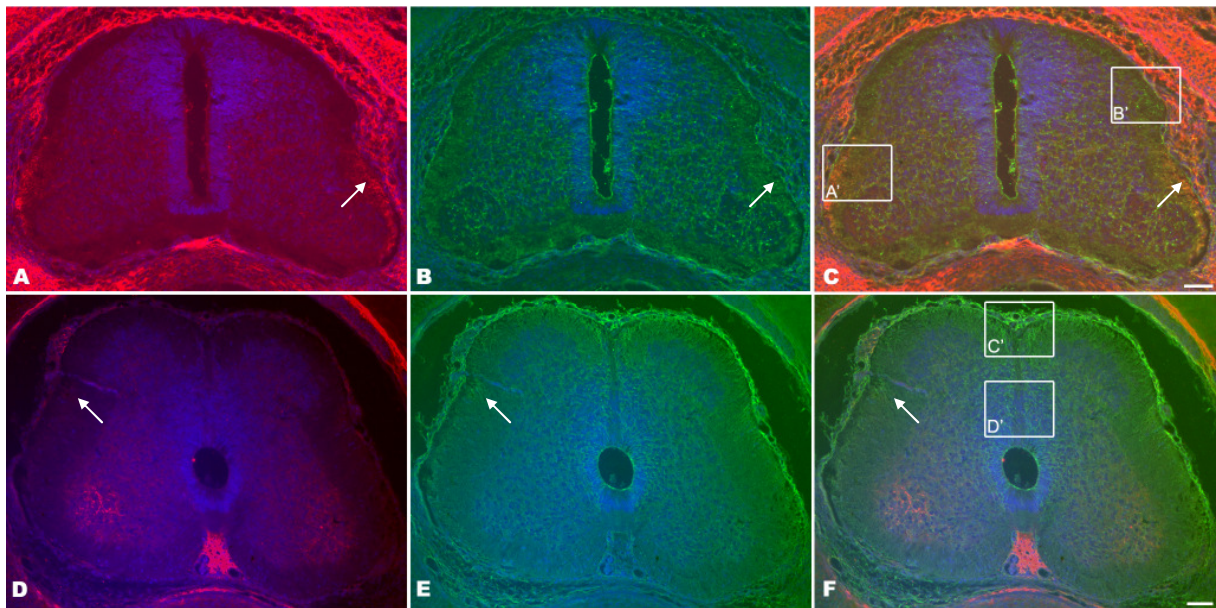
5.2.1. Kondroitin-szulfát eloszlása az életkor függvényében

A kondroitin-szulfátok (CS) proteoglikánok központi fehérjéihez kapcsolódva fordulnak elő. Az idegrendszerben jelenlevő kondroitin-szulfát proteoglikánok egyik csoportja hialuronsavhoz kötődő lektikánok, a másik csoport a nem hialuronsavhoz kötődő proteoglikánok. Ez utóbbi csoportba tartozik a phosphacan. A kondroitin-szulfát elleni monoklonális antitesttel ezek együttes előfordulását vizsgáltuk a csirkeembrió fejlődő gerincvelőben annak eldöntésére, hogy milyen mértékű ezek együttes előfordulása a hialuronsavval. Elvégezve a vizsgálatot úgy találtuk, hogy minden stádiumban nagymértékben átfed a kondroitin-szulfát immunopozitivitás a hialuronsavval. Ez várakozásainknak megfelelően lektikánok expresszióját feltételezi. A HH8 stádiumban az MHP sejtek körüli CS immunopozitivitás figyelhető meg, ahol ezzel párhuzamosan HA is kimutatható (10. ábra A-C). A HH16 stádiumban is megfigyelhető a CS immunopozitív területek átfedése a HA pozitív területekkel (10. ábra D-F). Szembetűnő a tetőlemez és a szárnylemez együttes jelölődése, ugyanakkor az alaplemezben dominál a CS jelenléte. A fehérállomány és a gerincvelői gyökök átmeneti zónájában határozott jelölődés látható a HH23 stádiumban (10. ábra H). A belépési zóna ezzel szemben nem mutat különösebb HA pozitivitást (10. ábra G, I). Ebben az életkorban az erős HA pozitivitást mutató intermedier zónában egyben CS immunoreaktivitás is található, míg a kevesebb HA tartalmú ventrikuláris zóna intenzív CS reaktivitású (10. ábra G-I).



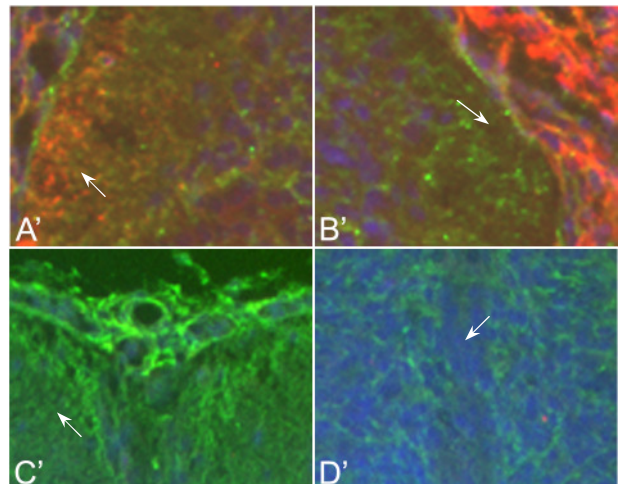
10. ábra. A HA (vörös) és a kondroitin-szulfát immunreakciók (zöld) a csirkeembrió gerincvelő lumbális keresztmetszetekben a (A, B, C) HH8, a (D, E, F) HH16 és a (G, H, I) HH23 stádiumból. Az ábra felső paneljein a HH8 stádium velőlemez MHP sejtjei körüli HA és CS immunopozitivása látható (fehér nyíl). A HH16 stádiumban a gyenge CS immunreaktivitás gyakorlatilag minden sejt körül látható, míg a HA reaktív területeket elsősorban a gerincvelő lateralis részén találjuk meg a szárnylemezben (fehér nyílhegy). A HH23 stádiumban a HA és CS pozitívítás a tetőlemezben (kék nyíl), a ventrikuláris (sárga nyílhegy) és az intermedier zónában (sárga csillag) átfedést mutat, míg a fenéklemez (sárga nyíl) és a belépési zóna (kék nyílhegy) elsősorban csak CS immunopozitivitást mutat. Skála: 50 μ m.

Az embrionális fejlődés későbbi szakaszában a HA reakció által lefedett területek folyamatos csökkenést mutatnak. Ez a változás a HH28 stádiumban jól érzékelhető (11. ábra A), majd a HH34 stádiumban a HA szinte kimutathatatlan lesz a gerincvelőből. A HH35 stádiumtól kezdődően azonban újra nagyobb és nagyobb területeken lesz detektálható (11. ábra D). Ezzel szemben a CS expresszióban nem lehet felismerni hasonló tendenciát sem a HH34, sem pedig a HH35 stádiumban. A fehérállomány és a belépési zóna egyenletes CS pozitivitást mutat a HA reakcióval ellentétben (11. ábra B, C és 12. ábra A', B'). Kis mértékű intenzitásbeli emelkedés érzékelhető a HH35 stádium funiculus dorsalisban (12. ábra D'), míg a középvonalban szinte alig találtunk CS és HA expressziót (12. ábra C').



11. ábra. A HA (vörös) és a kondroitin-szulfát immunreakciók (zöld) a csirkeembrió gerincvelői keresztmetszetekben a (A, B, C) HH28, a (D, E, F) HH35 stádiumból. A HA reakció csökkenését (A, D) ezekben a stádiumokban nem követi a CS immunoreaktivitásának változása (B, E). A különbségek főleg a fehérállományban szembetűnők (nyilak). A (C, F) paneleken a bekeretezett részek kinagyítva a 12. ábrán láthatók. Skála: 50 μ m.

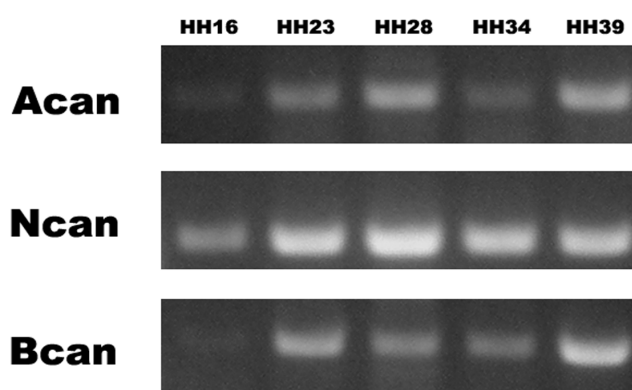
12. ábra. A HA (vörös) és kondroitin-szulfát reakció (zöld) kombinációja a (A', B') HH28 és (C' D') HH35 stádium gerincvelőin. A HH28 stádium funiculus lateralisban mind a HA reakció, mind pedig a CS immunreakció intenzív jelölést adott (A' nyíl), míg a belépési zónában csak CS jelet látunk (B' nyíl). A HH35 stádiumban a funiculus dorsalis erős CS immunopozitív (C' nyíl), míg a középvonal alig ad jelet (D' nyíl). Az átnézeti képek a 11. ábrán láthatók.



5.2.2. Lectikánok és a phosphacan expressziójának alakulása az életkorral

Biokémiai vizsgálatokat végeztünk, annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a kondroitin-szulfát proteoglikánok megoszlásáról a vizsgált életkorokban. RT-PCR segítségével az aggregánt, a neurokánt és a brevikánt tudtuk kimutatni ugyanazon gerincvelőből származó mintákból (13. ábra). Ezek életkor szerinti megoszlása azonban változó. A neurokán folyamatos expressziója jellemző a vizsgált stádiumokban, míg a brevikán és az aggregán csak a HH23 stádiumtól lesz jellemző.

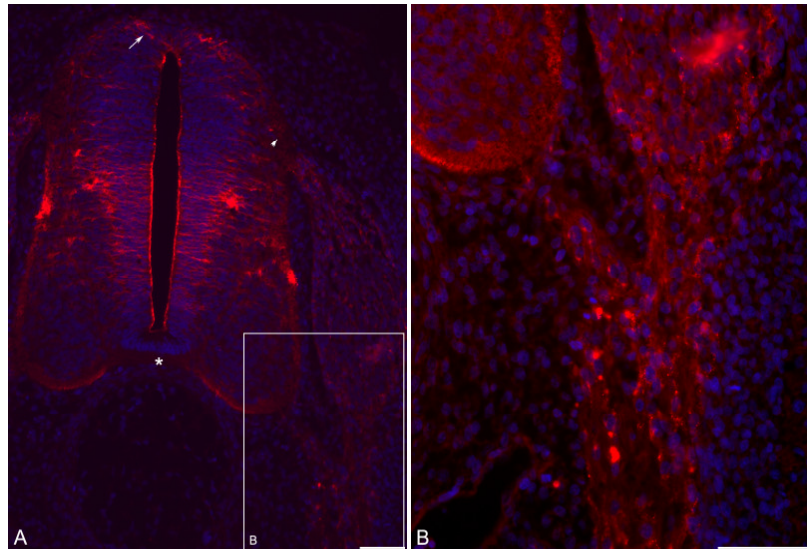
13. ábra. A lektikánok PCR amplifikációt követő gélelektroforetikus képe a HH16, HH23, HH28, HH34 és HH39 stádiumú csirkeembriók gerincvelő izolátumaiból. Acan: aggregán, Ncan: neurokán, Bcan: brevikán. A neurokán folyamatos expressziója figyelhető meg, míg a brevican és az aggregan jó érzékelhetően csak a HH23 stádiumtól kezdve expresszál



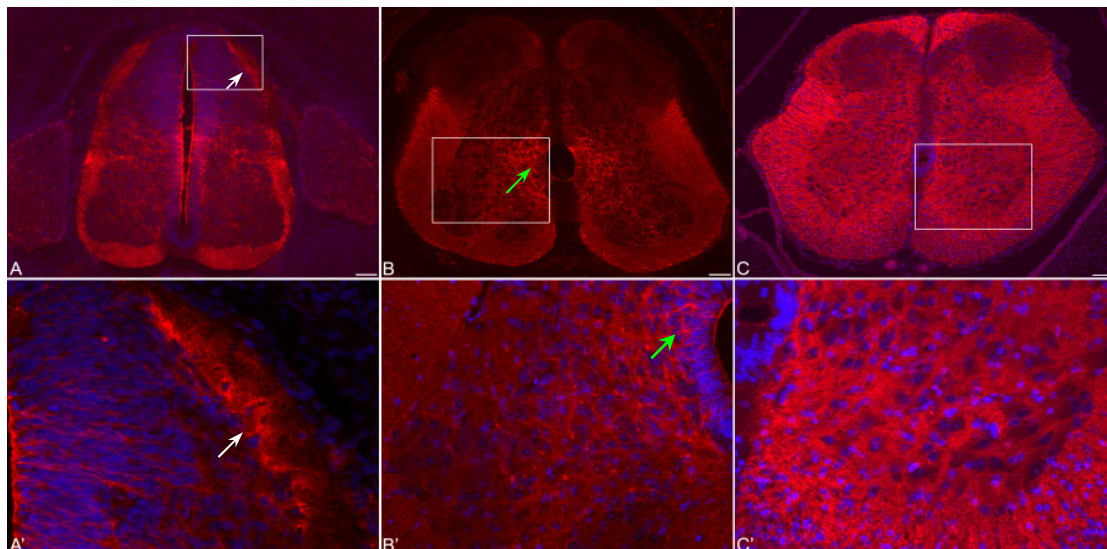
5.2.3. A phosphacan expressziós mintázata a csirkeembrió gerincvelőben

A phosphacan a nem HA kötő kondroitin-sulphat proteoglikánok csoportjában tartozik, és mai ismereteink szerint kizárólag az idegrendszerben expresszál. Csirkespecifikus monoklonális antitesttel vizsgáltuk a phosphacan fejlődés-függő expresszióját a gerincvelőben feltételezett szerepének felderítése érdekében. A phosphacan expresszióját legkorábban a HH23 stádiumban tudtuk kimutatni (14. ábra) a perifériás idegekben (14. ábra B), a tetőlemez sejtei körül, a szárnylemez intermedier zónájában és a radier glia sejtek körül (14. ábra A). A fehérállomány és a belépési zónában is immunopozitivitást detektáltunk, míg a commissura anterior ezzel szemben negatívnak bizonyult.

14. ábra. Phosphacan immuno-fluoreszcens jelölés (vörös) a HH23 stádiumú csirkeembrió gerincvelő kersztmetszetén. A gerincvelő és az érződúc átmetszetén (A) a gerincvelői ideg kinagyítva (B). Az ábrán megfigyelhető a tetőlemez (A, nyíl), a belépési zóna (A, nyílhegy) és a periférás idegek (B) immunopozitivitása. A commissura anterior (A, csillag) ezzel szemben negatív. Skála: 50 μ m.



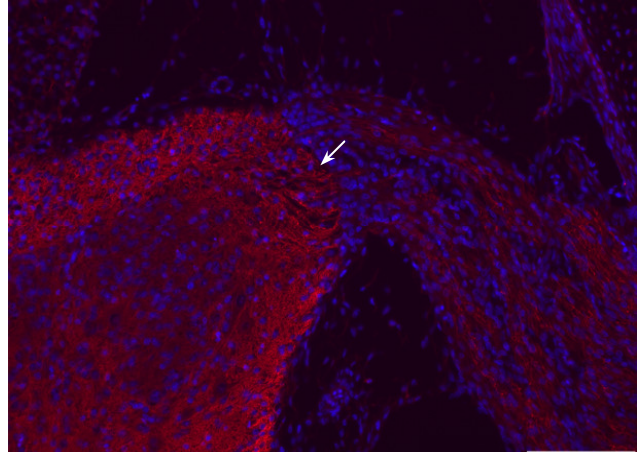
Az ezt követő stádiumokban folyamatosan növekszik a phosphacan immunopozitív területek aránya a gerincvelőben (15. ábra). A HH28 stádiumban feltűnő a belépési zóna erős jelölődése, míg a tetőlemezben alig mutatható ki (15. ábra A, A'). A HH35 stádiumban kontrasztos különbség érzékelhető a dorsalis és a ventralis gerincvelőfél phosphacan reakciójában (15. ábra B), mely szerint a hátsó szarvban és a funiculus dorsalisban sokkal gyengébb reakció látható. Némileg erősebb a jelölődés a canalis centralist övező sejtek körüli X. laminában (15. ábra B').



15. ábra. Phosphacan immunofluoreszcens jelölés (vörös) a (A) HH28, (B) HH35 és a (C) HH39 stádiumokban. Az A', B' és C' panelek a felettük levő képek kinagyított részletét mutatják. A HH28 stádiumban az alaplamezben, a fehérállományban és a belépési zónában (fehér nyilak) láthatunk immunopozitív jelet (A, A'). A phosphacan egyre több területen jelenik meg a későbbi stádiumokban (B B'); a szürkeállományban főleg a canalis centralis körül találunk intenzív jelölődést (zöld nyilak), a legkésőbb a szürkeállomány hátsó szarva lesz pozitív (C), míg a mellső szarvban minden sejt körül ki lehet mutatni a phosphacant (C'). Skála: 50 μ m.

Az expresszió még fokozottabb a HH39 stádiumban (15. ábra C), ahol gyakorlatilag minden sejt körül megtalálható (15. ábra C'). A hátsó szarvban látszólag gyengébb jelet tudunk detektálni, míg a fehérállomány erős reakciót mutatott. Ebben a stádiumban a perifériás idegek is phosphacan tartalmaznak, de a reakció jóval erősebb a belépési zónában (16. ábra).

16. ábra. Phosphacan immunreakció (vörös) a HH39 stádiumú lumbalis gerincvelő belépési zónájában. A perifériás idegben levő gyengébb jel a belépési zónában erősebbé válik (nyíl). Skála: 50 μ m.



5.3. A hialuronsav változása a nervus vestibularis regenerációja során

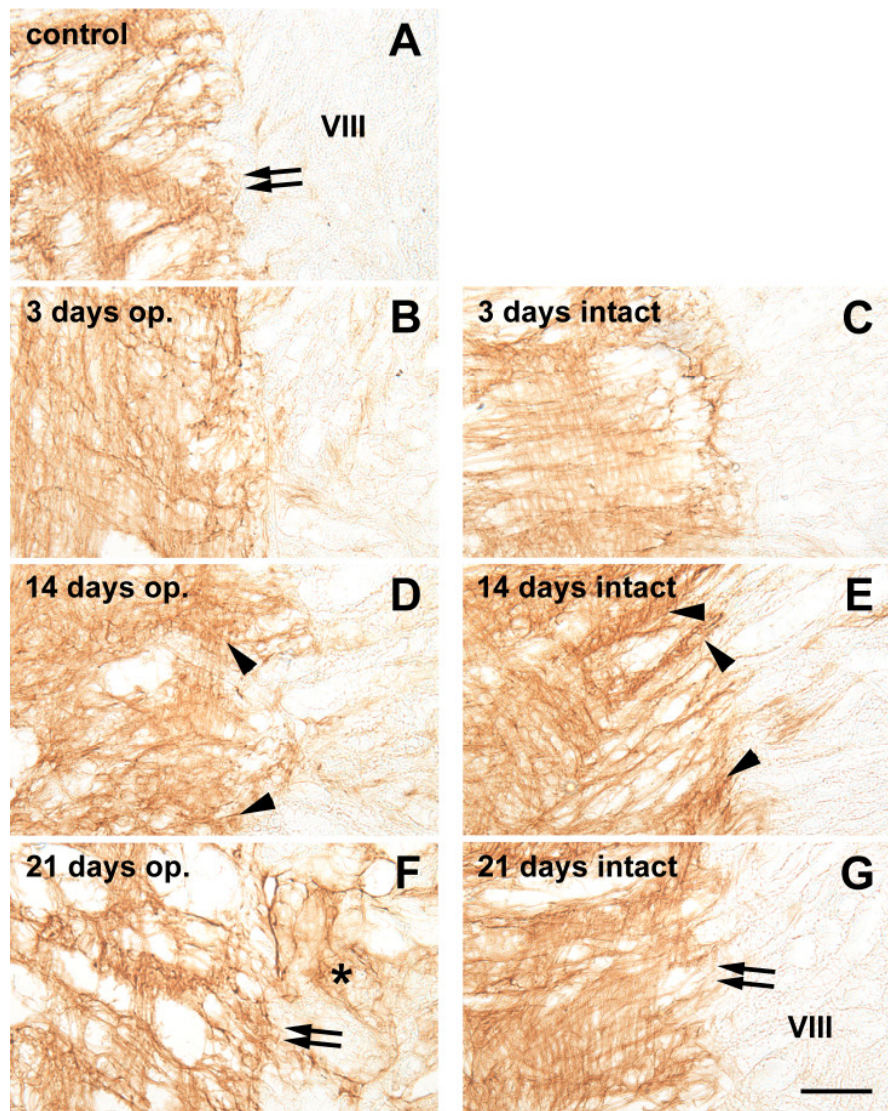
5.3.1. A hialuronsav normál eloszlása a béka idegrendszerében

Előző munkáink során feltártuk (Matesz és mtsai 2005; Szigeti és mtsai 2006), hogy a nervus vestibulocochlearis nem tartalmaz kimutatható mértékben hialuronsavat, míg erős jelet kaptunk a belépési zónában. A fehérállomány hialuronsavban gazdagnak bizonyult, különösen azokon a területeken, ahol a tractus vestibulocochlearis, vestibulospinalis és vestibulocerebellaris idegpályák futnak. A vestibularis magokban a hialuronsav megoszlására jellemző volt, hogy egyrészt a perikarion körül volt megtalálható (a perineuronális háló részeként), másrészt a neuropil-ben adott finom szemcsézett jelet.

5.3.2. A hialuronsav mennyisége változott a belépési zónában az axotomiát követően

Az axotomiát követő harmadik napon a bHABC hisztokémiai reakció optikai denzitása némileg gyengült a nem műtött állathoz képest. Ez a gyengülés a műtött és kisebb mértékben a nem műtött oldalon is mérhető volt. Az optikai denzitás ezt követő napokban növekedést mutatott, mely az 5. napon volt mérhető ($P < 0,05$, t-próba) (17. ábra A, B, C, 20. ábra A). A növekedés ütemét nézve az operált oldalon kissé nagyobb volt a változás mértéke. A 7. napon a hialuronsav reakció újabb csökkenését tapasztaltuk, ez azonban nem mondható szignifikánsnak ($P > 0,05$, t-próba). A belépési zónában a 14. napon tudunk a legnagyobb optikai denzitás értékeket mérni mindkét oldalon (17. ábra D, E). A növekedés szignifikánsnak volt mondható ($P < 0,01$, t-próba). A 14-21. napi postoperatív időszakban a bHABC optikai denzitása a nem műtött állatokban mért érték közeléig csökkent ($P < 0,01$, t-próba) (17. ábra F, G). Az axotomiát követő 21. nap után a hialuronsav relatív mennyiségének változásában már nem tudunk szignifikáns különbségeket kimutatni optikai denzitás mérések alapján (21-84. nap, emelkedés lineáris regressziója, ANOVA, $P > 0,05$). A belépési zóna perifériáján a hialuronsav reakció gyenge jelet adott az axotomiát követő napokban, mely a 14. naptól kezdődően erősödést mutatott, és maximumát a 21. postoperatív napon érte el (17. ábra F).

17. ábra. bHABC hisztokémiai reakció a nervus vestibulocochlearis belépési zónája körül a (A) kontroll állatban (B, D, F) az nervus vestibulocochlearis átvágása után az operált és (C, E, G) az épen hagyott oldalon a (B, C) 3., a (D, E) 14. és a (F, G) 21. postoperatív napon. A kettős nyilak a belépési zónát jelölik. A nyílhegy a 14. napon a HA reakció intenzitásának növekedését jelzi az ép és operált oldalon. A csillag a nervus vestibulocochlearis perifériás részén jelzi a HA reakció intenzitásának emelkedését a 21. napon az operált oldalon. VIII: a nervus vestibulocochlearis perifériás része. Skála: 25 µm.

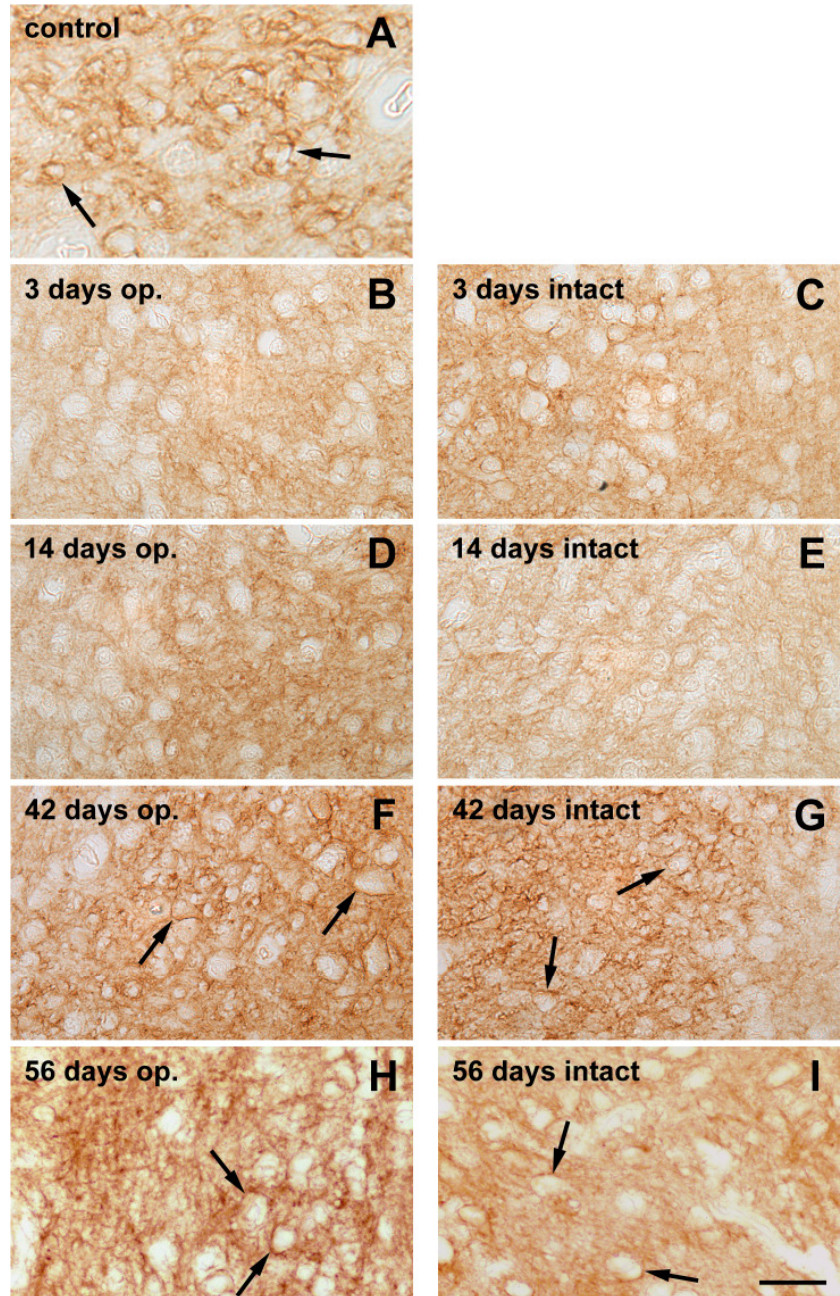


5.3.3. A hialuronsav és változása a nucleus vestibularis medialisban

Az axotomiát követő napokban a hialuronsav nem volt megtalálható a perineuronális hálóban (18. ábra A, B, C). Ez nem csak strukturális változást jelentett azonban, hanem a hialuronsav reakció optikai denzitásának csökkenésében is megmutatkozott. Hasonlóan a belépési zónához, az operált oldalon nagyobb mértékben jelentkezett a változás (18. ábra B, 20. ábra B). Ezen csökkenés az 5. napon a nem operált állathoz hasonló optikai denzitás értékekre növekedett ($P < 0,05$, t-próba). Ezt követően csökkenés következett, így a 7. és 14. napokon mértük a legkisebb optikai denzitását a hialuronsav reakciónak ($P < 0,0001$, t-próba). A 14. postoperatív napot követően mindkét oldalon gyors növekedést mértünk az optikai denzitásra vonatkozóan (18. ábra D, E). A növekedés trendje a 42. napig folyamatos volt, míg elérte a kontroll közeli értéket (ANOVA, $P < 0,0001$). Ezen mért értékekkel együtt változott a morfológiai kép is a 14-42. napokon, vagyis a hialuronsav újból kimutatható volt a

perineuronális hálóban (18. ábra F, G). Az optikai denzitás értékek a továbbiakban nem mutattak szignifikáns változást a kontrollhoz képest (ANOVA, $P > 0,05$), kivéve egy esetet, amikor az 56. napon a nem operált oldalon szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (18. ábra H, I).

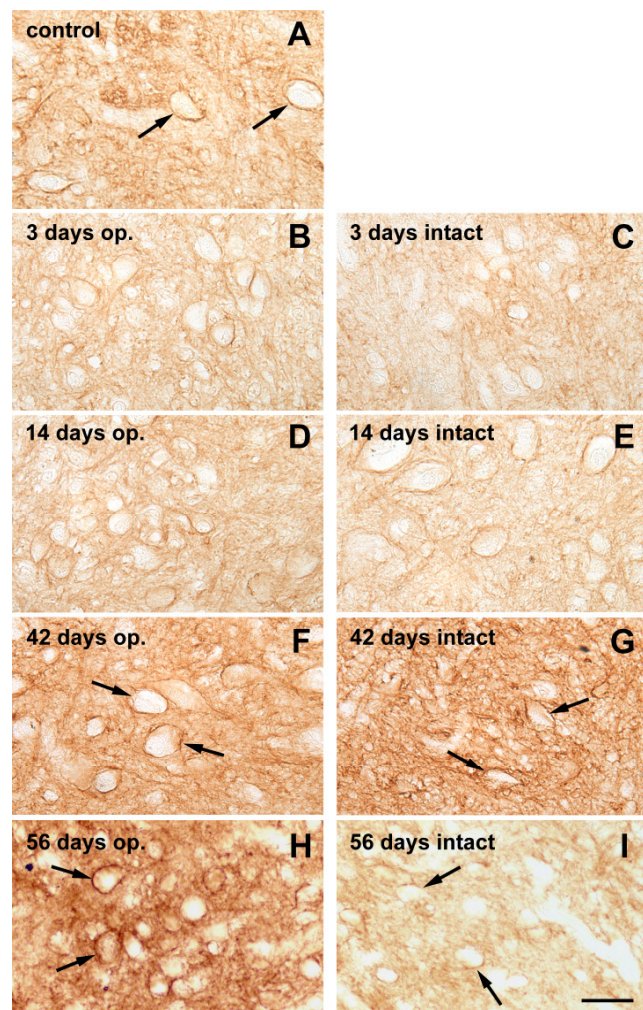
18. ábra. bHABC hisztokémiai reakcióval történt HA kimutatás a nucleus vestibularis medialisban (NVM) a (A) kontroll állatokon és a kezelt állatokon az (B, D, F, H) operált és az (C, E, G, I) épen hagyott oldalon az operációt követő (B, C) 3., (D, E) 14., (F, G) 42. és az (H, I) 56. napokon. A nyíl a perineuronális hálót mutatja. Az operációt követő 14. (D, E) napon a HA reakció által jelzett perineuronális háló dezorganizációja figyelhető meg, amely a 42 (F, G) és 56 (H, I) napokra újjáépül. Skála: 25 μm .



5.3.4. A hialuronsav eloszlásának és relatív mennyiségének változása a nucleus vestibularis lateralisban

A hialuronsav reakció a perineuronális hálózatban nagyon hasonló morfológiát mutatott a lateralis magban a medialisban tapasztaltakéhoz (19. ábra, 20. ábra C). A bHABC hisztokémiai reakció optikai denzitás értékei is tendenciájukat nézve nagyon hasonlítottak a medialis nucleuséhoz (19. ábra B, C). Hasonlóan a nucleus vestibularis medialisához az 5. napon a kontrollhoz hasonló értékre növekedett a hialuronsav reakció optikai denzitása ($P < 0,01$, t-próba). A lateralis magban is a 7. és 14. napokon mértük a legkisebb denzitás értékeket, mind az operált, mind pedig az ép oldalon (19. ábra D, E). A 14. napot követően mind nagyobb és nagyobb értékeket kaptunk, egészen a 28. napig, amikor is a maximum optikai denzitást kaptunk, amely meghaladta a nem műtött állatban tapasztaltat is ($P < 0,0001$, t próba). Az optikai denzitás értékek a továbbiakban nem mutattak szignifikáns változást a kontrollhoz képest (ANOVA, $P > 0,05$) (19. ábra F, G), kivéve azt az egy esetet, amikor az 56. napon – hasonlóan a medialis nucleusban mért értékhez képest – a nem operált oldalon szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (19. ábra H, I, 20. ábra C).

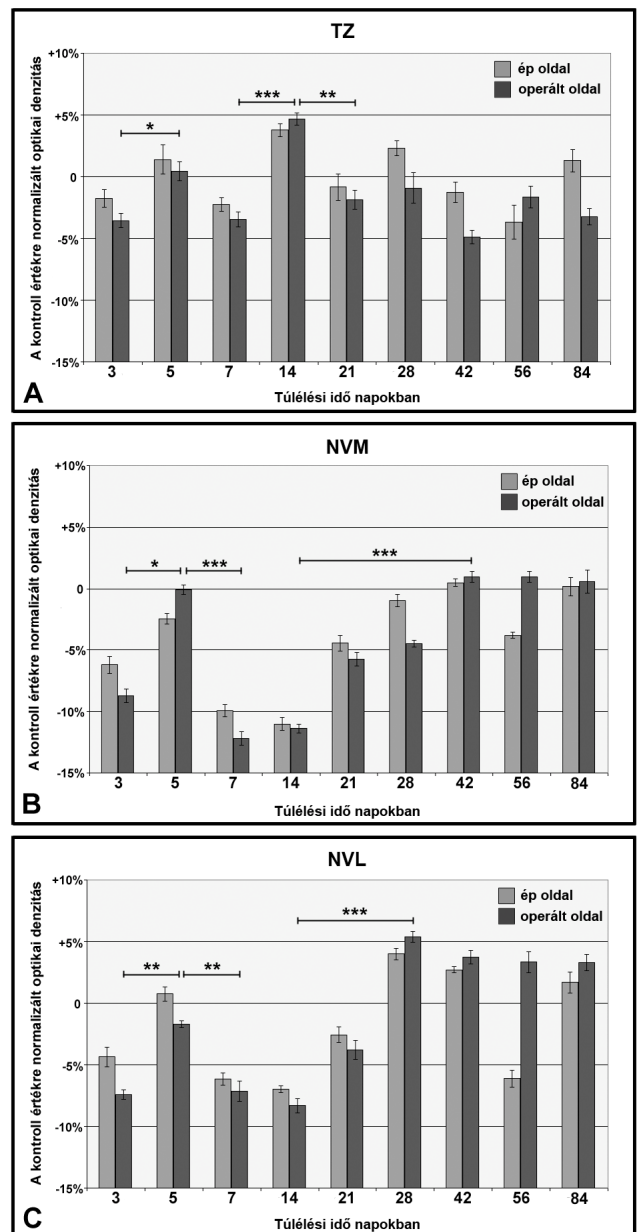
19. ábra. bHABC hisztokémiai reakcióval történt HA kimutatás a nucleus vestibularis lateralisban (NVL) a (A) kontroll állatokon és a kezelt állatokon az (B, D, F, H) operált és az (C, E, G, I) épen hagyott oldalon az operációt követő (B, C) 3., (D, E) 14., (F, G) 42. és az (H, I) 56. napokon. A nyilak a perineuronális hálót mutatják. Az operációt követő 14 napon a perineuronális háló dezorganizációja figyelhető meg, amely a 42. napra újjraszerveződik. Az 56. napon a nem operált oldalon az idegsejtek körüli perineuronális háló kevésbé fejlett, mint az operált oldalon. Skála: 25 μm .



5.3.5. A hialuronsav eloszlási mintázatának változása az operált és ép oldalon

Korábbi vizsgálatok eredményeképpen ismert, hogy a két oldalon levő vestibularis magok commissuralis rostok által kapcsolatban vannak egymással (Ladpli és Brodal 1968; Grofova és Corvaja 1972; Dieringer és Precht 1979; Vidal és mtsai 1998), így összehasonlítást végeztünk a lehetséges kölcsönhatásokat felderítése érdekében a hialuronsav reakcióban a két oldal között. A Fisher megfélelési próba azt mutatta, hogy a bHABC hisztokémiai reakció optikai denzitás értékeinek változása az operált és az ép oldal között nem független egymástól (mindhárom régióban: MVN, LVN, TZ: $P < 0,01$). Ezért elmondható, hogy az ép oldalon tapasztalt változások is az axotómia miatt következtek be.

20. ábra. A nervus vestibulocochlearis (A) belépési zónájában, (B) nucleus vestibularis medialisban és (C) lateralisban a hialuronsav reakció optikai denzitásának változása. Az átlagértékek a kontroll optikai denzitásához képest vannak feltüntetve, az egyes oszlopokon a szórás értéke adja a hibasávokat. A 0 értéke a kontrollállatok optikai denzitása a különböző vizsgált napokon. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$). **A.** Nincs szignifikáns különbség a 24-84 túlélési napok értékei között (lineáris regresszió analízis, ANOVA, $P > 0,05$). A változások az ép és az egészséges oldal értékei között nem egymástól függetlenek (Fischer féle megfélelőségi teszt $P > 0,05$). **B** Nem mutatható ki szignifikáns trend az optikai denzitás értékekben a 42-84 napokon az operált oldalon (lineáris regresszió analízis, ANOVA, $P > 0,05$). A változások az ép és az egészséges oldal értékei között nem egymástól függetlenek (Fischer féle megfélelőségi teszt $P < 0,05$). **C** Nem mutatható ki szignifikáns trend az optikai denzitás értékekben a 28 nap után az operált oldalon (lineáris regresszió analízis, ANOVA, $P < 0,05$). A változások két oldal értékei között nem egymástól függetlenek (Fischer féle megfélelőségi teszt $P < 0,05$).



6. Megbeszélés

6.1. A hialuronsav a fejlődő gerincvelőben

A HA heterogén megoszlását találtuk a gerincvelő fejlődése során mind a szürke, mind pedig a fehérállományban. Ezen túlmenően a HA expresszió az életkor előrehaladtával is változott, mind annak relatív mennyisége, mind pedig a HA pozitív területek nagyságát illetően. Adataink és más szerzők adatai is azt mutatják, hogy a neuruláció kezdetén a formálódó velőcső kevés HA-t tartalmaz (Bakkers és mtsai 2004; Brown és Papaioannou 1993). A HA ezután egyre nagyobb mennyiségben jelenik meg a gerincvelőben, amely a HH23 stádiumban jól megfigyelhető réteges elrendeződést mutat, mintegy körbeveszi a canalis centralis körül levő proliferáló sejteket. Ezen sejtpopulációtól laterális irányban a differenciálódó sejteket találjuk, így a két populáció gyakorlatilag HA-ban gazdag ECM-al van elválasztva egymástól. Az egyelőre kérdés, hogy az intermedier zónában mért nagy HA mennyiség a sejtciklus S fázisában levő proliferáló sejtek terméke vagy a már lefűződött differenciálódó (Lim1, 2 és MNR2 pozitív) sejteké. Az is kérdéses, hogy itt a HA a proliferáló sejtekben a proliferációt, a differenciációt vagy a laterális migrációt segíti. Rendelkezünk néhány adattal a HA jelenlétéről a fejlődő idegrendszerben (Toole 1997). Ezek feltételezik, hogy a HA a neuronok differenciálódáshoz szükséges faktor, ennek pontos mechanizmusa azonban nem ismert. Valószínűnek látszik az, hogy a HA egy erősen hidratált környezetet hoz létre a sejtek körül elősegítve ezzel migrációjukat. Ezt az elméletet alátámasztani látszik az az adat, amelyben az egér fejlődő cerebellumában a HA jelenlétét írták le migráló neuronok útvonalán (Baier és mtsai 2007). Több, nem neuronális sejttípusban leírták, hogy a migrációs folyamatokban a HA CD44 és RHAMM receptorain keresztül közvetített jelátvitel során kis GTPáz enzimeket aktivál, melyek a citoszkeleton újraszerveződését eredményezik, és ez lamellipodium kialakulásához vezet (Oliferenko és mtsai 2000; Ridley 2001). A csirkeembrió gerincvelőben a HA-ban gazdag intermedier zónában nem találtunk sem CD44 sem pedig RHAMM immunopozitivitást, így továbbra is kérdéses, hogy a HA önállóan vagy mely más molekulák segítségével fejti ki hatását a differenciálódó neuronokra. Az itt jelenlevő HA HAS2 és HAS3 enzimek révén akkumulálódik a sejtek köré, melyet RT-PCR segítségével igazoltunk. A differenciált idegrendszerre jellemző, hogy a neuronok felelősek a HA termeléséért (Carulli és mtsai 2006; Galtrey és mtsai 2008). Ezek alapján a HAS2 autokrin módon való hatását feltételezzük a fejlődő idegrendszerben is.

A HH23 stádiumot követően a HA pozitív területek nagysága folyamatos csökkenését tapasztaltuk a későbbi stádiumokban egészen a HH34 stádium eléréséig, ahol a HA nem

mutatható ki a gerincvelőből. Ezzel párhuzamosan a HAS2 és HAS3 mutat némi expressziót, de azok csökkent mértéke a többi stádiuméhoz képest szembevetendő. Ellentmondás van tehát abban, hogy ebben a stádiumban hisztotechnikai módszer segítségével nem, míg PCR módszerrel tudunk HA vagy HAS expressziót kimutatni a gerincvelőből. Az ellentmondás feloldására három magyarázat szolgálhat. Egyrészt eltérő lehet a technikák érzékenysége, ami RT-PCR-rel még kimutatható az esetleg már a HA próba használatával már nem. Másrészt az RT-PCR segítségével a HAS enzimek mRNS-ét detektáltuk nem a működőképes fehérjét, így elképzelhető az is, hogy ott van az enzim a sejtekben, de nem aktív. Harmadrészt pedig látható, hogy ebben a stádiumban is jelentős HA kötő lektikán expressziót találunk, amely a HA-hoz kötődve elfedheti a kötőhelyeket a bHABC elől, ezért nem tudjuk kimutatni a HA-t a használt módszer segítségével.

A HH34 stádiumtól kezdődően a HA fokozódó jelenléte mutatható ki, mely a HH39 stádiumban eléri a maximális HA lefedettséget, ahol a gerincvelőben gyakorlatilag minden sejt körül megtalálható. A synaptogenesis kritikus periódusának vége egybeesik a HA és a hozzá kötött lektikánok felhalmozódásával a neuronok körül vagyis a formálódó perineuronális háló kialakulásával (Pizzorusso és mtsai 2002). A perineuronális háló kialakulását általában a postnatalis életkorokra teszik (Celio és Blümcke 1994; Bandtlow és Zimmermann 2000; Brückner és mtsai 2000; Carulli és mtsai 2007). Ezen tanulmányok azonban olyan agyterületeket vizsgálnak, melyek a postnatalis élet során fognak funkcionálni. A csikeembrió gerincvelőben ezzel szemben már az embrionalis élet végén a HH39 stádiumban igen fejlett perineuronális hálót találunk. Ez a látszólagos ellentmondás feloldható azzal a ténnyel, hogy a csirke a kikelés pillanatában már képes a lépőmozgásokra. Így nagyon valószínű az, hogy a synaptogenesis kritikus periódusa a gerincvelőben az embrionalis életre tehető (Hanson és mtsai 2008).

A HA pozitivitás az idegsejtek axonjai körül is különbségeket mutat mind a fejlődés során, mind pedig azonos fejlődési stádium eltérő helyein. A perifériás idegekben és azok be- és kilépési zónáiban sem tudunk HA-t kimutatni egyik vizsgált fejlődési stádiumban sem, jóllehet a motoneuronok perikaryonja körül pozitív volt a reakció. Ez a HAS polarizált expresszióját feltételezi az egyes neuronokban, mivel ezekben a stádiumokban nem valószínű a differenciált oligodendroglia jelenléte, amelyek a HA-t akumulálhatnák az idegsejtek köré, mivel azok később jelennek meg (Pringle és Richardson 1993; Ono és mtsai 1995). A fehérállományban a HH34 stádium eléréséig a funiculus lateralis mutat erőteljes HA pozitivitást, melyek eredő sejtjeinek egy része is HA-ban gazdag szürkeállományban található (Shiga és mtsai 1995), másik részük valószínűleg a formatio reticularisban található

és leszálló pályát képez a fejlődő tractus reticulospinalis révén (Okado és Oppenheim 1985). A HH34 stádiumtól kezdődően a fehérállomány csupán egy homogén halvány jelet ad, mely a későbbi stádiumokban sem változik.

6.2. A hialuronsav változása az ideg regeneráció során

A HA idegnövekedésre és a synaptikus plaszticitásra gyakorolt hatását kecskebékák regenerálódó nervus vestibulocochlearis belépési zónájában, és ezen primer afferenseket fogadó vestibularis magok közül a nucleus vestibularis medialisban (NVM) és lateralisban (NVL) vizsgáltuk. A HA reakció intenzitásában megfigyelt változások azt mutatták, hogy a HA szerepet játszik a vestibularis magok funkciójának helyreállításában, a szenzoros bementük elvesztése után. A metszeteken mért HA optikai denzitása nem a HA abszolút mennyiségét mutatja meg, azonban ezzel a technikával a mért helyen a reakció intenzitása tájékoztató adatokat nyújt az adott molekula relatív mennyiségéről (Felszeghy és mtsai 2000; Klekner és mtsai 2005). Ennek megfelelően a nagyobb optikai denzitással rendelkező HA reakció nagyobb HA koncentrációt jelent a mért helyen. Másrésztől nem szabad megfeledkeznünk a bHABC speciális HA kötődéséről sem, vagyis ugyanazokon a helyeken köti a HA-t, ahol a lektikánok. Azokban a szövetekben, ahol nagyon magas lektikán tartalom ott ezen PG-k által kötött HA a próba számára nem mindenhol hozzáférhető, mintegy maszkírozzák a reakciót (Lammi és mtsai 2001).

6.2.1. A belépési zóna bHABC reakció optikai denzitásának változása

A nervus vestibulocochlearis postganglionáris lézióját követően korrelációt tudtunk kimutatni a regeneráció és a belépési zóna HA reakció optikai denzitása között. A HA valószínű, hogy sohasem önmagában van hatással az ideg regenerációra, hanem más molekulákkal kölcsönhatásban. Ezek együttese fogja meghatározni a HA permisszív vagy éppen non-permisszív hatását a regenerálódó rostokra (Kaaijk és mtsai 1997; Hartmann és Maurer 2001; Rhodes és Fawcett 2004). Az idegek átmeneti zónájának ECM összetétele az alacsonyabbrendű gerincesekben nem teljesen tisztázott, bár előzetes munkáink eredményeképpen rendelkezünk a HA-ra vonatkozó adatokkal (Szigeti és mtsai 2006). Azok a változások, melyeket a HA optikai denzitásában mértünk a belépési zónában a primer afferens rostok regenerációja során rávilágít arra, hogy ez a megváltozott makromolekuláris struktúra megengedő környezetet teremt az újonnan benövő rostok számára. Azt azonban nem tudjuk pontosan, hogy a regeneráció ideje alatt miért ingadozik a HA optikai denzitása. Valószínű, hogy a sterikusan jelenlevő HA változásával függ össze, melynek magyarázatára több elmélet

is létezik. Egyfelől a HA receptorai segítségével kötődik a sejtek felszínéhez, melyek jelenlétét az axonok filopodium migrációja során leírtak mind fejlődés, mind a regeneráció során (Jones és mtsai 2000). A receptorok mennyiségének változása egyrészt a HA kötése révén a bHABC segítségével kimutatható HA mennyiségét befolyásolhatja, másrészt a HA receptorok jelátviteli folyamatai hatással lehetnek az extracelluláris térbe történő HA akkumulációjára. A változások ezen molekulák expressziós profiljában kapcsolatban állhatnak az eltérő vastagságú és növekedési sebességű és dinamikájú regenerálódó axonokkal.

A HA kimutathatósága az ECM-ben a lektinok mennyiségének jelenlétével is változhat a belépési zónában. Az emlősök központi idegrendszere gazdag ezekben a PG-okban, illetőleg hasonló adatokkal rendelkezünk a béka esetében is bár itt lényegesen más lehet a PG összetétel. A nervus vestibularis léziót követően ezek a PG-HA kapcsolatok módosulhatnak, ami jelenthet több, a próba által köthető HA-t. Ez magyarázatul szolgálhat a léziót követő 5. napon a HA optikai denzitásának növekedésére. Feltételezhetően több szabad HA jelenik meg ebben az időszakban, mely segítheti a benövő rostok regenerációját, ahogyan ezt más kísérletek során is megfigyelték (Milev és mtsai 1998; Zuo és mtsai 1998; Kopranner és mtsai 2000; Mohammad és mtsai 2000; Pfeiler és mtsai 2002).

A HA permisszív szerepét ugyancsak igazolni látszik a belépési zóna perifériás részében a pozitív HA reakció megjelenése a 14. napon, mely maximális intenzitását a 21. napon éri el. Ez megelőzi a pionir regenerálódó axonok megjelenését a központi idegrendszerben, amely a 4. héten történik meg (Sperry 1945; Zakon és Capranica 1981). Nem bizonyított, csupán feltételezzük, hogy itt nagyrészt szabad HA-t mutattunk ki, mely facilitálja a benövő vestibularis rostokat a központi idegrendszerbe, hasonlóan az embrionalis fejlődés során tapasztaltakhoz. (Milev és mtsai 1998; Zuo és mtsai 1998; Kopranner és mtsai 2000; Sander és mtsai 2001; Pfeiler és mtsai 2002). E permisszív hatása a HA-nak azon receptoraihoz kötött folyamat révén valósul meg, melyek a növekedési kúpban expresszálódnak. Itt főként a CD44-nek lehet nagy szerepe, hiszen ez a receptor az intracelluláris részével aktinhoz kötődik, mely alapvető a növekedési kúp kialakulásában (Nagy és mtsai 1995; Jones és Jones 1997; Moon és mtsai 2004).

6.2.2. A HA optikai denzitásának változása a vestibularis magokban (NVM és NVL)

A nervus vestibulocochlearis axotomiát követően a HA reakció intenzitásának változása egyben HA strukturális változásával is járt a PNN-ben. Ez egyben azt is jelenti, hogy a HA mennyiségének változása főként az idegsejteket körülvevő pericellularis mátrixot érinti. A

HA reakció optikai denzitásának csökkenése a léziót követő napokban egyúttal PNN dezorganizációt is eredményezett. Feltételezhető, hogy a PNN synaptogenesis-re gyakorolt repulzív hatását igyekeznek az idegsejtek feloldani, hogy új synapsisok létrejöttét segítsék ezzel (Fox és Caterson 2002; Pizzorusso és mtsai 2002; Massey és mtsai 2006). Az operációt követő 14. napon a PNN újraszerveződését tapasztaltuk, mely együtt járt a HA optikai denzitásának emelkedésével is. Ez a folyamat az újraalakult synapsisok stabilizálásában játszhatna szerepet, azonban mint említettem az első benövő axonok csak az operációt követő 4. héten jelennek meg (Sperry 1963; Zakon és Capranica 1981), továbbá neurbiotinnal jelölt bouton-okat csak az operációt követő 8. héten tudtunk kimutatni a vestibularis magokban. Ez tehát biztosan nem a primer afferensek stabilizálására szolgáló folyamat. Valószínű, hogy a vestibularis magokba kollateralisokat adó idegpályák axonalis sprouting-ja jelentkezik ebben az időszakban, ahogyan az a labirintus irtás után jelentkezik (Dieringer 1995).

A HA optikai denzitásának csökkenése a nem operált oldalon az operációt követő 56. napon nem interpretálható egyszerűen. Lehetséges az, hogy a primer afferensek elérve a vestibularis magokat a 8. héten okozzák az ellenoldali vestibularis magok neuronjait körülvevő PNN HA csökkenését egy eddig ismeretlen mechanizmussal a commissurális összeköttetések révén (Jones és Jones 2000).

A vestibularis magokban a változásokat az indukálhatja, hogy ezek a magok elveszítik fő stimulusukat a primer afferensek felől (Dityatev és Schachner 2003). Ezek a változások sokféle választ válthatnak ki az idegsejtekből, így például regulálhatják a HA szintézist a HAS enzimek szabályozása útján. A HAS enzimek membránhoz kötött enzimek és a szabad HA receptoraiként is funkcionálhatnak (Klewes és Prehm 1994; Al'Qteishat és mtsai 2006; Carulli és mtsai 2006) megteremtve ezzel a sejt- ECM kapcsolatot az idegsejtek PNN-jében. Az újonnan benövő rostok a postsynaptikus neuronon újabb változásokat generálnak, mely folyamatokban a CD44 szerepét leírták (Kaaijk és mtsai 1997; Lynn és mtsai 2001).

A PNN ECM komponenseinek regulációja egy ettől eltérő folyamat eredménye is lehet. A synaptikus kapcsolatok megváltozása aktiválhatja a mátrix metalloproteinaz (MMP) és ehhez hasonló hialuronidáz enzimeket, mely az ECM alkotók emésztése útján szabályozza a neuron-neuron illetve a neuron-astrocyta kapcsolatokat (Frame és mtsai 2002; Wright és mtsai 2002). A deafferentált vestibularis neuronok megváltozott synaptikus aktivitása ehhez hasonló változásokat is eredményezhet a PNN-ben a HA és egyéb ECM komponensei struktúrájának és molekuláris rendezettségének alakulásában.

A nervus vestibularis regenerációja során a HA reakció optikai denzitása különbségeket mutat a NVM és NVL között, amennyiben a NVL-ben gyorsabban és nagyobb mértékben

növekszik a reakció optikai denzitása. A különbségeket okozhatja az is, hogy rendszerint a NVL fogadja a legtöbb regenerálódó rostot a vestibularis magok közül (Newman 1986), így több újonnan létrejött synaptikus kapcsolattal rendelkeznek. Ez vezethet oda, hogy a NVL magban korábban áll helyre a PNN, mint a NVM-ben. Az NVL-ben a HA reakció nagyobb optikai denzitását okozhatja a fogadott afferensek különböző volta is. Ennek megfelelően a NVL a fő állomása az utriculus maculájából érkező primer afferensek, mely az egyensúly megtartásáért elsődlegesen felelős rendszer, és a NVL a legtöbb rostot küldi a gerincvelő felé a tractus vestibulospinalis révén (Toth és mtsai 1985; Montgomery 1988; Ikegami és mtsai 1994; Fanardjian és mtsai 1999). Ennek megfelelően a nervus vestibularis átvágását követően először testtartási zavarok jelentkeznek a műtött állaton. Összefüggés lehet a NVL HA reakciójának gyorsabb és nagyobb arányú növekedése és a testtartási tünetek helyreállítása között, melyben ugyancsak a NVL játszik fő szerepet.

6.2.3. A HA változása az ép és operált oldali vestibularis magokban és a belépési zónában

A nervus vestibulocochlearis regenerációja során a HA reakció denzitása változott az operált és az ép oldalon is mind a vizsgált vestibularis magokban, mind pedig a belépési zónában. Ismert, hogy az axon sérülését hegszövet kialakulása kíséri a sérülés helyén, melyet az idegszövet glia és más nem neuralis eredetű sejtjei alakítják ki. A hegszövet sejtjeinek citokinjei és más szekrétumai a keringésbe kerülve eljutnak más közeli szövetekhez, így akár az ellenoldali vestibularis magokhoz is (Liberto és mtsai 2004; Silver és Miller 2004; Niclou és mtsai 2006; Pizzi és Crowe 2007). Másrésről a kétoldali vestibularis magok commissuralis rostok által összeköttetésben állnak egymással, így az egyik oldalon okozott beavatkozás változást fog okozni az ellenoldali vestibularis magokban is a megváltozott neuronális aktivitás útján (Grofova és Corvaja 1972; Dieringer és Precht 1979). A neuronális aktivitásban történt változások a HA és más ECM alkotók változását eredményezheti mind a két oldali vestibularis magokban. Hasonló kétoldali változást már leírtak a HA receptorokban egér hippocampusban, ahol az egyik oldali fornixon végezték el az átvágást (Jones és Jones 2000).

6.3. A kondroitin-szulfát proteoglikánok a fejlődő idegrendszerben

A HA az ECM-ben csak ritkán található meg szabad formában, általában fehérjékhez, főként proteoglikánokhoz kötötten fordul elő. Ezek a PG-k a lektikánok melyek N-terminalis G1 doménjükkel a HA-hoz, míg C-terminalis végükkel más mátrix fehérjékhez (főleg

tenascinhoz) vagy sejtfelszíni fehérjékhez kötődik. A molekula középső része szulfatált GAG molekulákat, főként kondroitin-szulfátot köt változó mennyiségben. Ezek a CS oldalláncok okozzák a PG-k polianionos karakterét, mely fontos szerepet tölthet be a sejtek körüli megfelelő ionkoncentráció fenntartásában. A lektikánok CS tartalma tág határok között változik, így a sejtek nemcsak egy adott PG expressziójának fokozásával vagy csökkentésével tudják regulálni a maguk vagy a szomszédos sejtek köré akkumulált CS mennyiségét, hanem a központi tengelyfehérje változtatásával is. Ennek megfelelően a neurokán és a brevikán expresszióval viszonylagosan kevesebb CS oldalláncuk miatt kevésbé anionosak, míg a versikán és főleg az aggregkán erősebb anionos karakterrel bírnak. Kísérleteinkben CS elleni monoklonális antitestet használtunk, mellyel az összes CS tartalmú PG expressziója vizsgálható egyidejűleg. Azonban nem csak a HA kötő lektikánok rendelkeznek CS oldallánccal, hanem a phosphacan is, melynek főként a mátrix fehérjék foszforilációján keresztüli ECM organizációjában van szerepe. A lektikánok és a phosphacan tehát funkciójukban teljesen külön csoportot képez, így a phosphacan expresszióját a gerincvelő differenciálódása során külön is vizsgáltuk.

A fejlődő csirkeembrió gerincvelő minden stádiumában gazdagon tartalmaz CS-ot, melynek jelenlétét mind immunohisztokémiai, mind pedig biokémiai módszerekkel kimutattuk. A CS immunoreaktivitás némileg átfedést mutatott a HA reaktív területekkel. A HH23 stádiumban az intermedier zóna is erős CS reakciót mutatott hasonlóan a HA-hoz. Ez a terület jelenti a tulajdonképpeni laterális határát az osztódó sejtek zónájának az innen lefűződő differenciálódó sejtek radialis irányba migrálnak. Valószínű, hogy a CS ebben a régióban található lektikánok GAG oldalláncait alkotja. A lektikánok a fejlődő idegrendszerben sejtmigrációt gátló hatását írták le, ezek a tanulmányok azonban a crista neuralis sejtek migrációját gátló hatásáról emlékeznek meg és nem a központi idegrendszerben található sejtekről (Landolt és mtsai 1995, Oakley és Tosney 1991, Perris és mtsai 1991). Az osztódó sejtek körül található PG-ok szerepe nem teljesen tisztázott. A HA megnövekedett expressziója kapcsán felállított hipotézisünk helytállóságát sem bizonyítani sem pedig cáfolni nem tudják a CS-leleteink. Ha azonban a CS hasonló hatását feltételezzük a neuroblasztokra és a glioblasztokra, mint a crista neuralis sejtekre, úgy valószínűsíthető, hogy a CS az osztódó sejtek izolációjáért lehet felelős. Erre utal a canalis centralishoz közel eső sejtek basalis felszínén talált erős CS reakció, mely valószínűleg a lefűződött leánysejtek canalis centralis felé történő migrációját akadályozhatja meg. A CSPG-k a sejtmigráció akadályozása mellett a neuroprogenitor sejtek osztódóképességét is csökkentik (Sirko és mtsai 2007). E gátló hatásukat a CS oldalláncok biztosítják, mivel ez a proliferációt gátló hatás felfüggeszthető a

CS szelektív emésztésével kondroitináz-ABC kezeléssel. A CS GAG-ok hatásukat valószínűleg nem közvetlenül fejtik ki, hanem növekedési faktorok, mint potenciális ligandumaik szabályozása útján. Ilyen potenciális ligandum lehet a CS oldalláncoknak a HB-GAM/PTN (heparin binding growth association molecule/pleiotrophin), melynek a phosphacan CS oldalláncaival történő kölcsönhatását igazolták (Maeda és mtsai 1994). Később a neurokánról is bizonyították, hogy HB-GAM, amphoterin és más heparin kötő fehérjéket képes kötni a fejlődő idegrendszerben (Merenmies és mtsai 1991, Milev és mtsai 1998a). Ezen CS-növekedési faktor kölcsönhatások döntően befolyásolják a növekedési faktorok hatékonyságát. Kondroitináz-ABC kezelés ezekben az esetekben szinte teljes mértékben gátolni tudja a növekedési faktorok által kiváltott jelátvitelt (Milev és mtsai 1998a).

A HH23 stádiumban a phosphacan immunoreaktivitás a HA gazdag intermedier zónában található meg, ezen kívül a radier gliasejtek mentén főként az alaplemezen. Ezen a területen expresszáló phosphacan proliferációt gátló hatása megkérdőjelezhető, hiszen éppen az erős proliferációt mutató sejtek körül található. A phosphacan proliferációt stimuláló hatását kell tehát feltételezzük, mely valószínűleg FGF2 kötődése útján valósul meg erősítve a növekedési faktor mitogén hatását (Milev és mtsai 1998b). FGF2-t a proteoglikánok közül a neurokán is tudja kötni, de ez a kötődés látszólag nincsen hatással az FGF aktivitására (Milev és mtsai 1998b). A rágcsáló gerincvelőben a phosphacan és FGF mRNS-t azon sejtekben találták, melyek a ventrikularis zónában található és proliferálnak, így feltételezhetően autokrin módon hat (Engel és mtsai 1996). A HH23 stádiumú csirkeembrió gerincvelő mellső szarvában, a későbbi IX. lamina területén, a motoneuronok zónájában és a hátsó szarvnak megfelelő területen csak gyenge CS és phosphacan immunreakciót tudtunk detektálni. Az életkor előrehaladtával ez változik, míg a HH39 stádiumban már csak a hátsó szarv mutat gyengébb reakciót. Ez a megfigyelés összefüggésben állhat a neuronok érése során kialakuló perineuronális hálóval (perineuronal net, PNN), mely a neuronokon létrejött synaptikus kapcsolatok stabilizálását segíti, ugyanakkor az új synapsisok létrejöttét gátolja (Bandtlow és Zimmermann 2000). Ez a PNN kialakulás időben egybeesik az ún. kritikus periódus végével. A PG-ok ezen funkcióját nagy valószínűséggel a CS oldalláncok hordozzák, mivel a kondroitináz-ABC enzim kezeléssel a synaptogenesis kritikus periódusa időben kiszélesíthető volt macskák látókérgében (Pizzorusso és mtsai 2002).

A CSPG-k sejt migrációban betöltött szerepét sugallja a későbbi embriók gerincvelőjében az astrocyták differenciálódási és migrációs útvonala mentén paramedialisan. Ez a terület ugyanis mind a CS, mind pedig a phosphacanra nézve halványabb reakciót eredményezett.

Ezen a területen radier gliasejtek találhatóak, melyek vimentin intermedier filamentumaik alapján azonosíthatók be. A radialis irányba migráló korai asztrocyták differenciációjuk és migrációjuk valószínűleg CD44 receptor által közvetített jelátviteli folyamat útján valósul meg, mivel ezek a sejtek CD44 expressziót mutatnak (Alfei és mtsai 1999). A HA vagy akár a CSPG-k CD44 ligandum szerepe ezen folyamatokban erősen kérdéses, hiszen hisztokémiai reakciót sem a HA sem pedig a CS nem adott. A CD44 ligandja ezekben a sejtekben eddig nem ismert. Amennyiben a CSPG-k non-permisszív hatásúak ezen sejtekre, valószínű, hogy a migrációs útvonalukat az astrocytáknak a radier glia nyúlványai jelenti. Ezen sejtek laterális irányba történő migrációját az ott található erős CS gátolja.

A CSPG-k az axon növekedésre elsősorban gátló hatását írták le, míg néhány esetben axonnövekedést stimuláló is lehet. Az irodalmi adatok alapján a CS immunoreaktív területeken barrierfunkciót feltételezhetünk. A sclerotom hátsó részén (Landolt és mtsai 1995, Oakley és Tosney 1991, Perris és mtsai 1991) a perifériás idegekre, a gerincvelő dorsalis középvalában a commissuralis rostokra (Jhaveri 1993) valamint a tectumban, a nervus opticusban illetve a retinában (Brittis és mtsai 1992, Snow és mtsai 1991) számoltak be a CSPG-k gátló hatásáról. *In vitro* kísérletekben a teljes CSPG-k (Dou és Levine 1994, Friedlander és mtsai 1994, Maeda és Noda 1996, Niederöst 1999) illetve az izolált központi tengelyfehérje (Dou és Levine 1994, Maeda és Noda 1996) és a CS oldalláncok (Carbonetto és mtsai 1984, Verna és mtsai 1989) gátolják a neurit növekedését. Organoid kultúrákban is hasonló eredményekre jutottak, mivel a CSPG expressziójának gátlása axonnövekedést eredményezett azokba a régiókba, melyekben előzőleg gátolva volt az axonnövekedés (Brittis és mtsai 1992, Fichard és mtsai 1991). Azonban a CS nem feltétlenül mindig gátló az axonnövekedésre (Oakley és Tosney 1991, Yaginuma és Oppenheim 1991), illetve néhány esetben valószínűsíthető az axonnövekedést serkentő hatása is (Bicknese és mtsai 1994, McAdams és McLoon 1995, Sheppard és mtsai 1991). Ezek azonban *in vitro* kísérletek, ahol vagy a teljes PG-t (Faissner és mtsai 1994, Streit és mtsai 1993) vagy a CS-t (LaFont és mtsai 1992) vagy az izolált központi tengelyfehérjét alkalmazták (Iijima és mtsai 1991). A CSPG-k axonnövekedésre kifejtett hatása legjobban a neurokán és a phosphacan esetén tanulmányozott. A csirkeembrióban kimutatták, hogy az axonnövekedés gátlását Ng-CAM/N-CAM kötődésük révén fejtik ki (Friedlander és mtsai 1994, Milev és mtsai 1994), mely nem a CS oldalláncoktól függ. Más tanulmányok a fibronektin szubsztráton a phosphacan axonnövekedést serkentő hatásáról számoltak be (Maeda és mtsai 1996). Ezek expressziója az axonnövekedést megelőzően és közben mutatható ki azokban az embrionalis régiókban, melyeken az axon keresztülnőtt. Az agy fejlődése során a neurokán és phosphacan expresszió

változását írták le a fel és leszálló pályákban, melyek egyik csoportját gátolta, míg másokat serkentette a neurokán és a phosphacan jelenléte (Fukuda és mtsai 1997). E kettős hatásukért a PG-oknak egyrészt valószínűleg a sejt különböző sejtadhéziós molekuláinak kölcsönhatásai lehetnek a felelősek, másrészt pedig az egyéb ECM alkotók különböző PG-khez való kötődése. Így tehát a PG-ok különböző molekulákkal való kölcsönhatása eltérő hatásokat válthat ki az axon viselkedésére. Ennek példájaként a neurokán kötődhet L1 molekulához és TAG-1-hez is. Ezen molekulák expressziója a fejlődő agyban különböző mintázatot ad. A neurokán és a phosphacan kötődése Ng-CAM molekulához az axon növekedésére gátló hatással bír (Friedlander és mtsai 1994, Milev és mtsai 1994). A tenascin-C expressziójának megjelenése az axonok érésével esik egyidőbe a fejlődő nagyagyban (Sheppard és mtsai 1991). Ezen időszak előtt a PG-ok mellett ugyanazokban az axonokban HB-GAM is expresszál (Milev és mtsai 1998a), melynek serkentő hatását ismerjük. Ebben a rendszerben a neurokán axonnövekedésre kifejtett hatását a HB-GAM és a tenascin-C befolyásolja. Ahol a tenascin-C jelen van ott az axonnövekedés gátolt, míg a HB-GAM esetén ellenkező a hatás. A mi vizsgálatainkban a gerincvelő fehérállományának PG expresszióját követtük nyomon. Az itt futó rostok körül különböző mértékű CS expressziót találtunk, mely eltérések valószínűleg a fehérállomány le és felszálló pályáinak eltérő kialakulási üteméből adódnak. Abban az esetben, ha ezekben a rendszerekben a PG axonnövekedésre gátló hatással bír, akkor szerepe lehet az itt kialakult pályarendszerek szomatotópiájának megtartásában. Ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel még. A szürkeállományban futó rostok területe minden esetben CS és HA negatívnak bizonyult. Ezt jól tükrözi a commissura anterior HA és CS hiánya, mely megengedő környezet lehet a kereszteződő rotok számára. Ezzel szemben a tetőlemez sejtjei élénk CS és HA pozitivitást mutat, amely nagyrészt phosphacan oldalláncaiból adódik (Meyer-Puttitz és mtsai 1996) és gátló hatással bír a kereszteződő rostok számára (Brittis és mtsai 1992). A commissura posterior csak azután tud kialakulni ha ez a HA és CS expresszió lecsökken a tetőlemez sejtjeiben (Snow és mtsai 1990).

6.4. Konklúzió

Összefoglalva elmondható, hogy a HA a gerincvelő fejlődése során legalább kettős szerepet tölt be. Egyrészt a neuronok differenciációjában és migrációjában tölthet be fontos szerepet, másrészt viszont az embrionális fejlődés későbbi periódusában válik mátrix organizáló molekulává, vagyis a perineuronális háló kialakításában játszik fontos szerepet. Ezen funkcióit a HA elsősorban a hozzá kötődő lektinok organizációja útján fejt ki, melyek hatásmechanizmusa nem tisztázott. Hatását valószínűleg a növekedési faktorok, sejtadhéziós

molekulák és kationok kölcsönhatása révén fejt ki. A phosphacan osztódó sejtek körül akkumulálódik, ahol mitogén aktivitással rendelkezhet FGF2 kölcsönhatásával. A vizsgált ECM molekulákról nem lehet egyértelműen meghatározni, hogy az axonnövekedést serkentik vagy gátolják. Ez nagymértékben függ az adott idegsejtpopulációtól, mely különböző sejtadhéziós molekulakészlettel rendelkezi, eltérő axonnövekedési potenciált adva ezzel az idegsejteknek.

Az ideggeneráció az alacsonyabbrendű gerincesekben valószínűleg azért lehetséges, mert az idegsejtek körüli perineuronális háló nem oly differenciált, mint az emlősökben, így kevesebb gátló molekula lehet jelen, másrészt pedig valószínű a gátló molekulák enzimatis lebontása hatékonyabb, mint az emlősökben.

7. Összefoglalás

Az extracelluláris mátrix (ECM) egyik fő komponense a hialuronsav (HA), mely hatással van a mátrixalkotók organizációjában és a sejt-ECM kapcsolat regulációjában.

Munkánk első részében a HA és a HA-hoz kötődő kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG) expressziós mintázatát térképeztük fel csirkeembriók gerincvelő telepeiben, annak érdekében, hogy újabb adatokat gyűjtsünk ezen ECM alkotók lehetséges szerepéről a neuronok differenciációja és axonjaik növekedése során. A HA specifikus hisztokémiai reakciókat kombinálva különböző neuron populációkat jelző immunofluoreszcens jelöléssel szövettani metszetekben kimutattuk, hogy a HA elsősorban postmitotikus állapot előtti osztódó sejtek körül akkumulálódik. A HA valószínűleg a neuronok kezdeti differenciációját segíti. A HA által közvetített pontos jelátviteli útvonal nem ismert, azonban gerincvelő izolatumból RT-PCR-rel kimutattuk, hogy a HA akkumulációért a hialuronsav-szintáz (HAS) 2 és HAS 3 a felelős. A HAS2 és HAS3 enzimek valószínűleg egyben az egyetlen HA kötő sejtfelszíni molekulák is ezekben a sejtekben, mivel a hisztokémiai módszerekkel nem tudunk sem CD44-et sem pedig RHAMM-ot kimutatni a korai stádiumokban. Ehhez kapcsolódóan a HA kötő CSPG-k (lektinok) eloszlását vizsgáltuk RT-PCR és hisztotechnikai módszerek segítségével ugyanezen csirkeembriók gerincvelő telepeiben. A lektinok expressziós mintázata nagy átfedést mutatott a HA reakcióval, így feltételezhetően funkcionális kapcsolat van ezen molekulák között. A lektinok közül a neurokinin expressziója volt jellemző a fiatalabb stádiumokban, míg idősebb korban az erősen glikozilált aggregátum expressziója dominált. A CSPG-k központi fehérje megváltozása mellett a kondroitin-szulfát ilyen módon való növekedése a gerincvelő fejlődése során valószínűleg szerepet játszik a neuronális differenciációban. Más CSPG, a phosphacan expresszióját is kimutattuk az embrionális gerincvelőben, proliferáló sejtek körül és perifériás idegekben, azok belépési zónájában valamint a fehérállományban. A szürkeállományban futó axonok körül viszont érdekes módon nem találtunk phosphacant.

Munkánk második részében a HA változását figyeltük meg a nervus vestibulochochlearis átvágását követő regenerációban békákon. A regeneráció idején a HA jelentősen csökkent a primer afferenseket fogadó vestibularis magokban, amely a HA eloszlás struktúrájában is megmutatkozott; az idegsejtek körüli perineuronális hálóban levő HA jelölődés csökkent le. Ennek alapján a HA non-permisszív hatását feltételezhetjük a központi idegrendszerben az axonregenerációban. A perifériás idegekben azonban a HA permisszív hatással bírhat, mivel a primer afferensekben emelkedett a HA mennyisége a regeneráció során.

8. Summary

One major component of the extracellular matrix (ECM) is hyaluronan (HA) that is important for organization of other ECM molecules and in the regulation of cell-matrix communication.

We investigated the expression pattern of HA and HA-binding chondroitin-sulphate proteoglycans (CSPG) in spinal cord of chicken embryos in order that providing new data about the possible roles of these molecules in differentiating neurons and axon guidance and sprouting. Using biotinylated HA specific binding complex (bHABC) combined with immunofluorescent labelling of differentiating neurons in histological sections of spinal cords, HA was found around neuroprogenitor cells before their postmitotic stage. These finding suggested the permissive role of HA in neuroprogenitor cell differentiation. The exact signaling pathway was not evaluated but we showed the expression of two hyaluronan synthases HAS2 and 3 in the developing spinal cord indicating that these molecules might also functioning as HA binding molecule to the cell surface. The HAS2 and 3 might be the exclusive cell adhesion molecule with the ligand of HA in our system since we could not detect the CD44 and RHAMM, the major receptors of HA. By using RT-PCR and histotechnique, we also found a set of HA-binding CSPGs (lecticans) expressed by embryonic spinal cord. The expression pattern of these lecticans were largely overlapped with the HA reaction suggesting a functional relationship between the lecticans and HA to form HA-lectican complexes. Among lecticans, the neurocan was expressed in earlier stage of development while the highly glycosylated lectican (aggrecan) was expressed by older embryos. Increasing of the relative amount of chondroitin-sulphate during differentiation of the spinal cord suggested that both chondroitin-sulphate and core protein had functional role in embryonic development. Another CSPG, phosphacan was also expressed by developing spinal cord. We found that phosphacan was accumulating around proliferating neurons, in the peripheral nerves and in their entry zone as well as in the white matter. Interestingly, phosphacan was not detect around the axons in the gray matter.

In the second part of our work we found changes in distribution of HA after transection of the vestibulocochlear nerve in frogs. During regeneration the expression of HA decreased in the vestibular nuclei indicating structural changes in the perineuronal net. These findings suggest a non-permissive role of HA to the axon sprouting in the central nervous system while the HA might be permissive in the peripheral nerves which was indicated increased relative amount of HA during regeneration.

9. Köszönetnyilvánítás

A kísérleteket a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztem. Köszönettel tartozom mindazoknak, akik munkámhoz szakmai irányításukkal vagy közvetlen segítségükkel hozzájárultak.

Mindenekelőtt szeretném megköszönni az Anatómiai Intézet igazgatójának, Dr. Antal Miklós egyetemi tanárnak, hogy a munkámat lehetővé tette az intézetben, és hasznos tanácsaival kutatásaimat segítette.

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Módis László egyetemi tanárnak és Dr. Matesz Klára egyetemi tanárnak, aki magas szintű elméleti tudásával és tanácsaival munkámat messzemenőig segítette.

Köszönöm mindazoknak a munkáját, akik a kísérletek technikai kivitelezésében voltak segítségemre, elsősorban Kenyeres Annamáriának, aki nagyon sokat segített a laboratóriumi és más egyéb munkámban. Köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Halasi Gábornak a regenerációs kísérletekben való munkájáért, valamint azt, hogy a csirkeembrió manipulációban szerzett tapasztalatait megosztotta velem és nagyon sok hasznos tanáccsal segítette munkámat. Köszönöm Dr. Felszeghy Szabolcs egyetemi adjunktusnak a számítógépes képanalízisben valamint Dr. Wolf Ervin egyetemi adjunktusnak a statisztikai elemzésben nyújtott segítségüket. Köszönettel tartozom Dr. Veress Gábor egyetemi tanársegédnek a segítségét a konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében. Köszönöm továbbá Király Zoltánnak a számítógépes munkákban nyújtott kitartó segítségét. Ezen kívül hálámat szeretném kifejezni, minden más munkatársamnak is, hogy mindig készséggel segítettek nekem bármilyen kéréssel is fordultam hozzájuk.

Köszönöm szüleimnek, hogy támogatták tanulmányaimat és bíztak bennem. Valamint külön köszönöm Kedvesem türelmét és szerető gondoskodását.

10. Irodalomjegyzék

- Ackerman, S. L., Kozak, L. P., Przyborski, S. A., Rund, L. A., Boyer, B. B., & Knowles, B. B. 1997. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. Nature, 386(6627): 838-842.
- Adams, N. C., Tomoda, T., Cooper, M., Dietz, G., & Hatten, M. E. 2002. Mice that lack astrotactin have slowed neuronal migration. Development, 129(4): 965-972.
- Akers, R. M., Mosher, D. F., & Lilien, J. E. 1981. Promotion of retinal neurite outgrowth by substratum-bound fibronectin. Dev.Biol., 86(1): 179-188.
- Akopians, A. L., Babayan, A. H., Beffert, U., Herz, J., Basbaum, A. I., & Phelps, P. E. 2008. Contribution of the Reelin signaling pathways to nociceptive processing. Eur.J Neurosci., 27(3): 523-537.
- Al'Qteishat, A., Gaffney, J., Krupinski, J., Rubio, F., West, D., Kumar, S., Kumar, P., Mitsios, N., & Slevin, M. 2006. Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man. Brain, 129(Pt 8): 2158-2176.
- Alder, J., Lee, K. J., Jessell, T. M., & Hatten, M. E. 1999. Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. Nat.Neurosci., 2(6): 535-540.
- Alfei, L., Aita, M., Caronti, B., De Vita, R., Margotta, V., Medolago, A. L., & Valente, A. M. 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(1): 29-38.
- Anggiansah, C. L., Scott, D., Poli, A., Coleman, P. J., Badrick, E., Mason, R. M., & Levick, J. R. 2003. Regulation of hyaluronan secretion into rabbit synovial joints in vivo by protein kinase C. J Physiol, 550(Pt 2): 631-640.
- Artinger, K. B. & Bronner-Fraser, M. 1993. Delayed formation of the floor plate after ablation of the avian notochord. Neuron, 11(6): 1147-1161.
- Asher, R. & Bignami, A. 1991. Localization of hyaluronate in primary glial cell cultures derived from newborn rat brain. Exp.Cell Res., 195(2): 401-411.
- Aspberg, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegard, D., Schachner, M., Ruoslahti, E., & Yamaguchi, Y. 1997. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(19): 10116-10121.
- Assmann, V., Marshall, J. F., Fieber, C., Hofmann, M., & Hart, I. R. 1998. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. J Cell Sci., 111 (Pt 12): 1685-1694.
- Bacsikai, T. & Matesz, C. 2002. Primary afferent fibers establish dye-coupled connections in the frog central nervous system. Brain Res.Bull., 57(3-4): 317-319.

- Baier, C., Baader, S. L., Jankowski, J., Gieselmann, V., Schilling, K., Rauch, U., & Kappler, J. 2007. Hyaluronan is organized into fiber-like structures along migratory pathways in the developing mouse cerebellum. Matrix Biology, 26(5): 348-358.
- Bajorath, J., Greenfield, B., Munro, S. B., Day, A. J., & Aruffo, A. 1998. Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. J Biol.Chem., 273(1): 338-343.
- Bakkers, J., Kramer, C., Pothof, J., Quaedvlieg, N. E. M., Spaink, H. P., & Hammerschmidt, M. 2004. Has2 is required upstream of Rac1 to govern dorsal migration of lateral cells during zebrafish gastrulation. Development, 131(3): 525-537.
- Balazs E.A. (Ed.) 1970. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London: Academic Press.
- Bandtlow, C. E. & Zimmermann, D. R. 2000. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. Physiological Reviews, 80(4): 1267-1290.
- Bausch, S. B. 2006. Potential roles for hyaluronan and CD44 in kainic acid-induced mossy fiber sprouting in organotypic hippocampal slice cultures. Neuroscience, 143(1): 339-350.
- Bicknese, A. R., Sheppard, A. M., O'Leary, D. D., & Pearlman, A. L. 1994. Thalamocortical axons extend along a chondroitin sulfate proteoglycan-enriched pathway coincident with the neocortical subplate and distinct from the efferent path. J Neurosci., 14(6): 3500-3510.
- Bignami, A., Hosley, M., & Dahl, D. 1993. Hyaluronic-Acid and Hyaluronic Acid-Binding Proteins in Brain Extracellular-Matrix. Anatomy and Embryology, 188(5): 419-433.
- Birinyi, A., Straka, H., Matesz, C., & Dieringer, N. 2001. Location of dye-coupled second order and of efferent vestibular neurons labeled from individual semicircular canal or otolith organs in the frog. Brain Res., 921(1-2): 44-59.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Chu, A., Iida, N., Zhang, L., & Hung, M. C. 1997. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. J Biol.Chem., 272(44): 27913-27918.
- Braunewell, K. H., Martini, R., Lebaron, R., Kresse, H., Faissner, A., Schmitz, B., & Schachner, M. 1995. Up-Regulation of A Chondroitin Sulfate Epitope During Regeneration of Mouse Sciatic-Nerve - Evidence That the Immunoreactive Molecules Are Related to the Chondroitin Sulfate Proteoglycans Decorin and Versican. European Journal of Neuroscience, 7(4): 792-804.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L. R., & Ericson, J. 1999. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. Nature, 398(6728): 622-627.
- Brittis, P. A., Canning, D. R., & Silver, J. 1992. Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. Science, 255(5045): 733-736.
- Bronner-Fraser, M., Wolf, J. J., & Murray, B. A. 1992. Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. Dev.Biol., 153(2): 291-301.

- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., & Kidd, T. 1999. Slit proteins bind robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. Cell, 96(6): 795-806.
- Brown, J. J. G. & Papaioannou, V. E. 1993. Ontogeny of Hyaluronan Secretion During Early Mouse Development. Development, 117(2): 483-492.
- Bruckner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Hartig, W., Margolis, R. U., Delpech, B., Seidenbecher, C. I., Czaniera, R., & Schachner, M. 2000. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. Journal of Comparative Neurology, 428(4): 616-629.
- Campanelli, J. T., Hoch, W., Rupp, F., Kreiner, T., & Scheller, R. H. 1991. Agrin mediates cell contact-induced acetylcholine receptor clustering. Cell, 67(5): 909-916.
- Carbonetto, S. 1984. The Extracellular-Matrix of the Nervous-System. Trends in Neurosciences, 7(10): 382-387.
- Carey, D. J. 1996. N-syndecan: structure and function of a transmembrane heparan sulfate proteoglycan. Perspect.Dev.Neurobiol., 3(4): 331-346.
- Carter, W. G. & Wayner, E. A. 1988. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. J Biol.Chem., 263(9): 4193-4201.
- Carulli, D., Rhodes, K. E., Brown, D. J., Bonnert, T. P., Pollack, S. J., Oliver, K., Strata, P., & Fawcett, J. W. 2006. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. Journal of Comparative Neurology, 494(4): 559-577.
- Catala, M., Teillet, M. A., & LeDouarin, N. M. 1995. Organization and Development of the Tail Bud Analyzed with the Quail-Chick Chimera System. Mechanisms of Development, 51(1): 51-65.
- Catala, M., Teillet, M. A., DeRobertis, E. M., & LeDouarin, N. M. 1996. A spinal cord fate map in the avian embryo: While regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. Development, 122(9): 2599-2610.
- Celio, M. R. & Blumcke, I. 1994. Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. Brain Res Brain Res Rev., 19(1): 128-145.
- Celio, M. R., Spreafico, R., De Biasi, S., & Vitellaro-Zuccarello, L. 1998. Perineuronal nets: past and present. Trends Neurosci., 21(12): 510-515.
- Chenn, A. & McConnell, S. K. 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell, 82(4): 631-641.
- Chitnis, A. B. 1995. The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification. Mol.Cell Neurosci., 6(6): 311-321.
- Cohen, J., Burne, J. F., McKinlay, C., & Winter, J. 1987. The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. Dev.Biol., 122(2): 407-418.

- Colamarino, S. A. & Tessier-Lavigne, M. 1995. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. Cell, 81(4): 621-629.
- Cole, G. J. & Halfter, W. 1996. Agrin: an extracellular matrix heparan sulfate proteoglycan involved in cell interactions and synaptogenesis. Perspect.Dev.Neurobiol., 3(4): 359-371.
- Colman, H., Nabekura, J., & Lichtman, J. W. 1997. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. Science, 275(5298): 356-361.
- Crainie, M., Belch, A. R., Mant, M. J., & Pilarski, L. M. 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(5): 1684-1696.
- Csoka, A. B., Frost, G. I., & Stern, R. 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. Matrix Biol., 20(8): 499-508.
- Culty, M., Nguyen, H. A., & Underhill, C. B. 1992. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. J Cell Biol., 116(4): 1055-1062.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., & Curran, T. 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature, 374(6524): 719-723.
- Davenport, R. W., Dou, P., Rehder, V., & Kater, S. B. 1993. A sensory role for neuronal growth cone filopodia. Nature, 361(6414): 721-724.
- Davies, J. A., Cook, G. M., Stern, C. D., & Keynes, R. J. 1990. Isolation from chick somites of a glycoprotein fraction that causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. Neuron, 4(1): 11-20.
- DeAngelis, P. L. 1999. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. Cell Mol.Life Sci., 56(7-8): 670-682.
- Desmond, M. E. & Schoenwolf, G. C. 1986. Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. J.Embryol.Exp.Morphol., 97: 25-46.
- Desmond, M. E. & Field, M. C. 1992. Evaluation of neural fold fusion and coincident initiation of spinal cord occlusion in the chick embryo. J.Comp Neurol., 319(2): 246-260.
- Detrick, R. J., Dickey, D., & Kintner, C. R. 1990. The Effects of N-Cadherin Misexpression on Morphogenesis in *Xenopus* Embryos. Neuron, 4(4): 493-506.
- Dieringer, N. & Precht, W. 1979. Synaptic mechanisms involved in compensation of vestibular function following hemilabyrinthectomy. Prog.Brain Res, 50: 607-615.
- Dieringer, N. 1995. 'Vestibular compensation': neural plasticity and its relations to functional recovery after labyrinthine lesions in frogs and other vertebrates. Prog.Neurobiol., 46(2-3): 97-129.
- Dityatev, A. & Schachner, M. 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. Nat.Rev.Neurosci., 4(6): 456-468.

- Doege, K., Sasaki, M., Horigan, E., Hassell, J. R., & Yamada, Y. 1987. Complete Primary Structure of the Rat Cartilage Proteoglycan Core Protein Deduced from Cdna Clones. Journal of Biological Chemistry, 262(36): 17757-17767.
- Dou, C. L. & Levine, J. M. 1994. Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. J Neurosci., 14(12): 7616-7628.
- Dupin, E., Real, C., & LeDouarin, N. 2001. The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, 73(4): 533-545.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell, 75(7): 1417-1430.
- Engel, M., Maurel, P., Margolis, R. U., & Margolis, R. K. 1996. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. J Comp Neurol., 366(1): 34-43.
- Erickson, C. A. & Weston, J. A. 1983. An Sem Analysis of Neural Crest Migration in the Mouse. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 74(APR): 97-118.
- Erickson, H. P. 1993. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. Curr.Opin.Cell Biol., 5(5): 869-876.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M., & Yamada, T. 1992. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. Science, 256(5063): 1555-1560.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. Cell, 87(4): 661-673.
- Ethell, I. M. & Yamaguchi, Y. 1999. Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. J Cell Biol., 144(3): 575-586.
- Ethell, I. M., Irie, F., Kalo, M. S., Couchman, J. R., Pasquale, E. B., & Yamaguchi, Y. 2001. EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. Neuron, 31(6): 1001-1013.
- Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., & Schachner, M. 1994. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. J Cell Biol., 126(3): 783-799.
- Faissner, A. 1997. The tenascin gene family in axon growth and guidance. Cell and Tissue Research, 290(2): 331-341.
- Faissner, A., Heck, N., Dobbertin, A., & Garwood, J. 2006. DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. Adv.Exp.Med.Biol., 557: 25-53.

- Fanardjian, V. V., Manvelyan, L. R., Zakarian, V. L., Pogossian, V. I., & Nasoyan, A. M. 1999. Electrophysiological properties of the somatotopic organization of the vestibulospinal system in the frog. Neuroscience, 94(3): 845-857.
- Felszeghy, S., Hyttinen, M., Tammi, R., Tammi, M., & Modis, L. 2000. Quantitative image analysis of hyaluronan expression in human tooth germs. Eur.J.Oral Sci., 108(4): 320-326.
- Fichard, A., Verna, J. M., Olivares, J., & Saxod, R. 1991. Involvement of a chondroitin sulfate proteoglycan in the avoidance of chick epidermis by dorsal root ganglia fibers: a study using beta-D-xyloside. Dev.Biol., 148(1): 1-9.
- Ford-Perriss, M., Turner, K., Guimond, S., Apedaile, A., Haubeck, H. D., Turnbull, J., & Murphy, M. 2003. Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development. Dev.Dyn., 227(2): 170-184.
- Forscher, P. & Smith, S. J. 1988. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. J.Cell Biol., 107(4): 1505-1516.
- Fox, K. & Caterson, B. 2002. Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net. Science, 298(5596): 1187-1189.
- Frame, M. C., Fincham, V. J., Carragher, N. O., & Wyke, J. A. 2002. v-Src's hold over actin and cell adhesions. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 3(4): 233-245.
- Frantz, G. D. & McConnell, S. K. 1996. Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. Neuron, 17(1): 55-61.
- Friedlander, D. R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R. K., Margolis, R. U., & Grumet, M. 1994. Neuronal Chondroitin Sulfate Proteoglycan Neurocan Binds to the Neural Cell-Adhesion Molecules Ng-Cam/L1/Nile and N-Cam, and Inhibits Neuronal Adhesion and Neurite Outgrowth. Journal of Cell Biology, 125(3): 669-680.
- FUJITA, S. 1964. Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. J.Comp Neurol., 122: 311-327.
- Fukuda, T., Kawano, H., Ohyama, K., Li, H. P., Takeda, Y., Oohira, A., & Kawamura, K. 1997. Immunohistochemical localization of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. J Comp Neurol., 382(2): 141-152.
- Galtrey, C. M., Kwok, J. C. F., Carulli, D., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. W. 2008. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. European Journal of Neuroscience, 27(6): 1373-1390.
- Garwood, J., Schnadelbach, O., Clement, A., Schutte, K., Bach, A., & Faissner, A. 1999. DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. J Neurosci., 19(10): 3888-3899.
- Glass, D. J., Bowen, D. C., Stitt, T. N., Radziejewski, C., Bruno, J., Ryan, T. E., Gies, D. R., Shah, S., Mattsson, K., Burden, S. J., DiStefano, P. S., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., & Yancopoulos, G. D. 1996. Agrin acts via a MuSK receptor complex. Cell, 85(4): 513-523.

- Golden, J. A. & Chernoff, G. F. 1993. Intermittent Pattern of Neural-Tube Closure in 2 Strains of Mice. Teratology, 47(1): 73-80.
- Gont, L. K., Steinbeisser, H., Blumberg, B., & de Robertis, E. M. 1993. Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. Development, 119(4): 991-1004.
- Goodman C.S. & Doe C.Q. 1993. Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In Bate M. & Martinez Arias A. (Eds.), The development of the *Drosophila melanogaster*: 1131-1206. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Goodman, C. S. & Shatz, C. J. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. Cell, 72 Suppl: 77-98.
- Griffith, C. M. & Wiley, M. J. 1989. The distribution of cell surface glycoconjugates during mouse secondary neurulation. Anat.Embryol.(Berl), 180(6): 567-575.
- Griffith, C. M. & Wiley, M. J. 1991. N-CAM, polysialic acid and chick tail bud development. Anat.Embryol.(Berl), 183(2): 205-212.
- Groffen, A. J., Ruegg, M. A., Dijkman, H., van de Velden, T. J., Buskens, C. A., van den, B. J., Assmann, K. J., Monnens, L. A., Veerkamp, J. H., & van den Heuvel, L. P. 1998. Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. J Histochem.Cytochem., 46(1): 19-27.
- Grofova, I. & Corvaja, N. 1972. Commissural projection from the nuclei of termination of the 8th cranial nerve in the toad. Brain Res, 42(1): 189-195.
- Grumet, M., Flaccus, A., & Margolis, R. U. 1993. Functional-Characterization of Chondroitin Sulfate Proteoglycans of Brain - Interactions with Neurons and Neural Cell-Adhesion Molecules. Journal of Cell Biology, 120(3): 815-824.
- Grumet, M., Milev, P., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Bourdon, M., Margolis, R. K., & Margolis, R. U. 1994. Interactions with Tenascin and Differential-Effects on Cell-Adhesion of Neurocan and Phosphacan, 2 Major Chondroitin Sulfate Proteoglycans of Nervous-Tissue. Journal of Biological Chemistry, 269(16): 12142-12146.
- Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. 2001. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. Nature, 411(6833): 86-89.
- Gundersen, R. W. 1987. Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. Dev.Biol., 121(2): 423-431.
- Gunther, T., Struwe, M., Aguzzi, A., & Schughart, K. 1994. Open Brain, A New Mouse Mutant with Severe Neural-Tube Defects, Shows Altered Gene-Expression Patterns in the Developing Spinal-Cord. Development, 120(11): 3119-3130.
- Guthrie, S. & Lumsden, A. 1991. Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. Development, 112(1): 221-229.

- Hagihara, K., Miura, R., Kosaki, R., Berglund, E., Ranscht, B., & Yamaguchi, Y. 1999. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: Colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. Journal of Comparative Neurology, 410(2): 256-264.
- Halberg, D. F., Proulx, G., Doege, K., Yamada, Y., & Drickamer, K. 1988. A Segment of the Cartilage Proteoglycan Core Protein Has Lectin-Like Activity. Journal of Biological Chemistry, 263(19): 9486-9490.
- Hall, C. L., Yang, B., Yang, X., Zhang, S., Turley, M., Samuel, S., Lange, L. A., Wang, C., Curpen, G. D., Savani, R. C., Greenberg, A. H., & Turley, E. A. 1995. Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. Cell, 82(1): 19-26.
- Hamburger, V. & Hamilton, H. L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. Dev.Dyn., 195(4): 231-272.
- Hammer, O., Harper, D. A. T., and Ryan, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Electronica 4[1], 9. 2001. Ref Type: Journal (Full)
- Hanson, M. G., Milner, L. D., & Landmessey, L. T. 2008. Spontaneous rhythmic activity in early chick spinal cord influences distinct motor axon pathfinding decisions. Brain Research Reviews, 57(1): 77-85.
- Harrison R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. Journal of Experimental Zoology 9, 787-848. 1910. Ref Type: Journal (Full)
- Hartmann, U. & Maurer, P. 2001. Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. Matrix Biol., 20(1): 23-35.
- Hay E.D. (Ed.) 1991. Cell biology of the extracellular matrix. New York: Plenum Press.
- Heldin, P., Asplund, T., Ytterberg, D., Thelin, S., & Laurent, T. C. 1992. Characterization of the molecular mechanism involved in the activation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor in human mesothelial cells. Biochem.J, 283 (Pt 1): 165-170.
- Hollyday, M. 1980. Organization of motor pools in the chick lumbar lateral motor column. J.Comp Neurol., 194(1): 143-170.
- Hollyday, M. 2001. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. Int.J.Dev.Neurosci., 19(2): 161-173.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., & Stein, E. 1999. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. Cell, 97(7): 927-941.
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. A., Grant, P. E., Hourihane, J. O., Martin, N. D., & Walsh, C. A. 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. Nat.Genet., 26(1): 93-96.

- Hopker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. M., & Holt, C. 1999. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. Nature, 401(6748): 69-73.
- Iijima, N., Oohira, A., Mori, T., Kitabatake, K., & Kohsaka, S. 1991. Core protein of chondroitin sulfate proteoglycan promotes neurite outgrowth from cultured neocortical neurons. J Neurochem., 56(2): 706-708.
- Ikegami, H., Sasaki, M., & Uchino, Y. 1994. Connections between utricular nerve and neck flexor motoneurons of decerebrate cats. Exp.Brain Res, 98(3): 373-378.
- Itano, N., Sawai, T., Atsumi, F., Miyaishi, O., Taniguchi, S., Kannagi, R., Hamaguchi, M., & Kimata, K. 2004. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. J Biol.Chem., 279(18): 18679-18687.
- Ito, T., Williams, J. D., Fraser, D., & Phillips, A. O. 2004. Hyaluronan attenuates transforming growth factor-beta1-mediated signaling in renal proximal tubular epithelial cells. Am.J Pathol., 164(6): 1979-1988.
- Ito, T., Williams, J. D., Fraser, D. J., & Phillips, A. O. 2004. Hyaluronan regulates transforming growth factor-beta1 receptor compartmentalization. J Biol.Chem., 279(24): 25326-25332.
- Jacobson, A. G. & Moury, J. D. 1995. Tissue Boundaries and Cell Behavior During Neurulation. Developmental Biology, 171(1): 98-110.
- Jacobson, M. 1968. Cessation of DNA synthesis in retinal ganglion cells correlated with the time of specification of their central connections. Dev.Biol., 17(2): 219-232.
- Jacobson, M. 1991. Developmental Neurobiology. New York: Plenum.
- Jalkanen, S. & Jalkanen, M. 1992. Lymphocyte Cd44 Binds the CooH-Terminal Heparin-Binding Domain of Fibronectin. Journal of Cell Biology, 116(3): 817-825.
- Jaworski, D. M., Kelly, G. M., & Hockfield, S. 1995. The Cns-Specific Hyaluronan-Binding Protein Behab Is Expressed in Ventricular Zones Coincident with Gliogenesis. Journal of Neuroscience, 15(2): 1352-1362.
- Jaworski, D. M., Kelly, G. M., & Hockfield, S. 1996. The CNS-specific hyaluronan binding protein, BEHAB, is expressed during periods of glial cell generation and motility. Seminars in the Neurosciences, 8(6): 391-396.
- Jessell, T. M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. Nature Reviews Genetics, 1(1): 20-29.
- Jhaveri, S. 1993. Midline glia of the tectum: a barrier for developing retinal axons. Perspect.Dev.Neurobiol., 1(4): 237-243.
- Joester, A. & Faissner, A. 2001. The structure and function of tenascins in the nervous system. Matrix Biology, 20(1): 13-22.

- Jones, F. S. & Jones, P. L. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Dev.Dyn., 218(2): 235-259.
- Jones, L. L., Liu, Z., Shen, J., Werner, A., Kreutzberg, G. W., & Raivich, G. 2000. Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. J Comp Neurol., 426(3): 468-492.
- Jones, L. L., Liu, Z. Q., Shen, J., Werner, A., Kreutzberg, G. W., & Raivich, G. 2000. Regulation of the cell adhesion molecule CD44 after nerve transection and direct trauma to the mouse brain. Journal of Comparative Neurology, 426(3): 468-492.
- Kaaijk, P., Pals, S. T., Morsink, F., Bosch, D. A., & Troost, D. 1997. Differential expression of CD44 splice variants in the normal human central nervous system. J Neuroimmunol., 73(1-2): 70-76.
- Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., & Itano, N. 2004. A novel inhibition mechanism of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone. Glycobiology, 14(11): 1175-1176.
- Kaksonen, M., Pavlov, I., Voikar, V., Lauri, S. E., Hienola, A., Riekkki, R., Lakso, M., Taira, T., & Rauvala, H. 2002. Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory. Mol.Cell Neurosci., 21(1): 158-172.
- Keller, R., Shih, J., Sater, A. K., & Moreno, C. 1992. Planar Induction of Convergence and Extension of the Neural Plate by the Organizer of Xenopus. Developmental Dynamics, 193(3): 218-234.
- Khan, A. A., Bose, C., Yam, L. S., Soloski, M. J., & Rupp, F. 2001. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin. Science, 292(5522): 1681-1686.
- Kidd, T., Bland, K. S., & Goodman, C. S. 1999. Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. Cell, 96(6): 785-794.
- Klekner, A., Felszeghy, S., Tammi, R., Tammi, M., Csecsei, G., & Modis, L. 2005. Quantitative determination of hyaluronan content in cerebral aneurysms by digital densitometry. Zentralbl.Neurochir., 66(4): 207-212.
- Klewes, L. & Prehm, P. 1994. Intracellular signal transduction for serum activation of the hyaluronan synthase in eukaryotic cell lines. J Cell Physiol, 160(3): 539-544.
- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., O'Connor, T. P., Patel, N. H., Admon, A., Bentley, D., & Goodman, C. S. 1992. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. Neuron, 9(5): 831-845.
- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., & Goodman, C. S. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. Cell, 75(7): 1389-1399.
- Koprunner, M., Mullegger J, & Lepperdinger, G. 2000. Synthesis of hyaluronan of distinctly different chain length is regulated by differential expression of Xhas1 and 2 during early development of Xenopus laevis. Mech.Dev., 90(2): 275-278.

- Krull, C. E., Eberhart, J., McLennan, R., Koblar, S. A., Cerretti, D. P., & Pasquale, E. B. 1999. Segmental patterning of the peripheral nervous system. Developmental Biology, 210(1): 203.
- Lafont, F., Rouget, M., Triller, A., Prochiantz, A., & Rousset, A. 1992. In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. Development, 114(1): 17-29.
- Lammi, P. E., Lammi, M. J., Tammi, R. H., Helminen, H. J., & Espanha, M. M. 2001. Strong hyaluronan expression in the full-thickness rat articular cartilage repair tissue. Histochem.Cell Biol., 115(4): 301-308.
- Lamoureux, P., Buxbaum, R. E., & Heidemann, S. R. 1989. Direct Evidence That Growth Cones Pull. Nature, 340(6229): 156-162.
- Lance-Jones, C. & Landmesser, L. 1980. Motoneurone projection patterns in the chick hind limb following early partial reversals of the spinal cord. J.Physiol., 302: 581-602.
- Lander, A. D. 1987. Molecules that make axons grow. Mol.Neurobiol., 1(3): 213-245.
- Landmesser, L. 1978. The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. J.Physiol., 284: 371-389.
- Landolt, R. M., Vaughan, L., Winterhalter, K. H., & Zimmermann, D. R. 1995. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. Development, 121(8): 2303-2312.
- Lee, S. K. & Pfaff, S. L. 2001. Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. Nat.Neurosci., 4 Suppl: 1183-1191.
- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., KeinoMasu, K., Ackerman, S. L., & Tessierlavigne, M. 1997. Vertebrate homologues of C-elegans UNC-5 are candidate netrin receptors. Nature, 386(6627): 833-838.
- Letourneau, P. C. 1975. Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. Dev.Biol., 44(1): 77-91.
- Letourneau, P. C., Madsen, A. M., Palm, S. L., & Furcht, L. T. 1988. Immunoreactivity for laminin in the developing ventral longitudinal pathway of the brain. Dev.Biol., 125(1): 135-144.
- Li, H. S., Chen, J. H., Wu, W., Fagaly, T., Zhou, L. J., Yuan, W. L., Dupuis, S., Jiang, Z. H., Nash, W., Gick, C., Ornitz, D. M., Wu, J. Y., & Rao, Y. 1999. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. Cell, 96(6): 807-818.
- Liberto, C. M., Albrecht, P. J., Herx, L. M., Yong, V. W., & Levison, S. W. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. J.Neurochem., 89(5): 1092-1100.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., & Jessell, T. M. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. Cell, 82(6): 969-979.

- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., & Jessell, T. M. 1997. A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. Cell, 91(1): 127-138.
- Liem, K. F., Jr., Jessell, T. M., & Briscoe, J. 2000. Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. Development, 127(22): 4855-4866.
- Liesi, P. & Silver, J. 1988. Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS? Dev.Biol., 130(2): 774-785.
- Lin, L. & Chan, S. O. 2003. Perturbation of CD44 function affects chiasmatic routing of retinal axons in brain slice preparations of the mouse retinofugal pathway. Eur.J Neurosci., 17(11): 2299-2312.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science, 260(5111): 1130-1132.
- Luo, Y., Raible, D., & Raper, J. A. 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. Cell, 75(2): 217-227.
- Luxardi, G., Galli, A., Forlani, S., Lawson, K., Maina, F., & Dono, R. 2007. Glypicans are differentially expressed during patterning and neurogenesis of early mouse brain. Biochem.Biophys.Res Commun., 352(1): 55-60.
- Lynn, B. D., Li, X., Cattini, P. A., Turley, E. A., & Nagy, J. I. 2001. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain. J Comp Neurol., 439(3): 315-330.
- Lynn, B. D., Li, X. B., Cattini, P. A., Turley, E. A., & Nagy, J. I. 2001. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain. Journal of Comparative Neurology, 439(3): 315-330.
- Maeda, N., Hamanaka, H., Shintani, T., Nishiwaki, T., & Noda, M. 1994. Multiple receptor-like protein tyrosine phosphatases in the form of chondroitin sulfate proteoglycan. FEBS Lett., 354(1): 67-70.
- Maeda, N., Hamanaka, H., Oohira, A., & Noda, M. 1995. Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan. Neuroscience, 67(1): 23-35.
- Maeda, N. & Noda, M. 1996. 6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. Development, 122(2): 647-658.
- Magdaleno, S., Keshvara, L., & Curran, T. 2002. Rescue of ataxia and preplate splitting by ectopic expression of Reelin in reeler mice. Neuron, 33(4): 573-586.
- Mandriota, S. J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D. G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G., & Pepper, M. S. 2001. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J, 20(4): 672-682.

- Mansouri, A., Pla, P., Larue, L., & Gruss, P. 2001. Pax3 acts cell autonomously in the neural tube and somites by controlling cell surface properties. Development, 128(11): 1995-2005.
- Margolis R.U. & Margolis R.K. (Eds.)1979. Complex carbohydrates of nervous tissue. New York: Plenum Press.
- Margolis, R. K. & Margolis, R. U. 1993. Nervous tissue proteoglycans. Experientia, 49(5): 429-446.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., & Rubenstein, J. L. R. 2001. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. Science, 293(5531): 872-875.
- Martin, P. T., Ettinger, A. J., & Sanes, J. R. 1995. A synaptic localization domain in the synaptic cleft protein laminin beta 2 (s-laminin). Science, 269(5222): 413-416.
- Marx, J. 1995. Helping Neurons Find Their Way. Science, 268(5213): 971-973.
- Massey, J. M., Hubscher, C. H., Wagoner, M. R., Decker, J. A., Amps, J., Silver, J., & Onifer, S. M. 2006. Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. J Neurosci, 26(16): 4406-4414.
- Matesz, C. 1979. Central projection of the VIIIth cranial nerve in the frog. Neuroscience, 4(12): 2061-2071.
- Matesz, C., Modis, L., Halasi, G., Szigeti, Z. M., Felszeghy, S., Bacskai, T., & Szekely, G. 2005. Extracellular matrix molecules and their possible roles in the regeneration of frog nervous system. Brain Research Bulletin, 66(4-6): 526-531.
- Matsunami, H. & Takeichi, M. 1995. Fetal brain subdivisions defined by R- and E-cadherin expressions: evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. Dev.Biol., 172(2): 466-478.
- Matthes, D. J., Sink, H., Kolodkin, A. L., & Goodman, C. S. 1995. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. Cell, 81(4): 631-639.
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R. K., & Margolis, R. U. 1994. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A, 91(7): 2512-2516.
- McAdams, B. D. & McLoon, S. C. 1995. Expression of chondroitin sulfate and keratan sulfate proteoglycans in the path of growing retinal axons in the developing chick. J Comp Neurol., 352(4): 594-606.
- McConnell, S. K. & Kaznowski, C. E. 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. Science, 254(5029): 282-285.
- Mecham, R. P. 1991. Laminin Receptors. Annual Review of Cell Biology, 7: 71-91.

- Merenmies, J., Pihlaskari, R., Laitinen, J., Wartiovaara, J., & Rauvala, H. 1991. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. J Biol.Chem., 266(25): 16722-16729.
- Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., & Kolodkin, A. L. 1995. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. Neuron, 14(5): 949-959.
- Meyer-Puttlitz, B., Junker, E., Margolis, R. U., & Margolis, R. K. 1996. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. J Comp Neurol., 366(1): 44-54.
- Meyer K. and Palmer J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. Journal of Biological Chemistry **107**, 629-634. 1934.
- Milev, P., Friedlander, D. R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R. K., Grumet, M., & Margolis, R. U. 1994. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. J Cell Biol., 127(6 Pt 1): 1703-1715.
- Milev, P., Fischer, D., Haring, M., Schulthess, T., Margolis, R. K., ChiquetEhrismann, R., & Margolis, R. U. 1997. The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. Journal of Biological Chemistry, 272(24): 15501-15509.
- Milev, P., Chiba, A., Haring, M., Rauvala, H., Schachner, M., Ranscht, B., Margolis, R. K., & Margolis, R. U. 1998. High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. Journal of Biological Chemistry, 273(12): 6998-7005.
- Milev, P., Monnerie, H., Popp, S., Margolis, R. K., & Margolis, R. U. 1998. The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity. J Biol.Chem., 273(34): 21439-21442.
- Miura, R., Aspberg, A., Ethell, I. M., Hagihara, K., Schnaar, R. L., Ruoslahti, E., & Yamaguchi, Y. 1999. The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. J Biol.Chem., 274(16): 11431-11438.
- Mohammad, J. A., Warnke, P. H., Pan, Y. C., & Shenaq, S. 2000. Increased axonal regeneration through a biodegradable amniotic tube nerve conduit: Effect of local delivery and incorporation of nerve growth factor/hyaluronic acid media. Annals of Plastic Surgery, 44(1): 59-64.
- Montgomery, N. M. 1988. Projections of the vestibular and cerebellar nuclei in *Rana pipiens*. Brain Behav.Evol., 31(2): 82-95.
- Moon, C., Heo, S., Sim, K. B., & Shin, T. 2004. Upregulation of CD44 expression in the spinal cords of rats with clip compression injury. Neurosci.Lett., 367(1): 133-136.

- Mori, H., Tomari, T., Koshikawa, N., Kajita, M., Itoh, Y., Sato, H., Tojo, H., Yana, I., & Seiki, M. 2002. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. EMBO J, 21(15): 3949-3959.
- Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C. A., Gutmann, D. H., Ponta, H., & Herrlich, P. 2001. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. Genes Dev., 15(8): 968-980.
- Moury, J. D. & Schoenwolf, G. C. 1995. Cooperative Model of Epithelial Shaping and Bending During Avian Neurulation - Autonomous Movements of the Neural Plate, Autonomous Movements of the Epidermis, and Interactions in the Neural Plate Epidermis Transition Zone. Developmental Dynamics, 204(3): 323-337.
- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T. M., & Ericson, J. 2001. Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell, 104(6): 861-873.
- Nagy, J. I., Hacking, J., Frankenstein, U. N., & Turley, E. A. 1995. Requirement of the hyaluronan receptor RHAMM in neurite extension and motility as demonstrated in primary neurons and neuronal cell lines. J Neurosci., 15(1 Pt 1): 241-252.
- Newman, A., Kuruvilla, A., Pereda, A., & Honrubia, V. 1986. Regeneration of the eight cranial nerve. I. Anatomic verification in the bullfrog. Laryngoscope, 96(5): 484-493.
- Nichols, D. H. 1981. Neural Crest Formation in the Head of the Mouse Embryo As Observed Using A New Histological Technique. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 64(AUG): 105-120.
- Niclou, S. P., Ehlert, E. M., & Verhaagen, J. 2006. Chemorepellent axon guidance molecules in spinal cord injury. J Neurotrauma, 23(3-4): 409-421.
- Niederost, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E., & Bandtlow, C. E. 1999. Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. J Neurosci., 19(20): 8979-8989.
- Noakes, P. G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J. R., & Merlie, J. P. 1995. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. Nature, 374(6519): 258-262.
- Oakley, R. A. & Tosney, K. W. 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(1): 187-206.
- Okado, N. & Oppenheim, R. W. 1985. The Onset and Development of Descending Pathways to the Spinal-Cord in the Chick-Embryo. Journal of Comparative Neurology, 232(2): 143-161.
- Oliferenko, S., Kaverina, I., Small, J. V., & Huber, L. A. 2000. Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. Journal of Cell Biology, 148(6): 1159-1164.

- Ono, K., Bansal, R., Payne, J., Rutishauser, U., & Miller, R. H. 1995. Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. Development, 121(6): 1743-1754.
- Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J. P., Herrlich, P., & Ponta, H. 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. Genes Dev., 16(23): 3074-3086.
- Pasteels, J. Etudes sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques. III. Oiseaux. IV. Conclusions générales. Archives of Biology 48, 381-488. 1937.
- Patterson P.H. 1992. Neuron-target interactions. In Hall Z. (Ed.), An Introduction to Molecular Neurobiology: 428-459. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Paves, H. & Saarma, M. 1997. Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. Cell and Tissue Research, 290(2): 285-297.
- Pearson, J., Johnson, E. M., & Brandeis, L. 1983. Effects of antibodies to nerve growth factor on intrauterine development of derivatives of cranial neural crest and placode in the guinea pig. Dev.Biol., 96(1): 32-36.
- Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., Grumet, M., & Schlessinger, J. 1995. The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. Cell, 82(2): 251-260.
- Perris, R., Krotoski, D., Lallier, T., Domingo, C., Sorrell, J. M., & Bronner-Fraser, M. 1991. Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development. Development, 111(2): 583-599.
- Pfeiler, E., Toyoda, H., Williams, M. D., & Nieman, R. A. 2002. Identification, structural analysis and function of hyaluronan in developing fish larvae (leptocephali). Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol., 132(2): 443-451.
- Pini, A. 1993. Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. Science, 261(5117): 95-98.
- Pizzi, M. A. & Crowe, M. J. 2007. Matrix metalloproteinases and proteoglycans in axonal regeneration. Exp.Neurol., 204(2): 496-511.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. Science, 298(5596): 1248-1251.
- Placzek, M., Tessierlavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., & Dodd, J. 1990. Mesodermal Control of Neural Cell Identity - Floor Plate Induction by the Notochord. Science, 250(4983): 985-988.
- Polleux, F., Morrow, T., & Ghosh, A. 2000. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. Nature, 404(6778): 567-573.

- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S., & Jackson, D. G. 2001. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. J Biol.Chem., 276(22): 19420-19430.
- Price, S. R., Marco Garcia, N. V., Ranscht, B., & Jessell, T. M. 2002. Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. Cell, 109(2): 205-216.
- Pringle, N. P. & Richardson, W. D. 1993. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. Development, 117(2): 525-533.
- Purves, D. & Lichtman, J. W. 1980. Elimination of synapses in the developing nervous system. Science, 210(4466): 153-157.
- Rakic, P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. Science, 183(123): 425-427.
- Rakic, P. & Goldman-Rakic, P. S. 1982. The development and modifiability of the cerebral cortex. Overview. Neurosci.Res.Program.Bull., 20(4): 433-438.
- Rauch, U., Karthikeyan, L., Maurel, P., Margolis, R. U., & Margolis, R. K. 1992. Cloning and Primary Structure of Neurocan, A Developmentally Regulated, Aggregating Chondroitin Sulfate Proteoglycan of Brain. Journal of Biological Chemistry, 267(27): 19536-19547.
- Rauvala, H., Huttunen, H. J., Fages, C., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Imai, S., Raulo, E., & Kilpelainen, I. 2000. Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility. Matrix Biol., 19(5): 377-387.
- Rhiner, C., Gysi, S., Frohli, E., Hengartner, M. O., & Hajnal, A. 2005. Syndecan regulates cell migration and axon guidance in *C. elegans*. Development, 132(20): 4621-4633.
- Rhodes, K. E. & Fawcett, J. W. 2004. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? J Anat., 204(1): 33-48.
- Ridley, A. J. 2001. Rho GTPases and cell migration. J.Cell Sci., 114(Pt 15): 2713-2722.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Altaba, A. R. I., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., & Dodd, J. 1994. Floor Plate and Motor-Neuron Induction by Vhh-1, A Vertebrate Homolog of Hedgehog Expressed by the Notochord. Cell, 76(4): 761-775.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., & Jessell, T. M. 1995. Floor Plate and Motor-Neuron Induction by Different Concentrations of the Amino-Terminal Cleavage Product of Sonic Hedgehog Autoproteolysis. Cell, 81(3): 445-455.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol.Biol., 132: 365-386.
- Ruoslahti, E. 1996. Brain extracellular matrix. Glycobiology, 6(5): 489-492.

- Rutka, J. T., Apodaca, G., Stern, R., & Rosenblum, M. 1988. The Extracellular-Matrix of the Central and Peripheral Nervous Systems - Structure and Function. Journal of Neurosurgery, 69(2): 155-170.
- Sainte-Marie, G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J.Histochem.Cytochem.,(10): 250-256.
- Sakurai, T., Friedlander, D. R., & Grumet, M. 1996. Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta: the secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. J Neurosci.Res., 43(6): 694-706.
- Sakurai, T., Lustig, M., Nativ, M., Hemperly, J. J., Schlessinger, J., Peles, E., & Grumet, M. 1997. Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. J Cell Biol., 136(4): 907-918.
- Saleque, S., Ruiz, N., & Drickamer, K. 1993. Expression and Characterization of A Carbohydrate-Binding Fragment of Rat Aggrecan. Glycobiology, 3(2): 185-190.
- Sanes, J. R. 1989. Extracellular-Matrix Molecules That Influence Neural Development. Annual Review of Neuroscience, 12: 491-516.
- Sauer, F. C. Mitosis in the neural tube. Journal of Comparative Neurology 62, 377-405. 1935.
- Schachner, M. 1994. Lessons from Genetic Knockout Mice Deficient in Neural Recognition Molecules. Neuroscience: From the Molecular to the Cognitive, 100: 25-30.
- Schmalfeldt, M., Dours-Zimmermann, M. T., Winterhalter, K. H., & Zimmermann, D. R. 1998. Versican V-2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. Journal of Biological Chemistry , 273(25): 15758-15764.
- Schoenwolf, G. C. & Desmond, M. E. 1984. Neural tube occlusion precedes rapid brain enlargement. J.Exp.Zool., 230(3): 405-407.
- Schoenwolf, G. C. & Alvarez, I. S. 1991. Specification of Neuroepithelium and Surface Epithelium in Avian Transplantation Chimeras. Development, 112(3): 713-722.
- Schwartz, N. B., Domowicz, M., Krueger, R. C., Jr., Li, H., & Mangoura, D. 1996. Brain aggrecan. Perspect.Dev.Neurobiol., 3(4): 291-306.
- Seidenbecher, C. I., Richter, K., Rauch, U., Fassler, R., Garner, C. C., & Gundelfinger, E. D. 1995. Brevican, A Chondroitin Sulfate Proteoglycan of Rat-Brain, Occurs As Secreted and Cell-Surface Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Isoforms. Journal of Biological Chemistry, 270(45): 27206-27212.
- Selleck, M. A., Garcia-Castro, M. I., Artinger, K. B., & Bronner-Fraser, M. 1998. Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm. Development, 125(24): 4919-4930.
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., & Tessierlavigne, M. 1994. The Netrins Define A Family of Axon Outgrowth-Promoting Proteins Homologous to C-Elegans Unc-6. Cell, 78(3): 409-424.

- Sharma, K., Leonard, A. E., Lettieri, K., & Pfaff, S. L. 2000. Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding. Nature, 406(6795): 515-519.
- Sheppard, A. M., Hamilton, S. K., & Pearlman, A. L. 1991. Changes in the distribution of extracellular matrix components accompany early morphogenetic events of mammalian cortical development. J Neurosci., 11(12): 3928-3942.
- Shiga, T., Gaur, V. P., Yamaguchi, K., & Oppenheim, R. W. 1995. The development of interneurons in the chick embryo spinal cord following in vivo treatment with retinoic acid. J Comp Neurol., 360(3): 463-474.
- Silver, J. & Miller, J. H. 2004. Regeneration beyond the glial scar. Nat.Rev.Neurosci., 5(2): 146-156.
- Sirko, S., von Holst, A., Wizenmann, A., Gotz, M., & Faissner, A. 2007. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. Development, 134(15): 2727-2738.
- Snow, D. M., Lemmon, V., Carrino, D. A., Caplan, A. I., & Silver, J. 1990. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. Exp.Neurol., 109(1): 111-130.
- Snow, D. M., Watanabe, M., Letourneau, P. C., & Silver, J. 1991. A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. Development, 113(4): 1473-1485.
- Sockanathan, S. & Jessell, T. M. 1998. Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. Cell, 94(4): 503-514.
- Sohal, G. S., Ali, M. M., & Tsai, N. T. 1995. Formation of the cranial motor neurons in the absence of the floor plate. Int.J.Dev.Neurosci., 13(8): 819-824.
- Sperry R.W. Centripetal regeneration of the 8th cranial nerve root with systematic restoration of vestibular reflexes. American Journal of Physiology 114, 735-741. 1945.
- Sperry, R. W. 1961. Cerebral Organization and Behavior: The split brain behaves in many respects like two separate brains, providing new research possibilities. Science, 133(3466): 1749-1757.
- Spicer, A. P. & McDonald, J. A. 1998. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. J Biol.Chem., 273(4): 1923-1932.
- Stewart, G. R. & Pearlman, A. L. 1987. Fibronectin-like immunoreactivity in the developing cerebral cortex. J Neurosci., 7(10): 3325-3333.
- Streit, A., Nolte, C., Rasony, T., & Schachner, M. 1993. Interaction of astrochondrin with extracellular matrix components and its involvement in astrocyte process formation and cerebellar granule cell migration. J Cell Biol., 120(3): 799-814.
- Suzuki, N., Yokoyama, F., & Nomizu, M. 2005. Functional sites in the laminin alpha chains. Connect.Tissue Res., 46(3): 142-152.

- Szigeti, Z. M., 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(6): 819-831.
- Takeo, S., Fujise, M., Akiyama, T., Habuchi, H., Itano, N., Matsuo, T., Aigaki, T., Kimata, K., & Nakato, H. 2004. In vivo hyaluronan synthesis upon expression of the mammalian hyaluronan synthase gene in *Drosophila*. Journal of Biological Chemistry, 279(18): 18920-18925.
- Tanabe, K. K. & Saya, H. 1994. The CD44 adhesion molecule and metastasis. Crit Rev.Oncog., 5(2-3): 201-212.
- Tanabe, Y., William, C., & Jessell, T. M. 1998. Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. Cell, 95(1): 67-80.
- Tanaka, H., Shan, W. S., Phillips, G. R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley, G. W., Benson, D. L., & Colman, D. R. 2000. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. Neuron, 25(1): 93-107.
- Thompson, W. 1983. Synapse elimination in neonatal rat muscle is sensitive to pattern of muscle use. Nature, 302(5909): 614-616.
- Toole, B. P. 1990. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. Curr.Opin.Cell Biol., 2(5): 839-844.
- Toole, B. P. 1997. Hyaluronan in morphogenesis. J.Intern.Med., 242(1): 35-40.
- Toole, B. P. 2000. Hyaluronan is not just a goo! J Clin.Invest, 106(3): 335-336.
- Tosney, K. W., Hotary, K. B., & Lance-Jones, C. 1995. Specifying the target identity of motoneurons. Bioessays, 17(5): 379-382.
- Toth, P., Csank, G., & Lazar, G. 1985. Morphology of the Cells of Origin of Descending Pathways to the Spinal-Cord in *Rana-Esculenta* - A Tracing Study Using Cobaltic-Lysine Complex. Journal Fur Hirnforschung, 26(4): 365-383.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A., & Herz, J. 1999. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. Cell, 97(6): 689-701.
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., & Pfaff, S. L. 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. Cell, 79(6): 957-970.
- Turner, D. L. & Cepko, C. L. 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature, 328(6126): 131-136.
- Twitty, V. C. & Johnson, H. H. 1934. Motor inhibition in *Amblystoma* produced by *Triturus* transplants. Science, 80(2064): 78-79.

- Twitty, V. C. Experiments on the phenomenon of paralysis produced by a toxin occurring in *Triturus* embryos. *Journal of Experimental Zoology* 76, 67-104. 1937.
- Van Allen, M. I., Kalousek, D. K., Chernoff, G. F., Juriloff, D., Harris, M., McGillivray, B. C., Yong, S. L., Langlois, S., MacLeod, P. M., Chitayat, D., & . 1993. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am.J.Med.Genet.*, 47(5): 723-743.
- Verna, J. M., Fichard, A., & Saxod, R. 1989. Influence of glycosaminoglycans on neurite morphology and outgrowth patterns in vitro. *Int.J.Dev.Neurosci.*, 7(4): 389-399.
- Wallace, V. A. 1999. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Current Biology*, 9(8): 445-448.
- Wang, C., Entwistle, J., Hou, G., Li, Q., & Turley, E. A. 1996. The characterization of a human RHAMM cDNA: conservation of the hyaluronan-binding domains. *Gene*, 174(2): 299-306.
- Wang, H. U. & Anderson, D. J. 1997. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron*, 18(3): 383-396.
- Wang, J., Jing, Z., Zhang, L., Zhou, G., Braun, J., Yao, Y., & Wang, Z. Z. 2003. Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC. *Nat.Neurosci.*, 6(10): 1017-1018.
- Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., & Barres, B. A. 1998. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron*, 21(1): 63-75.
- Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J., & Cantor, H. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 271(5248): 509-512.
- Weigel, P. H., Hascall, V. C., & Tammi, M. 1997. Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22): 13997-14000.
- Westerfield, M., Liu, D. W., Kimmel, C. B., & Walker, C. 1990. Pathfinding and synapse formation in a zebrafish mutant lacking functional acetylcholine receptors. *Neuron*, 4(6): 867-874.
- Wright, J. W., Kramar, E. A., Meighan, S. E., & Harding, J. W. 2002. Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides*, 23(1): 221-246.
- Yaginuma, H. & Oppenheim, R. W. 1991. An experimental analysis of in vivo guidance cues used by axons of spinal interneurons in the chick embryo: evidence for chemotropism and related guidance mechanisms. *J.Neurosci.*, 11(8): 2598-2613.
- Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M., & Yamaguchi, Y. 1994. Molecular-Cloning of Brevican, A Novel Brain Proteoglycan of the Aggrecan Versican Family. *Journal of Biological Chemistry*, 269(13): 10119-10126.

- Yamada, H., Fredette, B., Shitara, K., Hagihara, K., Miura, R., Ranscht, B., Stallcup, W. B., & Yamaguchi, Y. 1997. The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. J Neurosci, 17(20): 7784-7795.
- Yamada, K. M., Spooner, B. S., & Wessells, N. K. 1971. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J Cell Biol, 49(3): 614-635.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., & Jessell, T. M. 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. Cell, 64(3): 635-647.
- Yamada, T., Pfaff, S. L., Edlund, T., & Jessell, T. M. 1993. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. Cell, 73(4): 673-686.
- Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D., & Copp, A. J. 2002. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. Development, 129(10): 2507-2517.
- Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. 2007. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. Development, 134(17): 3203-3211.
- Yip, G. W., Ferretti, P., & Copp, A. J. 2002. Heparan sulphate proteoglycans and spinal neurulation in the mouse embryo. Development, 129(9): 2109-2119.
- Yip, J. W., Yip, Y. P., Nakajima, K., & Capriotti, C. 2000. Reelin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A, 97(15): 8612-8616.
- Yu, Q., Grammatikakis, N., & Toole, B. P. 1996. Expression of multiple CD44 isoforms in the apical ectodermal ridge of the embryonic mouse limb. Dev.Dyn., 207(2): 204-214.
- Yu, Q. & Stamenkovic, I. 1999. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. Genes Dev., 13(1): 35-48.
- 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(8): 3914-3918.
- Zakon, H. & Capranica, R. R. 1981. An anatomical and physiological study of regeneration of the eighth nerve in the leopard frog. Brain Res, 209(2): 325-338.
- Zhang, S., Chang, M. C., Zylka, D., Turley, S., Harrison, R., & Turley, E. A. 1998. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. J Biol.Chem., 273(18): 11342-11348.
- Zimmermann, D. R. & Ruoslahti, E. 1989. Multiple Domains of the Large Fibroblast Proteoglycan, Versican. Embo Journal, 8(10): 2975-2981.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S.,

& Cattaneo, E. 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. Science, 293(5529): 493-498.

Zuo, J., Hernandez, Y. J., & Muir, D. 1998. Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. Journal of Neurobiology, 34(1): 41-54.

11. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezést megalapozó in estenso közlemények:

Meszar Z, Felszeghy S, Veress G, Matesz K, Szekely G, and Modis L. 2008. Hyaluronan accumulates around differentiating neurons in spinal cord of chicken embryos. Brain Res Bull 75:414-418. **IF: 1,684**

Halasi G, Wolf E, Bacskai T, Szekely G, Modis L, Szigeti ZM, **Meszar Z**, Felszeghy S, and Matesz C. 2007. The effect of vestibular nerve section on the expression of the hyaluronan in the frog, *Rana esculenta*. Brain Struct Funct 212:321-334. **IF: 1,277**

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb in extenso közlemények:

Felszeghy S, **Meszar Z**, Prehm P, and Modis L. 2005. The expression pattern of hyaluronan synthase during human tooth development. Arch Oral Biol 50:175-179. **IF: 1,288**

Szigeti ZM, Matesz C, Szekely G, Felszeghy S, Bacskai T, Halasi G, **Meszar Z**, and Modis L. 2006. Distribution of hyaluronan in the central nervous system of the frog. J Comp Neurol 496:819-831. **IF: 3,831**

A megjelent közlemények összesített impact faktora: 8,08

Idézhető kongresszusi absztrakt:

Meszar Z, Matesz K, Szigeti ZM, Veress G, Szekely G, Felszeghy S, and Modis L. Distribution of hyaluronan and hyaluronan-associated proteins in the spinal cord of chicken embryos. Febs Journal 1, 273. 2005.

Egyéb kongresszusi absztraktok:

Meszar Z, Szekely G, Matesz K, and Modis L. Hyaluronan distribution pattern in developing spinal cord of chicken embryos. Clinical Neuroscience 1, 45-46. 2004.

Meszar Z, Szigeti ZM, Matesz K, Veress G, Szekely G, Felszeghy S, and Modis L. Hyaluronsav és hyaluronsavhoz kapcsolódó proteinek megoszlása a fejlődő csirkeembryo gerincvelőben. XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok 1, 173. 2005.

Meszar Z, Matesz K, Szigeti ZM, Szekely G, Felszeghy S, and Modis L. Expression of hyaluronan and hyaluronan binding proteins during spinal cord development of chicken embryos. Clinical Neuroscience 1, 66-67. 2005.

Szigeti ZM, **Meszar Z**, Matesz K, Modis L, and Szekely G. Expression of extracellular matrix molecules during optic nerve regeneration in the frog. Clinical Neuroscience 1, 62. 2005.

Szigeti ZM, **Meszar Z**, Matesz K, Bacskai T, Szekely G, and Modis L. Distribution of the extracellular matrix molecules in the visual system of the frog. *Clinical Neuroscience* 1, 61-62. 2006.

Racz E, **Meszar Z**, Veress G, Modis L, Szekely G, and Matesz K. Composition of the perineuronal net of motoneurons in the brain stem. *Clinical Neuroscience* 1, 54-55. 2007.

12. Melléklet: az értekezést megalapozó közlemények különnyomatai