

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Extracellularis mátrix molekulák eloszlása a
nuclei precerebellares és a bulbus olfactorius területén**

Hunyadi Andrea

Témavezető: Dr. Rácz Éva



**Debreceni Egyetem
Idegtudományi doktori iskola
Debrecen, 2020**

Extracelluláris mátrix molekulák eloszlása a nucleii precerebellares és a bulbus olfactorius területén

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az elméleti orvostudományok és klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Hunyadi Andrea, molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Rácz Éva, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csiba László, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Halasy Katalin, MTA doktora
Dr. Deák Ádám, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2021. január 26., 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Elekes Károly, MTA doktora

Dr. Fekete Klára, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csiba László, akadémikus

tagok: Prof. Dr. Halasy Katalin, MTA doktora

Prof. Dr. Elekes Károly, MTA doktora

Dr. Deák Ádám, PhD

Dr. Fekete Klára, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2021. január 26., 13:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a hunyadi.a2@gmail.com e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2021. január 25.) 12 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. Bevezetés

1.1. Extracellularis mátrix

Az extracellularis teret az extracellularis mátrix (ECM) makromolekulái töltik ki a központi idegrendszerben, mikrokörnyezetet biztosítva ezáltal a neuronok és glia sejtek számára. Az ECM fő komponensei a hialuronsav (HA), a kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG) (aggrekán, brevikán, neurokán, verzikán) és a glikoproteinek, mint a tenascin-R (TN-R) és a kapcsoló fehérjék (pl.: HAPLN1). Az ECM-nek a központi idegrendszerben több megjelenési formája ismert. A molekulák diffúzhálózatot képezhetnek a neuropilben, illetve különböző neuronális struktúrák köré akkumulálódva, kondenzált megjelenési formákat alakíthatnak ki. A kondenzált megjelenési formáknak három fő változata ismert: (1) a perineuronális háló (PNN), mely a neuronok sejtteste, az axon initialis szegmentuma és a dendritek proximális része körül szerveződő sűrű molekulaszövet, (2) nodalis ECM a Ranvier-féle befűződések körül, (3) az axon terminálisokat behüvelyező, 'axonal coat' (AC). Az ECM különböző megjelenési formáinak molekuláris összetétele függ a neuronok funkciójától, összeköttetéseitől, morfológiai és neurokémiai sajátosságaitól.

1.2. Nuclei precerebellares

Az általaunk vizsgált oliva inferior (OI) és nucleus prepositus hypoglossi (PHN) a nuclei precerebellares csoportjába tartoznak. A kisagy elsősorban a nagyagykéregből származó motoros parancsok és a gerincvelő felől érkező szenzoros információk összehangolását végzi. Ezen információk közvetett módon, az agytörzsben található nuclei precerebellares-en keresztül, moha- vagy kúszórostok közvetítésével érik el a kisagy területét. Míg a moharostok számos agytörzsi magból eredhetnek, köztük a PHN-ből, addig a kúszórostok elsődleges forrását az OI jelenti.

Munkacsoportunk figyelmének központjában a vestibularis magkomplex felépítésének és kapcsolatrendszernek vizsgálata áll, valamint annak feltárása, hogy a vestibularis magok területén megfigyelhető morfológiai és funkcionális különbségek mutatnak-e párhuzamot az ECM molekulák eloszlásával és szerveződésével. A vestibularis magokba érkező ingerület származhat a belső fülben található labirintusból, illetve lehet vizuális és proprioceptív eredetű. A vestibularis magokban történő komplex ingerület feldolgozást követően az információ direkt vagy indirekt úton elsősorban a szemmozgató, illetve gerincvelői motoneuronok felé továbbítódik, jelentős szerepet játszva ezáltal mozgás során az egyensúly megtartásában, illetve a szemmozgások koordinációjában. Az indirekt transzmisszióban a nucleii precerebellares közül elsősorban az OI-nak és a PHN-nak van kulcsfontosságú szerepe, melyek a kisagy aktivitásának szabályozásán keresztül látják el funkciójukat.

1.2.1. Oliva inferior

Az OI, szerkezetét tekintve, három almagra osztható: principal olive (PO), dorsal accessory olive (DAO) és medial accessory olive (MAO)¹. A három almagon kívül további, kisebb neuron csoportok figyelhetők meg az OI területén, melyek összeköttetések alapján a MAO részeinek tekinthetők: dorsal cap (DC), nucleus β , ventrolateral outgrowth (VLO) és dorsomedial cell column (DMCC). Funkcionálisan az OI-on belül szomatoszenzoros, vizuomotoros-vestibularis és integratív sejtcsoportok különíthetők el, melyek sejtjei jellegzetes topográfiai elrendeződést mutatnak.

Az OI sejtjei morfológiailag egységes populációt képeznek. Neuronjai 2-7 dendrittel rendelkeznek, melyek a sejttesttől 10-20 μm távolságban oszlanak el. A sejttest és a dendritek proximális részének felszínén szinapszisok ritkán figyelhetők

¹ Az almagok elnevezése az angol nevezéktan alapján történt.

meg, többnyire a dendritek distalis részén látható glomerulusok területén fordulnak elő. Az OI-ból kiinduló tractus olivocerebellaris rostjai a kisagykéreg különböző területeihez futnak és mint kúszórostok aktiválják a Purkinje sejteket, illetve axon kollaterálisok révén egyes kisgygi magok neuronjaival is serkenő kapcsolatot alkotnak.

1.2.2. Nucleus prepositus hypoglossi

A PHN a nucleus hypoglossus felső pólusától rostralisan található, a negyedik agykamra fenekén, a nucleus vestibularis medialishez (MVN) képest medialisan, a nervus facialis térdéhez közel helyezkedik el. A PHN sejtjei a sejttest mérete, elhelyezkedése és a dendritfa elágazódása alapján három csoportba sorolhatók. A PHN caudalis részének dorsolaterális régióját, amely elsősorban kisméretű sejteket tartalmaz, parvocellularis alumnak, míg a főként nagyméretű neuronokat tartalmazó, ventromedialis részt magnocellularis alumnak nevezzük. A fennmaradó területeken dominánsan a közepes mérettartományba eső sejtek fordulnak elő. A PHN neuronjai egyaránt lehetnek serkentő, illetve gátló sejtek. Funkcióját tekintve a PHN a látó és a vestibularis rendszer közötti kapcsolat kialakításában játszik szerepet.

1.3. Bulbus olfactorius

A BO lamínaris szerkezetű struktúra, így számos, egymással párhuzamos rétegre osztható, melyeken belül különböző típusú neuronokat azonosíthatunk. A neuronok csoportosítása leggyakrabban a sejttestük lokalizációja alapján történik. A külső felszín felől a mélyebb régiók felé haladva a következő rétegeket különíthetjük el: glomerularis réteg (GL), külső plexiform réteg (EPL), mitralis sejtek rétege (MCL), belső plexiform réteg (IPL), granularis sejtek rétege (GCL).

A BO különböző rétegeinek kialakításában számos sejttípus vesz részt. Megtalálhatók projekciós neuronok: mitralis sejtek és pamacsos sejtek. Interneuronok közül a következők azonosíthatók: periglomerularis sejtek, külső pamacsos sejtek, short axon sejtek, granularis sejtek, Van Gehuchten sejtek és Blanes sejtek. Jellemző glia sejtek: astrocyta, oligodendrocyta, olfactory ensheathing sejtek, NG2 és mikrogliá.

A BO szinaptikus plaszticitás szempontjából az agy kitüntetett területét képviseli, hiszen neuronális hálózata folyamatosan átépülő rendszert képez. Ez az élethosszig tartó átszerveződés két mechanizmuson keresztül valósul meg: (1) a szaglópámban lévő érzékszövetek folyamatosan megújulnak és benövő axonjaik a glomerulusok már meglévő neuronális hálózatába integrálódnak, melyet ugyanazon szagló receptort expresszáló neuroepithel sejtek axonjai alkotnak, (2) a BO neuronális hálózatába folyamatosan épülnek be a subventricularis zónából származó, újonnan képződő neuronok. Ezen folyamatok igen magas fokú plaszticitást biztosítanak a szaglórendszer számára, bár a háttérben álló molekuláris mechanizmusok részleteikben nem ismertek.

2. Célkitűzés

Mivel az irodalmi adatok és korábbi vizsgálataink is azt sugallják, hogy az ECM molekulák jelenléte, illetve hiánya jelentős mértékben befolyásolja a központi idegrendszer szinaptikus plaszticitását és regenerációját, ezért jelen munkánk során célul tűztük ki ezen molekulahálózat összetételének pontos feltérképezését három olyan agyterületen, melyek fokozott szinaptikus plaszticitással rendelkeznek. Vizsgálatainkat patkányokon végeztük.

1. Kísérleteink első szakaszában az OI és a PHN területét tanulmányoztuk, melyek kiterjedt kapcsolatban állnak a munkacsoportunk által részletesen vizsgált és igen magas fokú plaszticitással rendelkező vestibularis rendszerrel.

a. Az OI kapcsán felmerül a kérdés, hogy az ECM molekulák eloszlási mintája követi-e az almagok funkcionális heterogenitását, vagy az egységes morfológiai bélyegeknél megfelelően az ECM molekulák eloszlása is homogénnek bizonyul.

b. Hasonlóképpen, a PHN esetében is kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e összefüggés a mag területén található neuronok morfológiai és funkcionális tulajdonságai, valamint az ECM molekulák eloszlása között.

2. Ezt követően kísérleteinket a BO területére terjesztettük ki, melyről ismeretes, hogy szinaptikus hálózatának folyamatos átszerveződése teljes élethosszig megmarad.

Az általunk vizsgált, fokozott szinaptikus plaszticitással rendelkező területeken expresszált ECM molekulák kimutatása és ezen molekulák expressziós mintázatában megfigyelhető regionális különbségek feltárása, majd a eredmények összevetése a központi idegrendszer egyéb, kevésbé plasztikus területeinek vizsgálata során kapott eredményekkel, segítséget nyújthat az ECM szinaptikus plaszticitásban betöltött szerepének megismerésében.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Mintaelőkészítés

A kísérletek kivitelezése a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának irányelvei alapján (OI, PHN engedély száma: 11/2011/DEMAB, BO engedély száma: 6/2017/DEMAB) és az EU szabályzatának (European Communities Council Directive of 24 November 1986; 86/609/EEC) megfelelően történt. Vizsgálatainkat 12-14 hetes, felnőtt, nőtény Wistar patkányon (Charles River Laboratory, Strain Crl: WI) végeztük el. Az állatok altatása 10%-os uretánnal intraperitoneális úton történt, amelyet fiziológiás sóoldattal való transcardialis perfúzió követett. Az agytörzsek eltávolítása után a mintákat Sainte-Marie fixálószerbe (99% abszolút alkohol és 1% jégcet) helyeztük, majd paraffinba történő ágyazást követően, mikrotóm segítségével, 8 μ m vastagságú szeletekből álló frontális sorozatmetszeteket készítettünk.

A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciókat a nem-specifikus kötőhelyek blokkolása előzte meg.

Az OI és a PHN esetében a mintákat a következő blokkoló szerekkel kezeltük: 1% szarvasmarha szérum albumin (BSA) (*HA*; *Wisteria floribunda* agglutinin, *WFA*), 1% BSA + 10% normál kecske szérum (NGS) (*aggrekán*), 2% BSA (*verzikán*; *HA*; *HAPLN1*), 3% normál ló szérum (NHS) (*neurokán*), 1% BSA + 10% NHS (*brevikán*) és 1% BSA + 10% normál nyúl szérum (NRS) (*TN-R*).

A BO vizsgálata során a következő blokkoló szereket alkalmaztuk: 3% BSA (*HA*; *WFA*; *verzikán*), 3% BSA + 10% NGS (*aggrekán*), 3% BSA + 10% NRS (*egérben termelt monoklonális anti-kondroitin szulfát proteoglikán*, *Cat-301*; *neurokán*), 3% BSA + 10% normál szamár szérum (NDS) (*brevikán*; *TN-R*; *HAPLN1*).

3.2. Hisztokémiai reakciók

3.2.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi

A HA eloszlásának detektálására biotinilált hialuronsav kötő fehérjét, míg a PNN általános markereként biotinilált *Wisteria floribunda* agglutinint alkalmaztunk. A lektinek csoportjába tartozó WFA specifikusan kötődik a CSPG-ok és a glikoproteinek N-acetil-galaktozamin alegységéhez, így általa információt nyerhetünk ezen molekulák neuronok körüli megjelenéséről. A reakciók vizualizálása ExtrAvidin Peroxidase, H₂O₂ és 3,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid kromogén segítségével történt.

3.2.2. Bulbus olfactorius

A HA és a WFA reakciók kivitelezése a 3.2.1. fejezetben leírtak szerint történt. A reakciók vizualizálásához Streptavidin AlexaFluor 555 jelölő anyagot használtunk.

3.3. Immunhisztokémiai reakciók

3.3.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi

A CSPG-ok és a glikoproteinek kimutatása antitestek segítségével történt. Vizsgálataink során az alábbi primer antitesteket használtuk: nyúlban termelt poliklonális anti-aggrekán, egérben termelt monoklonális anti-verzikán, egérben termelt monoklonális anti-neurokán, egérben termelt monoklonális anti-brevikán, kecskében termelt poliklonális anti-TN-R és kecskében termelt poliklonális anti-HAPLN1. Az aggrekán, a brevikán és a verzikán esetében a jobb antigén feltárás érdekében a metszeteket kondroitináz ABC enzimmel való emésztésnek vetettük alá.

A primer reagenseknek megfelelően az alábbi szekunder antitesteket alkalmaztuk: biotinilált, kecskében termelt anti-nyúl IgG (*aggrekán*); biotinilált,

lóban termelt anti-egér IgG (*verzikán, neurokán és brevikán*) és biotinilált, nyúlban termelt anti-kecske IgG (*TN-R és HAPLN1*). A vizualizáció során a HA és a WFA reakciók esetében leírtak szerint jártunk el.

3.3.2. Bulbus olfactorius

A CSPG-ok és a glikoproteinek kimutatása során az a lábbi primer antitesteket használtuk: nyúlban termelt poliklonális anti-aggregán, Cat-301, egérben termelt monoklonális anti-verzikán, egérben termelt monoklonális anti-neurokán, bárányban termelt poliklonális anti-brevikán, kecskében termelt poliklonális anti-TN-R, kecskében termelt poliklonális anti-HAPLN1. Az aggregán, a Cat-301, a verzikán és a brevikán esetében a jobb antigén feltárás érdekében a metszeteket ebben az esetben is kondroitináz ABC emésztésnek vetettük alá. A reakciók vizualizálása AlexaFluor 555 jelölőanyaggal konjugált szekunder antitestek segítségével történt: kecskében termelt anti-nyúl IgG (*aggregán*), nyúlban termelt anti-egér IgG (*verzikán, neurokán, Cat-301*), számban termelt anti-bárány IgG (*brevikán*) és számban termelt anti-kecske IgG (*TN-R, HAPLN1*).

3.3.2.1. Kettős fluoreszcens jelölés

Az ECM molekulák pontos lokalizációjának meghatározásához a fent leírt reakciókat a dendritek és az axonok jelölésével kombináltuk. Az axonok feltüntetésére neurofilament elleni antitestet (egérben termelt monoklonális anti-neurofilament vagy nyúlban termelt poliklonális anti-neurofilament) alkalmaztunk, míg a dendritek jelölése mikrotubulushoz asszociált protein 2 (MAP2) elleni antitest (nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2) segítségével történt. A neurofilament és a MAP2 elleni antitestekkel történő inkubációt megelőzően a metszeteket blokkoltuk: 3% BSA + 10% NGS (*egérben termelt anti-neurofilament*), 3% BSA + 10% NDS (*nyúlban termelt anti-neurofilament; nyúlban termelt anti-MAP2*).

Vizsgálataink során a következő antitest kombinációkat alkalmaztuk: egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + WFA, egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + aggrekán, nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2 + Cat-301, nyúlba termelt poliklonális anti-neurofilament + verzikán, egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + brevikán, nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2 + brevikán, egérben termelt monoklonális anti-neurofilament + HAPLN1, nyúlban termelt poliklonális anti-MAP2 + HAPLN1.

A neurofilament és MAP2 reakciók vizualizálása AlexaFluor 488 jelű anyaggal konjugált szekunder antitestek segítségével történt: kecskében termelt anti-egér IgG (*egérben termelt anti-neurofilament*), szamárbán termelt anti-nyúl IgG (*nyúlban termelt anti-neurofilament és nyúlban termelt anti-MAP2*).

3.4. Az eredmények feldolgozása

3.4.1. Oliva inferior, nucleus prepositus hypoglossi

A képeket Nikon Eclipse E800 fénymikroszkóp segítségével készítettük, a kontraszt és a háttér beállításaink minimális módosítását a Photoshop CS4 v11.0 használatával végeztük.

3.4.2. Bulbus olfactorius

A képeket (a szuper-rezolúciós felvételek kivételével) Olympus CX31 epifluoreszcens fénymikroszkóp és DP27 kamera segítségével készítettük, a kontraszt és a háttér beállításaink minimális módosítását a Photoshop CS4 v11.0 használatával végeztük. A szuper-rezolúciós felvételeket Olympus FV-3000 konfokális mikroszkóp alkalmazásával készítettük.

3.4.3. A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív kiértékelése

A hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív kiértékelését elvégeztük az OI, a PHN és a BO esetében is. Három különböző állati gyűrűsének azonos szintjeiből készült, illetve a BO területéről származó metszetek kerültek kiválogatásra, amelyekről az ECM molekulák kimutatására irányuló reakciók elvégzése után felvételeket készítettünk. A reakciók festődési intenzitásának meghatározásához öt fokozatú skálát használtunk (-: nincs festődés, +: gyenge festődés, ++: mérsékelt festődés, +++: erős festődés, ++++: nagyon erős festődés). A BO esetében az ECM kondenzált formáinak előfordulását rétegenként jelöltük. A kiértékelés két személy független véleménye alapján készült, azonos nagytítás, kontraszt és fényerősség beállítását követően, melyet három másik kollégánk ellenőrzött.

4. Eredmények

4.1. Oliva inferior

Az OI területén az ECM szerveződésének legszembetűnőbb sajátossága a PNN hiánya, amely összefüggésben lehet az itt található neuronok egyedi morfológiai és kapcsolatbeli tulajdonságaival. Mivel a szinapszisok többsége a dendritek distalis részén kialakuló glomerulusokra korlátozódik és a sejttesten, illetve a dendritek proximalis részén szinaptikus kapcsolatok csak elvétve láthatók, feltételezhetjük, hogy nincs szükség a PNN szinapszisokat stabilizáló hatására. Ugyanakkor figyelembe véve a szinapszisok lokalizációját és az ECM szinaptikus kapcsolatokat stabilizáló szerepét, valószínű, hogy a neuropilben megfigyelt, erősen festődő, gyűrűszerű struktúrák az ECM glomerulusok körüli akkumulációját jelzik. Brückner és mtsai. 2008-ban 'axonal coat' néven először említették a kondenzált ECM axon terminálisok körül történő megjelenését mind gátló, mind serkentő szinapszisok

esetén. A neuropil területén általunk megfigyelt, gyűrűszerű struktúrák tehát valószínűleg az ECM ezen kondenzált megjelenési formáját reprezentálják. A kondenzált ECM egy másik speciális megjelenési formáját a verzikán jelölésével tettük láthatóvá. A verzikán reakciót követően erősen festődő, pontszerű képletek jelentek meg a neuropil területén, melyek vélhetően a Ranvier-féle befűződések körül kialakuló nodalis ECM-et jelölik.

Az OI neuronjainak meglehetősen egységes morfológiai tulajdonságai alapján feltételezhetnénk az ECM molekulák homogén eloszlását az almagok területén. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az ECM megjelenési formája valóban egységes az OI területén, azonban a vizsgált molekulák eloszlása és az egyes molekulák kimutatása érdekében elvégzett immunreakciók intenzitása jelentős eltéréseket mutatott.

Funkcionálisan az OI-on belül szomatoszenzoros, vizuomotoros-vestibularis és integratív sejtcsoportok különíthetők el, melyek sejtjei jellegzetes topográfiai elrendeződést mutatnak. A három, funkcionális szempontból eltérő régió közül a vizuomotoros-vestibularis magok (DMCC, DC, nucleus β) esetében tapasztaltuk az ECM molekulák legváltozatosabb eloszlását. A legszembetűnőbb különbséget az aggregátumok esetében figyeltük meg, hiszen a DC negatívnak bizonyult ezen molekulára nézve, míg a DMCC és a nucleus β területén intenzív reakció volt megfigyelhető. Az aggregátum az AC egyik esszenciális komponense, irodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy a szinapszisok stabilizálása által gátolja a központi idegrendszer kapcsolatainak átépülését. Az aggregátum hiánya a DC területén fokozhatja a szinaptikus plaszticitást az oculomotoros aktivitás során. A másik szembetűnő jelenség a neurokán expressziója kapcsán volt megfigyelhető: erőteljes reakcióintenzitást detektáltunk a nucleus β területén, ezzel szemben a DC és DMCC esetében vagy nagyon gyenge festődést mutatottunk ki, vagy ezen területek teljesen negatívnak bizonyultak. A neurokán fokozott expressziója figyelhető meg prenatálisan és a korai postnatalis korban. Termelődése jelentősen csökken a

második postnatalis héttől, bár expressziója a központi idegrendszer sérülését követően újra fokozódik. Egyre nagyobb számú irodalmi adat támasztja alá, hogy az ECM érése a fejlődés során jelentősen korlátozza a központi idegrendszer plaszticitását, mely folyamat részét képezi a neurokán expressziójának születést követő csökkenése is. A szomatoszenzoros magok (DAO, MAO horizontális lamellája) területén az ECM expressziós mintázata csekély eltéréseket mutatott. Annak ellenére, hogy az OI integratív részét képező magok (PO, MAO rostrális lamellája) kapcsolatrendszere jelentősen eltér, az ECM molekulák eloszlása ezeken a területeken is azonosnak bizonyult. Szembetűnő jelenség, hogy az aggregán reakció intenzitása igen erős volt az integratív magcsoport részét képező PO területén, míg a vizuomotoros DC esetében nem tudtunk jelet detektálni. Ez részben magyarázható a két almag közötti funkcionális különbséggel, valamint azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a két mag neuronjainak elektrofiziológiai tulajdonságai jelentős különbségeket mutatnak.

4.2. Nucleus prepositus hypoglossi

A PHN parvocellularis és magnocellularis részében az ECM molekulák eltérő eloszlási mintázatot mutatnak. A két terület között különbségek figyelhetők meg a neuropil festődési intenzitásában, mely az alegységeken belül sem egyenletes, valamint a PNN megjelenésében is. A PHN magnocellularis részében PNN előfordulását figyeltük meg a HA, a WFA, az aggregán, a TN-R és a HAPLN1 reakciókat követően, bár a pericellularis festődés intenzitása jelentős különbségeket mutatott a magnocellularis almag sejtjei körül. A brevikán és a neurokán jelölését követően PNN jelenlétét nem tudtuk igazolni. A PHN parvocellularis részében az ECM molekulák ritkán alakítanak ki PNN-t, kizárólag az aggregán és a TN-R molekulák esetében figyeltünk meg halvány pericellularis jelölődést a sejtek körül. A CSPG-ok az emlősök központi idegrendszerében a PNN esszenciális részét képezik, illetve közismert, hogy gátló hatással vannak a szinaptikus plaszticitásra és

a központi idegrendszer regenerációjára. A vestibularis magokkal ellentétben, ahol a PNN kialakításában az aggregán, a brevikán, a neurokán és a verzikán is részt vesz, a PHN magnocellularis területén kizárólag az aggregán jelenlétét tudtuk azonosítani. A PHN, összegző funkciója miatt, jelentős szerepet tölt be a vestibuloocularis reflex horizontalis komponensének háttérében álló neuronális hálózat kialakításában, így feltételezhetjük, hogy a CSPG-ok további képviselőinek hiánya elősegíti ezen neuronhálózat nagyobb fokú plaszticitását, mely elengedhetetlen a folyamatos alkalmazkodáshoz a tekintet fixálása során.

A neuropil festődését minden egyes vizsgált ECM molekula esetében megfigyeltük a PHN teljes területén, azonban a legtöbb esetben a magnocellularis részben erősebb jel volt detektálható. A parvocellularis és a magnocellularis a legeségek közötti legszembetűnőbb különbség a neurokán és az aggregán reakciók esetében volt megfigyelhető. A neuropil festődési intenzitása az almagokon belül sem volt egységes, elsősorban a magnocellularis területen találtunk regionális különbségeket. A PHN parvocellularis területén néhány, sötétben festődő, szabálytalan terület volt megfigyelhető az aggregán, a verzikán és a TN-R esetében. Az ECM reakciókat követően a neuropilben, elsősorban a PHN magnocellularis területén, ovális vagy kerek, 2-4 μm átmérőjű intenzíven festődő struktúrák rajzolódtak ki, melyek a kondenzált ECM egyik típusának, az AC-nak felelnek meg. A verzikán reakció eredményeként nagyszámú, erősen festődő pontszerű képletet figyeltünk meg a neuropil területén, melyek a nodalis ECM jelenlétére utalnak.

4.3. Bulbus olfactorius

Jelen munkánk során leírtuk, a központi idegrendszer felépítésében résztvevő, legjelentősebb ECM molekulák (HA, lektikánok, TN-R és a HAPLN1) szerveződését patkány BO területén. Az elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók intenzitása és a festődés mintázata jelentős

különbségeket mutatott a különböző rétegekben és az egyes rétegeken belül. Az ECM molekulák elsősorban a neuropil területén voltak kimutathatók, szerveződésükre mind a diffúz, mind a kondenzált megjelenési forma jellemző volt. Utóbbit elsősorban az AC-ok és a Ranvier-féle befűződések körüli nodalis ECM-ek képviselik, míg PNN-t csak igen ritkán tudtunk azonosítani.

A **glomerularis rétegben** a WFA és az aggregátumok esetében tapasztaltuk a legerősebb reakcióintenzitást, ezt követte a HA, a neurokán és a HAPLN1 mérsékeltbb megjelenése. A leggyengébb reakciót a brevikán és a TN-R mutatta, míg a GL verzikánra nézve negatív volt. Mivel a verzikán és a TN-R a nodalis ECM esszenciális komponenseit képezik, ezen molekulák aacsony szintű expressziója, illetve hiánya valószínűleg a Ranvier-féle befűződések hiányára utal, mely jelenség magyarázható a nervus olfactorius mielinizálatlan axonjainak jelenlétével. A GL egyik legszembetűnőbb jellemvonása az erősen és gyengén festődő glomerulusok váltakozása volt, mely jelenség megfigyelhető a WFA, az aggregátumok és a HAPLN1 reakciók esetében, és amelynek magyarázata további vizsgálatokat igényel. Egy másik szokatlan jellemvonás, az intra glomerularis terület festődési mintázatában megfigyelhető foltszerűen festett és festetlen területek szabálytalan váltakozása. Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az így kialakult mintázat az intra glomerularis ON, illetve non-ON kompartmentek területét reprezentálja. Az 'ON' zónában a szaglóhám szenzoros sejtjei a lakítanak ki axo-dendritikus szinapszisokat a célsejtjeikkel, míg a 'non-ON' zónában az interneuronok között jönnek létre dendro-dendritikus szinaptikus kapcsolatok. A glomerulusok területén a WFA, az aggregátumok, a brevikán és a HAPLN1 reakció esetében számos AC fedezhető fel.

A periglomerularis térség festődési mintázata szintén eltérő volt az egyes reakciók esetében. Az ECM molekulák eltérő expressziós mintázata magyarázható a periglomerularis sejtek morfológiai, funkcionális és neurokémiai tulajdonságaival. A PNN jelenléte nem zárható ki a periglomerularis térségben, viszont a szorosan

egy más mellett elhelyezkedő sejtek megnehezítik az ECM molekulák pericelluláris aggregációjának a zonositását.

Az aggregátán, a brevikán és a HAPLN1 expresszió pontos lokalizációjának meghatározásához ezen molekulák jelölését MAP2, illetve neurofilament elleni antitestekkel kombináltuk. A MAP2 reakció igazolta a dendritek nagyszámú jelenlétét a glomerulusok területén, míg a neurofilament elleni antitesttel jelölődött axonok csakély számban voltak jelen. Az aggregátán, a brevikán és a HAPLN1 neurofilamenttel való kettős jelölését követően a glomerulusok területén AC-ok előfordulása volt megfigyelhető.

A **külső plexiform réteg** területén a verzikán kivételével, az összes általunk vizsgált molekula pozitív reakciót mutatott. A legerősebb reakcióintenzitást a HA, az aggregátán, a neurokán és a HAPLN1 esetében figyeltük meg, a brevikán és a WFA reakció mérsékelten erős jelet adott, míg a TN-R esetében gyenge jelölődést kaptunk. A mitralis és a pamacsos sejtek testének lokalizációja és azok szekunder dendritjeinek kiterjedése alapján, az EPL egy külső/felszínes és egy belső/mély rétegre osztható. Az említett dendritek eltérő szinaptikus kapcsolatokat hoznak létre az a rétegekben, ami maga után vonhatja az ECM molekulák egyenlőtlen eloszlását. A HA, az aggregátán, a brevikán és a neurokán reakciók intenzívebbnek bizonyultak a külső rétegben. Ezen a ponton fontos megemlítenünk, hogy a HA és a brevikán szerepe bizonyított a parvalbumin pozitív sejtek érési folyamatában és a neuronoknak a lokálisan már kialakult neuronhálózatba való integrálásában. A parvalbumin pozitív sejtek a BO teljes területén megtalálhatók, de legnagyobb számban az EPL felszínes részében vannak jelen.

A központi idegrendszer más területein végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a WFA reakció mintázata és intenzitása nagymértékű hasonlóságot mutat az aggregátán expressziós mintázatával. Azonban a BO területén az előzetes eredményekkel ellentétes képet kaptunk a két reakció esetében: míg az aggregátán az EPL külső rétegében mutatott erősebb expressziót, addig a WFA

reakció a mélyebb rétegben adott intenzívebb jelet. Ezen jelenség magyarázata további vizsgálatok elvégzését igényli.

Közvetlenül a GL alatt, az EPL felszínes rétegében, ahol a szekunder dendritekkel rendelkező külső pamacsos sejtek szómái találhatóak, erősen festődő brevikán pozitív sávot figyeltünk meg, míg a mélyebb rétegek csak gyenge festődést mutattak. Az EPL-ben a brevikán jelölés jellegzetes, pontszerű, a BO felszínére merőleges elrendeződést mutatott. A brevikán-neurofilament kettős jelölés eredményeként jól látható volt, hogy a brevikán pozitív pontszerű struktúrák az axonok mentén figyelhetők meg, mely jelenség a Ranvier-féle befűződések körüli nodalis ECM jelenlétére utal.

Az EPL területén a neurokán igen erős festődést mutatott. Ezen molekuláról általanosságban elmondható, hogy esszenciális komponense a juvenilis ECM-nek és szintje a szinaptikus átrendeződésre való képesség beszűkülésével párhuzamosan drámaian csökken a korai postnatalis időszakban. A neurokán magas fokú expressziója a BO területén a szaglórendszer nagyfokú plasztikusságára utalhat.

A BO rétegei közül a **belső plexiform réteg** az egyetlen, amelyben az elvégzett ECM reakciók mindegyike pozitívnak bizonyult.

Erős reakcióintenzitás volt megfigyelhető a WFA és az aggrekán esetében, mely jellegzetes festődési mintázattal párosult: a reakció elvégzését követően a BO felszínére merőleges lefutású, erősen festődő sávok jelentek meg ebben a rétegben. Anti-neurofilamenttel történő kettős jelölést követően megállapítottuk, hogy a WFA és aggrekán pozitív sávok axonok köré lokalizálódnak, melyek feltételezhetően a mitralis sejtek axonjainak felelnek meg, de a jellegzetes mintázat pontos okának feltárásához további vizsgálatok elvégzése szükséges. Valószínűsíthetően a jelenség összefüggésben lehet az IPL lokálisan kialakult bonyolult neuronhálózatának nagyfokú plaszticitásával.

A vizsgált molekulák közül ki kell emelnünk a TN-R-t, melynek expressziója az IPL területén volt a legerősebb, mérsékelt intenzitást tapasztaltunk a GCL-ben, míg

a felszínes rétegek vagy gyenge immunreaktivitást mutattak, vagy negatívnak bizonyultak ezen molekulára nézve. Ez az expressziós mintázat visszavezethető a molekula neurogenesisben betöltött szerepére, miszerint a TN-R indukálja az újonnan képződött neuroblastok radiális migrációját a BO területére. A TN-R erős expressziója a BO mélyebb rétegeiben korrelál a radiális migráció útvonalával és azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint a zújonnan képződött neuronok nagy része granularis és periglomerularis sejtekké differenciálódik.

A **granularis sejtek rétegében** a legerősebb reakció a brevikán esetében volt látható, mérsékelten erős jelet figyeltünk meg a HA, a neurokán és a TN-R esetében, míg a WFA reakció gyenge jelet mutatott. Aggregánra és HAPLN1-re nézve a réteg negatívnak bizonyult. Az erős brevikán expresszió és az aggregán reakció negativitása arra enged következtetni, hogy a periszinaptikus ECM fő komponense a brevikán, mely jelenséget korábban megfigyelték a cochlea belső szőrsejtjei körül kialakuló kehelyszerű szinapszisok esetében. A verzikán reakció eredményeként jellegzetes pontszerű, jelölődést kaptunk. A verzikán pozitív pontok mennyiségétől függően, egymással alternáló, világosabb és sötétebb oszlopokat figyelhattunk meg a BO ezen rétegében. A neurofilament jelölés a verzikán reakcióhoz hasonló oszlopszerű mintázatot mutatott, a verzikán-neurofilament kettős jelölést követően pedig megfigyeltük, hogy a verzikán pozitív pontszerű struktúrák a neurofilament elleni antitesttel jelölődött axonok mentén helyezkednek el. A GCL mélyebb régiójában a neurofilament reakció intenzitása gyengének bizonyult, valamint a verzikán pozitív pontszerű képletek sűrűsége jelentősen csökkent. Eredményeink tehát alátámasztják azon irodalmi adatokat, melyek szerint a verzikán a nodalis ECM egyik fő komponensét képezi.

5. Összefoglalás

Jelen munkánk során leírtuk az ECM legfőbb molekuláinak (HA, lektinok, TN-R és HAPLN1) előfordulását és szerveződését az OI, a PHN és a BO területén, patkányban. Hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók segítségével a fent említett molekulák mindegyike kimutatható volt mindhárom vizsgált területen, viszont a molekulák megjelenése, szerveződése és a festődés intenzitása eltéréseket mutatott az egyes rétegek/almagok között, illetve bizonyos esetekben az egyes rétegeken/almagokon belül is.

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy az OI és a PHN között jelentős különbségek figyelhetők meg az ECM szerveződését illetően. Az OI esetében a legszembetűnőbb jelenség a PNN hiánya, amely magyarázható azzal, hogy az OI neuronjainak sejttestén és a dendritek proximalis részén ritkán fordulnak elő szinapszisok. A PHN a magno- és parvocellularis része között is jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Erős PNN volt megfigyelhető a magnocellularis almag neuronjainak többsége körül, míg a parvocellularis részben a pericellularis jelölődést nem tudtuk bizonyítani, az ECM kizárólag diffúz módon a neuropil területén jelent meg. Valószínűsítjük, hogy az OI és a PHN között, valamint a PHN két almagja között megfigyelt különbségek összefüggésben vannak az említett területek afferens és efferens kapcsolatait, cytoarchitektúráját és fiziológiai tulajdonságait érintő különbségekkel, valamint azzal a ténnyel, hogy eltérő szerepet töltenek be a tekintet és a testhelyzet koordinálásában. Az ECM molekulák eloszlásának ismerete a nucleii precerebellares területén normál körülmények között elengedhetetlenül szükséges ahhoz, hogy feltárjuk a vestibularis léziót követő kompenzáció során esetlegesen végbemenő változásokat a vestibularis magkomplex-szel kapcsolatban álló területeken.

A BO esetében azt tapasztaltuk, hogy a különböző ECM molekulák kimutatására elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciók elsősorban a neuropil területén mutattak pozitívítást. A PNN kizárólag vékony formában jelent meg és csak a mitralis sejtek körül volt megfigyelhető a WFA és az aggregán reakciót követően. Ezen eredmények összhangban vannak a szaglórendszer neuronhálózatának élethosszig tartó átrendeződésével, mely a meglévő szinaptikus kapcsolatok felbomlásán és újraprendeződésén, valamint az interneuronok folyamatos képződésén és a BO-ba való bevándorlásán keresztül valósul meg. A PNN kifejlett korban gátolja a neuronális plaszticitást, mivel a pericellularis molekulaszövet akadályozza új szinaptikus kapcsolatok kialakulását és korlátozza a szinapszisokban található receptorok motilitását. Tehát a PNN ritka megjelenése összefüggésben lehet a BO területén megfigyelhető kiemelkedő neuronális plaszticitással.

Eredményeink hozzájárulhatnak ahhoz, hogy megértsük az ECM neuronális plaszticitásban és regenerációban betöltött szerepét.



Nyilvántartási szám: DEENK/226/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hunyadi Andrea
Neptun kód: B709AW
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047549

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hunyadi, A.**, Gaál, B. Á., Matesz, K., Mészár, Z. M., Morawski, M., Reimann, K., Lendvai, D., Alpár, A., Wéber, I., Rácz, É.: Distribution and classification of the extracellular matrix in the olfactory bulb.
Brain Struct. Funct. 225 (1), 321-344, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-019-02010-8>
IF: 3.298
2. Kecskés, S., Gaál, B. Á., Rácz, É., Birinyi, A., **Hunyadi, A.**, Matesz, K.: Extracellular matrix molecules exhibit unique expression pattern in the climbing fiber-generating precerebellar nucleus, the inferior olive.
Neuroscience. 284, 412-421, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.080>
IF: 3.231
3. Gaál, B. Á., Kecskés, S., Matesz, K., Birinyi, A., **Hunyadi, A.**, Rácz, É.: Molecular composition and expression pattern of the extracellular matrix in a mossy fiber-generating precerebellar nucleus of rat, the prepositus hypoglossi.
Neurosci. Lett. 594, 122-126, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.056>
IF: 2.107

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,636

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,636

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymethai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.07.14.

