

HUMÁN FOGCSÍRÁK EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX KOMPONENSEINEK VIZSGÁLATA

FELSZEGHY SZABOLCS

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

DEBRECENI EGYETEM ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ANATÓMIA, SZÖVET- ÉS FEJLŐDÉSTANI INTÉZET

Programvezetők: Dr. Fésüs László
akadémikus, egyetemi tanár
Dr. Módis László
egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Módis László
egyetemi tanár

Debrecen, 2000.

TARTALOMJEGYZÉK

1, <i>BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS</i>	4-18
1.1 A FOGCSÍRA KIALAKULÁSA ÉS A ZOMÁNC KÉPZŐDÉS MEGINDULÁSA	
1.1.1 A fog kialakulása és fejlődése	4-6
1.1.2 A zománc kialakulásának főbb mozzanatai	6-7
1.2 HIALURONSAV	
1.2.1 Szerkezete, szintézise, metabolizmusa	8-11
1.2.2 Hialuronsav receptorok	11-13
1.2.3 Hialuronsav a különböző fejlődésbiológiai folyamatokban	13-14
1.3. X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN	
1.3.1 Szerkezete	15-17
1.3.2 X-es kollagén szerepe a mineralizációs folyamatokban	17-18
2, <i>CÉLKITŰZÉSEK</i>	19
3, <i>ANYAG ÉS MÓDSZER</i>	20-29
3.1 ANYAGGYŰJTÉS, FIXÁLÁS, DEKALCINÁLÁS, DEHIDRÁLÁS	20
3.2 MINTAFELDOLGOZÁS: BEÁGYAZÁS, VALAMINT METSZETKÉSZÍTÉS	20
3.3 A HIALURONSAV-MOLEKULA, VALAMINT RECEPTORÁNAK, A CD44-NEK DETEKTÁLÁSA HUMÁN FOGTELEP KÜLÖNBÖZŐ STRUKTÚRÁIBAN	
3.3.1 Hialuronsav kimutatása	21-23
3.3.2 Terület Integrált Optikai Denzitás meghatározás számítógépes képanalízissel	23-24
3.3.3 Statisztikai Módszer	24
3.3.4 CD44 kimutatása	24-25

3.4 X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN KIMUTATÁSA HUMÁN FOGCSÍRÁKBAN	
3.4.1 X-es kollagén immunhisztokémia	25-26
3.4.2 A X-es típusú kollagén kimutatása Western immunoblotting technikával	27-28
3.4.3 A X-es típusú kollagén kimutatása ELISA technikával	29
4, EREDMÉNYEK	30-42
4.1 A FOGTELEP HA MINTÁZATÁNAK VIZSGÁLATA	30-34
4.2 A HA RECEPTOR, A CD44 EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	34-37
4.3 A X-ES KOLLAGÉN VIZSGÁLATA	38-42
5, MEGBESZÉLÉS	43-46
5.1 A HIALURONSAV ÉS RECEPTORÁNAK A CD44-NEK FELTÉTELEZETT SZEREPE A FOGCSÍRA FEJLŐDÉSÉBEN	43-45
5.2 A X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN SZEREPE A ZOMÁNCMÁTRIX KIALAKULÁSÁNAK KEZDETI FOLYAMATAIBAN	46-47
6, ÖSSZEFOGLALÁS	48
7, IRODALMI HIVATKOZÁSOK	49-58
8, A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	59-60
8.1 IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK	
8.2 KÖZLÉSRE BENYÚJTOTT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNY	
8.3 EGYÉB IN EXTENSO TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNY	
9, KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	61
10, FÜGGELÉK	62

1.1 A FOGCSÍRA KIALAKULÁSA, FEJLŐDÉSE ÉS A ZOMÁNCKÉPZŐDÉS MEGINDULÁSA

1.1.1 A FOGCSÍRA KIALAKULÁSA ÉS FEJLŐDÉSE

A fogat alkotó szövetek az orális ektodermából, valamint a crista neurális eredetű mezenchimális sejtekből fejlődnek. A fog morfogenezise az orális epitélium bazális sejtjeinek az ektoderma alatti mezenchimába történő proliferációjával kezdődik, kialakítva ezzel a foglécet. A foglécen, a későbbi fogcsíráknak megfelelő helyen, a kezdetben gömb alakú sejtszaporulatból, a széli részek fokozott proliferációs aktivitásának, valamint az ektomezenchimának a fogcsíra középső területeire való benyomulásának eredményeképpen kialakul a zománcszerv (Sadler, 1985). A harang alakú zománcszerv homorulatában lévő ektomezenchimális eredetű szövet alkotja a későbbiekben a pulpa alapállományává differenciálódó fogpapillát, míg a harang körülötti mezenchimális szövet sejtjei a fogat rögzítő szalagrendszer és a cement alapállományának kialakításáért felelős fogzacskót képezik. A harang alakú zománcszerv homorulatában lévő, ektodermális eredetű belső zománchámsejtekből a további differenciációs folyamatok során alakulnak ki azon ameloblaszt sejtek, melyek felelősek a zománc alapállományának szintéziséért. A belső zománchámsejtektől egy alaphártya által az ún. lamina ameloblastica választja el azon ektomezenchimális sejtszaporulást, amelyek a későbbiekben odontoblasztokká fejlődve a dentin szintézisét végzik. A harang legkülső részén helyezkednek el a külső zománchámot alkotó sejtek. Ezen sejtsor és a belső zománchám között található sejtek a zománcpulpát

alkotják, melynek fontos szerepet tulajdonítanak a fejlődő fogcsíra helyigényének biztosításában.

A zománcszerv további fejlődése során a belső zománcchám preameloblasztokká, majd ameloblasztokká történő differenciálódása során a harangot alkotó zománcpulpa mennyiségi csökkenése figyelhető meg, ami a harang alakú fogcsíra széli részein a belső és külső zománcchámrétegek közelebb kerülését eredményezi, kialakítva ezzel a nyaki áthajlást, az ún. Hertwig-féle gyökérhüvelyt. A gyökérhüvely belső sejtjei azon indukciós folyamatokat indítják be, amelyek hatására a fogpapilla perifériáján elhelyezkedő sejtek odontoblasztokká differenciálódva megkezdik a gyökér dentinállományának szintézisét. A dentin alapállományának megjelenése fogzacskó belső sejtjeinek cementoblasztokká történő morfológiai változásait triggerelik.

A fogfejlődés során a sejtek differenciálódását számos sejt-sejt közötti interakció befolyásolja (Tucker és mtsai, 1999). Bimbó állapotában az ektomesenchimális sejtek indukciós hatásának eredményeképpen az ektoderma legbelső sejtrétege belső zománcchámsejteké differenciálódik. Az ektomezenchimának a fogbimbó belsejébe történő beékelődése során a belső zománcchám sejtjeinek indukciós hatására a fogpapilla legkülső, zománcchám felé eső sejtjei preodontoblasztokká alakulnak. Ezen sejtek indukciós hatására a belső zománcchám bazális sejtjei preameloblasztokká differenciálódnak. A harangstádium kezdetén, a preameloblasztok induktív hatására a fogpapilla preodontoblasztjának morfológiája megváltozik, odontoblasztokká differenciálódnak és megkezdik a dentin szintézisét. Az odontoblasztok nyúlványai körül megjelenő dentin szignálként szolgálhat ahhoz, hogy a belső

zománchám preameloblasztjai polaritásukat megváltoztatva szekretoros ameloblasztokká alakuljanak. Az orális ektoderma és ektomezenchima között eddig jelenlévő, minden bizonnyal indukciós hatások közvetítésében is szerepet játszó bazális membrán az ún. lamina ameloblastica feltöredezik.

1.1.2 A ZOMÁNC KIALAKULÁSÁNAK FŐBB MOZZANATAI

A zománc alapállományának létrejöttéhez szükség van azon sejtekre, melyek a zománcmátrix organikus anyagainak szintézisét biztosítják, a szekretoros ameloblasztokra. Míg a csöntsövetképződés során, ahol is egy nem mineralizálódott mátrixtemplát kialakulását követően indulnak csak el a mineralizációs folyamatok, addig a zománcmátrix alapállományban gyakorlatilag a szintézist követően azonnal elkezdődnek a mineralizációs folyamatok, így a sejtek által termelt speciális zománcfehérjéknek (amelogenin, enamelin, tuftelin, ameloblasztin/amelin) alapvető szerepe lehet a kristályszerkezet kialakulásának befolyásolásában.

A zománcfehérjék szintézisük során membránnal burkolt szekréciós granulumokba, majd a szekretoros ameloblasztok nyúlányaival történő fúziót követően exocitózissal az extracelluláris térbe kerülnek. Ezek a fehérjék kötik a zománc szervesetlen alapállományát alkotó hidroxipatit kristályokat, ezért fontos szerepet játszanak a zománc jellegzetes szerkezetének kialakításában a kristályok kialakulásának modulálása, növekedésüknek, térbeli orientációjuknak befolyásolása révén (Robinson és mtsai, 1988; Fincham és mtsai, 1999). A zománcmátrix kialakulása során a kristályok először egymástól szeparáltan, vég a vég találkozásban, szalagszerűen növekednek. A

szekretoros ameloblasztok nyúlványai, a parallel módon növekedő kristálykötegek közepén helyezkednek el. A nyúlványok disztális részén leváló mátrixvezikulumok felelősek a kristályköteg hosszanti növekedéséért, kialakítva a hosszanti rendeződést mutató zománcprizmákat „rod enamel”, míg a sejtnyúlványok laterális, oldalsó felszínéről leváló mátrixvezikulumok az interprizmatikus zománc „interrod enamel” kialakításában játszanak szerepet. Az interprizmatikus zománc szerepet játszhat a rendezett zománcprizmák szerkezetének kialakításában (Boyde, 1989). A zománcprizmák majdnem szabályos hengereket alkotnak, a körülvevő „interrod enamel” pedig kitölti a hengerek között kialakuló térséget, kialakítva ezzel az érett zománcmátrixra jellegzetes “kulcslyukszerű” átmetszetet (Daculsi és Kerebel, 1978; Boyde és Martin, 1982).

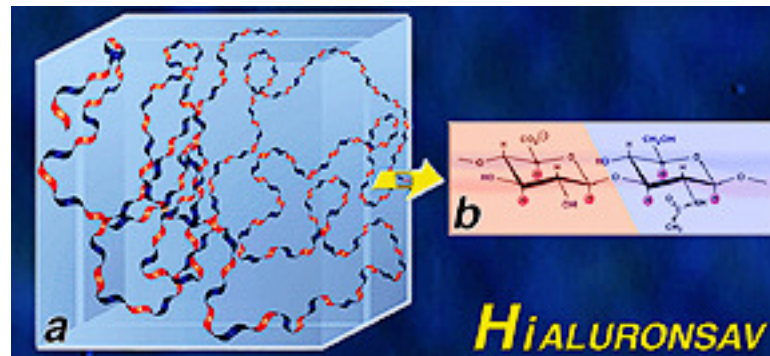
1.2 HIALURONSAV

1.2.1 SZERKEZETE, SZINTÉZISE, METABOLIZMUSA

A sejtek közötti teret, az ún. extracelluláris mátrixot különböző makromolekulákból (kollagének, glücoproteinek (GP), glükózaminoglikánok (GAG), proteoglikánok (PG)) felépülő vázrendszer alkotja. A hialuronsav (hyaluronan, HA) elsősorban differenciálódó szövetek sejtjeiben és extracelluláris mátrixában (ECM) előforduló, nagy molekulatömegű, nem szulfatált GAG (Fraser és mtsai, 1997).

Először 1934-ben, sikerült izolálni ezen rendkívül konzervatív szerkezetű molekulát szarvasmarha corpus vitreumából. A ma használatos név is erre utal: Hialuronsav=**Hyal**oid (Vitreous) + **uronsav** (Meyer és Palmer, 1934). A molekula pontos kémiai szerkezete mintegy 20 évvel később vált csak ismertté: a hialuronsav ismétlődő diszacharid egységekből felépülő óriás méretű poliszacharid, melynek molekulatömege megközelíti a 10 millió Daltont. A diszacharid egységeket D glükuronsav (GlcA) és N-acetilglükózamin (GlcNAc) cukrok alkotják, amelyek egymáshoz béta-1,4- és béta-1,3-glükozidos kötésekkel kapcsolódnak (Meyer és mtsai, 1954). A HA molekulák diméreket alkothatnak, melyekben a szálak egymással ellentétes lefutásúak, s ahol a szálakat harmadlagos kötések stabilizálják (Scott, 1992). Oldatban a dimérek hálózattá szerveződnek. Mivel a hálózatot alkotó HA molekulákat harmadlagos kötések stabilizálják, a kialakuló hialuronsav-hálózat rendkívül dinamikus, a kialakuló aggregátumok nagysága és denzitása

számos paramétertől függ, így a hialuronsav molekulásúlyától, az ionerősségtől, a hőmérséklettől stb. (1. ábra) (Scott, 1998).



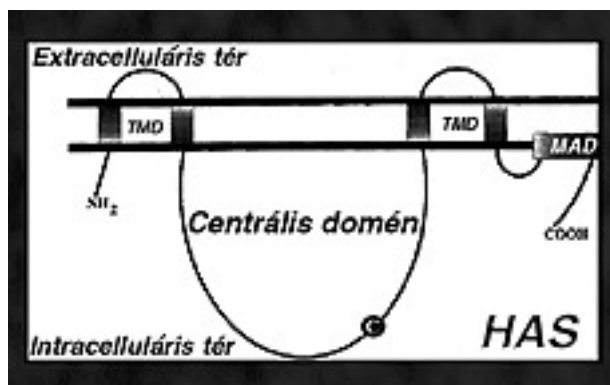
1. ábra

A hialuronsav szerkezete

Az alternáló sötét és világos egységek reprezentálják a molekulát felépítő monoszacharid alegységeket (a), melyek szerkezetét, valamint a köztük kialakuló kémiai kötések típusát az ábra jobb oldali részén tüntettük fel (b).

Ennek a harmadlagos szerkezetnek nemcsak a hialuronsav biomechanikai tulajdonságainak biztosításában van szerepe, hanem a hialuronsav különböző fejlődésbiológiai folyamatokban betöltött szerepét is befolyásolja: a HA szerepet játszik a fejlődő sejtek osztódásának (Toole és mtsai, 1984), vándorlásának (Nehls és mtsai, 2000) és differenciálódásának szabályozásában (Pohl és mtsai, 2000).

Ellentétben a legtöbb glükózaminoglikán molekulát szintetizáló enzimtől, a hialuronsav szintéziséért felelős enzim, a HAS (hyaluronan synthase), nem a Golgi apparátushoz, hanem a sejt felszíni membránjához kötött. A különböző HAS-okra általánosan jellemző, hogy 2-3 transzmembrán (TMD), egy membránasszociált (MAD) doménnel és egy centrális doménnel rendelkeznek. (Weigel és mtsai, 1997) (2. ábra).



2. ábra

Az HAS szerkezetének vázlatos rajza

Az ábrán látható, hogy a HAS N és C terminális vége, valamint az enzim centrális doménje is, mely feltehetően a különböző katalitikus aktivitással rendelkező alegységeket tartalmazza (DeAngelis és mtsai, 1993), intracellulárisan találhatók.

Ezen enzimnek azonban nemcsak lokalizációja és szerkezete egyedi, hanem az is, ahogyan a több tízezer bázispárból felépülő hialuronsavat szintetizálja. Ehhez legalább öt-hat különböző aktivitással rendelkező alegységre van szükség, melyek közül kettő az aktivált monoszacharidok (UDP-GlcNAc és UDP-GlcA) kötéseért felelős, kettő az aktivált cukrok közötti béta-glikozidos keresztkötések létrehozásáért, egy vagy több katalitikus alegység pedig a folyamatosan hosszabbodó polimer membránon keresztül történő átjuttatásáért felelős (Weigel és mtsai, 1997).

A hialuronsav felvétele különböző típusú receptorok receptor mediált endocitózisa révén valósul meg (3. ábra) (Culty és mtsai, 1992; Aguiar és mtsai, 1999; McCourt, 1999; Zhou B és mtsai, 2000).



*A hialuronsav receptor
mediált endocitózisát és
lebontását sematikusán
bemutató rajz*

3. ábra

A hialuronsav (HA) felvétele membránasszociált receptorokkal (HAR) valósul meg. Az internalizálódott molekulát a lizoszómális (L) lokalizációjú hialuronidáz és exoglikozidáz enzimek hasítják (Greiling és mtsai, 1975; Frost és mtsai, 1996). Az előbbi a hialuronsavat tetra- és hexaszacharidokra hasítja, míg az utóbbi a feltöredezett szakaszok nem-redukáló végeiről hasítja le a monoszacharid egységeket.

1.2.2 A HIALURONSAV RECEPTORAI

Azon molekulákat, amelyek képesek a hialuronsav megkötésére, összefoglaló néven hialadherineknak nevezzük (Aruffo és mtsai, 1990; Hall és mtsai, 1994; Knudson és mtsai, 1996). Ezeket a receptorokat három csoportra oszthatjuk: *intracellularis proteinek*: RHAMM, cdc37; *membrán lokalizált receptorok*: CD44 receptorcsalád, LEC IVd4, RHAMM; *extracelluláris fehérjék, melyek hialuronsav kötő tulajdonsággal rendelkeznek*: aggregán, brevikán, neurokán, verzikán (1. táblázat).

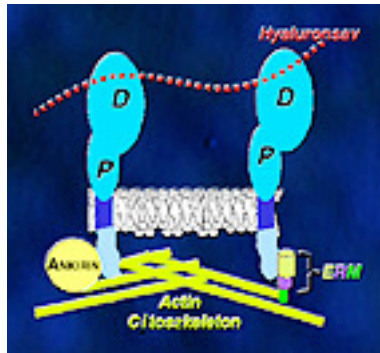
Celluláris fehérjék	
Intracelluláris fehérjék	Membrán lokalizált receptorok
cd37 (Grammatikakis és mtsai, 1992) RHAMH (Yang és mtsai, 1993)	CD44 (Underhill és mtsai, 1987) LEC N4E (Yamamoto és mtsai, 1992) RHAMH (Yang és mtsai, 1993)
Extracelluláris mátrix fehérjék	
Aggrecán (Hardingham és Blau, 1972) Brevikán (Yamada és mtsai, 1994) Neurokán (Reuch és mtsai, 1992) Verslikán (Zimmermann és Roushaki, 1992)	

1. táblázat

A hialuronsav receptorai

A legtöbbet tanulmányozott és a legtöbb hialuronsav mediált effektus továbbításáért felelős receptor a CD44. Korábban e 85 kD súlyú receptort számos egyéb névvel illették, úgymint Pgp-1 (phagocytic glycoprotein-1), ECMR III (extracellular matrix receptor type III), Hermes antigen, H-CAM (Entwistle és mtsai, 1996). A ma általánosan elfogadott nevét Underhill és munkatársainak azon megfigyeléséből származik, hogy a hialuronsav megkötéséért felelős transzmembrán fehérje ellenes antitest (K3), ugyancsak reagál a lymphocyták homingjáért felelős, korábbról már jól ismert receptorral, a CD44-el (Underhill és mtsai, 1987).

A CD44-et a 11-es kromoszóma rövid karján található gén kódolja. A sejtek felszínén mégis számos CD44 izoformát írtak le, ami az alternatív splicing eredménye, azonban minden különböző variánsra érvényes, hogy ez a glikoprotein molekula egy extracelluláris, egy transzmembrán valamint, egy intracelluláris doménnal rendelkezik (4. ábra) (Underhill, 1992).



4. ábra

A CD44 szerkezetét bemutató vázlatos rajz

A CD44 extracelluláris doménjének a disztális (D) része az aggregán molekula link proteinjének szerkezetéhez hasonló és a hialuronsav molekula kötéséért felelős. Az extracelluláris rész sejtmembránhoz közelebbi, proximális (P) szakasza eltérő lehet a különböző izoformáknál. A sejt belsejébe történő HA-effektus továbbításért a transzmembrán domén mellett a CD44 intracelluláris doménje felelős, mely a citoplazma különböző molekuláival, az ankirinnel (Lokeshwar és mtsai, 1994) és ERM (ezrin/radixin/moesin) család tagjaival kapcsolódhat (Yonemura és mtsai, 1998).

1.2.3 HIALURONSAV SZEREPE A FEJLŐDÉSBIOLOGIAI FOLYAMATOKBAN

Az 1970-es évek óta tudjuk, hogy a hialuronsavnak jelentős szerepe lehet a különböző típusú sejtek proliferációjának, migrációjának és differenciálódásának szabályozásában. Hogyan befolyásolhatja a sejtek osztódását és vándorlását ez a rendkívül egyszerű szerkezetű molekula? Ebben a HA viszkoelasztikus sajátosságából adódó térkitöltő hatásának tulajdonítanak alapvető szerepet. A kialakuló pericelluláris hialuronsav burok a sejtek

egymástól való szétválását elősegítve megteremti a mitózis egyik feltételét. Természetesen itt nemcsak a passzív térkitöltő hatásnak lehet szerepe, hanem a hialuronsav különböző sejtfelszíni receptorain keresztül (CD44, RHAMM), hathat az intracelluláris folyamatokra is (Entwistle és mtsai, 1996).

A hialuronsavban gazdag extracelluláris mátrixban azonban nemcsak a sejtek osztódása válik lehetővé, hanem a sejtek vándorlása is. Kísérletes megfigyelésekből tudjuk, hogy a vándorló sejtek más HAS enzimaktivitással rendelkeznek, mint a differenciálódó sejtek, így a sejtek körül kialakuló pericellularis mátrix hialuronsav összetétele eltérő, ami a szabályzás egyik fontos lépcsője lehet. A 2-es típusú HAS által szintetizált kisebb molekulású, rövidebb HA molekulák képtelenek egymással kapcsolódva hálózat létrehozására, de a kialakuló hidratált környezetben lehetővé válik a sejtek migrációja. Természetesen ez a laza „átjárható HA pericelluláris burok” lehetőséget teremt arra is, hogy a sejt működést szabályzó különböző makromolekulák könnyebben kapcsolatba kerüljenek a vándorló sejtekkel. Az 1-es típusú, HAS által szintetizált nagyobb molekulatömegű hialuronsav molekulák képesek egymással hálózatot kialakítva az addig vándorló sejtek között időleges kapcsolatokat létrehozni. Ezen kialakuló időleges kapcsolatoknak szerepet tulajdonítanak a differenciálódás kezdeti folyamataiban. Ebben a sejtek felszínén jelenlévő HA receptoroknak (CD44, RHAMM) is jelentős szerepe lehet, mert a HA kötést követően a sejdifferenciáció különböző szintjeire (ras/erk1, Src signal útvonala) hatva elindíthatják a sejtek megfelelő irányba való differenciálódását.

1.3 X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN

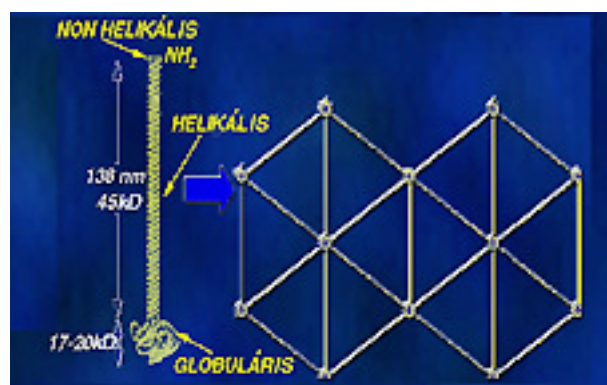
1.3.1 A X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN SZERKEZETE

Az extracelluláris mátrix (ECM) gélyszerű állományát struktúrfehérjék, adhéziós molekulák, valamint proteoglikánok és glukózaminoglikánok alkotják. Az első csoportba tartoznak a kollagének, a második csoportba azon makromolekulákat soroljuk, melyek egyrészt a különböző ECM komponensek között hozhatnak létre kapcsolatot (pl. fibronectin), másrészt a sejtmembrán specifikus integráns fehérjeihez kötődve továbbíthatják az ECM felől érkező szignálokat a sejt belsejébe, befolyásolva ezáltal azok működését. A harmadik csoportot alkotó molekuláknak mind a ECM struktúrájának kialakításában (pl. aggregán, hialuronsav), mind az ECM és sejtmembrán közötti kapcsolat fenntartásában (pl. szindekán) szerepet tulajdonítanak.

Eddig mintegy 19 különböző kollagéntípust írtak le. Ezen alapvetően molekulák három nagyobb csoportot alkotnak. Bizonyos kollagének fibrillumokat képeznek (pl. I., II., III., V.), a kollagéntípusok második csoportjába azon molekulák tartoznak, melyek az előző csoport valamelyik tagjához kapcsolódva találhatók meg (pl. IX.: II.-hez porcban, XII.: I.-hez inakban), míg az utolsó csoportot alkotó kollagének, nem képeznek fibrillumokat (pl. IV., VII.), és struktúrfehérjékként jól meghatározható az előfordulási helyük (pl. IV.: bazális membrán) (Linsenmayer, 1991). A harmadik csoporthoz tartozik a X-es típusú kollagén is, melynek jelenlétét az epifízis porckorong hipertrófiás zónájában, illetve az ízületi porc kalcifikációs zónájában írták le (Schmid és Linsenmayer, 1985). Azóta más

helyeken is sikerült kimutatni, így az diszkuszokban (Boos és mtsai, 1997; Lammi és mtsai, 1998) vagy az Achilles ínban, annak tapadásánál sarokcsonton (Niyibizi és mtsai, 1996; Fukuta és mtsai, 1998).

A X-es kollagén három különböző doménből épül fel: az N terminális végén kis molekulásúlyú nonhelikális, a C terminális végén egy 17-20 kD-os globuláris doménből, valamint a 45 kD-os középső helikális szakaszból. A molekula C terminálisán lévő nonhelikális szakasz rendkívül konzervatív, s ennek a doménnek tulajdonítanak szerepet a X-es kollagén szupramolekuláris szerkezetének kialakításában, nevezetesen abban, hogy ezen doménen keresztül a molekulák egymással aggregálódni képesek (1. ábra) (Kwan és mtsai, 1991).



1. ábra

A X-es típusú kollagén szerkezetének sematikus rajza

A X-es kollagén három különböző doménből épül fel: az N terminális végén kis molekulásúlyú nonhelikális szakasz található, ellentétben a molekula C terminális végének 17-20 kD-os globuláris doménjével, valamint a 45 kD-os középső helikális szakasz. A molekula C terminálisán keresztül homofil aggregációra képes.

A kialakuló aggregátum egyrészt a hipertrófiás porcsejteket veheti körül (Schmid és Linsenmayer, 1990), másrészt a kalcifikációs zóna interterritoriális

mátrixában kapcsolatba kerülhet egyéb struktúrproteinekkal (Chen és mtsai, 1990).

1.3.2 A X-ES KOLLAGÉN SZEREPE MINERALIZÁCIÓS FOLYAMATOKBAN

Mivel a X-es típusú kollagént a mineralizálódó porcszövet kalcifikációs zónájában mind immunohisztokémiai, mind biokémiai módszerekkel sikerült detektálni, felvetődött a kérdés, hogy milyen szerepet játszhat ezen molekula a porszövet kalcifikációs folyamataiban. A kérdés máig tisztázatlan, de egyre több meggyőző tanulmány szól a molekula mineralizációs folyamatokban betöltött pozitív (Schmid és mtsai, 1990; Gerstenfeld és mtsai, 1991; Kirsh és von der Mark, 1991; Coe és mtsai, 1992) szerepéről. Azonban meg kell említenünk, hogy születtek ezzel ellentétes, a X-es kollagén gátló (Poole és Pidoux, 1989; Arias és mtsai, 1991, 1997) szerepéről szóló tanulmányok is, sőt egyes munkacsoportok egyáltalán nem tulajdonítanak szerepet ezen molekulának (Boskey és mtsai, 1989) a mineralizációs folyamatokban.

Kirsh és von der Mark munkájából ismeretes, hogy a X-es típusú kollagén képes kalciumiont kötni, és ez a kölcsönhatás mediálhatja a molekula a mátrix vezikulumokkal történő kölcsönhatását az interterritoriális térségben, aminek szerepe lehet a mineralizáció beindításában (Bonucci, 1989). A matrix vezikulumokat meszesedő szövetekben, pericellulárisan mutatták ki. Ezeket extracelluláris lizoszomáknak, és a mineralizáció indikációs helyének tartják. Ezt a hipotézist támasztja alá az a kondrocita sejtenyészeteken végzett megfigyelés is, hogy az exogén Ca^{2+} koncentráció növekedése fokozza a X-es

típusú kollagén szintézisét (Bonen és Schmid, 1991). Ez a kalciumionokkal kölcsönhatásba lépő X-es kollagén aggregátum feltehetőleg templátként szolgálhat a mátrixvezikulumoknak, irányítva azok térbeli orientációját. Chen és munkatársainak kísérleteiből ismeretes, hogy a molekula C terminális doménje képes aggregátumra kötésére is, így ez az interterritoriális térségben kialakuló struktúra megfelelő környezetet teremthet a kalcifikációs folyamatok beindulásához (Chen és mtsai, 1992).

2. CÉLKITŰZÉSEK

A fejlődő fogtelep extracelluláris mátrixára vonatkozó ismereteink elsősorban állatokon, főleg rágcsálókön végzett kísérletes tanulmányokból származnak. Ezért döntöttünk úgy, hogy a fejlődés különböző stádiumaiból származó humán fogcsírákon tanulmányozzuk az ECM-komponensek közül a hialuronsav (I) illetve receptorának CD44 (II) időbeli és térbeli expresszáldását kvalitatív és kvantitatív hisztokémiai módszerekkel. Célul tűztük ki, továbbá azt is, hogy az irodalomban elsőként megvizsgáljuk a fog kemény szöveteiben a mineralizációban feltehetőleg szerepet játszó X. típusú kollagén előfordulását (III).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 ANYAGGYŰJTÉS, FIXÁLÁS, DEKALCINÁLÁS, DEHIDRÁLÁS

Vizsgálatainkat a DEOEC Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról kapott abortumokból, valamint a Patológia Intézetben gyűjtött foetusokból illetve elhalt újszülöttekből származó mintákon végeztük. A vizsgálati anyagokból az incizális régióból kivett fogcsírákat tartalmazó 1-1,5 cm-es mandibula részleteket Sainte-Maire fixálóba (Sainte-Marie, 1962, Turckett és Morris-Kay, 1988) helyeztük 24 órára. A 70 %-os etanolos öblítést követően mintáinkat EDTA (pH: 7,4) oldatban dekalcináltuk 18-21 napig. Ezek után deszt. vizes mosás következett, majd a mandibula részleteket 70 %-os etanolba helyeztük. Mintáinkat felszálló etanolsorban (30, 50, 70, 90, 96 %-os, absz. etanol), majd xilolban kezeltük és alacsony olvadáspontú (54°C) paraffinba ágyasztuk.

3.2 BEÁGYAZÁS, METSZETKÉSZÍTÉS

A paraffinos blokkokból speciális D profilú mikrotómkéssel (Leica Instruments, Nussloch, Germany) felszerelt szánkás mikrotóm (Reichert, Wien, Austria) használatával 7-8 μm vastagságú, a fogcsíra hossz tengelyével párhuzamos síkban metszeteket készítettünk. A metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezre helyeztük, majd megszáritottuk.

3.3 A HIALURONSAV MOLEKULA VALAMINT A RECEPTORÁNAK (CD44) DETEKTÁLÁSA A FOGTELEP KÜLÖNBÖZŐ STRUKTÚRÁIBAN

3.3.1 HIALURONSAV KIMUTATÁSA

A HA reagens (bHABC), a porcmátrixban előforduló nagyméretű PG - aggregán- molekula N terminálisán lévő G1 doménből izolált szakasz, mely specifikusan kötődik a hialuronsav dekaszacharidnyi részéhez (Ripellino és mtsai, 1985; Tammi és mtsai, 1988), hozzá biotint kötnek, ez a komplex lesz a reagens. A bHABC-t Dr. Tammi, R. és Dr. Tammi, M. (Department of Anatomy, University of Kuopio, Kuopio, Finland) bocsátották rendelkezésünkre. A reakció első lépése a szövetmintában jelenlévő HA detektálása a bHABC próbával. A továbbiakban a kötődött reagens biotinját detektáljuk, amire mi avidin-biotin peroxidáz komplexet (ABC) használtunk, a rendszerben lévő enzimet (peroxidáz) pedig szubsztrátjával (H_2O_2) valamint diaminobenzidin (DAB)-kromogén segítségével tettük láthatóvá. A reakció elvégzése után a HA-tartalmú struktúrák barna színben jelennek meg.

A metszetek deparaffinálását és hidratálását 3x10 perces 0,1 mol/l PBS-es (pH 7,4) mosás követte. A nem specifikus reagens-kötés gátlásához a metszeteinket a HA-reakció előtt 2 %-os BSA PBS-ben (pH 7,4) nedveskamrában 37 C°-on 30 percen keresztül inkubáltuk.

A HA reagenssel (munkahígítás: 5 µg/ml 1 % BSA PBS-ben) az inkubálás 1 éjszakán át 4 C°-on történt. Negatív kontrollként metszeteinkre a bHABC pufferét (PBS) használtuk.

A reakció leállítása végett metszeteinket 3x10 percig mostuk 0,1 mol/l PBS-ben (pH 7,4), majd az ABC komplex-szel (Vectastain ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) történő inkubálás követéset szobahőn 30 percig. Ezután 3x5 perces PBS-mosást hajtottunk végre, majd a DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) oldattal (5 ml 54 %-os vizes DAB törzsoldat, 45 ml deszt. víz, 50 ml 1 mol/l Tris-HCl puffer) végeztük az előhívást. A hívást mikroszkópos kontroll mellet végeztük 10 percig. A reakciót 2x3 perces deszt. vizes mosással állítottuk le, majd felszálló alkoholsorban dehidráltunk és xilolban derítettünk. Metszeteinket DePeX-el (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) és fedőlemezzel fedtük.

A bHABC reagens specicitását két különböző módon ellenőriztük. *I.* A HA reakciót megelőzően Streptomyces hialuronidáz (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA) enzimemésztést végeztünk, melyről ismert, hogy specifikusan csak a hialuronsavat depolimerizálja tetra és hexaszacharidokra (Yamada és mtsai, 1973). A deparaffinált, hidratált metszeteken 3x10 perces 0,02 mol/l Tris-HCl pufferes (pH 6) mosást hajtottunk végre. Ezt követően végeztük a Streptomices hialuroliticusból extrahált enzimmel az emésztést (enzimaktivitás: 100U/ml PBS-ben) nedveskamrában 60 C°-on 30 percig. Inkubálás után 3x5 perces mosás következett az enzim pufferében (0,02 mol/l Tris-HCl puffer (pH 6)), majd a HA próba pufferében (PBS) 3x5 percig öblítettünk. Ezután az előzőekben ismertetett módon elvégeztük a HA reakció további lépéseit.

II. További kontrollként hialuronsav oligoszacharidokkal történő előinkubálást is végeztünk reagensünk specifikus kötődésének tesztelésére (Tammi és mtsai, 1994). A metszeteinket deparaffinálást és hidratálást

követően az PBS-ben öblítettük 3x10 percig. Ezek után következett az oligoszacharidokkal (Tammi, R. és Tammi, M. (Department of Anatomy, University of Kuopio, Kuopio, Finland) ajándéka) az inkubálás nedveskamrában 37 C° 30 percig. A 3x5 perces PBS-es öblítést követően a fentebb ismertetett módon hajtottuk végre bHABC próbával az inkubálást majd a HA-reakció további lépéseit.

3.3.2 TERÜLET INTEGRÁLT OPTIKAI DENZITÁS MEGHATÁROZÁS SZÁMÍTÓGÉPES KÉPANALÍZISSEL

A kapott hisztokémiai reakciónk kvantitatív összehasonlítását közönséges fénymikroszkóphoz (Leitz Ortholux® II BK, PL Floutar 50x/0.85-N.A. objektív) illesztett CCD kamera (Kodak, Rochester, NY, USA), valamint egy Macintosh PC-n futó IP Lab nevű képanalizáló program (Signal Analytics, Vienna, VA, USA) segítségével végeztük.

Az optimális, monokromatikus hullámhossz előállítása végett 543 nm-es interferencia filtert használtunk (Schott, Wiesbaden, Germany). Méréseinket megelőzően, a képanalizáló rendszer által detektált intenzitás-grey level- értékeket az IPLab program, valamint neutrális filterek segítségével optikai denzitás értékekké alakítottuk és mintáink vizsgálatakor ezen optikai denzitás értékek segítségével jellemeztük az egyes struktúrák hialuronsav tartalmát. A rendelkezésre álló metszeteinkből minden egyes fejlődési stádiumnak megfelelően, random módon 2 darab metszetet választottuk ki. Minden egyes struktúrából 120 mérést végeztünk, méréseinket

átlagoltuk és a kapott értékeket terület integrált optikai denzitásként tüntettük fel. A mérések során a rendszer paramétereit nem változtattuk.

3.3.3 STATISZTIKAI MÓDSZER

A számítógépes képanalízis során kapott eredményeink elemzésére Mann-Whitney U statisztikai tesztet használtunk. A statisztikai próbát az SPSS szoftver (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) felhasználásával végeztük el.

3.3.4 CD44, A HA RECEPTORÁNAK KIMUTATÁSA

A HA egyik receptora a CD 44, transzmembrán proteoglikán, melynek extracelluláris doménje specifikusan kötődik a hialuronsav dekaszacharidnyi részéhez. A CD 44 összes izoformáját felismerő monoklonális antitestet (Hermes 3, H3) (Goldstein és mtsai, 1989)) Dr. Sirpa Jalkanen (University of Turku, Turku, Finland) bocsátott rendelkezésünkre. A H3-al inkubált metszeteket biotinált anti-egér antitesttel kezeltük, majd a 2. antitest biotinját detektáltuk ABC segítségével. A reakciót H_2O_2 valamint DAB-kromogén segítségével tettük láthatóvá. A reakció elvégzése után a CD44 tartalmú struktúrák barna színben jelennek meg.

A metszetek deparaffinálását és hidratálását 3x10 perces 0,1 mol/l PBS-es (pH 7,4) mosás követte. A nem specifikus reagens-kötés gátlásához a metszeteinket 2 %-os BSA PBS-ben (pH 7,4) nedveskamrában 37 C°-on 30 percen keresztül inkubáltuk.

A Hermes 3 antitesttel (munkahígítás: 1:100 1% BSA PBS-ben) az inkubálás 1 éjszakán át 4 C°-on történt. Negatív kontrollként metszeteinkre a nonimmun IgG₂-t (Sigma) (munkahígítás: 1:100 PBS) használtuk. Az első antitesttel történő inkubálást 3x10 perces PBS-es öblítéssel állítottuk le. A II. biotinált antitesttel (munkahígítás: 1/50 1 %-os BSA PBS-ben pH 7,4) szobahőn 60 perces inkubálást hajtottunk végre. Ezt követően ismét PBS-ben mostuk metszeteinket 3x5 percig.

A reakció leállítása végett metszeteinket 3x10 percig mostuk 0,1 mol/l PBS-ben (pH 7,4), majd az ABC komplex-szel (Vectastain ABC Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) történő inkubálás következett szobahőn 30 percig. Ezután 3x5 perces PBS-mosást hajtottunk végre, majd a H₂O₂-t DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) oldattal (5 ml 54 %-os vizes DAB törzsoldat, 45 ml deszt. víz, 50 ml 1 mol/l Tris-HCl puffer) végeztük az előhívást. A hívás, mely alufóliával bevont küvetában történt, mikroszkópos kontroll mellett 5 percig tartott. A reakciót 2x3 perces deszt. vizes mosással állítottuk le, majd felszálló alkoholsorban dehidráltunk és xilolban derítettünk. Metszeteinket DePeX-szel és fedőlemezzel fedtük.

3.4 X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN KIMUTATÁSA HUMÁN FOGCSÍRÁKBAN

3.4.1 X-ES KOLLAGÉN IMMUNHISZTOKÉMIA

Monoklonális ellenanyagot (von der Mark, K. -University of Erlangen-Nuremberg, Germany- ajándéka) használtunk a X-es típusú kollagén kimutatására (Eerola és mtsai, 1998). A kötődött antitestet, biotinált anti-egér

antitesttel, majd Streptavidin-alkalikus foszfátáz komplex-szel konjugáltuk. A reakció vizualizálására naftol AS-MX foszfátot és Fast Red-et alkalmaztunk (Aigner és mtsai, 1993). A reakció elvégzése után a X-es kollagént tartalmazó struktúrák vörös színben jelennek meg.

A metszetek deparaffinálását és hidratálását 3x10 perces 0,02mol/l Tris-HCl pufferes (pH 7,4) mosás követte. A következő lépésként tesztikuláris hialuronidáz (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) enzimemésztést (munkahígítás: 2mg/ml TBS, pH 5) végeztünk nedveskamrában 37 C°-on 1 óráig az X-es típusú kollagén epitópjainak feltárása érdekében. Ezt 3x5 perces TBS-es öblítés követte. A nem specifikus reagens-kötés gátlásához az immunreakció előtt a metszeteinket normál kecske szérummal (munkahígítás 1:20 0,02mol/l TBS-ben pH 7,4) nedveskamrában 37 C°-on 20 percig inkubáltuk, melyet 3x5 perces TBS-es mosás követett.

A X 53 antitesttel (munkahígítás: 100 µg/ml 1 % BSA 0,02mol/l TBS-ben) az inkubálás 1 éjszakán át 4 C°-on történt. Negatív kontrollként metszeteinkre a X 53 pufferét (0,02 mol/l TBS pH 7,4) használtuk.

A reakció leállítása végett metszeteinket 3x10 percig mostuk 0,02mol/l Tris-HCl pufferben (pH 7,4), majd a II. biotinált antitesttel (munkahígítás: 1/100 1 %-os BSA TBS-ben pH 7,4) történő inkubálás következtet szobahőn 20 percig. Ezután ismét TBS-ben mostuk metszeteinket 3x5 percig, majd a streptavidinnel konjugált alkalikus foszfátázt (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) tartalmazó oldattal (munkahígítás: 1/100 1 %-os BSA 0,02mol/l TBS-ben) kezeltük szövetmintáinkat. A 3x5 perces mosás elvégzése után a reakció előhívása következett, melyhez 0.2 mg/ml naftol AS-MX foszfátot, 1mg/ml Fast Red-et (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri,

USA) valamint 0,05 ml/ml N'N dimetilformamidot (Merck, Darmstadt, Germany) tartalmazó 50 mmol/l-es, 0.9 % NaCl-t tartalmazó Tris HCl puffert (pH 8,2) alkalmaztunk hívó oldatként szobahőn 30 percen keresztül. A reakciót 2x3 perces deszt. vizes mosással állítottuk le, ezt követően metszeteinket aquatex-szel (Merck, Darmstadt, Germany) és fedőlemezzel fedtük.

3.4.2 A X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN KIMUTATÁSA WESTERN IMMUNOBLOT TECHNIKÁVAL

Mintáink az előzőekben ismertetett helyekről (Anyag és Módszer 3.1) származtak. Az eltávolított mandibula darabokból a még át nem tört fogcsírákat sztereomikroszkóp (Carl Zeiss, Jena, Germany) segítségével szeparáltuk, majd gondos preparálással szétválasztottuk a fogat alkotó szöveteket. Pozitív kontrollként eltávolítottuk a humán mintáink tibijának epifízis porcát, ugyanis az epifízis porcban megtalálható hipertrófiás porcsejtekről és az őket körülvevő ECM-ről ismert, hogy X-es típusú kollagént tartalmaznak (Lisenmayer és mtsai, 1988).

A fog kemény szöveteit (dentin, zománc) 3mg/ml TRIS-t valamint 14,4 mg/ml glicint (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) tartalmazó 1% SDS (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) pufferbe tettük és dörzsmozsárban állandó hűtés mellett homogenizáltuk 30 percen keresztül. Az így kapott dentin- és zománc-masszát 10 percig 4000 Rpm-en centrifugáltuk, majd a felülúszót szeparáltuk (Wright és mtsai, 1996).

Az eltávolított és apróra vágott epifizisporc-darabkákat 4 mol/l-es guanidin HCl-vel (Reanal, Budapest, Hungary) homogenizáltuk 48 órán keresztül. Ezt követően a pellet-et háromszor mostuk 0,5 M-os ecetsav-ban, melyek között 20 perces centrifugálásokat végeztünk 6000 rpm-en. Az így kapott felülúszót 4 C°-on 24 óráig pepszinnel (munkahígítás: 0,5 g/100 g porc 0,5 M-os ecetsavban (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)) emésztettük. Az emésztést követő 20 perces 9000 Rpm-es centrifugálás után a felülúszót 0,1 M-os ecetsavban dializáltuk, majd lefagyasztottuk s liofileztük. A fogtelepből és a hipertrófiás porcból származó mintáinkat 8 %-os SDS-poliakrilamid minigélekre vittük fel. A gélek zsebeibe egyenként 20-20 µl mintát, valamint molekulasúly-standardokat (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) vittünk fel. A géleket ezután 60 mA-en elektroforézisnek vetettük alá. Eltávolításukat követően Coomassie késsel (Brilliant Blue R 250 Coomassie®, BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) inkubáltunk 1 órán keresztül.

A másik SDS-minigélen az előzőekben az elektroforézissel szétválasztott fehérjék blottolását végeztük el. A blottolást 3mg/ml TRIS-t valamint 14,4 mg/ml glicint tartalmazó 1% SDS pufferben (pH 8,3) 80 V-on jégakkus hűtés mellett 1 óráig végeztük. Ezt követte a membrán blokkolása 2 %-os BSA/SDS pufferben szobahőn 1 óráig, melyet a blot 3x10 perces öblítése követett TWB oldattal (2.42 g TRIS, 8 g NaCl, 3,8 ml 1M HCl 1 l bideszt. vízre, pH 7,4). A következő lépésben a X53 ellenanyag felvitelére került sor, mellyel 1 éjszakán keresztül inkubáltunk. A reakciót 3x10 perces TWB-és öblítéssel állítottuk le, miután a gélhez kötődött X53 detektáltuk a II. biotinált anti-egér ellenanyaggal, melyet 1 óra hosszat hagytunk a minigélen.

Az ezt követő 3x10 perces TWB-és mosás után a reakciót DAB-os hívóoldattal (0,25 mg/ml DAB, 0,1 µl/ml H₂O₂ TRIS pufferben) vizualizáltuk. A 30 perces hívást 3x10 perces TWB öblítéssel állítottuk le, mely után a gél meg szárítottuk.

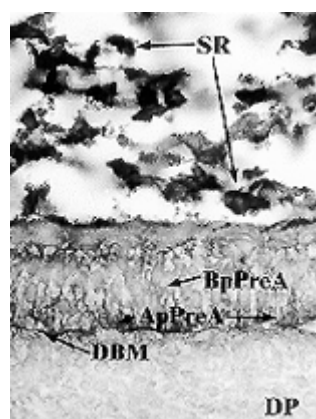
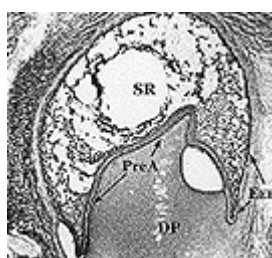
3.4.3 A X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN KIMUTATÁSA ELISA TECHNIKÁVAL

A X-es típusú kollagén ELISA-val történő kimutatásához Nunc- Immuno Plate-et (MaxiSorp, Nunc Itermed LTD., Copenhagen, Denmark) használtunk. A Plate-re a szövetmintákat (elkészítésüket l.: 3.4.2-ben) coating pufferrel (1,59 g Na₂CO₃, NaHCO₃, 0,2 g NaN₃ 1l deszt. vízre pH 9,6) -5µg/lyuk koncentrációban vittünk fel. A coatingolás után 1 %-os zselatin (Reanal, Budapest, Hungary) 0,1 mol/l PBS (pH 7,4) blokkolást végeztünk 37 C°-on 2 órán keresztül, melyet 2x5 perces deszt. vizes öblítés követett. Ezek után a X 53-as antitesttel (munkahígítás 1:1000 PBS-ben) 1 éjszakán át inkubáltunk 4 C°-on. A reakciót 4x5 perces PBS-es mosással állítottuk le, melyet a peroxidázzal konjugált második anti-egér ellenanyaggal történő inkubálás követett 37 C°-on 2 órán át. A vizualizálásra 60 ml citromsavas pufferben oldott 20 mg orto-fenilén-diamint (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) és 10µl cc. H₂O₂-ot használtunk, mellyel a színreakció megjelenéséig inkubáltunk szobahőn. A hívást 4 N kénsavval állítottuk le (Búzás és mtsai, 1993). A kapott színreakciókat λ=492 hullámhosszon fotometráltuk. A Fotométert (Titertek Uniskan® Labsystem, Helsinki, Finland) az 1 %-os zselatin PBS-t tartalmazó lyuk abszorpciós értékéhez kalibráltuk. A negatív kontrolloknál a X53 monoklonális antitesttel történő inkubációs lépést hagytuk ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A FOGTELEP HA MINTÁZATÁNAK VIZSGÁLATA

A fogfejlődés különböző stádiumában lévő fogcsírákat önkényesen két vizsgálati csoportba osztottuk. Az I. csoportba a fejlődés korai harang stádiumában lévő fogcsírák kerültek. Ezen fogtelepek fogpapillájában moderált bHABC jelölődést detektáltunk. A preszekretoros ameloblasztok vizsgálatakor a sejtek apikális és bazális része között optikai denzitáskülönbség mutatkozott. Míg a preszekretoros ameloblasztoknak a fogpapilla felé néző apikális része intenzív jelölődést mutatott, addig a sejtek bazális részében a HA reakciót gyengébbnek tapasztaltuk. A preszekretoros ameloblasztokat a fogpapilla legkülső sejt sorától elválasztó membrana bazális (ún. lamina ameloblastica), intenzíven jelölődött a hialuronsav reagenssel. A külső zománchámsejtek által határolt zománcpulpa csillag alakú sejtjei szintén intenzív HA reakciót mutattak. (1. ábra).

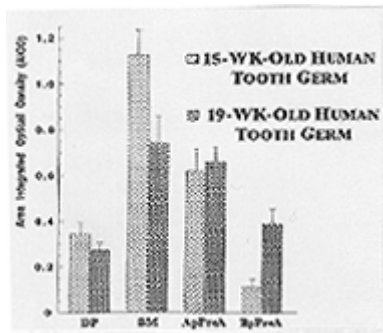


1. ábra

Hialuronsav reakció 19 hetes
humán fogcsírában

Látható, a fogpapilla (DP) és a preszekretoros ameloblasztok bazális részének (BpPreA) moderált intenzitása. A preszekretoros ameloblasztok apikális része (ApPreA), a lamina ameloblastica (DBM) a külső zománchám (EEE), valamint a stratum reticulare (SR) sejtei kifejezett HA reakciót mutatnak.

A fentebb említett struktúráknak a számítógépes képanalízis során kapott optikai denzitás értékeit a következő ábrán illusztráltuk (2. ábra.).



2. ábra

A harang stádiumú fogcsírák

Terület Integrált Optikai

Denzitása

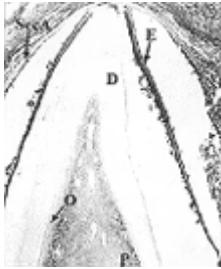
(Area Integrated Optical Density)

Az ektomezenchimális eredetű fogpapilla, melyből a későbbiekben a fog pulpája differenciálódik, az életkor függ-

vényében fokozatosan csökkenő intenzitást mutat. A preszekretoros ameloblasztok apikális részének OD növekedése pedig feltehetően a szekretoros ameloblasztokká való differenciálódás egyik velejárója, a sejtek fokozott hialuronsav termelésére utalhat.

A II. vizsgálati csoportba azon fogtelepek kerültek, amelyeknél már megfigyelhető a fog kemény szöveteinek szintézise. A HA reakció elvégzését követően a 21, illetve 31 hetes humán fogcsíráknál a pulpa és az odontoblasztok rétegének mérsékelt intenzitását tapasztaltuk. A dentin alapállományában csak a dentincsatornácskák falaiban láttunk mérsékelt pozitivitást, egyéb területeken jelölődést nem tapasztaltunk. A zománcképzés megindulásakor eddig az irodalomban nem közölt érdekes jelenségeket

tapasztaltunk, nevezetesen a zománc alapállományának intenzív jelölődését, amihez a zománc szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok apikális részének pozitivitása is társult, míg ezen sejtek bazális részében kifejezetten gyengébb reakció mutatkozott (3.a., b. ábra).



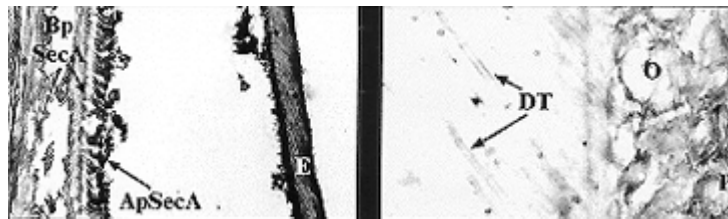
3.a ábra.

Hialuronsav reakció 31 hetes humán

fogtelep különböző szöveteiben

A felvételeken a pulpa (P), az odontoblasztok moderált HA reakciója jól látható. Megfigyelhető a zománc (E) mátrix intenzív jelölődése, valamint a zománc (E)

alapállományának szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok (SecA) inhomogén pozitivitása.



3.b. ábra

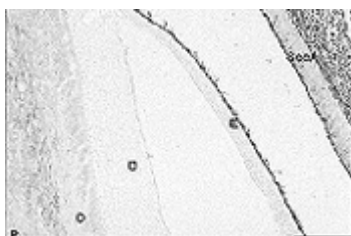
Hialuronsav reakció 31 hetes humán fogtelep különböző szöveteiben

A két nagyobb nagyítású felvételen jól látható a zománcmátrix(E) jelölődése a szekretoros ameloblasztok inhomogén pozitivitása(ApSecA, BpSecA), valamint –jobboldalon- az odontoblasztok (O) és a dentin csatornák falainak (DT) mérsékelt jelölődése (3.b.). A baloldali ábrán a zománc és a szekretoros ameloblasztok között zsugorodási műtermék (üres tér) látható.

A 9 hetes posztntális mintából származó fogcsíra tanulmányozásakor azonban újabb jelenségre lettünk figyelmesek. Alapvető különbség a fiatalabb

korú, a zománcképzés kezdeti stádiumában lévő fogcsírákhoz képest, hogy itt megszűnt a zománc mátrixának intenzív pozitivitása, csak a szekretoros ameloblasztok és a zománc felszín között tapasztaltunk némi jelölődést, valamint ehhez társultan a szekretoros ameloblasztok HA tartalom is jelentősen csökkent. Kifejezetten gyengébb HA reakció volt megfigyelhető a fog pulpájában és az odontoblasztokban is (4. ábra).

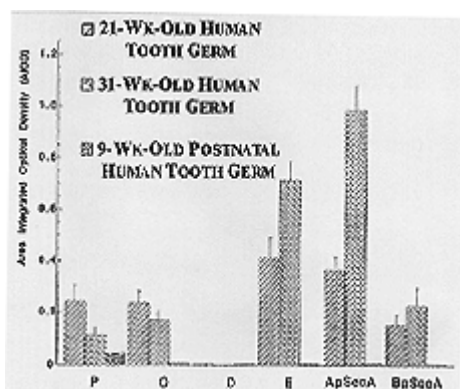
A 9 hetes posztnatális fogcsíra
HA reakciót követően



4. ábra

A HA reakció után az odontoblasztok (O) moderáltan jelölődnek. Jól látható, hogy a dentin (D), illetve a zománc (E) mátrix negatív, a szekretoros ameloblasztok (SecA) csökkent jelölődése.

A II. csoportba tartozó fogcsírák különböző struktúráinak optikai denzitás értékeit az 5. ábrán tüntettük fel.



5. ábra

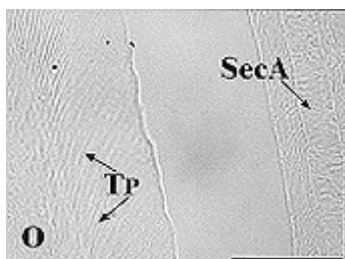
A II. Csoportba tartozó
fogcsírák struktúráinak
Terület Integrált Optikai
Denzitása (Area Integrated
Optical Density)

A zománc OD értéke szignifikánsan emelkedik a kezdeti szekrécións stádiumban, majd drasztikusan csökken a korai posztnatális korban.

A reagensünk specifikus kötődésének ellenőrzésére a negatív kontroll mellett *Streptomyces* hialuronidáz enzimemésztést -melyről ismert, hogy specifikusan csak a hialuronsavat depolimerizálja-, valamint hialuronsav oligoszacharidokkal történő előinkubálást végeztünk. Egyik kontroll esetében sem tapasztaltunk jelölődést, ami reagensünk specificitását támasztja alá (6. ábra).

HA-oligoszachariddal inkubált 31 hetes

humán fogcsíra HA reakciót követően



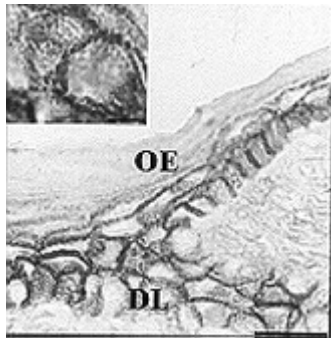
Jól látható, a zománc, a szekretoros ameloblasztok (SecA), az odontoblasztok (O), illetve azok nyúlványainak (TP) negatív reakciója.

6. ábra

4.2. A HIALURONSAV RECEPTOR, A CD44 EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A fejlődés korai stádiumában az orális epithelium bazális sejtsora, valamint az ebből kiinduló fogléc sejtsorai intenzíven jelölődtek az anti-humán CD44 monoklonális antitesttel (1. ábra).

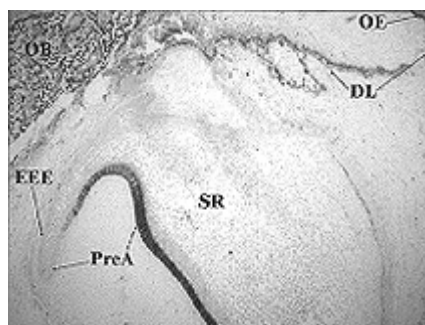
A 17 hetes foetus orális epitheliának,
illetve foglécének CD44 expressziója



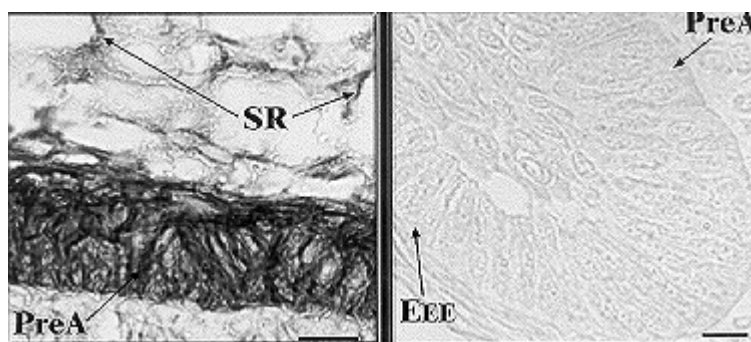
Az orális epithelium (OE) bazális sejtjei, valamint az ebből kiinduló fogléc (DL) osztódó sejtjei intenzív CD44 reakciót mutattak.

1. ábra

A fogfejlődés harang stádiumában lévő telepek esetében a CD44 expresszió a gyökérnyúlvány kivételével megfelelt a fogcsírák esetében tapasztalt hialuronsav mintázattal. (2. a., b ábra).



2.a. ábra



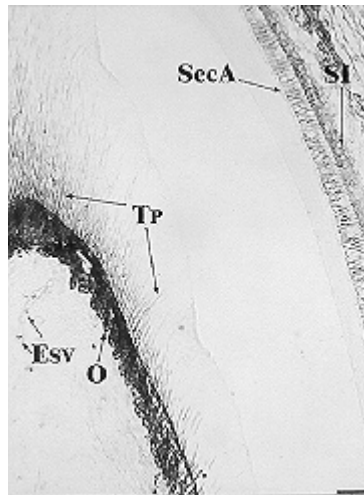
2.b. ábra

CD44 reakció 17 hetes humán fogtelepben

A fogtelep apikális régiójában a preszekretoros ameloblasztok (PreA) laterális és bazális sejtmembránja intenzív jelölődést mutatott (2.a. ábra). Azonban míg a fogtelep apikális régiójában a preszekretoros ameloblasztok pozitívítását tapasztaltuk, addig a gyökérnyúlvány területén ezen sejtek negatívak maradtak. Ugyancsak nem tapasztaltunk jelölődést a külső zománchám sejtek (EEE) esetében (2.b. ábra). A külső zománchámsejtek és a preszekretoros ameloblasztok által határolt stratum reticulare (SR) csillag alakú sejtjei moderált CD44 reakciót mutattak (2.b. ábra).

Azon humán fogcsírák esetében, ahol már megfigyelhető volt a fog kemény szöveteinek szintézise, a CD44 intenzíven expresszáldott az odontoblasztok rétegében. A dentin alapállományában csak a dentincsatornácskákból lévő Tomes nyúlványok jelölődtek a Hermes 3-al. A zománc szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok apikális, laterális valamint bazális sejtmembránján is kifejezett pozitív reakciót tapasztaltunk. A

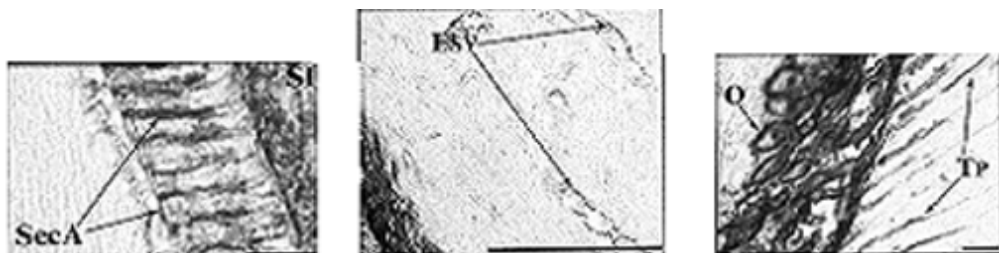
stratum intermedium sejtjeiben valamivel gyengébb reakció mutatkozott (3.a., b. ábra).



3.a. ábra

endotheliumának (ESV) moderált CD44 reakciója.

Az alábbi nagyobb nagyítású felvételeken (3.b. ábra) az előbb ismertetett struktúrák pozitív CD 44 jelölődését tüntették fel.



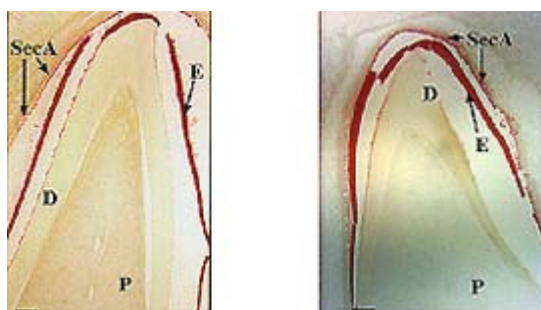
3.b. ábra

CD44 reakció 3 hetes posztnatális humán fogcsírában

4.3. A X-ES COLLAGÉN VIZSGÁLATA

A fogfejlődés korai harang stádiumában lévő humán fogcsírák esetében az anti-humán monoklonális X53-as antitesttel nem tapasztaltunk jelölődést a fogtelep különböző struktúráiban.

Azon fogcsíráknál, amelyeknél már megfigyelhető volt a fog kemény szöveteinek szintézise (25, 31, 33 foetus) a X-es kollagén ellenes antitest intenzív reakciót mutatott a zománc alapállományában (1.a ábra), amihez a zománc szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok apikális részének pozitivitása is társult, míg ezen sejtek bazális részében reakciót nem tapasztaltunk (1.b ábra).



1.a. ábra

X-es kollagén expresszió a 31 illetve 33 hetes fogtelep különböző szöveteiben



1.b. ábra

A 31 hetes fogcsíra X53-al pozitívan jelölődött struktúrái

Az 1.a. valamint az 1.b ábrákon megfigyelhető a zománc (E) mátrix intenzív jelölődése, illetve a zománc (E) alapállományának szintéziséért felelős szekretoros ameloblasztok (ApSecA, BpSecA) inhomogén pozitivitása.

Idősebb posztnatális mintából származó fogcsíra tanulmányozásakor alapvető különbség mutatkozott a fiatalabb korú, a zománcképzés kezdeti stádiumában lévő fogcsírákhoz képest. A zománc mátrixának pozitivitása csökkent, valamint ehhez társultan a szekretoros ameloblasztoknak csökkent jelölődését tapasztaltuk (2. ábra).



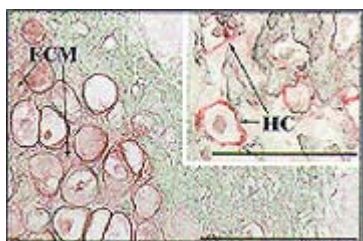
2. ábra

X-es kollagén expresszió 9 hetes posztnatális fogcsírában

A felvételeken látható a zománc alapállományának csökkent pozitivitása, valamint a szekretoros ameloblasztoknak a minimális jelölődése.

A reagensünk specifikus kötődését a negatív kontroll mellett, az α -X-es kollagénnel jellemző festődési mintázat is alátámasztotta, amelyet a 31 hetes foetus Meckel porcában tapasztaltunk. A Meckel porcot alkotó hipertrofiás porcsejtek, valamint azok extracelluláris mátrixa pozitív jelölődést mutatott ugyanazon antitesttel (X53) történő reakció elvégzését követően (3. ábra).

***X-es kollagén expresszió a 31
hetes foetus Meckel porcában***



Az ábrán jól látható, a X-es kollagén expressziójára jellemző pericelluláris illetve interterritoriális jelölődés.

3. ábra

Mivel a zománcképzés megindulásakor tapasztalt érdekes és meglepő jelenségről az irodalom eddig nem tett említést ezért az eredményeink alátámasztása végett ELISA, illetve Western immunoblot kísérleteket is végrehajtottunk.

A 22 hetes fogcsíra zománc fehérjéinek Western immunoblot analízisét követően a X-es kollagénnel jellemző molekulásúly tartományban (60 kDa) határozott sávot kaptunk, ami alátámasztja reagensünk specifitását (4. ábra).

A 22 hetes humán fogcsíra zománcának

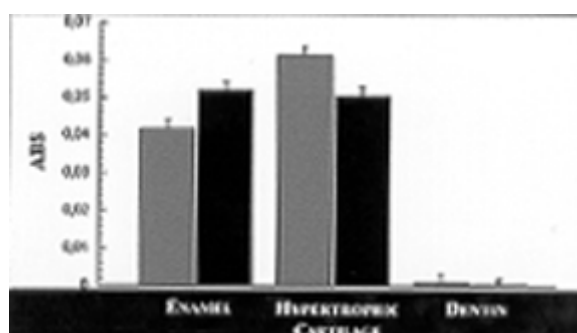
Western immunoblot analízise



Az ábrán látható, hogy a X 53-as antitesttel detektált sáv a X-es típusú kollagénre jellemző molekulásúlytartományba (60 kD) esik.

4. ábra

Az ELISA kísérleteinkhez 22, illetve 26 hetes foetus fogcsíra zománcát és dentinét, valamint pozitív önkontrollként az előbb említett foetusok tibiáinak eltávolított epifízis porcdarabjait használtuk, melyek hipertrófiás porcsejteket tartalmaznak. Az ELISA-val kapott eredményeink is alátámasztották előző megfigyeléseinket, ugyanis pozitív reakciót detektáltunk a zománc, illetve a hipertrófiás porcsejteket tartalmazó extraktumokban, azonban a dentinből készült mintákon ELISA-val nem tapasztaltunk reakciót (5. ábra).



5. ábra

A 22, illetve 26 hetes foetus különböző szöveteinek ELISA reakciója

A diagramon látható, hogy a zománc valamint az epifízisből származó extraktumok pozitív jelet adtak, addig a dentinből izolált minta esetén az X 53-

as antitesstel történt inkubálást követően ELISA-val nem tapasztaltunk pozitív, reakciót.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 A HIALURONSAV ÉS RECEPTORÁNAK, A CD44-NEK FELTÉTELEZETT SZEREPE A FOGCSÍRA FEJLŐDÉSÉBEN

A hialuronsav (HA) elsősorban a differenciálódó szövetek sejtjeiben és extracelluláris mátrixában (ECM) előforduló, nagy molekulatömegű, lineáris konfigurációjú, negatív töltésű glükózaminoglikán (Scott, 1998). A látszólag egyszerű szerkezet ellenére -mely alternáló N-acetil-D-glukózamin és D-glukuronsav molekulákból áll- a hialuronsav más ECM komponensekhez hasonlóan nem csupán az alapállomány alkotásában vesz részt (Heinegård és Oldberg, 1989), hanem specifikus interakciók révén szerepet játszik a sejtek proliferációjának, migrációjának és differenciálódásának irányításában is (Toole, 1997). Ezeknek a hialuronsav által mediált effektusoknak a továbbításáért legtöbbször a HA transzmembrán receptora, a CD44 felelős. A hialuronsav, valamint receptorának a fogfejlődésben játszott szerepeiről azonban nincsenek egyértelmű adatok.

Az ektoderma eredetű foglemez burjánzó, az ektomezenchimális szövetbe invaginálódó sejtjein detektált hialuronsavnak és CD44-nek feltehetőleg szerepe van a sejtek körüli pericelluláris mátrix kialakításában. Ennek a hidratált buroknak fontos szerepe lehet a fogléc sejtjeinek osztódásának és vándorlásának elősegítésében, hasonlóan más szövetek proliferáló, migráló sejtjeihez (Bourguignon és mtsai, 1999; Yamada és mtsai, 1999).

A fogfejlődés korai fázisaiban a dentális papilla és a zománcpulpa hialuronsav mintázata utalhat arra, hogy a HA a dentális papillában jelenlévő, hialuronsav-kötő képességgel rendelkező makromolekulákhoz (verzikán, brevikán) (Yamauchi és mtsai, 1997; Knudson 1993), illetve a zománcpulpában detektált CD44-hez kötődve fontos struktúrális komponense lehet a fogcsíra ezen részeinek. A zománcpulpában, más munkacsoport által is detektált hialuronsav, viszkoelasztikus tulajdonságából adódóan, magasan hidratált extracelluláris mátrix létrehozása által mintegy védőburkot biztosíthat a fogtelep egyéb fejlődő, differenciálódó részei felett, biztosítva ezáltal a fogcsíra normális alakfejlődését (Matthiessen és mtsai, 1997). A fogpapillában jelenlévő hialuronsav a papilla ektomezenchimális sejtjei között kialakuló "porózus" extracelluláris mátrix révén - hasonlóan más magas HA-tartalmú extracelluláris mátrix-al rendelkező fejlődő szövetekhez (Tammi és mtsai, 1998)- támogatja ezen szövet anyagtranszportját is, szerepe lehet a sejtek és a vér közötti térben a kismolekulatömegű anyagok transzportjában. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a dentális papilla kapilláris hálózatának kialakulását követően csökken a HA expresszió mértéke.

Az a megfigyelés, hogy az odontoblasztok nyúlványai és a körülöttük kialakuló dentintubulusok CD44, illetve HA pozitivitást mutatnak, arra utal, hogy hasonlóan az oszteocitákhoz (Nakamura és mtsai, 1996), a Tomes rostok körül kialakuló extracelluláris térségnek is fontos szerepe lehet ezen struktúrák fejlődésében.

Az egyik legérdekesebb új megfigyelésünk az, hogy a zománc alapállomány szintézisének megindulásakor a szekretoros ameloblasztokban, valamint az általuk szintetizált éretlen zománcmátrixban jelentős hialuronsav

menyiség volt detektálható. Képanalitikai adataink szerint a zománcmátrix optikai denzitás értéke szignifikánsan emelkedett a korai szekréción fázisban, majd drasztikusan csökkent a posztnatális korban. Az irodalmi adatokból ismert, hogy a zománc alapállomány szintézisének megindulásakor a jelenlévő zománcproteinek (amelogenin, tuftelin ameloblasztin) fontos szerepet játszhatnak a hidroxipatit kristályok nukleációjának megindításában, növekedésük, térbeli orientálódásuk irányításában (Robinson és mtsai, 1998). Azt, hogy a zománcmátrixban jelenlévő hialuronsav ezen fehérjékkel kapcsolatba lépve befolyásolja-e a zománc szerkezetének kialakulását, vagy közvetlenül hathat a kristályképződés kezdeti folyamataira, egyértelműen nem lehet megválaszolni. A rendelkezésre álló irodalmi adatokat figyelembe véve (Balázs 1998) úgy gondoljuk, hogy a hialuronsav szerkezeti sajátosságából adódóan feltehetően térkitöltő szerepet játszhat a zománckristályok kialakulásakor, melynek stabilizáló hatása lehet a kristálykötegek képződésében, elrendeződésében. A posztnatális minták zománc alapállományában tapasztalt HA mennyiség csökkenését valószínűleg az a tény magyarázhatja, hogy a mineralizáció előrehaladásával, a zománcproteinekhez hasonlóan, valószínűleg a hialuronsavat is hasítják az ekkor expresszáldó enzimek (Moe és mtsai, 1979; Moradian-Oldak és mtsai, 1996).

5.2 A X-ES TÍPUSÚ KOLLAGÉN SZEREPE A ZOMÁNCMÁTRIX KIALAKULÁSÁNAK KEZDETI FOLYAMATAIBAN

A X-es típusú nem fibrilláris kollagén előfordulását eddig a hipertrófiás porcsejtekben és az őket körülvevő porc extracelluláris mátrixban írták le (Eerola és mtsai, 1988), és a porc mineralizációs folyamataiban, az endokondrális csontosodásban tulajdonítottak neki szerepet (Kirsh és von der Mark, 1991). Fogcsírára vonatkozó irodalmi adatokat nem találtunk.

A humán fogfejlődés zománcszekréciós stádiumaiból származó szövettani metszeteinken a szekretoros ameloblasztokban, valamint a fejlődő zománc alapállományában tapasztalt pozitivitást mind ELISA, mind Western immunoblot technikával sikerült alátámasztani.

Mint ahogyan azt már a megbeszélés előző fejezetében említettük, a fejlődő zománc mátrixában jelenlévő zománcproteineknek (amelogenin, enamelin, tuftelin, ameloblasztin) szerepet tulajdonítanak a kristályszerkezet kialakításának befolyásolásában. Jelenlegi eredményeink alapján nem tartjuk kizártnak, hogy a X-es típusú kollagén, hasonlóan az endokondrális csontosodás során megfigyelhető mineralizációs folyamatokban játszott szerepéhez (Alini és mtsai, 1994; Bruckner és mtsai, 1989), közreműködhet a zománcmátrix mineralizációs folyamataiban is. Azt, hogy ez az effektus a zománcproteinekkel való interakció következtében vagy egyéb mechanizmusok révén valósul-e meg, nem tudjuk. Az irodalmi adatok tükrében nem tartjuk kizártnak, hogy a X-es kollagén a szupramolekuláris hexagonális aggregátumok létrehozása által (Scmid és Linsenmayer, 1990; Kwan és mtsai, 1991) fontos szerepet játszhat a zománc mineralizációs

folymatainak megindulásakor. A kollagénfibrillumokból kialakuló hálózat, hasonlóan más szövetekhez (Apte és Olsen, 1993; Iwamoto és mtsai, 1994), templátként szolgálhat az aggregátumhoz kötődő kalciumionok számára a nukleációs folyamatok megindulásakor.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkat különböző fejlődési stádiumból származó humán fogcsírákon végeztük. A hialuronsavat (HA) biotinált aggregán G1-doménnel (bHABC), a CD44-et monoklonális, az összes izoformát felismerő ellenanyaggal (H3) mutattuk ki. A X-es típusú kollagént monoklonális ellenanyaggal detektáltuk. A X-es kollagén ellenes reagenssel kapott immunohisztokémiai eredményeink ellenőrzése céljából ELISA és Western immunoblot kísérleteket is végeztünk.

Eredményeink: (1) A HA-t expresszálják a fogcsíra sejtjei. Új eredmény az a megfigyelés, hogy a HA tranziens módon megjelenik a zománcmátrixban is, legnagyobb mennyiségben a 31 hetes foetusban, idősebb korú fogcsíra zománcában azonban nem detektáltuk. (2) Humán fogcsírák esetében a CD44 expressziója szoros összefüggést mutatott az adott sejtek hialuronsav termelésével. (3) A X. típusú kollagén kimutatható a szekretoros ameloblasztokban és az általuk szintetizált zománc alapállományában. A fogtelep egyéb részeiben nem észleltünk reakciót. Az immunohisztokémiával kapott eredményeinket ELISA valamint Western immunoblot kísérleteink is alátámasztották. **Eredményeink alapján feltételezzük:** I. A HA a fogfejlődés során szerepet játszhat több folyamatban: (a) Szerepe lehet a fogléc sejtjeinek osztódásának és vándorlásának elősegítésében. (b) A fogpapillában jelenlévő, a fejlődés előrehaladásával fokozatosan csökkenő mennyiségben jelenlévő HA nemcsak strukturális komponense lehet a fogpapillának, hanem közreműködhet ezen szövet sejtjei közötti kismolekulatömegű anyagok transzportjában. (c) A HA feltehetően térkitöltő szerepet játszhat a zománckristályok kialakulásakor, stabilizáló hatása lehet a kristálykötegek irányított lerakódásában. (d) A Tomes-rostok körül kialakuló, HA-gazdag extracelluláris térségnek fontos szerepe lehet ezen struktúrák fejlődésében. (e) Mivel a CD44 expresszió hasonló volt a fogcsíráknál tapasztalt hialuronsav mintázattal, feltételezhetjük, hogy a hialuronsav által mediált effektusok közvetítésében a CD44-nek központi szerepe lehet a humán fogfejlődés során. II. A X-es típusú kollagén feltehetően szerepet játszhat a zománc alapállományának mineralizációjában.

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Aguiar, D.J., Knudson, W., and C.B. Knudson (1999) Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp. Cell. Res.*, 252:292-302.
- Aigner, T., Reichenberger, E., Bertling, W. Kirsch, T., Stons, H., and K. von der Mark (1993) Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumtoid articular cartilage. *Virchow. Archiv. B. Cell. Pathol.*, 63:205-211.
- Apte, S.S. and B.R. Olsen (1993) Characterization of the mouse type X collagen gene. *Matrix.*, 13:165-79.
- Arias, J.L., Nakamura, O., Fernandez, M.S., Wu, J.J., Knigge, P., Eyre, D.R., and A.I. Caplan (1997) Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. *Connect. Tissue. Res.*, 36:21-33.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and B. Seed (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.*, 61:1303-1313.
- Balázs, E. (1998) The viscoelastic intracellular matrix and control of cell function by hyaluronan. In Laurent TC, ed. *The application of hyaluronan and its derivates*. London: Portland Press., pp:185-204
- Bonucci, E. (1989) Electron microscope studies of the early stage of the calcification process: role of matrix vesicles. *Prog Clin Biol Res.*, 295:109-14.

- Boskey, A., Maresca, M., and J. Appel (1989) The effects of noncollagenous matrix proteins on hydroxyapatite formation and proliferation in a collagen gel system. *Connect. Tissue. Res.*, 21:171-178.
- Bourguignon, L.Y.W., Zhu, H., Shao, L., Zhu, D., and Y.W. Chen (1999) Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell. Mot. Cytoskel.*, 43:269-287.
- Boyde, A., and L. Martin (1982) Enamel microstructure determination in hominoid and cercopithecoid primates. *Anat. Embryol (Berl.)*, 165:193-212.
- Boyde, A. (1989) Enamel. In: Berkowitz KBB, Boyde A., Frank RM, Höhling HJ, Moxham BJ, Nalbandian J, Tonge CH, eds. *Handbook of microscopic anatomy*, Vol. V/6 Berlin: Springer, pp:309-373.
- Búzás, E. I., Holló, K., Rubliczky, L., Grazó, M., Nyirkos, P., and T.T. Glant (1993) Effect of pregnancy on proteoglycan-induced progressive polyarthritis in BALB/c mice: remission of disease activity. *Clin. Exp. Immunol.*, 94:252-260.
- Chen, Q.A., Gibney, E., Fitch, J.M., Linsenmayer, C., Schmid, T.M., and T.F. Linsenmayer (1990) Long-range movement and fibril association of type X collagen within embryonic cartilage matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:8046-8050.
- Culty, M., Nguyen, H.A., and C.B. Underhill (1992) The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell. Biol.*, 116:1055-1162.

- Daculsi, G., and B. Kerebel (1978) High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: size, shape, and growth. *J. Ultrastruct. Res.*, 65:163-72.
- DeAngelis, P.L., Papaconstantinou, J., and P.H. Weigel (1993) Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.*, 268:19181-19184.
- Eerola, I., Salminen, H., Lammi, P., Lammi, M., von der Mark, K., Vuorio, E., and A.M. Saamanen (1998) Type X collagen, a natural component of mouse articular cartilage: association with growth, aging, and osteoarthritis. *Arthritis. Rheum.*, 41:1287-1295.
- Entwistle, J., Hall, C.L., and E.A. Turley (1996) HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.*, 61:569-577.
- Fraser, J.R., Laurent, T.C., and U.B. Laurent (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.*, 242:27-33.
- Frost, G.I., Csóka, T.B., and R. Stern (1996) The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends. Glycosci. Glycotech.*, 8:419-434.
- Fukuta, S., Oyama, M., Kavalkovich, K., Fu, F.H., and C. Niyibizi (1998) Identification of types II, IX and X collagens at the insertion site of the bovine achilles tendon. *Matrix. Biol.*, 17:65-73.
- Girkontaite, I., Frischholtz, S., Lammi, P., Wagner, K., Swoboda, B., Aigner, T. and K. von der Mark (1996) Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix. Biol.*, 15:231-238.

- Goldstein, L.A., Zhou, D.F., Picker, L.J., Minty, C.N., Bargatze, R.F., Ding, J.F., and E.C. Butcher (1989) A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell.*, 56:1063-1072.
- Grammatikakis, N., Grammatikakis, A., Yoneda, M., Yu, Q., Banerjee, S.D., and B.P. Toole (1995) A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. *J. Biol. Chem.*, 270:16198-16205.
- Greiling, H., Stuhlsatz, H.W., Eberhard, T., and A. Eberhard (1975) Studies on the mechanism of hyaluronan lyase action. *Connect. Tissue. Res.*, 3:135-139.
- Hall, C.L., Wang, C., Lange, L.A., and E.A. Turley (1994) Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J. Cell. Biol.*, 126:575-588.
- Hardingham, T.E., and H. Muir (1972) The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta.*, 279:401-405.
- Heinegård, D., and Å. Oldberg (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB.*, 3:2042-2051.
- Iwamoto, M., Jikko, A., Murakami, H., Shimazu, A., Nakashima, K., Iwamoto, M., Takigawa, M., Baba, H., Suzuki, F., and Y. Kato (1994) Changes in parathyroid hormone receptors during chondrocyte cytodifferentiation. *J. Biol. Chem.*, 269:17245-17251.
- Jalkanen, S., Bargatze, R.F., de los Toyos, J., and E.C. Butcher (1987) Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct

- epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J. Cell. Biol.*, 105:983-990.
- Knudson, W., Aguiar, D.J., Hua, Q., and C.B. Knudson (1996) CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp. Cell. Res.*, 228:216-228.
- Kwan, A.P., Cummings, C.E., Chapman, J.A., and M.E. Grant (1991) Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J. Cell. Biol.*, 114:597-604.
- Linsenmayer, T.F. (1991) Collagen. In *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.) 2nd ed., New York: Plenum Press., pp 7-44.
- Linsenmayer, T.F., Long, F., Nurminskaya, M., Chen, Q., and T.M. Schmid (1988) Type X collagen and other up-regulated components of the avian hypertrophic cartilage program. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 60:79-109.
- Lokeshwar, V.B., Fregien, N., and L.Y.W Bourguignon (1994) Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J. Cell. Biol.*, 126:1099-1109.
- Matthiessen, M. E., Garbarsch. C., Engelbrecht-Olsen, B., Hellstrom, S., and A. Engstrom-Laurent (1997) Hyaluronan in human deciduous tooth germs in the bell stage. *Acta. Anat. (Basel)*, 159:1-7.
- McCourt, P.A. (1999) How does the hyaluronan scrap-yard operate? *Matrix. Biol.*, 18:427-432.

- Meyer, K., and J.W. Palmer (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. J. Biol. Chem., 107:629-634.
- Nakamura, H., and H. Ozawa (1996) Immunolocalization of CD44 and the ERM family in bone cells of mouse tibiae. J. Bone. Min. Res., 11: 1715-1722.
- Nehls, V., and W. Hayen (2000) Are hyaluronan receptors involved in three-dimensional cell migration? Histol. Histopathol., 15:629-636.
- Niyibizi, C., Sagarrigo-Visconti, C., Gibson, G., and K. Kavalkovich (1996) Identification and immunolocalization of type X collagen at the ligament-bone interface. Biochem. Biophys. Res. Commun., 222:584-609.
- Pohl, M., Sakurai, H., Stuart, R.O., and S.K. Nigam (2000) Role of hyaluronan and CD44 in in vitro branching morphogenesis of ureteric bud cells. Dev. Biol., 224:312-325.
- Poole, A.R., and I. Pidoux (1989) Immunoelectron microscopic studies of type X collagen in endochondral ossification. J. Cell. Biol., 109:2547-2554.
- Rauch, U., Karthikeyan, L., Maurel, P., Margolis, R.U., and R.K. Margolis (1992) Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain J. Biol. Chem., 267:19536-19547.
- Ripellino, J. A., Klinger, M.M., Margolis, R.U., and R.K. Margolis (1985) The hyaluronic acid binding region as a specific probe for the localization of hyaluronic acid in tissue section. J. Histochem. Cytochem., 33:1060-1066.

- Robinson, C., Brookes, S.J., Shore, R.C., and J. Kirkham (1998) The developing enamel matrix: nature and function. *Eur. J. Oral. Sci.*, 106:282-291.
- Sadler, T.W. (1985) Head and Neck. In: Sadler, T.W. (Ed), *Langman's Medical Embryology*. 5th ed., Williams&Wilkins, Baltimore, pp. 281-310.
- Sainte-Marie, G. (1962) A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.*, 10:250-256.
- Schmid, T.M., and T.F. Linsenmayer (1990) Immunoelectron microscopy of type X collagen: supramolecular forms within embryonic chick cartilage. *Dev. Biol.*, 138:53-62.
- Schmid, T.M., and T.F. Linsenmayer (1985) Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J. Cell. Biol.*, 100:598-605.
- Scott, J.E. (1992) Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB.*, 6: 2639-2645
- Scott, J.E. (1998) Chemical morphology of Hyaluronan. In: Laurent TC, ed. *The chemistry, biology and medical application of hyaluronan and its derivatives*. London: Portland Press, pp:7-17
- Tammi, R., MacCallum, D., Hascall, V.C., Pienimäki, J.P., Hyttinen, M., and M. Tammi (1998) Hyaluronan Bound to CD44 on Keratinocytes Is Displaced by Hyaluronan Decasaccharides and Not Hexasaccharides. *J. Biol. Chem.*, 273:28878-28888.

- Tammi, R., Ripellino, J. A., Margolis, R.U., and M. Tammi (1988) Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J. Invest. Dermatol.*, 90:412-414.
- Tammi, R., Rönkkö, S., Ågren, U., and M. Tammi (1994) Distribution of hyaluronan in bull reproductive organs. *J. Histochem. Cytochem.*, 42: 1479-1486.
- Toole, B.P., Goldberg, R.L., Chi-Rosso, G., Underhill, C.B., and R.W. Orkin (1984) Hyaluronate-cell interaction. In: Trelstad RL, ed. *The role of extracellular matrix in development*. New York: Alan R. Liss Inc., pp:43-66.
- Toole, B.P. (1997) Hyaluronan in morphogenesis. *J. Intern. Med.*, 242:35-40.
- Tucker, A.S., and P.T. Sharpe (1999) Sharpe Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J. Dent. Res.*, 78:826-834.
- Tuckett, F., and G. Morris-Kay (1988) Alcian blue staining of glycosaminoglycans in embryonic material: effect of different fixatives. *Histochem. J.*, 20:174-182.
- Underhill, C.B., Green, S.J., Cologlio, P.M., and G. Tarone (1987) The hyaluronate receptor is identical to a glycoprotein of 85, 000 Mr (gp 85) as shown by a monoclonal antibody that interferes with binding activity. *J. Biol. Chem.*, 262:13142-13146.
- Underhill, C.B. (1992) CD44: the hyaluronan receptor. *J. Cell. Sci.*, 103:293-298.

- Weigel, P. H., Hascall, V. C. and M. Tammi (1997) Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.*, 272: 13997-14000.
- Weissman, B., and K. Meyer (1954) The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J. Am. Chem. Soc.*, 76:1753-1757.
- Wright, J. T., Kiefer, C. I., Hall, K. I., and B. R. Grubb (1996) Abnormal enamel development in cystic fibrosis transgenic mouse model. *J. Dent. Res.*, 75:966-973.
- Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M., and Y. Yamaguchi (1994) Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family *J. Biol. Chem.*, 269:10119-10126.
- Yamada, K. (1973) The effect of digestion with streptomyces hyaluronidase upon certain histochemical reactions of hyaluronic acid-containing tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 21:794-798.
- Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Niimi, A., Ueda, M., and K. Kimata (1999) Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jap. J. Canc. Res.*, 90:987-992.
- Yang, B., Zhang, L., and E.A. Turley (1993) Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *J. Biol. Chem.*, 268:8617-8623.
- Yannariello-Brown, J., Frost, S.J., and P.H. Weigel (1992) Identification of the Ca(2+)-independent endocytic hyaluronan receptor in rat liver

sinusoidal endothelial cells using a photoaffinity cross-linking reagent.

J. Biol. Chem., 267:20451-20456.

Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and S. Tsukita (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. J. Cell. Biol., 140:885-895.

Zhou, B., Weigel, J.A., Fauss, L., and P.H. Weigel (2000) Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). J. Biol. Chem., 275:21111-21116.

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

8. A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

8.1. IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK

Felszeghy, S., Hyttinen, M., Tammi, R., Tammi, M., Módis, L., Quantitative image analysis of hyaluronan expression in human tooth germs. EUR J ORAL SCI 2000, (108), 320-326

Felszeghy, S., Holló, K., Módis, L., Lammi, M.: The type X collagen in Human enamel development: a possible role in mineralization. ACTA ODONTOL SCAND 58, 2000, (58), 171-176

8.2 KÖZLÉSRE BENYÚJTOTT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Felszeghy, S., Módis, L., Tammi, M., Tammi, R.: The distribution pattern of the hyaluronan receptor CD44 during human tooth development. Közlésre benyújtva az ARCHS ORAL BIOL-hoz

Schulte-Altdorneburg, G., Droste, D.W., **Felszeghy, S.**, Kellermann, M., Popa, V., Hegedűs, K., Hegedűs, Cs., Módis, L., Ringelstein E.B., Csiba, L.: Accuracy of in vivo carotid B-mode ultrasound compared to pathologic analysis: Intima-media thickening, lumen diameter and cross-sectional area. Közlésre benyújtva az CIRCULATION-hoz.

8.3 EGYÉB PUBLIKÁLT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNY

Zákány, R., Bakó, É., **Felszeghy, S.**, Holló, K., Balázs, M., Bárdos, H., Gergely, P., Módis, L.: Okadaic acid induced inhibition of protein phosphatase

2A enhances chondrogenesis in chicken limb bud micromass cell cultures.

ANAT EMBRYOL. Közlésre elfogadva 26 June 2000

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Módis Lászlónak, aki szakmai és baráti tanácsaival irányította tudományos munkámat. Köszönettel tartozom Dr. Antal Miklósnak, az Anatómia Intézet vezetőjének, hogy lehetőséget kaptam arra, hogy az intézetben dolgozhassak. Szeretném megköszönni Dr. Heikki J Helminennek, hogy ERASMUS ösztöndíjasként több hónapot eltölthettem a Kuopioi Egyetem Anatómiai Intézetében, valamint Dr. Markku Tamminak, Dr. Mika Hyttinennek, Dr. Mikko Lamminak és Dr. Raija Tamminak a közös munkát.

Hálás köszönettel tartozom Bárány Sándorné és Szanitter Béláné asszisztensnőknek akiktől megtanulhattam a szövettani anyagfeldolgozás technikai lépéseit, és akik mindig, mindenben a segítségemre voltak.

Hálás vagyok egykori TDK-s témavezetőimnek Dr. Földes Istvánnak és Dr. Kocsis Katalinnak, akik diákkörös éveimben irányították munkámat, és akik által módom volt bepillantást nyerni az intézet kötőszövetes munkacsoportjának kutatási területeibe.

Köszönet illeti a DEOEC Anatómiai, Szövet és Fejlődéstani Intézetének minden dolgozóját, akik készséggel segítettek különböző feladataim megoldása során.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak a biztatást és támogatást, amivel átsegítettek a nehézségeken.

10. FÜGGELÉK