

# A SZINAPSZIS VIZSGÁLATA NEURO-IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

## I. POSZTSZINAPTIKUS ANTIGÉN IMMUNELEKTRONMIKROSZKÓPOS KIMUTATÁSA

OROSZ ANTAL, FALUS ANDRÁS, MADARÁSZ EMÍLIA és ÁDÁM GYÖRGY  
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Összehasonlító Élettani Tanszéke, Budapest

### Bevezetés

Az idegszövet szubcelluláris részecskéinek és különböző membránfrakcióinak vizsgálatára egyes szerzők már alkalmaztak immunológiai eljárásokat: DE ROBERTIS és mtsai (1968), WALD és mtsai (1968), KORNGUTH és mtsai (1969), DAY és APPEL (1970), MACMILLAN és mtsai (1971), MACPHERSON és mtsai (1971), RAITERI és mtsai (1972), SHEK és MACPHERSON (1971). Az immun-módszereket felhasználó kutatások során több laboratóriumban mutattak ki szinaptoszomális antigén-determinánsokat, de csak ritkán vizsgálták a demonstrált idegszöveti antigén és az egyéb szövetekre is jellemző közös antigének esetleges rokonságának (vagy azonosságának) kérdését. HERSCHMANN és mtsai (1972), valamint MICKEY és mtsai (1971) kivételével ugyancsak kevés adatot közöltek arra vonatkozóan, hogy a szinaptoszómában kimutatható antigén-aktivitás más idegszöveti szubcelluláris részecskékben megtalálható-e. A vizsgálatok nem terjedtek ki az idegvégződésre jellemző antigén pontos szubszinaptoszomális elhelyezkedésének meghatározására.

Kísérleteink során sikerült olyan agyspecifikus immunszérumot előállítanunk, amely megfelelő szöveti antigénnel, illetve macska agykéregből nyert oldható fehérjéjéssel való „kimerítés” után csak a szinaptoszoma frakcióval szemben mutatott ellenanyag-aktivitást (OROSZ és mtsai 1971, 1974). Az immunszérumból tisztított ellenanyagok, illetve az ezekből előállított Fab<sub>2</sub> fragmentumok segítségével vizsgáltuk a szinaptoszoma-specifikus antigén-determináns egyes biokémiai és immunológiai tulajdonságait, valamint az antigénsajátságú komponens pontos helyét a szinaptoszoma részecskéken belül (OROSZ és mtsai 1973).

### Anyag és módszer

#### *I. Az immunszérum előállítása és feldolgoása*

1. Macska agykéregből foszfolipid-extrakció után nyert preparátummal szemben (JANKOVIC és mtsai 1968) nyulakban termeltünk immunszérumot (OROSZ és mtsai 1971). Az immunsavóból macskaszérummal, macska

máj- és vesekivonatokkal való abszorpció segítségével eltávolítottuk a nem-agyspecifikus ellenanyag-aktív komponenseket. Az így nyert agyspecifikus immunszérumot macska agykéreg oldható fehérje-frakcióival inkubáltuk. A kimerítések során minden lépésnél 1 : 10 (abszorbens mg: immunsavó ml) arányban, 37 °C-on, enyhe keverés mellett inkubáltunk. A keletkezett immunprecipitátumot centrifugálással távolítottuk el. Az eljárást addig ismételtük, míg az immunsavó immundiffúziós tesztben az adott antigénnel szemben reakciót már nem adott.

2. A szinaptoszoma-specifikus immunsavóból, valamint normál nyúlszérumból BAUMSTARK és mtsai (1964) módszere szerint a human IgG osztálynak megfelelő ellenanyag-frakciót izoláltuk. A frakció homogenitását immunelektroforézis segítségével ellenőriztük.

3. Normál- és immunszérumból izolált IgG frakciókat NISONOFF és mtsai (1959) szerint pepszinnel hidrolizáltuk. A hidrolizátumot 0,1 M Na-acetát-cet-sav (pH = 7,5) pufferrel equilibrált Sephadex G-150 oszlopra vittük. Az equilibráló pufferrel végzett elúció során az oszloptérfogat 32—50%-nak megfelelő puffermennyiséggel leoldott II. frakció tartalmazta a Fab'<sub>2</sub> fragmentumokat. A frakció tisztaságát immunelektroforetikus vizsgálatokkal és analitikai ultracentrifugálással ellenőriztük.

4. A bivalens ellenanyag-fragmentumokat (Fab'<sub>2</sub>) SINGER (1961) SRI RAM (1963) által módosított eljárás szerint ferritinnel konjugáltuk.

## II. Macska agykéreg szubcelluláris frakcionálása

Ficoll-szaharóz sűrűség-gradiens ultracentrifugálással macska agykéregből különböző denzitású szinaptoszoma frakciókat izoláltunk (OROSZ és mtsai 1973). Differenciál és sűrűséggradiens ultracentrifugálással mag, myelin, mitokondrium, mikroszoma és szinaptikus vezikulum frakciókat is előállítottunk. A szubcelluláris frakciók ozmotikus kezelésével membrán frakciókat nyertünk, amelyeket Triton X-100 nem-ionos detergens 0,6%-os oldatával szolubilizáltunk (OROSZ és mtsai 1974).

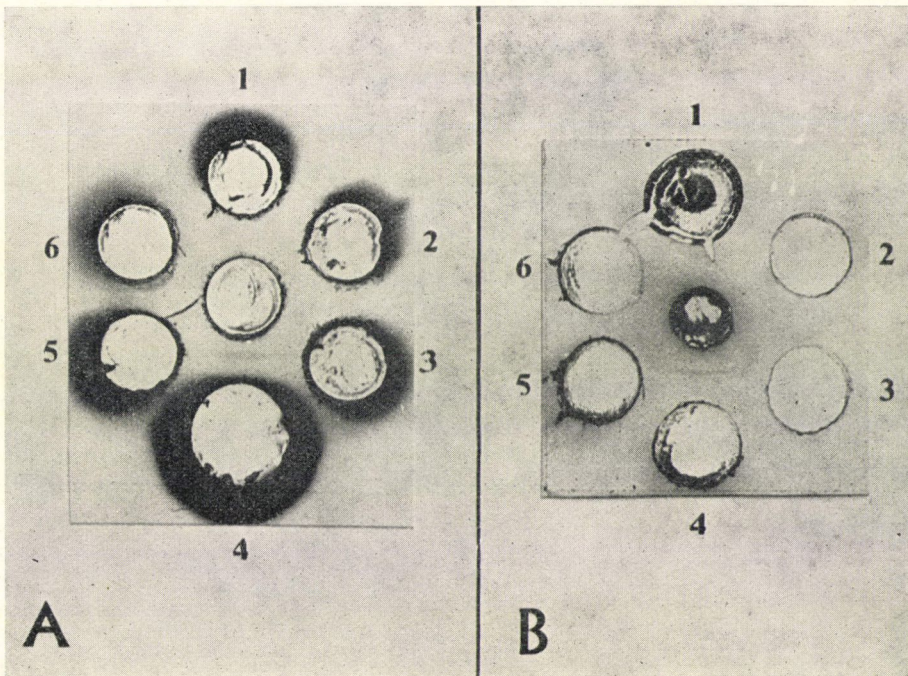
## III. A jelölt ellenanyag-fragmentumok bekötődésének vizsgálata

A szubcelluláris frakciókat ferritinnel jelölt normál és szinaptoszoma-specifikus Fab'<sub>2</sub> fragmentumok oldatával szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Az inkubálás befejeztével a feleslegben levő jelölt ellenanyag-fragmentumokat fiziológiás sóoldattal történő mosással távolítottuk el. Az inkubált frakciókat 2,5%-os glutáraldehiddel, majd 1,0%-os OsO<sub>4</sub>-al fixáltuk. Vízteleinítés után a beágyazáshoz Durcupan ACM-et használtunk.

## Eredmények

Macska agykéreg foszfolipid-extrahált kivonatával szemben sikerült immunszérumot előállítanunk, amely megfelelő szöveti abszorpciók után csak az agyszöveti komponensekkel adott reakciót, de nem reagált macska szérum, máj, vese, ovárium és lép vizes, illetve detergens-kivonataival: OROSZ és mtsai (1971, 1974) (1a. ábra). A szolubilis agykérgi antigénnel is kimerített immunszérum egyedül a szinaptoszoma membrán-frakció nem-ionos detergens (Triton X-100; 0,6%) kezelésével nyert extraktummal reagált. Immundiffúziós reakciót nem kaptunk myelin, mikroszoma, mitokondrium, mag és szinaptikus vezikula frakciók detergens kivonataival szemben (1b. ábra).

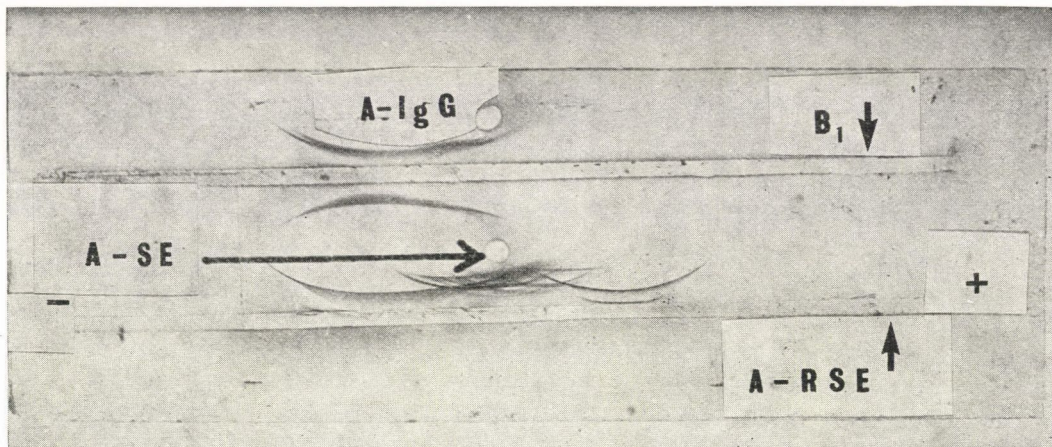
Az immunszérum vizsgálata során ellenanyag-aktivitást csak a human IgG osztálynak megfelelő 7S gammaglobulin frakcióban tudtunk kimutatni (2. ábra) A frakciót BAUMSTARK és mtsai (1964) módszere szerint izoláltuk. Az immunelektroforetikus vizsgálatok szerint a preparátum jelentős ellenanyagaktivitású tiszta „IgG” frakciónak bizonyult (2. ábra).



1. ábra. A szinaptoszoma-specifikus immunszérum vizsgálata Ouchterlony immundiffúziós módszerrel:

a) az immunszérum reakciója macska különböző szerveiből készített nem-ionos detergens kivonatokkal szemben. 1 vese; 2 máj; 3 lép; 4 agykéreg; 5 ovárium; 6 testis.

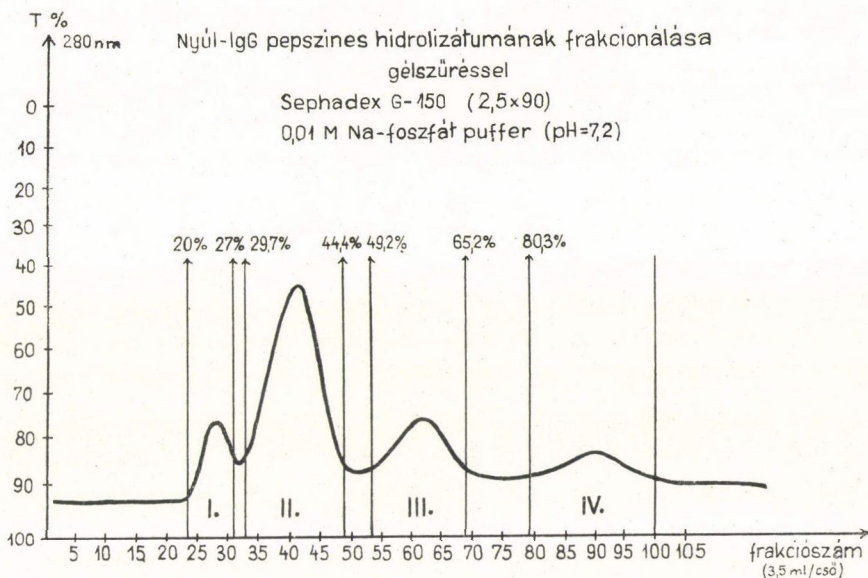
b) az immunszérum reakciója macska agykéreg különböző szubcelluláris frakcióinak detergens kivonataival szemben. 1 myelin; 2 szinaptikus vezikulák; 3 mitokondrium frakció; 4 szinaptoszoma frakció; 5 magfrakció; 6 mikroszoma frakció. (A kivonatok fehérjetartalma: 2,5 mg/ml)



2. ábra. Macska agykéreg vizes kivonatával ( $B_1$ : felső hosszanti tartály) az immunszérum IgG osztályának megfelelő komponensei reagáltak. ( $A-IgG$ : az immunszérumból izolált IgG frakció;  $A-SE$ : a teljes immunszérum; az alsó hosszanti tartályban anti-nyúlsavó lészérum volt:  $A-RSE$ )

Ismert adat, hogy az antigén-felismerésben és az antigénnel való kötődésben az ellenanyag-aktív IgG molekulák C-terminális szakaszai közvetlenül nem vesznek részt. Immunelektronmikroszkópos vizsgálataink során — az esetleges aspecifikus kötődés lehetőségének további csökkentésére — az IgG molekulákból az antigénkötésben közvetlenül szerepet játszó: C-terminálistól távolabbi molekularészeket izoláltuk. A specifikus ellenanyag-fragmentumok előállításánál az antigén-aktivitást célszerű lépésenként ellenőrizni. Az ilyen jellegű vizsgálatok bivalens, tehát antigénnel precipitációs reakciót adó fragmentumok ( $Fab'_2$ ) esetén a legegyszerűbb immundiffúziós és immunelektroforetikus módszerekkel történhetnek. Vizsgálataink céljára normál- és immunszérum tisztított IgG frakciójából pepszines hidrolízissel állítottunk elő bivalens ellenanyag-fragmentumokat (NISONOFF és mtsai 1959). A pepszines hidrolízis 4,9-5S szedimentációjú fragmentumokat eredményez, amelyek antigént kötő és precipitáló (bivalens) ellenanyag-aktivitással rendelkeznek (NISONOFF és DIXON 1964). Ezek redukciója után univalens fragmentumok keletkeznek, amelyek aminosavösszetétele és szedimentációs állandója (MANDY és mtsai 1961), valamint antigenitása (GOODMANN és GROSS 1963) a papainos emésztéssel nyert I. és II. Fab frakcióhoz rendkívül hasonló.

A normál- és az immun nyúl-IgG pepszines hidrolízisét NISONOFF és mtsai (1959) módszere szerint 0,1 M Na-acetát-ecetsav ( $pH = 4,2$ ) pufferben 20 órán át  $37^\circ C$ -on, fehérje : enzim = 100 : 1 arány mellett végeztük. 20 óra elteltével a hidrolízis leállítását az enzim inaktiválásával történt: 2 N NaOH adagolásával az elegy  $pH$ -ját  $pH = 8,0$ -ra emeltük, majd 0,01 M Na-foszfát pufferrel ( $pH = 7,2$ ) szemben 24 órán át dializáltuk. Az emésztmény nem-



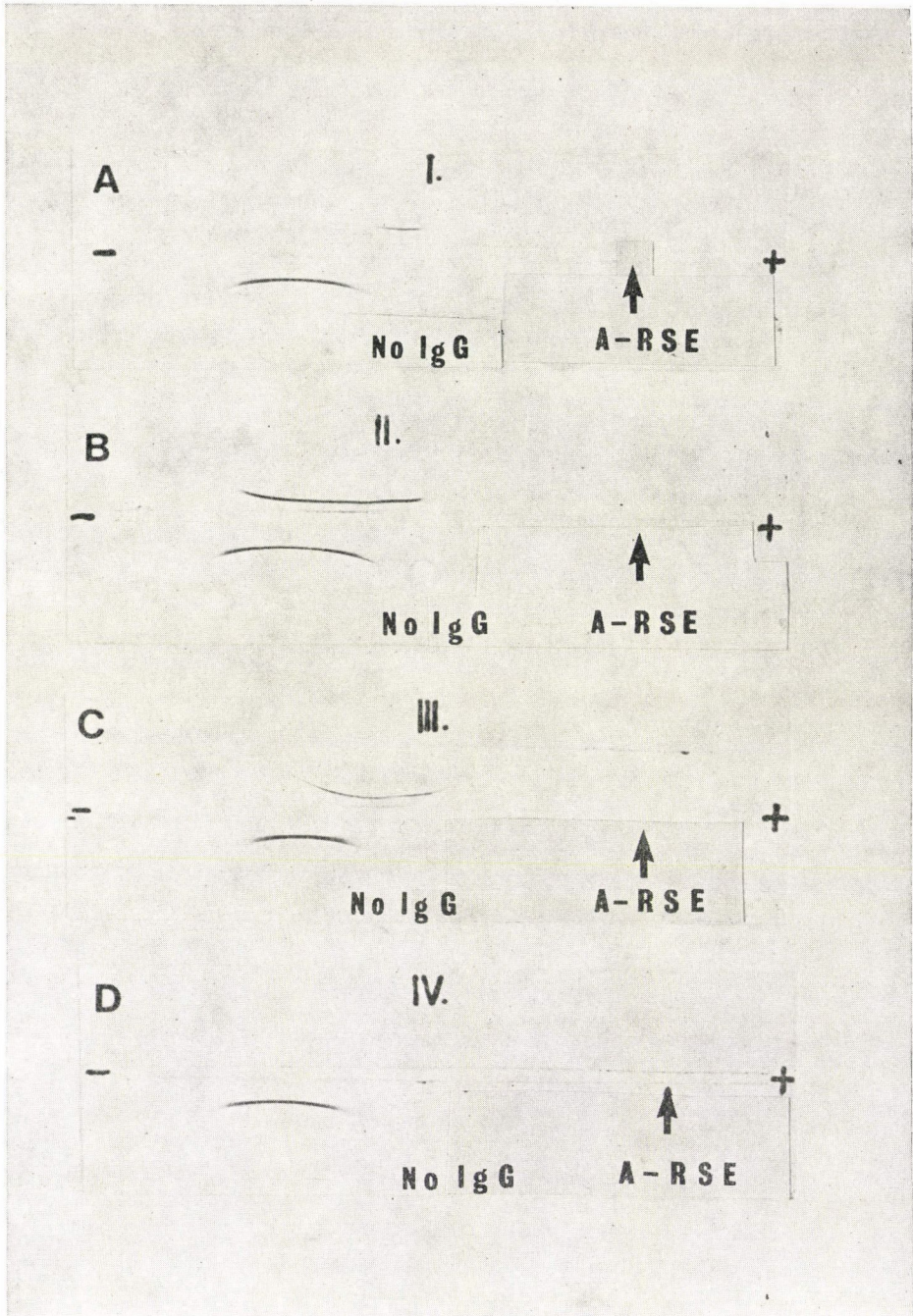
3. ábra. Nyúl-IgG pepszines hidrolizátumának gélszűrése Sephadex G-150 oszlopon. (30 mg fehérje 2,5 × 90 cm-es oszlopon; 0,01 M Na-foszfát puffer; pH = 7,2)

dializálható komponenseit a fenti pufferrel egyensúlyba hozott Sephadex G-150 oszlopon gélszűrűztük. A gélszűrés során GORINI és mtsai (1970) eredményeivel egyezően négy jól reprodukálható fehérje-maximumot kaptunk (3. ábra).

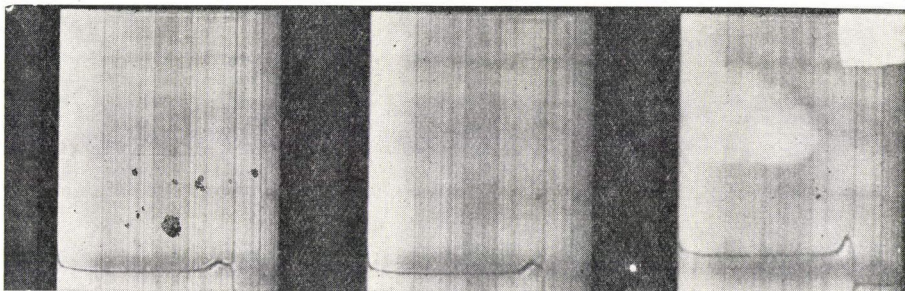
Az I. frakció az oszlop térfogatának 20–27%-nak megfelelő térfogatú pufferrel mosható le, a gélágyból kizáródó komponenseket tartalmazza. Előzetes vizsgálataink szerint a hasítatlan nyúl-IgG az oszloptérfogat 25–30%-nál eluálható. A frakció immunoelektroforetikus viselkedése azonban inkább aggregált fehérjekomplexek, mint hasítatlan IgG jelenlétére utal (4a. ábra). Megfelelő antigénnel vizsgálva a frakcióban ellenanyag-aktivitást nem tudtunk kimutatni.

Az oszloptérfogat 29–44%-ának megfelelő pufferrel lemosódó II. frakció a hidrolizátum nem-dializálható fehérjeinek 55–60%-át tartalmazta. A frakció elektroforetikus vizsgálatával lassú, de nem identikus komponensek mutathatók ki (4b. ábra). Megfelelő antigénnel vizsgálva (pl. ferritin-antiferritin-II. frakció rendszer) a frakció immundiffúziós lemezen precipitációs reakciót ad, amelynél titere az intakt IgG-hez képest kb. 30%-kal csökkent.

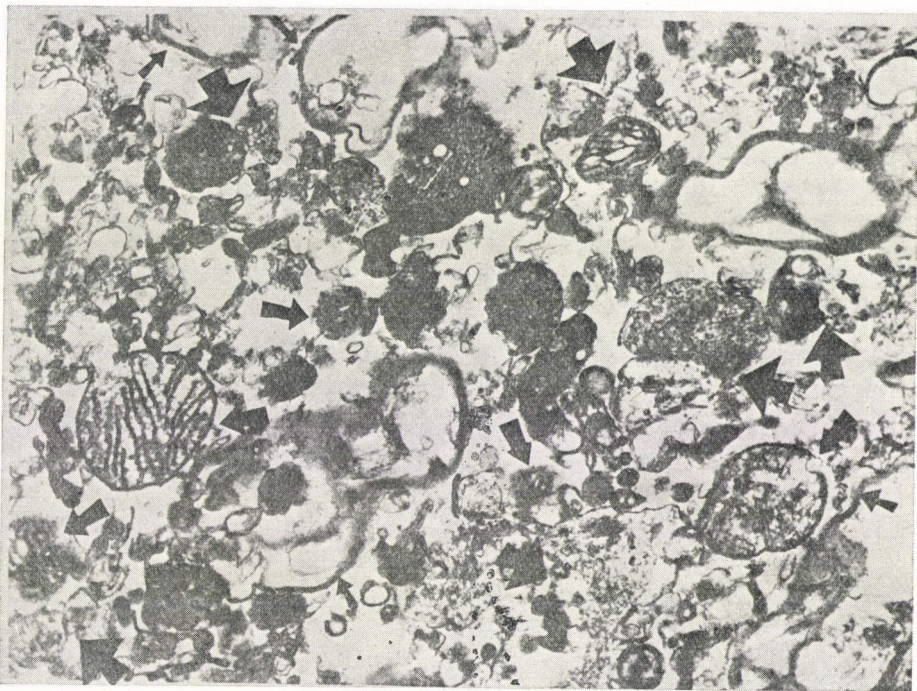
A III. frakciót az oszloptérfogat 50–65%-ának megfelelő puffermennyiség átfolytatásakor gyűjtöttük. Immunoelektroforetikus (antigenikus) viselkedése a II. frakció komponenseihez hasonló. Precipitációs ellenanyag-aktivitását azonban nem tudtuk kimutatni (4c. ábra). A IV-ik szélesen elhúzódó „peak” (fehérjemaximum), amely az oszloptérfogat 90%-tól izolálható kis peptideket



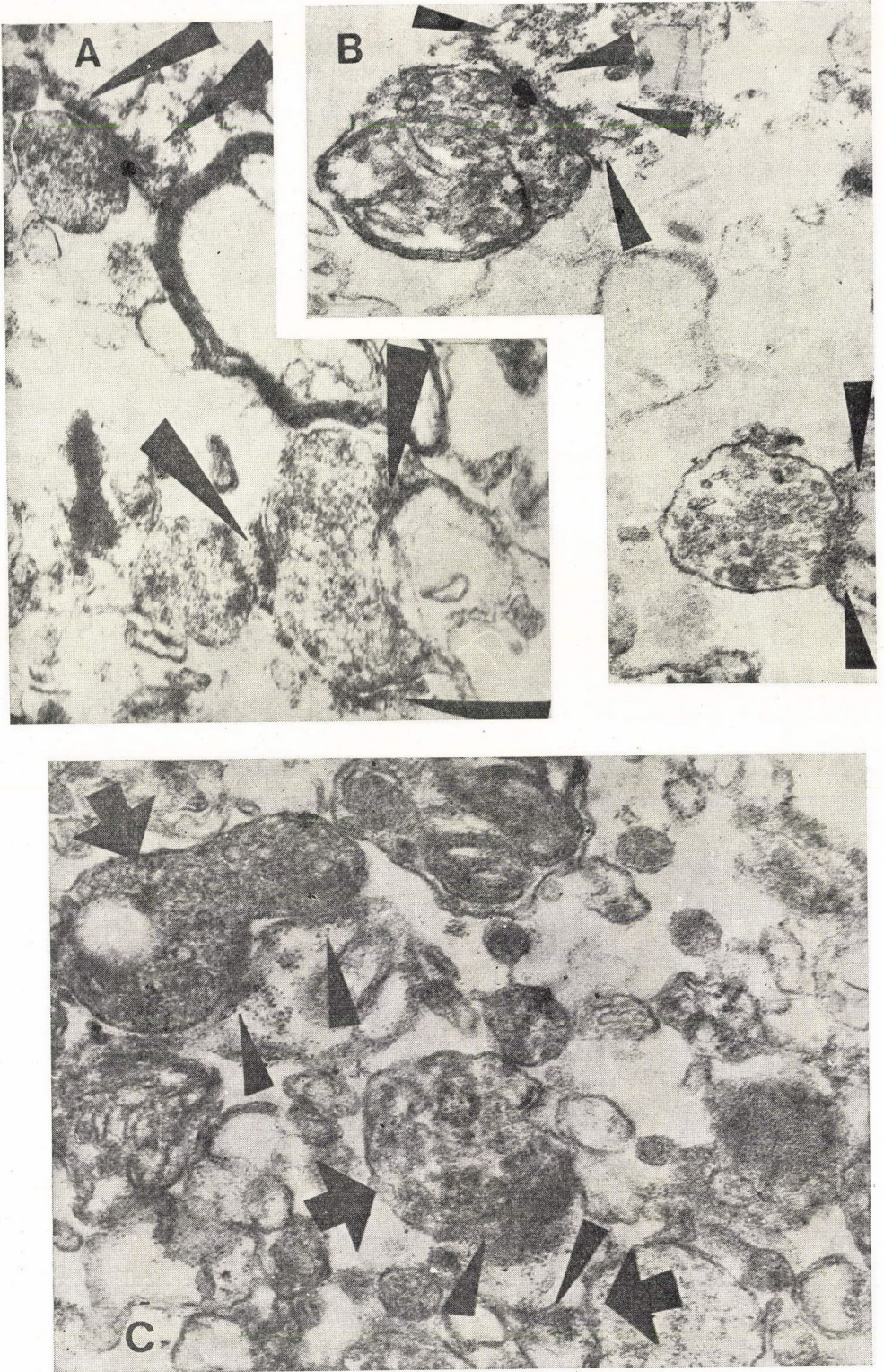
4. ábra. Nyúl-IgG pepszines hidrolizátumából gélszűrőssel elkülönített egyes frakciók immun-elektroforetikus vizsgálata. A hosszanti tartályokban ellenanyagként antinyúlsavó lószérumot (*A-RSE*); az alsó kerek tartályokban hasítatlan nyúl IgG-t (*No IgG*) helyeztünk. A vizsgálható frakciót a felső tartályokba töltöttük a: I; b: II; c: III; d: IV. frakció



5. ábra. A pepszines hidrolizátum II. (Fab'<sub>2</sub>) frakciójának vizsgálata analitikai ultracentrifugával



6. ábra. A nyers szinaptoszoma („nyers mitokondrium”) frakció elektronmikroszkópos képe. A nagy nyilak szinaptoszomát, a közepes nyilak mitokondriumot és a kis nyilak myelinfragmentumot jelölnek (20 000 × nagyítás)





tartalmaz, amelynek sem antigenikus, sem ellenanyagaktivitását nem sikerült kimutatnunk (4d. ábra).

A frakciók vizsgálatát minden esetben vákuum-dialízissel történt bekoncentrálás után, 5 mg/ml-es koncentrációban végeztük. A gélszűrési és immunológiai vizsgálatok során nyert eredményeink, valamint más szerzők adatai (GORINI és mtsai 1970) arra engednek következtetni, hogy a pepszines hidrolízis folyamán keletkező bivalens ellenanyag-fragmentumok a II. frakcióban eluálhatók.

Analitikai ultracentrifugás vizsgálatok szerint a II. frakció nem tartalmaz kimutatható mennyiségben sem hasítatlan IgG-nek, sem a bivalens fragmentnál kisebb molekula-részletnek megfelelő szedimentációjú komponenseket (5. ábra).

Az elektroforetikusan és a szedimentációs vizsgálatok szerint tiszta Fab'<sub>2</sub> frakciót ferritinnel konjugáltuk, majd a bekötődés helyét és mértékét macska agykéregből izolált tisztított szubcelluláris frakciókban vizsgáltuk. Az antigén-aktív komponenst tartalmazó szubcelluláris részecske kiválasztására legalkalmasabbnak a nyers szinaptoszoma („nyers mitokondrium”) (BRODY és BAIN 1952) preparátum bizonyult. Ez a frakció szinaptoszoma és mitokondrium részecskék mellett jelentős mennyiségű myelint, és pontosan nem meghatározható membrán-komponenseket is tartalmaz (6. ábra). A szaharóz oldatban 10%-os homogenizátumból a mag- és a sejttörmelék-frakciók eltávolítása után nyert nyers szinaptoszoma frakciót 11 500 g mellett 15 percig üleptítettük. A kétszer mosott frakciót a jelölt normál és specifikus ellenanyag fragmentumokkal, valamint tiszta ferritin oldattal 30 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szabad ellenanyag fragmentumokat, illetve ferritint többszöri üleptítéssel és mosással távolítottuk el. Az inkubált szuszpenziót a tisztítás után azonnal glutáraldehiddel fixáltuk, majd elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára beágyasztuk.

A ferritinnel jelölt Fab'<sub>2</sub> fragmentumok a heterogén nyers szinaptoszoma frakcióban csak a szinaptoszoma részecskékhez kötődtek specifikusan (7a. ábra). Hasonló eredményt kaptunk az egyes tisztított szubcelluláris frakciókon végzett bekötési vizsgálatok során, ugyanis a különböző szubcelluláris frakciókban (a szinaptoszoma frakciókat kivéve) az immun- és normál-nyúlszérumból izolált Fab'<sub>2</sub> fragmentumok diffúz, ritka és nem specifikus kötődést mutattak.

←  
7. ábra. Az antigén lokalizációjának immunelektronmikroszkópos vizsgálata. A nagy nyilak a szinaptoszoma részecskéket, a nyílhegyek a ferritinnel jelölt szinaptoszoma-specifikus Fab'<sub>2</sub> fragmentumok kötődésének helyét mutatják

(A: 25 000 ×

B és C: 35 000 × nagyítás)

Az immunferritin technikával nyert eredményeink tehát megerősítették azokat a korábbi immundiffúziós és szolubilizációs eljárásokkal nyert eredményeinket, amelyek szerint a szinapszishoz közeli területen olyan antigén-determináns(ok) található(k), amely(ek) az agyszövet egyéb szolubilis, illetve partikulált antigénjeitől eltérnek. A szinaptoszoma-specifikus antigén pontos, idegvégződésen belül elfoglalt helyének meghatározását tisztított szinaptoszoma frakciókon végeztük.

Specifikus ellenanyag-fragmentum kötődést figyeltünk meg a poszt-szinaptikus membránhoz csatlakozó „szubszinaptikus hálózat” területén (7b. ábra). A specifikus ellenanyag-fragmentumok nem reagáltak a szinaptoszoma részecskék más területein található komponensekkel, ugyanis szelektív bekötődést nem tudtunk megfigyelni a szinaptoszomák citoplazmájában, a preszinaptikus membrán, a „dense projections” (AKERT és SANDRI 1970) és a szinaptikus rés régióiban. Normál nyúlszérumból izolált Fab<sub>2</sub>-ferritin komplexek bekötődésének vizsgálatánál szelektív reakciót egyáltalán nem észleltünk.

Az adott ellenanyag-populáció felhasználásával nem mutatkozott antigenitásbeli különbség az egyes denzitás, ozmotikus érzékenység és morfológia szerint elkülöníthető (Orosz és mtsai 1974) szinaptoszoma frakciók között. A szinaptoszoma-specifikus antigén jelenléte a sok vezikulát tartalmazó — általunk „szinaptoszoma-2”-nek nevezett — részecskék kapcsolódási területén bizonyította, hogy ezek a partikulumok előző adatainkkal összhangban valóban szinaptoszomák (7c. ábra).

### Megbeszélés

A neuro-immunológia gyorsan fejlődő interdiszciplináris határterület, amely egyes immunológiai és neurológiai folyamatok analógiájaként rendelkezésünkre álló ismeretanyagot, továbbá az immunokémiai módszerek által nyújtott analitikai lehetőségeket az idegrendszeri kutatások szolgálatába állítja. A celluláris immunológia eredményei a sejtfelismerés folyamatainak kutatásában értékes információkat nyújthatnak az idegi hálózatalakulást vizsgáló kutató számára. A celluláris és humorális immunológia adatai igen fontosak a klinikai neuro-immunológiai kórképek megértéséhez.

Az immun-neurokémiai kutatások egy-egy idegrendszerre specifikus antigénnel vagy antigén-csoporttal szemben termelt ellenanyag-populációt analitikai eszközként használnak fel egyes idegi folyamatok, illetve struktúrák vizsgálatában. Azok a speciálisan idegi molekuláris összetevők, amelyek a szervezet más szerveiben nem fordulnak elő, gyakran rendelkeznek antigéntulajdonságokkal nemcsak más emlős fajok vagy egyedek, de a szervezet saját immunrendszere számára is. Így éppen az agyspecifikus komponensek azok, amelyek antigén-sajátságai révén immunológiai módszerekkel feltárhatók.

A más fajokban agyszövettel szemben termelt immunszérum természetesen tartalmaz a donor fajra jellemző és a különböző szervekben közös antigénekkal szemben is ellenanyag-aktivitást. A szérum specifikussá tehető a donor faj különböző szerveiből (vér, máj, lép, vese, ovárium stb.) készített kivonatokkal végzett abszorpciók sorozatával.

Az idegrendszeri kutatások számára különösen értékesek azok az ellenanyagok, amelyek ép idegszövetben az extracelluláris tér felől tudják megközelíteni a számukra specifikus antigéneket. Jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan adat, amely bizonyíthatná, hogy a 150 000—170 000 molekulásúlyú IgG molekula áthatolhatna ép neuron- vagy glia-membránon. Így az idegrendszer funkcionális neuro-immunológiai vizsgálatánál elsősorban olyan ellenanyagpopulációk használhatók fel, amelyek támadáspontja egy-egy sejtfelszíni, vagy sejtfelszín felől „természetes” úton megközelíthető antigén-determináns. Ilyen megfontolások alapján igyekeztünk olyan agyspecifikus immunszérumot nyerni, amely (az agyi szolubilis antigénnel történő kimerítés után) idegvégződések membrán-preparátumából nem-ionos detergenssel szolubilizálható antigénnel szemben mutatott aktivitást (OROSZ és mtsai 1971, 1974). Miután immunkémiai és biokémiai módszerekkel sikerült bizonyítani egy szinaptoszoma-specifikus antigén jelenlétét macska agykéregben, figyelmünk az antigén pontos helyének meghatározása felé fordult.

Az alkalmazott immunferritin eljárással (megfelelő kontrollrendszerek, és Fab<sub>2</sub> fragmentumok felhasználásával) a szinaptoszoma-specifikus antigént a posztzinaptikus membránhoz csatlakozó ún. szubszinaptikus hálózatban sikerült kimutatnunk.

A szinaptogenezis folyamataiban fontos szerepet játszó posztzinaptikus struktúrák (ADINOLFI 1972) antigenikus sajátága érdekes lehetőséget nyújthat a szinapszis-formálódással kapcsolatos vizsgálatok számára. A fejlődő pre- és posztzinaptikus terület egymást felismerő, feltételezett biokémiai kód-antikód rendszere (SYTKOWSKI és mtsai 1973) az idegi hálózat-alakulás alapvető kérdései közé tartozik. A posztzinaptikus antigén-determinánsokkal szemben termelt specifikus ellenanyagok értékes eszközként szolgálhatnak a posztzinapszis kialakulásának, működésének, és a szinaptogenezisben játszott szerepének vizsgálatában.

Köszönetet mondunk dr. Hámori Józsefnek (SOTE I. Anatómiai Tanszék) az elektronmikroszkópos vizsgálatokban nyújtott segítségéért, valamint dr. Czuppon Alfrédnek (MTA Kémiai Szerkezet Kutató Csoport), aki a szedimentációs analíziseket végezte.

#### IRODALOM

1. ADINOLFI, A. M.: Morphogenesis of synaptic junctions in layers I and II of the somatic sensory cortex *Exp. Neurol.* **34**, 372—382 (1972).
2. AKERT, K. és SANDRI, C.: Identification of active synaptic region by means of histochemical and freeze etching techniques In: „Excitatory synaptic mechanisms” ed.: Andersen, P., Jansen, J. K. S., Universitetsforlaget, Oslo; pp. 27. (1969).

3. BAUMSTARK, J. S., LAFFIN, R. J. és BARDAWILL, V. A.: A preparative method for the separation of 7S gammaglobulin from human sera. *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 514—522 (1964).
4. BRODY, T. M. és BAIN, J. A.: A mitochondrial preparation from mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **195**, 685—696 (1952).
5. DAY, E. D. és APPEL, S. H.: The biologic half-life of brain-localized antisynapse radio-antibodies. *J. Immunol.* **104**, 710—717 (1970).
6. DE ROBERIS, E., LAPETINA, E. G. és WALD, F.: The effect of antiserum against nerve ending membranes from cat cerebral cortex on the ultrastructure of isolated nerve ending and mollusc neurons. *Exp. Neurol.* **21**, 322—335 (1968).
7. GOODMAN, J. W. és GROSS, D.: Studies on fragments of rabbit gamma-globulin. *J. Immunol.* **90**, 865—71 (1963).
8. GORINI, G., MEDGYESI, G. H. és GORIA, G.: Heterogeneity of mouse myeloma gG globulins as revealed by enzymatic hydrolysis. *J. Immunol.* **103**, 1132—1136 (1970).
9. HERSCHMANN, H. R., COTMAN, C. és MATTHEWS, D. A.: Serologic specificities of brain subcellular organelles. I. Antisera to synaptosomal fractions. *J. Immunol.* **108**, 1362—1369 (1972).
10. JANKOVIC, B. P., RAKIC, L.J., VESKOV, R. és HORVÁT, J.: Effect of intraventricular injection of antibrain antibody on defensive conditioned reflexes. *Nature (London)* **218**, 270—271 (1968).
11. KORNGUTH, S. E., ANDERSEN, L. W. és SCOTT, G.: Isolation of synaptic complexes in a caesium chloride density gradient: electronmicroscopic and immunohistochemical studies. *J. Neurochem.* **16**, 1017—1024 (1969).
12. MACMILLAN, P. N., MICKEY, D. D., KAUFMANN, B. és DAY, E. D.: The specificity and cross reactivity of antimyelin antibodies as determined by sequential absorption analysis. *J. Immunol.* **107**, 1611—1617 (1971).
13. MACPHERSON, C. F. C. és CHINERMAN, J.: Effect of interventricular injections of brain iso-antibodies on learning. *Exp. Neurol.* **31**, 45—52 (1971).
14. MANDY, W. J., RIVERS, M. M. és NISONOFF, A.: Recombination of univalent subunits derived from rabbit antibody. *J. Biol. Chem.* **236**, 3221—6 (1961).
15. MICKEY, D. D., MACMILLAN, P. M., APPEL, S. H. és DAY, E. D.: Specificity and cross reactivity of antisynapse antibodies as determined by sequential absorption analysis. *J. Immunol.* **107**, 1599—1610 (1971).
16. NISONOFF, A., WISLER, F. C. és WOERNLEY, D. L.: Mechanism of formation of univalent fragments of rabbit antibody. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 318—322 (1959).
17. NISONOFF, A. és DIXON, D. J.: Evidence of linkage of univalent fragments and half-molecules of rabbit-globulin by the same disulfid bond. *Biochemistry* **3**, 1338—1342 (1964).
18. OROSZ, A., FALUS, A., GERGELY, J., MADARÁSZ E. és ÁDÁM, G.: Examination of antiserum specificity produced against homogenate of cat cerebral cortex. *Proc. Int. Un. Physiol. Sci.*, 25th Int. Congr., Munich p. 433 (1971).
19. OROSZ, A., HÁMORI, J., FALUS, A., MADARÁSZ, E., LAKOS, I. és ÁDÁM, G.: Specific antibody-fragments against the postsynaptic web. *Nature New Biol.* **245**, 18—19 (1973).
20. OROSZ, A., MADARÁSZ, E., FALUS, A. és ÁDÁM, G.: Demonstration of detergent-soluble antigen specific for the synaptosomal membrane fractions isolated from the cat cerebral cortex. *Brain Res.* **76**, 119—131 (1974).
21. RAITERI, M., BERTOLLINI, A. és LABELLA, R.: Synaptosome antisera effect permeability of synaptosomal membranes in vitro. *Nature New Biol.* **238**, 242—243 (1972).
22. SHEK, R. P. N. és MACPHERSON, C. F. C.: Immune response of rats to subcellular fractions of isologous brain and liver. *Immunology* **21**, 333—341 (1971).
23. SINGER, S. J. és SCHICK, A. F.: The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 519—523 (1961).
24. SRI RAM, J., TAWDE, S. S., PIERCE, D. B. és MIDGLEY, A. R.: Preparation of antibody-ferritin conjugates for immune-electronmicroscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 673—675 (1963).
25. SYTKOWSKI, A. J., VOGEL, Z. és NIRENBERG, M. W.: Development of acetylcholine receptor clusters on cultured muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 270—274 (1973).
26. UTSUMI, S. és KARUCH, F.: Peptic fragmentation of rabbit gG-immunoglobulin. *Biochemistry* **4**, 1766—1779 (1965).
27. WALD, F., MAZZUCHELLI, A. N., LAPETINA, E. G. és DE ROBERTIS, E.: The effect of antiserum against nerve ending membranes from cat cerebral cortex bioelectrical activity of mollusc neurons. *Exp. Neurol.* **21**, 336—345 (1968).