

A SZINAPSZIS VIZSGÁLATA IMMUNO-KÉMIAI ÉS CITOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

OROSZ ANTAL

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Összehasonlító Élettani Tanszék, Budapest

A sejt, mint alapegység, illetve a több-kevesebb sejtből álló *in vitro* rendszerek sejtjei közötti kölcsönhatások vizsgálata a neurobiológiában újabban fokozottan előtérbe került. Ezekben a kutatásokban is egyre erősödő tendencia a legkülönbözőbb tudományágak együttműködése valamely probléma megoldására, vagyis az interdiszciplináris szemlélet meghonosodása mind elméleti, mind metodikai téren. Ezek az irányzatok a szinapszis és a szinaptogenetikus folyamatok kutatásába is bevonultak és új kérdésfeltevéseket, valamint ennek megfelelő friss, modern szemléletet hoztak létre.

Az elmúlt néhány évben több közlemény jelent meg, melyekben arról számoltak be, hogy disszociált idegsejtek egyes típusait glia- és egyéb kísérősejtektől mentesen *in vitro* tenyésztették [8, 9, 10, 11, 12, 22, 43, 44 etc.]. Ezzel lényegében megszűnt az eddigi, inkább csak teoretikus aggály, hogy az idegsejtek glia- és más kísérő-sejtmentes környezetben nem differenciálódnak, ill., hogy *in vitro* nem lehet őket tenyészteni (összefoglalóan: WATSON 1974). Ezek az újabb eredmények, valamint a modern sejtbiológia más területein tapasztalható robbanásszerű fejlődés ma már szükségszerűen tesz fel olyan kérdéseket: hogyan és milyen mechanizmusok révén képes néhány disszociált sejtől álló kiindulási *in vitro* idegsejtpopuláció egy szinaptikusan összekapcsolt hálózati rendszerbe reorganizálni önmagát glia- és más kísérő-sejtmentes környezetben.

Nyilvánvaló, hogy még az ilyen kevés tagszámú neuronhálózatok organizációs folyamatai is annyira bonyolultak, hogy azokat először le kell bontani a különböző alegységek vizsgálatára, valamint az apróbb alap- és részfolyamatok elemzésére. Az egyes idegsejtek endogén tulajdonságainak felmérését, a szinaptikus kapcsolatok kialakításában és más kontakt jelenségekben részt vevő sejtmembrán-területek, valamint az ezekhez kapcsolódó citoplazmatikus komplex struktúrák és működések vizsgálatát még a kapcsolatok kialakulása előtt kell elvégezni. Ennek során, de a neurogenesis későbbi szakaszainak vizsgálatakor is fel kell használni a modern sejtbiológiának a különböző tudományterületeken alkalmazott új módszereit (pl. a citogenetikából ismert sejt-hibridizációs módszert stb.), információit és kutatási szisztémáját [4, 14, 15, 17, 35 etc.]. Így tanulmányozni kell az idegsejtek lokomociós jelenségeit,

melyek a szinaptikus kapcsolatokat hordozó különböző méretű neuronális nyúlványok kialakulásához vezetnek. Fontos megismerni a sejtváándorlások során megvalósuló kontakt-jelenségeket és sejt-indukciós reakciókat, valamint ezekben a kölcsönhatásokban és a „stabil” szinaptikus kapcsolatok kialakításában szerepet játszó sejt felszíni és membrán alatti komponenseket stb.

A celluláris és a molekuláris immunológia legújabb eredményei több meghökkentő analógiát tártak elénk bizonyos neurobiológiai és immunológiai folyamatok között, melyek értékes adatokat nyújthatnak egyes sejt felismerési jelenségek elemzésére a neuronális hálózatok kialakulását vizsgáló kutatásokban [6]. A különböző idegrendszeri specifikus antigénnel szemben termelt ellenanyag-populációk pedig analitikai eszközként használhatók fel egyes idegi folyamatok, illetve struktúrák molekuláris biológiai vizsgálatában.

Az utóbbi években munkatársaimmal együtt Tanszékünkön a fenti kérdésfeltevések és újabb irodalmi eredmények szellemében kialakítottunk egy molekuláris neurobiológiai és immunológiai laboratóriumi bázist és ezen alapuló kutatási irányt [27–33], majd következő lépésként az elmúlt esztendőben (Cambridge-ben a Molekuláris Biológiai Intézet Sejtbiológiai Osztályán tett tanulmányutam tapasztalatai alapján) disszociált idegsejtek individuális osztályainak szeparálását és *in vitro* tenyésztését kezdtük el. A következőkben ezeknek a vizsgálatoknak egyes részleteiről számolunk be.

Az egyszerű neuron-hálózatok *in vitro* formálódásával kapcsolatos jelenségek elemzése, során fontos megvizsgálni, hogy az adott neuron mely tulajdonságai endogén, vagyis genetikai program által megszabottak és mik azok, melyek más sejtekkel kialakított induktív kölcsönhatások eredményeként jönnek létre. Természetesen a sejt-kölcsönhatások által kialakított tulajdonságok variációinak spektruma is indirekt úton a genetikai kód által megszabott, de éppen e spektrum kiterjedését meghatározó alapvető térbeli és időbeli tulajdonság-eloszlásokra vonatkozóan kapunk felvilágosításokat, ha első lépésben a vizsgálandó idegsejt-hálózat egyes tagjainak individuális fejlődési és növekedési jelenségeit külön-külön megvizsgáljuk.

Döntő jelentőségű a kísérleti modell megválasztása, ahol a hálózati sejtek és kapcsolataik megfelelően tanulmányozhatók. Kísérleteinkben patkány kisagykérgi Purkinje-neuronokat és ezek kapcsolatrendszerét használtuk fel. Ennek előnyei a következők: *a)* emlősökben a kisagykéreg mindössze öt sejttypusból álló szimmetrikus geometriai felépítésű sejt-hálózat, melynek sejtjei ismert idő- és térbeli rendben egy jól körülhatárolt területen sorozatosan lépnek egymással kontaktusba. *b)* e sejt-hálózat kialakulása több rágesáló fajban normálisan jórészt a posztnatális korban zajlik le, így a fejlődés egyes lépései technikailag is könnyebben hozzáférhetők. *c)* nagy előny, hogy a Purkinje-neuronok jellegzetes dendritikus morfológiájuk és nagy átmérőjük miatt még fáziskontraszt-mikroszkóp alatt is viszonylag könnyen azonosíthatók, más sejtekkel nem téveszthetők össze.

SIDMAN [39] szerint az idegrendszeri sejt diszociátumok tenyésztéseiben végzett szinaptogenetikai vizsgálatok során nyert igen változatos eredmények oka az, hogy eddig nem fordítottak figyelmet a kiindulási sejtszuspenziók összetételének standardizálására. A kiindulási sejtszuspenziók szeparációs technikájában csak legújabban kezdtek alkalmazni olyan módszereket, melyek segítségével adott sejt típusok standardizált individuális osztályaiból tudunk kiindulni [3, 26], hogy azután az *in vitro* kultúrákban előre megtervezett mennyiségi és minőségi arányban mesterségesen rekombináljuk őket. E cél elérésére saját kezdeti kísérleteinkben először a kiválasztott sejt típusok (Purkinje-neuron, granuloblast és egyes nyúltvelői idegsejtek) dúsított frakcióit állítottuk elő. Ezeket 5 és 10 napos patkányok kisagykérgéből és nyúltvelőjéből származó szövetmintákból SELINGER és mtsai [38], valamint MILLER és PHILIPS [24] módszereinek COHEN és mtsai [13] által módosított eljárása szerint szeparáltuk. Ennek során RUBIN [36], KRAEMER [21] és mások adatai alapján az enzimatis eljárással helyett a mechanikus diszociációt részesítettük előnyben, mivel további kísérleteinkben érzékeny sejt felszíni kontakt jelenségek vizsgálatát tervezzük. Az aggregátumok kialakulásának megakadályozására a sejtszeparáció minden lépésben a sejteket örvénylő keveréssel diszpergáltuk.

A sejt mintákat, melyeket kihelyezés előtt nagymértékben hígítottunk, Falcon-csészéken készített nyíláson rögzített, kollagénnel fedett üveglemezeken BRAY [8] módszere szerint tenyésztettük, hogy a vizsgált tenésztériódusban individuális sejteket, majd ezek egyszerű kölcsönhatásait tudjuk megfigyelni. Ennek ellenére a sejtek egy része az első két nap alatt csomókká aggregált és csak a harmadik napon tapadtak a kollagén felülethez. Eközben az aggregálódott csomókban a nem-neuronális sejtek gyorsan elszaporodtak, majd további növekedésük révén egy-, majd többrétegű sejt masszát alakítottak ki.

Célkitűzéseinknek megfelelően csak az egyedülálló sejtek növekedését kísértük folyamatosan figyelemmel. Az 1., 2. és 3. ábrákon 5 napos patkányokból származó Purkinje-sejtek, illetve a nucleus olivaris inferior-ból szeparált nagy: 13–30 mikron átmérőjű idegsejtek [7, 37] 4–5 napos *in vitro* fejlődésének egyes szakaszait láthatjuk. A sejtek a kihelyezés után 24–28 óra múlva kezdtek csak nyúlványokat fejleszteni, ezután a nyúlványnövekedés felgyorsult és két-három nap alatt a Purkinje-neuronok egyik pólusán nagyjából egyforma hosszúságú random elágazódású, nagyszámú dendritnyúlvány fejlődött ki [20]. Ebben a tenésztériódusban figyeltük meg egy-két esetben axon-szerű hosszabb nyúlvánnyal rendelkező Purkinje-neuronokat is. A feltételezhetően n. olivaris inferior-ból származó sejteknél az előbbihez hasonlóan kezdetben nagyszámú, kb. azonos hosszúságú nyúlvány jelent meg. A granuloblastok felismerése a sejt alakja és átmérője alapján nem lehetséges, bár az első 3–4 napban több, a kis átmérőjű orsó alakú sejttest két végéből kiinduló nyúlvánnyal rendelkező sejtet figyeltünk meg, melyek az 5. nap után eltűntek.

Az 5—8. nap között az idegsejtek nyúlványainak száma csökkent, különösen a Purkinje-sejteknél (4. ábra). A 8—10. nap után a neuronális elemek fokozatos pusztulása indult meg, bár számos idegsejt több mint egy hónap múlva is életben maradt. Ezek vizsgálatát, valamint az ilyen neuronok között kialakuló kapcsolatok tanulmányozását a későbbiekben tervezzük. A 10 napos életkorú patkányokból származó Purkinje-neuronok és a n. olivaris inferior-idegsejtek egyik pólusán a 3. tenyésztési napon rövid, sörteszerű nyúlványok jelentek meg, melyek nem növekedtek tovább és a sejtek az 5—10. nap után lassan eltűntek.

A kísérletek következő részében a Purkinje-neuronok és a feltételezhetően n. olivaris inferior eredetű idegsejtek mesterséges rekombinációit tanulmányoztuk *in vitro*. Az 5. ábrán ugyanannak a szakasznak fáziskontraszt-fénymikroszkópos, valamint scanning elektronmikroszkópos képét látjuk, amikor 5 napos életkorú patkányokból származó, s már nyúlványnövekedést mutató kétnapos tenyészidejű Purkinje-neuron és n. olivaris inferior-idegsejt kapcsolatát mesterségesen hoztuk létre. A két sejt között a Purkinje-neuron szomáján előzetesen kialakított kontaktus induktív hatására a sejttest másik részén a nyílhegyekkel jelzett helyeken órák alatt periszomatikus nyúlványok nőttek ki. Ezek transzmissziós elektronmikroszkópos képe látható a 6. ábrán: közvetlenül a nyúlvány létrejötte után (6/C ábra) és két órával később (6/D ábra). Szembetűnő a jellegzetes rácsos mikrofilamentum rendszer és mikrovezikulumok jelenléte a nyúlványokban, később filopodiumok kialakulása [11, 42]. A 6/B ábrán szomatikus sejt-sejt kontaktus transzmissziós elektronmikroszkópos képe látható, ahol a Purkinje-sejt membránján az érintkezési felületen enyhe membrán-megvastagodás is megfigyelhető.

A periszomatikus nyúlványok, ha az induktív szomatikus kapcsolat fennmaradt, még napokig változatlan nagyságban megfigyelhetők voltak, viszont a kontaktus megszakadása után órák alatt eltűntek. Ezek nem fejlődtek ki, ha a n. olivaris inferior-sejt a Purkinje-sejt növekedésben levő dendritágaival létesített kapcsolatot, vagy ha a Purkinje-neuron *in vitro* fejlődése elérte az 5. tenyésznapot. Mindez azt mutatja, hogy a folyamat a Purkinje-sejten belül locus-specifikus, a neuron fejlődésében pedig idő-specifikus. Nem csak n. olivaris inferior-sejtek, hanem bármely más sejt (granuloblaszt?, glialelemek) a Purkinje-neuron említett fejlődési periódusában a szomatikus kontaktus kialakítása után hasonló nyúlványképzést indukált. Ez ALTMAN és ANDERSON [2], valamint mások adatait figyelembe véve arra mutat, hogy az *in vitro* fejlődő és sejtkapcsolataitól megfosztott Purkinje-neuron adott fejlődési periódusban rendkívüli affinitást mutat más sejtekkel való kapcsolatfelvételre, mivel az endogén (genetikai) folyamatok révén kialakított sejt felszíni receptív mezői, ha specifikus sejtek (n. olivaris inferior-sejt) nem állnak rendelkezésére, más sejtekkel is kapcsolatba lépnek és ez induktív folyamatok révén, ugyanazon genetikai program szerint periszomatikus nyúlványképzéshez vezet.

Az irodalomban különböző módszerekkel végzett kísérletek alapján a posztszinaptikus receptív areák és különböző posztszinaptikus képletek fontos szerepét a szinaptogenezisben már több szerző [1, 18, 19, 25] hangsúlyozta. NIRENBERG és mtsai [40] pedig sejttényezetekben az előzetesen diffúz eloszlású posztszinaptikus molekuláris elemek foltokba való csoportosulását figyelték meg, már jóval az axonális végződés megjelenése előtt. Kifejtik, hogy ezek a sejt felszínen található és a receptor-struktúrákkal összefüggésben levő molekuláris komponensek egy szinaptikus felismerő kódrendszert alkotnak, mely a közeledő axonvégzések közül a komplementer struktúrát felismeri.

Rendkívül érdekes, hogy a celluláris immunológia újabb eredményei között is ismertek hasonló jelenségek, ugyanis *in vitro* kultúrákban az ún. „B” limfociták felszínén található (immunoglobulin) receptor-molekulák külső inductív hatásokra foltokba vagy a sejt egyik pólusának felszínén „sapkát” képezve csoportosulnak. A sejtnek ez a pólusa megnyúlva alkotja az uropodot, mely más limfocitákkal kapcsolatot vehet fel [41]. E folyamatokban, és az idegsejtek nyúlványképzésében egyaránt részt vesz az aktin-szerű tulajdonságokkal rendelkező mikrofilamentum-rendszer, továbbá az idegsejtek filopódiumképződését gátló cytochalasin-B a limfociták „sapka”-képződését is gátolja [41, 42].

Az irodalmi adatok és az új metodikai lehetőségek tükrében fokozott jelentőségűek neuro-immunológiai vizsgálataink, melyek során felnőtt macska agykérgéből készített preparátummal nyulakat immunizálva olyan immunszérumot nyertünk, amely különböző kimerítési eljárások után egy agykérgi nyers partikula-frakcióval reagált. Különböző macskaszerv-extraktumok, valamint az agykérgi partikula-frakciók részletes vizsgálata után kiderült, hogy a detergens-oldékony antigén a szinaptoszomális plazmamembrán-frakcióban található [33] (7. ábra).

Az antigén szinaptoszomális topológiájának meghatározására a specifikus immunszérumból szeparáltuk a reagáló immunoglobulin molekula-populációt, majd ebből a molekula azon polipeptid-lánc részeit, az ún. F(ab)₂-fragmentumot, mely az antigén specifikus kötéséért felelős. Ezt ferritinnel konjugálva immunelektronmikroszkópos módszerrel sikerült kimutatni, hogy a detergensoldékony szinaptoszoma-membrán specifikus antigén a posztszinaptikus membránhoz csatlakozó ún. szubszinaptikus hálózatban [31] található (8. ábra).

Az antigén kémiai természetének felderítésére megvizsgáltuk a szinaptoszomális membrán szolubilizációját növekvő detergens koncentrációk mellett, és a protein- és szénhidrátoldékonyság maximumánál találtuk meg a legmagasabb antigénaktivitást is, ahol elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint az érintkező membrán-területek kivételével (9 ábra) a szinaptikus plazmamembrán teljesen feloldódott. Ezek az eredmények az irodalmi adatokkal [16] egybevetve arra mutatnak, hogy az antigén feltehetően egy membrán glükoprotein-komponens.

A BENNETT által már 1963-ban [5] leírt és általa „glycocalyx”-nak nevezett: az emlős állatok sejtmembránjainak külső felszínén található poliszaharidok ultrastrukturális sajátosságairól legutóbb PARSONS és SUBJECK [34] közöltek összefoglaló közleményt. Ezen kémiaiilag a glükó-proteinek és -lipidek, valamint „proteoglycan”-ok körébe sorolható makromolekulák funkcionális jelentőségének feltárása a modern sejtbiológiai kutatások homlokterében áll [21]. Az irodalmi adatok és az előzőekben ismertetett kísérleti eredményeink alapján ezért az utóbbi két évben a szinaptikus membránhoz kötött szénhidrátok biokémiai és immunológiai sajátosságainak intenzív vizsgálatát kezdtük meg. Érdeklődésünk elsősorban glükoproteinek felé fordult: módszert állítottunk be [23] a szinaptikus érintkező membránterület (junkcionális komplex) szolubilizálására és az így nyert glükoproteineket biokémiaiilag jellemeztük, majd nyulakat immunizálva velük sikerült ellenük specifikus immun-szérumot nyerni.

A továbbiakban az itt közölt kezdeti kísérleteinket folytatva, a sejtfelismerési folyamatokban fontos szerepet játszó sejt felszíni (pl. posztszinaptikus) glükoproteinekkal szemben nyert immunoglobulinokat kevés tagszámú in vitro idegsejt-populációk hálózati organizálódásának sejt- és molekuláris szinten történő tanulmányozására akarjuk felhasználni. Egyidejűleg az idegsejt-hálózati kapcsolatok tér- és időbeli variációit mikroelektrofiziológiai módszerekkel fogjuk vizsgálni és a működési paramétereket számítógép segítségével elemezni. A nyert adatokból computer-programokat készítve különböző 2-, ill. 3-dimenziós kevés tagszámú neuronhálózati eloszlásokat szeretnénk szimulálni, melyek közül a lehetséges konfigurációkat megpróbáljuk in vitro is előállítani.

IRODALOM

1. ADINOLFI, A. M.: The organisation of paramembraneous densities during postnatal maturation of synaptic junctions in the cerebral cortex. *Exp. Neurol.* **34**, 383–393 (1972).
2. ALTMAN, J. and W. J. ANDERSON: Experimental reorganisation of the cerebellar cortex II. Effects of elimination of most microneurons with prolonged X-radiation started at four days. *J. Comp. Neurol.* **149**, 123–152 (1973).
3. BARKLEY, D. S., L. L. RAKIC, J. K. CHAFFEE and D. L. WONL: Cell separation by velocity sedimentation of postnatal mouse cerebellum. *J. Cell Physiol.* **81**, 271–280 (1973).
4. BENNETT, D., E. A. BOYSE and L. J. OLD: Cell surface immunogenetics in the study of morphogenesis. In: *Cell interactions, Third Lepetit Colloquium*, Ed: L. G. Silvestri, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam p. 247–263 (1971).
5. BENNETT, H. S.: Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 14–23 (1963).
6. BLOOM, F. E. and R. SIDMAN: Some implications for neurobiology. In: *Neurosciences Res. Prog. Bull.* **11**, 138–140 (1973).
7. BOWMAN, M. H. and J. S. KING: The Conformation, Cytology and Synaptology of the Opossum Inferior Olivary nucleus. *J. Comp. Neurol.* **148**, (1973).
8. BRAY, D.: Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* **56**, 702–712 (1973).
9. BRAY, D.: Surface movements during the growth of single explanted neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **65**, 905–910 (1970).
10. BUNGE, R. P.: Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* **56**, 713–735 (1973).

11. BUNGE, R. P., R. REES, P. WOOD, H. BURTON, C. P. KO: Anatomical and physiological observations on synapses formed on isolated autonomic neurons in tissue culture. *Brain Res.* **66**, 401–412 (1974).
12. CHEN, J. S., R. LEVI-MONTALCINI: Axonal growth from insect neurons in glia-free cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **66**, 32–39 (1970).
13. COHEN, J., V. MARES and Z. LODIN: DNA content of purified preparations of mouse Purkinje neurons isolated by a velocity sedimentation technique. *J. Neurochem.* **20**, 651–657 (1973).
14. DUNN, G.: Extension of nerve fibres, their mutual interaction and direction of growth in tissue culture. In: *Locomotion of tissue cells, CIBA Found. Symp. 14.*, Elsevier, Excerpta Med., North-Holland Publ. Comp., Amsterdam p. 211–223 (1973).
15. FISCHBACK, D. G.: Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures. *Develop. Biol.* **28**, 407–429 (1972).
16. GOMBOS, G., I. G. MORGAN, T. V. WAEHNELDT, G. VINCENCON and W. C. BRECKENRIDGE: Glycoproteins of the synaptosomal plasma membrane. In: *Glycolipids, glycoproteins and mucopolysaccharides in the nervous system.* Eds: V. Zambotti, G. Tettamonti and M. Arrigoni, Plenum Press, New York p. 101–118 (1972).
17. GOODENOUGH, D. A. and N. B. GILULA: Cell junctions and intercellular communication. In: *Membranes and viruses in immunopathology.* Ed: S. B. Day and R. A. Good, Acad. Press, New York p. 155–168 (1972).
18. HÁMORI, J.: Developmental morphology of dendritic postsynaptic specializations. In: *Recent development of Neurobiology in Hungary, Vol. 4.* Ed: K. Lissák, Akadémiai Kiadó, Budapest pp. 9–32 (1973a).
19. HÁMORI, J.: The inductive role of presynaptic axons in the development of postsynaptic spines. *Brain Res.* **62**, 337–344 (1973b).
20. HOLLINGWORTH, T., M. BERRY, E. M. ANDERSON and R. FLINN: Network analysis of dendritic fields. Cit: D. Bray: Branching patterns of individual sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* **56**, 702–712 (1973).
21. KRAEMER, P. M.: Complex carbohydrates of animal cells: biochemistry and physiology of the cell periphery. In: *Biomembranes, Vol. 1.*, Ed: L. A. Manson, Plenum Press, New York p. 67–190 (1971).
22. LODIN, Z., J. BOOHER, F. K. KASTEN: Long-term cultivation of dissociated neurons from embryonic chick dorsal root ganglia in the Rose chamber. *Exp. Cell Res.* **59**, 291–298 (1970).
23. MARCHESI, V. T. and ANDREWS, E. P.: Glycoproteins: isolation from cell membranes with lithium diodosalicylate. *Science* **174**, 1247–1248 (1971).
24. MILLER, R. G. and R. A. PHILLIPS: Separation of cells by velocity sedimentation. *J. Cell. Physiol.* **73**, 191–202 (1969).
25. MUGNIANI, E.: Neurons as synaptic targets. In: *Excitatory Synaptic Mechanisms*, Eds: P. Andersen and J. K. S. Jansen, Universitetsforlaget, Oslo pp. 149–169 (1970).
26. OKUN, L. M.: Isolated dorsal root ganglion neurons in culture: Cytological maturation and extension of electrically active processes. *J. Neurobiol.* **3**, 111–151 (1972).
27. OROSZ, A., D. BRAY and G. HORN: Fejlődő patkányok kisagyi Purkinje-neuronjainak, valamint egyes nyúltvelői idegsejtjeinek szeparálása és tenyésztése. *MÉT 40. Vándor-gyűlése, Előadáskivonatok*, A. 39 (1974).
28. OROSZ, A., A. FALUS, J. GERGELY, E. MADARÁSZ and G. ÁDÁM: Examination of antiserum specificity produced against homogenate of cat cerebral cortex. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.*, 25th Int. Congr., Munich 433 (1971).
29. OROSZ, A., A. FALUS, E. MADARÁSZ, J. GERGELY, G. ÁDÁM: A brain-specific water-soluble antigen in homogenates of cat cerebral cortex. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 319–326 (1974).
30. OROSZ, A., A. FAZEKAS, G. SZENTPÉTERI: Immunofluorescent studies in myasthenia gravis: antineuronal activity of the sera. In: *Structure and function of normal and diseased muscle and peripheral nerve*, Eds: I. Hausmanova-Petrusewicz and H. Jędrzejowska, Polish Med. Publ., Warsaw p. 243–248 (1974).
31. OROSZ, A., J. HÁMORI, A. FALUS, E. MADARÁSZ, I. LAKOS and G. ÁDÁM: Specific antibody fragments against the postsynaptic web. *Nature New Biol.* **245**, 18–19 (1973).
32. OROSZ, A., J. KOVÁCS, E. MADARÁSZ, A. FALUS, G. ÁDÁM: Studies on the synaptosomal fractions of cat cerebral cortex after hypoosmotic and detergent treatment. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* (in press) (1975).
33. OROSZ, A., E. MADARÁSZ, A. FALUS and G. ÁDÁM: Demonstration of detergent-soluble antigen specific for the synaptosomal membrane fraction isolated from the cat cerebral cortex. *Brain Res.* **76**, 119–131 (1974).

34. PARSONS, D. F., J. R. SUBJECK: The morphology of the polysaccharide coat of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 85–113 (1972).
35. PEACOCK, J. H., F. A. MCMORRIS and P. G. NELSON: Electrical excitability and P. G. NELSON: Electrical excitability and chemosensitivity of mouse neuroblastoma X mouse or human fibroblast hybrids. *Exp. Cell Res.* **79**, 199–212 (1973).
36. RUBIN, H.: The behaviour of normal and malignant cells in tissue culture. In: The specificity of cell surfaces, Eds: B. D. Davis and C. Warren, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J. p. 181–194 (1967).
37. SCHILD, R. F.: On the inferior olive of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* **140**, 255–260 (1970).
38. SELLINGER, O. Z., J. M. AZCURRA, D. E. JOHNSON, W. G. OHLSSON, Z. LODIN: Independence of protein synthesis and drug uptake in nerve cell bodies and glial cells isolated by a new technique. *Nature, New Biol.* **230**, 253–256 (1971).
39. SIDMAN, R. L.: Cell-cell recognition in the developing central nervous system. In: The Neuro-sci. Third Study Prog., Eds: F. O. Schmitt and F. G. Worden, MIT Press, Cambridge, Massachusetts and London, p. 743–758 (1974).
40. SYTKOWSKI, A. J., Z. VOGEL and M. W. NIRENBERG: Development of acetylcholine receptor clusters on cultured muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 270–274 (1973).
41. TAYLOR, R. B., W. P. H. DUFFUS, M. C. RAFF and S. DEPETRIS: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by antiimmunoglobulin antibody. *Nature, New Biol.* **233**, 225–229 (1971).
42. YAMADA, K. M., B. S. SPOONER and N. K. WESSELS: Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J. Cell Biol.* **49**, 614–635 (1971).
43. VARON, S. and C. W. RAIBORN JR.: Dissociation, fractionation and culture of embryonic brain cells. *Brain Res.* **12**, 180–199 (1969).
44. WATSON, W. E.: Physiology of neuroglia. *Physiol. Rev.* **54**, 245–271 (1974).