

Received: 2012.03.02  
Accepted: 2012.09.06  
Published: 2012.11.29

## Rola proteolizy zewnątrzkomórkowej w plastyczności synaptycznej ośrodkowego układu nerwowego

### The role of extracellular proteolysis in synaptic plasticity of the central nervous system

Klaudia Ziemiańska<sup>1</sup>, Anna Konopka<sup>2</sup>, Grzegorz M. Wilczyński<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk w Warszawie

#### Streszczenie

W centralnym układzie nerwowym macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix - ECM) ma swoistą strukturę i skład białkowy. Dziś już wiadomo, że ECM nie tylko stanowi środowisko dla zanurzonych w niej komórek nerwowych i glejowych, ale także aktywnie modyfikuje ich funkcje. Ostatnie dwie dekady przyniosły wiele dowodów świadczących o istotnej roli proteolizy ECM w procesach plastyczności synaptycznej mózgu. Jak dotąd najwięcej danych zgromadzono o dwóch rodzinach proteaz: serynowych oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Przedstawicielki obu grup są umiejscowione w obrębie synaps oraz wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w mechanizmie zależnym od aktywności neuronów, gdzie dokonują przebudowy lokalnego środowiska, a także zmieniają strukturę i funkcję synaps. Strukturalne zmiany wywołane przez proteazy dotyczą kształtu, wielkości i liczby istniejących synaps, a także powstawania nowych połączeń synaptycznych. Natomiast zmiany czynnościowe to m.in. modyfikowanie czynności receptorów w części postsynaptycznej, a także wzmocnienie lub osłabienie wydzielania neuroprzekaźnika w części presynaptycznej. Niniejsze opracowanie podsumowuje dotychczas zgromadzoną wiedzę na temat roli proteolizy zewnątrzkomórkowej w zjawisku plastyczności zarówno fizjologicznej, leżącej u podstaw uczenia się i pamięci, jak i patologicznej, jak to się dzieje podczas epileptogenezy lub rozwijania się uzależnienia od substancji psychoaktywnych.

#### Słowa kluczowe:

synapsa • macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) • plastyczność synaptyczna • proteazy serynowe • tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) • neuropsyna • trombina • metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej • MMP-2 • MMP-3 • MMP-7 • MMP-9 • MT5-MMP

#### Summary

The extracellular matrix (ECM) of the central nervous system has a specific structure and protein composition that are different from those in other organs. Today we know that the ECM not only provides physical scaffolding for the neurons and glia, but also actively modifies their functions. Over the last two decades, a growing body of research evidence has been collected, suggesting an important role of ECM proteolysis in synaptic plasticity of the brain. So far the majority of data concern two large families of proteases: the serine proteases and the matrix metalloproteinases. The members of these families are localized at the synapses, and are secreted into the extracellular space in an activity-dependent manner. The proteases remodel the local environment as well as influencing synapse structure and function. The structural modifications induced by proteases include shape and size changes, as well as synapse elimination, and synaptogenesis. The functional changes include modifications of receptor function in the postsynaptic part

of the synapse, as well as the potentiation or depression of neurotransmitter secretion by the pre-synaptic site. The present review summarizes the current view on the role of extracellular proteolysis in the physiological synaptic plasticity underlying the phenomena of learning and memory, as well as in the pathological plasticity occurring during epileptogenesis or development of drug addiction.

**Key words:** synapse • extracellular matrix (ECM) • synaptic plasticity • serine proteases • tissue plasminogen activator • neuropsin • thrombin • matrix metalloproteinases • MMP-2 • MMP-3 • MMP-7 • MMP-9 • MT5-MMP

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1021851>

**Word count:** 6296

**Tables:** 4

**Figures:** 4

**References:** 190

**Adres autora:** dr hab. Grzegorz M. Wilczyński, Pracownia Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk, ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: g.wilczynski@nencki.gov.pl

**Wykaz skrótów:** **ABP** – białko wiążące receptor AMPA (AMPA receptor binding protein); **ADAMs** – admalizyny (a disintegrin and metalloproteinases); **ADMATS** – białka ADAM z motywem trombospondyny (ADAM proteases with thrombospondin motifs); **AMPA** – kwas  $\alpha$ -amino 3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole propionic acid); **BDNF** – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (brain-derived neurotrophic factor); **proBDNF** – prekursorowe BDNF (precursor BDNF); **mBDNF** – dojrzała postać BDNF (mature BDNF); **CA1, CA2, CA3** – regiony hipokampa (dawna nazwa: róg Amona, cornu Ammonis); **CaMKII** – kinaza typu II zależna od wapnia i kalmuliny (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II); **CAM** – cząsteczka adhezji komórkowej (cell adhesion molecule); **CD** – kompleks różnicowania (cluster of differentiation); **CNS** – centralny układ nerwowy (central nervous system); **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix); **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **GABA** – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy ( $\gamma$ -aminobutyric acid); **GluR1** – podjednostka 1 receptora glutaminergicznego (glutamate receptor subunit 1); **ICAM** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej (intracellular cell adhesion molecule); **LTD** – długotrwałe osłabienie synaptyczne (long-term depression); **LTP** – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (long-term potentiation); **E-LTP** – faza wczesna LTP (early LTP); **L-LTP** – faza późna LTP (late LTP); **MFP** – szlak włókien mszystych (mossy fiber pathway); **MMP** – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinase); **MT-MMP** – typ błonowy metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (membrane type matrix metalloproteinase); **MUG I** – murinoglobulina I (murinoglobulin I); **NCAM** – neuronalna cząsteczka adhezyjna (neural cell adhesion molecule); **NGF** – czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor); **proNGF** – prekursorowe NGF (precursor NGF); **mNGF** – dojrzała forma NGF (mature NGF); **NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy (N-methyl-D-asparagine acid); **nNOS** – neuronalna syntaza tlenku azotu (neuronal nitric oxide synthase); **NR1, 2A, 2B** – podjednostki receptora NMDA (NMDA receptor); **PAI** – inhibitor aktywatora plazminogenu (plasminogen activator inhibitor); **PAR1** – receptor aktywowany proteinazą 1 (proteinase-activated receptor 1); **PKA** – kinaza białkowa A (protein kinase A); **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C); **PN-1** – proteazowa neksyna 1 (protease nexin-1); **PSD** – zagęszczenie postsynaptyczne (postsynaptic density); **PTZ** – pentylenetetrazol (pentylenetetrazol); **RTP beta (PTP zeta)** – receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej beta (receptor-type protein tyrosine phosphatase beta); **SPI3** – inhibitor proteaz serynowych 3 (serine protease inhibitor 3); **TIMP** – inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (tissue inhibitor of metalloproteinases); **tPA** – tkankowy aktywator plazminogenu (tissue plasminogen activator); **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinase-type plasminogen activator).

## BUDOWA I FUNKCJE SYNAPSY

Synapsy są wyspecjalizowanymi strukturami błonowymi, za pomocą których komórki nerwowe łączą się ze sobą oraz z komórkami pobudliwymi innych typów. Główną rolę w przetwarzaniu informacji pełnią synapsy chemiczne, w których sygnał przekazywany jest za pośrednictwem neuroprzekaźnika z części presynaptycznej, poprzez szczelinę synaptyczną, do części postsynaptycznej [182]. Wśród większości synaps domena presynaptyczną przeważnie jest zakończenie aksonu, wypełnione pęcherzykami zawierającymi neuroprzekaźnik. W ośrodkowym układzie nerwowym część postsynaptyczna jest związana najczęściej z dendrytem, rzadziej z ciałem komórki nerwowej, wyjątkowo z aksonem. W korze nowej i formacji hipokampa większość synaps aksono-dendrytycznych jest umiejscowiona na powierzchni drobnych wypustek pnia dendrytu (o długości do 2  $\mu\text{m}$ ) zwanych kolcami dendrytycznymi [122,141]. Ze względu na małe rozmiary i ogromną liczebność, kolce co najmniej dwukrotnie zwiększają gęstość połączeń synaptycznych w tkance nerwowej [17,100,122]. W obrazie ultrastrukturalnym, synapsy występujące na kolcach charakteryzują się obecnością zagęszczenia postsynaptycznego (postsynaptic density – PSD), czyli pasma gęstego elektronowo amorficznego materiału przylegającego do błony postsynaptycznej od strony wnętrza komórki. PSD zawiera białka łączące błonę komórkową z cytoszkieletem, a także wiele białek związanych z receptorami błony postsynaptycznej, biorących udział w przekazywaniu sygnałów [15,17]. Obecność wyraźnego PSD określa przynależność synapsy do kategorii synaps asymetrycznych (typ I wg Graya). Obecnie wiadomo, że synapsy asymetryczne są synapsami pobudzającymi, w których rolę neuroprzekaźnika pełni glutaminian, wiążąc się z postsynaptycznymi receptorami jonotropowymi (typu NMDA, AMPA i kaininowymi) i/lub z receptorem metabotropowym. Ocenia się, że ponad 90% wszystkich synaps pobudzających w mózgu występuje na kolcach dendrytycznych [100,122]. Drugą grupą synaps są synapsy symetryczne, niemające zaznaczonego PSD, zawierające najczęściej kwas  $\gamma$ -aminomasłowy ( $\gamma$ -aminobutyric acid - GABA), neuroprzekaźnik hamujący. Szczególnie dużo synaps hamujących występuje na powierzchni ciała neuronu.

W najbliższym otoczeniu synapsy występują astrocyty, które oprócz tego, że odżywiają komórki nerwowe, uczestniczą w samym przekazywaniu synaptycznym oraz w synaptogenezie [45,54,73,174]. Ścisłe otaczając synapsę zapobiegają też dyfuzji neuroprzekaźnika poza szczelinę synaptyczną i wychwytyują go w razie potrzeby, tak samo jak nadmiar jonów potasu [148].

## PLASTYCZNOŚĆ SYNAPTYCZNA

Siła przekazywania synaptycznego może ulegać zmianom pod wpływem aktywacji neuronów. Proces ten, który występuje nie tylko w okresie rozwoju, ale także przez całe dorosłe życie, nazywamy plastycznością synaptyczną. Dzięki niemu synapsa może sprostać szczególnym wymaganiom funkcjonalnym i adaptacyjnym środowiska. Aktywacja synapsy może prowadzić zarówno do plastyczności krótkotrwałej, jak i do zmian w sile przekazywania, które mogą utrzymywać się przez długi czas. W długotrwałą plastyczność synaptyczną są zaangażowane wewnątrzkomórkowe kaskady sygnałowe i regulacja ekspresji genów.

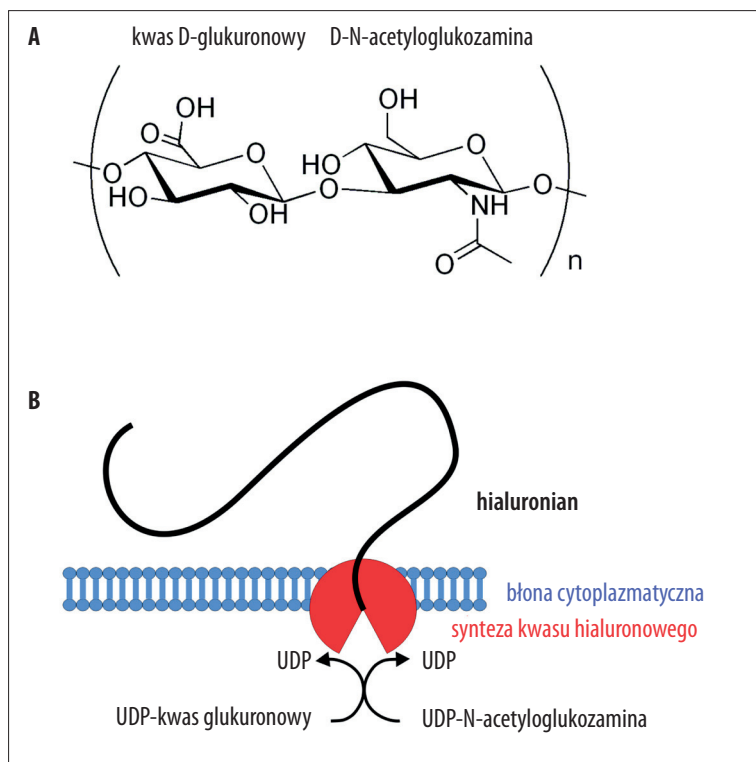
Plastyczność synaptyczna dotyczy zarówno zmian strukturalnych, jak i funkcjonalnych synapsy. Strukturalne zmiany dotyczą kształtu, wielkości i liczby istniejących synaps, a także powstawania nowych synaps [19]. Zmiany czynnościowe to m.in. zmiana liczby receptorów neuroprzekaźników w części postsynaptycznej, modyfikacja czynności receptorów, a także wzmocnienie bądź osłabienie wydzielania neuroprzekaźnika z części presynaptycznej [113].

Eksperymentalnymi modelami wzmocnienia albo redukcji siły synapsy w stymulowanych elektrycznie synapsach CNS są: długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP – long-term potentiation) i długotrwałe osłabienie synaptyczne (LTD – long-term depression). LTP powstaje pod wpływem stymulacji prądem o wysokiej częstotliwości, natomiast LTD wytwarza się pod wpływem traktowania prądem o niskiej częstotliwości. W indukcję LTP i LTD zaangażowane są zarówno mechanizmy presynaptyczne jak i postsynaptyczne, to znaczy depolaryzacja neuronów i aktywacja receptora NMDA oraz napięciowo zależnych kanałów wapniowych, które doprowadzają do napływu jonów wapnia do wnętrza komórki. Poziom jonów wapnia reguluje aktywność kinaz białkowych, takich jak: CaMKII, PKA i PKC oraz fosfataz, które z kolei kontrolują funkcję receptorów i innych białek. W powstawanie plastyczności zaangażowane są postsynaptyczne zmiany w fosforylacji receptorów neuroprzekaźników, transporcie synaptycznym receptorów AMPA i grupowanie receptorów (clustering) w błonie postsynaptycznej. Niezwykle istotną rolę w późnej fazie LTP (a także w niektórych postaciach LTD) odgrywa synteza nowych białek, która częściowo może zachodzić w pobliżu synaps, na matrycy mRNA, które jest transportowane z ciała neuronu [20,21].

Ważnym elementem w zjawiskach LTP i LTD są zmiany dotyczące kształtu i liczby kolców dendrytycznych. Badania *in vitro*, wykonane za pomocą przyżyciowego obrazowania neuronów podczas stymulacji wykazały, że LTP wiąże się z powiększaniem się kolców, natomiast LTD z ich kurczeniem się [98,171]. Wydaje się, że pod wpływem stymulacji dojrzałe neurony mogą też wytwarzać nowe kolce dendrytyczne, które najpierw w postaci dynamicznych filopodiów wyrastają z pni dendrytów, a następnie tworzą synapsy na już istniejących zakończeniach aksonalnych, budując tzw. wielosynaptyczne zakończenia aksonalne [16]. Na poziomie molekularnym plastyczność strukturalna wiąże się z dynamicznymi zmianami organizacji cytoszkieletu aktywnego [20]. Warto zaznaczyć, że zablokowanie polimerizacji aktyny uniemożliwia indukcję LTP [48].

## MACIERZ ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA I CZĄSTECZKI ADHEZYJNE

W centralnym układzie nerwowym macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix – ECM) zajmuje znacznie mniejszą objętość niż w innych narządach (do 20% całkowitej objętości tkanki), ma też odmienną strukturę [37,115,190]. W dorosłym mózgu nie zawiera ona np. włókienkowych form kolagenu (z wyjątkiem otoczenia naczyń krwionośnych) oraz wielu innych typowych dla tkanki łącznej glikoprotein i proteoglikanów. Stosunkowo niewiele jest też lamininy, choć może ona pełnić istotne funkcje w plastyczności synaptycznej [38]. Głównymi składnikami ECM w mózgu są hialuronian (ryc. 1), proteoglikany zawierające siarczan chondroityny (agrekany, neurokany,



Ryc. 1. Struktura hialuronianu. Hialuronian występuje u wszystkich kręgowców, gdzie jest ważnym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej. W niektórych przypadkach jest jej podstawowym składnikiem jak na przykład w skórze, ciele szklistym, czy układzie nerwowym, zwykle jednak współtworzy macierz zewnątrzkomórkową razem z innymi substancjami, takimi jak agrekan, kolagen, lamininy i inne. Na rycinie przedstawiono schematycznie budowę cząsteczki hialuronianu i mechanizm jej syntezy w komórce. (A) kwas hialuronowy jest polimerem podjednostek składających się z kwasu D-glukuronowego i D-N-acetyloglukozaminy połączonych ze sobą wiązaniem O-glikozydowym. Liczba  $n$  dwucukrowych podjednostek wchodzących w skład hialuronianu może wynosić nawet ponad 10000; (B) znajdująca się w błonie komórkowej syntaza kwasu hialuronowego tworzy długą liniową cząsteczkę hialuronianu poprzez naprzemienne dodawanie kwasu glukuronowego i acetyloglukozaminy do wydłużającego się łańcucha, wykorzystując w tym celu nukleotydo-cukry jako substraty. Przeciętna masa nowo utworzonej cząsteczki hialuronianu waha się w granicach 4 milionów daltonów.

fosfakan i brewikan) oraz tenascyny [37,190]. W otoczeniu ciał komórek nerwowych ECM ma postać tzw. sieci perineuralnych [124]. Również szczelina synaptyczna i przestrzeń otaczająca synapsę zawierają wyspecjalizowaną postać ECM, w której główną rolę prawdopodobnie pełnią tenascyny, trombospondyna oraz neuronalne pentraxyny [38]. Wiele badań wykazuje, że w układzie nerwowym składniki ECM mogą wpływać na aktywność i plastyczność synaptyczną, głównie przez interakcje z receptorami błonowymi z klasy integrzyn oraz z receptorami neuroprzekazników [37]. Trawienie macierzy zewnątrzkomórkowej okazało się jednym z istotnych mechanizmów powstawania zmian plastycznych w synapsach, w tym wzmocnienia synaptycznego [39,42,156].

Oddziaływanie komórek z ECM (oraz z sąsiednimi komórkami) odbywa się z udziałem cząsteczek adhezyjnych (cell adhesion molecules – CAM). W synapsach występuje wiele rodzajów takich cząsteczek, pośredniczących w wiązaniu składników synapsy ze sobą oraz z ECM [33]. Wśród synaptycznych CAM zidentyfikowano przedstawicieli niemal wszystkich znanych klas cząsteczek adhezyjnych, w tym integrzyn, kadheryn i cząsteczek immunoglobulinopodobnych (np. NCAM) [33]. Obecnie wiadomo, że synaptyczne cząsteczki adhezyjne pełnią bardzo ważną rolę w procesach plastycznych. Wśród synaps centralnego układu nerwowego, dobrze scharakteryzowano synaptyczne funkcje integrzyn, zwłaszcza typu  $\beta 1$ . Wykazano np., że zablokowanie funkcji integryny  $\beta 1$  z użyciem przeciwciał nie dopuszcza do powstania LTP w hipokampie. Podobnie, zwierzęta transgeniczne z ablacją genu integryny  $\beta 1$  mają zaburzone LTP, a także deficyty zdolności uczenia się/tworzenia pamięci. Funkcja integrzyn synaptycznych nie została całkowicie wyjaśniona na poziomie molekularnym. Prawdopodobnie cząsteczki te wiążą się na powierzchni synapsy z lamininą wchodzącą w skład

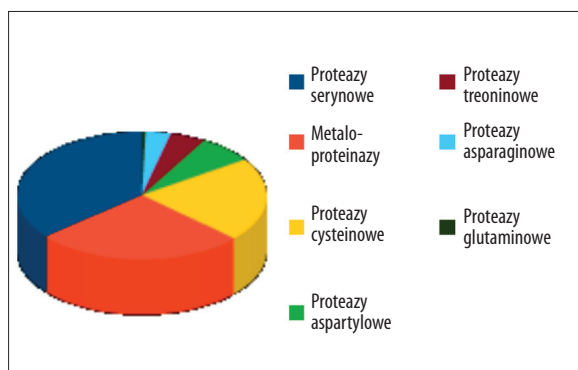
perysynaptycznej ECM, co powoduje transmisję sygnałów do cytoplazmy z udziałem kinaz z rodziny Src i/lub kalmodulinowej. Sygnały te wpływają na proces transportu receptorów glutaminianowych typu AMPA na powierzchnię błony komórkowej.

Dystroglikan jest błonową glikoproteiną występującą we wszystkich zbadanych tkankach. Składa się ona z dwóch podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$  powstających w wyniku obróbki proteolitycznej pojedynczego prekursora. Od strony ECM dystroglikan wiąże się z lamininą i agryną lub neureksyną, a od strony cytoplazmatycznej oddziałuje z dystrofiną lub utrofiną oraz z wieloma białkami sygnałowymi [13,152,162]. W dojrzałym mózgu dystroglikan występuje w otoczeniu naczyń krwionośnych i w glejowej blaszce granicznej zewnętrznej (*lamina limitans glia externa*) w powiązaniu z błoną podstawną, a także w obrębie PSD [185]. Znaczenie dystroglikanu dla funkcji mózgu podkreśla to, że niektóre mutacje zaburzające jego glikozylację wiążą się z poważnymi defektami budowy histologicznej kory mózgowej i upośledzeniem umysłowym [51]; podobnie zwierzęta transgeniczne z ablacją dystroglikanu swoistą dla mózgu wykazują defekty migracji neuronów i zaburzenia LTP [114]. Synaptyczny  $\beta$ -dystroglikan jest substratem metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9) (zob. niżej).

#### ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA PROTEOLIZA W SYNAPSACH

Badania prowadzone w ostatniej dekadzie dowodzą istotnej roli zewnątrzkomórkowej proteolizy w zjawisku plastyczności synaptycznej. Proteoliza, czyli enzymatyczny rozkład białek na peptydy i aminokwasy, katalizowany jest przez proteazy. Wśród proteaz, ze względu na mechanizm działania, wyróżnia się proteazy: serynowe, cysteinowe,





Ryc. 2. Klasyfikacja proteaz. Znanych jest ponad 640 proteaz. Najwięcej jest proteaz serynowych oraz metaloproteinaz. Wśród pozostałych wyróżniamy proteazy cysteinowe, aspartylowe, treoninowe, asparaginianowe i glutaminianowe (wg bazy MEROPS)

asparaginowe, treoninowe, aspartylowe, glutaminianowe oraz metaloproteinazy (ryc. 2). Wśród metaloproteinaz najlepiej opisane (pod kątem plastyczności) są metacynkiny (metzincins), nadrodzina białek zależnych od cynku, w skład której wchodzi m.in. metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases – MMPs), admalizyny (a disintegrin and metalloproteinases – ADAMs) oraz białka ADMATS (ADAM z motywem trombospondyny, ADAM proteases with thrombospondin motifs).

Spośród wymienionych proteaz najwięcej danych zgromadzono na temat proteaz serynowych oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i na nich skupia się niniejsze opracowanie.

### Proteazy serynowe

#### Wiadomości ogólne

Proteazy serynowe należą do klasy hydrolaz, podklasy proteaz i katalizują selektywnie hydrolizę wiązań peptydowego. Stanowią jedną trzecią proteaz spotykanych w naturze [62]. Ich nazwa pochodzi od obecności reszty serynowej w obrębie centrum aktywnego. Wyróżniamy cztery klasy proteaz serynowych reprezentowane przez chymotrypsynę, subtilizynę, karboksypeptydazę Y oraz proteazę Clp. Spośród nich najbardziej rozpowszechnione są proteazy typu chymotrypsyny (chymotrypsin-like proteases), które biorą udział w wielu procesach fizjologicznych, takich jak trawienie, hemostaza, odpowiedź immunologiczna,

apoptoza i gojenie się ran [69,81,158]. Ostatnie trzy dekady przyniosły wiele doniesień na temat występowania chymotrypsynopodobnych proteaz serynowych w obrębie układu nerwowego oraz ich zaangażowania w procesy plastyczności synaptycznej.

#### Budowa. Mechanizm działania. Regulacja aktywności

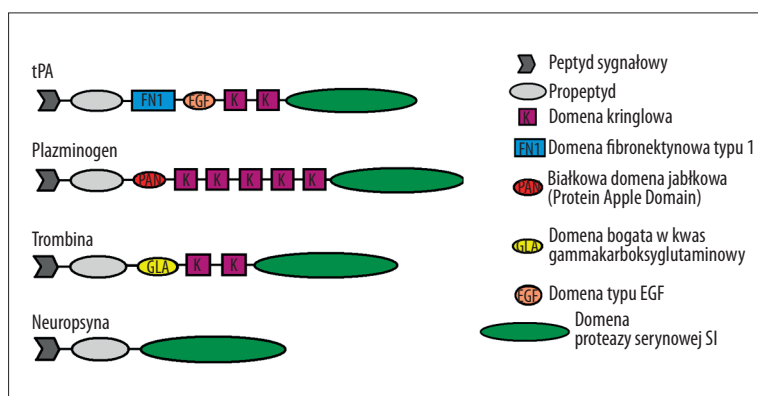
W obrębie cząsteczki chymotrypsynopodobnej proteazy możemy wyróżnić trzy domeny: rozpoznającą substrat, katalityczną oraz aktywującą zymogen [14]. Oprócz nich często są obecne domeny pomocnicze (domena typu EGF, kringlowa), które odpowiadają za różne właściwości poszczególnych enzymów. Budowę domenową proteaz serynowych opisywanych szerzej w tekście przedstawia ryc. 3.

W obrębie centrum aktywnego znajduje się tzw. triada katalityczna, którą tworzą reszty Ser, His i Asp. Triada katalityczna jest częścią systemu wiążącego wodór [62] i ma zasadnicze znaczenie w mechanizmie działania proteaz serynowych.

Mechanizm hydrolizy peptydu katalizowanej przez proteazy serynowe można podzielić na dwa etapy. Po związaniu się substratu z centrum aktywnym enzymu, następuje pierwszy etap reakcji, którym jest acylacja. Reszta serynowa, wchodząca w skład centrum aktywnego, atakuje grupę karbonylową substratu za pomocą His, która jest akceptorem protonu z Ser. Ujemnie naładowany Asp pełni funkcję stabilizującą His-H<sup>+</sup>. Powstaje tetraedryczny stan przejściowy, stabilizowany przez dziurę oksyanionową, w którym następuje hydroliza wiązania peptydowego. Następuje odłączenie aminowej części substratu i powstaje przejściowy kompleks acyloenzymu. Drugim etapem reakcji jest deacylacja. Przejściowy kompleks acyloenzymu ulega hydrolizie pod wpływem wody, powstaje drugi tetraedryczny stan przejściowy, który rozpada się uwalniając serynę oraz produkt (kwas karboksylowy) [62].

Proteazy chymotrypsynopodobne są syntetyzowane w postaci nieaktywnych zymogenów i do swojej aktywacji wymagają proteolitycznego usunięcia N-końcowego fragmentu łańcucha.

Innym sposobem kontroli aktywności proteaz serynowych jest łączenie się tych enzymów ze swoistymi dla nich inhibitorami z rodziny serpin (serine protease inhibitors). PAI-1 jest inhibitorem dla tPA i uPA [12]. Również neuroserpina funkcjonuje jako inhibitor tPA [59]. Aktywność trombiny



Ryc. 3. Budowa domenowa proteaz serynowych

jest regulowana przez PN-1 [4], a neuropsyny przez inhibitor proteaz serynowych 3 (SPI3) oraz murinoglobulinę I (MUG I), jednak ten ostatni związek nie należy do rodziny serpin [70].

Kompleks proteaza serynowa/neuroserpina, jak również sam enzym, może być następnie internalizowany i degradowany za pośrednictwem LRP lub innych członków rodziny receptorów LDL [2]. W tym kontekście LRP jest uważany za regulator aktywności proteolitycznej w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [63]. Opisano również zjawisko internalizowania aktywnej neuroserpiny przez mysie neurony korowe [93], co jest niespotykane wśród pozostałych serpin, które są internalizowane tylko w kompleksie z enzymem [160].

### *Proteazy serynowe w plastyczności synaptycznej*

W kontekście plastyczności synaptycznej opisano: układ tPA/plazminogen, neuropsyna i trombina oraz ich inhibitory (PAI-1, neuroserpina, neksyna).

### *Układ tPA/plazminogen i ich inhibitory*

Ekspresja tych enzymów w mózgu jest potwierdzona wieloma badaniami, które obejmują zarówno detekcję mRNA jak i samego białka.

tPA jest konstytutywnie ekspresjonowane w hipokampie, mózdzku, ciele migdałowatym, podwzgórzu i korze mózgowej [35,145,147]. W hipokampie ekspresja tPA jest szczególnie intensywna w obrębie włókien mszystych [145] oraz neuronów piramidowych [147]. Kolokalizacja z synaptofizyną, która uważana jest za marker synaps, wskazuje na synaptyczne umiejscowienie tego białka [155].

Doniesienia o konstytutywnej ekspresji plazminogenu są rozbieżne. Basham i Seeds wykazali obecność plazminogenu w obrębie kory mózgowej, hipokampa i mózdzku myszy [7]. Natomiast Sharon i wsp. znaleźli plazminogen w wielu rejonach mózgu myszy, ale dopiero po iniekcji kwasu kainianowego, analogu kwasu glutaminowego o neurotoksycznych właściwościach [153].

Neuroserpina występuje w korze mózgowej, formacji hipokampa, ciele migdałowatym, mózdzku, opuszcze węchowej i podwzgórzu [59,76]. Jej ekspresja jest najbardziej widoczna w obrębie neuronów [59] oraz synaps [130]. Natomiast PAI-1 w stanie aktywności podstawowej mózgu nie jest wykrywany [145,147].

Strategiczne umiejscowienie tPA i neuroserpiny w okolicy synaps oraz doniesienia o lokalnej dendrytycznej syntezie tPA [155] pozwalają wnioskować o związku tych białek ze zjawiskami plastyczności synaptycznej. Kolejnym argumentem potwierdzającym tę hipotezę jest ekspresja oraz sekrecja w mechanizmie zależnym od aktywności (activity-dependent manner). Transkrypcja genu tPA jest aktywowana w obrębie hipokampa w ciągu kilku minut po zewnątrzkomórkowej stymulacji obejmującej LTP, napad drgawek oraz tzw. rozniecanie (kindling) [142], natomiast iniekcja kwasu kainianowego powoduje wzrost poziomu tPA mRNA w regionie CA1 hipokampa [145]. Podobnie plazminogen ulega ekspresji po iniekcji kwasu kainowego [153], a neuroserpina pod wpływem depolaryzacji [10].

Równie istotne jest i to, że proteazy serynowe są wydzielane pod wpływem stymulacji neuronów. Wprowadzenie substancji depolaryzującej (KCl) do mózgu myszy za pomocą pompy osmotycznej powoduje zwiększenie aktywności tPA w obrębie zakrętu zębatego oraz regionów CA2-CA3 hipokampa, następujące w wyniku wydzielania tPA do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [55]. Jak wykazały późniejsze badania, depolaryzacja wyzwała powolne i częściowe wydzielanie tPA z DCG (dense core granules), które są magazynem tej proteazy zlokalizowanym w obrębie kolców dendrytycznych, a sam proces sekrecji jest zależny od zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [85]. Ten mechanizm egzocytozy przypomina model „fuse-pinch-linger“, który umożliwia ponowne wydzielanie tPA pozostałego w DCG podczas kolejnej depolaryzacji [85].

Również plazminogen i neuroserpina są wydzielane z zaktywowanych neuronów w sposób zależny od stężenia jonów wapnia [23].

Bezpośredni dowód na zaangażowanie tPA w procesy uczenia się i pamięci stanowią badania prowadzone na myszach typu knock-out (KO) oraz z nadekspresją tPA.

Jak już wspomniano, LTP oraz LTD są uważane za zwierzęcy model pamięci długoterminowej. KO genu tPA uniemożliwia powstanie LTP w synapsach korowo-prążkowio- wych [26], w obrębie hipokampa powoduje selektywne upośledzenie fazy późnej LTP (L-LTP) bez wpływu na fazę wczesną (E-LTP) [5,25,66], natomiast w obrębie prążkowie- nia uniemożliwia zajście zarówno wczesnej jak i późnej fazy LTD [25]. Konsekwencją upośledzenia zjawisk elektrofizjologicznych są zmiany behawioralne. Zwierzęta typu KO gorzej wykonują zadania angażujące procesy pamięci- ci zależne od hipokampa i prążkowie [25] oraz mózdzku [149]. Z kolei myszy z nadekspresją tPA wykazują zwiększone LTP oraz lepszą pamięć przestrzenną [90].

Co ciekawe, zarówno zwierzęta z niedoborem, jak i nadekspresją neuroserpiny wykazują zmniejszoną aktywność ruchową oraz reagują strachem na nowe obiekty [91]. Natomiast u ludzi mutacje w genie neuroserpiny są związane z demencją dziedziczną w sposób autosomalny dominujący [36,183].

tPA jest zaangażowane w różne formy plastyczności w różnych regionach mózgu. W obrębie kory wzrokowej myszy bierze udział w zmianach morfologicznych na poziomie kolców dendrytycznych, powstających w wyniku pozbawienia jednego oka bodźców wzrokowych (monocular deprivation) w odpowiednim okresie rozwoju. Skutkuje to powstaniem wielu funkcjonalnych i anatomicznych zmian w obrębie pierwszorzędowej kory wzrokowej, m.in. kurczeniem się drzewa dendrytycznego neuronów „obsługujących“ zdeprzywotowane oko oraz rozrastaniem się drzewa odpowiadającego oku otwartemu, w co zaangażowany jest układ tPA/plazmina [96,129].

tPA oraz jego inhibitor PAI-1 odgrywają rolę w molekularnej odpowiedzi na stres poprzez regulowanie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych oraz powstawania zmian adaptacyjnych w obrębie ciała migdałowatego [137] i hipokampa [123]. O istotności tych zjawisk świadczą to, że zwierzęta z ablacją genu dla tPA nie wykazują

Tabela 1. Zakres substratowy tPA i plazminy

tPA	plazminogen, NR1
plazmina	laminina, fosfakan, neurokan, PTP zeta, NCAM, NR1, NR2A, NR2B, prNGF, proBDNF, proMMP-9

lęku w odpowiedzi na stres [137] oraz gorzej niż osobniki dzikie wykonują zadania warunkowane strachem [123].

W obrębie jądra półleżącego tPA reguluje wyrzut dopaminy indukowany morfiną i kokainą, przez co bierze udział w rozwinięciu uzależnienia od tych substancji [92,117]. tPA ułatwia również powstanie fizycznego uzależnienia od etanolu [138].

Co ciekawe, tPA ma swój udział również w hemodynamicznej odpowiedzi na aktywność neuronalną, miejscowo zwiększając przepływ mózgowy poprzez regulację fosforylacji neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS) zależnej od aktywacji receptorów NMDA [133].

tPA pobudza wzrost neurytów oraz synaptogenezę. Zewnątrzkomórkowa aplikacja tPA na hipokampalną hodowlę komórkową powoduje wydłużenie włókien mszystych (aksonów komórek ziarnistych) oraz tworzenie żyłkowatych zgrubień wzdłuż wypustek aksonów dokładnie naprzeciwko regionów dendrytów szczególnie bogatych w GluR1, sugerując, że tPA jest zdolne do indukcji tworzenia nowych połączeń synaptycznych. Zjawiska te są zahamowane przez aplikację PAI-1, wskazując na udział proteolitycznej aktywności tPA [5]. Podobnie egzogenny plazminogen wzmacnia wzrost neurytów na długość [56], co może sugerować, że neurotroficzne właściwości tPA wynikają z konwersji plazminogenu do aktywnej plazminy.

Lee i wsp. opisali dodatni wpływ tPA na wzrost neurytów neuronów korowych na długość oraz przeżywalność komórek, jednak ich zdaniem wpływ ten jest niezależny od proteolitycznych właściwości tPA i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej [79]. Zdaniem badaczy w neurotroficznym efekcie tPA pośredniczy aneksyna II, białko błonowe, które wiąże tPA [57,157], ponieważ jego zablokowanie hamuje wpływ tPA na wydłużanie neurytów. Za jego pośrednictwem tPA miałyby aktywować szlaki typowo aktywowane przez czynniki wzrostowe (Raf-K, ERK, PCK, P13-K/Akt) [79].

Odwrotnie działa na wzrost neurytów neuroserpina. Już niewielkie zwiększenie ekspresji neuroserpiny powoduje spadek całkowitej liczby neurytów oraz ich długości [134].

Układ tPA/plazminogen jest zaangażowany również w patologiczne procesy plastyczności synaptycznej. W modelu epileptogenezy polegającym na stymulacji kwasem kaininowym, aktywność tPA wzrasta w obrębie szlaku włókien mszystych hipokampa (mossy fiber pathway – MFP) [187]. tPA aktywuje plazminogen do plazminy, która trawi składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak proteoglikany, wpływając na wzrost zakończeń nerwowych, ich bocznicowanie oraz reorganizację synaps w obrębie MFP [181], zjawiska leżące u podstaw epileptogenezy [24]. Jest bardzo prawdopodobne, że zjawiska podobne do tych obserwowanych na modelach zwierzęcych występują również

w organizmie człowieka, ponieważ wykazano zwiększoną ekspresję tPA w komórkach nerwowych i glejowych w obrębie ognisk padaczkowych pacjentów cierpiących na stwardnienie hipokampa, ogniskową dysplazję korową, stwardnienie guzowate i zwojakogłębaki [67].

O ile udział tPA w procesach plastyczności nie budzi już dzisiaj wątpliwości, o tyle mechanizm jego działania wciąż pozostaje niewyjaśniony. Najbardziej oczywistym mechanizmem działania tPA jako proteazy jest degradacja ECM, która zmienia środowisko na bardziej podatne na zmiany strukturalne połączeń synaptycznych, podobnie jak się to dzieje podczas ontogenezy, kiedy to rozwijające się aksony wydzielają tPA [150,163]. tPA konwertuje plazminogen do aktywnej plazminy, która charakteryzuje się szerszym zakresem działania niż tPA (tabela 1), trawiąc m.in. lamininę [27,116,119] oraz proteoglikany: fosfakan, neurokan [181] i RPTP beta (receptor-type protein tyrosine phosphatase beta, znany również pod nazwą PTP zeta) [30]. Zdaniem niektórych autorów degradacja lamininy przez plazminę reguluje LTP [119]. Natomiast PTP zeta jest umiejscowiony w okolicy zakończeń postsynaptycznych neuronów korowych i hipokampalnych [60], gdzie reguluje procesy synaptogenezy [3], aczkolwiek brak jest dowodów na rolę tego proteoglikanu jako pośrednika neurotroficznych właściwości plazminy.

Wśród substratów plazminy znajdują się również cząsteczki adhezyjne, w tym NCAM [41]. Proteoliza cząsteczek adhezyjnych mogłaby wprowadzać nowe stosunki między komórkami oraz komórkami i środowiskiem i tym samym prowadzić do zmiany organizacji synaps [65].

Innym potencjalnym mechanizmem działania tPA jako regulatora procesów plastyczności synaptycznej jest dokładnie opisana w literaturze regulacja przekazywania receptora NMDA, jednak charakter interakcji między tPA i NMDAR wciąż jest przedmiotem debat.

tPA wydzielany przez neurony pod wpływem depolaryzacji bezpośrednio tnie podjednostkę NR1, czego efektem jest zwiększenie przepuszczalności NMDAR dla jonów wapnia [9,46,121]. Powyższe zjawisko zostało potwierdzone *in vivo* w mózgu podczas udaru niedokrwiennego [89]. Proteoliza zachodzi w pozycji Arg-260 w obrębie N-końcowej domeny podjednostki NR1 (NR1-ATD), ponieważ substytucja Arg-260 na alaninę uniemożliwia zarówno proteolizę NR1-ATD jak i wpływ tPA na przekazywanie glutaminergiczne [46]. Natomiast zablokowanie interakcji tPA z NR1 *in vivo* za pomocą swoistych przeciwciał przeciwko NR1-ATD upośledza niektóre, ale nie wszystkie formy pamięci zależne od tPA, tzw. upośledzone u zwierząt typu KO [9]. Świadczy to o tym, że niektóre, ale nie wszystkie funkcje tPA w mózgu wymagają proteolitycznej interakcji z podjednostką NR1.

Zdaniem innych badaczy NR1 nie jest substratem tPA [83,99,146]. Według Matysa i Stricklanda proteoliza NR1



przez tPA wymaga obecności plazminogenu i jest wtórna do proteolitycznych właściwości plazminy [99]. Istotnie, plazmina jest zdolna do bezpośredniej interakcji i proteolizy NR1 [146] oraz przynajmniej częściowo odpowiada za zmniejszenie ilości NR1 w obrębie hipokampa w warunkach chronicznego stresu [139].

Również inne podjednostki receptora NMDA funkcjonują jako substraty plazminy. Proteoliza NR2A-ATD w punkcie Lys-317 znosi hamujący wpływ cynku na funkcje receptora NMDA [184], który w fizjologicznych warunkach jest wydzielany razem z glutaminianem w części presynaptycznej i w sposób toniczny hamuje przekazywanie NMDAR w synapsach włókien mszystych [173]. Podobnie podjednostka NR2B jest substratem plazminy, jednak interakcja z plazminą nie tyle prowadzi do dyskretnej proteolizy, jak to się dzieje w przypadku NR1 i NR2A, co do kompletnej degradacji NR2B [138].

Opisano wiele działań tPA niezależnych od jego proteolitycznej aktywności, m.in. aktywacja komórek mikrogleju [144], ochrona neuronów przed apoptozą [72,82] oraz zwiększanie tolerancji neuronów na niedokrwienie [40]. Również wpływ na funkcje receptora NMDA może być niezależny od proteolitycznej aktywności tPA, który wpływa na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe aktywowane przez NMDAR [101]. Podobnie, nieproteolityczna interakcja tPA z podjednostką NR2B jest niezbędna do zwiększenia ekspresji NR2B w przebiegu długotrwałego nadużywania etanolu, co ma zasadnicze znaczenie w rozwinięciu fizycznego uzależnienia od alkoholu [138].

Inna grupa badaczy wykazała, że plazmina wzmacnia przewodnictwo NMDAR w obrębie neuronów tylko w obecności astrocytów, wskazując na zjawisko komunikacji między astrocytami i neuronami (astrocyte-neuron cross-talk). Zdaniem autorów plazmina aktywuje astrocytarne receptory PAR-1, powodując wzrost stężenia jonów wapnia w astrocytach, co prowadzi do wydzielenia hipotetycznej cząsteczki, która docierałaby do neuronów i wpływała na przekazywanie synaptyczne [94]. Wiadomo, że zaktwowane astrocyty wydzielają wiele neuroaktywnych czynników, m.in. glutaminian [135]. Istotnie, aktywacja astrocytarnego PAR-1 powoduje wydzielenie glutaminianu, który aktywuje neuronalne NMDAR [78].

Jak już wcześniej wspomniano, LRP jest endocytarnym receptorem tPA. Najnowsze badania wskazują, że interakcja tPA z LRP pełni również inne funkcje niż tylko regulacja aktywności tego enzymu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Okazuje się, że LRP1 pośredniczy w aktywacji NMDAR i zwiększeniu jego przepuszczalności dla jonów wapnia przez tPA. Jest to niezależne od plazminogenu, ale wymaga proteolitycznej aktywności tPA [146]. Najprawdopodobniej kompleks LRP1-tPA wraz z białkiem adaptorowym PSD95 tworzą mechanizm bramkujący NMDAR, który stymuluje dokomórkowy napływ wapnia i następującą aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych [95].

Również wpływ tPA na L-LTP może być związany z LRP, a dokładnie z nieproteolityczną interakcją tPA z receptorem, która powoduje aktywację PKA. Zablockowanie LRP znosi dodatni wpływ egzogenego tPA na wzmocnienie synaptyczne w hipokampie myszy typu KO względem genu dla tPA [189].

Kolejnym możliwym mechanizmem działania tPA w regulacji procesów plastyczności synaptycznej jest kontrola aktywności czynników wzrostu i różnicowania komórek nerwowych: czynnika wzrostu nerwów (nerve growth factor – NGF) oraz neurotroficznego czynnika mózgowo pochodnego (brain-derived neurotrophic factor – BDNF).

System tPA-plazminogen-neuroserpina reguluje procesy dojrzewania NGF oraz jego degradacji [23,80]. ProNGF, plazminogen, tPA i neuroserpina są wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej pod wpływem stymulacji neuronów. tPA katalizuje przemianę plazminogenu do aktywnej plazminy, która konwertuje proNGF do jego dojrzałej postaci mNGF oraz jednocześnie aktywuje proMMP-9, z kolei zaktwowana MMP-9 dokonuje enzymatycznej inaktywacji nadmiaru mNGF. Tempo przemiany jest regulowane przez neuroserpinę, endogenny inhibitor tPA [24]. Zgodnie z tym zastosowanie inhibitora plazminy znacząco zmniejsza wzrost neurytów na długość oraz neurytogenezę indukowane przez NGF [56].

Z kolei tPA, plazminogen i proBDNF są wspólnie transportowane wewnątrz DCG z ciała neuronu, wzdłuż jego wypustek, do kolców dendrytycznych, gdzie są wspólnie magazynowane i wydzielane w sposób zależny od aktywności [86]. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej plazminogen zostaje zaktwowany przez tPA do plazminy, która konwertuje proBDNF do mBDNF, jego dojrzałej postaci [80,132]. ProBDNF i mBDNF działają przeciwstawnie na połączenia synaptyczne oraz procesy związane z nabywaniem i wygasaniem wspomnień. mBDNF odgrywa główną rolę w hipokampalnym LTP [132] oraz nabywaniu nowych informacji [6], podczas gdy proBDNF bierze udział w hipokampalnym LTD [178] oraz wygasaniu wspomnień [6]. Dlatego układ tPA/plazmina oraz jego inhibitory mogą wpływać na kierunek zmian plastyczności synaps hipokampa poprzez kontrolowanie ilości mBDNF i proBDNF.

### *Neuropsyna i jej inhibitory*

Ekspresja konstytutywna neuropsyny jest ograniczona do układu limbicznego oraz hipokampa [28,108]. W obrębie hipokampa jest umiejscowiona zarówno zewnątrzkomórkowo, jak i wewnątrz neuronów [125]. Również inhibitory neuropsyny, SPI3 i MUG I, są ekspresjonowane przez neurony piramidowe hipokampa [70]. Różnorodna stymulacja elektrofizjologiczna, taka jak kindling, LTP i stres, zwiększa ekspresję neuropsyny w obrębie hipokampa oraz wielu innych regionach mózgu [28,58,126].

Prekursorowa postać neuropsyny jest wydzielana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, która jest głównym magazynem tej proteazy w mózgu [154]. Aktywacja proneuropsyny jest zależna od aktywności neuronów i zachodzi podczas LTP [97].

Myszy typu KO względem genu neuropsyny wykazują zmiany morfologiczne neuronów i synaps w obrębie pola CA1 hipokampa: ciała neuronów piramidowych są powiększone i wydłużone, stosunek szerokości do długości jest obniżony, a liczba synaps asymetrycznych jest wyraźnie zmniejszona [64]. Inna grupa badaczy zaobserwowała nadpobudliwość komórek hipokampa w odpowiedzi na stymulację, a zastosowanie kwasu kainianowego



Tabela 2. Podsumowanie funkcji proteaz serynowych w mózgu

Proteaza serynowa	Procesy, w które zaangażowana jest proteaza
Układ tPA/plazminogen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E-LTP i L-LTP</li> <li>• Modulowanie funkcji NMDAR</li> <li>• Wzrost neurytów na długość, synaptogeneza</li> <li>• Epileptogeneza</li> <li>• Powstawanie uzależnienia od substancji psychoaktywnych</li> <li>• Stres</li> </ul>
Neuropsyna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E-LTP</li> <li>• Wzrost liczby neurytów, synaptogeneza</li> <li>• Epileptogeneza</li> </ul>
Trombina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulowanie funkcji NMDAR</li> </ul>

wywołało napad drgawek o znacznie cięższym przebiegu niż u zwierząt dzikich [34]. Zwierzęta te wykazują również poważne upośledzenie fazy wczesnej LTP oraz pamięci przestrzennej zależnej od hipokampa na etapie nabywania informacji [169].

Zewnątrzkomórkowa aplikacja rekombinowanej neuropsyny wzmacnia E-LTP w sposób zależny od dawki. Dodatnie działanie na LTP jest najbardziej widoczne przy stężeniu neuropsyny 2,5 nM. Większe stężenia są coraz mniej efektywne, a stężenie 170 nM całkowicie zahamowało LTP [74]. Zastosowanie przeciwciał hamujących aktywność proteolityczną endogennej neuropsyny znacząco zmniejsza [74] lub całkowicie hamuje E-LTP [169], co stanowi potwierdzenie działania neuropsyny *in vivo*. Zaobserwowano również, że dokomorowe wprowadzenie przeciwciał przeciw neuropsynie hamuje proces rozniecania padaczki (kindling), który polega na poddawaniu zwierzęcia podprogowej stymulacji elektrycznej, prowadzącej do obniżenia progu padaczkowego i występowania spontanicznych napadów [111].

Co więcej, egzogenna neuropsyna wzmacnia wzrost neurytów neuronów hipokampalnych, zwiększając średnią liczbę neurytów w komórce, ale nie wpływając na ich długość [125] i jest zaangażowana w tworzenie nowych połączeń synaptycznych [120]. mRNA neuropsyny występuje także w rozwijającym się układzie nerwowym. Co ciekawe zwiększona ekspresja mRNA neuropsyny została zaobserwowana między 5–10 dniem życia myszy, czyli mniej więcej w tym samym czasie, kiedy rejestrowane jest pierwsze LTP w obrębie hipokampa [165]. Nasuwa to przypuszczenie, że neuropsyna uczestniczy w procesie synaptogenezy na wczesnych etapach rozwoju, dlatego KO genu tego białka powoduje zaburzenia morfologii i funkcji synaps i neuronów.

Mechanizm działania neuropsyny wyjaśniający powyższe zjawiska najprawdopodobniej jest związany z proteolitycznymi właściwościami tego białka, aczkolwiek jego zakres substratowy jest dosyć wąski. Dotąd zidentyfikowano dwa substraty neuropsyny: cząsteczkę adhezyjną L1cam oraz fibronektynę [97,154]. L1cam jest umiejscowiona w części presynaptycznej synaps asymetrycznych hipokampa, a jej proteoliza zachodzi podczas aktywacji NMDAR, sugerując związek ze zjawiskami plastyczności synaptycznej zależnymi od NMDAR, zwłaszcza LTP [97]. Natomiast fibronektyna jest istotnym białkiem ECM i ligandem integrin. Proteoliza tych oraz innych niezidentyfikowanych

jeszcze składników ECM rearanżuje środowisko okołosynaptyczne, prowadząc do powstania nowych stosunków między komórkami.

#### *Trombina i jej inhibitor PN-1*

Trombina jest ekspresjonowana konstytutywnie w opuszce węchowej, hipokampie, korze mózgowej i mózdzku [176], a PN-1 w opuszce węchowej, prążkowi, przodomózgowiu podstawnym i korze mózgowej, zarówno w obrębie astrocytów jak i neuronów [159]. Ponadto ekspresja PN-1 może być indukowana aktywnością komórek nerwowych [77].

Trombina już w bardzo niskich stężeniach wzmacnia funkcje NMDAR w obrębie neuronów piramidowych regionu CA1 hipokampa w mechanizmie zależnym od aktywacji PAR1, który jest receptorem trombiny [50]. W wyższych stężeniach trombina jest zdolna do proteolizy podjednostki NR1 receptora NMDA *in vitro*, jednak dokładne miejsce proteolizy ani fizjologiczne konsekwencje tego zjawiska nie są znane [50].

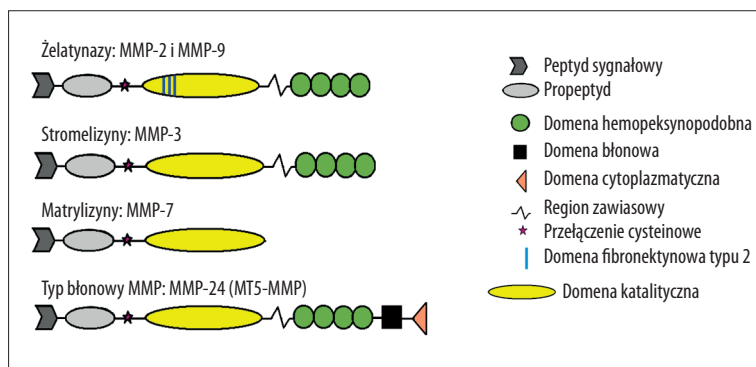
Sprzeczne z powyższymi wynikami są doświadczenia prowadzone *in vivo*. Trombina podana do płynu mózgowo-rdzeniowego hamuje niektóre funkcje NMDAR, m.in. czucie bólu [43] oraz upośledza funkcje poznawcze u szczurów [104].

PN-1 jest inhibitorem trombiny. Zwierzęta typu KO względem genu PN-1 wykazują zmniejszoną transmisję w obrębie NMDAR i spadek liczby podjednostek NR1 [77], zmniejszone LTP [88] oraz upośledzony proces wygaszania wspomnień [103]. Natomiast zwierzęta z nadekspresją PN-1 mają zwiększone LTP [88]. Co ciekawe, zarówno myszy z nadekspresją, jak i niedoborem tego białka mają obniżony próg drgawkowy [88], wskazując, że zaburzenia równowagi między proteazami i ich inhibitorami prowadzą do upośledzenia funkcji mózgu.

Ponieważ związek PN-1 z procesami plastyczności jest znacznie lepiej udokumentowany niż trombiny, nasuwa się przypuszczenie, że PN-1 może regulować pewne zjawiska w mechanizmie niezależnym od inhibicji trombiny, tak jak podczas rozwoju mózdzku, kiedy to PN-1 wiąże się do LRP, regulując procesy wzrostu i różnicowania prekursorów neuronów ziarnistych [172]. Podsumowanie funkcji proteaz serynowych w mózgu przedstawia tabela 2.

Tabela 3. Klasyfikacja MMP (na podstawie [43])

	Podgrupy MMP	Białka z danej podgrupy
Archetypowe MMP	Kolagenazy	MMP-1 (kolagenoza 1) MMP-8 (kolagenoza 2) MMP-13 (kolagenoza 3)
	Stromelizyny	MMP-3 (stromelizyna 1) MMP-10 (stromelizyna 2)
	Inne archetypowe MMP	MMP-12 (metaloelastaza) MMP-19 MMP-20 (enamelizyna) MMP-27
Matrylizyny		MMP-7 (matrylizyna 1) MMP-26 (matrylizyna 2)
Żelatynazy		MMP-2 (żelatynaza A) MMP-9 (żelatynaza B)
MMP aktywowane przez furynę	MMP wydzielnicze	MMP-11 (stromelizyna 3) MMP-21 MMP-28 (epilizyna)
	Typ błonowy MMP	MMP-14 (MT1-MMP) MMP-15 (MT2-MMP) MMP-16 (MT3-MMP) MMP-17 (MT4-MMP) MMP-24 (MT5-MMP) MMP-25 (MT6-MMP)
	Typ II przezbłonowy MMP	MMP-23A MMP-23B



Ryc. 4. Budowa domenowa MMP

**Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej**

*Wiadomości ogólne*

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są rodziną ponad 30 białek należących do grupy metcynkin. Większość z nich ulega sekrecji na zewnątrz komórki, ale do metaloproteinaz należą także przedstawiciele białek błonowych, które są eksponowane na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej (metaloproteinazy błonowe, membrane type – MT).

**Budowa. Mechanizm działania. Regulacja aktywności**

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej pomimo dużego zróżnicowania funkcjonalnego przejawiają pewne podobieństwa strukturalne, co pozwoliło na wyodrębnienie

podgrup, a wśród nich kolagenazy, stromelizyny, matrylizyny, żelatynazy i typ błonowy MMP (tabela 3). Strukturę domenową MMP opisywanych szerzej w tekście przedstawia rycina 4.

Te z MMP, które ulegają sekrecji na zewnątrz komórki mają N-terminalną sekwencję sygnałną (zwaną również „prodomeną”), która jest usuwana bezpośrednio po syntezie w ER. Wśród MMP swoją budową wyróżniają się MMP-2 i MMP-9, które w domenie katalitycznej zawierają dodatkowo trzy tandemowe powtórzenia, podobne do domeny typu drugiego fibronektyny. Domena ta ma zdolność do wiązania kolagenu i elastyny [161].

Przedstawicielki białek błonowych (MMP-14, 15, 16, 17, 24, 25) są zbudowane z jednołańcuchowej domeny transmembranowej oraz krótkiej cytoplazmatycznej części C-terminalnej (MMP-14, 15, 16, 24) lub części

Tabela 4. Ekspresja MMP w mózgu człowieka

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14
Inhibitory dla metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej	TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4

C-terminalnej będącej miejscem zakotwiczenia glikofosfatydylo-inozytolu (MMP-17, MMP-25) [44].

Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej przez MMP jest ściśle kontrolowana poprzez trzy wspierające się mechanizmy: regulację transkrypcji genów, regulację aktywacji proenzymu oraz poprzez tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (tissue inhibitor of metalloproteinases, cztery białka, TIMP-1 do TIMP-4). Transkrypcja genów może zostać zainicjowana przez czynniki wzrostu, produkty onkogenów, estry forbolu, a także poprzez interakcje komórki z komórką, czy też komórki z ECM [179].

Początkowo MMP są utrzymywane w postaci nieaktywnych proenzymów, czyli do swojej aktywacji wymagają proteolitycznego cięcia (usunięcia propeptydu). W postaci nieaktywnej proenzymu reszta cysteinowa należąca do regionu propeptydu jest związana z atomem cynku. Zerwanie wiązania cynk-cysteina poprzez aktywujące czynniki jest zwane „przełączeniem cysteinowym” (cysteine switch), które ujawnia część katalityczną. Te działania prowadzą do powstania form pośrednich MMP zdolnych do cięcia regionów propeptydowych poprzez autokatalizę, co skutkuje uzyskaniem pełnej aktywności katalitycznej. Do czynników aktywujących MMP zaliczamy: plazminę, trombinę, tPA, uPA oraz inne MMP (np. MMP-3 może aktywować MMP-1 MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 i MMP-13) [131].

#### *Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej w plastyczności synaptycznej*

Profil konstytutywnej i indukowanej ekspresji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w ośrodkowym układzie nerwowym różni się w zależności od regionu, typu komórki i gatunku. Ekspresja konstytutywna metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich inhibitorów w komórkach systemu nerwowego człowieka przedstawione w tabeli 4.

Spośród wielu MMP obecnych w mózgu, najlepiej udokumentowany związek z procesami plastyczności synaptycznej mają MMP-9, MMP-2, MMP-3, MMP-7 i MT5-MMP.

#### *MMP-9 i MMP-2*

MMP-9 i MMP-2 należą do grupy zelatynaz. W obrębie domeny katalitycznej zawierają 3 domeny typu drugiego fibronektyny, które pozwalają im na wiązanie się z kolagenem i jego rozkład proteolityczny. Oba enzymy charakteryzują się szerokim zakresem substratowym *in vitro*, tnąc kolagen typu I, IV, V, VII, X, XI, elastynę, fibronektynę, lamininę, agrekan i witronektynę, a MMP-2 dodatkowo brewikan i neurokan [131].

Zarówno MMP-9 jak i MMP-2 ulegają ekspresji w hipokampie, prążkowiu, międzymózgowiu, śródmózgowiu,

korze czołowej i mózdzku szczura, przy czym aktywność obu białek jest największa w obrębie hipokampa [186]. MMP-2 jest silnie ekspresjonowana w astrocytach [1], natomiast MMP-9 w neuronach, z preferencją do lokalizacji w ciałach komórek nerwowych oraz dendrytach [168]. Z badań mózgu szczura wynika, że zarówno MMP-9 mRNA jak i samo białko są obecne w kolcach dendrytycznych w obrębie synaps pobudzających [75,177]. Ponadto udowodniono, że MMP-9 występujące w synapsach jest aktywne enzymatycznie [49].

Ostatnie dwie dekady przyniosły wiele doniesień o zaangażowaniu MMP-9 w procesy fizjologicznej i patologicznej plastyczności synaptycznej.

Po pierwsze, aktywność MMP-9 wzrasta podczas indukcji fazy późnej LTP [118], a zablokowanie aktywności proteolitycznej tego białka za pomocą swoistego inhibitora lub przeciwciał neutralizujących upośledza fazę późną LTP w obrębie synaps utworzonych między kolateralami Schaffera i neuronami pola CA1 hipokampa [18,118]. Wpływ MMP-9 na LTP może być związany z modulowaniem przez MMP-9 kinetyki receptora NMDA [53], którego aktywacja, jak wiadomo, jest niezbędna do indukcji LTP w tychże synapsach. Również w obrębie kory przedczołowej zahamowanie aktywności MMP-9 przez TIMP-1 zapobiega powstaniu L-LTP [127].

Co więcej, w literaturze dokładnie opisany jest wpływ MMP-9 na morfologię kolców dendrytycznych neuronów hipokampa [107,170,175], co świadczy o zaangażowaniu tego białka również w tworzenie zmian strukturalnych w obrębie synapsy.

Ciekawych wyników dostarczyły badania nad regeneracją włókien nerwowych [32]. Regeneracja włókien po uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego jest związana z intensywnym przeorganizowaniem środowiska na zewnątrz komórki. MMP-2 i MMP-9 przyciągają uwagę szczególnie ze względu na zdolność do trawienia dużej liczby komponentów ECM po uszkodzeniach. Odnotowano wzrost ilości MMP-9 [32] po uszkodzeniu (przerwaniu) nerwów, sugerując korelację ze stanem zapalnym, przerwaniami bariery krew-mózg i degradacją neuronów. W kolejnych badaniach [31] zaobserwowano, że szczytowe poziomy MMP-9 i MMP-2 występują w różnych czasach. Poziom MMP-2 zaczyna wzrastać powoli po uszkodzeniu, a szczyt zostaje osiągnięty po siedmiu dniach. Natomiast MMP-9 osiąga maksimum już pierwszego dnia, a jej wzrost nakłada się czasowo z procesami degradacji neuronów i zapoczątkowaniem gliozy. Wydaje się, że MMP-2 mogłaby być związana z procesem powrotu do zdrowia, jej wzrost zaczyna się pojawiać po szczycie MMP-9. Badając myszy z ablacją genu dla MMP-9 wykazano, że wzrost MMP-2 jest niezależny od MMP-9. Dane wskazują, że MMP-2 oraz MMP-9 mogą odgrywać różne role w procesach uszkodzenia i naprawy,

gdzie MMP-2 inicjowałaby regenerację aksonów i ich wydłużanie [31]. Powyższe wnioski są zgodne z wynikami innych doświadczeń, z których wynika, że MMP-2 może regulować wzrost neurytów na długość [52,188].

Obie żelatynazy zaangażowane są również w powstawanie uzależnienia od substancji psychoaktywnych. Zarówno MMP-9 jak i MMP-2 biorą udział w rozwinięciu uzależnienia od metamfetaminy [109,110], a MMP-9 także od kokainy [22] i morfiny [84]. Rola metaloproteinaz w tym zjawisku może polegać na regulacji wyrzutu dopaminy w jądrze półkolumnym [109,110] lub interakcji z receptorem NMDA [84].

MMP-9 uczestniczy również w procesach patologicznej plastyczności, jakim jest epileptogeneza [177]. Wskazują na to doświadczenia z użyciem modeli zwierzęcych padaczki. Zwierzętom podawano wielokrotnie pentylenetetrazol (PTZ) w dawkach podprogowych, które początkowo nie wywoływały ataków drgawkowych, lecz po kilku podaniach u zwierząt obserwowano ataki drgawkowe, mimo takiej samej dawki PTZ – jest to tzw. rozniecanie padaczki. Udowodniono, że po stanie drgawkowym zarówno ekspresja jak i aktywność MMP-9 w obrębie zakrętu zębatego hipokampa wzrastają, co jest związane z eliminacją kolców dendrytycznych. Na podstawie hodowli organotypowych z hipokampa szczura stwierdzono, że MMP-9 jest potrzebna do tworzenia się nieprawidłowych połączeń synaptycznych między aksonami komórek ziarnistych hipokampa, a ich dendrytami [177]. Ten nieprawidłowy proces synaptyczny prowadzi do powstania pętli pobudzających sprzężeń zwrotnych, co wydaje się mieć istotny udział w powstawaniu ognisk padaczkowych [8,164].

Myszy pozbawione genu MMP-9 są mniej podatne na wywołanie padaczki, a intensywność zaniku kolców jest u nich mniejsza. Natomiast szczury transgeniczne z nadekspresją MMP-9 w neuronach są bardziej podatne na „rozniecanie” padaczki [177].

Jak dotąd, mechanizm molekularny działania MMP-9 na synapsę pozostaje słabo poznany. Spośród mnogości potencjalnych substratów, zidentyfikowano dwa białka, których trawienie może mieć związek z synaptyczną funkcją (funkcjami) tego enzymu:  $\beta$ -dystroglikan [105] i telencefalinę (ICAM-5) [170]. Również laminina wydaje się kandydatem na synaptyczny substrat MMP-9: jest substratem MMP-9 *in vitro* [161], trawiona przez tPA w zjawiskach plastyczności [129], a wiadomo, że tPA może być aktywatorem MMP-9 [161]. Wiadomo także, że MMP-9 działa w powiązaniu z integryną  $\beta 1$  [105,106,107,117], przy czym prawdopodobne są dwie możliwości:

- integryna oddziałuje z któryś z substratów MMP-9 albo
- integryna jest receptorem MMP-9.

Wykazano, że wpływ MMP-9 na morfologię kolców dendrytycznych oraz na ruchliwość receptora NMDA są zależne od integryny  $\beta 1$  [106,107]. Innym kandydatem na synaptyczny receptor MMP-9 jest CD44. Badania komórek raka piersi wykazały, że CD44 może zakotwiczać MMP-9 przy powierzchni błony komórkowej [47]. Inne obserwacje wskazują na ścisłą kolokalizację CD44 i MMP-9 w mózgu (Dzwonek i wsp., w przygotowaniu). Niewykluczone, że integryna  $\beta 1$  i CD44 współdziałają w wiązaniu MMP-9

w synapsie jako koreceptory, tak jak w komórkach hemoepoetycznych [143].

### MMP-3

MMP-3 jest ekspresjonowana w obrębie formacji hipokampa i wzrasta podczas reaktywnej synaptogenezy następującej po uszkodzeniu mózgu [71], a także pod wpływem uczenia w zadaniu biernego unikania [128] oraz habituacji [180]. Natomiast trening w labiryncie Morrisa powoduje wzrost poziomu zarówno MMP-3 jak i MMP-9 [102]. Co więcej, zahamowanie aktywności tych enzymów zmienia LTP i zmniejsza zdolność szczurów do uczenia się w labiryncie Morrisa [102].

Mimo doniesień na temat udziału MMP-3 w plastyczności synaptycznej i formowaniu się pamięci dokładny mechanizm tych zjawisk pozostaje niejasny. Biorąc pod uwagę zdolność MMP-3 do cięcia cząsteczek ECM, sugeruje się, że może ona wpływać na plastyczność synaptyczną poprzez reorganizację macierzy zewnątrzkomórkowej w okolicy synapsy. Istotnie, zakres substratowy MMP-3 jest szeroki i obejmuje agrekan, lamininę, fibronektynę, kolagen typu II, III, IV, V, IX, X, XI, entaktynę, perlekan, tenascynę, witronektynę, fibrynogen i elastynę [131]. Proces reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej występującej w okolicy synapsy mógłby być regulowany przez aktywację receptorów NMDA – aktywacja MMP-3 w tkance nerwowej podczas indukcji synaptogenezy w wyniku urazu jest zależna od aktywacji receptorów NMDA [71]. Inną możliwością jest bezpośrednie oddziaływanie MMP-3 z receptorami NMDA występującymi w błonie synaptycznej. Wykazano, że podjednostka NR1 receptora NMDA jest substratem MMP-3. Proteoliza NR1 następuje w miejscu wiązania glicyny i zależy od aktywacji receptora [136]. MMP-3 mogłoby również działać na synapsy pośrednio, dzięki zdolności do aktywacji MMP-9 [161]

Najnowsze badania wskazują, że MMP-3 może również ciąć  $\alpha$ -synukleinę [29]. Interakcja MMP-3 z synukleiną w komórkach dopaminergicznych może mieć zasadnicze znaczenie w patogenezie choroby Parkinsona.

### MMP-7

Kolejną opisaną w kontekście plastyczności metaloproteinazą jest MMP-7. MMP-7 nie ma C-końcowej domeny hemoepksynowej przez co enzym ten jest mniej podatny na wiązanie i inhibicję przez endogenne inhibitory MMPs (TIMPs). Poza tym MMP-7 ma względnie szeroki zakres substratów i tnie fibronektynę, lamininę, kolagen typu IV, V, IX, X, XI, żelatynę, agrekan, entaktynę, tenascynę, witronektynę i fibrynogen [131]. Rola MMP-7 w procesach plastyczności polega na modulowaniu czynności zarówno części pre- jak i postsynaptycznej.

Wpływ MMP-7 na część postsynaptyczną polega na modyfikowaniu funkcji receptora NMDA [167]. Wykazano, że MMP-7 tnie podjednostkę NR1 receptora NMDA z utworzeniem N-końcowego fragmentu. Także wyrzut jonów wapnia zależny od NMDA ulega istotnemu osłabieniu pod wpływem MMP-7 [167].

MMP-7 zmienia strukturę i funkcje zakończenia presynaptycznego. Po potraktowaniu hodowli neuronów MMP-7



zmniejszeniu uległa długość aktywnej strefy presynaptycznej oraz powierzchnia zakończenia presynaptycznego. Co więcej, rozmiar pęcherzyków synaptycznych był większy w porównaniu z grupą kontrolną, ich liczba została zredukowana, pęcherzyki były rzadziej upakowane w zakończeniu synaptycznym. Wreszcie chroniczne podawanie MMP-7 prowadziło do atrofii synaptycznej, włączając w to zmniejszenie zakończeń i zmniejszenie liczby pęcherzyków, co zostało uwidocznione w mikroskopie elektronowym. Te badania sugerują, że MMP-7 jest potencjalnym modulatorem przemian pęcherzyków synaptycznych i ultrastruktury synaptycznej [166].

Co więcej, MMP-7 indukuje transformację dojrzałych, krótkich grzybkosształtnych kolców do długich, cienkich, przypominających filopodia niedojrzałych kolców. Zmianom towarzyszyła redystrybucja F-aktyny z kolca do trzonu dendrytu. Tak więc MMP-7 może wpływać na morfologię dojrzałych kolców dendrytycznych i przez to na stabilność synaptyczną [11].

### MT5-MMP

MT5-MMP jest szczególnie interesująca, ponieważ w przeciwieństwie do innych błonowych MMP, występuje

w dwóch postaciach: związanej z błoną komórkową i rozpuszczalnej [140]. W porównaniu do wcześniej opisanych metaloproteinaz, MT5-MMP charakteryzuje się dość wąskim zakresem substratowym i tnie fibronektynę, żelatynę i proteoglikany [131] oraz kadheryny [111].

W obrębie ośrodkowego układu nerwowego MT5-MMP ulega ekspresji w hipokampie i mózdku [68,153], z preferencją do lokalizacji w obrębie neuronów [61] i synaps [112].

MT5-MMP odgrywa główną rolę podczas rozwoju układu nerwowego [68,87,140], natomiast w dojrzałym układzie nerwowym inicjuje wydłużanie aksonów [61]. Wykazano, że rozpuszczalna postać MT5-MMP może się wiązać z ABP (AMPA receptor binding protein) w obrębie zagęszczenia postsynaptycznego [112]. Ta interakcja prowadzi niejako do nakierowania aktywności proteolitycznej MT5-MMP w okolicę synapsy, gdzie uczestniczy w regulacji kierunku wzrostu poprzez przebudowę lokalnego środowiska [112].

### PODZIĘKOWANIE

Dziękujemy Adamowi Gorlewiczowi za pomoc w przygotowaniu rysunku 1.

### PIŚMIENNICTWO

- [1] Agapova O.A., Ricard C.S., Salvador-Silva M., Hernandez M.R.: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. *Glia*, 2001; 33: 205–216
- [2] Andreassen P.A., Sottrup-Jensen L., Kjoller L., Nykjaer A., Moestrup S.K., Petersen C.M., Gliemann J.: Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett.*, 1994; 338: 239–245
- [3] Asai H., Yokoyama S., Morita S., Maeda N., Miyata S.: Functional difference of receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta/beta isoforms in neurogenesis of hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2009; 164: 1020–1030
- [4] Baker J.B., Low D.A., Simmer R.L., Cunningham D.D.: Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell*, 1980; 21: 37–45
- [5] Baranes D., Lederfein D., Huang Y.Y., Chen M., Bailey C.H., Kandel E.R.: Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*, 1998; 21: 813–825
- [6] Barnes P., Thomas K.L.: Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS One*, 2008; 3: e3248
- [7] Basham M.E., Seeds N.W.: Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. *J Neurochem.*, 2001; 77: 318–325
- [8] Ben-Ari Y.: Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia*, 2001; 42(Suppl.3): 5–7
- [9] Benchenane K., Castel H., Boulouard M., Bluthé R., Fernandez-Monreal M., Roussel B.D., Lopez-Atalaya J.P., Butt-Gueulle S., Agin V., Maubert E., Dantzer R., Touzani O., Dauphin F., Vivien D., Ali C.: Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J. Cell Sci.*, 2007; 120: 578–585
- [10] Berger P., Kozlov S.V., Cinelli P., Kruger S.R., Vogt L., Sonderegger P.: Neuronal depolarization enhances the transcription of the neuronal serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol. Cell Neurosci.*, 1999; 14: 455–467
- [11] Bilousova T.V., Rusakov D.A., Ethell D.W., Ethell I.M.: Matrix metalloproteinase-7 disrupts dendritic spines in hippocampal neurons through NMDA receptor activation. *J. Neurochem.*, 2006; 97: 44–56
- [12] Binder B.R., Christ G., Gruber F., Grubic N., Hufnagl P., Krebs M., Mihaly J., Prager G.W.: Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci.*, 2002; 17: 56–61
- [13] Blake D.J., Weir A., Newey S.E., Davies K.E.: Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 291–329
- [14] Bode W., Renatus M.: Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1997; 7: 865–872
- [15] Boeckers T.M.: The postsynaptic density. *Cell Tissue Res.*, 2006; 326: 409–422
- [16] Bonhoeffer T., Yuste R.: Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron*, 2002; 35: 1019–1027
- [17] Bourne J.N., Harris K.M.: Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2008; 31: 47–67
- [18] Bozdagi O., Nagy V., Kwei K.T., Huntley G.W.: *In vivo* roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J. Neurophysiol.*, 2007; 98: 334–344
- [19] Bozdagi O., Shan W., Tanaka H., Benson D.L., Huntley G.W.: Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*, 2000; 28: 245–259
- [20] Bramham C.R.: Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr. Op. Neurobiol.*, 2008; 18: 524–531
- [21] Bramham C.R., Wells D.G.: Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2007; 8: 776–789
- [22] Brown T.E., Forquer M.R., Harding J.W., Wright J.W., Sorg B.A.: Increase in matrix metalloproteinase-9 levels in the rat medial prefrontal cortex after cocaine reinstatement of conditioned place preference. *Synapse*, 2008; 62: 886–889
- [23] Bruno M.A., Cuello A.C.: Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 6735–6740
- [24] Buckmaster P.S., Zhang G.F., Yamawaki R.: Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 6650–6658
- [25] Calabresi P., Napolitano M., Centonze D., Marfia G.A., Gubellini P., Teule M.A., Berretta N., Bernardi G., Frati L., Tolu M., Gulino A.: Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 1002–1012
- [26] Centonze D., Napolitano M., Saulle E., Gubellini P., Picconi B., Martorana A., Pisani A., Gulino A., Bernardi G., Calabresi P.: Tissue plasminogen activator is required for corticostriatal long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.*, 2002; 16: 713–721
- [27] Chen Z.L., Strickland S.: Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*, 1997; 91: 917–925

- [28] Chen Z.L., Yoshida S., Kato K., Momota Y., Suzuki J., Tanaka T., Ito J., Nishino H., Aimoto S., Kiyama H., Shiosaka S.: Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 1995; 15: 5088–5097
- [29] Choi D.H., Kim Y.J., Kim Y.G., Joh T.H., Beal M.F., Kim Y.S.: Role of matrix metalloproteinase 3-mediated alpha-synuclein cleavage in dopaminergic cell death. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 14168–14177
- [30] Chow J.P., Fujikawa A., Shimizu H., Noda M.: Plasmin-mediated processing of protein tyrosine phosphatase receptor type Z in the mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 2008; 442: 208–212
- [31] Costanzo R.M., Perrino L.A.: Peak in matrix metalloproteinases-2 levels observed during recovery from olfactory nerve injury. *Neuroreport*, 2008; 19: 327–331
- [32] Costanzo R.M., Perrino L.A., Kobayashi M.: Response of matrix metalloproteinase-9 to olfactory nerve injury. *Neuroreport*, 2006; 17: 1787–1791
- [33] Dalva M.B., McClelland A.C., Kayser M.S.: Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2007; 8: 206–220
- [34] Davies B., Kearns I.R., Ure J., Davies C.H., Lathe R.: Loss of hippocampal serine protease BSP1/neurosin predisposes to global seizure activity. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 6993–7000
- [35] Davies B.J., Pickard B.S., Steel M., Morris R.G., Lathe R.: Serine proteases in rodent hippocampus. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 23004–23011
- [36] Davis R.L., Shrimpton A.E., Carrell R.W., Lomas D.A., Gerhard L., Baumann B., Lawrence D.A., Yepes M., Kim T.S., Ghetti B., Piccardo P., Takao M., Lacbawan F., Muenke M., Sifers R.N., Bradshaw C.B., Kent P.F., Collins G.H., Larocca D., Holohan P.D.: Association between conformational mutations in neuroserpin and onset and severity of dementia. *Lancet*, 2002; 359: 2242–2247
- [37] Dityatev A., Schachner M.: Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003; 4: 456–468
- [38] Dityatev A., Schachner M.: The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res.*, 2006; 326: 647–654
- [39] Dzwonek J., Rylski M., Kaczmarek L.: Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett.*, 2004; 567: 129–135
- [40] Echeverry R., Wu J., Haile W.B., Guzman J., Yepes M.: Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 2194–2205
- [41] Endo A., Nagai N., Urano T., Takada Y., Hashimoto K., Takada A.: Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus. *Neurosci. Res.*, 1999; 33: 1–8
- [42] Ethell I.M., Ethell D.W.: Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J. Neurosci. Res.*, 2007; 85: 2813–2823
- [43] Fang M., Kovacs K.J., Fisher L.L., Larson A.A.: Thrombin inhibits NMDA-mediated nociceptive activity in the mouse: possible mediation by endothelin. *J. Physiol.*, 2003; 549: 903–917
- [44] Fanjul-Fernandez M., Folgueras A.R., Cabrera S., Lopez-Otin C.: Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1803: 3–19
- [45] Fellin T.: Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J. Neurochem.*, 2009; 108: 533–544
- [46] Fernandez-Monreal M., Lopez-Atalaya J.P., Benchenane K., Cacquevel M., Dulin F., Le Caer J.P., Rossier J., Jarrige A.C., Mackenzie E.T., Colloc'h N., Ali C., Vivien D.: Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 50850–50856
- [47] Fridman R., Toth M., Chvyrkova I., Meroueh S.O., Mobashery S.: Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev.*, 2003; 22: 153–166
- [48] Fukazawa Y., Saitoh Y., Ozawa F., Ohta Y., Mizuno K., Inokuchi K.: Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance *in vivo*. *Neuron*, 2003; 38: 447–460
- [49] Gawlak M., Gorkiewicz T., Gorlewicz A., Konopacki F.A., Kaczmarek L., Wilczynski G.M.: High resolution *in situ* zymography reveals matrix metalloproteinase activity at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 2009; 158: 167–176
- [50] Gingrich M.B., Junge C.E., Lyuboslavsky P., Traynelis S.F.: Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 4582–4595
- [51] Godfrey C., Clement E., Mein R., Brockington M., Smith J., Talim B., Straub V., Robb S., Quinlivan R., Feng L., Jimenez-Mallebrera C., Mercuri E., Manzur A.Y., Kinali M., Torelli S., Brown S.C., Sewry C.A., Bushby K., Topaloglu H., North K., Abbs S., Muntoni F.: Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*, 2007; 130: 2725–2735
- [52] Gonthier B., Koncina E., Satkauskas S., Perraut M., Roussel G., Aunis D., Kapfhammer J.P., Bagnard D.: A PKC-dependent recruitment of MMP-2 controls semaphorin-3A growth-promoting effect in cortical dendrites. *PLoS One*, 2009; 4: e5099
- [53] Gorkiewicz T., Szczuraszek K., Wyrembek P., Michaluk P., Kaczmarek L., Mozrzymas J.W.: Matrix metalloproteinase-9 reversibly affects the time course of NMDA-induced currents in cultured rat hippocampal neurons. *Hippocampus*, 2010; 20: 1105–1108
- [54] Griffin J.W., Thompson W.J.: Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia*, 2008; 56: 1518–1531
- [55] Gualandris A., Jones T.E., Strickland S., Tsirka S.E.: Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 2220–2225
- [56] Gutierrez-Fernandez A., Gingles N.A., Bai H., Castellino F.J., Parmer R.J., Miles L.A.: Plasminogen enhances neurogenesis on laminin-1. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 12393–12400
- [57] Hajjar K.A., Mauri L., Jacovina A.T., Zhong F., Mirza U.A., Padovan J.C., Chait B.T.: Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 9987–9993
- [58] Harada A., Shiosaka S., Ishikawa Y., Komai S.: Acute stress increases neurosin mRNA expression in the mouse hippocampus through the glucocorticoid pathway. *Neuroscience Lett.*, 2008; 436: 273–277
- [59] Hastings G.A., Coleman T.A., Haudenschild C.C., Stefansson S., Smith E.P., Barthlow R., Cherry S., Sandkvist M., Lawrence D.A.: Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 33062–33067
- [60] Hayashi N., Oohira A., Miyata S.: Synaptic localization of receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta/beta in the cerebral and hippocampal neurons of adult rats. *Brain Res.*, 2005; 1050: 163–169
- [61] Hayashita-Kinoh H., Kinoh H., Okada A., Komori K., Itoh Y., Chiba T., Kajita M., Yana I., Seiki M.: Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. *Cell Growth Differ.*, 2001; 12: 573–580
- [62] Hedstrom L.: Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.*, 2002; 102: 4501–4524
- [63] Herz J., Strickland D.K.: LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 779–784
- [64] Hirata A., Yoshida S., Inoue N., Matsumoto-Miyai K., Ninomiya A., Taniguchi M., Matsuyama T., Kato K., Iizasa H., Kataoka Y., Yoshida N., Shiosaka S.: Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neurosin-deficient mice. *Mol. Cell Neurosci.*, 2001; 17: 600–610
- [65] Hoffman K.B., Martinez J., Lynch G.: Proteolysis of cell adhesion molecules by serine proteases: a role in long term potentiation? *Brain Res.*, 1998; 811: 29–33
- [66] Huang Y.Y., Bach M.E., Lipp H.P., Zhuo M., Wolfer D.P., Hawkins R.D., Schoonjans L., Kandel E.R., Godfraind J.M., Mulligan R., Collen D., Carmeliet P.: Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 8699–8704
- [67] Iyer A.M., Zurolo E., Boer K., Baayen J.C., Giangaspero F., Arcella A., Di Gennaro G.C., Esposito V., Spliet W.G., van Rijen P.C., Troost D., Gorter J.A., Aronica E.: Tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator in human epileptogenic pathologies. *Neuroscience*, 2010; 167: 929–945
- [68] Jaworski D.M.: Developmental regulation of membrane type-5 matrix metalloproteinase (MT5-MMP) expression in the rat nervous system. *Brain Res.*, 2000; 860: 174–177
- [69] Johnson D.E.: Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia*, 2000; 14: 1695–1703

- [70] Kato K., Kishi T., Kamachi T., Akisada M., Oka T., Midorikawa R., Takio K., Dohmae N., Bird P.L., Sun J., Scott F., Miyake Y., Yamamoto K., Machida A., Tanaka T., Matsumoto K., Shibata M., Shiosaka S.: Serine proteinase inhibitor 3 and murinoglobulin I are potent inhibitors of neuropsin in adult mouse brain. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 14562–14571
- [71] Kim H.J., Fillmore H.L., Reeves T.M., Phillips L.L.: Elevation of hippocampal MMP-3 expression and activity during trauma-induced synaptogenesis. *Exp. Neurol.*, 2005; 192: 60–72
- [72] Kim Y.H., Park J.H., Hong S.H., Koh J.Y.: Nonproteolytic neuroprotection by human recombinant tissue plasminogen activator. *Science*, 1999; 284: 647–650
- [73] Koirala S., Reddy L.V., Ko C.P.: Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *J. Neurocytology*, 2003; 32: 987–1002
- [74] Komai S., Matsuyama T., Matsumoto K., Kato K., Kobayashi M., Imamura K., Yoshida S., Ugawa S., Shiosaka S.: Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 1479–1486
- [75] Konopacki F.A., Rylski M., Wilczek E., Amborska R., Detka D., Kaczmarek L., Wilczynski G.M.: Synaptic localization of seizure-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA. *Neuroscience*, 2007; 150: 31–39
- [76] Krueger S.R., Ghisu G.P., Cinelli P., Gschwend T.P., Osterwalder T., Wolfer D.P., Sonderegger P.: Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J. Neurosci.*, 1997; 17: 8984–8996
- [77] Kvaajo M., Albrecht H., Meins M., Hengst U., Troncoso E., Lefort S., Kiss J.Z., Petersen C.C., Monard D.: Regulation of brain proteolytic activity is necessary for the *in vivo* function of NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 9734–9743
- [78] Lee C.J., Mannaioni G., Yuan H., Woo D.H., Gingrich M.B., Traynelis S.F.: Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J. Physiol.*, 2007; 581: 1057–1081
- [79] Lee H.Y., Hwang I.Y., Im H., Koh J.Y., Kim Y.H.: Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.*, 2007; 101: 1236–1247
- [80] Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L.: Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 2001; 294: 1945–1948
- [81] Li W.Y., Chong S.S., Huang E.Y., Tuan T.L.: Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing? *Wound Repair Regen.*, 2003; 11: 239–247
- [82] Liot G., Roussel B.D., Lebeurrier N., Benchenane K., Lopez-Atalaya J.P., Vivien D., Ali C.: Tissue-type plasminogen activator rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J. Neurochemistry*, 2006; 98: 1458–1464
- [83] Liu D., Cheng T., Guo H., Fernandez J.A., Griffin J.H., Song X., Zlokovic B.V.: Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat. Med.*, 2004; 10: 1379–1383
- [84] Liu W.T., Han Y., Liu Y.P., Song A.A., Barnes B., Song X.J.: Spinal matrix metalloproteinase-9 contributes to physical dependence on morphine in mice. *J. Neurosci.*, 2010; 30: 7613–7623
- [85] Lochner J.E., Honigman L.S., Grant W.F., Gessford S.K., Hansen A.B., Silverman M.A., Scalettar B.A.: Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J. Neurobiology*, 2006; 66: 564–577
- [86] Lochner J.E., Spangler E., Chavarha M., Jacobs C., McAllister K., Schuttner L.C., Scalettar B.A.: Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Develop. Neurobiology*, 2008; 68: 1243–1256
- [87] Luo J.: The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. *Cerebellum*, 2005; 4: 239–245
- [88] Luthi A., Van der Putten H., Botteri F.M., Mansuy I.M., Meins M., Frey U., Sansig G., Portet C., Schmutz M., Schroder M., Nitsch C., Laurent J.P., Monard D.: Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 1997; 17: 4688–4699
- [89] Macrez R., Bezin L., Le Mauff B., Ali C., Vivien D.: Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 Subunit of N-methyl-D-aspartate receptors during stroke. *Stroke*, 2010; 41: 2950–2955
- [90] Madani R., Hulo S., Toni N., Madani H., Steimer T., Muller D., Vassalli J.D.: Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.*, 1999; 18: 3007–3012
- [91] Madani R., Kozlov S., Akhmedov A., Cinelli P., Kinter J., Lipp H.P., Sonderegger P., Wolfer D.P.: Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2003; 23: 473–494
- [92] Maiya R., Zhou Y., Norris E.H., Kreek M.J., Strickland S.: Tissue plasminogen activator modulates the cellular and behavioral response to cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 1983–1988
- [93] Makarova A., Mikhailenko I., Bugge T.H., List K., Lawrence D.A., Strickland D.K.: The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 50250–50258
- [94] Mannaioni G., Orr A.G., Hamill C.E., Yuan H., Pedone K.H., McCoy K.L., Berlinguer Palmieri R., Junge C.E., Lee C.J., Yepes M., Hepler J.R., Traynelis S.F.: Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 20600–20611
- [95] Martin A.M., Kuhlmann C., Trossbach S., Jaeger S., Waldron E., Roebroek A., Luhmann H.J., Laatsch A., Weggen S., Lessmann V., Pietrzyk C.U.: The functional role of the second NPXY motif of the LRP1  $\beta$ -chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 12004–12013
- [96] Mataga N., Mizuguchi Y., Hensch T.K.: Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron*, 2004; 44: 1031–1041
- [97] Matsumoto-Miyai K., Ninomiya A., Yamasaki H., Tamura H., Nakamura Y., Shiosaka S.: NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 7727–7736
- [98] Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C., Kasai H.: Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 2004; 429: 761–766
- [99] Matys T., Strickland S.: Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat. Med.*, 2003; 9: 371–372
- [100] McKinney R.A., Thompson S.M.: Glutamate regulation of dendritic spine form and function. *W. Encyclopedia of Neuroscience*, red.: L. Squire, Elsevier, 2009
- [101] Medina M.G., Ledesma M.D., Dominguez J.E., Medina M., Zafra D., Alameda F., Dotti C.G., Navarro P.: Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *EMBO J.*, 2005; 24: 1706–1716
- [102] Meighan S.E., Meighan P.C., Choudhury P., Davis C.J., Olson M.L., Zornes P.A., Wright J.W., Harding J.W.: Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J. Neurochem.*, 2006; 96: 1227–1241
- [103] Meins M., Herry C., Muller C., Ciochi S., Moreno E., Luthi A., Monard D.: Impaired fear extinction in mice lacking protease nexin-1. *Eur. J. Neurosci.*, 2010; 31: 2033–2042
- [104] Mhatre M., Nguyen A., Kashani S., Pham T., Adesina A., Grammas P.: Thrombin, a mediator of neurotoxicity and memory impairment. *Neurobiol. Aging*, 2004; 25: 783–793
- [105] Michaluk P., Kolodziej L., Mioduszevska B., Wilczynski G.M., Dzwonek J., Jaworski J., Gorecki D.C., Ottersen O.P., Kaczmarek L.:  $\beta$ -dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 16036–16041
- [106] Michaluk P., Mikasova L., Groc L., Frischknecht R., Choquet D., Kaczmarek L.: Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin  $\beta$ 1 signaling. *J. Neurosci.*, 2009; 29: 6007–6012
- [107] Michaluk P., Wawrzyniak M., Alot P., Szczot M., Wyrembek P., Mercik K., Medvedev N., Wilczek E., De Roo M., Zuschratter W., Muller D., Wilczynski G.M., Mozrzyms J.W., Stewart M.G., Kaczmarek L., Wlodarczyk J.: Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 3369–3380
- [108] Mitsui S., Tsuruoka N., Yamashiro K., Nakazato H., Yamaguchi N.: A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 260: 627–634



- [109] Mizoguchi H., Yamada K., Mouri A., Niwa M., Mizuno T., Noda Y., Nitta A., Itohara S., Banno Y., Nabeshima T.: Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. *J. Neurochem.*, 2007; 102: 1548–1560
- [110] Mizoguchi H., Yamada K., Niwa M., Mouri A., Mizuno T., Noda Y., Nitta A., Itohara S., Banno Y., Nabeshima T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *J. Neurochem.*, 2007; 100: 1579–1588
- [111] Momota Y., Yoshida S., Ito J., Shibata M., Kato K., Sakurai K., Matsumoto K., Shiosaka S.: Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur. J. Neurosci.*, 1998; 10: 760–764
- [112] Monea S., Jordan B.A., Srivastava S., DeSouza S., Ziff E.B.: Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. *J. Neurosci.*, 2006; 26: 2300–2312
- [113] Montgomery J.M., Madison D.V.: Discrete synaptic states define a major mechanism of synapse plasticity. *Trends Neurosci.*, 2004; 27: 744–750
- [114] Moore S.A., Saito F., Chen J., Michele D.E., Henry M.D., Messing A., Cohn R.D., Ross-Barta S.E., Westra S., Williamson R.A., Hoshi T., Campbell K.P.: Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*, 2002; 418: 422–425
- [115] Mossakowski M.: Tkanka nerwowa. W: *Histologia*, red.: K. Ostrowski, PZWL, Warszawa 1995
- [116] Nagai N., Urano T., Endo A., Takahashi H., Takada Y., Takada A.: Neuronal degeneration and a decrease in laminin-like immunoreactivity is associated with elevated tissue-type plasminogen activator in the rat hippocampus after kainic acid injection. *Neurosci. Res.*, 1999; 33: 147–154
- [117] Nagai T., Yamada K., Yoshimura M., Ishikawa K., Miyamoto Y., Hashimoto K., Noda Y., Nitta A., Nabeshima T.: The tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 3650–3655
- [118] Nagy V., Bozdagi O., Matynia A., Balcerzyk M., Okulski P., Dzwonek J., Costa R.M., Silva A.J., Kaczmarek L., Huntley G.W.: Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J. Neurosci.*, 2006; 26: 1923–1934
- [119] Nakagami Y., Abe K., Nishiyama N., Matsuki N.: Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. *J. Neurosci.* 2000; 20: 2003–2010
- [120] Nakamura Y., Tamura H., Horinouchi K., Shiosaka S.: Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 1341–1349
- [121] Nicole O., Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie E.T., Vivien D., Buisson A.: The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.*, 2001; 7: 59–64
- [122] Nimchinsky E.A., Sabatini B.L., Svoboda K.: Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.*, 2002; 64: 313–353
- [123] Norris E.H., Strickland S.: Modulation of NR2B-regulated contextual fear in the hippocampus by the tissue plasminogen activator system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 13473–13478
- [124] Nowicka D., Liguz-Lecznar M., Skangiel-Kramska J.: A surface antigen delineating a subset of neurons in the primary somatosensory cortex of the mouse. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2003; 63: 185–195
- [125] Oka T., Akisada M., Okabe A., Sakurai K., Shiosaka S., Kato K.: Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture. *Neurosci. Lett.*, 2002; 321: 141–144
- [126] Okabe A., Momota Y., Yoshida S., Hirata A., Ito J., Nishino H., Shiosaka S.: Kindling induces neuropsin mRNA in the mouse brain. *Brain Res.*, 1996; 728: 116–120
- [127] Okulski P., Jay T.M., Jaworski J., Duniec K., Dzwonek J., Konopacki F.A., Wilczynski G.M., Sanchez-Capelo A., Mallet J., Kaczmarek L.: TIMP-1 abolishes MMP-9-dependent long-lasting long-term potentiation in the prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry*, 2007; 62: 359–362
- [128] Olson M.L., Meighan P.C., Brown T.E., Asay A.L., Benoist C.C., Harding J.W., Wright J.W.: Hippocampal MMP-3 elevation is associated with passive avoidance conditioning. *Regul. Pept.*, 2008; 146: 19–25
- [129] Oray S., Majewska A., Sur M.: Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron*, 2004; 44: 1021–1030
- [130] Osterwalder T., Contartese J., Stoeckli E.T., Kuhn T.B., Sonderegger P.: Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J.*, 1996; 15: 2944–2953
- [131] Overall C.M.: Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol. Biotechnol.*, 2002; 22: 51–86
- [132] Pang P.T., Teng H.K., Zaitsev E., Woo N.T., Sakata K., Zhen S., Teng K.K., Yung W.H., Hempstead B.L., Lu B.: Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 2004; 306: 487–491
- [133] Park L., Gallo E.F., Anrather J., Wang G., Norris E.H., Paul J., Strickland S., Iadecola C.: Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 1073–1078
- [134] Parmar P.K., Coates L.C., Pearson J.F., Hill R.M., Birch N.P.: Neuroserpin regulates neurite outgrowth in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J. Neurochem.*, 2002; 82: 1406–1415
- [135] Parpura V., Zorec R.: Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.*, 2010; 63: 83–92
- [136] Pauly T., Ratliff M., Pietrowski E., Neugebauer R., Schlicksupp A., Kirsch J., Kuhse J.: Activity-dependent shedding of the NMDA receptor glycine binding site by matrix metalloproteinase 3: a PUTATIVE mechanism of postsynaptic plasticity. *PLoS One*, 2008; 3: e2681
- [137] Pawlak R., Magarinos A.M., Melchor J., McEwen B., Strickland S.: Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.*, 2003; 6: 168–174
- [138] Pawlak R., Melchor J.P., Matys T., Skrzypiec A.E., Strickland S.: Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 443–448
- [139] Pawlak R., Rao B.S., Melchor J.P., Chattarji S., McEwen B., Strickland S.: Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 18201–18206
- [140] Pei D.: Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 8925–8932
- [141] Peters A., Palay S., Webster H.: *The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells.* Oxford University Press, New York 1991
- [142] Qian Z., Gilbert M.E., Colicos M.A., Kandel E.R., Kuhl D.: Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature*, 1993; 361: 453–457
- [143] Redondo-Munoz J., Ugarte-Berzal E., Garcia-Marco J.A., del Cerro M.H., Van den Steen P.E., Opendakker G., Terol M.J., Garcia-Pardo A.:  $\alpha 4\beta 1$  integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood*, 2008; 112: 169–178
- [144] Rogove A.D., Siao C., Keyt B., Strickland S., Tsirka S.E.: Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J. Cell Sci.*, 1999; 112: 4007–4016
- [145] Salles F.J., Strickland S.: Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 2125–2134
- [146] Samson A.L., Nevin S.T., Croucher D., Niego B., Daniel P.B., Weiss T.W., Moreno E., Monard D., Lawrence D.A., Medcalf R.L.: Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.*, 2008; 107: 1091–1101
- [147] Sappino A.P., Madani R., Huarte J., Belin D., Kiss J.Z., Wohlwend A., Vassalli J.D.: Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J. Clin. Invest.*, 1993; 92: 679–685
- [148] Schousboe A., Waagepetersen H.S.: Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox. Res.*, 2005; 8: 221–225
- [149] Seeds N.W., Basham M.E., Ferguson J.E.: Absence of tissue plasminogen activator gene or activity impairs mouse cerebellar motor learning. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 7368–7375
- [150] Seeds N.W., Basham M.E., Haffke S.P.: Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 14118–14123
- [151] Sekine-Aizawa Y., Hama E., Watanabe K., Tsubuki S., Kanai-Azuma M., Kanai Y., Arai H., Aizawa H., Iwata N., Saido T.C.: Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur. J. Neurosci.*, 2001; 13: 935–948



- [152] Sgambato A., Brancaccio A.: The dystroglycan complex: from biology to cancer. *J. Cell. Physiol.*, 2005; 205: 163–169
- [153] Sharon R., Abramovitz R., Miskin R.: Plasminogen mRNA induction in the mouse brain after kainate excitation: codistribution with plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) mRNA. *Brain Res.*, 2002; 104: 170–175
- [154] Shimizu C., Yoshida S., Shibata M., Kato K., Momota Y., Matsumoto K., Shiosaka T., Midorikawa R., Kamachi T., Kawabe A., Shiosaka S.: Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 11189–11196
- [155] Shin C.Y., Kundel M., Wells D.G.: Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 9425–9433
- [156] Shiosaka S.: Serine proteases regulating synaptic plasticity. *Anat. Sci. Int.*, 2004; 79: 137–144
- [157] Siao C.J., Tsirka S.E.: Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 3352–3358
- [158] Sim R.B., Laich A.: Serine proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000; 28: 545–550
- [159] Simpson C.S., Johnston H.M., Morris B.J.: Neuronal expression of protease-nexin 1 mRNA in rat brain. *Neurosci. Lett.*, 1994; 170: 286–290
- [160] Stefansson S., Muhammad S., Cheng X.F., Battey F.D., Strickland D.K., Lawrence D.A.: Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 6358–6366
- [161] Sternlicht M.D., Werb Z.: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2001; 17: 463–516
- [162] Sugita S., Saito F., Tang J., Satz J., Campbell K., Sudhof T.C.: A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J. Cell. Biol.*, 2001; 154: 435–445
- [163] Sumi Y., Dent M.A., Owen D.E., Seeley P.J., Morris R.J.: The expression of tissue and urokinase-type plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth. *Development*, 1992; 116: 625–637
- [164] Sutula T.P., Pitkanen A.: More evidence for seizure-induced neuron loss: is hippocampal sclerosis both cause and effect of epilepsy? *Neurology*, 2001; 57: 169–170
- [165] Suzuki J., Yoshida S., Chen Z.L., Momota Y., Kato K., Hirata A., Shiosaka S.: Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci. Res.*, 1995; 23: 345–351
- [166] Szklarczyk A., Conant K., Owens D.F., Ravin R., McKay R.D., Gerfen C.: Matrix metalloproteinase-7 modulates synaptic vesicle recycling and induces atrophy of neuronal synapses. *Neuroscience*, 2007; 149: 87–98
- [167] Szklarczyk A., Ewalefioh O., Beique J.C., Wang Y., Knorr D., Haughey N., Malpica T., Mattson M.P., Haganir R., Conant K.: MMP-7 cleaves the NR1 NMDA receptor subunit and modifies NMDA receptor function. *Faseb J.*, 2008; 22: 3757–3767
- [168] Szklarczyk A., Lapinska J., Rylski M., McKay R.D., Kaczmarek L.: Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 920–930
- [169] Tamura H., Ishikawa Y., Hino N., Maeda M., Yoshida S., Kaku S., Shiosaka S.: Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus *in vivo*. *J. Physiol.*, 2006; 570: 541–551
- [170] Tian L., Stefanidakis M., Ning L., Van Lint P., Nyman-Huttunen H., Libert C., Itohara S., Mishina M., Rauvala H., Gahmberg C.G.: Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J. Cell. Biol.*, 2007; 178: 687–700
- [171] Toni N., Buchs P.A., Nikonenko I., Povilaitite P., Parisi L., Muller D.: Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 6245–6251
- [172] Vaillant C., Michos O., Orolicki S., Brellier F., Taieb S., Moreno E., Te H., Zeller R., Monard D.: Protease nexin 1 and its receptor LRP modulate SHH signalling during cerebellar development. *Development*, 2007; 134: 1745–1754
- [173] Vogt K., Mellor J., Tong G., Nicoll R.: The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 2000; 26: 187–196
- [174] Volterra A., Meldolesi J.: Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005; 6: 626–640
- [175] Wang X.B., Bozdagi O., Nikitczuk J.S., Zhai Z.W., Zhou Q., Huntley G.W.: Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 19520–19525
- [176] Weinstein J.R., Gold S.J., Cunningham D.D., Gall C.M.: Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J. Neurosci.*, 1995; 15: 2906–2919
- [177] Wilczynski G.M., Konopacki F.A., Wilczek E., Lasiecka Z., Gorlewicz A., Michaluk P., Wawrzyniak M., Malinowska M., Okulski P., Kolodziej L.R., Konopka W., Duniec K., Mioduszewska B., Nikolaev E., Walczak A., Owczarek D., Gorecki D.C., Zuschratter W., Ottersen O.P., Kaczmarek L.: Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J. Cell Biol.*, 2008; 180: 1021–1035
- [178] Woo N.H., Teng H.K., Siao C.J., Chiaruttini C., Pang P.T., Milner T.A., Hempstead B.L., Lu B.: Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.*, 2005; 8: 1069–1077
- [179] Wright J.W., Harding J.W.: Contributions of matrix metalloproteinases to neural plasticity, habituation, associative learning and drug addiction. *Neural. Plast.*, 2009; 2009: 579382
- [180] Wright J.W., Meighan S.E., Murphy E.S., Holtfreter K.L., Davis C.J., Olson M.L., Benoist C.C., Muhunthan K., Harding J.W.: Habituation of the head-shake response induces changes in brain matrix metalloproteinases-3 (MMP-3) and -9. *Behav. Brain Res.*, 2006; 174: 78–85
- [181] Wu Y.P., Siao C.J., Lu W., Sung T.C., Frohman M.A., Milev P., Bugge T.H., Degen J.L., Levine J.M., Margolis R.U., Tsirka S.E.: The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J. Cell Biol.*, 2000; 148: 1295–1304
- [182] Yamada S., Nelson W.J.: Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007; 76: 267–294
- [183] Yazaki M., Liepnieks J.J., Murrell J.R., Takao M., Guenther B., Piccardo P., Farlow M.R., Ghetti B., Benson M.D.: Biochemical characterization of a neuroserpin variant associated with hereditary dementia. *Am. J. Pathol.*, 2001; 158: 227–233
- [184] Yuan H., Vance K.M., Junge C.E., Geballe M.T., Snyder J.P., Hepler J.R., Yepes M., Low C.M., Traynelis S.F.: The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 12862–12873
- [185] Zaccaria M.L., Di Tommaso F., Brancaccio A., Paggi P., Petrucci T.C.: Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neuroscience*, 2001; 104: 311–324
- [186] Zhang J.W., Deb S., Gottschall P.E.: Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur. J. Neurosci.*, 1998; 10: 3358–3368
- [187] Zhang Y., Kanaho Y., Frohman M.A., Tsirka S.E.: Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 1797–1805
- [188] Zhang Y., Klassen H.J., Tucker B.A., Perez M.T., Young M.J.: CNS progenitor cells promote a permissive environment for neurite outgrowth via a matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. *J. Neurosci.*, 2007; 27: 4499–4506
- [189] Zhuo M., Holtzman D.M., Li Y., Osaka H., DeMaro J., Jacquin M., Bu G.: Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 542–549
- [190] Zimmermann D.R., Dours-Zimmermann M.T.: Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.*, 2008; 130: 635–653

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.