

**UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Natálie Procházková**

Ovlivnění plasticity centrálního nervového systému v dospělosti a po poškození

Central nervous system plasticity in adulthood and after injury

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především své školitelce doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D., za její trpělivost, cenné odborné rady a vstřícný přístup, které mi při vedení práce věnovala, a také mým blízkým, kteří mně během psaní podporovali.

## **Abstrakt**

Perineurální sítě jsou strukturou extracelulární matrix centrálního nervového systému, obepínající některé subpopulace neuronů. Jejich vznik souvisí s uzavřením kritické periody a výrazným omezením plasticity. Ve zdravém organismu jsou perineurální sítě důležité pro stabilizaci zralého nervového systému, podporu vysoce aktivních neuronů a jejich ochranu. Při patologických stavech jsou však jedním z faktorů, které zabraňují správné obnově tkáně prostřednictvím tvorby gliové jizvy a zvýšením koncentrace látek s inhibičním efektem na růst neuronů. Rozrušením perineurálních sítí, například enzymaticky, je možné znovu otevřít kritickou periodu a obnovit plasticitu centrálního nervového systému. To vede k potenciaci růstu a větvení neuronů a celkové regeneraci centrálního nervového systému jak po mechanickém poškození, jako je například poranění míchy, tak při neurodegenerativních onemocněních, jako je Alzheimerova choroba. V Alzheimerově chorobě ovlivňují perineurální sítě stejně jako ve stárnoucím organismu zhoršování paměti a obnovení plasticity zde vede ke zlepšení synaptického přenosu, a tím i odstranění paměťového deficitu.

**Klíčová slova:** perineurální sítě, neurodegenerativní onemocnění, poranění CNS, Alzheimerova choroba, chondroitinsulfát proteoglykany

## **Abstract**

Perineural nets are a structure of extracellular matrix, enwrapping several subpopulations of neurons in the central nervous system. Their formation is linked to the closure of critical period and significant plasticity restriction. In a healthy organism, they are important for stabilisation of mature nervous system, support of highly active neurons, and neuroprotection. However, they are one of the factors that restrict tissue regeneration during pathological conditions by participating in the formation of glial scar and upregulating molecules that have inhibitory impact on neuron sprouting. Digestion of perineuronal nets, which is mostly achieved enzymatically, leads to re-opening of critical period and renewal of plasticity, potentiating neuronal sprouting and growth and overall regeneration of central nervous system after mechanical damage, such as spinal cord injury, or during neurodegenerative diseases, as is Alzheimer's disease. Perineural nets play a similar role in Alzheimer's disease and aging, where they participate in memory loss. Renewal of plasticity in these conditions leads to facilitation of synaptic transmission and therefore eliminating the memory deficit.

**Key words:** neurodegenerative diseases, CNS injury, Alzheimer's disease, perineural nets, chondroitinsulfate proteoglycans

# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
Úvod	3
Extracelulární matrix	4
Perineurální síť	5
Struktura PNS	6
Aggrecan	8
Versican	8
Neurocan	9
Brevican	9
Hyaluronan	9
Phosphacan	10
Tenasciny	10
Link Proteiny	10
Obnovení plasticity CNS	11
PNS a Alzheimerova choroba	13
Perineurální síť a paměť	16
PNS a paměť spojená se strachem	16
PNS a deklarativní paměť	18
PNS a APP model AD	20
PNS a model tauopatie	24
Diskuze	27
Závěr	28
Seznam použité literatury	29

## Seznam použitých zkratek

A $\beta$	amyloid- $\beta$
AAV	adenoasociovaný virus
AD	Alzheimerova choroba
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
APP	amyloidní prekurzorový protein
BLA	basolaterální jádro amygdaly
Bral1	brain link protein 1
Bral2	brain link protein 2
C6, C7	6. a 7. krční obratel
CNS	centrální nervový systém
CSPG	chondroitinsulfát proteoglykany
Ctrl1	cartilage link protein
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
ECM	extracelulární matrix
FCS	fear conditioning system, strach podmiňující systém
fEPSP	field excitatory postsynaptic potential, postsynaptický excitační potenciál
GABA	gamma-aminobutyric acid, kyselina gama-aminomáselná
GAG	glykosaminoglykany
GPI	glykosylfosfatidylinositol
HA	hyaluronic acid, hyaluronan
HAPLN	rodina genů „hyaluronan and proteoglycan binding link protein”
HAS	hyaluronan syntáza
chABC	chondroitináza ABC
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
ko	knockout
LH	left hind limb, zadní končetina
LTD	long-term depression, dlouhodobá deprese
LTP	long-term potentiation, dlouhodobá potenciace
N-CAM	neural cell adhesion molecule

NFT	neurofibrillary tangles, neurofibrilární uzlíky
NG2	neuroglia-2
Ng-CAM	neuron-glia cell adhesion molecule
NMDA	N-methyl-D-aspartátová kyselina
NS	nepodmíněný stimul
ORT	object recognition task, test rozpoznání objektů
Otx2	orthodenticle homeobox 2
P16	postnatální den 16
P23	postnatální den 23
PG	proteoglykan
Pnase,	penicilinase, penicilináza
PNS	perineurální síť
PPF	paired-pulse facilitation, párová pulzní facilitace
PS	podmíněný stimul
PTP $\sigma$	proteintyrosinfosfatáza $\sigma$
ROCK	Rho-asociovaná protein kináza
RPTP $\beta$	receptorový protein tyrozin fosfatázy $\beta$
SCI	spinal cord injury
tg	transgenní
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$ , transformační růstový faktor $\beta$
TN	tenascin
WFA	<i>Wisteria floribunda</i> agglutinin
wt	wild type

## Úvod

Plasticita systému je vlastnost, která určuje, do jaké míry je daný systém schopen podstupovat změny a přestavby. Plasticita centrálního nervového systému (CNS) je po několika týdnech od narození značně omezena kvůli vzniku struktury extracelulární matrix, zvané perineurální síť (PNS). CNS vykazuje v raném věku vysokou míru plasticity, což slouží ke správnému vývoji v odpovědi na okolní stimuly, tvorbu nervových spojů a dozrání celého systému. Po ukončení tohoto období, zvaného kritická perioda, PNS zafixují vzniklé synapse, a přestože nedojde k úplnému zabránění modifikací CNS, jeho plasticita je výrazně omezená. To sice zabraňuje jeho nechtěným přestavbám, ale také představuje překážku v regeneraci tkáně při patologických stavech. Proto se v současné době řada vědců věnuje otázce, zda je možné manipulovat s PNS, dočasně je z CNS odstranit a znovu tak otevřít kritickou periodu, což může mít pozitivní vliv na obnovu CNS během terapie mechanických poškození i neurodegenerativních chorob.

Cílem práce je ukázat, zda je možné ovlivnit plasticitu CNS rozrušením perineurálních sítí a pokud ano, jak lze tuto skutečnost využít v terapii normální a patologické CNS, zejména v ohledu na zlepšení paměti ve stáří a při Alzheimerově chorobě (AD). Stáří je hlavní rizikový faktor pro pacienty postižené AD. Třebaže poruchy paměti ke stáří přirozeně patří, u AD jsou jedním z prvních příznaků a choroba postupně poškodí mozek do té míry, že u pacienta nakonec dojde k rozkladu osobnosti. V tuto chvíli neexistuje žádný způsob, jak AD vyléčit, efektivní zmírnění symptomů a jejich oddálení by však ulehčilo těžkou situaci mnoha pacientům i jejich blízkým. Poruchy paměti ve stáří a v rané fázi AD mají sice jiné příčiny, ale podobný mechanismus, a poznatky získané z výzkumu stárnoucích zvířat by mohly být přínosné také v terapii AD. Má bakalářská práce proto nejen předloží popis struktury a funkce PNS ve zdravém organismu a možnosti, jak jimi manipulovat, ale také představí několik studií, které se věnují roli PNS v mechanismech paměti ve stáří i u AD.

## Extracelulární matrix

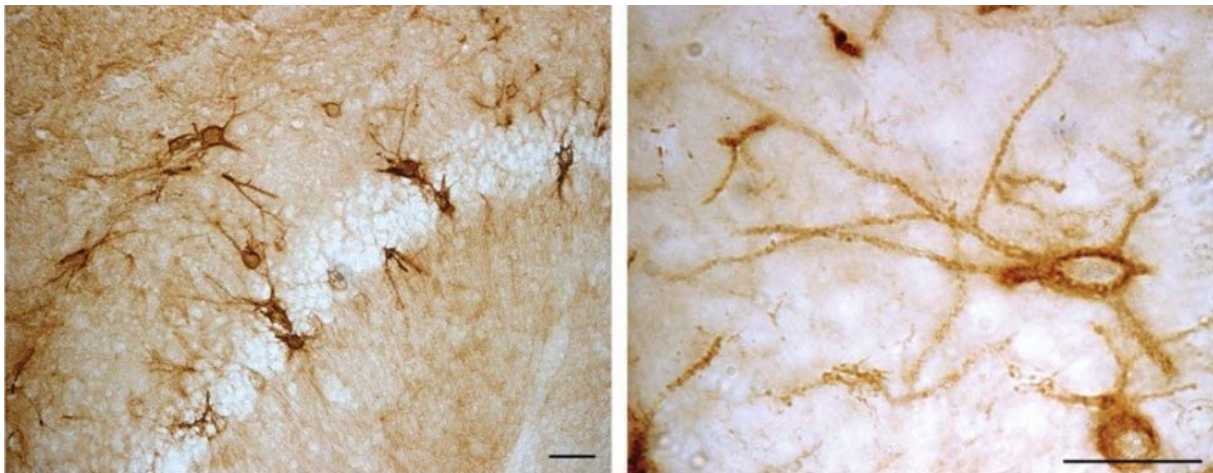
Stejně jako v dalších částech těla, i v centrální nervové soustavě (CNS) jsou buňky tkání obklopeny mikroprostředím, zvaným extracelulární matrix (ECM). Extracelulární matrix je mezibuněčná hmota vylučovaná vlastními buňkami, které potom obklopuje a komunikuje s nimi prostřednictvím buněčných receptorů na jejich povrchu (Novak & Kaye 2000). Sestává především z proteinů, glykosaminoglykanů a glykoproteinů. Nejrozšířenějšími složkami jsou např. kolagen, laminin či fibronectin a různé proteoglykany či integriny, kterými jsou buňky s ECM spojeny (Galtrey & Fawcett 2007). Přestože si je ECM napříč různými tkáněmi podobná, liší se zastoupením složek, a to jak jejich různými typy, tak poměrným množstvím, organizací a objemem ECM vůči objemu buněk dané tkáně. Jako protichůdné příklady lze uvést ECM pojiv, kde jsou buňky obklopeny velkým množstvím rozvolněnější mezibuněčné hmoty, a ECM epitelů, kde se ECM projevuje zejména jako bazální lamina k sobě těsně přisedlých buněk (Novak & Kaye 2000). Funkcí ECM je kromě strukturální úlohy také např. udržování homeostázy a podpora komunikace buněk mezi sebou, i s vnějším prostředím.

Extracelulární matrix CNS, která byla v letech 1897–1898 popsána vědci Santiagem Ramón y Cajal a Camillem Golgi, je unikátní v několika ohledech, a to jak strukturálních, tak funkčních. Stromatální prostory v mozku jsou histologicky špatně rozlišitelné, takže k potvrzení existence ECM v mozku došlo až v 80. letech a do té doby bylo rozšířené přesvědčení, že mozková tkáň je zcela zaplněna neurony a gliovými buňkami (Tani & Ametani, 1971). Přitom navzdory svým rozměrům, které činí pouze 20–60 nm na šířku, zabírá ECM až 20% objemu dospělého mozku (Nicholson et al. 2011; Nicholson & Sykova 1998). Extracelulární matrix je v CNS produkována Golgiho aparátem neuronů i gliových buněk (Dityatev & Schachner 2006) a liší se svým uspořádáním v závislosti na tom, ve kterém strukturálním či funkčním celku mozku se nachází (Novak & Kaye 2000; Dauth et al. 2016). Především je ale jiná než ECM jiných tkání těla, od kterých se odlišuje složením a obsahuje komponenty, nacházející se výlučně v mezibuněčné hmotě CNS. Takovými specifickými molekulami jsou například brevican, neurocan a phosphacan (Maurel et al. 1994; Ruoslahti 1996). Nápadný je rozdíl v množství vláknitých proteinů, jako jsou kolagen a fibronectin. Zatímco tyto proteiny se v ECM jiných tkání běžně vyskytují, v ECM mozku je nalzáme pouze v zanedbatelné míře (Yamaguchi 2000; Ruoslahti 1996). Oproti tomu v ní nalzáme velké množství glykosaminoglykanů, buďto spolu s proteiny formující proteoglykany, nebo volné ve formě hyaluronanů (Novak & Kaye 2000; Deepa et al. 2006). ECM má v centrálním nervovém systému důležité funkce, a to jak ve stadiu vývoje, tak v dospělém organismu a při

patologických stavech (Bonneh-Barkay & Wiley 2009). Je nezbytná pro přežití buněk, v reakci na jejich poškození, regeneraci a buněčné signalizaci (Kwok et al. 2011; Dauth et al. 2016) a dále pro tvorbu a stabilitu synapsí (De Luca & Papa 2016). Během vývoje má vliv na růst a migraci neuronů (Margolis & Margolis 1997). V dospělém mozku je ECM přítomná v mezibuněčných prostorech mezi neurony a gliovými buňkami (Yamaguchi 2000) a kromě své amorfní formy tvoří i speciální kondenzovanou strukturu - PNS, která se soustředí kolem určitých neuronů (Yamaguchi 2000; John et al. 2006). Právě tato struktura hraje klíčovou roli v plasticitě CNS.

## Perineurální síť

PNS jsou strukturou, která v podobě retikula těsně obepíná těla a proximální dendrity neuronů (Obr. 1.). Nalézají se také na iniciálních segmentech axonů, kde ponechávají otvory pro presynaptická zakončení jiných neuronů (Hockfield & McKay, 1983; Celio & Blümcke 1994). PNS se tvoří na různých typech neuronů, jako jsou excitační a inhibiční GABAergní neurony, a to jak v mozkové kůře, tak podkorových strukturách, konkrétně v hippocampu, thalamu, mozkovém kmeni a míše (Alpár et al. 2006).



**Obr. 1.** Perineurální síť v potkaním mozku vizualizované barvením aglutininem z rostliny *Wisteria floribunda*. PNS lze pozorovat zejména na povrchu těl a proximálních dendritů neuronů (Kwok et al. 2011).

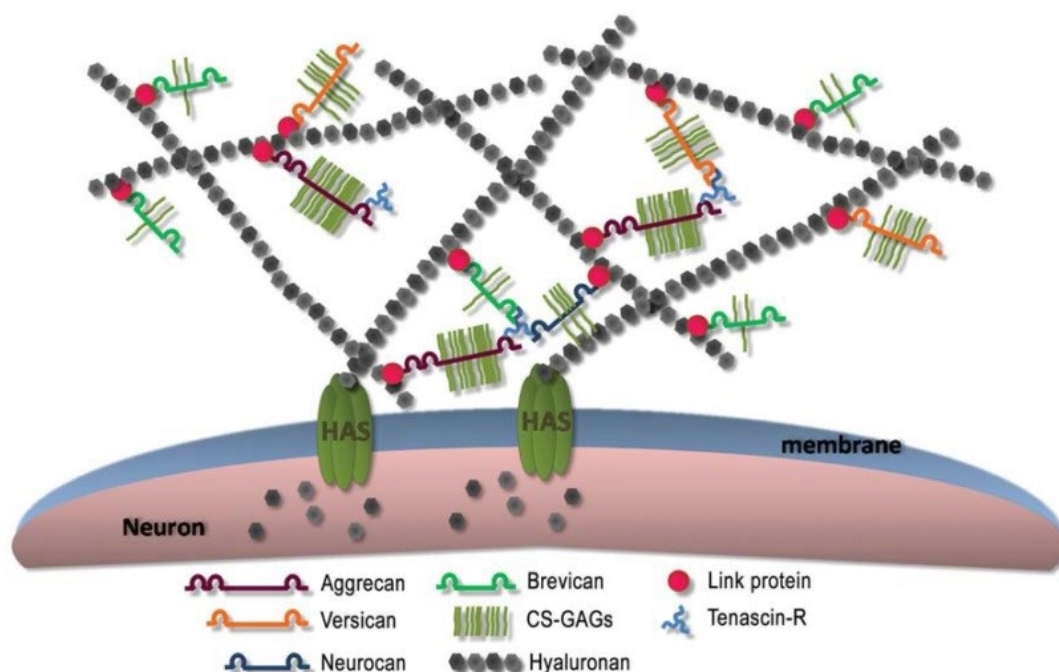
Na rozdíl od samotné extracelulární matrix se však PNS netvoří již během vývoje – jejich vznik je spojen s uzavřením kritické periody. Kritická perioda je období důležité zejména pro zrakovou kůru, během kterého se CNS vyznačuje největší mírou plasticity. Díky tomu na základě podnětů z vnějšího prostředí dospívá nezralý nervový systém, tvoří se nervová spojení a formuje se finální podoba celého centrálního nervového systému, zatímco při nedostatku podnětů dojde k patologickému vývoji (Pizzorusso 2002). Uzavření kritické

periody časově koreluje s detekcí PNS v organismu. Přestože PNS do určité míry umožňují změny v CNS i v dospělosti, jejich přítomnost vede k výraznému omezení plasticity (Pizzorusso 2002). Pro organismus je to důležité z hlediska stabilizace nově vytvořených synapsí, ochrany neuronů, reakce na poranění, regenerace a zabránění nechtěných změn ve stavbě CNS (Corvetti 2005; Carulli et al. 2010). Dále PNS poskytují ochranu před oxidativním stresem, regulaci iontové výměny kolem neuronů a iontovou homeostázu (Syková, 2004). Silný záporný náboj glykosaminoglykanů přítomných v PNS na sebe váže rozličné kationty přítomné v daném prostředí a reguluje tak difuzi iontů sodíku, draslíku a vápníku. PNS tak fungují jako pohotový výměník, což podporuje vysokou aktivitu neuronů, které obrůstají (Härtig et al., 2001). Inhibiční vlastnosti PNS však s sebou nesou také významné nevýhody, a to právě s ohledem na regeneraci po poranění či při patologických stavech. PNS jsou známé tím, že se účastní tvorby gliové jizvy, zabraňují růstu axonů a omezují plasticitu, a tím jsou omezeny i možnosti změn a přestaveb CNS nutných pro jeho obnovu (Smith-Thomas et al., 1995; Asher et al., 2000). Změny v jejich stavbě provází například Alzheimerovu chorobu, epilepsii, mrtvici (Galtrey & Fawcett 2007), účastní se také procesu stárnutí a hrají roli rovněž v procesech paměti. PNS se tak staly předmětem intenzivního výzkumu posledních dvou desetiletí, během kterých se do značné míry podařilo odhalit jejich tvorbu, strukturu, vztah k plasticitě a úlohu v její restrikci. Nalezeny a zkoumány byly u několika živočišných druhů včetně člověka. Existují metody, jak PNS modifikovat a jak jejich manipulaci využít v léčbě některých patologií CNS; zajímavým směrem výzkumu PNS posledních let je například jejich úloha v Alzheimerově chorobě (AD) a to, jak PNS ovlivňují paměť jak u AD, tak u zdravého a stárnoucího organismu.

## **Struktura PNS**

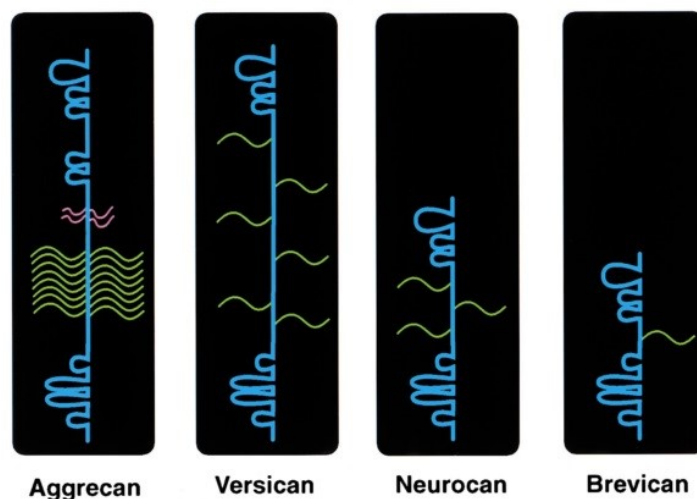
Odhalení struktury PNS bylo klíčové pro porozumění jejich tvorby a funkcí a v neposlední řadě také pro možnosti jejich modifikací, které mají význam ve výzkumu patologií s nimi spojených. V současnosti je jejich struktura dobře prozkoumána a od 90. let, kdy se vědci začali o perineurální síť více zajímat, byla na toto téma provedena řada studií.

Obecně lze říci, že perineurální síť tvoří následující skupiny molekul: Chondroitinsulfát proteoglykany (CSPG), hyaluronany (HA), link proteiny a tenasciny (Obr. 2). Dohromady tyto komponenty tvoří velké molekuly PNS. Pro ucelený přehled je však třeba jednotlivé složky PNS rozebrat do větších detailů.



**Obr. 2.** Struktura perineurálních sítí (Kwok et al. 2011).

Existují čtyři hlavní skupiny CSPG, avšak pro funkci extracelulární matrix CNS je podstatná rodina lectikanů (Ruoslahti 1996), kam patří versican (Zimmermann & Ruoslahti, 1989), aggrecan (Doege et al., 1991), neurocan (Rauch et al., 1992) a brevican (Yamada et al., 1994) (Obr. 3.). Dále mezi CSPG perineurálních sítí patří povrchově vázaný protein neuroglia 2 (NG2), phosphacan (Maurel et al., 1994) a decorin (Iozzo, 1999). Lectikany se mohou značně lišit ve své velikosti, která začíná na 90 kD u brevicanu a končí u 400 kD versicanu (Ruoslahti 1996). Mají společnou stavbu, sestávající z N-konce, na kterém je doména vázající hyaluronany, C-konce, jež váže tenasciny, a střední části – tzv. core proteinu, která nese až sto kovalentně vázaných postranních nevětvených řetězců glykosaminoglykanů (GAG) (Yamaguchi 2000; Silbert & Sugumaran 2002). Vlastní GAG se skládají z opakujících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-galaktosaminu spojených  $\beta$ -glykosidickou vazbou. V savčím organismu mohou být tyto jednotky opatřeny sulfáty v různých pozicích, nejčastěji v pozicích 2, 4 a 6 (Sugahara & Yamada, 2000). Četné kombinace různé délky řetězců core proteinu a různá uspořádání GAG řetězců a jejich sulfonace jsou odpovědné za značnou strukturální variabilitu CSPG, což významnou měrou ovlivňuje jejich biologické vlastnosti (Deepa et al. 2002; Maeda et al. 2003). Kromě níže popsaných CSPG jsou součástí PNS také další CSPG, jako jsou neuroglycan-C (Oohira et al. 2004), biglycan (Margolis & Margolis 1997) a decorin (Kappler et al. 1998).



**Obr. 3.** CSPG perineurálních sítí. Všechny obsahují core protein a C- a N- domény (modře) a chondroitinsulfátové řetězce (žlutě), aggrecan navíc obsahuje řetězce keratansulfátu (růžově) (Yamaguchi 2000).

### **Aggrecan**

Aggrecan, proteoglykan velký přibližně 210 kDa s velkým množstvím navázaných glykosaminoglykanů, je v organismu znám především jako součást pojivových tkání – bylo dokonce třeba překonat názor, že je exprimován výlučně v chrupavkách (Yamaguchi 2000). Ve skutečnosti je přítomen i v ECM jiných tkání včetně CNS, kde se nachází výlučně v perineurálních sítích a hraje roli ve vazbě hyaluronanu na povrch buněk pomocí link proteinů a tenascinů (Brückner et al., 1993). V PNS je zastoupen prakticky vždy, na rozdíl od zbylých lectikanů, jejichž výskyt se může lišit mezi subpopulacemi neuronů (Galtrey et al. 2008). Aggrecan je produkován především neurony, přičemž začíná být do určité míry exprimován již během vývoje. K větší produkci, která je spojena s nervovou aktivitou, však dochází až po narození, a reaguje tak na stimuly v raném postnatálním období ustavením zralých nervových spojení (Matthews et al. 2002).

### **Versican**

Versican je další velký proteoglykan nesoucí řetězce GAG, známý též z ECM jiných tkání, především pojiv. Vyskytuje se ve čtyřech isoformách V0, V1, V2 a V4, z nichž nejrozšířenější v CNS je V2 (Schmalfeldt et al. 1998). Stejně jako aggrecan, i versican je sice exprimován již během vývoje, ale nejvíce je produkován až po narození (Milev, Maurel, et al. 1998). Na rozdíl od aggrecanu je však exprimován především gliovými buňkami, a to astrocyty (Yamagata 2005) a nezralými oligodendrocyty (Asher et al. 2002). Versican má inhibiční účinek na růst axonů (Asher et al. 2002).

## **Neurocan**

Neurocan je spolu s brevicanem jediný CSPG specifický pro tkáň CNS (Yamada et al., 1994). Je exprimován neurony zejména v pozdějších stádiích vývoje mozku a v krátkém období po narození; poté míra exprese klesá (Oohira et al. 2000). Celý neurocan lze nalézt pouze v nedospělém mozku, jelikož v dospělém mozku podléhá štěpení a přítomné jsou pak pouze jeho fragmenty (Matsui et al., 1994; Milev et al., 1998). Výjimce podléhají zranění CNS, kdy se exprese neurocanu zvýší, je opět detekován v nerozštěpené podobě a je produkován astrocyty a oligodendrocyty (Asher et al. 2000; Matsui et al. 2002). Neurocan kromě vazby hyaluronanu a tenascinů interaguje například s molekulami buněčné adheze Ng-CAM a N-CAM (Friedlander et al., 1994), růstovými faktory a má vliv na buněčnou migraci a růst (Oohira et al. 2000).

## **Brevican**

Brevican je dalším CSPG, vyskytujícím se pouze v CNS (Yamada et al., 1994). Exprese brevicanu začíná během vývoje a postupně se zvyšuje až do dospělosti (Seidenbecher et al. 1995). Brevican je produkován jak neurony, tak gliemi (Yamada et al., 1994; Seidenbecher et al., 1995; John et al., 2006). Je to jediný lectikan, jež se vyskytuje také ve formě s glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou jako produkt alternativního sestřihu (splicing), a stává se tak buněčně vázaným receptorem hyaluronanů. Je však exprimován pouze gliemi bílé hmoty a mRNA této formy tvoří pouze 1% mRNA brevicanů v těchto buňkách (Seidenbecher et al., 1998). V PNS se brevican váže na link protein Bral2 (Bekku et al. 2003) a tenascin-R (Hagihara et al., 1999).

## **Hyaluronan**

Hyaluronan, neboli kyselina hyaluronová či hyaluronát, je dlouhý lineární polymer disacharidových jednotek N-acetylglukosaminu a glukuronové kyseliny (Meyer et al., 1951). Hyaluronan je jediný nesulfátovaný glykosaminoglykan v PNS a funguje jako páteř, která k sobě nekovalentně váže CSPG a GAG (Spicer, Joo & Bowling, 2003). Jeho syntézu zajišťuje enzym hyaluronan syntáza (HAS), umístěný na vnitřní straně plasmatické membrány buněk (Philipson & Schwartz, 1984; Weigel, Hascall & Tammi, 1997). Syntetizovaný hyaluronan se uvolňuje přímo během syntézy do extracelulární matrix, kde se váže na hyaluronan-vazebné domény lectikanů (Köppe et al. 1997). HAS jsou exprimovány všemi neurony, které mají PNS, a nedojde-li k odštěpení řetězce hyaluronanu, kotví celou strukturu PNS na membráně buněk (Toole 2004). Hyaluronan syntázy se u savců objevují ve třech isoformách HAS-1, HAS-2 a HAS-3 (Weigel et al. 1997). Hyaluronan je přítomen ve všech typech tkání. V CNS

má kromě interakce s lectikany a buněčnými receptory také úlohu v buněčné migraci a reakci na poškození (Novak & Kaye 2000).

### **Phosphacan**

Phosphacan, známý též jako DSD-1-PG, je CSPG, který nepatří do rodiny lectikanů. Phosphacan představuje celou extracelulární doménu receptorového proteinu tyrozin fosfatázy  $\beta$  (RPTP $\beta$ , což je transmembránový PG v nalézající se v mozku (Maurel et al. 1994). Phosphacan/RPTP $\beta$  je exprimován neurony i gliovými buňkami, a to jak během vývoje, tak v dospělosti (Maurel et al. 1994). Účastní se podobných vazebných interakcí jako neurocan: váže tenasciny (Grumet, Milev & Sakurai, 1994; Milev, Chiba, et al., 1998), molekuly buněčné adheze jako N-CAM a Ng-CAM/L1 (Milev et al. 1994) a contactin (Peles et al. 1995), a růstové faktory jako např. pleiotrophin či amphoterin (Milev, Chiba, et al. 1998).

### **Tenasciny**

Tenasciny patří do rodiny modulárních glykoproteinů o pěti členech, a to TN-C, TN-R, TN-W, TN-X a TN-Y. Tenasciny se nevyskytují pouze v nervovém systému, např. TN-C a TN-X jsou běžně přítomné v pojivových tkáních a hladkém svalstvu (Jones & Jones 2000). Pro PNS je důležitý zejména TN-R (Tucker & Chiquet-Ehrismann 2009). Tenasciny jsou multimerní molekuly extracelulární matrix a hrají roli v morfogenezi, vývoji nervového systému, regeneraci, buněčné migraci a reakci na poškození (Jones & Jones 2000). Na N-konci mají doménu zodpovědnou za tvorbu multimerů, přičemž TN-R tvoří trimery, které váží lectikany. Jeden trimer TN-R může vázat až tři molekuly lectikanů (Jones & Jones 2000). Tyto vazby přispívají k posílení a stabilizaci celé struktury perineurálních sítí a TN-R je nutný pro jejich normální vývoj (Weber et al. 1999).

### **Link Proteiny**

Link proteiny interagují jak s hyaluronany, tak CSPG a tím stabilizují celé agregáty (Matsumoto et al. 2003). Vzhledem ke svým vazebným vlastnostem patří do genové skupiny HAPLN (hyaluronan- and proteoglycan-binding link protein gene family), která má čtyři členy (Spicer et al. 2003). Všechny čtyři link proteiny jsou velké přibližně 38-43 kDa a mají podobnou strukturu. V nervovém systému nacházíme tři ze čtyř link proteinů, a to cartilage link protein Ctrl1 (HAPLN1), brain link protein Bral1 (HAPLN2) a Bral2 (HAPLN4). Bral2 se nalézá výlučně v dospělé nervové soustavě, a to především u myelinizovaných axonů v mozku a míše, kde je spolu s versicanem součástí tzv. perinodálních sítí na Ranvierových zářezech. Studie prováděné na myších s knockoutovaným genem HAPLN2 ukázaly, že bez

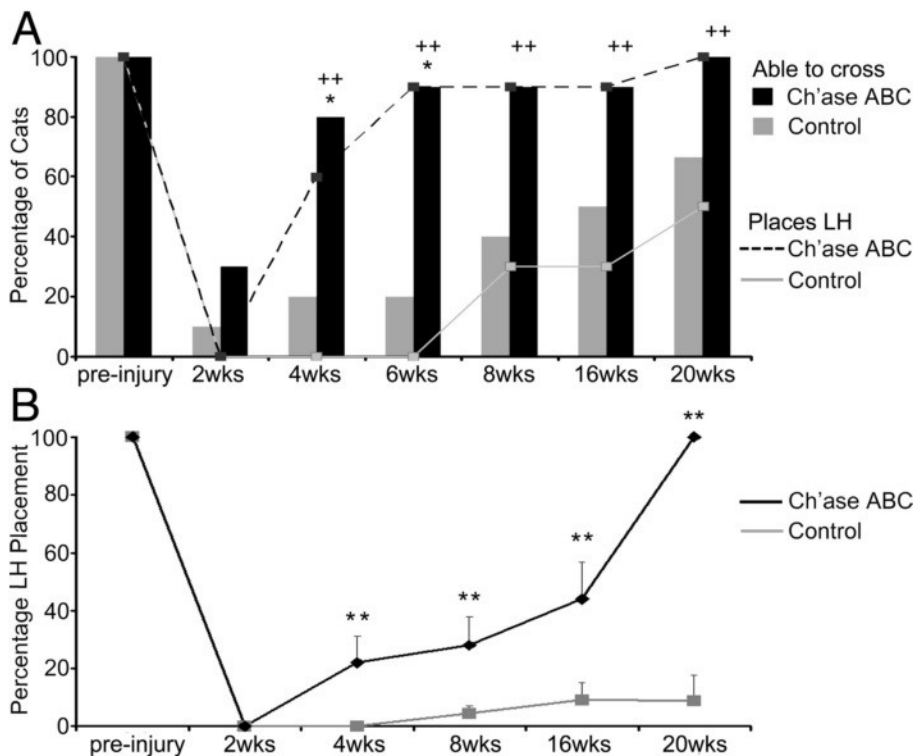
exprese Bral2 mají perinodální sítě abnormální difuzní strukturu a došlo také k poklesu vodivosti axonů (Hirakawa et al. 2000; Oohashi et al. 2002). Součástí perineurálních sítí jsou link proteiny Ctrl1 a Bral2 a jsou exprimovány výhradně neurony s PNS (Bekku et al. 2003; Rauch et al. 2004; Carulli et al. 2006). Ctrl1 je nezbytný pro zformování správné kondenzované struktury PNS (Carulli et al. 2010).

## **Obnovení plasticity CNS**

Tvorba perineurálních sítí kolem inhibičních interneuronů je klíčovou událostí v restrikci vývojové plasticity a modulaci synaptických spojů. Ke konci kritické periody podstupují CSPG v ECM změny ve svém složení a sulfonaci (Deepa et al. 2006). Zdá se, že pro regulaci synaptické plasticity je důležitý poměr sulfonací v poloze 4 a 6 (4S/6S) (Miyata et al., 2012). Zvýšení tohoto poměru vede k hromadění Otx2, což je homeoprotein zodpovědný za vývoj a dozrávání parvalbumin-exprimujících interneuronů, což jsou zároveň neurony, jež si vyvinou PNS (Miyata et al., 2012). CSPG v perineurálních sítích zprostředkovávají internalizaci tohoto proteinu do neuronů, což udržuje kritickou periodu uzavřenou a omezuje plasticitu CNS (Beurdeley et al., 2012). CSPG se kromě inhibice neuronálního růstu také účastní tvorby gliové jizvy, čímž přispívají ke znemožnění regenerace. Expres těchto složek PNS astrocyty a oligodendrocyty se jako reakce na zranění dokonce zvyšuje, což z CSPG činí jednu z hlavních příčin velmi omezené regenerace tkáně CNS po poranění, jak ukazuje studie provedená na neuronech ganglia zadních kořenů míšních (Smith-Thomas et al. 1995; Asher et al., 2000; Asher et al., 2002).

Otázkou je, zda je možné tento vliv PNS nějak utlumit, nebo mu dokonce zcela zabránit, a využít toho ve prospěch regenerace CNS. Jako odpověď se nabízí hned několik metod, z nichž nejrozšířenější je degradace CSPG pomocí chondroitinázy ABC (chABC), enzymu získanému z bakterie *Proteus vulgaris* (Yamagata et al., 1968). Tento enzym odštěpuje chondroitinsulfát glykosaminoglykanové řetězce od core proteinu, čímž rozruší strukturu PNS natolik, že dojde k poklesu Otx2 v neuronech a dočasnému obnovení plasticity CNS (Crespo et al. 2007; Beurdeley et al. 2012). Tímto způsobem byla znovu dočasně otevřena kritická perioda, spojená s fenoménem okulární dominance. Prokázán byl také růst a větvení axonů a tvorba nových synapsí v poraněné míše (spinal cord injury, SCI). První studii provedli Lemons a jeho kolegové (Lemons et al. 1999), kdy aplikace chABC rozložila CSPG v traumaticky poraněné míše potkana, což vedlo k eliminaci inhibičního vlivu PNS na plasticitu CNS a umožnění opětovného růstu neuronů. Tato studie byla klíčová pro rozvoj nového

potenciálního přístupu k léčbě poranění CNS. Aplikace chABC se ukázala být efektivní podpůrnou terapií při regeneraci tkáně na mnoha zvířecích modelech. Rozrušení PNS při SCI vede k opětovné inervaci míst poškozených hemisekcí nebo kontuzí a obnovení ovládnání motoriky a močového měchýře potkanů (Bradbury et al., 2002; Yick et al., 2003). Přímá spojitost mezi zlepšenou regenerací a aplikací chABC byla ukázána ve studii, kterou provedl J. Massey (Massey 2006), kde díky rozrušení PNS pomocí chABC došlo k větvení axonů a obnově inervace přední tlapy potkanů po transekcii míchy mezi C6 a C7. Terapie tohoto typu byla provedena také na kočkách, kde po hemisekcii hrudní míchy vedla k lepší obnově motorických funkcí a obnova byla oproti kontrolním skupinám o 3 týdny urychlena (Obr. 4.). Díky úspěšnosti této metody a snadné aplikaci chABC na místo poranění má tato terapie potenciál pro přenos do klinické medicíny.



**Obr. 4.** U koček léčených chABC došlo k výraznému zlepšení motorických schopností oproti kontrolní skupině. Zlepšení motorických schopností je vyjádřeno jako míra úspěchu v testu chůze po kolících a koordinace umístění levé zadní končetiny (LH) na kolíky během chůze (Jefferson et al. 2011).

Kromě aplikace chABC v léčbě míšního poranění tato metoda podpořila větvení axonů Purkyňových buněk mozečku (Corvetti 2005) a došlo k obnově plasticity zrakové kůry (Pizzorusso 2002; Pizzorusso et al. 2006).

ChABC není jedinou možností, jak dosáhnout rozrušení PNS a zabránit tak jejich inhibičnímu vlivu na plasticitu CNS. Jednou z variant je aplikace DNA enzymu degradujícího mRNA xylosyltransferázy-1. Xylosyltransferáza-1 je prvním enzymem, který se účastní tvorby GAG řetězců CSPG. Bez něj není možné syntetizovat GAG řetězce, jež jsou hlavními nositeli inhibice. Praktickým příkladem je studie, kde aplikace DNA enzymu na místo zranění vyústila ve sníženou expresi GAG řetězců, což podpořilo regeneraci axonů v poškozené potkaní míše (Grimpe 2004; Galtrey & Fawcett 2007).

Utlumení inhibice lze dosáhnout také zásahem do signální kaskády Rho/ROCK, která zprostředkovává některé z inhibičních efektů CSPG na růst axonů. Takovým zásahem může být užití inhibitoru proteinkinázy C (Sivasankaran et al., 2004), inhibitoru Rho GTPázy (Monnier et al. 2003) nebo inhibitoru ROCK (Fournier et al. 2003), což může být vhodný způsob pro modulaci plasticity normálního i poškozeného CNS.

Terapeutický potenciál má i blokáce účinků transformačního růstového faktoru  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ). TGF $\beta$  stimuluje syntézu core proteinů CSPG pomocí zvýšení jejich transkripce (Asher et al. 2000). Jako účinný inhibitor TGF $\beta$  se prokázal decorin (Logan et al. 1999). Aplikace decorinu na poškozený mozek a míchu potkana potlačuje expresi některých CSPG, jako je neurocan, brevican, phosphacan a NG2 (Davies et al. 2004). Tím se předejde jejich inhibičním vlivům na plasticitu a podpoří se růst axonů na poškozených místech CNS.

Citlivé a plastické prostředí CNS je během léčby vhodné také podpořit patřičnými stimuly. Správná rehabilitace a provádění úkonů spojených s poškozenou strukturou CNS vede při obnově plasticity k lepší tvorbě a posílení správných nervových spojení (Biernaskie & Corbett 2001; Komitova et al. 2006).

## **PNS a Alzheimerova choroba**

Obnovení plasticity při mechanickém poškození CNS se jeví jako nadějná metoda především při léčbě poranění míchy. Může mít obnovení plasticity také další roli a přinést nové terapeutické využití? Tuto otázku si položilo hned několik výzkumných týmů a pozornost se kromě dalších neurodegenerativních patologií soustředila zejména na Alzheimerovu chorobu.

Alzheimerova choroba je chronické neurodegenerativní onemocnění. Jedná se o poškození a postupnou ztrátu neuronů způsobenou zejména přítomností  $\beta$ -amyloidních plaků v blízkosti neuronů a patologií Tau proteinu. Tau za normálních okolností stabilizuje mikrotubuly

nervových buněk, při Alzheimerově chorobě však dochází k jeho hyperfosforylaci a nadměrnému hromadění ve tkáni, kde formuje tzv. neurofibrilární uzlíky (neurofibrillary tangles, NFT). Vznik  $\beta$ -amyloidních plaků je způsoben proteolytickým štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) na amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptidy. Ve zdravém organismu je jejich vznik a odbourávání v rovnováze, avšak v mozku postiženém AD buď dochází k jejich nadprodukcí, nebo se neodbourávají v dostatečné míře. Dalšími průvodními znaky jsou ztráta presynaptických zakončení a reaktivní astroglíóza. Alzheimerova choroba se dělí na dva typy, a to na familiární a sporadický. Familiární AD je vzácná, postihuje pacienty v ranějším věku – již před 60. rokem života a její původ tkví zřejmě v mutaci některých genů, jako jsou geny pro APP, tau a presenilin. Sporadická AD se rozvíjí typicky mezi 60 – 70ti lety pacienta a její příčiny nejsou příliš dobře objasněny. Důsledkem poškození nervové tkáně je demence - postupná ztráta paměti a dorozumívacích schopností, další poruchy chování a rozklad osobnosti. Spolu s poruchami příjmu potravy může degenerace nervové tkáně vést i ke smrti. Na AD v současnosti neexistuje účinná léčba, možné je pouze podávat podpůrnou medikaci, která však nemá velké účinky (Serrano-pozo et al. 2011; Nelson et al. 2012; Foster et al. 2016).

Mezi první příznaky AD patří poruchy krátkodobé paměti, ke kterým dochází ještě před akumulací  $A\beta$  a Tau v tkáni mozkových center zodpovědných za procesy spojené s pamětí, jako je hippokampus. Zároveň patří hippokampus mezi první zasažené oblasti mozku (Braak & Braak, 1991). U pokročilejších stadií AD, kdy dochází ke zřetelným patologickým změnám a odumírání neuronů, jsou příčinou poruch paměti a změn osobnosti  $A\beta$  plaky a NFT. Za zhoršením těchto funkcí před neurodegenerací hippokampu vlivem zmíněných příznaků stojí změny na synapsích, provázejících jak stáří, tak AD. Pro studium procesů provázejících AD a stárnutí organismu se užívá zvířecích modelů. Pro modelování stárnutí se užívá wild type (wt) myši, kde pokles kognitivních schopností a citlivost hippokampu na poruchy krátkodobé paměti dobře korelují s danou situací u člověka (Foster et al. 2016). Tyto modely jsou pro výzkum AD důležité z hlediska prozkoumání jednoho z nejdůležitějších rizikových faktorů této choroby – stáří. Získání poznatků o přirozeném zhoršování paměti za fyziologických podmínek přispívá k objasnění okolností, za jakých se rozvíjí Alzheimerova choroba. Pro studium samotné AD bylo nutné vyšlechtit nové transgenní kmeny myši s použitím lidských genů souvisejících s familiární AD. Ačkoliv není možné prostřednictvím těchto modelů vytvořit stejné prostředí, jaké vytváří lidská Alzheimerova choroba v plném rozsahu, dobře se tyto metody osvědčily při studiu vlivu  $A\beta$  na nervový systém, rané poruchy paměti

hippokampu a přinesly další cenné poznatky o průběhu AD (Bornemann & Staufenbiel, 2000; Ashe & Zahs 2010; Foster et al. 2016). Studie prováděná na transgenních myších s nadměrnou expresí APP ukázala, že dochází k úbytku presynaptických zakončení ještě před výskytem A $\beta$  plaků, což podpořila elektrofyziologická měření, která ve stejné době odhalila významné nedostatky v synaptickém přenosu. Se stárnutím myši již nedocházelo k velkým strukturálním změnám, avšak funkčnost synapsí se dále zhoršovala (Hsai et al. 1999). Příčinou je zřejmě neurotoxicita solubilního A $\beta$  (A $\beta$ \*56), která byla prokázána jak na studiích in vitro, tak in vivo.

Studium synaptické plasticity a procesů paměti ve zdravém, resp. stárnoucím organismu slouží k dalšímu objasnění rozvoje AD. Přírozeným projevem stáří jsou poruchy epizodické paměti, která závisí na hippokampu (Lekeu et al., 2002). Pozornost se proto zaměřila na hippokampální synapse z oblasti CA3 a CA1 a procesy synaptické plasticity, které zprostředkovávají paměť, a sice LTP (long-term potentiation) a LTD (long-term depression). LTP má původ ve vysokofrekvenční stimulaci, která vyvolá zesílení synaptického přenosu vtokem Ca<sup>2+</sup>, který aktivuje kinázy zprostředkující indukci LTP. LTD vzniká následkem nízkofrekvenční stimulace NMDA receptorů, vedoucí k prodloužené době výlevu Ca<sup>2+</sup>. Vápenaté ionty v tomto případě stimulují aktivitu proteinfosfatáz, které defosforylací přispívají k postupnému zeslabení synaptické odpovědi neuronu (Foster et al. 2016). Oba mechanismy synaptické plasticity závisí na NMDA receptorech, které během stárnutí a patologických stavů procházejí změnami. Právě ty mají za důsledek zhoršení funkcí synapsí a poruchy paměti.

Příčinou těchto změn je patrně oxidativní stres (Dröge & Schipper 2007). NMDA receptory jsou citlivé na intracelulární redoxní stav, jehož prostřednictvím dochází k modifikacím proteinů a enzymů účastnících se synaptického přenosu (Rayudu & Choi 1998; Aizenman et al., 1990). To podporují studie, kde aplikace oxidačních činidel na hippokampální řezy z mladých zvířat způsobuje zhoršení synaptické odpovědi (Bodhinathan et al. 2010), zatímco aplikace redukčních činidel zlepší synaptické funkce i u starých zvířat se zhoršenou pamětí (Kumar & Foster 2013). Oxidace zřejmě způsobí abnormální tok vápenatých iontů do buňky, změny v aktivitě kináz a fosfatáz, nedostatečnou výměnu AMPA receptorů a tím i narušené funkce synaptické plasticity (Foster et al. 2016). Je možné, že u Alzheimerovy choroby přispívají k oxidativnímu stresu právě A $\beta$ \*56. Jejich škodlivý vliv na NMDA receptory byl prokázán například u studií, kde aplikace A $\beta$  oligomerů na neurony vede k endocytóze NMDA receptorů (Snyder et al., 2005) či jejich aberantní a nedostatečné expresi, což vede v

nedostatečné odpovědi neuronů na stimuly a abnormální morfologii synapsí (Lacor et al. 2007; Dewachter et al. 2009).

Jak s tímto problémem souvisí perineurální síť, a jakou úlohu hrají v Alzheimerově chorobě a ztrátě paměti? Jak již bylo řečeno, PNS obrůstají neurony i v místech synapsí, teoreticky tedy mohou synaptický přenos ovlivňovat. Může jejich rozrušení vést k podobně pozitivním účinkům, jako například při poškození míchy?

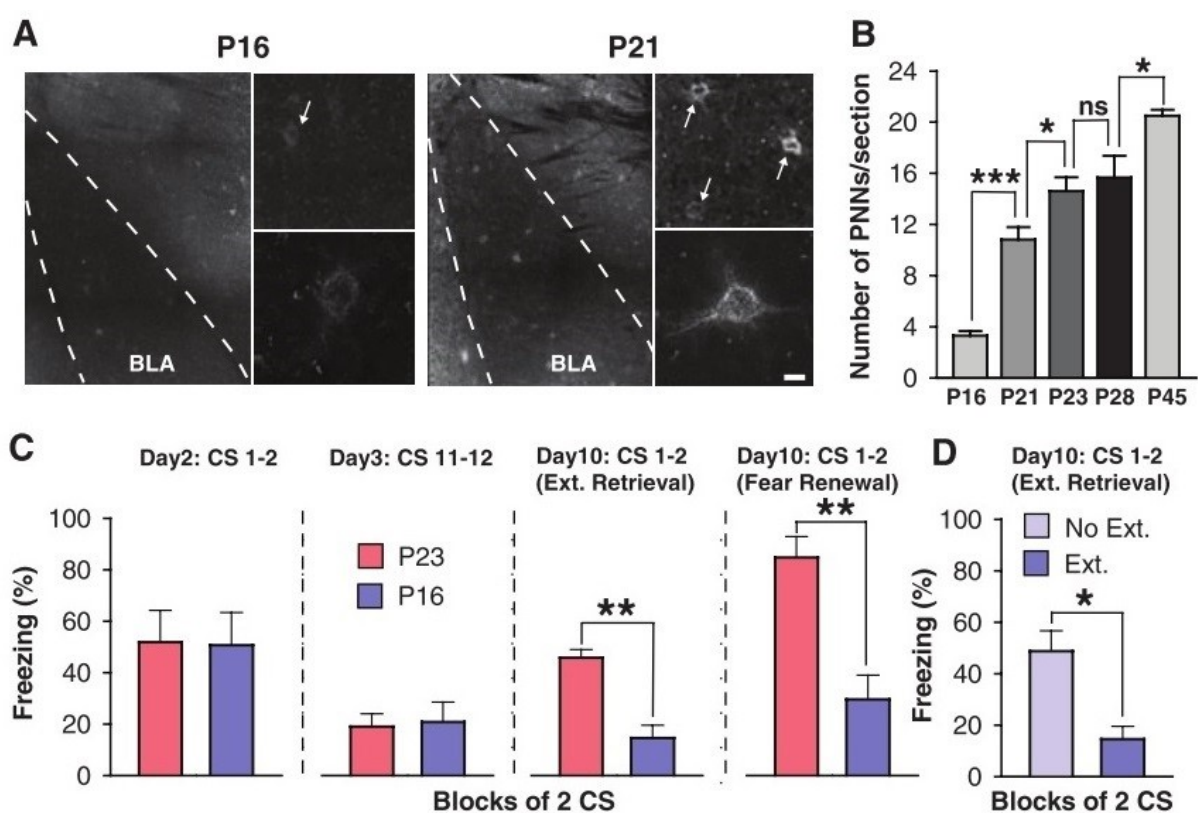
## **Perineurální síť a paměť**

Perineurální síť jsou dobře prozkoumány ve spojitosti s takovými procesy, jako je uzavření kritické periody a okulární dominance, a kromě toho hrají roli v rozličných patologiích CNS. Výzkum posledních let potvrdil, že PNS mají vliv na synaptickou plasticitu a tím i na paměť. V dalších kapitolách bych chtěla podrobněji zmínit 4 studie, které se významným způsobem zabývaly studiem PNS v souvislosti se změnami různých typů paměti u zdravých zvířat i u dvou různých modelů AD.

### **PNS a paměť spojená se strachem**

Studie N. Gogolly a jejího týmu (Gogolla et al. 2009) se věnovala vztahu mezi PNS a vybavováním podnětů spojených se strachem. Pokusili se prokázat, že perineurální síť znemožňuje vymazání paměťových stop, které ve zvířatech vyvolaly strach. Takové paměťové stopy vznikají, pokud se zvíře vystaví neutrálnímu, podmíněnému stimulu (PS) ve spojitosti se stresovým, nepodmíněným stimulem (NS). Jsou velmi silné a u potkanů mohou přetrvávat i celý život (Gale et al. 2004). Strach z nepodmíněného stimulu lze eliminovat tréninkem zvaným extinkce, kdy se zvíře opakovaně vystavuje podmíněnému stimulu bez kontextu nebezpečí. Po opětovném vystavení NS se vyhodnocuje tzv. freezing, tj. chování, které zvíře ve strachu vykazuje, např. se kromě dýchání vůbec nehýbe, či se naopak aktivně vyhýbá NS (Myers & Davis 2007). Extinkce však u dospělých zvířat nevede k trvalému přivyknutí na PS - při opětovném vystavení zvířete PS spolu s NS dojde k obnovení strachu (Quirk et al. 2006; Myers & Davis 2007). Jiná situace je u mladých zvířat, kde extinkce vede k úplnému smazání paměťové stopy (Kim & Richardson 2007). Stáří zvířat, kdy dojde ke znemožnění smazání paměťových stop extinkcí, koreluje s obdobím, kdy se v organismu vytvoří perineurální síť. To bylo prokázáno na řezech získaných z mozků různě starých potkanů, na které bylo aplikováno značení aglutininem *Wisteria floribunda* (WFA), jež se standardně používá pro detekci PNS. Amygdala je strukturou, která zodpovídá za eliminaci paměťových stop (Myers

& Davis 2007), a právě zde bylo zjištěno, že množství PNS se zvyšuje až do 28. dne po narození, kdy značení vykazovalo stejné hodnoty jako u dospělých jedinců (Obr. 5A, 5B). Ve stejné době dochází ke změně v efektivitě extinkce. Gogolla a kol. Vystavili dvě skupiny zvířat stresovému podnětu; jednu skupinu se zvířaty stáří nižšího 16ti dní (P16), druhou se zvířaty staršími 23 dní (P23). Následně je podrobili tréninku extinkce a po sedmi dnech je opět vystavili stresovému podnětu, v podmíněném i nepodmíněném kontextu. Zatímco u skupiny P23 došlo k obnovení bojácné reakce, u skupiny P16 došlo k úspěšnému vymazání paměťové stopy (Obr. 5C). Zvířata si nicméně pamatovala daný podnět a pro odstranění bojácných reakcí je tedy nutná extinkce (Obr. 5D).



**Obr. 5.** Výskyt PNS v organismu koreluje s uzavřením kritické periody, během které lze vymazat paměťové stopy extinkcí. (A) WFA značení PNS v basolaterálním jádře amygdaly (BLA) u myši starých 16 (P16) a 21 (P21) dní. (B) Množství PNS v organismu se během postnatálního vývoje postupně zvyšuje. (C) Porovnání výkonu skupiny P16 a P23 týden po extinkci. Zatímco u P23 došlo při vystavení stresovému podnětu k obnovení paměťové stopy, u P16 byla extinkce úspěšná. (CS-conditioned stimulus, podmíněný stimul; Blocks of 2 CS- dvojitá vystavení zvířete podmíněnému stimulu, jednou samostatně, jednou s nepodmíněným stimulem) (D) Skupina P16 si bez tréninku extinkce po deseti dnech stále pamatovala stresový podnět (Gogolla et al. 2009).

Studie rovněž zjistila, že aplikace chABC u dospělých zvířat pouze umožňuje smazání či přepsání paměťové stopy; nejedná se ani o posílení inhibičního učení během extinkce, ani o blokádu vytvoření nové paměťové stopy. Zároveň však neovlivňuje vzpomínky získané před

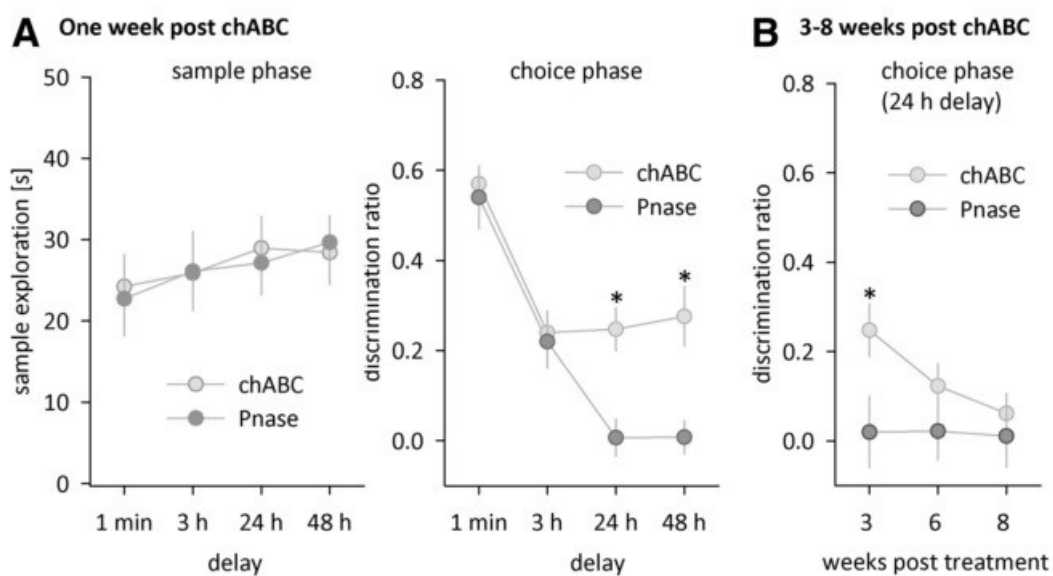
její aplikací, které se po určité době po injekci chABC znovu obnoví. K úspěšnému smazání dochází pouze u vzpomínek, získaných během nepřítomnosti PNN. Lze tedy uzavřít, že PNS v amygdale chrání paměťové stopy spojené se strachem, zatímco jejich rozrušení umožňuje jejich odstranění – obnovení plasticity CNS tedy ovlivňuje i paměť.

### **PNS a deklarativní paměť**

Studie Caroly Romberg a kol. (Romberg et al. 2013) zkoumala, zda perineurální síť ovlivňuje také deklarativní paměť, a zaměřili se na perirhinální kortex, který je s tímto typem paměti spojován (Winters et al. 2004). K tomu použili genetický a farmakologický model odstranění PNS, test rozpoznání objektů (object recognition task, ORT) a elektrofyziologická měření. Jako genetický model odstranění PNS byly použity myši s knockoutovaným genem pro *Ctrl1* a dále transgenně upravené tak, aby knockout *Ctrl1* ovlivnil pouze tkáň CNS. Tomuto kmeni myši se nevyvinou žádné nebo pouze zbytkové PNS (Carulli et al. 2010). Jako farmakologický model sloužily wt myši, kterým byla injektována chABC. Test ORT je běžně užívaný model deklarativní paměti u myši a potkanů a má dvě fáze. V první je zvíře umístěno do jednoho z ramen aparátu tvaru Y s vysokými stěnami, označovaného jako startovní rameno. Ve zbývajících dvou ramenou jsou umístěny dva stejné objekty A. Zvíře má pět minut na jejich prohlídku. Následuje různý časový odstup (1 min, 3 h, 24 h, 48 h), během kterého je myš ve své kleci, a druhá fáze testu. Ta je stejná jako první, ale v jednom z ramen je kromě známého objektu A nový objekt B. Celý test se natáčí a podle nahrávky se vyhodnotí čas, který myš stráví při zkoumání nového objektu. Objekt, který již zná, by měla prozkoumávat kratší dobu.

V první fázi experimentu byly ORT testem porovnány tři skupiny myši: *Ctrl1 ko*, wt a *Ctrl1-Tg* (nadměrná exprese *Ctrl1* v chrupavkách). Při krátkých prodlevách mezi první a druhou fází testu se všechny skupiny chovaly podobně, ale při prodlevách 24h a 48h *Ctrl1 ko* myši rozeznávaly objekt z první fáze stále jako povědomý, zatímco kontrolní skupiny se k němu chovaly jako k neznámému již po 24 hod. Všechny skupiny během první fáze prozkoumávaly objekty A stejně dlouho a aktivně, takže lepší výsledky *Ctrl1 ko* skupiny nejsou způsobeny chybou testu. Jako důkaz, že za zlepšením deklarativní paměti u myši stojí PNS, byla provedena druhá fáze experimentu, kdy do skupiny *Ctrl1 ko* myši a skupiny wt myši vědci injektovali chABC. To vede k rozrušení PNS a také CSPG v difuzní ECM, které měl genetický model zachované, jak prokázalo barvení řezů mozků čtyřměsíčních *Ctrl1 ko* myši nebo wt myši 16 dní po aplikaci chABC. PNS byly značeny pomocí WFA. Týden po aplikaci chABC byly tyto myši vystaveny ORT a prodlevy mezi první a druhou fází testu činily 24h a

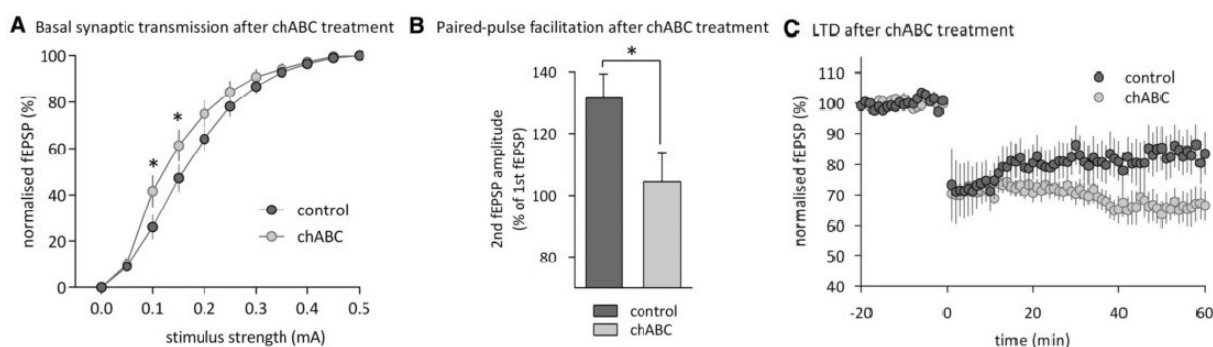
48h. Farmakologický model myši dosahoval stejných výsledků jako genetický model, tj. obě skupiny myši po 48h rozeznávaly objekt A jako známý. Došlo tedy ke zlepšení paměti po odstranění perineurálních sítí nejen u genetického modelu, ale také u wt myši, kterým byly PNS odstraněny dodatečně pomocí chABC. Rozklad CSPG v ECM na to neměl žádný vliv. Pro kontrolu, že na zlepšení paměti neměla vliv mechanická aplikace enzymu a vedlejší účinky chirurgie, byl dvěma skupinám wild type myši injektován enzym – jedné skupině chABC, druhé penicilináza (Pnase), a prošly ORT testem. U Pnase skupiny nebyla pozorována žádná změna oproti výsledkům wt myši, zatímco u chABC skupiny opět došlo ke zlepšení paměti (Obr. 6A). U farmakologického modelu podle histologických rozborů později dojde k samovolné obnově PNS v organismu, a spolu s tím by se měla postupně zhoršovat paměť. Proto byly myši s aplikací chABC 3, 6 a 8 týdnů po injekci enzymu znovu testovány pomocí ORT. Jejich schopnost rozeznávat a pamatovat si objekty se s časem postupně zhoršovala, tak jak se obnovovaly PNS v organismu (Obr. 6B).



**Obr. 6.** Rozložení PNS v perirhinálním kortexu pomocí chABC zlepšuje deklarativní paměť. **(A)** Čas, který wt myši s aplikovanou chABC nebo Pnase věnovaly průzkumu objektu v první fázi testu (vlevo) a míra preference nového objektu stejnými skupinami myši v druhé fázi testu (vpravo). **(B)** Míra schopnosti rozeznat po 24h nový objekt v různém časovém odstupu od aplikace chABC nebo Pnase (Romberg et al. 2013).

Dále byla provedena elektrofyziologická měření. Mechanismem deklarativní paměti v entorhinálním kortexu je LTD, tedy postupná redukce synaptické odpovědi na stimuly. Romberg a kol. zaznamenávali hodnoty fEPSP (field excitatory postsynaptic potential, což je dočasná depolarizace postsynaptického neuronu, která zvýší pravděpodobnost vzniku akčního potenciálu) a měřili LTD a PPF (paired-pulse facilitation-párová pulzní facilitace), při kterém

je EPSP v odpověď na impuls zvýšený, pokud tento impuls následuje těsně za prvotním impulsem. PPF se uplatňuje i během učení a funguje jako krátkodobá forma synaptické plasticity. Řezy pocházely z mozků čtyřměsíčních myší, a měření probíhalo na dráze vedoucí z temporálního kortexu do entorhinálního kortexu. Různě silné stimuly vyvolaly zvýšené hodnoty fEPSP u Ctrl1 ko myší oproti kontrolním skupinám, proti kterým měly Ctrl1 ko také lepší LTD, jelikož měly po 50 min. stimulace výrazně menší hodnoty fEPSP než wt skupina, a dále u nich nebylo naměřeno PPF. Podobných výsledků bylo dosaženo u myší po aplikaci chABC, kde byl naměřen zvýšený synaptický přenos, zredukované PPF a výrazně efektivnější LTD u synapsí v III/IV vrstvě neuronů perirhinálního kortexu (Obr. 7).



**Obr. 7.** Změny v synaptickém přenosu po aplikaci chABC vůči kontrolní skupině. **(A)** Hodnoty fEPSP naměřené v II/III vrstvě mozkové kůry. **(B)** Naměřené hodnoty PPF. **(C)** Naměřené hodnoty LTD (Romberg et al. 2013).

Studie ukázala, že jak v případě genetického odstranění PNS z organismu pomocí ko genu pro Ctrl1 v CNS, tak v případě podání chABC wt myším, dojde k výraznému zlepšení deklarativní paměti v modelovém testu rozeznávání objektů. Zlepšení bylo srovnatelné mezi oběma skupinami a je důsledkem odstranění perineurálních sítí z CNS, konkrétně z entorhinálního komplexu. Zlepšení paměti je kromě behaviorálního testu dokázáno také na elektrofyziologických měřeních, kde odstranění PNS vedlo u genetického i farmakologického modelu ke zvýšení synaptického přenosu a facilitaci LTD.

### PNS a APP model AD

Ve studii provedené Marlene Végh a kol. (Végh et al. 2014) jsou prozkoumány změny v proteinovém složení synapsí u jednoho z myších modelů Alzheimerovy choroby, jak tyto změny souvisí s poruchami paměti v raných stádiích AD a zda lze tyto patologické změny eliminovat pomocí aplikace chABC.

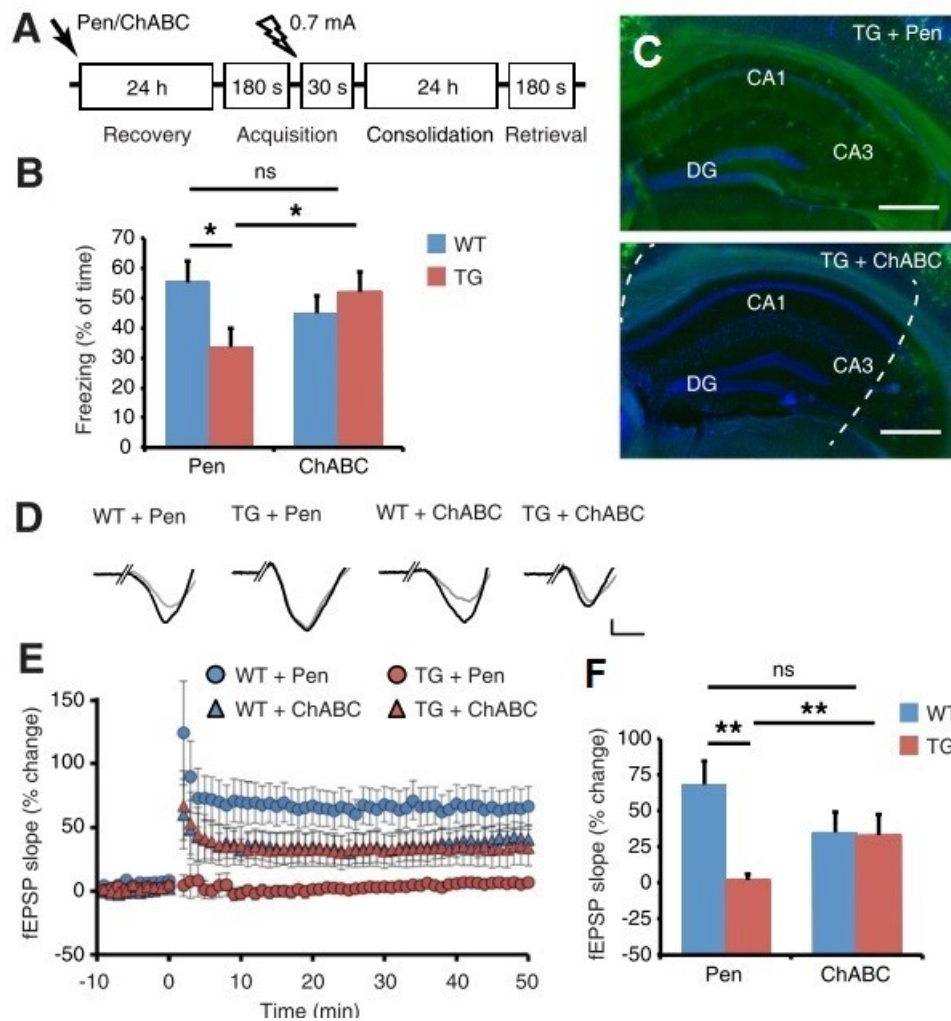
Jako model AD byl použit transgenní kmen myší APP/PS1, které vykazují nadměrnou produkci A $\beta$ . Proteomika zahrnovala izolaci synaptosomů z hippocampů APP/PS1 myší a

kontrolní wt skupiny myši o stáří 1,5, 3, 6 a 12 měsíců a jejich kvantitativní analýzu pomocí iTRAQ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation), funkční analýzu pomocí DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), imunoblotting a imunohistochemickou analýzu. Výsledky ukázaly, že z celkových 376ti kvantifikovaných proteinů bylo u APP/PS1 105 proteinů výrazně zvýšených oproti wt, z toho 87 bylo zvýšených již ve třech měsících stáří myši. Nejvíce zvýšený byl protein APP, související se zvýšením koncentrace A $\beta$  v tkáni potvrzený pomocí imunoblottingu. Celkové množství proteinů synapsí bylo u obou skupin myši srovnatelné. Rozdílná hladina množství proteinů byla pozorována zejména u čtyř proteinů ECM, a to u neurocanu, brevicanu, tenascin-R a Ctrl1. Všechny tyto proteiny vykazují postupné zvyšování koncentrace u wt i APP/PS1, ale u APP/PS1 je zvyšování urychleno a ve třech a šesti měsících stáří myši je relativní množství těchto proteinů větší než u wt, což potvrdil i imunoblotting. U APP/PS1 bylo také více PNN-positivních neuronů než u wt, což bylo prokázáno značením pomocí WFA. Dále byl na hippocampálních řezech APP/PS myši vyhodnocen výskyt A $\beta$  plaků v tkáni. Ve třech měsících stáří myši byl jejich výskyt v hippocampu nulový, v šesti měsících byly první plaky nalezeny ve tkáni a ve dvanácti měsících byla tkáň plaky silně poškozena.

Pro testování paměti posloužily dva behaviorální testy, systém podmiňující strach (FCS, fear conditioning system) a Morrisovo vodní bludiště. Při FCS testu se v první fázi myši umístí do komory s mřížkou z chirurgické oceli na podlaze, načež po 180s dostanou mřížkou 2s elektrický šok (0.7 mA) a po dalších 30s v komoře jsou vráceny zpět do klece. V druhé fázi testu jsou po 24h myši vráceny na 180s do komory a vyhodnocuje se jejich chování – zkoumání prostředí, freezing a míra pohybu (Obr. 8A). Morrisovo vodní bludiště testuje prostorovou paměť. Je to kulatá vodní nádrž, ve které je na určitém místě 0.5 cm pod hladinou ostrůvek. Na stěnách nádrže jsou značky pro umožnění orientace v prostoru. Myši byly na tento test nejdříve po dobu pěti dní trénovány, a to každý den čtyřikrát s odstupem 30-180s mezi zkouškami. Zkoušky probíhají tak, že je myš umístěna po dobu 30s na ostrůvek, poté je ručně umístěna do vody na náhodnou startovní pozici a jejím úkolem je do doby max. 60s najít ostrůvek. Myši, které to nedokáží, jsou na 30s ručně umístěny zpět na ostrůvek a testovány znovu. Mezi druhou a třetí zkouškou jsou na 3min umístěny do své klece. Šestý den byl proveden ostrý test, který se provádí bez ostrůvku. Zatímco během tréninku se měřil čas, během kterého myši našly ostrůvek, při ostrém testu se vyhodnocoval čas, který myš strávila v jednotlivých kvadrantech nádrže. Míra úspěšnosti myši v testu je vyhodnocena jako poměr času, který myš stráví v kvadrantu, kde byl během tréninku umístěn ostrůvek, vůči

zbylým kvadrantům. Ve studii byly testovány dvě skupiny myši, APP/PS1 a wt. Tříměsíční myši měly v obou skupinách srovnatelné výsledky v první fázi FCS testu, zatímco v druhé fázi testu APP/PS1 myši ve výkonu zaostávaly za jejich wt sourozenci. Jiná situace je u Morrisova vodního bludiště, kde si čtyři měsíce staré myši obou skupin vedly stejně dobře. Z toho lze vyvodit, že v asymptomatické fázi Alzheimerovy choroby je poškozena paměť spojená se strachem, zatímco k poškození prostorové paměti dochází až v pozdějších stadiích.

Výzkumný tým se pokusil prokázat hypotézu, že zvýšená hladina proteinů extracelulární matrix, z nichž všechny jsou proteiny PNS, souvisí s paměťovým deficitem APP/PS1 myši. Čtyřem skupinám myši byl injektován enzym: Dvěma skupinám APP/PS1 chABC a kontrolní penicilináza (Pnase), a dvěma wt skupinám chABC a Pnase. Den po aplikaci enzymu byly myši podrobeny FCS testu (Obr. 8B). Skupina APP/PS1 + chABC vykazovala velké zlepšení paměti oproti skupině APP/PS1 + Pnase, která podala srovnatelný výkon jako skupina wt + Pnase a skupina myši bez podání enzymu, které byly testovány v předchozí fázi studie. Zlepšení paměti dosáhly také wt + chABC myši. Výkony všech skupin v behaviorálním testu korelovaly s množstvím PNS v hippocampu, které bylo zjištěno z tkáňových řezů značených WFA (Obr. 8C).



**Obr. 8.** Aplikace chABC zlepšuje deklarativní paměť a efektivitu synaptického přenosu u tříměsíčních APP/PS1 myší. **(A)** Průběh FCS testu. **(B)** Freezing spojený s udržení paměťové stopy na stresový podnět. Transgenní (TG) myši s aplikovanou penicilinázou (Pen) měly horší paměť než wild type (WT) myši s aplikovanou Pen. Aplikace chABC na transgenní myši obnovila jejich paměť na hodnoty kontrolní wt skupiny, na kterou aplikace chABC neměla vliv. **(C)** Značení pomocí WFA potvrdilo rozrušení PNS v hippocampu po použití chABC. Přerušovaná čára značí oblast ovlivněnou chABC. CA, cornus ammonis; DG, dentate gyrus. Rozlišení 400  $\mu$ m. **(D)** Průběh LTP u různých skupin myší. Hodnoty fEPSP před tetanickou stimulací (šedě) a po stimulaci (černě). Měřítka: 0.1 mV; 2 ms. **(E)** Průběh LTP u wt nebo Tg skupin myší před a po aplikaci Pnase nebo chABC. (Végh et al. 2014). **(F)** Změna zprůměrovaných hodnot fEPSP v průběhu 10–20 min ukazuje výrazně zhoršené LTP u APP/PS1 myší s aplikovanou Pnase oproti wt myším s aplikovanou Pnase. Po aplikaci chABC dojde u APP/PS1 myší k návratu na normální hodnoty (Végh et al. 2014).

Během studie byla provedena na hipokampálních řezech výše zmíněných čtyřech skupin myší elektrofyziologická měření fEPSP a LTP. Ta ukázala zhoršený průběh LTP u APP/PS1 + Pnase myší a naopak výrazně lepší průběh LTP u skupiny APP/PS1 + chABC, který byl srovnatelný s hodnotami wt + chABC i wt + Pnase skupin (Obr. 8D-F).

Výsledky ukazují, že rané poruchy hipokampální paměti u tříměsíčních APP/PS1 myší časově souvisí se zvýšením hladiny ECM proteinů. Tyto nedostatky paměti je možné odstranit

použitím chondroitinázy ABC, jejíž aplikací se dosáhne rozštěpení perineurálních sítí, což má pozitivní efekt prokázaný jak behaviorálními testy, tak elektrofyziologickým měřením.

### **PNS a model tauopatie**

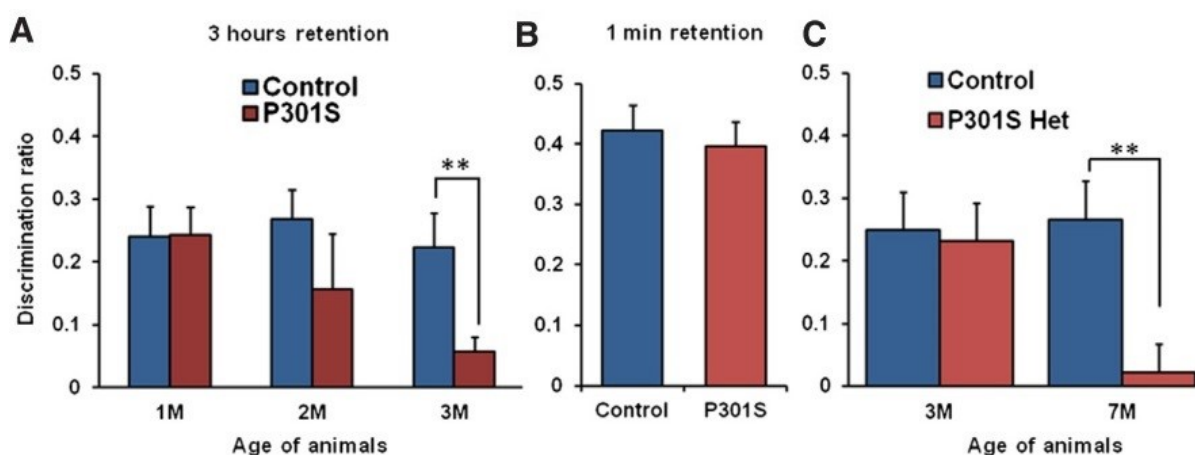
Studie vedená Sujeong Yang (Yang et al. 2015) zkoumá, zda lze v mozku poškozeném patologií tau napravit poruchy paměti pomocí odstranění perineurálních sítí. Jako metodiku vědci použili behaviorální test paměti ORT, jehož průběh byl velmi podobný stejnému testu použitému ve studii C. Romberg (Romberg et al. 2013), imunohistochemickou analýzu pro zjištění množství hyperfosforylovaného tau v tkáni, značení pomocí WFA pro detekci PNS, stereologii pro spočtení neuronů, PNS-pozitivních a tau-pozitivních buněk, western blot analýzu pro další stanovení tau v mozku, a elektrofyziologická měření. V experimentu byly použity dva modely tau patologie: Transgenní kmen homozygotních P301S myši (Tg-P301S), vykazující tau patologii v CNS i PNS, a wt kmen myši, kterým byl do perirhinálního kortexu injektován adenoasociovaný virus exprimující stejnou mutaci P301S (AAV-P301S).

Zjištění progresu choroby bylo provedeno pomocí imunohistochemické analýzy mozků různých starých Tg-P301S myši, která ukázala, že abnormální tau je v tkáni přítomen již v jednom měsíci stáří myši. U tříměsíčních zvířat došlo k rozvinutí patologie, jež způsobilo 15% ztrátu neuronů v perirhinálním kortexu oproti wt myším.

V ORT testu byly porovnávány Tg-P301S myši a wt myši (Obr. 9A). Výsledky byly následující: Jednoměsíční myši obou skupin se mezi sebou v tomto věku ve výkonu nelišily, ale ve dvou měsících stáří začíná být patrné zhoršení paměti u Tg-P301S a tříměsíční Tg-P301S již oproti wt trpěly velkými paměťovými deficity. V první fázi testu myši prozkoumávaly objekty stejnou měrou a dosahovaly srovnatelných výsledků i ve druhé fázi, kde byla prodleva mezi fázemi krátká 1min, takže zhoršení výkonu v testu nebylo důsledkem špatné motivace nebo neschopnosti určit, co je nové a co známé (Obr. 9B). Pro potvrzení, že deficit v paměti je způsoben škodlivým vlivem tau, vědci provedli srovnání také mezi wt a heterozygotními Tg-P301S zvířaty, která mají pozdější nástup tau patologie - zatímco u homozygotních Tg-P301S se příznaky patologie plně projevují již u tříměsíčních jedinců, u jejich heterozygotních sourozenců se projevují až v sedmi měsících stáří (Obr. 9C). Zhoršení paměti dobře korelovalo s nástupem choroby, což potvrzuje, že paměťové deficity jsou skutečně následkem patologie tau.

Pro posílení tohoto tvrzení byl zaveden další model AD, kdy byla wt myším předána mutace P301S virovým vektorem (AAV-P301S), a dvě kontrolní skupiny wt myši, kterým byl

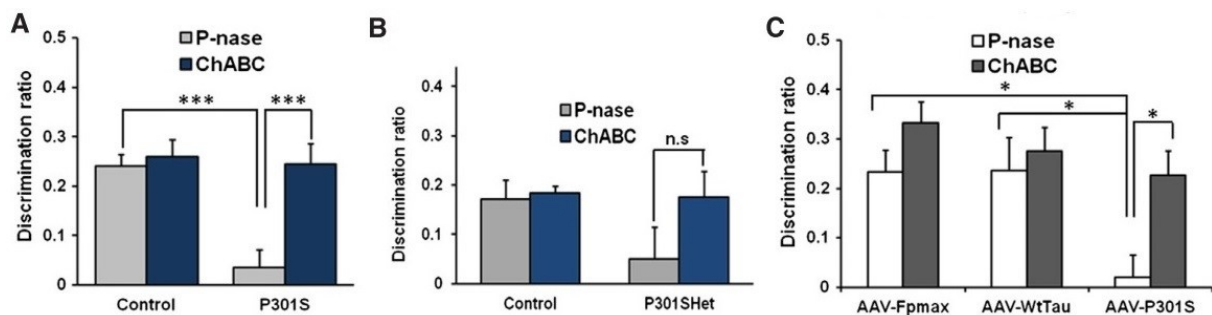
stejným způsobem předán gen pro wt tau (AAV-TauWT) nebo gen pro GFP (AAV-fpmax). Pro zjištění postupu patologie byla provedena imunohistochemická analýza a stereologie. Dva měsíce po injekci byl kolem místa vpichu přítomný hyperfosforylovaný tau a skupina AAV-P301S vykazovala 26% ztrátu neuronů oproti kontrolní skupině AAV-fpmax, což ukazuje na poškození mozku exprimací mutovaného genu P301S. Pro zjištění dopadu této mutace na paměť byly všechny tři skupiny myši podrobeny ORT testu s prodlevou mezi první a druhou fází 1 min a 3h, ve kterém měla AAV-P301S skupina v souladu s předchozími výsledky experimentu po 3h prodlevě výrazně horší výsledky než ostatní dvě skupiny.



**Obr. 9.** Poškození paměti u P301S myši vlivem tauopatie. **(A)** Porovnání výkonu různě starých P301S a wt myši ve druhé fázi ORT testu. U P301S dochází ke zhoršení paměti vlivem tauopatie, které je závislé na věku myši. Discrimination ratio: Doba prozkoumávání nového objektu oproti celkovému času strávenému průzkumem bludiště. **(B)** Srovnání výkonu tříměsíčních P301S a wt myši ve druhé fázi ORT testu s prodlevou 1min. P301S se v tomto ohledu chovají stejně jako wt myši a dokáží rozeznat nový objekt, takže tímto způsobem nedochází ke zkrácení výsledků testu. **(C)** Srovnání výkonu v ORT testu heterozygotních P301S myši a jejich wt sourozenců za účelem potvrzení vlivu tauopatie na paměť. Ve třech měsících věku není mezi skupinami rozdíl, v sedmi měsících věku u P301S Het dochází k silnému rozvoji tauopatie a poškození paměti (Yang et al. 2015).

Studie prokázala zhoršení paměti v perirhinálním kortexu v důsledku patologie tau. Dále bylo jejím účelem prokázat, zda rozštěpení PNS pomocí chABC dovede toho zhoršení zvrátit. K tomu použili tříměsíční Tg-P301S homozygoty a sedmiměsíční Tg-P301S heterozygoty, kterým byla injekčně podána chABC. Sedm dní po její aplikaci byly myši testovány pomocí ORT (Obr. 10A). Zvířata, kterým byla podána chABC, vykazovala výrazné zlepšení paměti srovnatelné s wt zvířaty léčenými chABC, zatímco kontrolní skupina zvířat s injektovanou Pnase nevykázala žádnou změnu oproti neléčeným zvířatům. Sedmiměsíční heterozygoti dosáhli také zlepšení, ale výsledky jsou variabilnější (Obr. 10B). Testem ORT prošly rovněž dvě skupiny AAV-P301S myši, z nichž jedné byla podána chABC, druhé

Pnase. Pro kontrolu bylo tímto způsobem naloženo i se skupinami AAV-Fpmax a AAV-WtTau (Obr. 10C). Skupina AAV-P301S s injektovanou chABC dosáhla velkého zlepšení paměti, na rozdíl od skupiny s injektovanou Pnase. Dva týdny po aplikaci chABC vědci z transgenních myší odebrali tkáňové řezy a vizualizovali perineurální síť v mozku pomocí WFA. Vizualizace ukázala úspěšný rozklad PNS v perirhinálním kortexu a do určité míry také v entorhinálním kortexu, temporálním kortexu a kaudálním hippokampu. Spočítání WFA-pozitivních neuronů pomocí stereologie ukázalo 39% redukci PNS oproti kontrolní skupině s injektovanou Pnase. Zlepšení paměti tak koreluje s rozkladem perineurálních sítí. To podporují výsledky sledování návratu CNS do stavu před aplikací chABC, která PNS rozloží pouze dočasně a ty se pak postupně samovolně obnovují. Změny byly sledovány pomocí průběžného odebírání tkáňových řezů a jejich značení pomocí WFA, a současného testování paměti myší pomocí ORT. Stále intenzivnější značení pomocí WFA korelovalo s úměrným zhoršováním paměti a po pěti týdnech od injekce chABC byla situace stejná, jako před její aplikací. Použití chABC však nemá žádný vliv na průběh patologie, což dokazují výsledky imunohistochemických analýz.



**Obr. 10.** Obnovení paměti u P301S a AAV- P301S myší. **(A)** Tříměsíčním homozygotním P301S a wt myším byla podána chABC nebo Pnase a byly vystaveny ORT testu s prodlevou 3h mezi fázemi. Na wt myši nemělo podání chABC vliv, ale P301S myši a aplikovanou chABC dosáhly výrazně lepších výsledků než P301S skupina s aplikovanou Pnase. **(B)** Sedmiměsíčním heterozygotním P301S myším (P301SHet) a wt myším byla podána chABC nebo Pnase a byl na nich proveden ORT test. Aplikace chABC zlepšila výsledky u P301SHet skupiny, ale toto zlepšení není statisticky významné. **(C)** Všechny AAV skupiny myší byly po aplikaci chABC nebo Pnase testovány pomocí ORT s tříhodinovou prodlevou mezi fázemi. Podání chABC významně zlepšilo paměťový deficit u AAV-P301S myší (Yang et al. 2015). Během elektrofyziologických měření byly zaznamenávány fEPSP a LTD u tříměsíčních Tg-P301S myší, Tg-P301S myši s aplikovanou chABC a stejně starými wt jedinci. Tg-P301S myši vykazovaly výrazně horší synaptický přenos oproti kontrolní skupině, zatímco aplikace chABC měla za následek návrat na normální hodnoty fEPSP a oproti kontrolám, či dokonce jejich zlepšení. Měření LTD u Tg-P301S neprokázalo žádnou změnu.

V této studii byl popsán postupný průběh tau patologie u Tg-P301S a AVV-P301S myši a její škodlivý vliv na perirhinální kortex, který se projevuje jako výrazné zhoršení paměti. Poruchy paměti je možné odstranit pomocí aplikace chABC, což bylo prokázáno díky behaviorálním testům a elektrofyzilogickým měřením. Studie také ukázala, že použití chABC nemá u Tg-P301S ani AVV-P301S žádný vliv na postup patologie, takže přínosný efekt aplikace chABC není důsledkem úspěšné terapie choroby, ale spíše obnovením plasticity CNS pomocí odstranění perineurálních sítí.

## Diskuze

Ve své práci jsem představila několik studií, které demonstrovaly úlohu PNS v plasticitě CNS. Na základě jejich výsledků lze vyvodit, že rozrušení PNS pomocí chABC ve strukturách mozku, jako je perirhinální a entorhinální komplex a hipokampus vede ke zlepšení paměti jak ve stáří, tak u AD. Existuje několik hypotéz, jak PNS ovlivňují paměť, ale definitivní vysvětlení zatím chybí. Jedním z možných mechanismů je přímý vliv na GABAergní parvalbumin-pozitivní interneurony, které jsou PNS obklopeny a které regulují celkovou inhibici v CNS a vznik elektrických impulsů. Dále PNS váží různé molekuly a receptory, které komunikují s buňkami, jako jsou např. semaphorin 3A ovlivňující synaptický přenos (Sahay 2005), či inhibičně působící PTP $\sigma$  receptor (Shen et al. 2009). Bezprostřední vliv na synaptický přenos mají také chondroitinsulfáty PNS, jak na hippokampálních řezech ukázali vědci Albiňana a kol. (Albiňana et al. 2015). To podporuje objev, že brevican váže AMPA receptory a omezuje jejich mobilitu (Frischknecht et al. 2009). Přesné mechanismy, jak PNS modifikují synaptickou plasticitu, a děje doprovázející zlepšení paměti při jejich rozrušení, jsou zřejmě komplexního charakteru a zaslouží si další studium.

Přínosný efekt rozložení PNS při SCI byl prokázán na zvířecích modelech a má pozitivní význam i pro lidské pacienty, ale aby bylo možno tento efekt prozkoumat i u lidských pacientů trpících AD, bude nejdříve nutné k tomu vyvinout vhodný prostředek. Aplikace chABC obnoví plasticitu CNS na omezenou dobu několika týdnů, než dojde k samovolné obnově PNS, a je tedy nutné aplikace pravidelně opakovat. Při podání chABC nebo jiného potencionálního prostředku k rozrušení PNS v mozku je nutné překonat hematoencefalickou bariéru, což se u zvířecích modelů řeší injekcí enzymu přímo na místo. Pro lidské pacienty toto není vhodná forma terapie a je tedy třeba se zaměřit na jiné zprostředkování podání léčby, ať už to bude jen odlišná forma aplikace chABC, nebo rozrušení PNS zcela novým způsobem.

Funkcí PNS ve zdravém organismu je mimo jiné neuroprotektce, a to platí i během Alzheimerovy choroby. Neurony s PNS jsou mnohem méně poškozeny neurotoxicitou A $\beta$  plaků v tkáni a netvoří NFT způsobené tau patologií (Morawski et al. 2012; Suttkus et al. 2016). Rozrušení PNS v takové situaci pak sice zabrání poruchám paměti, ale je otázka, zda to nemůže negativně ovlivnit průběh choroby.

## **Závěr**

Studie ukázaly, že rozrušení PNS vedoucí ke zlepšení paměti se jeví jako nadějná forma podpůrné terapie ve stáří a při AD. Obnovení plasticity v CNS dospělého organismu může být proto důležité pro řadu terapeutických postupů. Zároveň je třeba vzít v potaz další efekty, které odstranění PNS může zejména z dlouhodobého hlediska na CNS mít, a vyvinout vhodnou formu a prostředek rozrušení PNS pro lidské pacienty. V každém případě je to však slibný směr výzkumu, který by v případě úspěchu nejen přinesl vhodnou terapii paměťových deficitů při AD, ale také tím naznačil nové potencionální přístupy k dalším neurodegenerativním chorobám.

## Seznam použité literatury

- Albiñana, E. et al., 2015. Chondroitin sulfate induces depression of synaptic transmission and modulation of neuronal plasticity in rat hippocampal slices. *Neural plasticity*, 2015, p.463854.
- Alpár, A. et al., 2006. Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Research*, 1120(1), pp.13–22.
- Ashe, K.H. & Zahs, K.R., 2010. Probing the Biology of Alzheimer's Disease in Mice. *Neuron*, 66(5), pp.631–645.
- Asher, R.A. et al., 2000. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), pp.2427–2438.
- Asher, R.A. et al., 2002. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(6), pp.2225–36.
- Bekku, Y. et al., 2003. Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(1), pp.148–159.
- Beurdeley, M. et al., 2012. Otx2 Binding to Perineuronal Nets Persistently Regulates Plasticity in the Mature Visual Cortex. *Journal of Neuroscience*, 32(27), pp.9429–9437.
- Biernaskie, J. & Corbett, D., 2001. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(14), pp.5272–5280.
- Bodhinathan, K., Kumar, A. & Foster, T.C., 2010. Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(5), pp.1914–1924.
- Bonneh-Barkay, D. & Wiley, C.A., 2009. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathology*, 19(4), pp.573–585.
- Bornemann, K.D. & Staufenbiel, M., 2000. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, pp.260–266.
- Braak, H. & Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp.239–59.
- Bradbury, E.J. et al., 2002. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881), pp.636–640.
- Carulli, D. et al., 2010. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, 133(8), pp.2331–2347.
- Carulli, D. et al., 2006. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *Journal of Comparative Neurology*, 494(4), pp.559–577.

- Corvetti, L., 2005. Degradation of Chondroitin Sulfate Proteoglycans Induces Sprouting of Intact Purkinje Axons in the Cerebellum of the Adult Rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(31), pp.7150–7158.
- Crespo, D. et al., 2007. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Experimental Neurology*, 206(2), pp.159–171.
- Dauth, S. et al., 2016. Extracellular matrix protein expression is brain region dependent. *Journal of Comparative Neurology*, 524(7), pp.1309–1336.
- Davies, J.E. et al., 2004. Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries. *European Journal of Neuroscience*, 19(5), pp.1226–1242.
- Deepa, S.S. et al., 2006. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), pp.17789–17800.
- Deepa, S.S. et al., 2002. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors: Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), pp.43707–43716.
- Dewachter, I. et al., 2009. Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 30(2), pp.241–256.
- Dityatev, A. & Schachner, M., 2006. The extracellular matrix and synapses. *Cell and Tissue Research*, 326(2), pp.647–654.
- Dröge, W. & Schipper, H.M., 2007. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, 6(3), pp.361–370.
- Foster, T.C., Kyritsopoulos, C. & Kumar, A., 2016. Central role for NMDA receptors in redox mediated impairment of synaptic function during aging and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 322, pp.223–232.
- Fournier, A.E., Takizawa, B.T. & Strittmatter, S.M., 2003. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), pp.1416–23.
- Frischknecht, R. et al., 2009. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Neuroforum*, 15(3), pp.94–95.
- Gale, G.D. et al., 2004. Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. *Journal of Neuroscience*, 24(15), pp.3810–3815.
- Galtrey, C.M. et al., 2008. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 27(6), pp.1373–1390.
- Galtrey, C.M. & Fawcett, J.W., 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Research Reviews*, 54(1), pp.1–18.
- Gogolla, N. et al., 2009. Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science*, 325(5945), pp.1258–1261.

- Grimpe, B., 2004. A Novel DNA Enzyme Reduces Glycosaminoglycan Chains in the Glial Scar and Allows Microtransplanted Dorsal Root Ganglia Axons to Regenerate beyond Lesions in the Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 24(6), pp.1393–1397.
- Grumet, M., Milev, P. & Sakurai, T., 1994. Interactions with tenascin and differential-effects on cell-adhesion of neurocan and phosphacan, 2 major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous-tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), pp. 12142-12146.
- Hagihara, K. et al., 1999. Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurobiology*, 410(2), pp.256–264.
- Hartig, V. et al., 2001. Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Research*, 899(1-2), pp. 123-133.
- Hirakawa, S. et al., 2000. The brain link protein-1 (BRAL1): cDNA cloning, genomic structure, and characterization as a novel link protein expressed in adult brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), pp.982–989.
- Hockfield, S. & McKay, R.D., 1983. A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(18), pp.5758–5761.
- Hsai, A.Y. et al., 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp.3228–33.
- Iozzo, R.V., 1999. The Biology of the Small Leucine-rich Proteoglycans-Functional network of interactive proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), pp.18843-18846.
- Jefferson, S.C., Tester, N.J. & Howland, D.R., 2011. Chondroitinase ABC Promotes Recovery of Adaptive Limb Movements and Enhances Axonal Growth Caudal to a Spinal Hemisection. *Journal of Neuroscience*, 31(15), pp.5710–5720.
- John, N. et al., 2006. Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(4), pp.774–784.
- Jones, F.S. & Jones, P.L., 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental Dynamics*, 218(2), pp.235–259.
- Kappler, J. et al., 1998. Developmental regulation of decorin expression in postnatal rat brain. *Brain Research*, 793(1–2), pp.328–332.
- Kim, J.H. & Richardson, R., 2007. A developmental dissociation in reinstatement of an extinguished fear response in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(1), pp.48–57.
- Komitova, M. et al., 2006. Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Experimental Neurology*, 199(1), pp.113–121.

- Köppe, G. et al., 1997. Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochemical Journal*, 29(1), pp.11–20.
- Kumar, A. & Foster, T.C., 2013. Linking redox regulation of NMDAR synaptic function to cognitive decline during aging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(40), pp.15710–5.
- Kwok, J.C.F. et al., 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology*, 71(11), pp.1073–1089.
- Lacor, P.N. et al., 2007. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 27(4), pp.796–807.
- Lekeu, F. et al., 2002. Effects of incidental and intentional feature binding on recognition: a behavioural and PET activation study. *Neuropsychologia*, 40(2), pp.131–144.
- Lemons, M.L., Howland, D.R. & Anderson, D.K., 1999. Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Experimental neurology*, 160(1), pp.51–65.
- Logan, A., Baird, A. & Berry, M., 1999. Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere. *Exp.Neurol.*, 159(2), pp.504–510.
- De Luca, C. & Papa, M., 2016. Looking Inside the Matrix: Perineuronal Nets in Plasticity, Maladaptive Plasticity and Neurological Disorders. *Neurochemical Research*, 41(7), pp.1507–1515.
- Maeda, N. et al., 2003. Heterogeneity of the chondroitin sulfate portion of phosphacan/6B4 proteoglycan regulates its binding affinity for pleiotrophin/heparin binding growth-associated molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp.35805–35811.
- Margolis, R.U. & Margolis, R.K., 1997. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell and Tissue Research*, 290(2), pp.343–348.
- Massey, J.M., 2006. Chondroitinase ABC Digestion of the Perineuronal Net Promotes Functional Collateral Sprouting in the Cuneate Nucleus after Cervical Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 26(16), pp.4406–4414.
- Matsui, F. et al., 2002. Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. *Neuroscience*, 112(4), pp.773–781.
- Matsumoto, K. et al., 2003. Distinct Interaction of Versican/Pg-M with Hyaluronan and Link Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), pp.41205–41212.
- Matthews, R.T. et al., 2002. Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(17), pp.7536–7547.
- Maurel, P. et al., 1994. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), pp.2512–2516.
- Meyer K., Linker A. & Rapport M.M., 1951. The production of monosaccharides from hyaluronic acid by b-glucuronidase. *Journal Of Biological Chemistry*, 192(1), pp.275–

- Milev, P., Maurel, P., et al., 1998. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(2), pp.207–212.
- Milev, P. et al., 1998. High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *Journal Of Biological Chemistry*, 273(12), p.6998–7005.
- Milev, P. et al., 1994. Interactions of chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *Journal of Cell Biology*, 127(6), pp.1703–1715.
- Miyata S. et al., 2012. Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nature Neuroscience*, 15(3), pp.414–422.
- Monnier, P.P. et al., 2003. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 22(3), pp.319–330.
- Morawski, M. et al., 2012. Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathology*, 22(4), pp.547–561.
- Myers, K.M. & Davis, M., 2007. Mechanisms of fear extinction. *Molecular psychiatry*, 12(2), pp.120–150.
- Nelson, P.T. et al., 2012. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71(5), pp.362–381.
- Nicholson, C., Kamali-Zare, P. & Tao, L., 2011. Brain extracellular space as a diffusion barrier. *Computing and Visualization in Science*, 14(7), pp.309–325.
- Nicholson, C. & Sykova, E., 1998. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences.*, 21(5), pp.207–215.
- Novak, U. & Kaye, A.H., 2000. Extracellular matrix and the brain: components and function. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 7(4), pp.280–290.
- Oohashi, T. et al., 2002. Bral1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. *Molecular and cellular neurosciences*, 19(1), pp.43–57.
- Oohira, A. et al., 2000. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Archives of biochemistry and biophysics*, 374(1), pp.24–34.
- Oohira, A. et al., 2004. Neuroglycan C, a brain-specific part-time proteoglycan, with a particular multidomain structure. *Glycoconjugate Journal*, 21(1–2), pp.53–57.
- Peles, E. et al., 1995. The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase  $\beta$  is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell*, 82(2), pp.251–260.
- Philipson L.H. & Schwartz N.B., 1984. Subcellular localization of hyaluronate synthetase in

- oligodendrogloma cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 259(8), pp.5017–5023.
- Pizzorusso, T., 2002. Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science*, 298(5596), pp.1248–1251.
- Pizzorusso, T. et al., 2006. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), pp.8517–8522.
- Quirk, G.J., Garcia, R. & González-Lima, F., 2006. Prefrontal Mechanisms in Extinction of Conditioned Fear. *Biological Psychiatry*, 60(4), pp.337–343.
- Rauch, U. et al., 2004. Cartilage link protein interacts with neurocan, which shows hyaluronan binding characteristics different from CD44 and TSG-6. *Matrix Biology*, 22(8), pp.629–639.
- Rayudu, P. V & Choi, Y., 1998. Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Progress in Brain Research*, 118, pp.1535–1541.
- Romberg, C. et al., 2013. Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(16), pp.7057–7065.
- Ruoslahti, E., 1996. Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, 6(5), pp.489–492.
- Sahay, A., 2005. Secreted Semaphorins Modulate Synaptic Transmission in the Adult Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25(14), pp.3613–3620.
- Seidenbecher, C.I. et al., 1995. Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp.27206–27212.
- Serrano-pozo, A. et al., 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), pp.1–24.
- Shen, Y.J. et al., 2009. PTP sigma Is a Receptor for Chondroitin Sulfate Proteoglycan, an Inhibitor of Neural Regeneration. *Science*, 326(5952), pp.592–597.
- Schmalfeldt, M. et al., 1998. Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(25), pp.15758–15764.
- Silbert, J.E. & Sugumaran, G., 2002. Biosynthesis of Chondroitin / Dermatan Sulfate. *IUBMB life*, 54(4), pp.177–186.
- Sivasankaran, R. et al., 2004. PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nature Neuroscience*, 7(3), pp.261–268.
- Smith-Thomas, L.C. et al., 1995. Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *Journal of Cell Science*, 108, pp.1307–1315.
- Snyder, E.M. et al., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature Neuroscience*, 8(8), pp.1051–1058.
- Spicer, A.P., Joo, A. & Bowling, R.A., 2003. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes. The missing links. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), pp.21083–

21091.

- Suttkus, A. et al., 2016. The neuronal extracellular matrix restricts distribution and internalization of aggregated Tau-protein. *Neuroscience*, 313, pp.225–235.
- Syková, E., 2004. Diffusion properties of the brain in health and disease. *Neurochemistry International*, 45(4), pp.453–466.
- Tani, E. & Ametani, T., 1971. Extracellular distribution of ruthenium red-positive substance in the cerebral cortex. *Journal of Ultrastructure Research*, 34(1), pp.1-14
- Toole B.P., 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), pp.528–539.
- Tucker, R.P. & Chiquet-Ehrismann, R., 2009. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(5), pp.888–892.
- Végh, M.J. et al., 2014. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, p.76.
- Weber, P. et al., 1999. Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), pp.4245–4262.
- Weigel, P.H., Hascall, V.C. & Tammi, M., 1997. Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), pp.13997–14000.
- Winters, B.D. et al., 2004. Double Dissociation between the Effects of Peri-Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. *Journal of Neuroscience*, 24(26), pp.5901–5908.
- Yamagata, M., 2005. Versican in the Developing Brain: Lamina-Specific Expression in Interneuronal Subsets and Role in Presynaptic Maturation. *Journal of Neuroscience*, 25(37), pp.8457–8467.
- Yamagata T. et al., 1968. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *Journal of Biological Chemistry*, 243(7), pp.1523–1535.
- Yamaguchi, Y., 2000. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(2), pp.276–289.
- Yang, S. et al., 2015. Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. *Experimental Neurology*, 265, pp.48–58.
- Yick, L.W. et al., 2003. Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. *Experimental Neurology*, 182(1), pp.160–168.