

Proteomika proteaz na przykładzie możliwej roli MMP-9 w plastyczności synaptycznej*

Proteomics of proteases in the example of the possible role of MMP-9 in synaptic plasticity

Piotr Michaluk, Marcin Rylski, Leszek Kaczmarek

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie, Polska Akademia Nauk

Neuropsychiatria i Neuropsychologia 2008; 3, 3–4: 95–106

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Leszek Kaczmarek
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel. +48 22 589 22 40, faks +48 22 822 53 42
e-mail: l.kaczmarek@nencki.gov.pl

Streszczenie

W coraz większym stopniu proteazy są postrzegane jako precyzyjne mechanizmy komórkowe mogące regulować procesy biologiczne u wszystkich organizmów, a nie tylko jako niespecyficzne enzymy towarzyszące katabolizmowi białek. Z tego powodu niezwykle ważne są nowe podejścia eksperymentalne, które mogą wyjaśniać rolę proteaz oraz regulację ich aktywności na wszystkich etapach ekspresji białka, począwszy od transkrypcji genu, na hamowaniu aktywności poprzez endogenne inhibitory skończywszy. W swoich badaniach autorzy niniejszej pracy skupili się na poszukiwaniu nowych elementów regulujących transkrypcję genu *mmp-9* (ang. *matrix metalloproteinase 9* – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9), jak również na znalezieniu substratów dla tego enzymu w mózgu. Dzięki metodzie *footprinting* autorzy zidentyfikowali czynnik YY1, który okazał się represorem genu *mmp-9* w neuronach niepobudzonych, a także aktywatorem w neuronach stymulowanych. Przy użyciu immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) i immunoprecypitacji (IP), a następnie dzięki analizie uzyskanych próbek białek za pomocą spektrometrii mas, zidentyfikowano wiele potencjalnych partnerów wiążących się z YY1 *in vivo* zarówno w neuronach niepobudzonych, jak i pobudzonych. Z kolei badając aktywność białka MMP-9, autorzy wykazali cięcie β -dystroglikanu (białka błonowego występującego na synapsach neuronów) przez MMP-9 wydzielone w wyniku pobudzenia neuronalnego, co ma potencjalne znaczenie w plastyczności synaptycznej, procesach leżących prawdopodobnie u podstaw uczenia się i pamięci. W dalszej części pracy przedstawiono zrodzoną niedawno koncepcję „proteodegradomiki” oraz zestawiono metody mogące służyć do znajdowania potencjalnych substratów proteaz, jak również do analizowania poziomu proteolizy w różnych stanach komórki.

Słowa kluczowe: MMP-9, YY1, mózg, proteomika, macierz zewnątrzkomórkowa, proteazy

Abstract

More and more proteases are viewed as precise cellular mechanisms, which may regulate biological processes in all organisms, and not only as unspecific enzymes involved in catalysis of proteins. For this reason new experimental approaches are needed, which may explain the role of proteases and regulation of their activity on all levels of protein expression, starting from gene transcription, ending with inhibition of activity by endogenous inhibitors. In our research, we focused on finding new elements regulating transcription of the *mmp-9* (matrix metalloproteinase-9) gene and on finding new substrates for this enzyme in the brain. Thanks to the footprinting method we identified YY1 factor, which turned out to be an *mmp-9* gene repressor in non-stimulated and activator in stimulated neurons. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) and immunoprecipitation (IP) and analyzing resulting samples by mass spectrometry, we identified many potential partners binding to YY1 *in vivo* in non-stimulated and stimulated neurons. Studying the activity of MMP-9 protein, we have shown that cleavage of β -dystroglycan (transmembrane protein occurring on neuronal synapses) by MMP-9, released as a result of neuronal excitation, is potentially important in synaptic plasticity, a process which is probably a base of learning and memory. In a later part of this paper, we explain the new concept of “proteodegradomics” and we set together methods which are useful in finding new substrates for proteases and analysing the level of proteolysis in various states of the cell.

Key words: MMP-9, YY1, brain, proteomics, extracellular matrix, proteases

* Niniejsza praca została wygłoszona podczas XXIII Zimowej Szkoły Instytutu Farmakologii PAN w Mogilianach i opublikowana: Michaluk P, Rylski M, Kaczmarek L. Proteomika proteaz na przykładzie możliwej roli MMP-9 w plastyczności synaptycznej. W: Genomika i proteomika w biologii i medycynie. XXIII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Kraków 2006. Przewłocka B. (red.). Kraków 2006; 79-89.

Wstęp

Zrozumienie molekularnego podłoża plastyczności synaptycznej jest wielkim wyzwaniem współczesnej neurobiologii, jest ona bowiem powszechnie akceptowaną podstawą takich zjawisk, jak: uczenie się i pamięć, reorganizacja połączeń neuronalnych w toku rozwoju (m.in. okresy krytyczne w rozwoju kory mózgowej) oraz czynnościowa regeneracja po uszkodzeniach mózgu. Jak dotąd znakomita większość badań plastyczności synaptycznej jest skoncentrowana na procesach zachodzących wewnątrz komórek nerwowych, po obu (pre- i postsynaptycznej) stronach szczeliny synaptycznej. Ostatnio jednak zwraca się także uwagę na zjawiska proteolizy zachodzące w macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix* – ECM) otaczającej synapsy (Dityatev i Shachner 2003; Oray i wsp. 2004). Wydaje się bowiem, że bez zrozumienia procesów zachodzących w ECM nie będzie możliwe uzyskanie całościowego obrazu biologii molekularnej plastyczności. Warto też podkreślić, że określenie ważnych dla plastyczności procesów odbywających się w przestrzeni między- i pozakomórkowej jest szczególnie atrakcyjne dla potencjalnego opracowania nowych podejść terapeutycznych (prokognitywnych i sprzyjających rehabilitacji po uszkodzeniach mózgu oraz w chorobach neurodegeneracyjnych). Mamy tu bowiem, z oczywistych względów, ułatwiony dostęp do leków, które nie muszą penetrować błony komórki nerwowej.

W swoich badaniach autorzy niniejszej pracy podjęli zagadnienie biologicznej roli zewnątrzkomórkowej proteolizy z udziałem metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases* – MMPs). Nasze zainteresowanie tym zagadnieniem w kontekście plastyczności neuronalnej, w tym uczenia się i pamięci, wynika z poprzednich obserwacji, wskazujących na:

- kluczową dla tych zjawisk rolę białka c-Fos i jego udziału w czynniku transkrypcyjnym AP-1 (Kaczmarek 1993; Kaczmarek i Chaudhuri 1997; Kaczmarek 2002);
- udział AP-1 w zależnej od pobudzenia neuronalnego kontroli ekspresji genu kodującego białko tkankowego inhibitora metaloproteinaz 1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* – TIMP-1), które z kolei reguluje aktywność biologiczną niektórych MMP (zwłaszcza MMP-9) (Jaworski i wsp. 1999; Dzwonek i wsp. 2004).

Proteomika chromatyny genu MMP-9

W swoich ostatnich badaniach autorzy niniejszej pracy stwierdzili, że zgodnie z oczekiwaniami AP-1 odgrywa rolę w kontroli ekspresji genu *mmp-9* (Ryłski i Kaczmarek 2004), jak również odkryli, że niezidentyfikowany dotychczas w mózgu czynnik transkrypcyjny YY1 (Thomas i Seto 1999) także kontroluje ten gen. Zaobserwowano, że mRNA dla MMP-9 ulega indukcji w szczurzym hipokampie po 2 godz. od aktywacji neuronalnej wywołanej dootrzewnowym podaniem pentyletetrazolu (PTZ). W celu sprawdzenia, jakie białka regulują transkrypcję MMP-9, zastosowano metodę *footprinting*. Fragment promotora *mmp-9* inkubowano z ekstraktami białek jądrowych z hipokampów szczurów stymulowanych za pomocą PTZ, a następnie traktowano próbki DNazą I, co powoduje, że regiony DNA niechronione przez związane z nimi białka ulegają degradacji. Można więc określić sekwencje DNA, do których związały się czynniki transkrypcyjne, co w przypadku doświadczeń autorów ujawniło sekwencje konsensusowe wiązania AP-1 i YY1.

W celu potwierdzenia wiązania się białek hipokampalnych do obu regionów zidentyfikowanych podczas *footprintingu*, wykonano analizy metodą EMSA (ang. *electromobility shift assay*) (Cutts i wsp. 1997), w której inkubuje się lizaty białkowe ze znakowanym radioaktywnie fragmentem DNA i rozdziela próbki na żelu poliakrylamidowym. Migracja sondy, do której związało się białko, ulega opóźnieniu w stosunku do sondy niezwiązanej z powodu większych rozmiarów takiego kompleksu, co można obserwować na autoradiogramie. Analiza metodą EMSA z wykorzystaniem sondy o sekwencji konsensusowej dla AP-1 lub YY1 wykazała, że wiązanie białek jądrowych hipokampa do miejsca YY1 jest znacznie silniejsze w próbkach pochodzących od szczurów niepobudzonych neuronalnie niż będących 2 godz. po drgawkach wywołanych PTZ, podczas gdy wiązanie białek do miejsca AP-1 zachowuje się odwrotnie. W celu identyfikacji białek wiążących się do omawianych fragmentów promotora *mmp-9* autorzy posłużyli się metodą *supershift* EMSA, w której do mieszaniny inkubacyjnej dodaje się dodatkowo przeciwciała skierowane przeciwko specyficznemu białku (w tym przypadku AP-1 lub YY1). Jeśli do sondy wiąże się białko, które wykrywa dodane przeciwciała, to taki „potrójny” kompleks migruje jeszcze wolniej w żelu poliakrylamidowym. Badania metodą *supershift* EMSA potwierdziły, że białkiem hipokampal-

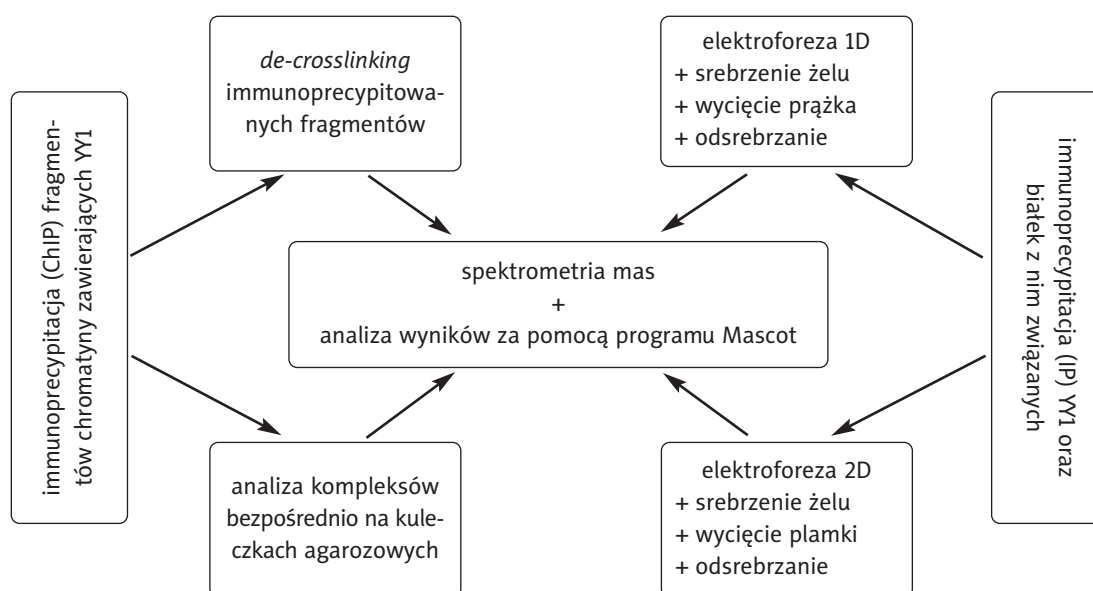
nym wiążącym się do potencjalnego miejsca AP-1 jest czynnik AP-1, a do miejsca YY1 jest Yin Yang 1.

Odkryte przez nas interakcje zachodzą również *in vivo*, co wykazały analizy z wykorzystaniem immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) (Das i wsp. 2004). Metoda ta polega na łagodnym utrwalaniu za pomocą 1-procentowego formaldehydu komórek hipokampa w warunkach powodujących związanie się kowalencyjne kompleksów białkowych chromatyny do DNA. Następnie z hipokampa są izolowane ekstrakty tkankowe, w których za pomocą ultradźwięków fragmentuje się chromatynę na kawałki o długości ok. 500–1000 par zasad. Kolejnym krokiem jest dodanie do próbek przeciwciała skierowanego przeciwko interesującemu nas białku chromatyny oraz kuleczek agarozowych pokrytych białkiem G, które ma immobilizować kompleks przeciwciało-białko. Po odwirowaniu próbki fragmenty chromatyny zawierające interesujące nas białko pozostają w osadzie, a supernatant jest odrzucany. W wyniku kilku płukań kulek agarozowych w warunkach zwiększającej się restrykcyjności, niespecyficznie związane białka są odrzucane. Właściwe fragmenty chromatyny, odpłukane z kuleczek za pomocą buforu o dużym stężeniu dodecylsiarczanu sodu (SDS), inkubuje się w roztworze o dużym stężeniu chlorku sodu, co powoduje rozerwanie wiązań pomiędzy białkami chromatyny a DNA, wytworzonych w trakcie utrwalania tkanki.

Jak wspomniano, w hipokampie szczurów nie pobudzonych, YY1 jest znajdowane w znacznej ilości na chromatynie promotora *mmp-9*,

podczas gdy w 2 godz. po pobudzeniu neuronalnym jego obecność ulega wyraźnej redukcji. Potwierdzono to, stosując barwienia immunocytochemiczne lokalizujące białko YY1 wraz z hybrydyzacją *in situ* wskazującą umiejscowienie mRNA dla MMP-9. Zmniejszanie się zawartości białka YY1 na chromatynie proksymalnego promotora *mmp-9* po aktywacji neuronalnej koreluje z jednoczesną aktywacją tego genu, co sugeruje, że YY1 funkcjonuje jako represor transkrypcji *mmp-9*. Tezę tę potwierdzają badania przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronalnych z użyciem genu reporterowego pokazujące, że aktywność lucyferazy rośnie wielokrotnie w neuronach nie pobudzonych, gdy wprowadzimy do nich gen lucyferazy znajdujący się pod kontrolą promotora *mmp-9* ze zmutowanym miejscem wiązania YY1 w porównaniu z ekspresją lucyferazy będącej pod kontrolą „dzikiego” promotora *mmp-9*. Dodatkowo badania tego typu wykazały, że oprócz hamowania ekspresji MMP-9 w neuronach nie pobudzonych, YY1 współuczestniczy w aktywacji genu *mmp-9* po pobudzeniu neuronalnym. Autorzy przypuszczają, że za aktywację transkrypcji genu *mmp-9* przez YY1 oprócz odłączania się tego białka od promotora odpowiadają również partnerzy YY1, których „ściąga” on do chromatyny tego promotora, a następnie się od niej odłącza.

W celu rozwinięcia tych wyników podjęto ostatnio próby identyfikacji białek, które w chromatynie mózgu mogą oddziaływać z YY1 (ryc. 1.). Do tego celu wykorzystano m.in. metody proteomiki, głównie spektrometrię mas (ang. *mass spectrometry* – MS) (Steen



Ryc. 1. Proteomika chromatyny

i Mann 2004). Przed wprowadzeniem próbek do spektrometru masowego autorzy poddawali je trawieniu trypsyną, która powoduje rozpad białek na fragmenty mające na C-końcu protonowane aminokwasy. Peptydy o takiej strukturze są szczególnie łatwe do sekwencjonowania. Mieszanina peptydów pochodzących z trawienia trypsyną jest wprowadzana do kapilarnej kolumny chromatograficznej, wypływający z niej przesącz jest przekształcany w aerozol składający się z silnie zjonizowanych peptydów i wprowadzany po odparowaniu do spektrometru masowego. Wykorzystywany przez autorów do badań spektrometr masowy był wyposażony w analizator typu pułapki jonowej, zatem umożliwiał pomiar widm MS/MS. Od razu po wejściu wielokrotnie uprotionowanych peptydów do urządzenia oblicza ono widma mas poszczególnych jonów peptydowych. Widma te zwane są normalnymi lub MS. Dla ścisłości należy zaznaczyć, że spektrometr nie mierzy mas cząstek jako takich, ale stosunek ich masy do ładunku (współczynnik m/z). Ponieważ jony peptydowe wchodzące do spektrometru niosą na sobie wiele ładunków, zatem obserwowana w stosunku m/z wartość „z” musi być pomnożona przez liczbę obecnych na cząsteczce protonów po to, by obliczyć masy poszczególnych peptydów. Na podstawie tych danych komputer generuje spriorytetyzowaną listę peptydów znajdujących się w spektrometrze. Pierwszy peptyd z utworzonej komputerowo listy jest poddawany dalszej fragmentacji w wyniku kolizji energetycznej z gazem i aparat mierzy widma mas powstających z niego mniejszych fragmentów. Widma te nazywane są tandemowymi lub MS/MS. Spektra MS i MS/MS są przez aparat zapamiętywane i generowane w postaci zbiorczego pliku danych, który otrzymuje badacz jako dane wyjściowe ze spektrometru będące informacjami o sekwencjach zidentyfikowanych peptydów. Dane te następnie wprowadza się do programu komputerowego (na przykład Mascot), który wykryte sekwencje porównuje z sekwencjami białek obecnymi w bazach danych, co umożliwia ich identyfikację.

Przeprowadzono immunoprecypitację chromatyny (metoda ChIP) związanej z YY1 w komórkach hipokampa szczurów niebudzonych neuronalnie. Za kontrolę doświadczeń posłużyły autorom immunoprecypitaty chromatyny uzyskane z użyciem przeciwciała izotypowego do immunoglobuliny anty-YY1. Po odłączeniu i oddzieleniu kompleksów chromatyny od kuleczek agarozowych pokrytych białkiem G oraz od przeciwciała i po dekarbonylowaniu, zanalizo-

wano je za pomocą spektrometrii mas. Analiza tak przygotowanych preparatów powiodła się, choć zbyt duże stężenie SDS w buforze odłączającym kompleksy chromatyny od kuleczek i przeciwciała zniszczyło kolumnę chromatograficzną wprowadzającą próbki do spektrometru masowego. Zidentyfikowano jednak *in vivo* w chromatynie niebudzonych komórek szczurzego hipokampa następujących potencjalnych partnerów białkowych YY1: *atrophin-1-interacting protein 1*, *Van Gogh-like 1 (strabismus 2; Vang-like protein 1)*, *joubertin*, *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*, *bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthetase 1*, *transcription intermediary factor 1-β, similar to AAA-ATPase TOB3*, *hypothetical protein FLJ11193* i *hypothetical protein FLJ35826*.

Wobec niekorzystnego wpływu SDS na kolumnę chromatograficzną autorzy niniejszej pracy zmodyfikowali podejście badawcze. Po immunoprecypitacji chromatyny z komórek szczurzego hipokampa przeciwciałem skierowanym przeciw YY1 lub przeciwciałem izotypowym jej kompleksy nie były odłączane od kuleczek i przeciwciała, tylko poddawane analizie MS bezpośrednio w kompleksie. To podejście nie przyniosło oczekiwanego rezultatu. Wszechobecne w próbkach białko G oraz immunoglobuliny były jedynymi wykrytymi przez analizę MS składnikami próbek badanych przez autorów niniejszej pracy.

Sekwencje aminokwasowe obecne w wynikach uzyskanych z analiz MS próbek po ChIP były identyfikowane przy użyciu programu Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Następnie porównywano wyniki uzyskane za pomocą przeciwciała skierowanego przeciwko YY1 z wynikami otrzymanymi z przeciwciałem izotypowym. Za istotne uznawano tylko te białka, które występowały w immunoprecypitatach YY1, ale nie występowały w próbkach kontrolnych. Każdą zidentyfikowaną sekwencję o kompletnym, jasno zdefiniowanym widmie spektrometrycznym uznawano za istotną. Ponieważ analiza za pomocą spektrometrii mas nie jest metodą ilościową, białko uznawano za zidentyfikowane nawet wtedy, gdy tylko jeden fragment jego sekwencji był obecny w analizowanej próbce.

Następnym krokiem w kierunku identyfikacji partnerów YY1 była immunoprecypitacja (IP) ekstraktów białek hipokampalnych przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko YY1 oraz jako kontroli za pomocą odpowiedniego dla niego przeciwciała izotypowego w materiale pochodzącym z komórek hipokam-

pa szczurów niepobudzonych neuronalnie oraz w 2 godz. po pobudzeniu neuronalnym. Immunoprecypitacja jest metodą podobną do CHIP, jednak podczas IP komórki nie są utrwalane i nie ma potrzeby fragmentacji chromatyny oraz wymywania kompleksów z kuleczek agarozowych, a także ich dekroslinowania (Williams 2000). W konsekwencji CHIP bada interakcje białkowe *in vivo*, a IP *in vitro*. Po IP próbki właściwe i kontrolne były rozdzielane koło siebie na żelu SDS-PAGE lub na dwóch różnych żelach jednocześnie za pomocą elektroforezy dwukierunkowej. Po elektroforezie żele barwiono solami srebra. Na żelach po elektroforezie jednokierunkowej poszukiwano prążków obecnych w linii elektroforetycznej należącej do próbki właściwej, ale niewystępujących w linii należącej do próbki kontrolnej. Na żelach po elektroforezie dwukierunkowej poszukiwano plamek, które byłyby obecne na żelach po immunoprecypitacji z przeciwciałem przeciwko YY1, a które nie występowałyby na odpowiednich żelach z rozdzielonymi immunoprecypitatami kontrolnymi. Po identyfikacji takie różnicowe prążki lub plamki były wycinane z żelu pod laminarem do hodowli komórkowych, odsrebrzane i analizowane za pomocą MS. Wyniki analiz MS były analizowane w programie Mascot. Każdą zidentyfikowaną sekwencję o kompletnym, jasno zdefiniowanym widmie spektrometrycznym uznawano za istotną.

W rezultacie analiz IP rozdzielanych za pomocą elektroforezy jednokierunkowej zidentyfikowano metodą MS jako potencjalnych partnerów YY1 w hipokampie szczurzym następujące białka:

- u szczurów niepobudzonych neuronalnie: *huntingtin* (*Huntington's disease protein homolog*), *β2-chimerin*, *similar to Zinc finger HIT domain containing 2 protein*, *hypothetical protein FLJ44290*, *hypothetical protein LOC366671*, *Ica69-related protein*, *γ-glutamyl transferase 6*, *14-3-3 protein epsilon*, *FGA protein*,
- u szczurów w 2 godz. po pobudzeniu neuronalnym: *desmoplakin 1*, *clathrin heavy chain 1*, *huntingtin*, *sodium/potassium-transporting ATPase α-1 chain*, *vigilin*, *Unc-13 homolog A*, *major vault protein*, *Ras-interacting protein 1*, *multidrug resistance-associated protein 6*, *integrin alpha-D precursor*, *dynammin-1*,
- dodatkowo w próbkach IP pochodzących ze szczurzych hipokampów w 2 godz. po pobudzeniu neuronalnym i rozdzielonych za pomocą elektroforezy dwukierunkowej zidentyfikowano metodą MS jako

potencjalnych partnerów YY1 w hipokampie szczurzym: *melanoma-associated antigen MG50*, *hornerin*, *nebulin*, *calgranulin B*, *similar to Wolf-Hirschhorn protein i syndrome candidate 1 protein*.

Biologiczna rola białek z rodziny MMP

Białka MMP tworzą rodzinę ponad 20 enzymów będących zewnątrzkomórkowymi (najczęściej występującymi okołokomórkowo, ale część jest związana z błoną) endopeptydazami wymagającymi jonu Zn^{2+} do swej aktywności. Większość białek wchodzących w skład rodziny MMP składa się z trzech podstawowych domen: propeptydu na N-końcu, domeny katalitycznej i domeny podobnej do hemopeksyny na C-końcu. Usunięcie propeptydu na skutek proteolitycznego cięcia powoduje aktywację zymogenu (wszystkie białka rodziny MMP powstają bowiem w formie proenzymu) (Masova i wsp. 1998; Woessner i Nagase 2000). Domena podobna do hemopeksyny jest dobrze zachowana w toku ewolucji i odgrywa rolę w wiązaniu substratów oraz w oddziaływaniach z endogennymi inhibitorami MMP – białkami TIMP (Gomis-Ruth i wsp. 1997). Białka MMP mają wielkie znaczenie w degradacji nie tylko składników ECM, ale także białek występujących na powierzchni komórki, jak również innych znajdujących się poza komórką. Są przez to zaangażowane w wiele procesów fizjologicznych (rozwój tkanek i narządów, naprawa uszkodzeń) oraz patologicznych (stan zapalny, przerzuty nowotworowe) (Woessner i Nagase 2000; Sternlicht i Werb 2001). Macierz zewnątrzkomórkowa w znacznym stopniu wpływa na zachowanie komórek poprzez oddziaływanie z cząsteczkami sygnalizacyjnymi, czynnikami wzrostu i wiążącymi je białkami. Działa także jako ligand dla receptorów adhezji komórek, takich jak integryny, które przekazują sygnał do wnętrza komórki. Proteolityczne trawienie macierzy zewnątrzkomórkowej powoduje także uwolnienie cząsteczek mających aktywność biologiczną (Giannelli i wsp. 1997).

Także trawienie białek nienależących do macierzy zewnątrzkomórkowej przez enzymy z rodziny MMP może powodować uwolnienie cząsteczek o aktywności biologicznej. Przykładem takiej sytuacji jest cięcie plazminogenu przez MMP-2, -7, -9 i -12, wskutek czego powstaje inhibitor angiogenezy – angiostatyna (Patterson i Sang 1997; O'Reilly i wsp. 1999). Wykazano również, że MMP-3 aktywuje poprzez mechanizm proteolityczny kinazę regulowaną przez sygnał zewnątrzkomórkowy

(ang. *extracellular signal-regulated kinase* – ERK) (Kim i wsp. 2005).

Pomimo intensywnych badań nad MMP i TIMP w różnych dziedzinach biologii, rola tych białek w mózgu pozostaje w dużej mierze nieznaną. Wiadomo, że w ośrodkowym układzie nerwowym MMP są uwalniane przez leukocyty infiltrujące tkanki, a w sytuacji patologicznej, takiej jak zniszczenie bariery krew-mózg, przez rezydujące komórki (Mun-Bryce i Rosenberg 1998). Wykazano także ich zaangażowanie m.in. w odnajdywaniu drogi przez wzrastający akson (Hehr i wsp. 2005). Spośród białek wchodzących w skład rodziny MMP, rola MMP-9 w mózgu wydaje się być szczególnie interesująca, gdyż enzym ten jest zaangażowany m.in. w śmierć neuronów (Gu i wsp. 2002; Saillant i wsp. 2003) oraz w plastyczność neuronalną (Kaczmarek i wsp. 2002). W szczególności autorzy niniejszej pracy wykazali, że zarówno poziom mRNA, białka, jak i aktywność enzymatyczna MMP-9 wzrastają 6–24 godz. po drgawkach wywołanych kainianem, głównie w hipokampie i korze mózgowej (Szklarczyk i wsp. 2002). Wzrost ekspresji MMP-9 jest obserwowany przede wszystkim w ciałach neuronów i w dendrytach. W hipokampie ten wzrost jest ograniczony do zakrętu zębatego, który przechodzi znaczne zmiany strukturalne (plastyczne) w modelu kainianowym (Szklarczyk i wsp. 2002). Co szczególnie istotne, ostatnio wykazano, że MMP-9 jest białkiem synaptycznym, którego ekspresja i aktywność enzymatyczna w synapsach hipokampa wzrastają pod wpływem stymulacji kainianem (Konopacki i wsp. 2007; Wilczyński i wsp. 2008).

Wspólnie ze współpracownikami ze Stanów Zjednoczonych autorzy niniejszej pracy stwierdzili również, że MMP-9 reguluje późną fazę długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. *long term potentiation* – LTP), które jest uznanym modelem plastyczności neuronalnej (Nagy i wsp. 2006). W tym kontekście można postawić hipotezę, że pozakomórkowa aktywność proteolityczna zachodząca z udziałem MMP-9 umożliwia takie zmiany w strukturze ECM, które pozwalają na reorganizację połączeń synaptycznych (zmiany wielkości i liczby synaps). Co więcej, uzasadniona wydaje się także i taka hipoteza, że MMP-9 może być zaangażowana w przekazywanie sygnałów w synapsach, np. poprzez proteolizę białek związanych z błoną czy też przez cięcie białek uwalniających cząsteczki sygnałowe (Kaczmarek i wsp. 2002; Oray i wsp. 2004; Van den Steen i wsp. 2000). Do weryfikacji obu tych hipotez niezbędna jest znajomość

białek, na które działa MMP-9 w warunkach fizjologicznych. Nadal jednak niewiele wiadomo o substratach *in vivo* dla MMP-9 w mózgu, które miałyby wpływ na plastyczność synaptyczną. Atrakcyjnym kandydatem jest β -dystroglikan, który, jak wykazano, jest cięty przez MMP z wydzielaniem peptydu o masie ok. 30 kDa (pełnej długości β -dystroglikan ma ok. 43 kDa) (Yamada i wsp. 2001).

β -dystroglikan jako substrat MMP-9

Dystroglikan został po raz pierwszy opisany jako składnik kompleksu dystrofinowego (Ervasti i wsp. 1990), który występuje w mięśniach szkieletowych, jak również w innych tkankach, w tym w mózgu. Gen dystroglikanu koduje α - i β -dystroglikan jako pojedynczy transkrypt i białko, które jest cięte w wyniku modyfikacji potranslacyjnych (Holt i wsp. 2000). A-dystroglikan jest zewnątrzkomórkowym białkiem podlegającym glikozylacji poprzez wiązania O-glikozyłowe (Ervasti i Campbell 1991). Między innymi dzięki tym resztom cukrowym białko to oddziałuje na powierzchnię komórki z lamininą, agryną, perlekanem, a w mózgu z neureksyną (Henry i Campbell 1999; Suita i wsp. 2001). A-dystroglikan jest niekowalencyjnie związany z β -dystroglikanem, który będąc białkiem transbłonowym, kotwiczony α -dystroglikan w błonie, a jego część cytoplazmatyczna wiąże różne cząsteczki, takie jak dystrofinę, utrofinę czy rapsynę (Jung i wsp. 1995; Henry i Campbell 1999; Culligan i Ohlendieck 2002).

W ośrodkowym układzie nerwowym dystroglikan ulega ekspresji w składnikach bariery krew-mózg (śródbłonek, glej) oraz w synapsach, w błonie postsynaptycznej (Zaccaria i wsp. 2001; Culligan i Ohlendieck 2002; Levi i wsp. 2002). Warto w tym kontekście wspomnieć, że poprzednio pokazano selektywne zmiany ekspresji głównych partnerów dystroglikanu na synapsie, neureksyny II α oraz dystrofiny Dp71, w zakręcie zębatym hipokampa w odpowiedzi na traktowanie szczurów kwasem kainowym, co interpretowano jako wskazówkę, że cząsteczki te mogą mieć znaczenie w plastyczności synaptycznej (Gorecki i wsp. 1998; Gorecki i wsp. 1999).

Bezpośredni udział dystroglikanu w funkcjonowaniu synaps ujawniły obserwacje myszy będących mózgowo-selektywnymi nokautami dla dystroglikanu. Zwierzęta te (podobnie jak myszy bez MMP-9) mają zablokowaną późną fazę LTP (Moore i wsp. 2002). Szczegóły molekularne synaptycznej funkcji dystroglikanu

nie są znane, chociaż można przypuszczać, że białko to odgrywa rolę w kaskadach przekazujących sygnały. Na przykład, przy użyciu immunoprecypitacji odkryto bezpośrednie interakcje dystroglikanu z adaptorowym białkiem Grb2 oraz z kinazą FAK (ang. *focal adhesive kinase*). Oba białka są elementami klasycznych szlaków przekazywania sygnałów od receptorowych kinaz tyrozynowych (Grb) oraz od integryn i niektórych receptorów neurotransmiterów (FAK) (Siciliano i wsp. 1996; Cavaldesi i wsp. 1999). Pojawia się także coraz więcej dowodów na to, że w procesach przekazywania sygnałów dystroglikan oddziałuje bezpośrednio lub pośrednio z kinazą ERK, która jest niezwykle istotna dla procesów uczenia się i pamięci (Golin i Segal 2003; Sweatt 2004). W szczególności wykazano, że β -dystroglikan jest białkiem kotwiczącym dla ufosforylowanej kinazy ERK-1 i kinazy MEK-1 (Spence i wsp. 2004). Związek funkcjonalny dystroglikanu z kinazami ERK zachodzi w procesach przekazywania sygnałów od integryn (Ferletta i wsp. 2003), a także w mechanotransdukcji w komórkach nabłonkowych pęcherzyków płucnych (Jones i wsp. 2005).

W kontekście powyższych informacji autorzy niniejszej pracy chcieli ustalić, czy β -dystroglikan jest rzeczywiście trawiony przez MMP-9 na synapsie w trakcie pobudzenia neuronalnego. Wiadomo, że trawienie β -dystroglikanu jest zależne od MMP, ale brak jest jednoznacznych danych, że to właśnie MMP-9 jest zaangażowana w ten proces (Yamada i wsp. 2001). Pokazano uprzednio, że trawienie β -dystroglikanu w hipokampie szczura koreluje ze wzrostem aktywności MMP-9 po drgawkach wywołanych podaniem kwasu kainowego (Kaczmarek i wsp. 2002), oraz uzyskano wstępne dane, że proces ten jest zaburzony u myszy nokautowych bez aktywnej MMP-9 (Dzwonek 2004). Obserwacje te wymagały jednak weryfikacji za pomocą innych metod.

W pierwszym etapie autorzy niniejszej pracy uzyskali rekombinowaną formę autoaktywującego się MMP-9 (aaMMP-9), korzystając z cDNA pochodzącego z laboratoriów firmy Pfizer, USA (Fisher i wsp. 2002). Tak uzyskane MMP-9 dodawano do ekstraktów białek hipokampa szczura, po czym poddano analizie *Western-blot* z przeciwciałem rozpoznającym β -dystroglikan. Dodanie do mieszaniny rekombinowanego aaMMP-9 spowodowało nagromadzenie się ciętej formy β -dystroglikanu, ale w obecności fenantroliny (niespecyficznego inhibitora MMP) cięcie β -dystroglikanu jest cał-

kowicie wstrzymane (Dzwonek 2004; Michaluk i wsp. 2007). Świadczy to o tym, że MMP-9 jest zaangażowane w trawienie β -dystroglikanu. Być może zjawisko to zachodzi bezpośrednio, choć możliwe jest, że MMP-9 aktywuje inne proteazy, które trawią β -dystroglikan. Fenantrolina będąca chelatorem jonów Zn^{2+} , które są kofaktorem wszystkich MMP, jest zbyt nieselektywna, by stwierdzić, czy to właśnie MMP-9 trawi bezpośrednio β -dystroglikan, pozwala jednak na wykazanie, że cięcie to jest zależne od proteazy metalozależnej.

W celu dalszej analizy hipotezy o cięciu β -dystroglikanu przez MMP-9 stymulowano pierwotną hodowlę korową (Xia i wsp. 1996; Jaworski i wsp. 2003) 10-mikromolowym glutaminianem sodu. Następnie izolowano z komórek ekstrakty białkowe, które analizowano za pomocą metody *Western-blot* z przeciwciałem skierowanym przeciw β -dystroglikanowi. W rezultacie obserwowano cięcie β -dystroglikanu już po 10 min od stymulacji (Michaluk i wsp. 2007). Aby pokazać, czy cięcie to jest zależne od MMP-9, zastosowano wektor adenowirusowy niosący cDNA kodujące TIMP-1 (endogenny inhibitor MMP, a zwłaszcza MMP-9). Jako kontroli użyto wektora niosącego gen β -galaktozydazy. Hodowlę infekowano wirusami na 24 godz. przed eksperymentem (Jaworski i wsp. 2003), a następnie pobudzano komórki glutaminianem. W próbkach pochodzących z komórek zainfekowanych adenowirusem niosącym TIMP-1 cięcie β -dystroglikanu jest wyraźnie zredukowane, co sugeruje, że MMP-9 jest zaangażowana w jego degradację. Adenowektor z genem β -galaktozydazy nie ma żadnego wpływu na cięcie.

Postanowiono również sprawdzić wpływ egzogennej MMP-9 na proteolizę β -dystroglikanu w hodowli neuronalnej. Komórki inkubowano z rekombinowanym MMP-9, po czym stymulowano je glutaminianem. W próbkach pochodzących z komórek inkubowanych z MMP-9 cięcie β -dystroglikanu było wyraźnie większe, co świadczy o tym, że MMP-9 jest zaangażowana w jego degradację. Ponadto zastymulowanie komórek nie spowodowało zwiększenia degradacji β -dystroglikanu, co może świadczyć o tym, że populacja tego białka, strawiona w wyniku inkubacji z rekombinowanym MMP-9, jest tą samą, jaka jest cięta w wyniku stymulacji. Wykazano tym samym, że stymulacja neuronów prowadzi do wzrostu aktywności proteolitycznej w macierzy zewnątrzkomórkowej, co objawia się w tym przypadku trawieniem β -dystroglikanu (Michaluk i wsp. 2007).

Poszukiwanie nowych substratów MMP-9 w mózgu

Ponieważ wiadomo, że po stymulacji szczura kainianem następuje wzrost aktywności proteolitycznej MMP-9 na synapsie w hipokampie (Szkłarczyk i wsp. 2002; Konopacki i wsp. 2007; Wilczyński i wsp. 2008) i że proteaza ta jest zaangażowana w plastyczność synaptyczną (Nagy i wsp. 2006), dobrze byłoby sprawdzić, jakie białka na synapsie są trawione przez MMP-9. Ich identyfikacja może przyczynić się do uzyskania całościowego obrazu zjawisk składających się na proces plastyczności synaptycznej, otwierając zarazem nowe perspektywy badawcze.

W celu zidentyfikowania substratów MMP-9 w synapsie po stymulacji neuronalnej, autorzy niniejszej pracy chcą wykorzystać tzw. podejście „proteodegradomiki” (Lopez-Otin i Overall 2002; Descamps i wsp. 2004). Koncepcja ta polega na inkubacji ekstraktów białkowych z tkanki z rekombinowaną proteazą, analizie zdegradowanych białek za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (ewentualnie dwuwymiarowej elektroforezy) i ich identyfikacji za pomocą MS. Autorzy w swoich badaniach zamierzają wykorzystać błonową frakcję synaptyczną i rekombinowane aktywne MMP-9 do identyfikacji substratów tej proteazy występujących na synapsie. Tego rodzaju metodę wykorzystano już do identyfikacji substratów MMP-9 w oku myszy (Descamps i wsp. 2004). Ekstrakt białek oka inkubowano z rekombinowanym, aktywnym MMP-9, a następnie wraz z ekstraktem kontrolnym rozdzielano w żelu poliakrylamidowym. Zaobserwowano degradację prążka o masie 31 kDa i za pomocą MS zidentyfikowano to białko jako krystalinę β B-1. Dzięki analizie produktu trawienia za pomocą degradacji Edmana poznano miejsce cięcia przez MMP-9. W badaniach tych wykorzystano również interesujące podejście z zastosowaniem myszy typu nokaut. Ponieważ chemokina GCP-2 stymuluje wydzielanie MMP-9, wstrzyknięto ją *in vivo* do tylnej komory oka myszy pozbawionych białka MMP-9 oraz myszy typu dzikiego. Następnie ekstrakty białkowe analizowano za pomocą dwuwymiarowej elektroforezy, gdzie obserwowano pojawianie się produktu degradacji krystaliny β B-1. W przypadku badań autorów jako induktor wydzielania MMP-9 zastosowano wywołujący drgawki pentylenetetrazol (PTZ). Stosując podejście „proteodegradomiki”, Hwang i wsp. (2004) zidentyfikowali 15 substratów MMP-14 w osoczu krwi, anali-

zując ok. 40 plamek na obrazie dwukierunkowej elektroforezy.

Do identyfikacji substratów proteaz na dużą skalę można również zastosować dobrze znany system dwuhybrydowy w drożdżach. W swej klasycznej postaci wykorzystuje on domenową budowę czynników transkrypcyjnych i polega na rekonstytucji czynnika transkrypcyjnego wiążącego się do promotora genu reporterowego, umożliwiającego wzrost drożdży na selektywnej pożywce bądź ekspresję genu *LacZ* umożliwiającą identyfikację pozytywnych kolonii. W przypadku poszukiwania substratów dla proteazy jako „przynętę” można zastosować domenę proteazy, która bierze udział w wiązaniu substratu. Po raz pierwszy użyto tego systemu do znalezienia nowych substratów MMP-2. Wzięto pod uwagę, że kolagen będący substratem MMP-2 wiąże się do jej domeny hemopeksynowej i wykorzystano ją jako „przynętę” w systemie dwuhybrydowym (McQuibban i wsp. 2000). Jednak nie zawsze białka oddziałujące z domenami proteazy muszą być jej substratami, dlatego Overall i wsp. (2004) zastosowali jako „przynętę” w systemie dwuhybrydowym zmutowaną w miejscu aktywnym domenę katalityczną MT1-MMP. Podejście to opiera się na założeniu, że substrat proteazy wiąże się do domeny katalitycznej enzymu, ale ze względu na zmutowanie reszty aminokwasowej istotnej dla katalizy nie nastąpi jego cięcia, a w efekcie także uwolnienie z miejsca aktywnego.

Oczywistymi ograniczeniami systemu dwuhybrydowego są trudności z prawidłową ekspresją białek. Nie można oczekiwać, że wszystkie substraty będą ulegały ekspresji w jądrze (w przypadku klasycznego systemu dwuhybrydowego), szczególnie jeśli modyfikacje posttranslacyjne są istotne dla rozpoznania substratu. Poza tym nie wiadomo, czy fałdowanie się białek przebiegnie prawidłowo, szczególnie białek wydzielanych na zewnątrz komórki mających mostki disiarczkowe. Autorzy w swoich badaniach chcą poszukać w bibliotece cDNA szczura po treningu behawioralnym substratów dla MMP-9, używając zmutowanej w miejscu aktywnym domeny katalitycznej MMP-9 w systemie rekrutacji białka SOS (SRS), będącego odmianą systemu dwuhybrydowego (Detka i wsp. 2006). System ten opiera się na obserwacji, że ssaczy czynnik wymieniający nukleotyd guanylowy (ang. *GDP-GTP exchange factor*) – hSos, może aktywować białko Ras tylko wtedy, gdy jest zlokalizowany przy błonie komórkowej. W komórkach ssaczy zjawisko takie wystę-

puje podczas rekrutacji takiego czynnika do części cytoplazmatycznej aktywowanego receptora wzrostu. Drożdże piekarskie wymagają aktywacji szlaku sygnałowego Ras do wzrostu w wyższej temperaturze. Specjalny szczep drożdży pozbawionych czynnika wymieniającego nukleotyd guanylowy dla Ras nie jest w stanie rosnąć w wyższej temperaturze, ale ekspresja białka hSos skierowanego do błony komórkowej w sposób sztuczny przez sygnał mirystylacji pozwala na wzrost. Białko będące przynętą jest w fuzji z hSos, a białka ekspresjonowane na bazie przeszukiwanej biblioteki cDNA są w fuzji z sygnałem kierującym do błony.

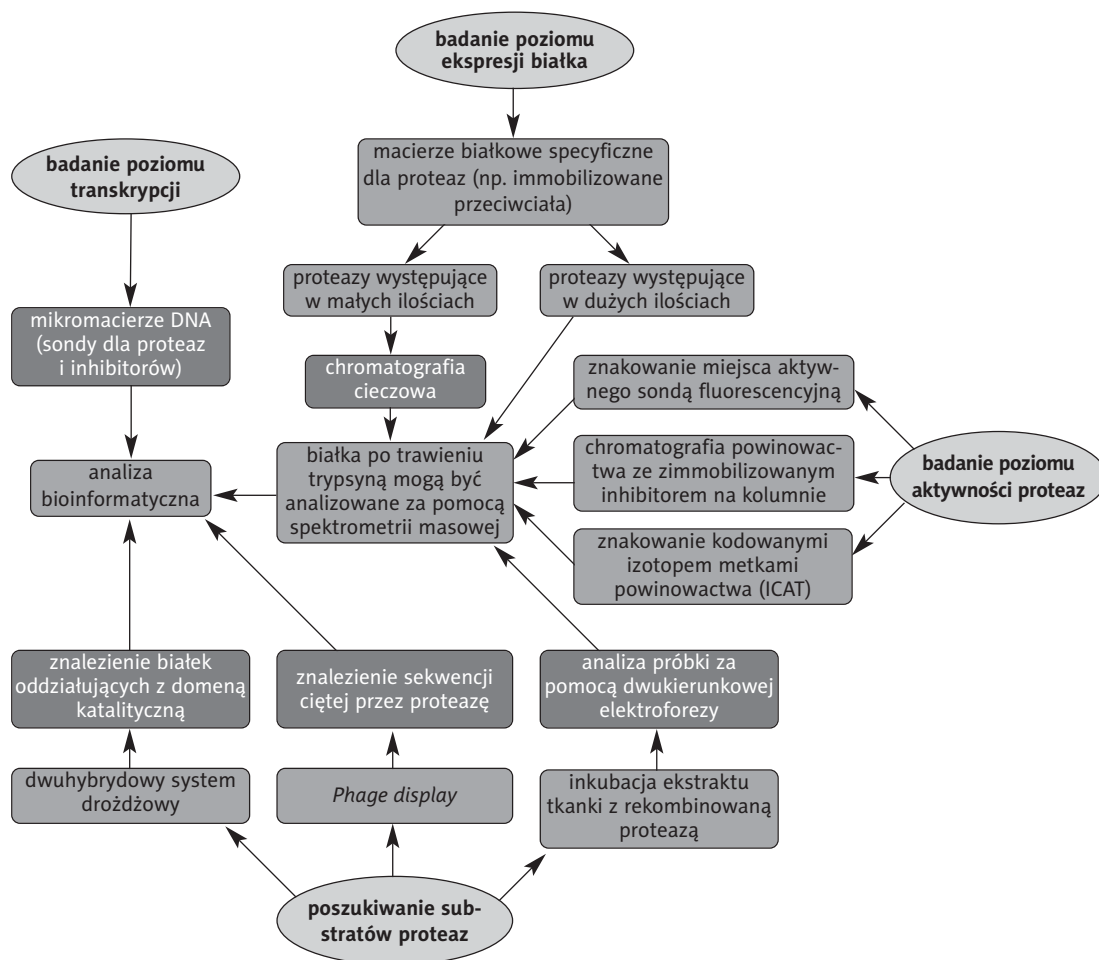
Kolejną metodą, którą można zastosować do identyfikacji substratów proteaz, może być *phage display*. Polega ona na stworzeniu biblioteki 6-aminokwasowych peptydów ekspresjonowanych na kapsydzie faga M13 w fuzji z epitopem FLAG. Biblioteka fagów jest następnie inkubowana z rekombinowaną proteazą, po czym fagi trawione są oddzielane od nietrawionych dzięki precypitacji tych drugich przeciwciałami anty-FLAG. Fagi trawione pozostałe w supernatancie są namnażane w komórkach *Escherichia coli* i z powrotem zawracane do selekcji. Po 3–5 cyklach selekcji fagi mogą być analizowane pod względem kodowanej sekwencji. Na tej podstawie wiadomo, jakie peptydy są trawione przez proteazę, i korzystając z baz danych, można zidentyfikować białka, w skład których wchodzi znalezione przez autorów niniejszej pracy peptydy. Metoda ta pozwala również na określenie sekwencji konsensusowej trawionej przez interesującą nas proteazę. Dzięki zastosowaniu tej techniki określono sekwencję konsensusową i znaleziono potencjalne substraty dla MMP-9 (Kridl i wsp. 2001).

Należy jednak pamiętać, że proteazy nie działają w odosobnieniu, ale jako komponenty ogromnego systemu proteolitycznego komórki składającego się nie tylko z pokrewnych proteaz, ale także z ich inhibitorów, substratów, receptorów i białek wiążących te proteazy. Często jedna proteaza tnie wiele substratów lub na odwrót, wiele proteaz może trawić jedno białko. Ponadto enzymy proteolityczne mogą aktywować inne elementy całych kaskad proteaz, czy też ulegać autolizie i degradować innych członków systemu. Hierarchia elementów takiego systemu będzie zależna od poziomu ekspresji proteaz, ich rozmieszczenia w przestrzeni i w czasie, aktywacji oraz inhibicji. Poznanie tych zagadnień jest kluczowe, szczególnie w opracowywaniu nowych leków, gdyż łatwo

sobie wyobrazić sytuację, że kilka proteaz może trawić ten sam substrat *in vitro*, ale w sytuacji *in vivo* trawienie substratu może zachodzić tylko dzięki jednej z nich. Widać więc, że nawet dla dość dobrze poznanych proteaz całościowy obraz degradomu jest daleki od zrozumienia.

Spośród narastającej liczby metod dogodnych do analizowania proteaz, wymienić należy mikromacierze DNA, które w przypadku analizy proteaz zawierałyby sondy specyficzne nie tylko dla poszczególnych proteaz z danego gatunku, ale również ich inhibitorów. Macierze takie byłyby dogodne do obserwowania ogólnego obrazu transkrybowanych proteaz i inhibitorów w różnych stanach komórki. Jednak poziom mRNA tych białek nie mówiłby nam wiele o ich poziomie ekspresji, nie wspominając już o aktywności enzymów proteolitycznych. Z tego powodu informacje uzyskane za pomocą mikromacierzy DNA powinny być uzupełniane informacjami z macierzy białkowych specyficznych dla proteaz (ryc. 2.). Macierz taka mogłaby się składać z immobilizowanych przeciwciał mogących wyłapywać konkretne proteazy ze złożonych mieszanin białek. Na macierzach można by też zastosować immobilizowane cząsteczki chemiczne specyficznie oddziałujące z proteazami. Białka po związaniu z macierzą mogłyby być trawione trypsyną *in situ* i analizowane za pomocą MS. Metoda ta może być łatwo zastosowana do analizy proteaz, które są zaangażowane w procesy kataboliczne i ich ekspresja zachodzi na wysokim poziomie, wówczas czułość MS jest wystarczająca. Jednak w stosunku do proteaz, które są częścią kaskad przekazujących sygnały wewnątrzkomórkowe i których ekspresja jest pod ścisłą kontrolą, wymagane będzie zastosowanie chromatografii cieczowej w celu zagęszczenia próbek, aby nadawały się do analizy za pomocą MS. Innym ważnym ograniczeniem tej metody jest fakt, że skupia się ona raczej na różnicach w ekspresji białek niż na różnicach w aktywności enzymatycznej. Ograniczenia te są szczególnie istotne, gdy chce się badać proteazy, które podlegają wielu mechanizmom regulacji posttranslacyjnej, takim jak choćby aktywacja zymogenu, autokatalityczne odcinanie domen wiążących inhibitor itp.

Aby rozróżnić aktywny enzym od jego formy prekursorowej, niezbędne są testy na aktywność proteolityczną. W przypadku proteaz serynowych i cysteinowych, których mechanizm katalityczny polega na stworzeniu kowalencyjnie związanego z enzymem kompleksu przejściowego zawierającego grupę acylową, można określić aktywność enzymu za pomocą sondy znakowa-



Ryc. 2. Metody badania degradomu

nej fluorescencyjnie, która wiąże się z seryną bądź cysteiną w centrum katalitycznym. Dzięki temu będzie można zidentyfikować aktywne formy enzymów poprzez różnice masy, jak i poprzez znacznik fluorescencyjny. Możliwe jest też inne podejście pozwalające na rozróżnienie formy aktywnej od latentnej, polegające na sekwencjonowaniu aktywnych proteaz wyłapanych z roztworu przez immobilizowany na kolumnie chromatograficznej inhibitor. Po elucji związanych z kolumną proteaz można by je analizować za pomocą MS.

Metodą, za pomocą której można by rozróżnić ilość aktywnego enzymu w dwóch różnych próbkach, jest znakowanie kodowanymi izotopem metkami powinowactwa (ang. *isotope coded affinity tags* – ICAT). Metoda ta polega na inkubacji metki powinowactwa znakowanej ośmioma deuterami bądź ośmioma wodorami i mającymi metkę biotynylową, która ma

związać się ze zredukowanymi resztami cysteinowymi, m.in. tymi, które znajdują się w miejscu aktywnym proteazy cysteinowej. Takie same białka mogą być więc wyznakowane ilościowo i porównane dzięki różnicom w masie pomiędzy próbkami z ciężkim („deuterowym”) znacznikiem i lekkim („wodorowym”) znacznikiem. Próbkę są następnie mieszane, trawione razem przez trypsynę, a następnie analizowane za pomocą MS. Dzięki przesunięciom w widmie masowym możliwe jest ilościowe porównanie występowania aktywnych form tego samego enzymu w dwóch różnych próbkach.

Na koniec warto też wspomnieć o mikromacierzach białkowych, gdzie sondami są substraty proteaz, a raczej peptydy wyznakowane fluorescencyjnie, które mogą być potencjalnie trawione przez dane enzymy proteolityczne.

Piśmiennictwo

- Cavaladesi M, Macchia G, Barca S, et al. Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J Neurochem* 1999; 72: 1648-1655.
- Culligan K, Ohlendieck K. Diversity of the brain dystrophin-glycoprotein complex. *J Biomed Biotech* 2002; 2: 31-36.
- Cutts SM, Masta A, Panousis C, et al. A gel mobility shift assay for probing the effect of drug-DNA adducts on DNA-binding proteins. *Methods Mol Biol* 1997; 90: 95-106.
- Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* 2004; 37: 961-969.
- Descamps FJ, Martens E, Proost P, et al. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 provokes cataract by cleaving lens betaB1 crystallin. *FASEB J* 2004; 19: 29-35.
- Detka D, Kalińska K, Kaczmarek L. Activation function-1 domain plays a negative role in dimerization of estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 99: 157-160.
- Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 456-468.
- Dzwonek J. Aktywacja metaloproteazy 9 (MMP-9) w mózgu w odpowiedzi na pobudzenie neuronale in vivo substancjami drgawkogennymi. Praca doktorska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, 2004 Warszawa.
- Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors (TIMPs) in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett* 2004; 567: 129-135.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, et al. Deficiency of glycoprotein component of dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; 345: 315-319.
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991; 66: 1121-1131.
- Ferletta M, Kikkawa Y, Yu H, et al. Opposing roles of integrin alpha6beta1 and dystroglycan in laminin-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2088-2103.
- Fisher KE, Fei Q, Laird ER, et al. Engineering autoactivating forms of matrix metalloproteinase-9 and expression of the active enzyme in cultured cells and transgenic mouse brain. *Biochemistry* 2002; 41: 8289-8297.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, et al. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin 5. *Science* 1997; 277: 225-228.
- Goldin M, Segal M. Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2529-2539.
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389: 77-81.
- Gorecki DC, Lukasiuk K, Szklarczyk AW, et al. Kainate-evoked changes in dystrophin mRNA levels in the rat hippocampus. *Neuroscience* 1998; 84: 467-477.
- Gorecki DC, Szklarczyk A, Lukasiuk K, et al. Differential seizure-induced and developmental changes of neurexin expression. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13: 218-227.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297: 1186-1190.
- Hehr CL, Hocking JC, McFarlane S. Matrix metalloproteinases are required for retinal ganglion cell axon guidance at select decision points. *Development* 2005; 132: 3371-3379.
- Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 602-607.
- Holt KH, Crosbie RH, Venzke DP, et al. Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett* 2000; 468: 79-83.
- Hwang IK, Park SM, Kim SY, Lee ST. A proteomic approach to identify substrates of matrix metalloproteinase-14 in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1702: 79-87.
- Jaworski J, Biedermann IW, Lapinska J, et al. Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of timp-1 gene expression in rodent hippocampus. *J Biol Chem* 1999; 274: 28106-28112.
- Jaworski J, Mioduszevska B, Sánchez-Capelo A, et al. Inducible cAMP early repressor, an endogenous antagonist of cAMP responsive element-binding protein, evokes neuronal apoptosis in vitro. *J Neurosci* 2003; 23: 4519-4526.
- Jones JC, Lane K, Hopkinson SB, et al. Laminin-6 assembles into multimolecular fibrillar complexes with perlecan and participates in mechanical-signal transduction via a dystroglycan-dependent, integrin-independent mechanism. *J Cell Sci* 2005; 118: 2557-2566.
- Jung D, Yang B, Meyer J, et al. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 1995; 270: 27304-27310.
- Kaczmarek L. Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? *J Neurosci Res* 1993; 34: 377-381.
- Kaczmarek L, Chaudhuri A. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Rev* 1997; 23: 237-256.
- Kaczmarek L. c-Fos in learning: beyond the mapping of neuronal activity. W: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 19: Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction. Kaczmarek L, Robertson HA (ed.). Elsevier, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo 2002; 189-216.
- Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S. Matrix metalloproteinases in adult brain physiology: a link between c-Fos, AP1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J* 2002; 21: 6643-6648.
- Kim YS, Kim SS, Cheo JJ, et al. Matrix metalloproteinase-3: a novel signalling protease from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci* 2005; 25: 3701-3711.
- Konopański FA, Rylski M, Wilczek E, et al. Synaptic localization of seizure-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA. *Neuroscience* 2007; 150: 31-39.
- Kridel SJ, Chen E, Kotra LP, et al. Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2001; 276: 20572-20578.
- Lévi S, Grady RM, Henry MD, et al. Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* 2002; 22: 4274-4285.
- Lopez-Otin C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 509-519.
- Masova I, Kotora LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J* 1998; 12: 1075-1098.
- McQuibban GA, Gong J-H, Tam EM, et al. Inflammation dampened by gelatinase cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; 289: 1202-1206.
- Michaluk P, Kołodziej Ł, Mioduszevska B, et al. Beta-dystroglycan as a synaptic target for Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem* 2007; 282: 16036-16041.

40. Moore SA, Saito F, Chen J, et al. Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Science* 2002; 418: 422-425.
41. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 1998; 274: R1203-R1211.
42. Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, et al. Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory. *J Neurosci* 2006; 26: 1923-1934.
43. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, et al. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 1999; 274: 29568-29571.
44. Oray S, Majewska A, Sur M. Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* 2004; 44: 1021-1030.
45. Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, et al. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-Chip, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem* 2004; 385: 493-504.
46. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 1997; 272: 28823-28825.
47. Rylski M i Kaczmarek L. AP-1 targets in the brain. *Front Biosci* 2004; 9:8-23
48. Siciliano JC, Toutant M, Derkinderen P, et al. Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase beta (PYK2/CAKbeta) and pp125 (FAK) by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J Biol Chem* 1996; 271: 28942-28946.
49. Spence HJ, Dhillon AS, James M, Winder SJ. Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade. *EMBO Rep* 2004; 5: 484-489.
50. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 699-711.
51. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
52. Sugita S, Saito F, Tang J, et al. A stoichiometric complex of neuroligins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol* 2001; 154: 435-445.
53. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14: 311-317.
54. Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, et al. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 2002; 22: 920-930.
55. Thomas MJ, Seto E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 1999; 236: 197-208.
56. Vaillant C, Meissirel C, Mutin M, et al. MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24: 395-408.
57. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, et al. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; 96: 2673-2681.
58. Wilczynski GM, Konopacki FA, Wilczek E, et al. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol* 2008; 180: 1021-1035.
59. Williams NE. Immunoprecipitation procedures. *Methods Cell Biol* 2000; 62: 449-453.
60. Woessner JF, Nagase H. *Protein Profile, Matrix Metalloproteinases and TIMPs*; Oxford University Press, Oxford 2000.
61. Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neuroscience* 1996; 16: 5425-5436.
62. Yamada H, Saito F, Fukuta-Ohi H, et al. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Gen* 2001; 10: 1563-1569.
63. Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, et al. Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study. *Neuroscience* 2001; 104: 311-324.