

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vera J. Stamenković

**ISPITIVANJE ULOGE
MOLEKULA VANĆELIJSKOG MATRIKSA
TENASCINA-C U REGULACIJI STRUKTURNE
I FUNKCIONALNE PLASTIČNOSTI MALOG
MOZGA I OBLIKOVANJU PONAŠANJA MIŠA
NAKON IZLAGANJA USLOVIMA OBOGAĆENE
SREDINE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vera J. Stamenković

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF
THE EXTRACELLULAR MATRIX MOLECULE
TENASCIN-C IN THE REGULATION OF
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PLASTICITY
OF THE CEREBELLUM AND IN SHAPING OF THE
BEHAVIOR OF MOUSE AFTER EXPOSURE TO
ENRICHED ENVIRONMENT CONDITIONS**

Ph.D. Thesis

Belgrade, 2017

Mentor:

dr Pavle R. Andus, redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Miroslav Savić, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Đorđe Miljković, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Centru za lasersku mikroskopiju i laboratoriji Katedre za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, laboratorijama za neurobiologiju i neuromorfologiju Nencki Instituta za eksperimentalnu biologiju u Poljskoj, kao i na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se:

mentoru prof. dr Pavlu R. Anđusu na ukazanom poverenju i pruženim prilikama za stručno usavršavanje, na pomoći u osmišljavanju eksperimenata i diskusijama rezultata, kao i na pomoći prilikom pisanja radova i izrade ove doktorske disertacije

prof. dr Laszek Kaczmarek-u i dr Grzegorz Wilczynski-om na stručnim savetima i dragocenim smernicama tokom izrade ove disertacije

prof. dr Miroslavu Saviću i dr Đorđu Miljkoviću na korisnim komentarima i predlozima tokom izrade ove doktorske disertacije

prof. dr Borisu Šakiću na stručnim savetima i pomoći u planiranju eksperimenata ponašanja, kao i analizi i diskusiji rezultata

kolegama sa Katedre za uporednu fiziologiju i ekofiziologiju na pomoći i korisnim savetima prilikom izvođenja metode Western blot

kolegama iz Centra za lasersku mikroskopiju na podršci i pozitivnoj radnoj atmosferi, kao i na svim lepim trenucima druženja

prijateljima i porodici na neizmernoj podršci

ISPITIVANJE ULOGE MOLEKULA VANĆELIJSKOG MATRIKSA TENASCINA-C U REGULACIJI STRUKTURNE I FUNKCIONALNE PLASTIČNOSTI MALOG MOZGA I OBLIKOVANJU PONAŠANJA MIŠA NAKON IZLAGANJA USLOVIMA OBOGAĆENE SREDINE

REZIME

Tenascin-C (TnC) je glikoprotein prisutan u vanćelijskom matriksu (VĆM) različitih tkiva kičmenjaka tokom razvića, gde je uključen u regulaciju ćelijskog rasta, migracije i adhezije preko aktivacije različitih unutarćelijskih signalnih puteva. Ekspresija TnC je značajno smanjena u adultnom organizmu, međutim ostaje prisutna samo u određenim perifernim tkivima, kao i u delovima centralnog nervnog sistema koji zadržavaju visok nivo plastičnosti, kao što je mali mozak, gde je uočena njegova uloga u modulaciji sinaptičkih funkcija. Obogaćena sredina (OS) oblikuje mnoge aspekte ponašanja i stoga može da posluži kao pristup za proučavanje neuronalne plastičnosti u adultnom organizmu. Izlaganje OS dovodi do brojnih promena na molekularnom i ćelijskom nivou u različitim regionima mozga uključujući mali mozak.

Cilj ove studije je bio da se ispita uloga TnC u modulaciji strukturne plastičnosti malog mozga indukovane OS praćenjem distribucije perineuronalnih mreža (PNM), promene u veličini i gustini ekscitatornih i inhibitornih presinaptičkih završetaka, kao i aktivnosti glavnih enzima koji vrše razgradnju VĆM, MMP-2 i MMP-9. Takođe, ova studija je imala za cilj da ispita kako nedostatak TnC interaguje sa spoljašnjom sredinom u oblikovanju različitih domena ponašanja povezanih sa funkcijom malog mozga. U te svrhe, miševi sa nedostatkom TnC (TnC^{-/-}) ili MMP-9 (MMP-9^{-/-}) i odgovarajući kontrolni miševi starosti 3 nedelje su izlagani standardnim uslovima gajenja (SS) ili OS 4 ili 8 nedelja.

Ova studija je pokazala da izlaganje OS u toku 8 nedelja dovodi do smanjenja intenziteta bojenja na PNM, kao i smanjenja u veličini GABAergičkih i povećanja broja i veličine glutamatergičkih sinaptičkih završetaka u kontrolnim miševima. Nasuprot tome, TnC^{-/-} miševi su pokazali smanjen intenzitet bojenja na PNM u poređenju sa kontrolnim životinjama gajenim u SS, dok njihovo izlaganje OS nije dovelo da smanjenja, već do blagog povećanja intenziteta PNM. Pored toga, OS nije uticala na

gustinu dva tipa sinaptičkih završetaka kod TnC^{-/-} miševa, dok je veličina inhibitornih, ali ne i ekscitatornih, sinaptičkih završetaka bila povećana. Takođe, merenjem aktivnosti MMP-9, kao i praćenjem njene kolokalizacije sa PNM i presinaptičkim markerima, pokazano je da MMP-9, ali ne i MMP-2, utiče na remodelovanje PNM i sinaptičku plastičnost u malom mozgu u vremenskom periodu između 4. i 8. nedelje izlaganja OS. Ovi nalazi su dodatno potvrđeni rezultatima dobijenim na MMP-9^{-/-} miševima.

Za procenu ponašajnog fenotipa TnC^{-/-} miševa korišćena je baterija testova nakon izlaganja ovih životinja SS i OS u trajanju od 8 nedelja. Ova studija pokazuje da TnC^{-/-} miševi gajeni u SS ispoljavaju spontanu noćnu hiperaktivnost, kao i slabu senzomotornu koordinaciju i sporo plivanje u Morisovom vodenom lavirintu. Međutim, izlaganje ovih životinja OS je dovelo do ukidanja hiperlokomocije, brže habituacije ovih životinja na novu sredinu, poboljšanja snage prednjih ekstremiteta i delimičnog poboljšanja koordinacije pokreta, dok je sposobnost plivanja ostala poremećena. S druge strane, nedostatak TnC je umanjio pozitivne efekte OS na sposobnost učenja i pamćenja, kao i anksiolitičke efekte OS na smanjivanje nivoa akrofobije.

Ova studija pokazuje da je TnC uključen u regulaciju procesa strukturne plastičnosti u malom mozgu, kao i da su interakcije između TnC i MMP-9 neophodne za odigravanje ovih procesa. Takođe, ova studija proširuje postojeće znanje o ponašajnom fenotipu TnC^{-/-} miševa i otkriva da efekat genetičke osnove na ponašajne odgovore može biti izmenjen izlaganjem životinja stimulatívnoj sredini.

Ključne reči: Tenascin-C, matriksna metaloproteinaza-2 i -9, mali mozak, obogaćena sredina, perineuronalna mreža, strukturna plastičnost, ponašanje

Naučna oblast: Neuronauke

Uža naučna oblast: Neurofiziologija sa biofizikom

UDK broj: [575.853'3:611.817]:591.5(043.3)

INVESTIGATION OF THE ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX MOLECULE TENASCIN-C IN THE REGULATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PLASTICITY OF THE CEREBELLUM AND IN SHAPING OF THE BEHAVIOR OF MOUSE AFTER EXPOSURE TO ENRICHED ENVIRONMENT CONDITIONS

ABSTRACT

Tenascin-C (TnC) is a glycoprotein present in the extracellular matrix (ECM) of a variety of vertebrate tissues during development, where it plays multiple roles in cell growth, migration and adhesion by activating diverse intracellular signaling pathways. Expression of TnC is markedly downregulated in the adulthood, persisting in a few peripheral structures and in central nervous system areas known to retain high degree of plasticity, such as the cerebellum, where it is involved in the modulation of synaptic functions. Enriched environment (EE) shapes many aspects of behavior and may, therefore, serve as a paradigm to study neuronal plasticity in the adult. Exposure to EE leads to numerous changes at the molecular and cellular levels, which target various brain regions including the cerebellum.

The aim of present study was to examine the role of TnC in the modulation of cerebellar structural plasticity induced by the exposure to EE by following the appearance of perineuronal nets (PNN), changes in size and density of excitatory and inhibitory synaptic terminals, and the activity of major ECM degrading enzymes, MMP-2 and MMP-9. Furthermore, the present study aimed to examine how TnC deficiency interacts with the environment in shaping different behavioral domains associated with the cerebellum. To this end, 3-week-old mice lacking TnC (TnC^{-/-}) or MMP-9 (MMP-9^{-/-}) and corresponding wild-type mice were exposed to standard conditions (SC) or an enriched environment (EE) for 4 or 8 weeks.

The present study shows that 8 weeks of exposure to EE leads to reduced staining of PNN, reduction in the size of GABAergic and increase in the number and size of glutamatergic synaptic terminals in wild-type mice. Conversely, TnC^{-/-} mice showed reduced staining of PNNs compared to wild-type mice maintained under standard conditions, while exposure to EE did not further reduce, but even slightly increased PNN staining. EE did not affect the densities of the two types of synaptic

terminals in TnC^{-/-} mice, while the size of inhibitory, but not of excitatory synaptic terminals was increased. In the time frame of 4-8 weeks, MMP-9, but not MMP-2, was observed to influence PNN remodeling and cerebellar synaptic plasticity as revealed by measurement of MMP-9 activity and colocalization with PNNs and synaptic markers. These findings were supported by observations on MMP-9^{-/-} mice.

To assess the behavioral phenotype of TnC^{-/-} mice a comprehensive battery of tests was used after post-weaning housing animals in SC or EE for 8 weeks. The present study shows that when housed in SC, TnC^{-/-} mice exhibited spontaneous nocturnal hyperactivity, as well as poor sensorimotor coordination and low swimming velocity in the Morris water maze. However, housing of TnC^{-/-} mice in EE abolished hyperlocomotion, led to faster habituation to novel environment, strengthened the grasp of fore limbs and partially improved movement coordination, while the swimming ability remained deficient. Conversely, TnC deficiency attenuated both the beneficial effects of EE on learning/memory capacity and the anxiolytic effect of EE in reducing the level of acrophobia.

The present study shows that TnC contributes to the regulation of structural plasticity in the cerebellum and that interactions between TnC and MMP-9 are important for these processes to occur. Furthermore, this study expands the existing knowledge about the phenotype associated with TnC deficiency, and reveals that the effect of genetic background on the behavioral response could be altered by housing in a stimulating environment.

Key words: Tenascin-C, matrix metalloproteinase-2 and -9, cerebellum, enriched environment, perineuronal net, structural plasticity, behavior

Scientific filed: Neuroscience

Narrower scientific field: Neurophysiology and Biophysics

UDC number: [575.853'3:611.817]:591.5(043.3)

Sadržaj:

1. Uvod	1
1.1 Vanćelijski matriks mozga	1
1.2 Tenascin-C	3
1.2.1 Struktura tenascina-C	3
1.2.2 Ekspresija tenascina-C, ćelijski izvori i receptori	5
1.2.3 Uloga tenascina-C u neuronalnoj plastičnosti	6
1.2.4 Ponašanje TnC ^{-/-} miševa.....	8
1.3 Perineuronalne mreže	9
1.3.1 Sastav perineuronalnih mreža u malom mozgu.....	10
1.3.2 Funkcije perineuronalnih mreža	11
1.4 Proteolitički enzimi u vanćelijskom matriksu	14
1.4.1 Želatinaze.....	15
1.5 Postupak „obogaćenja sredine” i neuralna plastičnost	18
1.6 Anatomsko-funkcionalne specifičnosti malog mozga	22
1.6.1 Struktura malog mozga i glavne projekcije	22
1.6.2 Ćelijska organizacija malog mozga	24
1.6.3 Postnatalni razvoj malog mozga – uloga TnC i želatinaza.....	27
2. Ciljevi istraživanja	30
3. Materijali i metode	31
3.1 Eksperimentalni model	31
3.2 Genotipizacija životinja metodom polimerazne lančane reakcije (PCR)	31
3.2.1 PCR protokol za detekciju TnC ^{+/+} i TnC ^{-/-} miševa.....	31
3.2.2 PCR protokol za detekciju MMP-9 ^{+/+} i MMP-9 ^{-/-} miševa.....	33
3.3 Gajenje životinja u standardnoj i obogaćenoj sredini	34
3.4 Gel zimografija	35
3.4.1 Izolacija dubokih jedara i kore malog mozga.....	35
3.4.2 Prečišćavanje MMP	36
3.4.3 Detekcija MMP-2 i MMP-9 aktivnosti na SDS-poliakrilamidnom gelu.....	37

3.5 Izolacija proteina i Western blot analiza	39
3.5.1 Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva	39
3.5.2 Određivanje koncentracije proteina	39
3.5.3 Razdvajanje proteina na SDS-PAGE	40
3.5.4 Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu	41
3.5.5 Imunološka detekcija proteina (Western blot) – analiza ekspresije TnC	41
3.6 In situ zimografija visoke rezolucije	42
3.6.1 Izolacija i alkoholna fiksacija tkiva	42
3.6.2 Impregnacija voska u tkivo	43
3.6.3 Kalupljenje tkiva u vosak i priprema parafinskih blokova za sečenje	43
3.6.4 Zimografija	44
3.7 Histohemija i imunohistohemija	45
3.7.1 Priprema moždanog tkiva	45
3.7.2 Fluorescentno obeležavanje moždanih preseka	46
3.8 Konfokalna mikroskopija	48
3.9 Analiza fluorescentnog signala	48
3.9.1 Kvantifikacija intenziteta ISZ i WFA signala	48
3.9.2 Kvantifikacija kolokalizacije ISZ i WFA signala	49
3.9.3 Kvantifikacija ISZ signala u jedrima i vanćelijskom prostoru	49
3.9.4 Kvantifikacija ISZ signala unutar tela Purkinje neurona	50
3.9.5 Kvantifikacija gustine i veličine presinaptičkih završetaka	50
3.10 Merenje ponašanja	51
3.10.1 Neurološki testovi	52
3.10.2 Test održavanja na žici	53
3.10.3 Test silaženja sa platforme	53
3.10.4 Test hodanja po gredi	53
3.10.5 „Rota-rod” test (rotirajući cilindar)	54
3.10.6 Test otvorenog polja	54
3.10.7 Spontana noćna aktivnost	55
3.10.8 Morisov vodeni lavirint	55
3.11 Statistička obrada podataka	57

4. Rezultati	58
4.1 Genotipizacija eksperimentalnih životinja	58
4.2 Distribucija tenascina-C u <i>n. dentatus</i>	59
4.3 Distribucija tenascina-C u kori malog mozga	60
4.4 Izmenjena strukturna plastičnost u <i>n. dentatus</i> kod TnC ^{-/-} miševa nakon izlaganja obogaćenoj sredini 8 nedelja	61
4.5 Uloga tenascina-C u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti	64
4.6 Uloga želatinaza u degradaciji perineuronalnih mreža i sinaptičkoj plastičnosti... ..	67
4.7 Aktivnost želatinaza unutar Purkinje neurona.....	69
4.8 Perineuronalne mreže i aktivnost želatinaza nakon izlaganja TnC ^{+/+} i TnC ^{-/-} miševa standardnoj i obogaćenoj sredini 4 nedelje	71
4.9 Perineuronalne mreže kod MMP-9 ^{+/+} i MMP-9 ^{-/-} miševa nakon izlaganja standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja.....	74
4.10 Sinaptička plastičnost kod MMP-9 ^{+/+} i MMP-9 ^{-/-} miševa nakon izlaganja standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja.....	75
4.11 Ekspresija tenascina-C nakon izlaganja TnC ^{+/+} i TnC ^{-/-} miševa standardnoj i obogaćenoj sredini 4 i 8 nedelja	78
4.12 Ekspresija tenascina-C nakon izlaganja MMP-9 ^{+/+} i MMP-9 ^{-/-} miševa standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja.....	79
4.13 Merenje ponašanja TnC ^{+/+} i TnC ^{-/-} miševa nakon izlaganja standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja	80
4.13.1 Telesna masa.....	82
4.13.2 Neurološki testovi.....	83
4.13.3 Test održavanja na žici	84
4.13.4 Test silaženja sa platforme	85
4.13.5 Test hodanja po gredi	86
4.13.6 „Rota-rod” test (rotirajući cilindar)	88
4.13.7 Test otvorenog polja	89
4.13.8 Spontana noćna aktivnost	91
4.13.9 Morisov vodeni lavirint	92

5. Diskusija.....	96
5.1 Uloga TnC u strukturnoj plastičnosti malog mozga	96
5.1.1 Uloga TnC u sazrevanju i održavanju perineuronalnih mreža	96
5.1.2 Smanjena strukturna plastičnost kod TnC-/- i MMP-9-/- miševa nakon dugotrajnog izlaganja obogaćenoj sredini	97
5.1.3 Uloga MMP-2 i MMP-9 u razgradnji perineuronalnih mreža.....	99
5.1.4 Uloga TnC u sinaptičkoj plastičnosti.....	100
5.1.5 Uloga MMP-9 u sinaptičkoj plastičnosti	102
5.2 Uloga TnC u oblikovanju ponašanja	105
5.2.1 Motorni deficiti koji se odnose na koordinaciju i sposobnost plivanja kod TnC-/- miševa ostaju prisutni i nakon gajenja u obogaćenoj sredini	105
5.2.2 Hiperlokomocija TnC-/- miševa može biti ukinuta nakon gajenja u obogaćenoj sredini – brža habituacija na novu sredinu	108
5.2.3 Smanjen anksiolitički efekat obogaćene sredine kod TnC-/- miševa.....	109
5.2.4 Gajenje u obogaćenoj sredini otkriva oslabljenu sposobnost učenja i pamćenja, kao i smanjenu „kognitivnu fleksibilnost” kod TnC-/- miševa.....	110
6. Zaključci	113
7. Literatura.....	115
8. Biografija.....	147

1. UVOD

1.1 Vanćelijski matriks mozga

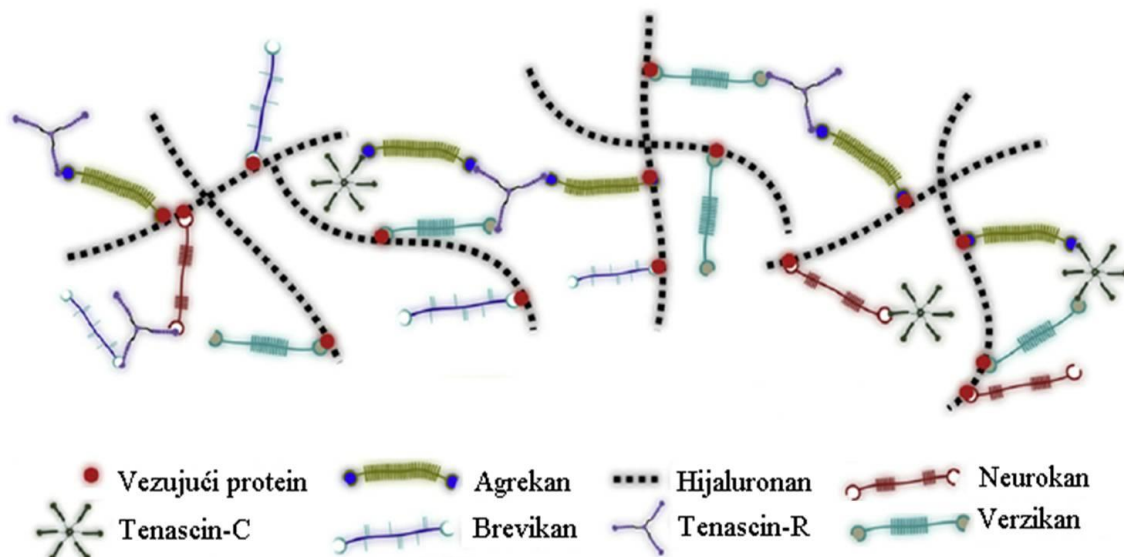
Vanćelijski matriks (VĆM) predstavlja kompleksnu mrežu molekula koji obezbeđuju strukturnu i biohemijsku potporu okolnim ćelijama. Pored toga što molekuli VĆM interaguju međusobno, oni mogu aktivirati mnoge signalne puteve preko različitih membranskih receptora i tako učestvovati u koordinaciji ćelijskih funkcija kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija i preživljavanje. Takođe, danas se zna da molekuli VĆM centralnog nervnog sistema (CNS) učestvuju u formiranju i eliminaciji sinapsi, kao i u modulaciji sinaptičke funkcije tako što aktiviraju različite receptore i jonske kanale koji se nalaze na presinapsi i postsinapsi. Stoga, VĆM mozga se smatra, zajedno sa astrocitima, presinapsom i postsinapsom, sastavnim delom tzv. tetrapartitnih sinapsi (Dityatev i Rusakov, 2011).

Sastav VĆM zavisi od vrste tkiva i može se značajno menjati tokom razvića. Za razliku od perifernih vezivnih tkiva čiji je VĆM bogat kolagenom, VĆM u CNS je uglavnom izgrađen od glikozaminoglikana, proteoglikana i glikoproteina, dok su fibrozni proteini kao što su kolagen i elastin skoro u potpunosti odsutni (Slika 1) (Asher et al., 1991).

Glikozaminoglikani (GAG) predstavljaju grupu dugačkih i nerazgranatih polisaharida koji se sastoje od niza disaharidnih jedinica. Ovi molekuli su vrlo zastupljeni u CNS, a na osnovu njihovog disaharidnog sastava napravljena je sledeća klasifikacija: hondroitin sulfat, heparan sulfat, keratan sulfat, dermatan sulfat i hijaluronan. Hijaluronan je jedini član koji nema sulfatnu grupu, ne vezuje protein i izgrađen je od identičnih disaharidnih jedinica (Toole, 2001). Pored toga, hijaluronan predstavlja okosnicu VĆM i jednu od ključnih komponenti perineuronalnih mreža (videti poglavlje 1.3).

Proteoglikani su izgađeni od proteinskog jezgra za koje je kovalentnim vezama vezan GAG. U zavisnosti od toga koji GAG vezuju, razlikuju se sledeće podklase proteoglikana: hondroitin sulfat proteoglikani, heparan sulfat proteoglikani, keratan sulfat proteoglikani i dermatan sulfat proteoglikani. Hondroitin sulfat proteoglikani

(eng. *chondroitin sulfate proteoglycans, CSPG*) su najzastupljeniji proteoglikani u CNS. CSPG imaju važnu ulogu u različitim procesima u toku razvića, zatim u regeneraciji tkiva i sinaptičkoj plastičnosti (Kwok et al., 2012). Kao najpoznatija familija CSPG izdvaja se familija lektikana gde spadaju neurokan, agrekan, brevikan i verzikan (Yamaguchi, 2000). Ovi molekuli su uključeni u migraciju ćelija, usmeravanje rasta aksona i ćelijsku adheziju (Dityatev et al., 2010). Pored toga, kako je njihovo prisustvo uočeno u perineuronalnim mrežama (videti poglavlje 1.3), otkrivena je i njihova uloga u formiranju i sazrevanju sinapsi, odnosno u kontroli sinaptičke plastičnosti (Rhodes i Fawcett, 2004). S obzirom na to da je većina CSPG izrazito negativno naelektrisana, uglavnom pokazuju inhibitorna svojstva u svojoj sredini, što se ogleda u sprečavanju izrastanja neurita i sinaptogeneze (Friedlander et al., 1994; Pyka et al., 2011).



Slika 1. Šematski prikaz glavnih komponenti vanćelijskog matriksa u centralnom nervnom sistemu i njihovih međusobnih interakcija. Modifikovano iz Volpato et al., 2013.

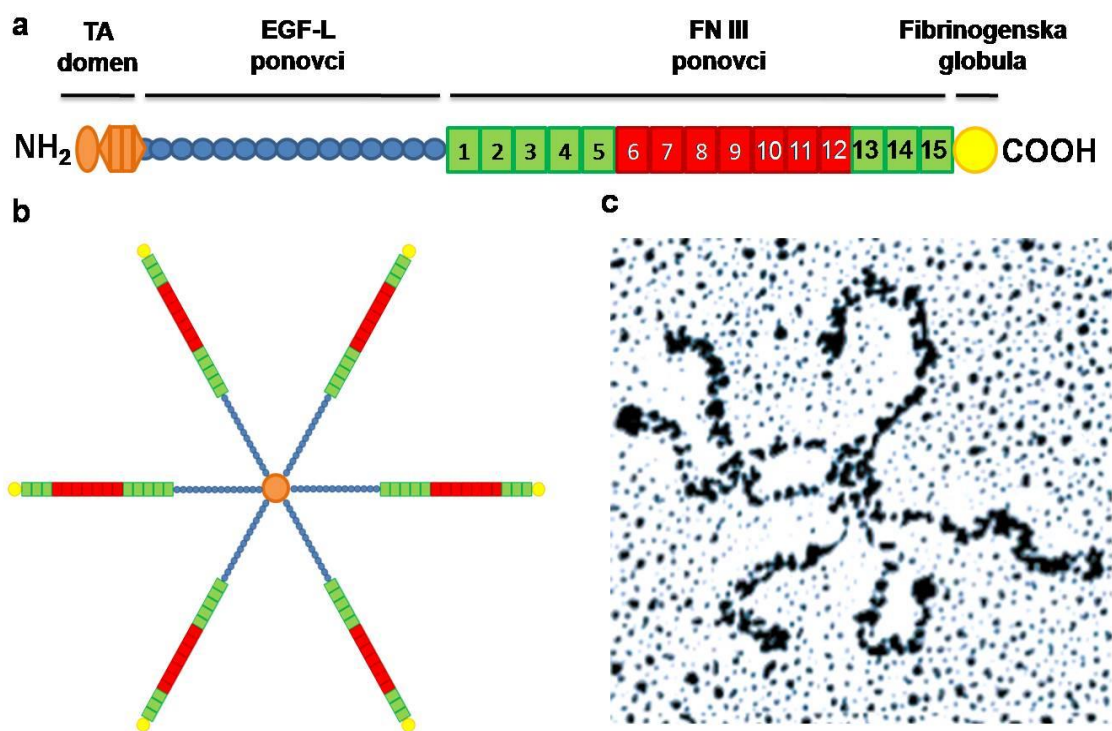
Glikoproteini su proteini koji sadrže oligosaharidne lance (glikane) kovalentno vezane za bočne polipeptidne lance. Nastaju procesom glikozilacije, jednim od najzastupljenijih oblika modifikacije proteina nakon sinteze. Novije studije ukazuju da glikani glikoproteina koji su izlučeni u VĆM mogu uticati na mnoga svojstva proteina, kao što su rastvorljivost, stabilnost, osetljivost na degradaciju ili polarnost, dok su glikani na glikoproteinima koji se nalaze na površini ćelija uključeni prvenstveno u kontrolu komunikacije između ćelija (Sato i Endo, 2010). U ovu grupu molekula VĆM spadaju laminin, fibronektin i tenascini.

1.2 Tenascin-C

Tenascini izgrađuju VĆM mnogih tkiva (Jones i Jones, 2000; Chiquet-Ehrismann i Chiquet, 2003). Ova familija je evolutivno visoko konzervirana u okviru filuma *Chordata*. Kod kičmenjaka se sastoji od četiri člana: tenascina-C, tenascina-X, tenascina-R i tenascina-W (Tucker et al., 2006). Prvi član ove familije, tenascin-C (TnC) je otkriven pre više od 30 godina nezavisno od strane nekoliko grupa koje su istovremeno ispitivale različite biološke aspekte (Bourdon et al., 1983; Chiquet i Fambrough, 1984; Erickson i Inglesias, 1984; Grumet et al., 1985; Kruse et al., 1985; Rettig et al., 1989). Različiti autori su predlagali različita imena, kao što su glijalni/mezenhimalni protein vanćelijskog matriksa, mišićnotetivni antigen, heksabrahion, citotaktin, J1_{220/200}, tenascin i neuronektin. Međutim, ime tenascin koje su predložili Chiquet-Ehrismann i saradnici je na kraju prihvaćeno (Chiquet-Ehrismann et al., 1986). Danas je poznato da TnC ima važnu morforegulatornu ulogu u toku razvića i tkivnom remodelovanju. Takođe, može biti uključen u regulaciju adhezivnih i signalnih svojstava neuralnih i ne-neuralnih ćelija u različitim bolestima (sumirano u Jones i Jones, 2000).

1.2.1 Struktura tenascina-C

TnC je heksamerni protein od oko 1800 kDa. Izgrađen je od šest monomera koji su povezani disulfidnim vezama, pri čemu različiti delovi monomera predstavljaju različite funkcionalne domene molekula (Erickson i Inglesias, 1984). Šest polipeptidnih lanaca je povezano na svojim amino krajevima pomoću tenascinskog povezujućeg domena (Slika 2). Tanji, proksimalni delovi monomera se sastoje od linearnog niza ponovaka koji nalikuju epidermalnom faktoru rasta (EGF-L ponovci), dok se deblji, distalni delovi monomera sastoje od dva tipa ponovaka fibronektina tipa III (FN III ponovci), stalnih i onih koji podležu alternativnom iskrajanju. Na C-terminalnom kraju monomera nalazi se globularni domen koji podseća na karboksilne krajeve β i γ lanaca fibrinogena, zbog čega je ovaj domen i označen kao fibrinogenska globula.



Slika 2. Struktura molekula TnC. a) Šematski prikaz monomera TnC na kome se mogu videti četiri funkcionalna domena: 1) tenascinski povezujući domen (TA domen, narandžasto) koji je odgovoran za povezivanje monomernih subjedinica, 2) linearni niz od 14,5 ponovaka nalik epidermalnom faktoru rasta (EGF-L ponovci, plavo) za koje se pretpostavlja da sprečavaju adheziju fibroblasta, neurona, glijalnih ćelija, kao i da su uključeni u neuronalnu migraciju i usmeravanje rasta aksona tokom razvića, 3) stalni fibronektin III ponovci (FN III ponovci, zeleno) i ponovci fibronektina III koji podležu alternativnom iskrajanju (FN III ponovci, crveno), 4) fibrinogenska globula (žuto) koja ima ulogu u ostvarivanju interakcije sa drugim molekulima VCM i membranskim proteinima, kao što su kolagenska vlakna, integrini, heparan, fosfakan i mnogi drugi. b) Šematski prikaz heksamernog proteina TnC. c) Elektronska mikrografija TnC. Modifikovano iz Sekeljic i Andjus, 2012.

Opšta organizacija domena TnC monomera je visoko konzervirana kod kičmenjaka, mada male razlike u broju EGF-L i FN III ponovaka ipak postoje kod različitih vrsta kičmenjaka (Tucker et al., 2006; Chiquet-Ehrismann i Tucker, 2011). Pored toga, usled alternativnog iskrajanja prekursorske informacione RNK koja kodira za FN III ponovke, TnC se može u jednoj vrsti javiti u vidu više izoformi (Joester i Faissner, 1999). Sklapanje monomera TnC u finalnu heksamernu strukturu, poznatu još i kao heksabrahion (Slika 2), predstavlja proces koji se odvija u dva koraka. Najpre dolazi do formiranja trimera, a zatim i do povezivanja dva trimera u heksamer. U okviru jednog heksamera se najčešće sreće samo jedan tip monomera. Međutim, kod pojedinih vrsta uočeni su i heterotipski heksameri (Kammerer et al., 1998).

1.2.2 Ekspresija tenascina-C, ćelijski izvori i receptori

Ekspresija TnC je visoko regulisan proces kako tokom razvića, tako i kod adultnih organizama (Tucker i Chiquet-Ehrismann, 2009). Vremenski obrazac ekspresije se poklapa sa periodima stvaranja i migracije različitih tipova ćelija, uspostavljanjem sinaptičkih veza, mijelinizacijom, brzim funkcionalnim sazrevanjem tkiva, kao i strukturnom plastičnošću kod adulta. TnC se prvi put uočava u toku gastrulacije, dok je u kasnijim fazama razvića njegovo prisustvo ograničeno samo na rostralnu polovinu somita u kojoj se odvija ulazak ćelija poreklom iz neuralne kreste (Crossin et al., 1986; Tan et al., 1987). Tokom daljeg razvića, TnC je izrazito zastupljen u CNS i u perifernom tkivu, gde se uočava u toku morfogeneze skeletnog sistema, vezivnog tkiva i krvnih sudova (Chiquet i Fambrough, 1984). Međutim, njegova ekspresija značajno opada sa sazrevanjem organizama tako da je kod adulta detektovan samo u nekoliko perifernih struktura koje su izložene izrazitom istezanju, kao što su tetive, kosti, hrskavica ili glatki mišići koji izgrađuju zidove arterija (Kannus et al., 1998; Chiquet-Ehrismann i Tucker, 2004). Takođe, TnC ostaje prisutan i u nekoliko regiona CNS koji poseduju visok stepen plastičnosti, kao što su mali mozak i regioni u kojima se odvija aktivna neurogeneza, kao što su hipokampus, subventrikularna zona i rostralni migratorni put koji koriste prekursori olfaktornih neurona na putu do olfaktornog bulbosa (Bartsch et al., 1992; Gates et al., 1995; Ferhat et al., 1996). Takođe, pokazano je da se ekspresija TnC može indukovati na mestima neovaskularizacije i kardiovaskularnih bolesti (Golledge et al., 2011), zatim nakon povrede ili mehaničkog stresa (Chiquet-Ehrismann, 2004) i tokom različitih patoloških stanja, kao što su infekcije, upale ili tumorogeneza (Chiquet-Ehrismann i Chiquet, 2003; Orend i Chiquet-Ehrismann, 2006; Jakovcevski et al., 2013).

Različiti tipovi ćelija sintetišu TnC u toku embriogeneze, što ukazuje na važnu ulogu ovog molekula u ranom razviću (sumirano u Jones i Jones, 2000). S druge strane, ekspresija TnC u toku razvića CNS je ograničena samo na glijalne ćelije. TnC je izrazito prisutan u vlaknima radijalne ili Bergmanove glije u toku migracije neurona ka kori velikog i malog mozga (Crossin et al., 1986; Yuasa, 1996), dok se u perifernom nervnom sistemu, TnC eksprimira u Švanovim ćelijama u toku procesa mijelinizacije. U

adultnom mozgu, astrociti predstavljaju glavni ćelijski izvor TnC (Meiners et al., 1993; Mahler et al., 1996).

TnC ostvaruje svoje funkcije uglavnom preko direktne interakcije sa različitim receptorima na površini ćelije, uključujući članove integrinske familije heterodimera, zatim ćelijske adhezione molekule iz imunoglobulinske superfamilije, aneksin II i transmembranski hondroitin sulfat proteoglikan, odnosno receptor protein tirozin fosfataze nazvan fosfakan ili RPTP ζ/β (Prieto et al., 1992; Barnea et al., 1994; Chung i Erickson, 1994; Chung et al., 1996; Milev et al., 1997). Pored toga, TnC može delovati indirektno tako što interaguje sa drugim proteinima VĆM, uključujući fibronektin, agrekan, verzikan, brevikan i neurokan (Grumet et al., 1994; Milev et al., 1997; Rauch et al., 1997; Day et al., 2004). Takođe, pokazano je da TnC može interagovati sa različitim proteolitičkim enzimima koji se nalaze u VĆM, kao što su serin proteaze i matriksne metaloproteinaze (Imai et al., 1994; Siri et al., 1995; Gundersen et al., 1997).

1.2.3 Uloga tenascina-C u neuronalnoj plastičnosti

Neuronalna plastičnost se odnosi na mehanizme koji omogućavaju neuronu da izmeni svoje osobine i/ili veze sa drugim neuronima kako bi prilagodio svoje odgovore različitim zahtevima spoljašnje sredine. Danas je poznato da nervno tkivo podleže promenama na strukturnom i funkcionalnom nivou ne samo u toku razvića, već i u adultnom stupnju. Promene u morfologiji, organizaciji i broju sinapsi mogu biti indukovane u toku učenja i procesa sazrevanja, ali isto tako se mogu javiti i nakon povrede, stresa ili gajenja životinja u obogaćenoj sredini (Lamprecht i LeDoux, 2004).

Dok je uloga TnC u formiranju niše stem ćelija, zatim u regulaciji proliferacije i migracije progenitorskih ćelija, izrastanju neurita i usmeravanju ćelija do finale destinacije uveliko poznata (Garcion et al., 2001; Garcion et al., 2004), njegov uticaj na neuronalnu plastičnost i sinaptičku funkciju postaje sve više predmet mnogih istraživanja. Uloga TnC u regulaciji sinaptičke plastičnosti je prvi put prepoznata kada je uočeno da hemijska i električna stimulacija dovode do ushodne regulacije ekspresije TnC u hipokampusu pacova (Nakic et al., 1996; Nakic et al., 1998). Studije na TnC^{-/-} miševima su pokazale da ovi miševi imaju oslabljenu formu sinaptičke plastičnosti koja se odvija posredstvom voltažno-zavisnih kanala za Ca²⁺ L tipa (LVDCC). Naime, kod

njih je pokazana smanjena dugotrajna potencijacija, kao i potpun izostanak dugotrajne depresije u CA1 regionu hipokampusa (Evers et al., 2002). Tačan mehanizam regulacije sinaptičke plastičnosti posredstvom TnC nije još uvek poznat, ali se pretpostavlja da TnC indirektno kontroliše aktivnost LVDCC kanala tako što interaguje sa ćelijskim receptorima integrinima, za koje se zna da su uključeni u regulaciju otvorenosti ovih kanala (Gall et al., 2003). Međutim, s obzirom na to da je poznato da TnC interaguje sa voltažno-zavisnim kanalima za natrijum (Srinivasan et al., 1998) čija je je α subjedinica strukturno vrlo slična α subjedinici LVDCC kanala (Anderson i Greenberg, 2001), može se pretpostaviti da bi TnC mogao biti i direktno uključen u regulaciju ovih kanala. S druge strane, studija Strekalova et al. je pokazala da je TnC uključen u stvaranje kontekstualne memorije koje se odvija u hipokampusu, a FN III ponovci 6-8 su identifikovani kao domen TnC koji posreduje u učenju i sinaptičkoj plastičnosti (Strekalova et al., 2002).

Pokazana je i važna uloga TnC u razviću i funkcionisanju CA1 regiona hipokampusa (Gurevicius et al., 2009). Detaljna morfološka analiza ovog regiona je otkrila da slojevi koji su označeni kao *stratum radiatum*, *stratum lacunosum moleculare* i *stratum oriens* imaju smanjen volumen kod TnC^{-/-} miševa. Pored toga, uočen je i smanjen broj somatostatin-pozitivnih interneurona. Pored strukturnih promena, uočena je i izmenjena spontana aktivnost neurona koji se nalaze u CA1 regionu za koju se pretpostavlja da nastaje kao posledica promena na strukturnom nivou. Stoga, ovi nalazi ukazuju na značajnu ulogu TnC u strukturnoj organizaciji CA1 regiona hipokampusa i oblikovanju neuronalne aktivnosti.

Irinchev i saradnici su otkrili da adultni TnC^{-/-} miševi imaju izmenjen ćelijski sastav i u somatosenzornom i motornom delu kore velikog mozga, ukazujući na značaj TnC za normalan razvoj i funkcionisanje ovih regiona CNS (Irinchev et al., 2005). Naime, u ovim regionima su pronađeni astroglioza i uvećan broj neurona. S druge strane, ovi miševi su imali smanjenu gustinu parvalbumin-pozitivnih interneurona, smanjen broj oligodendrocita u odnosu na broj neurona, kao i smanjen broj inhibitornih neurona u odnosu na ekscitatorne. Pored toga, primećene su i strukturne aberacije kortikalnih piramidalnih neurona, kao što su neprirodna morfologija dendrita i izmenjena distribucija dendritskih trnova na dendritskim stablima.

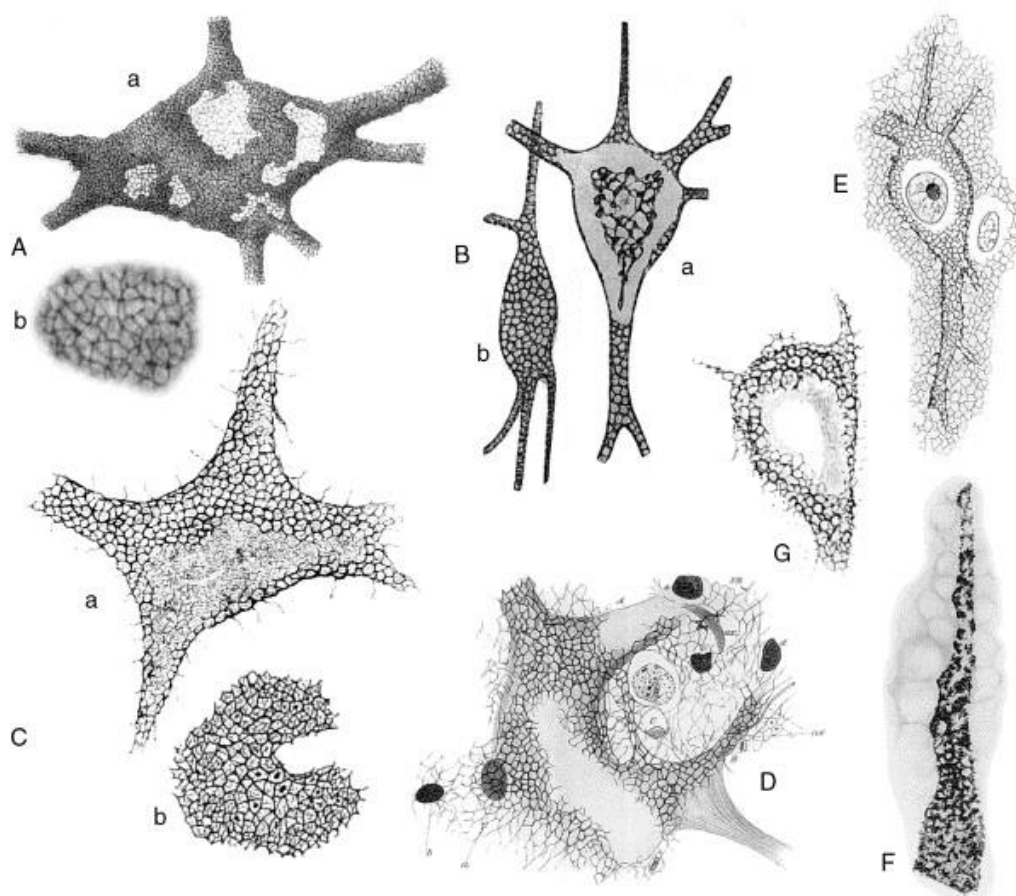
Uloga TnC u neuronalnoj plastičnosti je takođe proučavana i u malom mozgu (Andjus et al., 2005). Naime, primenom dva uzastopna električna impulsa na puzajuća ili paralelna vlakna u kori malog mozga, ispitana su dva oblika kratkotrajne plastičnosti Purkinje neurona, neuronalna facilitacija i neuronalna depresija. Pokazano je da je neuronalna depresija manje izražena kod TnC^{-/-} miševa u poređenju sa kontrolnim životinjama. S druge strane, prilikom ispitivanja neuronalne facilitacije, uočeno je da pojedini Purkinje neuroni pokazuju veće nivoe facilitacije, dok neki drugi pokazuju depresiju. Rezultati ove studije su ukazali da nedostatak TnC utiče na oslobađanje glutamata iz puzajućih i paralelnih vlakana na Purkinje neurone.

1.2.4 Ponašanje TnC^{-/-} miševa

Funkcionalni doprinos TnC u ponašanju ispitan je na dva mišja TnC^{-/-} mutanta koja su nezavisno napravljena u dve različite laboratorije (Saga et al., 1992; Evers et al., 2002). Iako je poznato da TnC ima važne uloge tokom embriogeneze i organogeneze, zanimljivo je da nijedna grupa autora nije uočila izražene deficite tokom razvića miševa sa nedostatkom ovog molekula. Međutim, ubrzo je kod mutanta opisanom od strane Saga i saradnika otkriveno prisustvo brojnih poremećaja u ponašanju, uključujući hiperlokomociju, pojačanu istraživačku aktivnost, narušenu motornu koordinaciju, oslabljenu sposobnost plivanja, izmenjen cirkadijalni ritam i smanjenu kogniciju (Fukamauchi et al., 1996; Fukamauchi et al., 1997a; Fukamauchi et al., 1998; Kiernan et al., 1999; Mackie i Tucker, 1999). Ipak, postojala je sumnja da ovi miševi ekspimiraju izmenjene fragmente TnC molekula što u izvesnoj meri utiče na interpretaciju rezultata (Mitrovic i Schachner, 1995). Iako je sumnja vrlo brzo otklonjena (Settles et al., 1997), Evers i saradnici su napravili novog konstitutivnog TnC^{-/-} mutanta (Evers et al., 2002), čije je ponašanje detaljno opisano u radu Morellini i Schachner (2006). Ustanovljeno je da ovaj mutant ispoljava smanjenu anksioznost, povećanu aktivnost u novoj sredini, odloženu resinhronizaciju cirkadijalne aktivnosti i smanjenu mišićnu snagu. S druge strane, značajnije promene u koordinaciji i kognitivnoj sposobosti kod ovog mutanta nisu zabeležene.

1.3 Perineuronalne mreže

Perineuronalne mreže (PNM) predstavljaju specijalizovanu formu VĆM koju je prvi uočio i opisao još Camillo Golgi zajedno sa svojim saradnicima (Slika 3; Golgi et al. 1893). PNM su zapravo agregati različitih molekula VĆM koji obmotavaju ćelijsko telo i proksimalne delove dendrita različitih populacija neurona u kori velikog mozga, hipokampusu, talamusu, moždanom stablu, malom mozgu i kičmenoj moždini (Carulli et al., 2007; Galtrey et al., 2008; Yamada i Jinno, 2013; Horii-Hayashi et al., 2015).



Slika 3. Prvi crteži perineuronalnih mreža iz 19. veka. A) Neuron iz anteriornog roga kičmene moždine (ARKM) mačke sa uvećanim detaljima pod a) i b), B) Dve ćelije iz kore velikog mozga adultne mačke, C) Dve nervne ćelije iz ARKM psa, D) Ćelija u ARKM embriona teleta sa difuznom mrežom, E) Ćelija kore velikog mozga adultnog psa, F) Izmenjena perineuronalna mreža oko ćelije kore velikog mozga čoveka sa demencijom, G) Ćelija iz produžene moždine guštera *Lacerta muralis*. Modifikovano iz Celio et al., 1998.

Ove strukture se uglavnom formiraju oko inhibitornih parvalbumin-pozitivnih interneurona, mada se mogu uočiti i oko ekscitatornih neurona, kao što su na primer, piramidalni neuroni kore velikog mozga (Wegner et al., 2003; Alpar et al., 2006). Različiti molekuli VCM ulaze u sastav PNM. Međutim, sastav ovih struktura dosta varira u zavisnosti od regiona, kao i od stadijuma razvića. S obzirom na to da se PNM uočavaju samo u zreлом mozgu, dok se vrlo retko mogu sresti u ranim stadijumima razvića kada je mozak podložan plastičnim promenama, ove strukture privlače ogromnu pažnju mnogih istraživača. Sve je više podataka koji ukazuju da je formiranje PNM zapravo preduslov za održavanje i stabilnost sinaptičkih veza, a samim tim i za skladištenje informacija u adultnom mozgu. S druge strane, njihova razgradnja može ponovo pokrenuti plastične promene u CNS i tako omogućiti uspostavljanje novih neuronalnih veza i stvaranje novih sinapsi (Dityatev i Schachner, 2003; Dityatev et al., 2010; Wang i Fawcett, 2012).

1.3.1 Sastav perineuronalnih mreža u malom mozgu

Molekulski sastav, ćelijsko poreklo određenih komponenti, kao i vremenski obrazac formiranja PNM je detaljno proučen u malom mozgu pacova (Carulli et al., 2006; Deepa et al., 2006; Carulli et al., 2007). Naime, pokazano je da se PNM nalaze uglavnom oko tzv. velikih ekscitatornih neurona dubokih jedara i da u njihov sastav ulaze CSPG (agrekan, neurokan, verzikan, brevikan i fosfakan), tenascin-R, hijaluronan i vezujućii proteini, Bral2 i Crtl1 (Carulli et al., 2006). Nedavno je otkriveno da je i molekul koji je uključen u usmeravanje rasta aksona, semaforin 3A (Sema3A) takođe prisutan u PNM malog mozga, kao i da poseduje visoki afinitet za vezivanje CSPG (Carulli et al., 2013). Dok je za tenascin-R nedvosmisleno pokazano da ulazi u sastav PNM (Bruckner et al., 2000; Haunso et al., 2000; Morawski et al., 2014), za TnC ne postoje jasni dokazi u literaturi. Međutim, postoje podaci koji ukazuju da TnC interaguje sa različitim CSPG koji ulaze u sastav PNM (Grumet et al., 1994; Rauch et al., 1997; Day et al., 2004).

Koristeći biljni lektin *Wisteria floribunda* aglutinin (WFA), najčešće korišćen marker za detekciju PNM, Carulli i saradnici su uočili da se mrežaste strukture u dubokim jedrima malog mozga javljaju tek 7. postnatalnog dana (P7). Postepeni porast

intenziteta bojenja zabeležen je u toku daljeg postnatalnog razvića (P14 i P21), dok su najizraženije mreže detektovane u adultnom pacovu starosti 3 meseca (Carulli et al., 2007). Takođe, važno je napomenuti da je uporedo sa formiranjem PNM zabeležena i pojačana sinteza agrekana, hijaluronana i Crt11, što ukazuje da bi ovi molekuli mogli biti ključni za formiranje PNM i održavanje njihove stabilnosti.

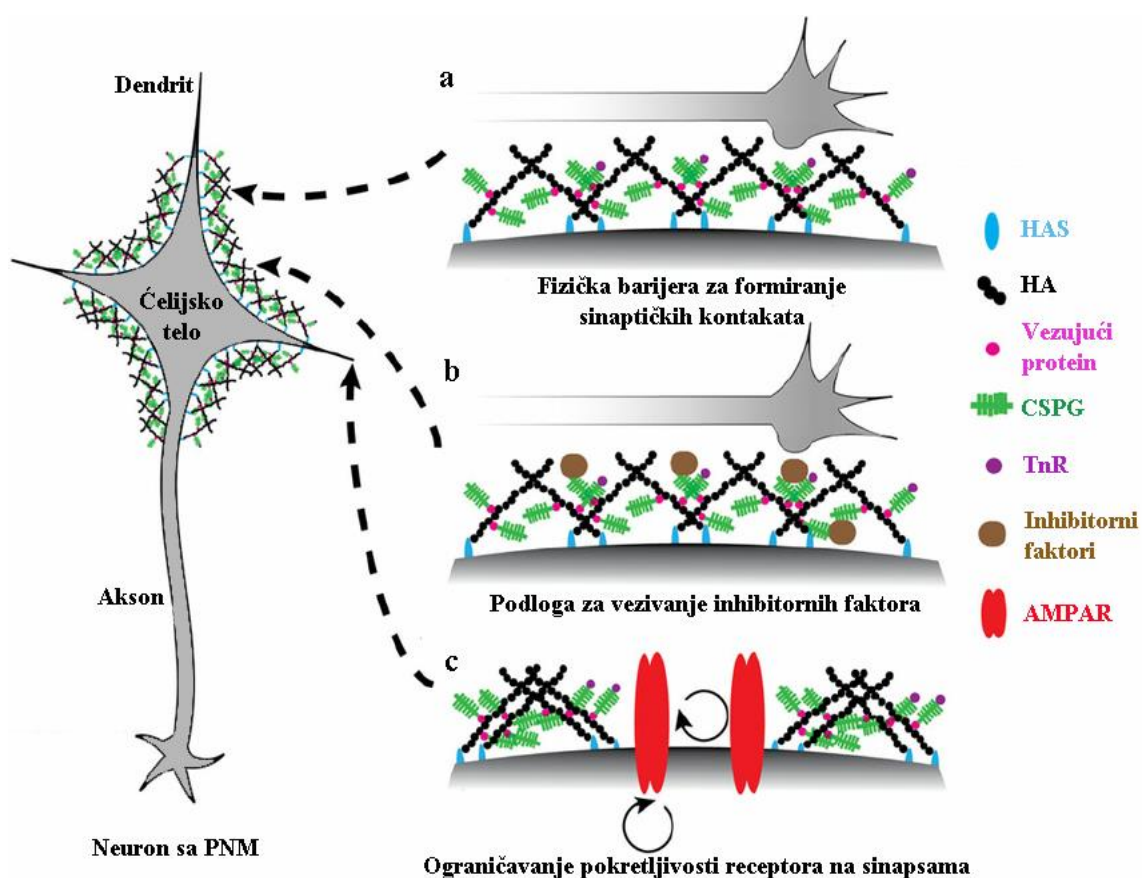
Prilikom ispitivanja ćelijskih izvora pojedinačnih komponenti PNM u dubokim jedrima malog mozga, pokazano je da pored neurona koji su obavijeni PNM i glijalne ćelije mogu učestvovati u njihovoj sintezi. Naime, neuroni i glija sintetisu CSPG i tenascin-R, dok su isključivo neuroni odgovorni za sintezu hijaluronana, Crt11 i Bral2 molekula (Carulli et al., 2006). Interesantno, za sintezu Sema3A su odgovorni Purkinje neuroni u kori malog mozga. Takođe, ustanovljeno je da je intenzitet bojenja Sema3A u dubokim jedrima u direktnoj korelaciji sa količinom aferentnih vlakana Purkinje neurona (Carulli et al., 2013).

1.3.2 Funkcije perineuronalnih mreža

Različite studije su pokazale da PNM mogu doprinosti nakupljanju faktora rasta oko određenih neurona, delovati kao puferski sistem za jone, štititi ćelije od oksidativnog stresa ili obezbeđivati specifičnu mikrosredinu za izrazito aktivne neurone (Bruckner et al., 1993; Blumcke et al., 1994; Bruckner et al., 1996; Hartig et al., 1999). Međutim, danas se ipak smatra da je njihova osnovna uloga kontrola plastičnosti u CNS. Na to je ukazala činjenica da se vremenski obrazac formiranja PNM poklapa sa završavanjem tzv. kritičnog perioda u toku kojeg se odvijaju važni procesi poput sinaptogeneze, gašenja nefunkcionalnih sinapsi, mijelinizacije i sazrevanja nervnog sistema (Pizzorusso et al., 2002; Balmer et al., 2009; Gogolla et al., 2009). Takođe, danas se zna da njihovo formiranje i sazrevanje zavisi od aktivnosti neurona (Lander et al., 1998; Dityatev et al., 2007; Foscarin et al., 2011). Na primer, blokiranje akcionih potencijala, otpuštanja neurotransmitera, kao i aktivnosti AMPA receptora propustljivih za Ca^{2+} ili LVDCC *in vitro* dovodi do značajnog smanjenja broja neurona koji su obavijeni sa PNM (Dityatev et al., 2007). Pored toga, pokazano je da gajenje pacova u odsustvu svetlosti sprečava formiranje PNM tako što značajno smanjuje ekspresiju Crt11 molekula. Međutim, naknadno izlaganje svetlosti dovodi do uspostavljanja normalne

sinteze Crtl1 molekula, što nakon nekoliko dana dovodi do formiranja PNM (Carulli et al., 2010).

Iako je odnos između PNM i plastičnosti dobro ustanovljen u različitim regionima CNS, mehanizmi preko kojih PNM ograničavaju plastičnost još uvek nisu dovoljno razjašnjeni (Wang i Fawcett, 2012). Predloženo je nekoliko mogućnosti koje podrazumevaju da PNM deluju kao fizičke barijere za formiranje novih veza između neurona, zatim kao podloge za vezivanje drugih molekula koji sprečavaju plastičnost, ili da deluju tako što ograničavaju pokretljivosti površinskih receptora (Slika 4).



Slika 4. Tri predložena mehanizma delovanja PNM u toku ograničavanja plastičnosti. a) PNM mogu da deluju kao fizička barijera za formiranje novih sinaptičkih veza b) PNM mogu da predstavljaju podlogu za vezivanje drugih molekula koji zatim sprečavaju plastičnost c) PNM mogu ograničavati pokretljivost sinaptičkih receptora. HAS - hijaluronan sintaza, HA - hijaluronan, CSPG - hondroitin sulfat proteoglikani, TnR - tenascin-R, AMPAR - AMPA receptor. Modifikovano iz Wang i Fawcett, 2012.

Sprečavanje formiranja novih veza može biti ostvareno direktno, zahvaljujući generalnoj sposobnosti CSPG da inhibiraju izrastanje neurita (Oohira et al., 1991; Snow et al., 1996; McKeon et al., 1999; Niederost et al., 1999; Asher et al., 2000) ili indirektno, pomoću receptora za koje se vezuju pojedinačne komponente PNM (Mikami et al., 2009; Shen et al., 2009). Drugi predloženi mehanizam se zasniva na nalazima koji su dobijeni pomoću biohemijskih eseja koji su pokazali da postoji izvestan broj liganda za CSPG koji čine gradivne komponente PNM (Crespo et al., 2007). Međutim, za većinu od tih molekula nema dokaza u *in vivo* eksperimentima, izuzev za Sema3A (De Wit et al., 2005; Williams et al., 2010). Treći mehanizam, koji podrazumeva da PNM mogu ograničiti sinaptičku plastičnost tako što menjaju pokretljivost određenih receptora na površini ćelija, dolazi na osnovu studije koja je pokazala da pokretljivost AMPA receptora, a samim tim i efikasnost njihove zamene sa nosintetisanim receptorima, može biti smanjena prisustvom PNM (Frischknecht et al., 2009).

1.4 Proteolitički enzimi u vanćelijskom matriksu

VĆM predstavlja izrazito dinamičnu strukturu koja podleže procesima remodelovanja i degradacije, što s jedne strane dovodi do strukturne i funkcionalne plastičnosti, dok s druge strane može stabilizovati neuronalna mikrokola. Poslednje dve decenije sakupljeno je mnoštvo dokaza koji ukazuju na važnost proteolize VĆM u sinaptičkoj plastičnosti (Dityatev i Schachner, 2003, 2006). Proteoliza podrazumeva enzimsku degradaciju proteina ili peptida koja je katalizovana različitim proteazama. Proteaze su podeljene u 5 klasa: metalo-, serin, cistein, treonin i asparaginske proteaze. Međutim, uloga serin proteaza, kao i metaloproteaza, tačnije familije matriksnih metaloproteinaza, u sinaptičkoj plastičnosti, učenju i pamćenju je posebno dobro dokumentovana (Almonte i Sweatt, 2011; Wlodarczyk et al., 2011; Verslegers et al., 2013; Tsilibary et al., 2014). Pored razgradnje VĆM, vanćelijske proteaze mogu interagovati sa transmembranskim molekulima i tako funkcionisati kao signalni ligandi. Takođe, oni mogu doprinositi oslobađanju signalnih molekula iz VĆM, remodelovanju aktinskog citoskeleta, formiranju novih dendritskih filopodija i rastu postojećih dendritskih trnova.

Serin proteaze: Najbolje okarakterisani članovi ove familije su proteaze koje nalikuju trombinu (trombin, aktivator plazminogena u tkivu (tPA) i plazmin) i proteaze koje nalikuju tripsinu (tripsin, neurotripsin i neuropsin). Serin proteaze se oslobađaju u VĆM u vidu neaktivnih proenzima (zimogena) i postaju aktivni tek nakon proteolize. Ovi enzimi imaju sposobnost da degraduju različite komponente VĆM ili receptore koji se potom aktiviraju, ali isto tako mogu degradovati i druge serin proteaze (Almonte i Sweatt, 2011; Wlodarczyk et al., 2011).

Metaloproteaze: U ovu grupu proteaza spadaju matriksne metaloproteinaze (MMP), dezintegrin i metaloproteinaze (ADAM) i ADAM proteaze sa trombospondinskim motivima (ADAMT).

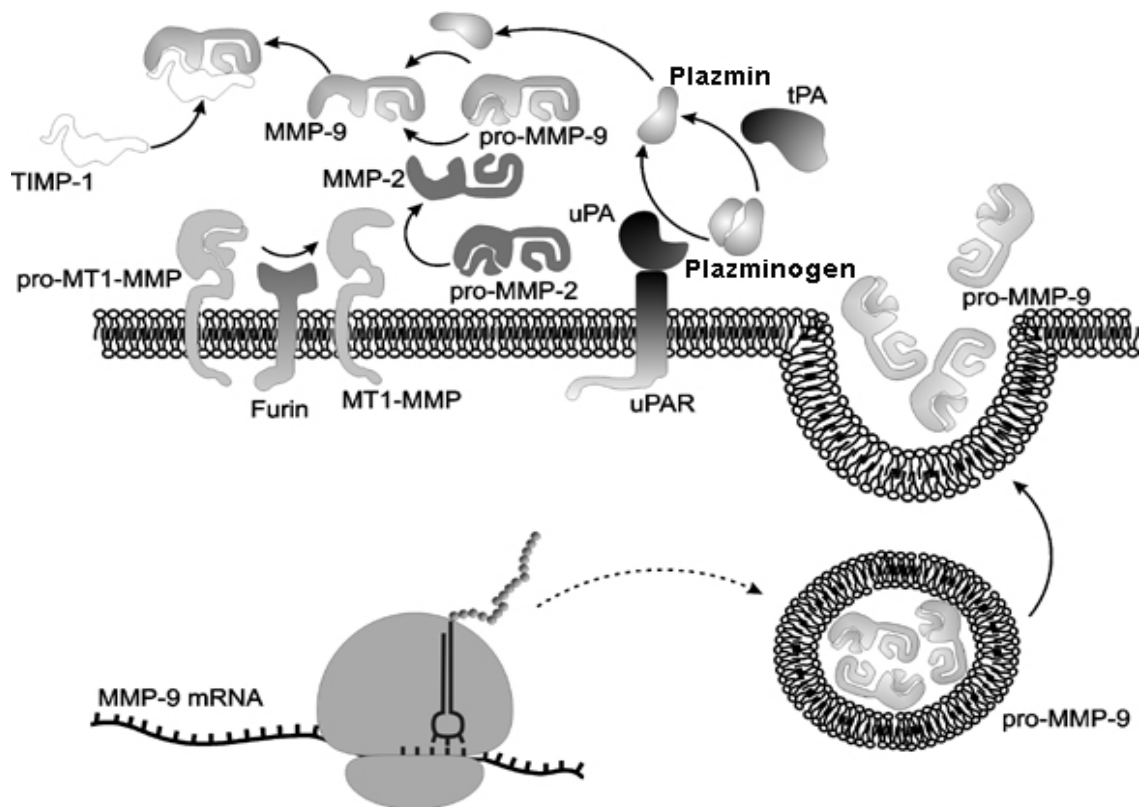
MMP predstavljaju familiju proteina koju čini preko 20 cink-zavisnih proteolitičkih enzima razvrstanih u nekoliko podklasa, uključujući želatinaze, kolagenaze, stromelizine, matrilizine, MMP membranskog tipa (MT-MMP) i druge MMP koje se ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih grupa (Nagase et al., 2006; Fanjul-Fernandez et al., 2010). MMP degraduju matriks, ali i druge proteinaze, faktore

rasta i ćelijske adhezione molekule. Takođe, one učestvuju u fizičkom remodelovanju mikrosredine koja okružuje ćeliju, kao i u ćelijskoj signalizaciji tako što oslobađaju ili obrađuju različite ligande za ćelijske receptore.

Ekspresija i aktivnost ovih enzima je regulisana na nivou transkripcije preko različitih faktora rasta, citokina, hemokina i ekscitatornih neurotransmitera. Takođe, dodatni vidovi regulacije MMP enzima podrazumevaju pomeranje informacione RNK prema dendritima i sinapsama, modifikaciju proteina nakon translacije, kao i kontrolu njihovog oslobađanja u VĆM što se dešava usled pojačane aktivnosti neurona. MMP se uglavnom izlučuju u VĆM kao neaktivni proenzimi (zimogeni), koji se ubrzo aktiviraju nakon proteolize. Faktori koji učestvuju u aktivaciji MMP podrazumevaju kaskadu plazminogen - plazmin i druge MMP koji prekidaju interakciju između cisteina i cinka nakon čega dolazi do uklanjanja propeptidnog regiona što rezultuje u finalnoj aktivaciji. Još jedan vid kontrole MMP aktivnosti se odvija pomoću tzv. tkivnih inhibitora MMP (TIMP) koji mogu interagovati sa aktivnim formama MMP enzima (Tsilibary et al., 2014).

1.4.1 Želatinaze

Želatinaze predstavljaju do danas najbolje proučenu podfamiliju MMP. Tu spadaju MMP-2 (želatinaza A, 72 kDa) koja se eksprimira u glijalnim ćelijama i MMP-9 (želatinaza B, 92 kDa) koja se prvenstveno eksprimira u neuronima (Szklarczyk et al., 2002). Oba enzima sadrže 3 ponovka fibronektina tipa II u svom katalitičkom mestu što omogućava vezivanje denaturisanog kolagena tipa IV i V, odnosno želatina, zatim elastina i kolagena (Steffensen et al., 1995). Pro-MMP-2 je konstitutivno ekspimirana i uglavnom se aktivira nakon vezivanja za TIMP-2/MT1-MMP kompleks na ćelijskoj površini, gde TIMP-2 služi kao receptor za MMP-2. MT1-MMP seče vezani MMP-2 propeptid, a zatim autolitički mehanizmi generišu potpuno aktivnu formu MMP-2 koja se potom oslobađa u okoloćelijski prostor (Strongin et al., 1995; Itoh et al., 2001). Dok niske koncentracije TIMP-2 dopuštaju aktivaciju MMP-2 na ćelijskoj površini u okviru trostrukog kompleksa, visoke koncentracije TIMP-2 inhibiraju MMP-2 proteolitičku aktivnost (Bernardo i Fridman, 2003). Takođe, MT-2-MMP i trombin mogu aktivirati MMP-2 (Galis et al., 1997; Nguyen et al., 2000; Morrison et al., 2001).



Slika 5. Šematski prikaz sinteze i aktivacije MMP-9. Informaciona RNK za MMP-9 se iz ćelijskog tela premešta u dendrite gde se odvija lokalna translacija nakon koje se pro-MMP-9 smešta u sekretorne vezikule. Kao odgovor na povećanu neuronalnu aktivnost MMP-9 se oslobađa u vanćeljski prostor gde se kroz kaskadu proteolitičkih događaja (furin, MT1-MMP, MMP-2, tPA, uPA i plazmin) transformiše iz neaktivne (pro-MMP-9) u aktivnu formu (MMP-9). Vrlo brzo nakon aktivacije MMP-9 dolazi do njene inaktivacije inhibitorom TIMP-1 koji se vezuje za aktivno mesto na enzimu. uPA – urokinaza – plazminogen aktivator, uPAR - uPA receptor. Modifikovano iz Michaluk i Kaczmarek, 2007.

S druge strane, pro-MMP-9 može biti aktivirana nakon proteolitičkog delovanja drugih MMP ili serin proteaza (Slika 5) (Ogata et al., 1992; Cuzner i Opdenakker, 1999; Li et al., 2017). Najčešći vid aktivacije pro-MMP-9 podrazumeva da serin proteaze tPA ili uPA aktiviraju plazminogen u plazmin, koji zatim prevodi pro-MMP-9 u aktivnu formu. Ubrzo nakon aktivacije MMP-9 može biti internalizovana ili inhibirana vezivanjem najčešće TIMP-1 za katalitičko mesto enzima ili za domen MMP-9 koji služi za vezivanje supstrata (Gomis-Ruth et al., 1997; Olson et al., 1997; Bjorklund et al., 2004). Zanimljivo je da MMP-9 i TIMP-1 imaju istu kinetiku oslobađanja u VCM (Bruno i Cuello, 2006). Šta više, nedavno je pokazano da ova dva proteina mogu biti zajedno oslobođena iz iste vezikule (Roderfeld et al., 2007).

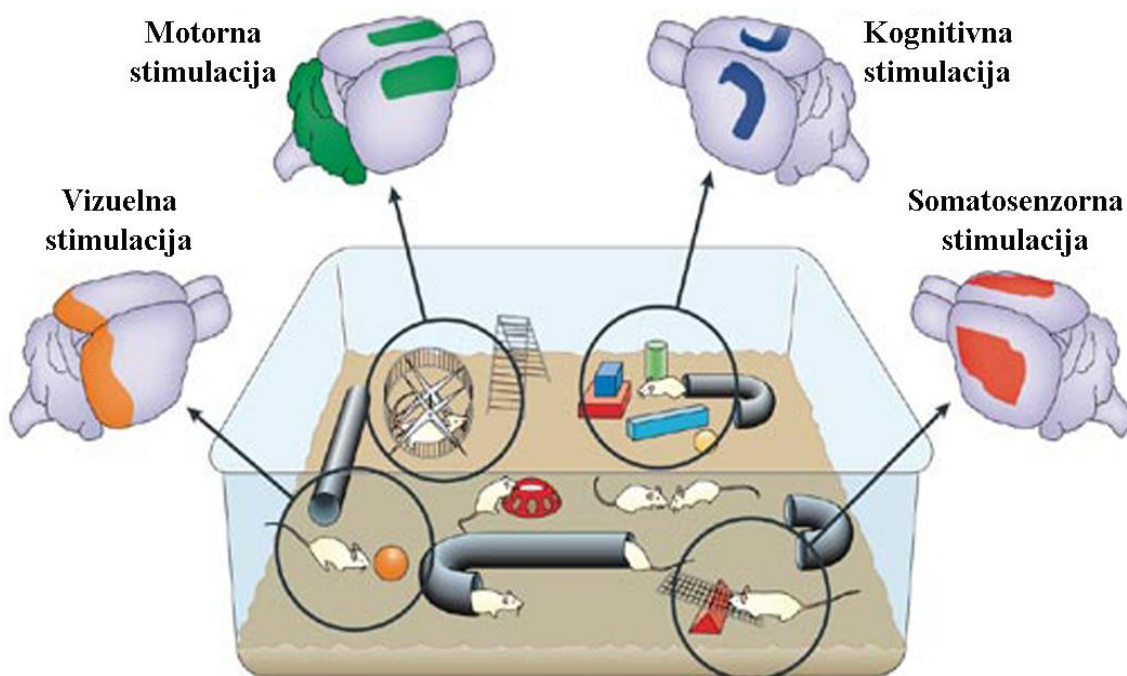
Želatinaze mogu imati važne uloge u različitim fiziološkim procesima, ali i u različitim patološkim stanjima, kao što su na primer infekcije, inflamatorne i

kardiovaskularne bolesti, kancer i moždani udar (Van den Steen et al., 2002; Stamenkovic, 2003; Klein i Bischoff, 2011). Prostorno-vremenski obrasci ekspresije ovih enzima ukazuju na njihovu važnost tokom razvića CNS gde se smatraju jednim od ključnih modifikatora ćelijskog i vanćelijskog okruženja (Rivera et al., 2010). Njihova uloga je prepoznata u mnogim razvojnim procesima, uključujući neovaskularizaciju tkiva, neurogenezu, migraciju ćelija do finalne pozicije, izrastanje aksona i dendrita, kao i diferencijaciju oligodendrocita i Švanovih ćelija tokom ranih faza mijelinizacije. S obzirom na to da su procesi plastičnosti tokom razvića vrlo slični onima koji se odvijaju kod adultnih organizama tokom procesa učenja ili oporavka nakon povrede u kojima je pokazana bitna regulatorna uloga pre svega MMP-9, a u manjoj meri i MMP-2, vrlo je izvesno da želatinaze predstavljaju važne posrednike i u procesu sinaptogeneze koji se dešava tokom razvića CNS (sumirano u Verslegers et al., 2013). Pored njihovih uloga u VĆM, želatinaze takođe mogu imati razne funkcije unutar ćelija, na primer tokom procesa genske transkripcije, iskrajanja RNK ili replikacije DNK (Cauwe i Opendakker, 2010).

Poslednjih godina sve je više podataka koji ukazuju na to da MMP-9 ima važnu ulogu u učenju i sinaptičkoj plastičnosti. Naime, nakon primene farmakoloških inhibitora MMP-9 ili antitela koji blokiraju njenu aktivnost *in vivo* ustanovljeno je da MMP-9 služi kao modulator LTP u hipokampusu, odnosno da je uključen u održavanje sinaptičke potencijacije (Nagy et al., 2006; Bozdagi et al., 2007; Dziembowska et al., 2012). Takođe, vrlo je jasno pokazana uloga MMP-9 u proteolitičkom sečenju sinaptičkih proteina, zatim u regulaciji pokretljivosti sinaptičkih receptora, kao i u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti gde značajno utiče na morfologiju dendritskih trnova (Michaluk et al., 2007; Tian et al., 2007; Wang et al., 2008; Michaluk et al., 2009; Michaluk et al., 2011). Za razliku od MMP-9, do sada nema podataka o ulozi MMP-2 u dugotrajnim procesima plastičnosti u hipokampusu. Aktivnost MMP-2 se ne povećava nakon indukcije LTP (Nagy et al., 2006; Wiera et al., 2012). Međutim, ne može se u potpunosti odbaciti mogućnost da je MMP-2 takođe uključena u procese sinaptičkog remodelovanja, s obzirom na to da je u *in vitro* uslovima ustanovljeno da nekoliko molekula koji su uključeni u plastičnost mogu predstavljati potencijalne supstrate za ovaj enzim.

1.5 Postupak „obogaćenja sredine” i neuralna plastičnost

Osnovni doprinos razumevanju efekata stimulusa iz spoljašnje sredine na mozak i neuralnu plastičnost potiču od uvođenja obogaćene sredine. Obogaćena sredina (OS) se odnosi na eksperimentalnu paradigmu u kojoj se laboratorijske životinje gaje u okruženju koje podrazumva pojačanu senzornu, motornu i kognitivnu stimulaciju (Slika 6) (Rosenzweig et al., 1978; van Praag et al., 2000). Dosadašnje studije su pokazale da OS ima značajne efekte kako na anatomskom i molekulskom nivou, tako i na nivou ponašanja.



Slika 6. Šematski prikaz obogaćene sredine. Gajenje u obogaćenoj sredini dovodi do povećane vizuelne, motorne, kognitivne i somatosenzorne stimulacije i aktiviranja različitih delova mozga (vizuelni, somatosenzorni i motorni deo kore velikog mozga, hipokampus i mali mozak). Modifikovano iz Nithianantharajah i Hannan, 2006.

Gajenje u OS podrazumeva upotrebu kaveza većih dimenzija u koje se pored hrane, vode i piljevine stavljaju i razni objekti kako bi se kod životinja podstakla veća fizička aktivnost. Pored fizičkog obogaćivanja sredine, može se primenjivati i socijalno obogaćivanje koje podrazumeva gajenje većeg broja jedinki u istom kavezu pri čemu se na taj način podstiče socijalna interakcija (Mesa-Gresa et al., 2013). Pokazano je da obe komponente OS, pojačana fizička aktivnost i socijalna interakcija, imaju niz pozitivnih

efekata na mozak. Naime, fizička aktivnost deluje tako što pojačava neurogenezu, nivo neurotrofičkih faktora rasta kao i ekspresiju određenih neurotransmiterskih subjedinica, što na kraju može rezultovati u poboljšanju kognitivnih sposobnosti životinja (van Praag et al., 1999; Farmer et al., 2004; Erickson et al., 2011). S druge strane, pokazano je da primenjivanje samo socijalne komponente OS dovodi do povećanja mase mozga (Rosenzweig et al., 1978).

Postoje brojni podaci u literaturi o strukturnim i funkcionalnim promenama u CNS koje nastaju kao posledica OS, a koje se nalaze u osnovi izmenjene neuronalne aktivnosti.

Morfološke promene u CNS: Jedan od najranije uočenih efekata OS odnosi se na povećanje mase mozga, što je posebno karakteristično za kortikalni i hipokampalni region (Diamond et al., 1976). Faktori koji se nalaze u osnovi ovog fenomena podrazumevaju povećanje u neuronalnoj gustini i veličini, grananju i dužini dendritskog stabla, gustini dendritskih trnova, kao i u grananju aksona (Kempermann et al., 1997; Leggio et al., 2005; Jung i Herms, 2014). Takođe, primećeno je da su promene u morfologiji dendrita praćene i izmenama na nivou sinapsi, odnosno u povećanju broja sinapsi i sinaptičkih kontakata (Briones et al., 2004; Landers et al., 2011). Pojačan nivo neurogeneze je još jedna promena koja se uočava u CNS nakon OS i za nju se smatra da je ključna za poboljšane kognitivnih performansi životinja (Kempermann et al., 1997, 1998; Nilsson et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2005). Čelijska proliferacija, ali i poboljšano neuronalno preživljavanje i funkcionalna integracija novih neurona su zabeleženi u adultnom dentatnom girusu nakon OS (Kempermann et al., 1997, 1998; van Praag et al., 2000; Lu et al., 2003; Bruel-Jungerman et al., 2005).

Molekularne promene u CNS: Strukturne u funkcionalne promene nakon OS su posledica niza promena na molekularnom nivou, uključujući promene u neurotrofičkim i neurotransmiterskim sistemima, kao i u nivoima ekspresije različitih regulatornih proteina koji povećavaju broj i stabilnost sinapsi, pojačavaju neurogenezu i podstiču oslobađanje neurotransmitera (van Praag et al., 2000; Mohammed et al., 2002; Frick i Fernandez, 2003; Nithianantharajah et al., 2004; Will et al., 2004; Nithianantharajah i Hannan, 2006). Neurotrofički faktori čiji se nivoi ekspresije značajno uvećavaju u kori velikog mozga, hipokampusu i malom mozgu nakon gajenja u OS ili pojačane fizičke aktivnosti su neurotrofički faktor mozga (eng. *Brain-derived neurotrophic factor*,

BDNF) i faktor rasta nerva (eng. *Nerve growth factor, NGF*) (Torasdotter et al., 1998; Angelucci et al., 2009; Birch et al., 2013). U adultnom mozgu BDNF i NGF podstiču plastičnost koja zavisi od iskustva tako što pojačavaju sinaptičku plastičnost, signalizaciju između ćelija, učenje i pamćenje (Bekinschtein et al., 2011). Smatra se da su povećani nivoi ovih neurotrofičkih faktora odgovorni za poboljšanje motorne i kognitivne funkcije nakon OS (Gelfo et al., 2011; Bechara i Kelly, 2013; Birch et al., 2013). S druge strane, pokazano je da su i određeni neurotransmiterski sistemi izmenjeni pod uticajem OS. Na primer, OS može dovesti do povećanja nivoa serotonina, koji je prepoznat kao jedan od ključnih molekula za pokretanje plastičnih promena u CNS (Maya Vetencourt et al., 2008; Baroncelli et al., 2010). Takođe, uočeno je da nakon OS dolazi i do ushodne regulacije ekspresije serotoninских receptora (Rasmuson et al., 1998; Koh et al., 2007). Nivoi drugih neurotransmitera koji se dovode u vezu sa sinaptičkom plastičnošću, kao što su acetilholin i noradrenalin, su takođe povećani nakon OS (Galani et al., 2007; Brenes et al., 2009). U saglasnosti sa ovim promenama u nivoima neurotransmitera, ekscitatorna aktivnost se takođe menja posle OS, što se ogleda u povećanju vanćelijskih nivoa glutamata u hipokampusu i povećanoj ekspresiji AMPA i NMDA receptora.

Promene u ponašanju: Pozitivni efekti OS na razvoj ponašajnog fenotipa su brojni. Naime, uočeno je da gajenje u OS značajno poboljšava motoričke sposobnosti, prostorno i ne-prostorno učenje i pamćenje, sposobnost razlikovanja novog objekta, kognitivnu fleksibilnost, zatim ispoljava anksiolitički efekat, podstiče istraživačko ponašanje i ubrzava habituaciju (van Praag et al., 2000; Nithianantharajah i Hannan, 2006; Simpson i Kelly, 2011).

Jasno je da OS ispoljava svoje efekte tako što menja ekspresiju mnogih gena uključenih u regulaciju neuronalne strukture, nadražljivosti, sinaptičke transmisije i plastičnosti pri čemu dovodi do izmenjene neuronalne funkcije. Međutim, danas se smatra da je pomeranje ravnoteže između ekscitacije i inhibicije ka ekscitaciji osnovni mehanizam preko kojeg OS menja funkciju mozga i ponašanje, i da upravo gajenje u OS dovodi do reaktivacije forme neuronalne plastičnosti koja je karakteristična za nezreo mozak, odnosno za rani period u toku razvića kada su inhibicioni mehanizmi nedovoljno razvijeni. Drugi predloženi mehanizam podrazumeva regulaciju genske

ekspresije aktiviranjem specifičnih transkripcionih faktora kao što je BDNF. To za posledicu ima pokretanje različitih transkripcionih programa koji dovode do aktivacije drugih gena koji su uključeni u plastičnost (sumirano u Baroncelli et al., 2010; Baroncelli et al., 2011). Iako tek treba da se razjasne tačni molekularni činioci koji leže u osnovi smanjene inhibicije i ushodne regulacije ekspresije BDNF nakon OS, pretpostavlja se da važnu ulogu mogu imati neurotransmiterski sistemi koji se karakterišu difuznim projekcijama u celom mozgu i za koje je uočeno da utiču na plastičnost mozga kako u razviću tako i kod adulta.

Međutim, pored mnogobrojnih unutarćelijskih promena nakon OS, jedan od najboljih pokazatelja plastičnosti u vanćelijskom okruženju jeste razgradnja PNM koja omogućava remodelovanje sinaptičkih kontakata. Na primer, Foscarin i saradnici su pokazali da izlaganje adultnih miševa OS dovodi do značajnih strukturnih promena u malom mozgu koje su podrazumevale smanjenje broja PNM i ekspresije pojedinih gradivnih komponenti ovih struktura, zatim povećanje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 enzima, kao i povećanje gustine ekscitatornih sinaptičkih završetaka u dubokim jedrima malog mozga. Ovakva zapažanja su ukazala na to da su PNM regulisane međusobnom interakcijom ravnoteže između sinteze/razgradnje njihovih komponenti i sinaptičke aktivnosti (Foscarin et al., 2011).

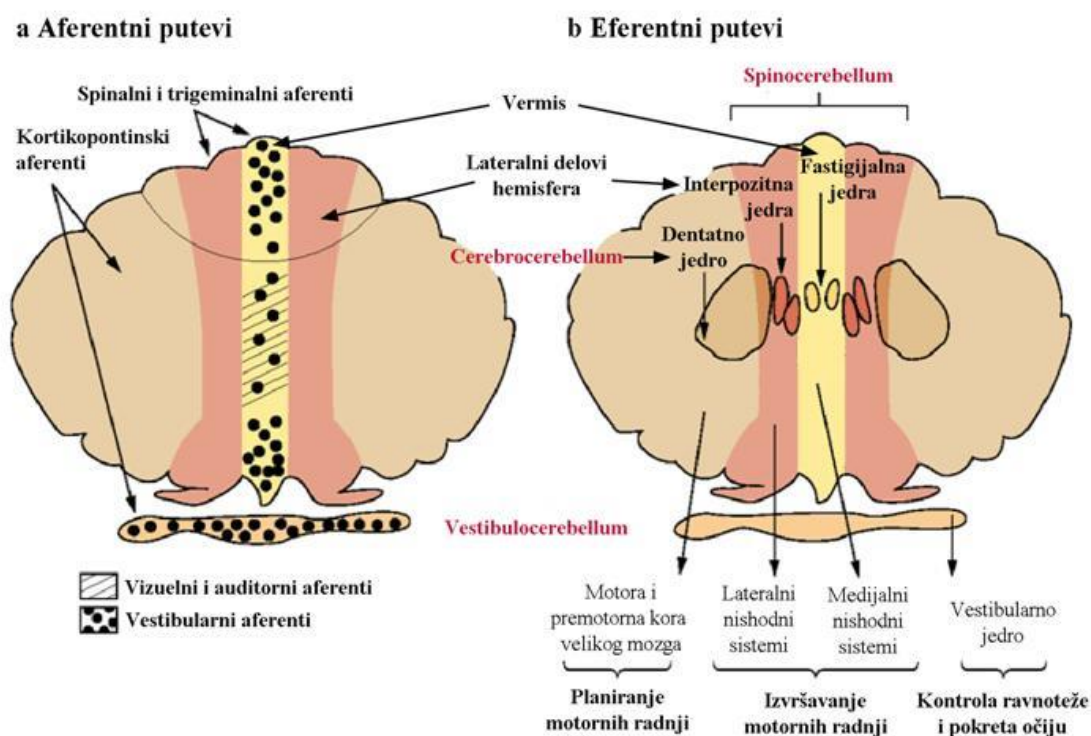
1.6 Anatomsko-funkcionalne specifičnosti malog mozga

Mali mozak (lat. *cerebellum*) čoveka iako čini svega 10% ukupne zapremine mozga, on sadrži skoro polovinu od ukupnog broja neurona. Tradicionalno je smatran za strukturu mozga koja je ključna za motornu kontrolu, odnosno da predstavlja koordinatora, sinhronizatora i korektora složenih motornih aktivnosti, uključujući i voljne mišićne pokrete. Međutim, sa napretkom funkcionalnih metoda oslikavanja mozga, postalo je jasno da mali mozak takođe ima važnu ulogu u rešavanju složenih kognitivnih zadataka. S tim u vezi, pokazano je da disfunkcija malog mozga ne dovodi samo do poremećaja u motornoj koordinaciji i motornom učenju, već može rezultovati i u različitim kognitivnim poremećajima (Kandel et al., 2000).

1.6.1 Struktura malog mozga i glavne projekcije

Mali mozak se nalazi u posteriornom delu lobanje i sastoji se od dve hemisfere koje su spojene intermedijalnim regionom koji je označen kao vermis. Siva masa se nalazi na površini i čini koru malog mozga. Ispod kore malog mozga lokalizovana je bela masa, a u njenom centralnom delu se nalazi još jedna siva masa organizovana u tri jedra koja su označena kao duboka jedra malog mozga: fastigijalno (*n. fastigi*), interpozitno (*n.interpositus*) i dentatno (*n. dentatus*). Informacije koje dolaze iz različitih delova CNS i sa periferije u koru malog mozga se prenose u duboka jedra, a zatim različitim eferentnim putevima preko drugih regiona CNS do efektornih organa (skeletalnih mišića). Na osnovu filogenije i funkcije u malom mozgu se mogu razlikovati tri regiona (Slika 7; Kandel et al., 2000).

Archicerebellum ili *vestibulocerebellum* je filogenetski najstariji deo malog mozga koji se sastoji od flokulonodularnog lobusa. Ovaj deo malog mozga prima informacije direktno iz primarnih vestibularnih aferentnih vlakana i projektuje se na bočna vestibularna jedra. Kod viših kičmenjaka njegova funkcija je ograničena na kontrolu ravnoteže tela i pokreta očiju.



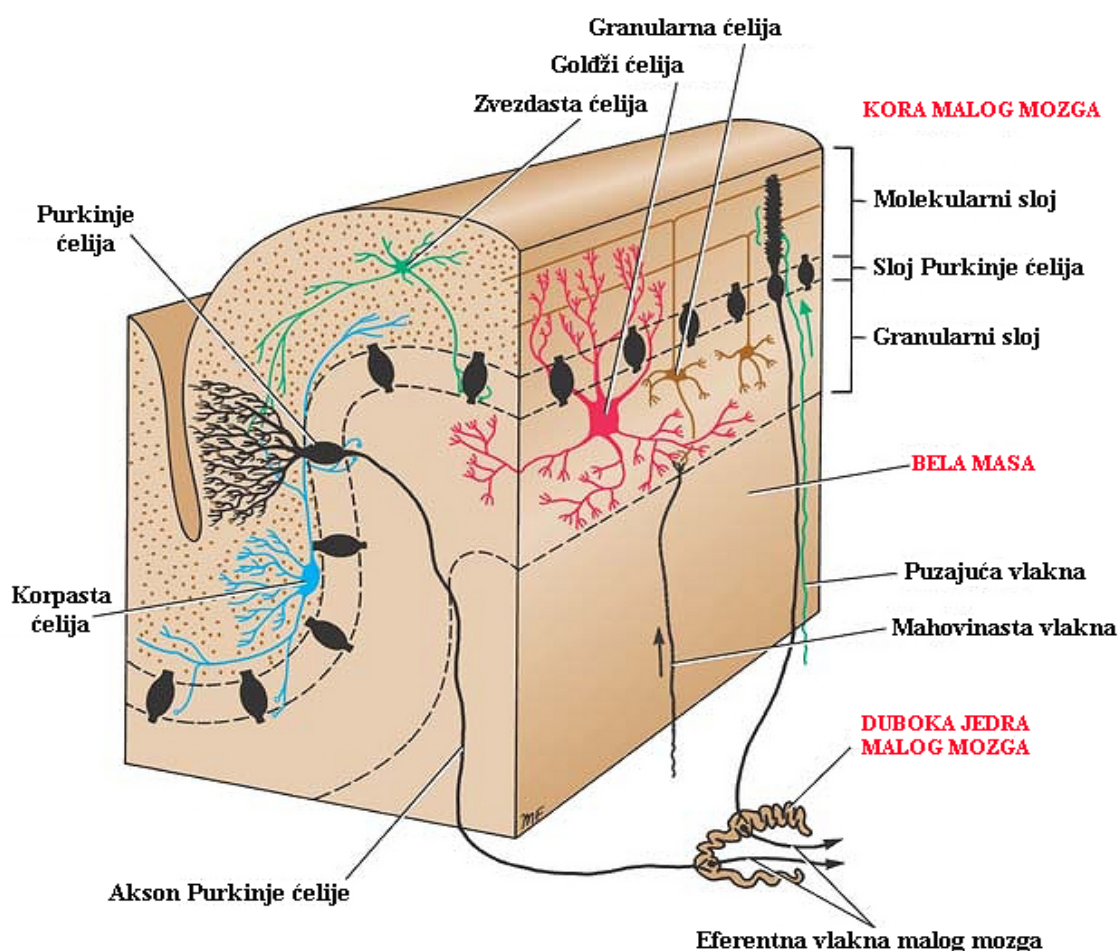
Slika 7. Šematski prikaz tri funkcionalno različita regiona malog mozga sa glavnim aferentnim (a) i eferentnim (b) putevima. Modifikovano iz Kandel et al., 2000.

Paleocerebellum ili *spinocerebellum* se sastoji od vermisa i intermedijarnih delova hemisfera. Vermis prima vizuelne, auditorne i vestibularne ulaze, kao i somatosenzorne ulaze iz glave i proksimalnih delova tela. S druge strane, on se projektuje preko fastigijalnog jedra u koru velikog mozga i moždano stablo koji čine medijalne nishodne sisteme koji kontrolišu proksimalne mišiće tela i udova. Vermis takođe kontroliše položaj tela, lokomociju, kao i usmeravanje pogleda. Susedni intermedijarni delovi hemisfera takođe primaju somatosenzorne ulaze ali iz ekstremiteta, a projektuju se preko interpozitnog jedra u bočne kortikospinalne i rubrospinalne sisteme pri čemu kontrolišu distalne mišiće ekstremiteta i vrhove prstiju.

Neocerebellum ili *cerebrocerebellum* se sastoji od lateralnih delova hemisfera i predstavlja filogenetski najmlađi deo malog mozga. Ovaj deo prima informacije isključivo iz kore velikog mozga, a preko dentatnog jedra se projektuje na motorni, premotorni i prefrontalni deo kore velikog mozga. Neocerebellum je uključen u planiranje, odnosno u regulaciju i koordinaciju voljnih mišićnih pokreta i utiče na neokortikalne aktivnosti.

1.6.2 Čelijska organizacija malog mozga

Kora malog mozga je jednostavna struktura koja se sastoji iz tri sloja, odnosno 5 tipova neurona: inhibitornih (zvezdasti, korpasti, Purkinje i Goldži neuroni) i ekscitatornih granularnih ćelija (Slika 8) (Kandel et al., 2000).



Slika 8. Šematski prikaz strukture malog mozga. Kora malog mozga je izgrađena od molekularnog sloja, sloja Purkinje ćelija i granularnog sloja. U okviru kore, mogu se razlikovati 5 tipova ćelija: korpaste, zvezdaste, Goldži, Purkinje i granularne. Ispod kore malog mozga lokalizovana je bela masa koju čine aferentni i eferentni putevi malog mozga kao i vlakna Purkinje neurona, dok se u njenom centralnom delu nalaze tri jedra koja su označena kao duboka jedra malog mozga. Preuzeto i modifikovano sa <http://ueu.co/ovid-clinical-neuroanatomy-15>

Molekularni sloj je površinski deo kore malog mozga koji je izgrađen od ćelijskih tela dva tipa inhibitornih interneurona, zvezdastih i korpastih ćelija, koji su raspoređeni između aksona ekscitatornih granularnih ćelija i dendrita inhibitornih Purkinje neurona čija se ćelijska tela nalaze u dubljim, nižim slojevima. Aksoni granularnih ćelija se u ovom sloju zbog svoje prostorne orijentacije nazivaju još i paralelna vlakna.

Sloj Purkinje neurona se nalazi ispod molekularnog sloja i izgrađen je od jednog sloja ćelijskih tela Purkinje neurona. Aksoni ovih ćelija se projektuju na duboka jedra malog mozga ili vestibularna jedra i predstavljaju glavne izlazne puteve kore malog mozga koji su isključivo inhibitorni i posreduju preko oslobađanja GABA neurotransmitera.

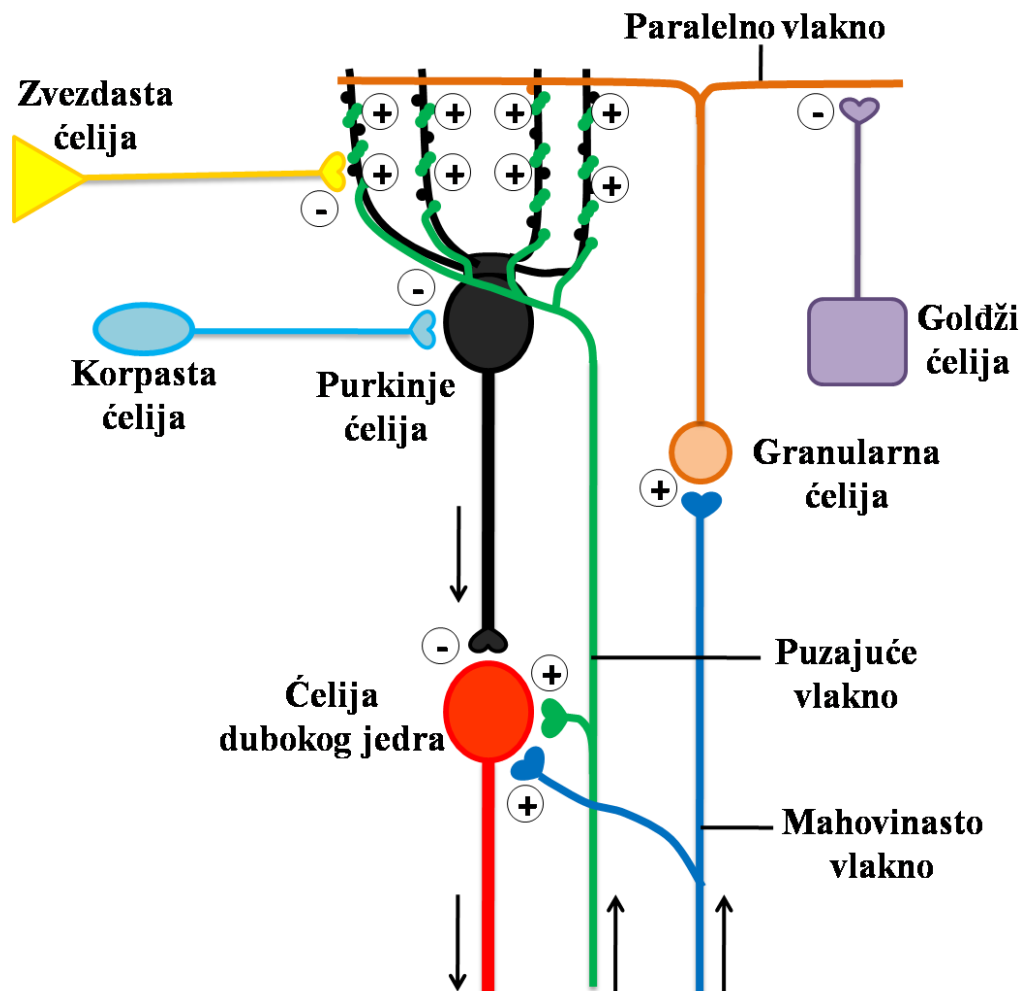
Granularni sloj je najdublji sloj sačinjen iz velikog broja granularnih ćelija i znatno manjeg broja Goldži interneurona. Mahovinasta vlakna koja inače predstavljaju glavni izvor aferentnih vlakana u malom mozgu se završavaju upravo u ovom sloju. Sinaptički kompleks sačinjen od okruglastog završetka mahovinastog vlakna koji ostvaruje kontakt sa granularnim ćelijama i Goldži neuronima označen je kao glomerulus.

Purkinje neuroni obavljaju složenu integraciju velikog broja ekscitatornih ulaza koje dobijaju iz različitih regiona mozga preko dva glavna aferentna puta, mahovinastih i puzajućih vlakana. S druge strane, aktivnost Purkinje neurona je inhibirana od strane zvezdastih, korpastih i Goldži ćelija (Slika 9).

Mahovinasta vlakna vode poreklo iz kičmene moždine i moždanog stabla i nose senzorne informacije sa periferije, kao i informacije iz kore malog mozga. Ova vlakna formiraju u granularnom sloju ekscitatorne (glutamatne) sinapse sa dendritima granularnih ćelija, dok aksoni granularnih ćelija (paralelna vlakna) dalje nadražuju veliki broj Purkinje neurona tako što ostvaruju kontakt sa njihovim dendritima u molekularnom sloju. Jedan Purkinje neuron može primati ulaze od velikog broja granularnih ćelija (~200 000), a svaka od tih granularnih ćelija dobija informacije od velikog broja mahovinastih vlakna.

Puzajuća vlakna vode poreklo iz inferiornog (donjeg) olivarnog jedra i prenose somatosenzorne i vizuelne informacije, kao i informacije iz kore velikog

mozga. Ova vlakna se obmotavaju oko ćelijskih tela i proksimalnih dendrita Purkinje neurona ostvarujući tako brojne sinaptičke kontakte. Jedan Purkinje neuron prima sinaptički ulaz od samo jednog puzajućeg vlakna. Međutim, jedno puzajuće vlakno može da ostvari kontakt sa 1-10 Purkinje neurona.



Slika 9. Šematski prikaz neuronalnih kola u malom mozgu. Vlakna mahovinastih i puzajućih vlakana predstavljaju dva glavna aferentna puta do kore malog mozga, dok aksoni neurona u dubokim jedrima malog mozga predstavljaju glavna eferentna vlakna malog mozga. Modifikovano iz Sekeljic i Andjus, 2012.

Nakon integracije svih signala Purkinje ćelije generišu izlazne signale koji inhibiraju neurone u dubokim jedrima koji predstavljaju funkcionalne centre i glavne izlazne puteve malog mozga (Uusisaari i Knopfel, 2011). Sve je više dokaza koji ukazuju da duboka jedra nisu samo relejna stanica, već mesta gde dolazi do integracije i stvaranja novih signala. Purkinje neuroni se projektuju na ćelijska tela i proksimalne

delove dendrita neurona u dubokim jedrima, dok se na distalnim delovima dendrita nalaze ekscitatorne sinapse koje ćelije dubokih jedara ostvaruju sa mahovinastim i puzajućim vlaknima. Ekscitatorni ulazi mogu biti glutamatni, ali i serotoninski i holinergički. Morfološke i elektrofiziološke studije su do sada otkrile šest različitih populacija neurona u okviru ovih jedara: dve grupe neurona za koje se pretpostavlja da oslobađaju glutamat, tzv. veliki i mali GAD67 negativni neuroni (GADnL i GADnS), zatim GAD67 pozitivni GABAergični neuroni koji mogu biti lokalni (GAD+ interneuroni) ili projekcioni s obzirom da se projektuju na inferiorne olive (GAD+IO), glicinergički spontano neaktivni, za koje je sa sigurnošću potvrđeno da ne proizvode akcione potencijale u odsustvu sinaptičkih ulaza (Gly-I) i Gly-F projekcioni neuroni karakteristični samo za fastigijalno jedro, za koje postoje indikacije da, slično GAD+ interneuronima, spontano proizvode akcione potencijale. Dentatno duboko jedro (*n. dentatus*) je najkрупnije od tri jedra i poseduje najveći broj neuronalnih projekcija koje povezuju mali mozak sa talamusom i moždanim stablom. Do sada je pokazano da je ovo jedro uključeno u regulaciju motivacije, istraživačkog ponašanja, planiranje, započinjanje i kontrolu voljnih pokreta, kao i u prostorno učenje i učenje složenih motornih radnji (Joyal et al., 2001; Noblett i Swain, 2003; Bauer et al., 2011; Peterson et al., 2012).

1.6.3 Postnatalni razvoj malog mozga – uloga TnC i želatinaza

Ćelijska proliferacija i migracija, rast aksona i dendrita, sinaptogeneza, ćelijska smrt i eliminacija nefunkcionalnih sinapsi su glavni događaji koji prethode formiranju CNS. Mnogi od ovih događaja su proučavani upravo u kori malog mozga zbog njene geometrijski jednostavne strukture. Mali mozak glodara nakon rođenja prolazi intenzivan period sazrevanja koji traje oko 3 nedelje, a finalnu formu dostiže tek za 7-8 nedelja (McKay i Turner, 2005). S druge strane, kod čoveka razvoj malog mozga traje sve do 15-20. godine života (Diamond, 2000).

Kod miša, morfološke studije su pokazale da se sinapse između paralelnih vlakana i Purkinje neurona formiraju oko P7 (Zhao et al., 1998). Granularne ćelije nastaju izraženom proliferacijom njihovih progenitora u spoljašnjem granularnom sloju tokom prve dve postnatalne nedelje. Post-mitotske granularne ćelije zatim bilateralno

pružaju svoje aksone, dok njihova ćelijska tela migriraju naniže u molekularni sloj. Do treće postnatalne nedelje ove ćelije se smeštaju u unutrašnji granularni sloj ispod ćelijskog sloja Purkinje neurona. Tokom prve tri nedelje ćelije unutrašnje moždane ovojnice (*pia mater*) imaju važnu ulogu u ćelijskoj proliferaciji i migraciji, dok Bergmanova glija pruža svoje nastavke ka molekularnom sloju usmeravajući tako migraciju granularnih ćelija (Altman, 1975). Granularne ćelije se zatim diferenciraju i formiraju sinaptičke komplekse sa ekscitatornim mahovinastim vlaknima i inhibitornim aksonima Goldži ćelija. Izvestan broj granularnih ćelija ulazi u programiranu ćelijsku smrt, apoptozu, što se zapravo smatra procesom koji optimizuje broj ćelija i njihovu međusobnu povezanost. Takođe, u toku prve tri postnatalne nedelje dolazi i do izrazitog rasta Purkinje neurona, odnosno njihovih dendritskih stabala koji formiraju brojne sinaptičke kontakte. Za razliku od kore malog mozga, razviće dubokih jedara je još uvek nedovoljno proučeno. Međutim, ono što je poznato jeste da različite populacije inhibitornih i ekscitatornih neurona u dubokim jedrima nastaju u različitim progenitorskim odeljcima u različitim vremenskim intervalima, nakon čega jedinstvenim migratornim putevima dolaze do finalne pozicije u malom mozgu (Fink et al., 2006).

S obzirom na važnu ulogu TnC u razviću neuronalnih ćelija, Bartsch i saradnici su ispitali njegov obrazac ekspresije u postnatalnom razviću kore malog mozga miša (Bartsch et al., 1992). Oni su pokazali da se TnC pojačano eksprimira u svim slojevima kore malog mozga od rođenja pa sve do treće postnatalne nedelje, kada dolazi do značajne nishodne regulacije njegove ekspresije. Takođe, pokazano je da su astrociti i Bergmanova glija glavni ćelijski izvori TnC u malom mozgu. Iako nijedan od tipova neurona u malom mozgu ne eksprimira TnC, uočena je njegova distribucija na površini neurona. Ovakav rezultat je ukazao da bi TnC mogao preko određenih receptora na površini neurona da ostvaruje funkcionalna svojstva koja se odnose na ćelijsku migraciju ili izrastanje neurita, što je ubrzo i pokazano, kao i da to čini preko svog fibronektinskog domena (Husmann et al., 1992).

Takođe, karakterističan prostorno-vremenski obrazac ekspresije i aktivnosti želatinaza, MMP-2 i MMP-9, kao i njihovih inhibitora tokom razvića malog mozga ukazao je da bi proteolitička aktivnost ovih enzima mogla da bude ključna u određivanju redosleda događaja koji se javljaju tokom morfogeneze malog mozga, ali i

tokom plastičnih promena u adultnom stupnju (Vaillant et al., 1999). Naime, ustanovljena je povišena aktivnost MMP-2 u malom mozgu u toku postnatalnog razvića koja se zadržava na istom nivou i kod adultnog pacova. Aktivnost MMP-2 je uglavnom ograničena na ćelijska tela Purkinje neurona i ne uočava se u granularnom i molekularnom sloju u toku razvića. S druge strane, MMP-9 dostiže maksimalnu aktivnost u toku P10 nakon čega opada i ostaje slabo primetna kod adulta. Njeno prisustvo je uočeno ne samo u telima Purkinje neurona, već i u ćelijskim telima Bergmanove glije i interneurona, kao i granularnih ćelija. Vaillant i saradnici su pokazali u *in vitro* studiji da specifična blokada MMP-9 inhibira migraciju granularnih ćelija kao i izrastanje njihovih aksona (Vaillant et al., 2003). Zatim, ista grupa autora je potvrdila odloženu migraciju granularnih ćelija kod MMP-9^{-/-} miševa i otkrila smanjenu apoptozu ovih ćelija i time objasnila prekomernu akumulaciju granularnih ćelija u kori malog mozga kod ovih životinja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Iako su prethodna istraživanja pokazala da je TnC uključen u procese plastičnosti nervnog sistema njegova tačna uloga u regulaciji različitih oblika plastičnosti je još uvek nedovoljno razjašnjena. Ovo se pre svega odnosi na parametre strukturne plastičnosti kao što je distribucija PNM, morfologija sinapsi i aktivnost proteolitičkih enzima uključenih u neuroplastične procese. Izlaganje eksperimentalnih životinja OS pokreće procese plastičnosti u različitim regionima mozga u kojima se zadržava ekspresija TnC i nakon embrionalnog razvića, kao što je slučaj sa malim mozgom. S obzirom na sve navedeno, osnovni cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uloga ovog molekula VCM u regulaciji plastičnih procesa praćenjem parametara strukturne plastičnosti u malom mozgu miševa sa nedostatkom TnC, kao i detaljnim ispitivanjem ponašajnog fenotipa ovih životinja nakon njihovog izlaganja uslovima OS. Stoga, eksperimentalni zadaci ovog istraživanja su podrazumevali da se ispita:

1. Lokalizacija TnC u VCM malog mozga adultnog miša divljeg soja, odnosno njegova distribucija u odnosu na PNM.
2. Da li OS menja nivo ekspresije TnC u malom mozgu miša divljeg soja.
3. Kako nedostatak TnC utiče na distribuciju i morfologiju PNM, odnosno stepen njihove degradacije nakon OS.
4. Kako nedostatak TnC utiče na gustinu i površinu inhibitornih i ekscitatornih presinaptičkih završetaka u *n. dentatus* malog mozga.
5. Uloga glavnih proteolitičkih enzima prisutnih u malom mozgu, MMP-2 i MMP-9, u degradaciji PNM i sinaptičkom remodelovanju.
6. Kako nedostatak TnC utiče na nivo aktivnosti MMP-2 i MMP-9.
7. Vremenski sled promena strukturne plastičnosti u malom mozgu.
8. Kako nedostatak TnC interaguje sa sredinskim faktorima u oblikovanju različitih domena ponašanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Eksperimentalni model

U eksperimentima su korišćena dva tipa genetički modifikovanih miševa: miš sa nedostatkom vanćelijskog matriksnog molekula TnC (TnC^{-/-}), prvi put detaljno opisan u studiji Evers et al. (2002) i miš sa nedostatkom MMP-9 enzima (MMP-9^{-/-}), prvi put opisan u studiji Vu et al. (1998). Oba konstitutivna mutanta su napravljena na genetičkoj osnovi inbrednog mišijeg soja C57BL/6. Kolonije genetički modifikovanih miševa su održavane ukrštanjem ženke soja C57BL/6 i mužjaka sa nedostatkom TnC ili MMP-9 molekula, dok su u eksperimentima korišćene homozigotne jedinke dobijene iz heterozigotnog ukrštanja. Genotip životinja je utvrđen standardnom metodom polimerazne lančane reakcije. Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa standardima za gajenje životinja propisanim od strane Srpskog udruženja za proučavanje laboratorijskih životinja i odobreni su od strane Etičkog komiteta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (EK-BF-2016/02).

3.2 Genotipizacija životinja metodom polimerazne lančane reakcije (PCR)

3.2.1 PCR protokol za detekciju TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa

U cilju utvrđivanja genotipa eksperimentalnih životinja urađen je PCR na DNK izolovanoj iz tkiva. Od svakog miša, starosti oko 2 nedelje, uzet je odsečak repa veličine 0,5 cm i stavljen u 0,3 ml pufera za digestiju (TDB) koji sadrži: 50 mM Tris pufera pH 8,0, 50 mM EDTA i 0,5% natrijum dodecil sulfat (SDS). Odsecci su inkubirani u TDB 15 min na +65°C u cilju inaktivacije enzima koji razgrađuju DNK. Zatim je u svaki uzorak dodato 0,2 ml smeše proteinaze K i TDB u odnosu 187 µl TDB i 13 µl proteinaze K koncentracije 20 mg/ml. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani između 16-18 h na +56°C. Razgrađeni repovi su centrifugirani pri brzini rotacije 14000 x g u trajanju od 5 min. Supernatant je razblažen 20 puta u dejonizovanoj i destilovanoj vodi

(ddH₂O) i inkubiran 15 min na +95°C kako bi došlo do razdvajanja lanaca dvolančane DNK.

Svaku PCR smešu su činile sledeće komponente:

- 14 µl ddH₂O
- 7 µl PCR Master Mix - 0,4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), 4 mM MgCl₂ i 0,05 U/µl Taq DNK polimeraze neophodne za otpočinjanje PCR reakcije (Fermentas, Nemačka)
- 0,95 µl 20 µM *ES delete new* prajmera,
(5'-AGC CCC TGC CTA CCT TTT CCT AAT G-3')
- 0,95 µl 20 µM *ES TnC (pos) RV+I* prajmera,
(5'-CCA GCT TTA TCG GAT CCA TAA CTT CG-3')
- 1,1 µl 20 µM *ES WT new 59* prajmera,
(5'-CTT CGG GAG TGA GGG CAA ACA AAG-3')
- 1 µl uzorka izolovane DNK.

Pored uzoraka koje je trebalo ispitati, pripremani su i kontrolni uzorci: pozitivne kontrole - DNK genetički modifikovanog miša (fragment od 225 baznih parova) i DNK genetički nemodifikovanog miša (fragment od 461 baznih parova) i kontrola PCR reakcije - uzorak ddH₂O. Protokol za PCR reakciju je prikazan u Tabeli 1.

Tabela 1. Protokol za PCR reakciju

Naziv faze	Temperatura (°C)	Trajanje (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	150	1
Denaturacija	94	30	30
Hibridizacija	65	45	
Elongacija	72	50	
Finalna elongacija	72	300	1
	4	Do korišćenja	

Nakon završene PCR reakcije, uzorci su nalivani na 1.7% agarozni gel koji je sadržao etidijum bromid, nakon čega su razdvojeni horizontalnom elektroforezom na 100 V u trajanju od 25 min. Procentni sastav gela određuje veličinu pora - što je veći, pore su manje, a moć razdvajanja traka (fragmenata DNK) bliskih veličina je veća. Gel je osvetljen na transiluminatoru i uslikan kamerom.

3.2.2 PCR protokol za detekciju MMP-9+/+ i MMP-9-/- miševa

Proces izolacije DNK je rađen po istom protokolu koji je opisan u prethodnom odeljku.

Svaku PCR smešu su činile sledeće komponente:

- 11,4 µl ddH₂O,
- 2 µl PCR pufera, 10x koncentrovan (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl (pH 8.3 na 20°C), Sigma-Aldrich),
- 2 µl 15 mM MgCl₂,
- 0,4 µl 10 mM dNTP (Fermentas),
- 0,2 µl Taq DNK polimeraze (Kapa, 5 U/µl),
- 1 µl startera 1

(5 µM *Neo sense* prajmer 5'-GAA GGG ACT GGC TGC TAT TG-3' i 5 µM *Neo antisense* prajmer 5'-AAT ATC ACG GGT AGC CAA CG-3'),

- 1 µl startera 2

(15 µM *MMP-9 sense* prajmer 5'-GCA TAC TTG TAC CGC TAT GG-3' i 15µM *MMP-9 antisense* prajmer 5'-TAA CCG GAG GTC CAA ACT GG-3'),

- 2 µl uzorka izolovane DNK.

PCR reakcija se odvijala po programu prikazanom u Tabeli 2.

Tabela 2. Protokol za PCR reakciju

Naziv faze	Temperatura (°C)	Trajanje (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	300	1
Denaturacija	94	60	30
Hibridizacija	60	40	
Elongacija	72	40	
Finalna elongacija	72	600	1
	4	Do korišćenja	

Nakon završene PCR reakcije, uzorci su nalivani na 1% agarozni gel koji je sadržao etidijum bromid, nakon čega su razdvojeni horizontalnom elektroforezom na 100 V u trajanju od 20 min. Gel je osvetljen na transiluminatoru i uslikan kamerom. Fragment DNK genetički modifikovanog miša poseduje oko 450 baznih parova, dok fragment DNK genetički nemodifikovanog miša oko 300 baznih parova.

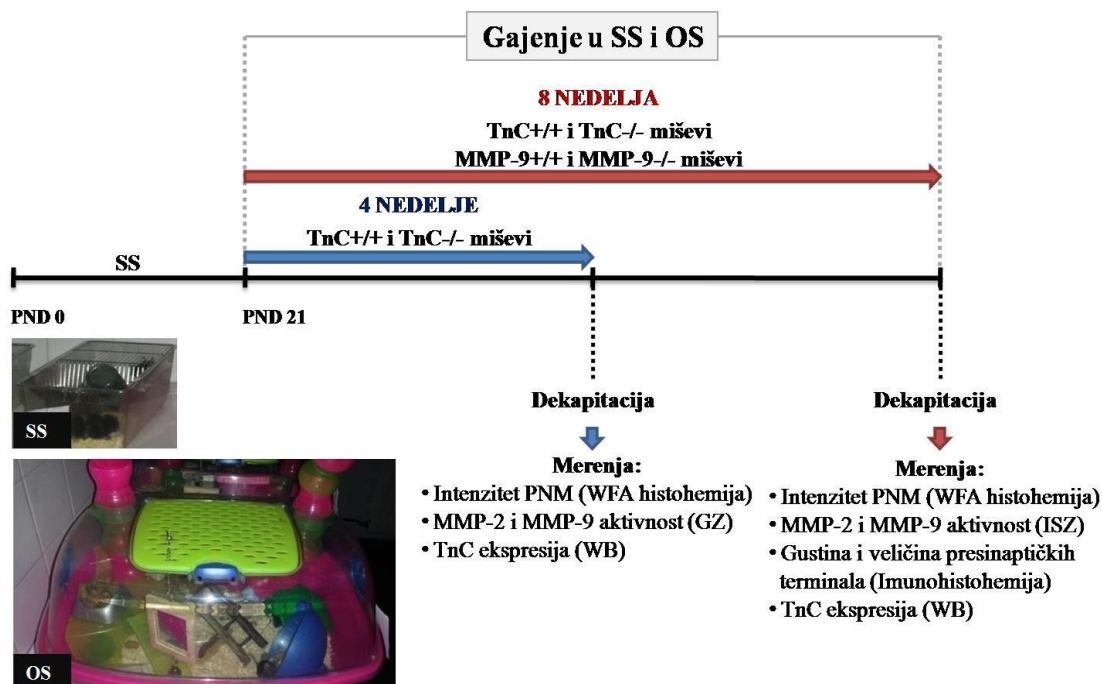
3.3 Gajenje životinja u standardnoj i obogaćenoj sredini

Životinje su po rođenju gajene u standardnim uslovima zajedno sa roditeljima. Nakon genotipizacije, jedinke muškog pola i starosti 3 nedelje, su raspoređene u 4 eksperimentalne grupe (2 genotipa x 2 sredine). U svakom kavezu se nalazilo po 6 životinja, a period gajenja je trajao 4 ili 8 nedelja (Slika 10). Starost životinja je izabrana na osnovu prethodnih studija koje su pokazale da izlaganje životinja uslovima obogaćene sredine u toku prvog meseca starosti ima brojne pozitivne i dugotrajne posledice na morfološkom i ponašajnom nivou (Simpson i Kelly, 2011; Hosseiny et al., 2015). U studiji su korišćeni samo mužjaci kako bi se izbegao efekat estrusnog ciklusa na ponašanje (ter Horst et al., 2012).

Eksperimentalne grupe korišćene u toku istraživanja:

- 1) TnC^{+/+} ili MMP-9^{+/+} miševi, standardna sredina (SS)
- 2) TnC^{+/+} ili MMP-9^{+/+} miševi, obogaćena sredina (OS)
- 3) TnC^{-/-} ili MMP-9^{-/-}, SS
- 4) TnC^{-/-} ili MMP-9^{-/-}, OS

Tokom gajenja životinja u OS korišćeni su kavezi većih dimenzija 54 x 39 x 27 cm koji su bili opremljeni različitim objektima kao što su tuneli, skloništa, merdevine, loptice, drvca, zvonice, točkovi za trčanje koji su se razlikovali po svom sastavu, mirisu, teksturi, obliku, veličini i boji. Kako bi se postigla intenzivnija motorička, senzorna i kognitivna stimulacija eksperimentalnih životinja, raspored objekata unutar kaveza je menjan jednom dnevno dok je sastav objekata menjan jednom nedeljno. Standardni uslovi gajenja životinja su podrazumevali upotrebu standardnih laboratorijskih kaveza za miševu dimenzija 32 x 20 x 13 cm koji su posedovali piljevinu i posude za hranu i vodu. Temperatura u prostoriji u kojoj su gajene životinje iznosila je $21 \pm 1^\circ\text{C}$, dok je relativna vlažnost vazduha bila između 40 – 70%, a osvetljenost ~100 lx sa automatski podešenim 12-h dan/noć ciklusom.



Slika 10. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna i osnovnih parametara merenih u studiji. U trećoj nedelji starosti (postnatalni dan, PND 21), kontrolni (TnC+/+ i MMP-9+/+) i genetički modifikovani (TnC-/- i MMP-9-/-) miševi su raspoređeni u kaveze koji su predstavljali standardnu sredinu (SS) ili obogaćenu sredinu (OS) gde su gajeni u trajanju od 4 ili 8 nedelja. PNM – perineuronalne mreže, GZ – gel zimografija, WB – Western blot, ISZ – *in situ* zimografija.

3.4. Gel zimografija

3.4.1 Izolacija dubokih jedara i kore malog mozga

Nakon izlaganja TnC+/+ i TnC-/- miševa 4 nedelje SS i OS, životinje su dekapitovane. Mozak je izolovan, a zatim je mali mozak odvojen od ostatka mozga i moždanog stabla. Rostralni deo malog mozga koji je sadržao duboka jedra, smeštena između četvrte moždane komore i kore malog mozga, je dalje odvojen od kaudalnog dela u nivou paraflokulusa. Zatim su pod stereo mikroskopom pažljivo razdvojena duboka jedra od ostatka kore malog mozga i obe strukture su zamrznute na -80°C do dalje upotrebe. Ceo postupak izolacije kao i svi naredni koraci su rađeni brzo i na ledu u cilju očuvanja enzimske aktivnosti. Sva tri duboka jedra (dentatno, interpozitno i fastigijalno) su izolovana zajedno usled nemogućnosti precizne izolacije dentatnog jedra (*n. dentatus*), kao i nedovoljne količine tkiva za dalju analizu.

3.4.2 Prečišćavanje MMP

MMP su izolovane po već opisanoj proceduri uz manje izmene (Szklarczyk et al., 2002). Tkiva obe moždane strukture su homogenizovana u hladnom puferu koji je sadržao 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM CaCl₂, 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka), kao i dodatno razblažene proteazne i fosfatazne inhibitore (po 1 tableta od svakog inhibitora je rastvorena u 30 ml pufera; Roche, Mannheim, Nemačka). Težina tkiva je pre homogenizacije izmerena na analitičkoj vagi, tako da je na 10 mg tkiva korišćeno 10 µl pufera. Zatim je od svakog homogenata uzeto po 200 µl i centrifugirano pri brzini rotacije 6000 x g na 4°C u trajanju od 30 min. Sav supernatant je izdvojen i označen kao rastvorljiva frakcija u Triton X-100, dok je talog činio nerastvorljivu frakciju u Triton X-100. U ciju precipitacije rastvorljivih proteina, supernatant je dalje pomešan sa apsolutnim etanolom tako da finalna koncentracija etanola bude 60%, a zatim centrifugiran pri brzini rotacije 15000 x g na 4°C 5 min. Supernatant je uklonjen dok je talog resuspendovan u 100 µl pufera koji je sadržao 63 mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2% SDS i 0,0025% bromfenol plavo rastvorene u ddH₂O, na mešalici koja je podešena na 1000 rotacija po minuti na 37°C 15 min (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, Nemačka), a zatim je momentalno zamrznut u tečnom azotu i odložen na -80°C do dalje upotrebe. Da bi smo izolovali proteine koji se nalaze u vanćelijskom matriksu, talog koji je činio nerastvorljivu frakciju u Triton X-100 je rasuspendovan u 500 µl pufera koji je sadržao 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM CaCl₂, kao i razblažene proteazne i fosfatazne inhibitore (po 1 tableta od svakog inhibitora je rastvorena u 30 ml pufera) i grejan na 60°C 15 min na mešalici sa 1000 rotacija po minuti. Zatim je centrifugiran pri brzini od 10000 x g na 4°C 30 min. Supernatant je izdvojen i pomešan sa apsolutnim etanolom tako da finalna koncentracija etanola bude 60% i dalje centrifugiran pri brzini rotacije 15000 x g na 4°C 5 min. Nakon uklanjanja supernatanta, talog bogat MMP enzimima je rastvoren u 50 µl pufera koji je sadržao 63 mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2% SDS i 0,0025% bromfenol plavo rastvorene u ddH₂O i ostavljen u mešalici na 1000 rotacija po minuti na 37°C 15 min, a zatim je momentalno zamrznut u tečnom azotu i odložen na -80°C do dalje upotrebe.

3.4.3 Detekcija MMP-2 i MMP-9 aktivnosti na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je metoda za razdvajanje proteina na gelu na osnovu razlika u njihovoj relativnoj molekularnoj masi. Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom 30% akrilamidne mešavine koja se sastojala iz 29,2% akrilamida i 0,8% N,N-metilen-bis-akrilamida, najčešće korišćenog agensa za umrežavanje. Proces polimerizacije započinje dodavanjem amonijum persulfata (APS) i N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). Polimerizacijom akrilamida nastaju dugački lanci polimera, dok bis-akrilamid formira poprečne veze. Na taj način nastaje neutralna hidrofilna mrežasta struktura gela koja se odlikuje određenom veličinom pora. Veličina pora u gelu se reguliše zastupljenošću akrilamidne mešavine – što je više prisutana, broj poprečnih veza u gelu će biti veći, a veličina pora će biti manja. U cilju razdvajanja MMP-2 i MMP-9 i detektovanja njihove aktivnosti u prethodno pripremljenim uzorcima, najpre je nalivan gel za razdvajanje koji je u sebi sadržao supstrat, 0,5% želatin. Nakon njegove potpune polimerizacije, postavljani su češljici za formiranje bunarića i nalivan je gel za koncentrovanje koji služi da se materijal koncentriše kako bi proces razdvajanja počeo u isto vreme u svim uzorcima. Komponente gela za razdvajanje i gela za koncentrovanje su prikazane u Tabeli 3.

Tabela 3. Komponente gela za razdvajanje i koncentrovanje proteina

8% gel za razdvajanje		5% gel za koncentrovanje	
ddH ₂ O	10,9 ml + 3 ml želatina	ddH ₂ O	6,8 ml
30% akrilamidna mešavina	8 ml	30% akrilamidna mešavina	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	7,5 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	300 µl	10% SDS	100 µl
10% APS	300 µl	10% APS	100 µl
TEMED	18 µl	TEMED	10 µl

Uzorci su neposredno pre nalivanja na gel inkubirani u mešalici na 1000 rotacija po minuti na 37°C 5 min, a zatim su snažno promešani i u jednakim količinama nanošeni u bunariće. Na svaki gel je nanošen proteinski standard koga čine proteini poznatih molekularnih masa radi provere molekularne mase ispitivanog proteina

(Fermentas, Estonija). Elektroforeza se odvijala u vlažnoj atmosferi, odnosno u puferu za elektroforezu koji je sadržao 25 mM Tris, 190 mM glicin i 0,1% SDS rastvorene u ddH₂O. Proteini su razdvajani elektroforezom pri naponu od 70 V u trajanju od 1 h, a zatim je voltaža povećana na 130 V i elektroforeza je trajala dodatnih 2,5 h (Criterion Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Nakon SDS-PAGE, gel je ispran 2 puta po 30 min u 2,5% Triton X-100, a zatim je inkubiran u razvijajućem puferu koji je sadržao 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 1% Triton X-100 i 0,02% NaN₃ na 37°C između 2-5 dana. Gel je dalje ispran u ddH₂O i inkubiran 2 h na sobnoj temperaturi u 0,25% rastvoru boje Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD) rastvorenoj u 45% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini, nakon čega je gel postepeno odbojavan inkubiranjem u mešavini 45% metanola i 10% sirćetne kiseline rastvorene u ddH₂O do pojave belih traka na plavom gelu što je bio pokazatelj da je došlo do proteolize, odnosno razlaganja želatina od strane aktivnih formi MMP-2 (72 kDa) i MMP-9 (92 kDa) enzima. Vlažni zimogrami sa uzorcima iz rastvorljive frakcije u Triton X-100 (vidljiva samo MMP-2 aktivnost) i nerastvorljive frakcije u Triton X-100 (vidljiva MMP-2 i MMP-9 aktivnost) su skenirani (AGFA, Mortsel, Belgija) za dalju analizu. Kvantifikacija intenziteta dobijenih traka je urađena u programu ImageJ (National Institute of Health, SAD) korišćenjem funkcije *Gel Analysis*. Nakon uklanjanja pozadinskog signala sa svake slike gela, određeni su intenziteti traka za svaku eksperimentalnu grupu, a zatim je za svaki ispitivani region urađena normalizacija u odnosu na prosečnu vrednost intenziteta koja je dobijena za TnC^{+/+} eksperimentalnu grupu koja je gajena u standardnoj sredini.

3.5 Izolacija proteina i Western blot analiza

3.5.1 Izolovanje ukupnih proteina iz tkiva

Proteini su izolovani iz kore malog mozga kao i dubokih jedara malog mozga kontrolnih i genetički modifikovanih TnC^{-/-} i MMP-9^{-/-} miševa koji su gajeni u SS i OS 4 ili 8 nedelja. Postupak izolacije tkiva je detaljno opisan u odeljku *Gel zimografija - Izolacija dubokih jedara i kore malog mozga* (videti poglavlje 3.4.1). Nakon izolacije, tkiva određene moždane strukture koja su izolovana iz 3 životinje koje pripadaju istoj eksperimentalnoj grupi, su sjedinjena nakon čega je urađena homogenizacija u hladnom puferu za liziranje koji je bio identičnog sastava kao i pufer prilikom pripreme uzoraka za gel zimografiju (10 µl pufera na 1 mg tkiva).

3.5.2 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određena spektrofotometrijskom metodom po Lowry-ju (Lowry et al., 1951). Metoda se zasniva na merenju apsorbance svetlosti talasne dužine 750 nm od strane dva obojena kompleksa, biuretskog, koji se formira između jona bakra i azota peptidnih veza u baznoj sredini, i redukovanog fosfomolibdenskog i fosfovolframovog kompleksa.

U cilju određivanja koncentracije proteina u uzorcima pripremljeni su sledeći rastvori:

Rastvor A: 20 mg K-Na tartarata u 2 ml 0,5% CuSO₄ x 5H₂O

Rastvor B: 10 g Na₂CO₃ i 2 g NaOH u 500 ml ddH₂O

Radni reagens: 1 ml rastvora A i 49 ml rastvora B

Folinov reagens: *Folin-Chicalteau* reagens (rastvor fosfomolibdenske i fosfovolframove soli razblažen vodom u odnosu 1:2)

Uzorci prethodno izolovanih proteina su razblaživani 400 puta u ddH₂O. Od svakog razblaženog uzorka je uzimano 100 µl i dodavano 100 µl 2% SDS. Ovako dobijena smeša je snažno promešana, a zatim je u svaki uzorak dodato po 1 ml radnog reagensa. Smeša je snažno promešana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 100 µl Folinovog reagensa u svaki uzorak i snažnog mešanja, uzorci su inkubirani 20 min u mraku. Fenolne grupe aromatičnih aminokiselina (tirozin, triptofan

i cistein) su u interakciji sa Folinovim reagensom dovodile do prelaska rastvora iz oksidovanog stanja koji je bio žute boje u redukovano stanje plave boje sa maksimumom apsorpcije na 750 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Švedska). Intenzitet boje je bio proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracija proteina u uzorcima je očitavana sa standardne krive koja je konstruisana određivanjem apsorbanace rastvora albumina govečeta (BSA) poznate koncentracije. Rastvori BSA poznate koncentracije (standardi) kao i kontrolna proba (ddH₂O) su prolazili kroz istu eksperimentalnu proceduru kao i uzorci kojima je određivana koncentracija proteina. Nakon određivanja koncentracije proteina, svi uzorci su razblaženi u ddH₂O do koncentracije 4 mg/ml.

3.5.3 Razdvajanje proteina na SDS-PAGE

Da bi razdvojili proteine iz prethodno pripremljenih uzoraka, najpre je nalivan 10% gel za razdvajanje čija je koncentracija određena na osnovu molekulske mase ispitivanog proteina, a zatim je nalivan 4% gel za koncentrovanje. Komponente gela za razdvajanje i gela za koncentrovanje su prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Komponente gela za razdvajanje i koncentrovanje proteina

10% gel za razdvajanje		4% gel za koncentrovanje	
ddH ₂ O	3,96 ml	ddH ₂ O	3,05 ml
30% akrilamidna mešavina	3,33 ml	30% akrilamidna mešavina	0,665 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	100 µl	10% SDS	50 µl
10% APS	100 µl	10% APS	25 µl
TEMED	8 µl	TEMED	5 µl

Neposredno pre nalivanja, uzorci su 2 puta razblaženi *Laemmli* - SDS puferom koji je sadržao 2% SDS, 2,5% β-merkaptetanol, 63 mM Tris-HCl, 25% glicerol i 0,0025% bromfenol plavo rastvorene u ddH₂O. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 5 min u ključaloj vodi u cilju potpune denaturacije proteina, nakon čega su snažno promešani i u jednakim količinama nanošeni u bunariće. Ukupna količina proteina po bunariću bila je 70 µg. Na svaki gel je nanošen proteinski standard koji se sastojao od proteina poznatih molekulskih masa radi provere molekulske mase ispitivanog proteina (Fermentas,

Estonija). Gel sa uzorcima je preliven puferom za elektroforezu koji je sadržao 25 mM Tris, 190 mM glicin i 0,1% SDS. Proteini su razdvajani elektroforezom pri naponu od 100 V u trajanju od 30 min, a zatim je voltaža povećana na 120 V i elektroforeza je trajala dodatnih 90 min (Criterion Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD).

3.5.4 Prenos proteina sa poliakrilamidnog gela na membranu

Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče i stavljen u posudu sa puferom za transfer koji je sadržao 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% metanol i 39 mM glicin rastvorene u ddH₂O, u trajanju od 10 minuta (ekvilibracija gela). Poliviniliden difluorid membrana (PVDF; Amersham, Buckinghamshire, Engleska) je aktivirana u metanolu u trajanju od 2 min, isprana u ddH₂O i čuvana u puferu za transfer na 4°C do upotrebe. Komponente za transfer, filter papiri i sunderi, su takođe pripremljeni potapanjem u pufer za transfer. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer po sledećem redosledu: sunder, filter papir, gel, membrane, filter papir i sunder, kasetu je ubačena u uređaj za transfer (Criterion blotter, Bio-Rad), prelivena puferom za transfer, a zatim izložena dejstvu električnog polja. Gel je postavljan bliže katodi, a membrana bliže anodi, pri čemu su se negativno naelektrisani proteini kretali ka anodi kada je i dolazilo do zaustavljanja protein i njihovog vezivanja za membranu. Prenos proteina na membranu se dešavao preko noći na 4°C, pri konstantnoj jačini struje od 20 mA po gelu.

3.5.5 Imunološka detekcija proteina (Western blot) – analiza ekspresije TnC

Nakon transfera proteina, membrane su isprane u rastvoru koji je sadržao 150 mM NaCl u 50 mM Tris-HCl pH 7.5 i 0.1% *Tween-20* (TBST). Da bi se izbeglo nespecifično vezivanje antitela, membrane su blokirane u 5% BSA rastvorenom u TBST 90 min na sobnoj temperaturi. Membrane su zatim inkubirane u rastvoru sa primarnim antitelom preko noći na 4°C. Ekspresija TnC je praćena pomoću zečjeg antitela na TnC (razblaženje 1:1000, AbD Serotec, Duesseldorf, Nemačka). Mišje antitelo na β -aktin (razblaženje 1:15000, Abcam, Cambridge, Engleska) je korišćeno kao kontrola

ujednačenosti prilikom nalivanja uzoraka u bunariće. Posle četiri ispiranja po 10 min, membrane su inkubirane u rastvoru sa sekundarnim antitelom koje je konjugovano sa peroksidazom u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Korišćena su sledeća sekundarna antitela: kozje antitelo na proteine zeca ili goveđe antitelo na proteine miša (razblaženja 1:4000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemačka). Rastvori primarnih i sekundarnih antitela su pravljani u TBST. Nakon inkubacije sekundarnih antitela, membrane su isprane četiri puta po 10 min, a zatim inkubirane sa rastvorom za detekciju hemiluminiscencije ECL (Amersham). Detekcija je izvršena u mračnoj komori. Membrana je postavljena između dve providne folije i smeštena u kasetu za detekciju (Hypercassette, Amersham). Preko membrane je stavljen rentgenski film i kasetu je zatvorena. Ekspozicija filma je trajala 1 min, a zatim je film razvijan u razvijaju i fiksiran (Ilford, Marly, Švajcarska). Razvijeni filmovi su osušeni i skenirani za dalju analizu. Kvantifikacija intenziteta dobijenih traka je urađena u programu ImageJ (National Institute of Health, SAD) korišćenjem funkcije *Gel Analysis*. Eksperimenti su urađeni u četiri ponavljanja za oba ispitivana regiona. Nakon uklanjanja pozadinskog signala sa svake slike gela, određeni su intenziteti traka ispitivanog proteina za svaku eksperimentalnu grupu. Zatim je za svaki ispitivani region urađena normalizacija u odnosu na odgovarajući intenzitet trake dobijene za TnC^{+/+} ili MMP-9^{+/+} eksperimentalnu grupu koja je gajena u standardnoj sredini.

3.6 *In situ* zimografija visoke rezolucije

Priprema uzoraka i *in situ* zimografija visoke rezolucije je urađena po već opisanoj proceduri uz manje izmene (Gawlak et al., 2009).

3.6.1 Izolacija i alkoholna fiksacija tkiva

Nakon 8 nedelja izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa SS i OS, izvršena je dekapitacija. Mozak je brzo izolovan, nakon čega je mali mozak odvojen od ostatka moždanog tkiva i fiksiran u alkoholnom fiksativu koji je sadržao 70% etanol i metanol u odnosu 3:1. Fiksacija tkiva se odvijala na 4°C u trajanju od 24 h, a zatim su uzorci stavljeni na -20°C do dalje upotrebe.

3.6.2 Impregnacija voska u tkivo

U cilju očuvanja morfologije tkiva i enzimske aktivnosti, urađena je impregnacija voska u moždano tkivo po protokolu koji je detaljno opisan u Tabeli 5. Tkivo je prvo inkubirano u 90% i apsolutnom etanolu, a zatim u nekoliko uzastopnih rastvora koji su sadržali poliestarski vosak (Science Services, Munich, Nemačka) u rastućim koncentracijama i apsolutni etanol.

Tabela 5. Protokol za impregnaciju voska u tkivo

Dan	Trajanje	Temperatura (°C)	Rastvor
1	1 h	4	90% EtOH
1	1 h	4	apsolutni EtOH
2	30 min	37	apsolutni EtOH
2	3 h	37	vosak : apsolutni EtOH = 1:3
2	preko noći + 8h	37	vosak : apsolutni EtOH = 1:1
2	preko noći	37	vosak : apsolutni EtOH = 9:1
3	8 h + noć	42	100% vosak

3.6.3 Kalupljenje tkiva u vosak i priprema parafinskih blokova za sečenje

Nakon impregnacije voska u tkivo malog mozga, tkivo je dalje ukalupljeno u 100% vosak. Kalupi su prethodno pripremljeni od aluminijske folije. Pre nalivanja u kalup, vosak je istopljen na 42°C, a tkivo je pozicionirano tako da se pri sečenju uvek polazi od anteriornog dela malog mozga. Ukalupljeno tkivo je ostavljeno preko noći na 4°C, zatim je aluminijska folija odvojena od voštanih blokova koji su dalje kalupljeni u parafinske blokove koji su služili kao platforma prilikom postavljanja tkiva u držač mikrotoma. Parafinski blokovi koji su sadržali voštane blokove sa tkivom držani su na -20°C do upotrebe. Tkivo je sečeno na koronalne preseke debljine 6 µm pomoću rotacionog mikrotoma sa vodenim mlazom (RMC, Boeckeler, Nemačka). Temperatura vode je iznosila 37°C u toku sečenja tkiva. Koronolani preseki su lepljeni na staklene pločice (Superfrost Plus, Menzel Glaser, Nemačka), zatim su sušeni na sobnoj temperaturi između 1-3 h, nakon čega su držani na 4°C do dalje upotrebe.

3.6.4 Zimografija

Protokol za zimografiju *in situ* (ISZ) je detaljno opisan u Tabeli 6 i podrazumeva sledeće korake: uklanjanje voska sa tkivnih preseka, rehidraciju tkiva, preinkubaciju, reakciju ISZ i ispiranje nerazloženog substrata. Tkivni preseci su zatim ili osušeni i prekriveni pokrovnim staklima ili izloženi imunohistohemijskom protokolu u cilju praćenja kolokalizacije MMP aktivnosti sa markerima perineuronalnih mreža i sinaptičkih terminala.

Tabela 6. Protokol za zimografiju

Postupak	Trajanje	Temperatura	Rastvor
Uklanjanje voska	2 x 5 min + 10 min	37°C (inkubator)	Apsolutni EtOH
Rehidracija	3 x 3 min	37°C (inkubator)	ddH ₂ O
Preinkubacija	100 min	37°C (inkubator)	ddH ₂ O
ISZ	45 min	37°C (inkubator)	Reakcioni rastvor (videti u tekstu)
Ispiranje	3 x 5 min	Sobna temperatura	0,01 M PBS pH 7,4
Stavljanje pokrovnih stakala ili imunohistohemija			

U toku ISZ tkivni preseci su inkubirani u rastvoru koji je sadržao supstrat za MMP-2 i MMP-9, želatin sa svojstvom fluorescencije (Invitrogen, Camarillo, CA, SAD), razblaženja 1:100, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ pH 7,6 rastvorene u ddH₂O (reakcioni rastvor). Reakcija se odvijala u vlažnoj atmosferi, u mraku. Proteolitičko razlaganje supstrata je dovelo do oslobađanja zarobljenih fluorescentnih obeleživača pri čemu je intenzitet fluorescentnog signala bio direktno proporcionalan aktivnosti enzima. Kao kontrola specifičnosti reakcije, nekoliko preseka je istovremeno inkubirano u rastvoru koji je sadržao inhibitor MMP aktivnosti, 1, 10-*O*-fenantrolin u koncentraciji 50 mM (Molecular probes, Eugene, OR, SAD). Osnovni rastvor inhibitora je pripremljen u apsolutnom etanolu, dok je radni rastvor za preinkubaciju uzoraka pripremljen u ddH₂O, odnosno u reakcionom rastvoru za ISZ reakciju.

3.7 Histochemija i imunohistochemija

3.7.1 Priprema moždanog tkiva

Pre izolacije moždanog tkiva, životinjama je urađena transkardijalna perfuzija. Perfuzija podrazumeva eliminaciju krvi iz tkiva kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela. Takođe, perfuzijom se postiže brza fiksacija cele životinje, zaustavlja proces proteolize i razvoj bakterija i gljivica u tkivu. Životinjama je data intraperitonealna anestezija u vidu mešavine ketamina (50 mg/kg) i ksilazina (16 mg/kg) u 0,9% rastvoru NaCl. Po ulasku životinja u doboku anesteziju, na šta je ukazivalo odsustvo kornealnog refleksa i refleksa povlačenja zadnjih ekstremiteta, životinjama je pažljivo otvaran grudni koš kako bi se oslobodio pristup srcu. Perfuzija je rađena sa 0,01 M sonim rastvorom fosfatnog pufera (PBS) koji sadrži 8,61 g/l NaCl u dvadeset puta razblaženom 0,2 M fosfatnom puferu (PB) pH 7,4 (6,24 g/l NaH₂PO₄ i 22,72 g/l Na₂HPO₄ rastvorene u ddH₂O) i sa 4% rastvorom paraformaldehida (PFA) u dva puta razblaženom 0,2 M PB pH 7,4. Ubadanjem igle u levu komoru i presecanjem desne pretkomore omogućeno je da najpre 50 ml PBS istisne kompletnu krv iz cirkulatornog sistema, nakon čega je tkivo fiksirano sa dodatnih 50 ml 4% PFA. Po završenoj perfuziji, životinja je dekapitovana, a moždano tkivo je izolovano i dodatno fiksirano u 4% PFA 48 h na 4°C. Nakon fiksacije, urađena je dehidratacija tkiva u 30% rastvoru saharoze koji je pripremljen u dva puta razblaženom rastvoru 0,2 M PB pH 7,4 kako bi se sprečilo formiranje kristala leda u tkivu prilikom zamrzavanja mozga. Nakon spuštanja mozga na dno posude, tkivo je zamrznuto na -80°C do dalje upotrebe. Mozak je zatim isečen na koronalne preseke debljine 30 µm upotrebom kriostata (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) na temperaturi -25°C. Preseci su nanošeni na Superfrost Plus mikroskopske pločice (Manzel-Glasser, Nemačka) i čuvani na 4°C do dalje upotrebe.

3.7.2 Fluorescentno obeležavanje moždanih preseka

Za detekciju i lokalizaciju antigena u moždanim presecima korišćena je metoda indirektno imunofluorescence što podrazumeva upotrebu neobeleženog antitela koje je specifično za ispitivani antigen (primarno antitelo) za koje se zatim vezuje anti-imunoglobulinsko antitelo obeleženo fluorescentnom bojom (sekundarno antitelo). Kompleks antigen - primarno antitelo - sekundarno antitelo - fluorescentna boja fluorescira i može se posmatrati pod mikroskopom nakon ekscitacije fluorescentne boje svetlošću odgovarajuće talasne dužine. Pre fluorescentnog obeležavanja, moždani preseci su ostavljeni 10 minuta na sobnoj temperaturi da se temperiraju, a zatim su rehidratirani 3 puta po 10 min u 0,01 M PBS. Zatim je rađeno blokiranje preseka u rastvoru koji je sadržao 5% kozji ili magareći serum i 0,2% Triton X-100 rastvorene u 0,01 M PBS 45 min na sobnoj temperaturi. Vrsta seruma je birana tako da uvek bude iz iste vrste iz koje su izolovana i sekundarna antitela. Blokiranjem su sprečene nespecifične interakcije antitela sa tkivom čime je smanjena mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata. Preseci su dodatno inkubirani 15 min u rastvoru streptavidina i 15 min u rastvoru biotina (streptavidin-biotin blocking kit, Vector Laboratories) kako bi se blokirali endogeni biotin, proteini koji vezuju biotin, lektini, kao i ostale nespecifične supstance u tkivu. Između dva perioda inkubacije, preseci su isprani u 0,01 M PBS. Zatim je na preseke nanošen rastvor koji sadrži odgovarajuće primarno antitelo, 1% kozji ili magareći serum i 0,02% Triton X-100 u 0,01M PBS. Korišćena su sledeća primarna antitela:

- zečje antitelo na tenascin-C (TnC, 1:100, AbDSerotec, Nemačka)
- zečje antitelo na vezikularni transporter GABA neurotransmitera (VGAT, 1:500, Invitrogen, SAD); marker inhibitornih presinaptičkih završetaka.
- zečje antitelo na vezikularni glutamatni transporter 2 (VGlut-2, 1:1000, Sigma Aldrich, Nemačka) ili antitelo na VGlut-2 izolovano iz morskog praseta (1:500, Synaptic Systems, Goettingen, Nemačka); marker ekscitatornih presinaptičkih završetaka.
- zečje antitelo na protein koji vezuje kalcijum, kalbindin D-28K (CaBP, 1:1000, Sigma Aldrich, Nemačka); kalbindin D-28K se esprimira u ćelijskim telima,

jedrima, dendritima i aksonima Purkinje neurona malog mozga i predstavlja specifičan marker ovih ćelija u malom mozgu.

Za histochemijsko bojenje perineuronalnih mreža korišćen je biotiniziran lektin izolovan iz biljke *Wisteria floribunda* (*Wisteria floribunda* aglutinin, WFA, 1:200, 2 µg/ml, Sigma Aldrich, Nemačka) koji se vezuje za N-acetilgalaktozamske ostatke na hondroitin sulfat proteoglikanima, glavnim komponentama perineuronalnih mreža. Za bojenje neurona korišćena je *NeuroTrace* fluorescentna *Nissl* boja 640/660 (1:100, Invitrogen, Molecular Probes), koja se vezuje za Nislovu supstancu koju čine poliribozomi i granulisani endoplazmatični retikulum, a nalazi se u ćelijskim telima i dendritima neurona.

Preseci su inkubirani u rastvoru primarnih antitela i WFA preko noći na 4°C u vlažnoj atmosferi kako bi se sprečilo isparavanje rastvora i sušenje preseka. Preseci su ispirani tri puta po 10 min da bi se uklonilo primarno antitelo koje se nije vezalo, a zatim su inkubirani sa odgovarajućim fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelima razblaženim u 0,01 M PBS 2,5 h na sobnoj temperaturi u mraku i vlažnoj atmosferi. Korišćena su sledeća sekundarna antitela (sva: 1:200, Invitrogen, SAD):

- Kozje antitelo na proteine zeca, *Alexa Fluor 488*
- Kozje antitelo na proteine zeca, *Alexa Fluor 555*
- Kozje antitelo na proteine zeca, *Alexa Fluor 633*
- Magareće antitelo na proteine zeca, *Alexa Fluor 488*
- Magareće antitelo na proteine zeca, *Alexa Fluor 555*
- Magareće antitelo na proteine morskog praseta, *Alexa Fluor 647*

Za vizuelizaciju WFA korišćen je streptavidin obeležen sa *Alexa Fluor 488* (1:200, Invitrogen, SAD) ili sa *Alexa Fluor 555* (1:500, Invitrogen, SAD).

Preseci su zatim ispirani 5 puta po 5 min u 0,01 M PBS kako bi se uklonilo sekundarno antitelo koje se nije vezalo, nakon čega je nanošen medijum za održavanje fluorescencije i lepljenje pokrovnih stakala, *Mowiol* (Sigma Aldrich). Za negativnu kontrolu bojenja primarna antitela su izostavljena. U svakoj seriji imunohistochemijskog bojenja korišćeni su preseci iz svih eksperimentalnih grupa.

3.8 Konfokalna mikroskopija

Fluorescentno obeleženi presezi su snimani na LSM 510 Axioskop 2 FS mot kofokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu (Carl Zeiss, GmbH, Jena, Nemačka) uz upotrebu sledećih objektiva: A-Plan 10x/0.25, Plan-Neofluar 20x/0.5 i Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Za ekscitaciju su korišćene ekscitacione linije 488 nm argonskog lasera, kao i 543 nm i 633 nm helijum-neonskog lasera. Emisiona svetlost je razdvajana u različite kanale upotrebom NFT 545 dihroičnog ogledala koje reflektuje svetlost talasne dužine manje od 545 nm u jednu detekcionu jedinicu, a u drugu propušta svetlost većih talasnih dužina. Potpuno razdvajanje emisione svetlosti zelenog dela spektra je postignuto uskopojasnim filterom BP 505-530, crvenog dela spektra širokopropusnim filterom LP 585, a daleko crvenog dela spektra širokopropusnim filterom LP 650. Prilikom snimanja korišćena je opcija „Z-stack” (Z-stog) radi dobijanja trodimenzionalne slike posmatranog tkiva i detaljnije analize interakcije signala. Podešavanja koja utiču na intenzitet signala kao što su intenzitet lasera, debljina optičkog preseka i osetljivost detektora su održavana konstantnim tokom snimanja. Snimanje je rađeno u jednokanalnoj ili višekanalnoj konfiguraciji sa rezolucijom 2048 x 2048 piksela.

3.9 Analiza fluorescentnog signala

3.9.1 Kvantifikacija intenziteta ISZ i WFA signala

Nakon kombinovanja ISZ i histohemijskog bojenja za WFA na presecima u nivou bočnih dubokih jedara (*n. dentatus*) malog mozga dobijenih iz TnC+/+ i TnC/- miševa gajenih u SS i OS 8 nedelja, praćena je aktivnost želatinaza, MMP-2 i MMP-9, kao i zastupljenost PNM. Srednji intenzitet piksela oba signala je analiziran na konfokalnim slikama koje su dobijene pomoću objektiva Plan-Neofluar 20x/0.5. Pozadinski signal je uklonjen sa svake slike na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u beloj masi koja okružuje duboka jedra malog mozga. Analiza je urađena u osnovnom softverskom paketu konfokalnog mikroskopa LSM 510 verzija 3.2.

3.9.2 Kvantifikacija kolokalizacije ISZ i WFA signala

Analiza kolokalizacije ISZ i WFA signala je urađena na 3D snimcima koji su napravljeni na moždanim presecima u nivou *n. dentatus* TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS i OS 8 nedelja upotrebom objektiva Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Iz serije optičkih preseka debljine 0,66 μm za analizu je izabran presek sa najvećim intenzitetom WFA signala, kao i po tri preseka iznad i ispod njega. Na presecima je praćen koeficijent kolokalizacije izražen kao procenat piksela WFA signala koji kolokalizuju sa pikselima ISZ signala. Pozadinski signal je uklonjen sa svake slike na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u neobojenim delovima slike. Vrednosti koje su dobijene sa 7 optičkih preseka po snimku su usrednjene i korišćene za dalju statističku obradu. Analiza kolokalizacije je urađena u osnovnom softverskom paketu konfokalnog mikroskopa LSM 510 verzija 3.2.

3.9.3 Kvantifikacija ISZ signala u jedrima i vanćelijskom prostoru

U cilju razdvajanja vanćelijskog i unutarćelijskog ISZ signala na konfokalnim snimcima dobijenim u nivou *n. dentatus* TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS i OS 8 nedelja, urađena je dodatna analiza u ImageJ softveru. Nakon obeležavanja svih jedara na slici kao regione od interesa (ROI), praćen je intenzitet ISZ signala u jedrima ćelija. Međutim, za kvantifikaciju intenziteta vanćelijskog ISZ signala bilo je neophodno napraviti tzv. masku koja je sadržala sve prethodno obeležene ROI. Kopiranjem maske na originalnu konfokalnu sliku, unutarćelijski signal je bio isključen iz dalje analize a dobijena vrednost za srednji intenzitet ISZ signala je predstavljala ISZ signal iz vanćelijskog prostora. Pozadinski signal je uklonjen sa svake slike na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u neobojenim delovima slike. Analiza ISZ signala u citoplazmi je pokazala da je fluorescencija u ovom ćelijskom odeljku bila u nivou pozadinskog signala, tako da je on isključen iz analize prilikom uklanjanja pozadinskog signala.

3.9.4 Kvantifikacija ISZ signala unutar tela Purkinje neurona

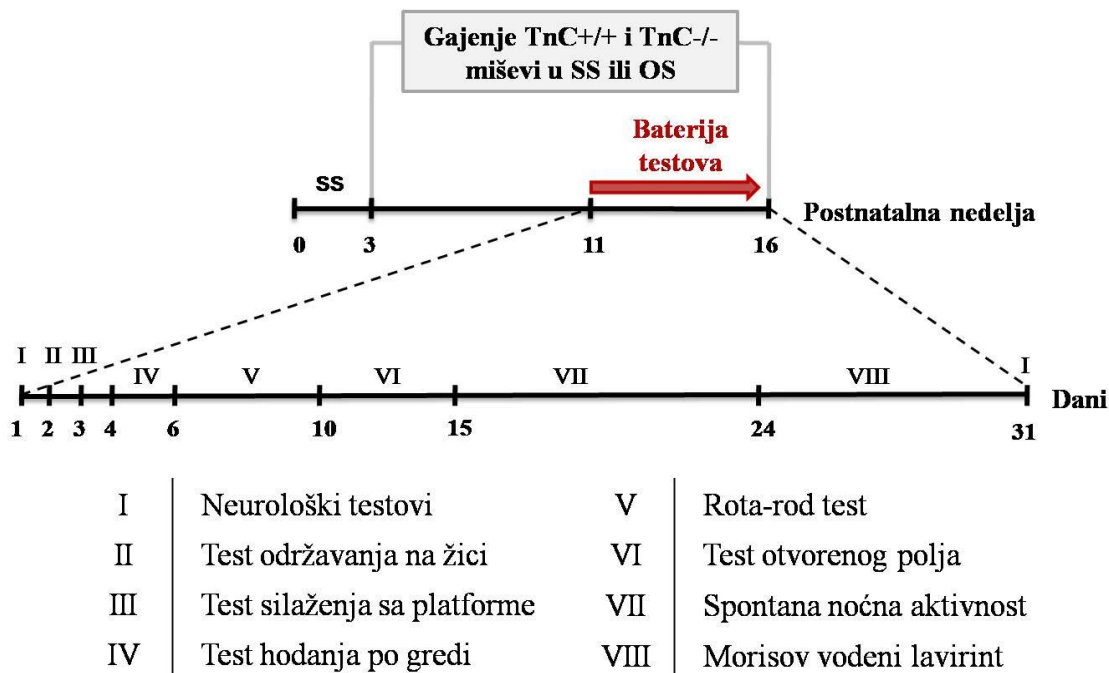
Nivo aktivnosti MMP-2 i MMP-9 unutar Purkinje neurona je praćen nakon kombinovanja ISZ i imunohistohemijskog bojenja na presecima malog mozga dobijenim iz TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS i OS 8 nedelja. Intenzitet ISZ signala je analiziran na konfokalnim slikama koje su dobijene pomoću objektiva Plan-Neofluar 20x/0.5. ISZ signal unutar CaBP-pozitivnih Purkinje neurona iz ansiformnog reznja kore malog mozga, čiji se aksoni projektuju direktno na *n. dentatus*, je označavan kao region od interesa (ROI). Nakon uklanjanja pozadinskog signala koji je određen na osnovu srednje vrednosti intenziteta piksela u molekularnom sloju kore malog mozga, praćena je srednja vrednost intenziteta piksela ISZ signala za svaku sliku. Analiza signala je urađena u osnovnom softverskom paketu konfokalnog mikroskopa LSM 510 verzija 3.2.

3.9.5 Kvantifikacija gustine i veličine presinaptičkih završetaka

Analiza gustine (broj završetaka/mm²) i veličine (μm²) presinaptičkih završetaka obeleženih sa antitelima na VGlut-2, VGAT i CaBP je rađena na konfokalnim slikama dobijenim iz moždanih preseka u nivou *n. dentatus* malog mozga TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa, kao i MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa gajenih u SS i OS 8 nedelja. Konfokalne slike su snimljene upotrebom objektiva Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Analiza je urađena u ImageJ softveru korišćenjem funkcije *Analyze particles*. Nakon uklanjanja pozadinskog signala i određivanja optimalnog opsega za veličinu i cirkularnost presinaptičkih završetaka, praćena je gustina, odnosno broj tačaka po mm² slike. Kako bi se dobila prosečna vrednost veličine presinaptičkih završetaka najpre je analizirana prosečna vrednost broja piksela po presinaptičkom završetku, nakon čega je ta vrednost pomnožena sa površinom jednog piksela izraženom u μm². Površina jednog piksela je dobijena deljenjem ukupne površine slike sa ukupnim brojem piksela koji je bio određen rezolucijom slike. Za statističku analizu kako gustine tako i veličine presinaptičkih završetaka korišćene su prosečne vrednosti dobijene na osnovu tri snimka po jedru.

3.10 Merenje ponašanja

Ponašanje TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa je praćeno nakon gajenja u SS i OS 8 nedelja. Eksperimentalni dizajn i baterija testova su prikazani na Slici 11. Nedelju dana pre početka testiranja sve životinje su prošle period habituacije na prisustvo eksperimentatora. Testiranje je raćeno u toku svetle faze (14:00 – 18:00 h), izuzev spontane noćne aktivnosti koja je praćena u periodu od 20:00 – 08:00 h. Baterija testova je uraćena na 60 životinja (15 životinja/grupi) u dve uzastopne serije. Druga serija testiranja (8 životinja/grupi) je poćela dve nedelje nakon završetka prve serije (7 životinja/grupi). U toku testiranja uvek je uzimana naizmenićno po jedna životinja iz svake eksperimentalne grupe. Mogućnost mešanja životinja iz razlićitih eksperimentalnih grupa je izbegnuta tetoviranjem odgovarajućeg broja na rep životinje. Tetoviranje je uraćeno u drugoj postnatalnoj nedelji, pre genotipizacije životinja. Telesna masa životinja je praćena jednom nedeljno u toku testiranja. Aparatura je ćišćena nakon testiranja svake životinje (Mer-Clean) kako tragovi defekacije i urina ne bi uticali na analizirane parametre.



Slika 11. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna merenja ponašanja. Na gornjoj skali se može videti da su TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševi gajeni u SS i OS u periodu između 3. i 16. nedelje starosti, dok je baterija testova uraćena u priodu između 11. i 16. postnatalne nedelje. Na donjoj skali je prikazan redosled izvođenja testova po danima. Pojedinaćni testovi su oznaćeni rimskim brojevima.

3.10.1 Neurološki testovi

U cilju ispitivanja da li životinje poseduju izvesne neurološke poremećaje koji bi mogli negativno da utiču na odgovor u ostalim testovima ponašanja, urađena je grupa neuroloških testova na početku i na kraju baterije testova (Slika 11).

Refleks spajanja zadnjih ekstremiteta: Životinja je podignuta na ~10 cm od podloge tako što je držana za središnji deo repa. Skala od 0-3 je korišćena da se proceni odgovor životinje: 0 označava normalan odgovor i maksimalno raširene zadnje ekstremitete, 1 da su zadnji ekstremiteti približeni jedan drugom, 2 da se ekstremiteti dodiruju, dok se ocena 3 dodeljuje životinjama sa teškim neurološkim poremećajima, kod kojih su zadnji ekstremiteti preklopljeni.

Vizuelni refleks: Životinja se uhvati za središnji deo repa i postepeno približava tamnoj površini (ivica stola) tako da joj ona bude u nivou njuške i očiju, ali da je ne dodiruje. Ukoliko životinja pruža prednje ekstremitete ka tamnoj površini i teži da se osloni na nju, takav odgovor je smatran kao normalan, dok u suprotnom, životinja ima oštećenje čula vida.

Geotaksija: Životinja se stavlja na stiropornu ploču dimenzija 20 x 40 cm, pri čemu se ona izdiže od podloge i postavlja pod uglom od 45°. Glava životinje treba da bude okrenuta ka podlozi. Normalan odgovor životinje je smatran ako se ona okrene i kreće ka višem kraju stiropora, odnosno suprotno od sile Zemljine teže (negativna geotaksija). Ukoliko se životinja kreće u pravcu sile Zemljine teže (pozitivna geotaksija), može se smatrati da ima određenih neuroloških oštećenja. Maksimalno vreme testiranja po životinji iznosilo je 3 min.

Refleks uspravljanja: Životinja se stavlja na žičanu mrežu, nakon čega se mreža okreće tako da životinja leđima bude okrenuta ka podlozi. Normalan odgovor životinje je da se u kratkom vremeskom periodu otkaci od žice i stane sa sva četiri ekstremiteta na čvrstu površinu stola. U slučaju da ima narušene neurološke funkcije i poremećaj rada vestibularnog sistema, životinja će imati poteškoće da izvede ovaj refleks.

3.10.2 Test održavanja na žici

Izdržljivost i mišićna snaga prednjih ekstremiteta kod životinja je testirana tako što je životinja stavljena na žičanu mrežu prikačenu za kutiju od providnog pleksiglasa dimenzija 20 x 20 cm (Paylor et al., 1998; Mocholi et al., 2011). Nakon obrtanja kutije tako da životinja visi zakačena za mrežu, praćena je latencija do pada sa žice u toku 3 min. Sve životinje su imale ukupno po tri pokušaja, pri čemu oni nisu bili uzastopni, već je naredni pokušaj započet tek nakon testiranja svih životinja iz sve četiri eksperimentalne grupe.

3.10.3 Test silaženja sa platforme

Kako bi bio ispitan stepen akrofobije kod životinja, odnosno strah od visine, životinja je u osvetljenoj prostoriji stavljena na središnji deo platforme dimenzija 10 x 8 cm koja je bila izdignuta ~6 cm od podloge (Sakic et al., 1994). Merena je latencija, odnosno vreme koje protekne do momenta kada životinja siđe sa platforme i spusti sva četiri ekstremiteta na tamnu površinu stola na kojem se nalazila platforma. Maksimalno vreme testiranja po životinji iznosilo je 5 min.

3.10.4 Test hodanja po gredi

Senzomotorna koordinacija životinja je procenjena pomoću testa hodanja po gredi (Dean et al., 1981). Test je podrazumevao da se svaka životinja prvog dana testiranja nauči da hoda po horizontalnoj gredi, dok je drugog dana rađeno testiranje. Aparatura, koja je bila postavljena na nosače tako da bude na visini ~70 cm od podloge, se sastojala od: 1) polazne platforme dimenzija 6 x 4 cm pored koje je bila postavljena svetlosna lampa, 2) grede od providnog pleksiglasa (dužina 72,5 x širina 0,8 x visina 1,2 cm) i 3) skloništa. Prvog dana životinja je imala 3 pokušaja da uđe u sklonište ali sa različitih početnih pozicija na aparaturi. Životinja je prvo stavljena na sam kraj grede tako da ima vrlo brz pristup skloništu, zatim na sredinu grede, dok je pri poslednjem pokušaju životinja stavljena na polaznu platformu koja se nalazila na suprotnom kraju grede od skloništa. S obzirom na to da je polazna platforma anksiozna sredina za

životinju zbog prisustva jakog osvetljenja, očekivano je da ona relativno brzo pređe gredu kako bi stigla do skloništa. Drugog dana testiranja, životinja je odmah stavljena na polaznu platformu pri čemu je praćena latencija do početka prelaska grede (vreme koje životinja provede na platformi dok ne krene da prelazi gredu), vreme prelaska grede, kao i broj proklizavanja prednjih i zadnjih ekstremiteta tokom prelaska grede. Svaka životinja je u toku testiranja snimana video kamerom (Panasonic, SDR-H288) tako da su svi navedeni parametri mereni na usporenom video snimku.

3.10.5 "Rota-rod" test (rotirajući cilindar)

Kako bi kod životinja bila procenjena sposobnost senzomotornog učenja (Jones i Roberts, 1968), urađen je "Rota-rod" test (Ugo Basile S.R.L., Comerio VA, Italija) u trajanju od 4 dana, pri čemu je svaka životinja imala tri pokušaja u jednom danu. Trajanje jednog pokušaja je bilo ograničeno na 5 min. Rotirajući cilindar (R=3 cm, postavljen na visini od 16 cm) se okretao konstantnom brzinom od 16 rotacija po minuti. Istovremeno je testirano 4 životinje (po jedna životinja iz svake eksperimentalne grupe). Merena je latencija do pada, odnosno vreme koje je životinja provela na rotirajućem cilindru pre pada.

3.10.6 Test otvorenog polja

Kako bi kod životinja bio ispitan nivo agorafobije (strah od otvorenog prostora), urađen je test otvorenog polja (Denenberg, 1969; Walsh i Cummins, 1976). Bez prethodne habituacije na eksperimentalne uslove, životinja je stavljena u arenu (drvena kutija sa podlogom od sivog pleksiglasa, površine 1 m² i visinine 0,5 m), nakon čega je praćena njena lokomotorna aktivnost u periodu od 20 min. U toku testiranja, eksperimentalna prostorija je bila osvetljena neonskim svetlom. Ponašanje životinja je snimano kamerom (Microsoft DV Camera and VCR), dok su u ANY-maze softveru (ANY-maze Video Tracking System software, Stoelting CO., Wood Dale, IL, SAD) praćeni sledeći parametri: ukupna pređena distanca, broj propinjanja životinje na zid arene, vreme provedeno u tigmotaksičnoj zoni (15 cm od zida arene), vreme provedeno

u mirovanju, latencija ulaska životinje u centralnu zonu (70 x 70 cm), broj ulazaka u centralnu zonu, ukupno vreme provedeno u toj zoni i pređena distanca.

3.10.7 Spontana noćna aktivnost

Bez prethodne habituacije, praćena je spontana noćna aktivnost životinja u otvorenom kavezu od belog pleksiglasa (dužina 40 x širina 25 x visina 60 cm) u periodu od 20:00-8:00 h. Na dno kaveza je posut tanak sloj piljevine, dok je u jedan ugao stavljen briket hrane, a u drugi posuda sa vodom. Istovremeno je merena spontana lokomotorna aktivnost 4 životinje u 4 različita kaveza. U svakom kavezu je bila po jedna životinja iz različite eksperimentalne grupe, a raspored životinja po kavezima je nasumično određen pre početka merenja. Eksperimentalna prostorija je bila osvetljena tamno-crvenim svetlom (~20 lx) kako bi bilo omogućeno praćenje ponašanje životinja i pravljenje video zapisa pomoću kamere (Microsoft DV Camera and VCR). Ukupna pređena distanca je analizirana u ANY-maze softveru (Stoelting CO., SAD).

3.10.8 Morisov vodeni lavirint

Morisov vodeni lavirint je test koji se radi kako bi se procenila sposobnost prostornog učenja i pamćenja kod laboratorijskih životinja (Kapadia et al., 2016). Protokol se sastojao iz 5 faza koje su bile raspoređene u toku 8 dana (Marchese et al., 2014). Svaka životinja je imala 4 pokušaja po danu, pri čemu je svaki pokušaj bio ograničen na 2 min. U toku testiranja je korišćena platforma od providnog pleksiglasa (R=15 cm), dok je kružni bazen (bele boje, R= 170 cm i dubine 50 cm) punjen čistom vodom (~23°C) do visine od 30 cm svaki dan. Eksperimentalna prostorija je posedovala različite orjentire čija pozicija nije menjana u toku testiranja. Kako bi refleksija vode bila što manja i kako bi ponašanje životinje bilo adekvatno snimljeno, prostorija je u toku testiranja bila osvetljena belim difuznim svetlom. Životinja je lagano spuštana uz unutrašnji zid bazena pri čemu su početne pozicije za 4 pokušaja određene na osnovu 4 strane sveta. Redosled početnih pozicija za svaki dan je bio nasumično određen pre početka testiranja. Nakon pronalaženja platforme, životinja je ostavljena 60s na

platformi kako bi formirala prostorne mape. Eksperimentator je navodio rukom životinju do platforme ukoliko ona sama nije mogla da je pronađe u toku 2 min.

Protokol za testiranje životinja u Morisovom vodenom lavirintu se sastojao iz sledećih faza:

- 1) Prvog dana testiranja platforma se nalazila iznad nivoa vode. Na platformu je bio postavljen objekat tamne boje kako bi bila što uočljivija. Na taj način životinji je omogućeno da nauči da se na određenom mestu u bazenu nalazi platforma na koju može da se popne, pri čemu je smanjena mogućnost da životinja provodi vreme plutajući u tigmotaksičnoj zoni što bi moglo negativno da utiče na rezultate testiranja. U toku prvog dana testa je analizirana senzomotorna sposobnost životinje, odnosno oštrina vida i sposobnost plivanja.
- 2) Naredna četiri dana platforma je bila na istom mestu, ali 0,5 cm ispod nivoa vode pri čemu je praćena sposobnost prostornog učenja i pamćenja.
- 3) Petog dana testiranja platforma je bila uklonjena iz bazena. U toku prvog pokušaja je praćeno koliko životinja provodi vremena u kvadrantu u kome se prethodnih dana nalazila platforma, kao i koju strategiju koristi za njeno pronalaženje. Ukoliko je životinja formirala prostornu mapu na osnovu različitih orijentira u prostoru, koristiće prostornu strategiju. Međutim, postoje još najmanje dve strategije koje životinja može da upotrebi: *praxis* strategija - kada životinja uči tačno određenu putanju na osnovu koje dolazi do platforme i *taxis* strategija - kada se oslanja na specifični vizuelni stimulus (platforma) koji se nalazi u njenoj neposrednoj blizini. Ako životinja koristi prvu strategiju, očekuje se da provede veći deo vremena u kvadrantu gde je nekad bila platforma, što nije slučaj sa druge dve strategije. U toku preostala tri pokušaja, praćeno je postepeno slabljenje odgovora.
- 4) Kako bi se ispitala „kognitivna fleksibilnost”, odnosno sposobnost životinje da potisne stare i formira nove prostorne mape, sedmog dana testiranja rađena su 4 reverzna pokušaja u kojima je platforma bila vidljiva, ali postavljena u suprotni kvadrant bazena.
- 5) Osmog dana testiranja platforma je takođe bila u suprotnom kvadrantu bazena, ali 0,5 cm ispod nivoa vode kako bi se pratili efekti proaktivne inhibicije,

odnosno da li prethodno naučeni odgovor otežava učenje novog odgovora i formiranje novih prostornih mapa.

Ponašanje životinja je sve vreme testiranja snimano kamerom (Axis 212 PTZ Network Camera), dok su u ANY-maze softveru (Stoelting CO., SAD) analizirani sledeći parametri: latencija nalaženja platforme, odnosno vreme koje protekne dok životinja ne pronade platformu, pređena distanca, brzina plivanja i vreme provedeno u tigmotaksičnoj zoni. U toku 6. dana testiranja je praćeno vreme koje je životinja provela u ciljnom kvadrantu.

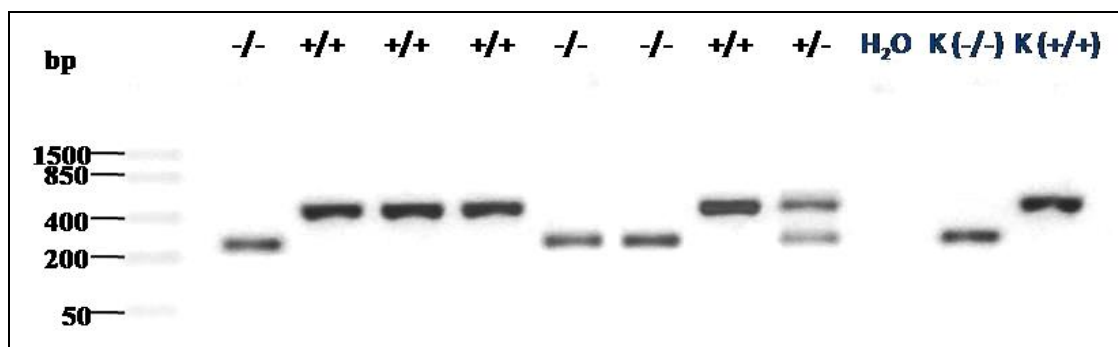
3.11 Statistička obrada podataka

Podaci su analizirani u *SigmaPlot 11* (Systat Software, Bangalore, Indija) ili *SPSS 20* (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) softveru. Pre obrade analizom varijanse, podaci su testirani na homogenost i normalnu raspodelu. Analiza varijanse (ANOVA) je korišćena za ispitivanje efekata dva nezavisna faktora, genotipa i sredine, dok su prilikom analize određenih testova ponašanja vremenski interval, pokušaj i dan predstavljali zavisne faktore varijabilnosti unutar grupe. Razlike između eksperimentalnih grupa su ispitane Holm-Sidak *post hoc* testom. Za poređenje dve grupe u slučajevima kada podaci nisu prolazili normalnu raspodelu korišćen je neparametrijski Mann-Whitney test. Pirsonovom i Spirmanovom korelacijom je ispitivan odnos između dva parametra. Kako bi se ispitalo da li telesna masa životinja utiče na latenciju do pada u testu održavanja na žici i brzinu plivanja u Morisovom vodenom lavirintu, urađena je analiza kovarijanse (ANCOVA) sa telesnom masom kao kovarijablom. Za analizu razlika između grupa u proporciji miševa koji pokazuju određeni tip ponašanja prilikom ispitivanja refleksa spajanja zadnjih ekstremiteta korišćen je λ^2 test. Podaci koji su imali vrednost $p < 0,05$ su smatrani statistički značajno različitim. Rezultati su predstavljeni grafički kao srednja vrednost \pm standardna greška. Grafički prikaz rezultata je urađen pomoću programa *SigmaPlot 11* ili *GraphPad Prism 6.01*.

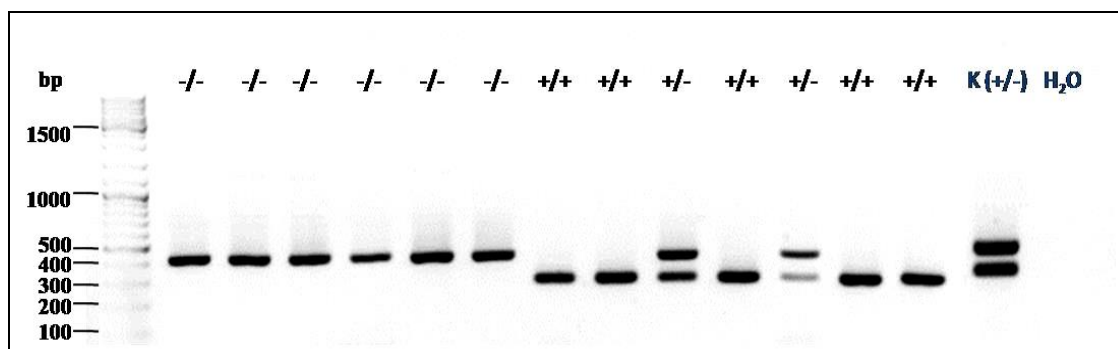
4. REZULTATI

4.1 Genotipizacija eksperimentalnih životinja

Pre započinjanja eksperimenata, genotip životinja dobijenih iz heterozigotnog ukrštanja je određen PCR metodom. Ukoliko je u genomskoj DNK prisutan mutiran gen za TnC, na gelu se detektuje traka od 225 bp, dok genomska DNK divljeg soja pokazuje traku od 461 bp. S obzirom da genomska DNK heterozigotnih jedinki poseduje oba alela, na gelu se detektuju obe trake (Slika 12). Heterozigotne jedinice nisu korišćene u eksperimentima.



Slika 12. Genotipizacija TnC^{+/+} i TnC^{-/-} životinja primenom PCR metode. Primer detektovanih traka na agaroznom gelu. Fragmenti DNK od 225 baznih parova (bp) odgovaraju homozigotnim jedinkama koje poseduju oba mutirana alela (-/-), dok fragmenti DNK od 461 bp odgovaraju homozigotnim jedinkama divljeg soja (+/+). Heterozigotna jedinka (+/-) poseduje obe trake na gelu. K (-/-) i K (+/+) - pozitivne kontrole reakcije; H₂O – kontrola PCR reakcije.

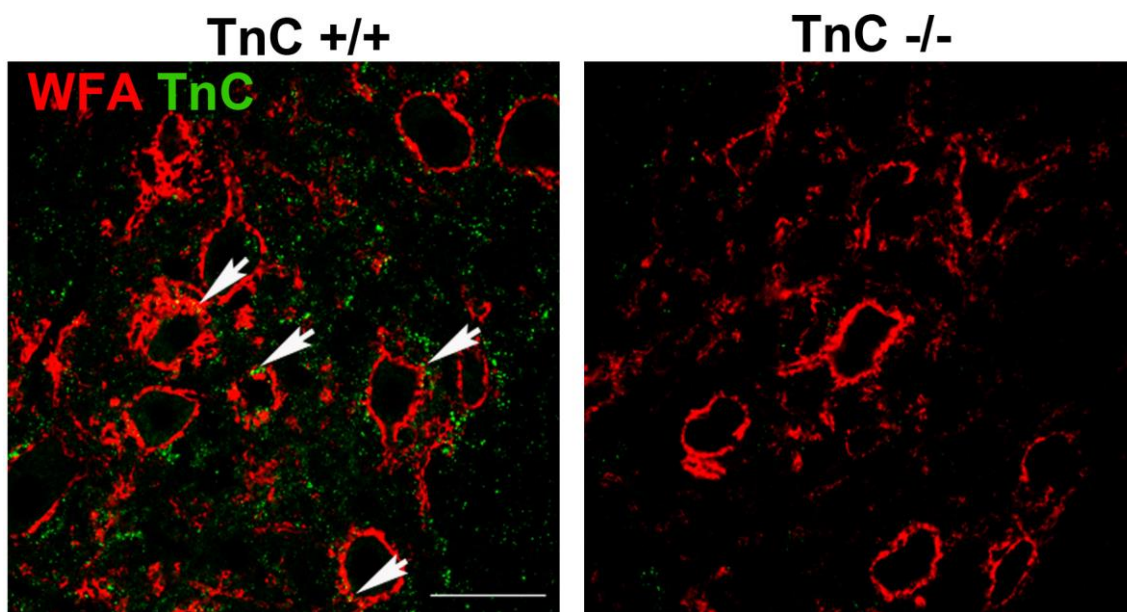


Slika 13. Genotipizacija MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} životinja primenom PCR metode. Primer detektovanih traka na agaroznom gelu. Fragmenti DNK od 450 baznih parova (bp) odgovaraju homozigotnim jedinkama koje poseduju oba mutirana alela (-/-), dok fragmenti DNK od 300 bp odgovaraju homozigotnim jedinkama divljeg soja (+/+). Heterozigotne jedinice (+/-) poseduju obe trake na gelu. K (+/-) - pozitivna kontrola reakcije; H₂O – kontrola PCR reakcije.

Ukoliko je u genomskoj DNK prisutan mutiran gen za MMP-9, na gelu se detektuje traka od 450 bp, dok genomski DNK divljeg soja pokazuje traku od 300 bp (Slika 13). Pojavljivanje obe trake na gelu ukazuje da se radi o heterozigotnoj jedinci i takve jedinke nisu korišćene u eksperimentima.

4.2 Distribucija tenascina-C u *n. dentatus*

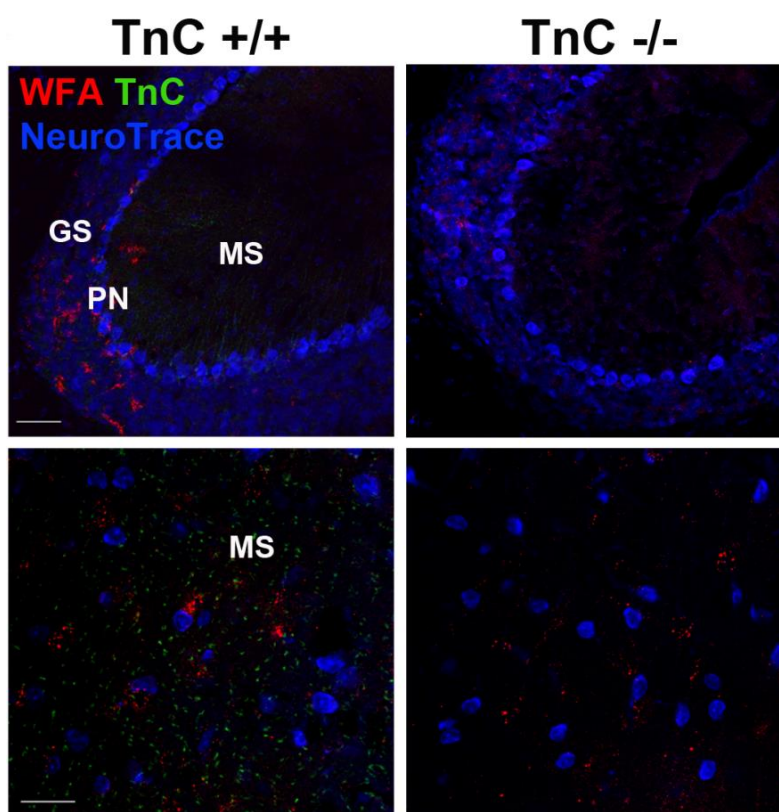
Kako bismo ispitali lokalizaciju TnC u *n. dentatus*, kao i njegovu distribuciju u odnosu na PNM, urađeno je dvostuko bojenje TnC, antitelom na TnC, i PNM, lektinom WFA. Korišćeni su moždani preseci miševa divljeg soja (TnC^{+/+}) i miševa sa nedostatkom TnC (TnC^{-/-}) kao negativna kontrola bojenja TnC. Životinje su odgajane u standardnim uslovima, a u trenutku dekapitacije bile su stare 3 meseca. Na Slici 14 se može uočiti da TnC ima uglavnom difuznu distribuciju u VCM. Međutim, belim strelicama su naznačena mesta bliskog kontakta TnC i PNM koja su takođe uočena. TnC imunoreaktivnost nije uočena kod TnC^{-/-} miševa, čime je i potvrđena specifičnost korišćenog antitela.



Slika 14. Lokalizacija TnC u *n.dentatus*. Konfokalne slike dobijene nakon fluorescentnog obeležavanja moždanih preseka 3 meseca starih TnC^{+/+} (levo) i TnC^{-/-} (desno) miševa antitelom na TnC (zeleno) i lektinom WFA (crveno), markerom PNM. Belim strelicama su naznačena mesta bliskog kontakta TnC i PNM. Kalibraciona oznaka iznosi 100 μm .

4.3 Distribucija tenascina-C u kori malog mozga

Pored distribucije TnC u *n. dentatus*, ispitana je i njegova lokalizacija u kori malog mozga. Nakon trostrukog bojenja sa antitelom na TnC, lektinom WFA i NeuroTrace bojom koja predstavlja neuronalni marker i samim tim omogućava vizuelizaciju topografije kore malog mozga, ustanovljeno je da se TnC najvećim delom nalazi u molekularnom sloju TnC^{+/+} miševa, dok su hondroitin sulfat proteoglikani, molekuli VCM obojeni lektinom WFA, uglavnom difuzno raspoređeni u granularnom i molekularnom sloju i ne formiraju kondenzovane strukture PNM (Slika 15). Imunoreaktivnost na TnC nije uočena kod TnC^{-/-} miševa čime je potvrđena specifičnost korišćenog antitela. Miševi oba genotipa su bili starosti 3 meseca i odgajani su u standardnim laboratorijskim uslovima.



Slika 15. Lokalizacija TnC u kori malog mozga. Konfokalne slike dobijene nakon fluorescentnog obeležavanja moždanih preseka 3 meseca starih TnC^{+/+} (desno) i TnC^{-/-} (levo) miševa antitelom na TnC (zeleno), lektinom WFA (crveno) i NeuroTrace bojom (plavo). Na snimcima u gornjem redu je prikazana kora malog mozga (deo ansiformnog režnja) na kojoj se mogu videti granularni sloj (GS), sloj Purkinje neurona (PN) i molekularni sloj (MS), dok je na snimcima u donjem redu prikazan samo molekularni sloj snimljen na većem uveličanju. Kalibracione oznake iznose 50 μm (gore) i 20 μm (dole).

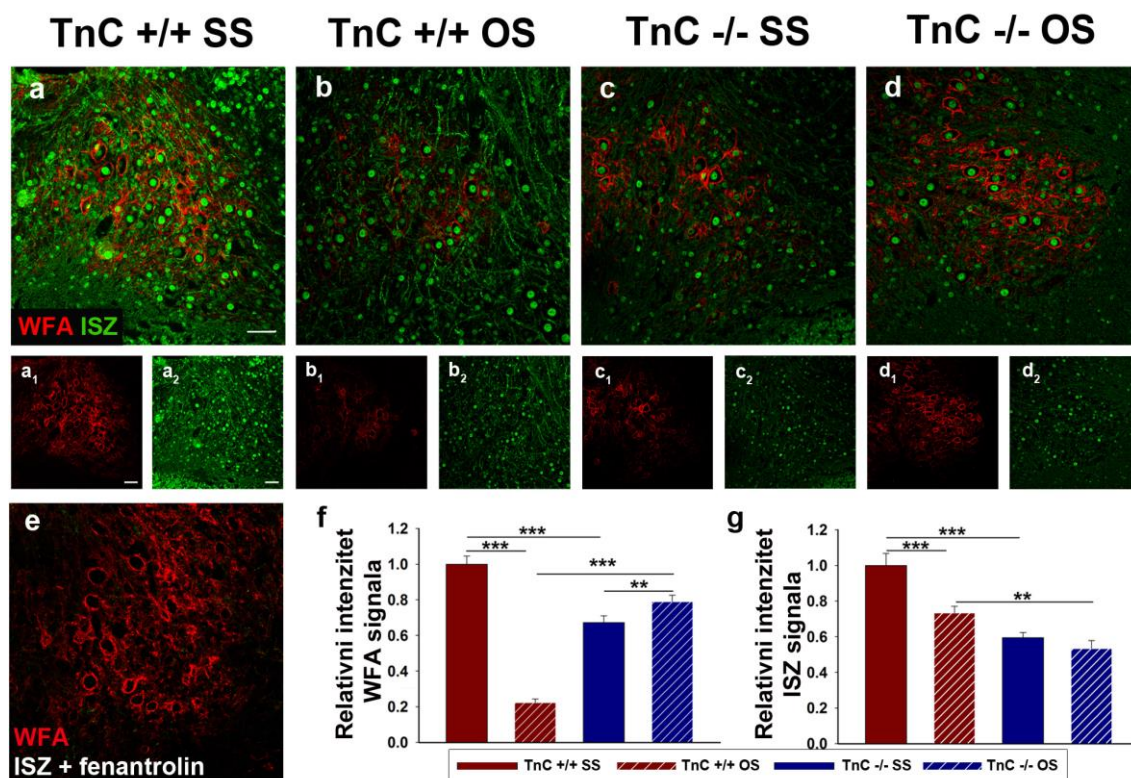
4.4 Izmenjena strukturna plastičnost u *n. dentatus* kod TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja obogaćenoj sredini 8 nedelja

Kako bismo ispitali ulogu TnC u strukturnoj plastičnosti, TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševi su izlagani obogaćenoj sredini (OS) 8 nedelja, počevši od 3. nedelje starosti (Slika 10). Kao kontrola uslova gajenja, oba genotipa su paralelno gajena i u standardnoj sredini (SS). Nakon histohemijskog bojenja sa WFA, markerom PNM, i *in situ* zimografije (ISZ) sa supstratom za MMP enzime iz podfamilije želatinaza, MMP-2 i MMP-9, urađena je kvantifikacija srednje vrednosti intenziteta oba signala. Dvofaktorskom analizom varijanse je ustanovljeno da na razvijenost PNM, kao i na aktivnost MMP-2 i MMP-9 enzima, utiču oba nezavisna faktora, genotip i sredina u kojoj su životinje odgajane, kao i njihova interakcija (Tabela 7). Prisustvo interakcije dva faktora ukazuje da efekat genotipa na intenzitet WFA ili ISZ signala zavisi od efekta sredine, i obrnuto.

Tabela 7. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za relativni intenzitet WFA i ISZ signala

	WFA		ISZ	
	<i>F</i> _{1,102}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,38}	<i>p</i>
Genotip	22,514	< 0,001	43,558	< 0,001
Sredina	74,507	< 0,001	12,616	0,001
Interakcija	185,526	< 0,001	4,989	0,031

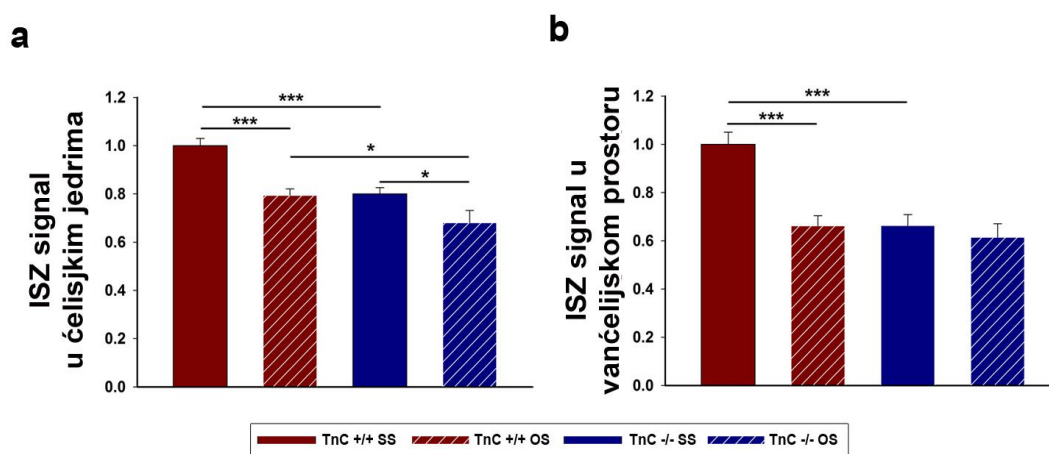
Post hoc analizom je pokazano da TnC^{-/-} miševi, odgajani u SS, imaju slabiji relativni intenzitet WFA signala u odnosu na TnC^{+/+} miševe koji su odgajani u istim uslovima (Slika 16a1,c1, f; $p < 0,001$). S druge strane, pokazano je da OS dovodi do značajnog smanjenja intenziteta WFA signala kod TnC^{+/+} miševa (Slika 16b1, f; $p < 0,001$), dok je, pak, kod TnC^{-/-} miševa uočeno povećanje ovog signala (Slika 16d1, f; $p < 0,001$). Ovi rezultati ukazuju da TnC ima važnu ulogu u remodelovanju PNM koje se javlja usled povećane plastičnosti mozga nakon izlaganja životinja OS.



Slika 16. PNM i MMP aktivnost u *n. dentatus* nakon izlaganja TnC+/+ i TnC-/- miševa SS i OS 8 nedelja. a-d₂) Konfokalne slike dobijene nakon fluorescentnog obeležavanja PNM lektinom WFA (crveno) i *in situ* zimografije (ISZ, zeleno) u kojoj je korišćen želatin sa svojstvom fluorescencije kao supstrat kako bi se pratila aktivnost MMP-2 i MMP-9 enzima preko oslobađanja fluorescencije supstrata. e) Konfokalna slika WFA – pozitivnih PNM i ISZ u prisustvu proteaznog inhibitora fenantroline. f, g) Grafici predstavljaju relativni intenzitet piksela WFA signala (n = 6 životinja/grupi, 4 preseka/životinji) i ISZ signala (n = 4 životinje/grupi, 2-3 preseka/životinji). Vrednosti su normalizovane u odnosu na srednji intenzitet TnC+/+ miševa gajenih u SS za odgovarajuće bojenje. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. Kalibracionim oznakama odgovaraju sledeće dužine a, a₁ i a₂ - 50 μm i e - 20 μm.

Na Slici 16 se može videti da je nakon ISZ aktivnost želatinaza prisutna kako u VCM, tako i unutar samih ćelija. Specifičnost ISZ reakcije je pokazana korišćenjem MMP inhibitora 1, 10 – fenantroline koji je u potpunosti inhibirao aktivnost ispitivanih enzima (Slika 16e) Ukupna aktivnost želatinaza (unutarćelijska i vanćelijska) u *n. dentatus*, izražena kroz intenzitet fluorescentnog signala nakon ISZ, najjača je kod TnC+/+ miševa koji su gajeni u SS, dok je u presotale tri eksperimentalne grupe ona znatno slabija. *Post hoc* analiza je pokazala da OS uzrokuje značajno smanjenje aktivnosti želatinaza kod TnC+/+ miševa (*p* < 0,001), ali isto tako i da TnC-/- miševi imaju smanjenu aktivnost u odnosu na TnC+/+ miševe, kako u SS (*p* < 0,001) tako i u OS (*p* = 0,003). Takođe, treba zapaziti da detaljnija analiza ISZ signala u kojoj je

razdvojen unutarćelijski (jedarni) od vanćelijskog signala nije dovela do bitne promene u odnosima intenziteta među grupama u poređenju sa analizom sveukupnog signala u *n. dentatus*, s tim što je primećeno da OS uzrokuje pad aktivnosti u jedrima kod oba genotipa, a ne samo kod TnC^{+/+} miševa, kao i da se gubi razlika u enzimskoj aktivnosti u VĆM između TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja OS (Slika 17). Slaba enzimaska aktivnost kod TnC^{-/-} miševa bez obzira na uslove u kojima su gajeni i na način analize signala, ukazuje na zavisnost MMP-2 i/ili MMP-9 aktivnosti od prisustva TnC. Takođe, odsustvo promena u intenzitetu vanćelijskog ISZ signala kod TnC^{-/-} miševa nakon OS ukazuje da bi TnC mogao biti uključen u regulaciju strukturne plastičnosti preko modulacije aktivnosti želatinaza.



Slika 17. Analiza intenziteta ISZ signala u jedrima neurona koja se nalaze u *n. dentatus*, odnosno u njihovom vanćelijskom prostoru. a, b) Grafici predstavljaju relativni intenzitet piksela ISZ signala u ćelijskim jedrima i vanćelijskom prostoru. Vrednosti su normalizovane za odgovarajuće odeljke u odnosu na srednji intenzitet TnC^{+/+} miševa gajenih u SS. Dvofaktorska ANOVA; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 4$ miša/grupi, 2-3 preseka/životinji.

4.5 Uloga tenascina-C u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti

S obzirom na potencijalnu ulogu PNM u regulaciji sinaptičke plastičnosti, kao i na uočene promene u intenzitetu WFA signala kod TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja OS 8 nedelja, ispitana je gustina i površina ekscitatornih i inhibitornih presinaptičkih završetaka.

Nakon imunofluorescentnog bojenja ekscitatornih završetaka u *n. dentatus* koji vode poreklo od mahovinastim vlakana i olivocerebelarnih aksona korišćenjem antitela na vezikularni glutamatni transporter 2, VGlut-2, urađena je kvantifikacija njihove gustine i površine. Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da pored značajnog efekta sredine, postoji i značajna interakcija genotipa i sredine na oba ispitivana parametra (Tabela 8). Daljom analizom je ustanovljeno da OS dovodi do povećanja gustine (Slika 18b; $p < 0,001$) i površine (Slika 18c; $p = 0,003$) sinaptičkih završetaka kod TnC^{+/+} miševa, dok takav efekat nije primećen kod TnC^{-/-} miševa. Naime, ekscitatorni završeci TnC^{-/-} miševa izlaganih OS su pokazali značajno manju gustinu (Slika 18b, $p = 0,013$) i površinu (Slika 18c, $p = 0,037$) u odnosu na iste završetke kod TnC^{+/+} miševa koji su izlagani istim uslovima. Ovakav rezultat ukazuje da bi TnC mogao da bude jedan od važnih molekula u sinaptogenezi ekscitatornih sinapsi koja se dešava kao posledica izlaganja životinja OS.

Gustina i površina inhibitornih presinaptičkih završetaka u *n. dentatus* koji vode poreklo od GABAergičkih aksona Purkinje neurona kao i od aksona lokalnih interneurona su takođe analizirani nakon imunofluorescentnog bojenja moždanih preseka TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa sa antitelom na vezikularni GABA transporter, VGAT (Slika 18a). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da genotip ima značajan efekat na gustinu VGAT - pozitivnih završetaka (Tabela 8). Naime, ustanovljeno je da TnC^{-/-} miševi imaju veći broj inhibitornih završetaka u odnosu na TnC^{+/+} miševa bez obzira na sredinu u kojoj su životinje gajene (Slika 18d). Izlaganje TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa OS nije dovelo do promene u gustini ovih završetaka. Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da postoji značajna interakcija genotipa i sredine kada se analizira površina inhibitornih VGAT - pozitivnih završetaka. *Post hoc* analizom je ustanovljeno da izlaganje OS dovodi do značajnog smanjenja površine ovih završetaka kod TnC^{+/+} miševa (Slika 18e; $p = 0,045$), dok kod TnC^{-/-} miševa dovodi do povećanja njihove

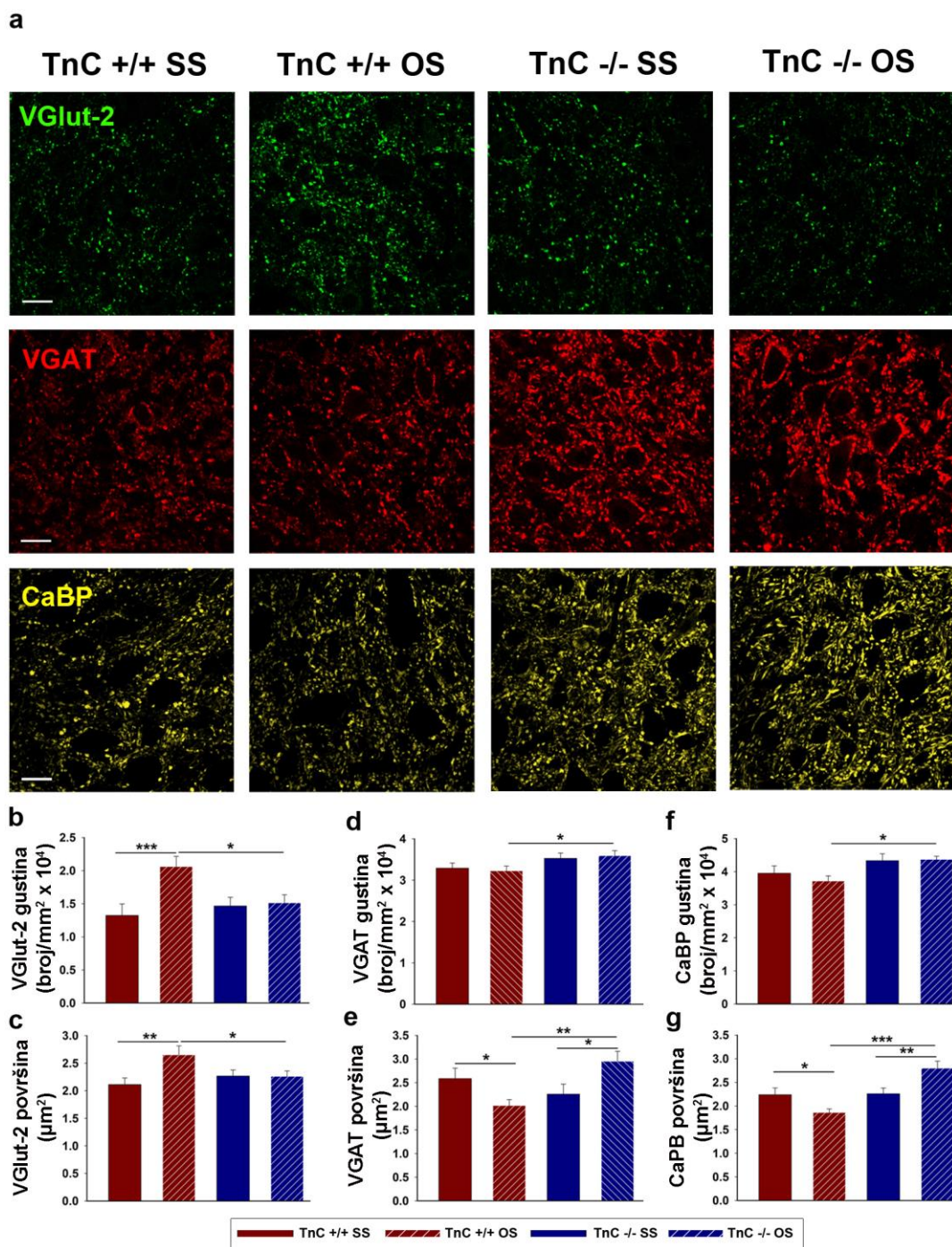
površine (Slika 18e; $p = 0,014$). Takođe je pokazano da TnC^{-/-} miševi imaju znatno veće inhibitorne završetke od TnC^{+/+} miševa nakon izlaganja oba genotipa OS (Slika 18e; $p = 0,001$).

Zatim su inhibitorni završeci imunofluorescentno obeleženi i sa antitelom na CaBP koje je specifično za Purkinje neurone ali i za njihove GABAergičke završetke koji predstavljaju glavne inhibitorne aferente u *n. dentatus*. Kao i sa VGAT bojenjem, pokazan je efekat genotipa na gustinu CaBP – pozitivnih završetaka, dok su efekti interakcije i genotipa pokazani kada je analizirana površina ovih završetaka (Tabela 8). S obzirom na podudarnost rezultata dobijenih sa dva različita markera inhibitornih presinaptičkih završetaka, VGAT i CaBP (Slika 18d, e, f, g), sa sigurnošću se može istaći važnost TnC u regulaciji promena gustine i površine inhibitornih završetaka koje nastaju kao rezultat izlaganja životinja OS, kao i da sam tretman ne utiče na promene u gustini ovih završetaka.

Tabela 8. Statistički parametri za gustinu i površinu ekscitatornih (VGlut-2) i inhibitornih (VGAT i CaBP) presinaptičkih završetaka nakon dvofaktorske analize varijanse

VGlut-2				
	Gustina		Površina	
	<i>F</i> _{1,61}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,61}	<i>p</i>
Genotip	1,868	n.z.	0,861	n.z.
Sredina	7,074	0,010	4,486	0,038
Interakcija	5,431	0,023	4,677	0,035
VGAT				
	Gustina		Površina	
	<i>F</i> _{1,44}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,44}	<i>p</i>
Genotip	6,645	0,022	2,024	n.z.
Sredina	0,00004	n.z.	0,101	n.z.
Interakcija	0,268	n.z.	10,676	0,002
CaBP				
	Gustina		Površina	
	<i>F</i> _{1,32}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,32}	<i>p</i>
Genotip	8,607	0,006	14,519	< 0,001
Sredina	0,323	n.z.	0,407	n.z.
Interakcija	0,592	n.z.	13,272	< 0,001

n.z. – nije statistički značajno



Slika 18. Promene u gustini i površini presinaptičkih završetaka u *n. dentatus* nakon izlaganja TnC+/+ i TnC-/- miševa SS i OS 8 nedelja. a) Konfokalne slike dobijene nakon imunohistochemijskog bojenja ekscitatornih sinapsi sa antitelom na VGlut-2 (zeleno) i inhibitornih sinapsi sa antitelima na VGAT (crveno) i CaBP (žuto). Grafici predstavljaju gustinu (broj završetaka/mm² x 10⁴) i površinu (µm²): b, c) VGlut-2 - pozitivnih završetaka (n = 4 životinje/grupi, 3 preseka/životinji, 2-3 slike/jedru), d, e) VGAT - pozitivnih završetaka (n = 4 životinje/grupi, 4 preseka/životinji, 2-3 slike/jedru), i f, g) CaBP - pozitivnih završetaka (n = 3 životinje/grupi, 3 preseka/životinji, 2 slike/jedru). Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. Kalibracione oznake iznose 20 µm.

4.6 Uloga želatinaza u degradaciji perineuronalnih mreža i sinaptičkoj plastičnosti

Nakon ISZ i histochemije sa WFA na moždanim presecima malog mozga TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS i OS 8 nedelja, praćena je kolokalizacija između aktivnosti želatinaza i PNM u *n. dentatus*. Na Slici 19a dat je primer 3D orto-projkcije na kojoj se jasno vidi uloga ovih proteolitičkih enzima u degradaciji mreža (žuti signal). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajan efekat genotipa, kao i interakciju genotipa i sredine na procenat piksela WFA signala koji kolokalizuju sa ISZ signalom (Tabela 9).

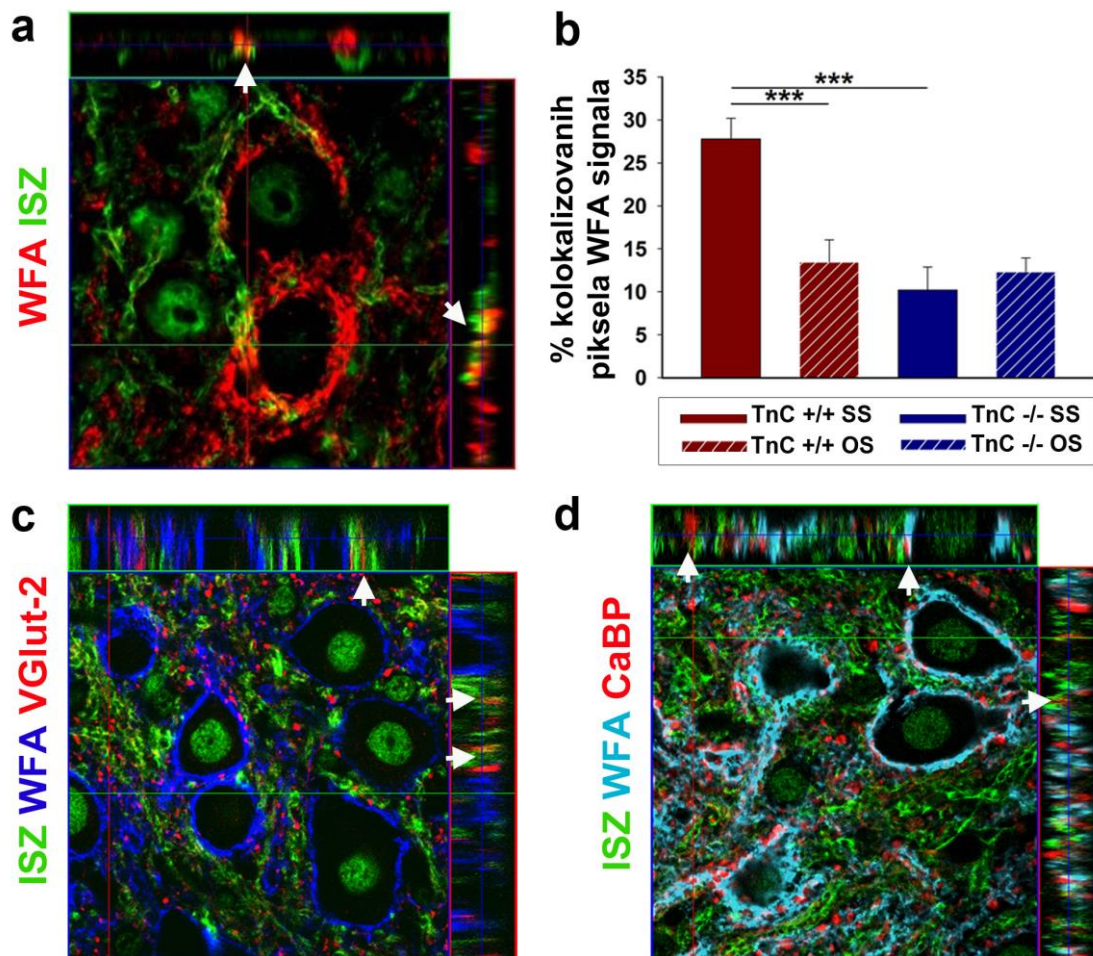
Tabela 9. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za kolokalizaciju WFA i ISZ signala

	<i>F</i> _{1,34}	<i>p</i>
Genotip	11,471	0,002
Sredina	3,947	n.z.
Interakcija	10,482	0,003

n.z. – nije statistički značajno

Najveći procenat kolokalizujućih WFA piksela je pronađen kod TnC^{+/+} miševa gajenih u SS (~30%), kod kojih je i zabeležen najjači intenzitet PNM kao i aktivnost želatinaza, dok je zastupljenost kolokalizujućih piksela opala 2-3 puta kod preostale tri eksperimentalne grupe (Slika 19b). *Post hoc* analizom je ustanovljeno značajno smanjenje kod TnC^{-/-} miševa u odnosu na TnC^{+/+} miševe koji su gajeni u SS ($p < 0,001$), kao i kod TnC^{+/+} miševa nakon izlaganja OS ($p < 0,001$).

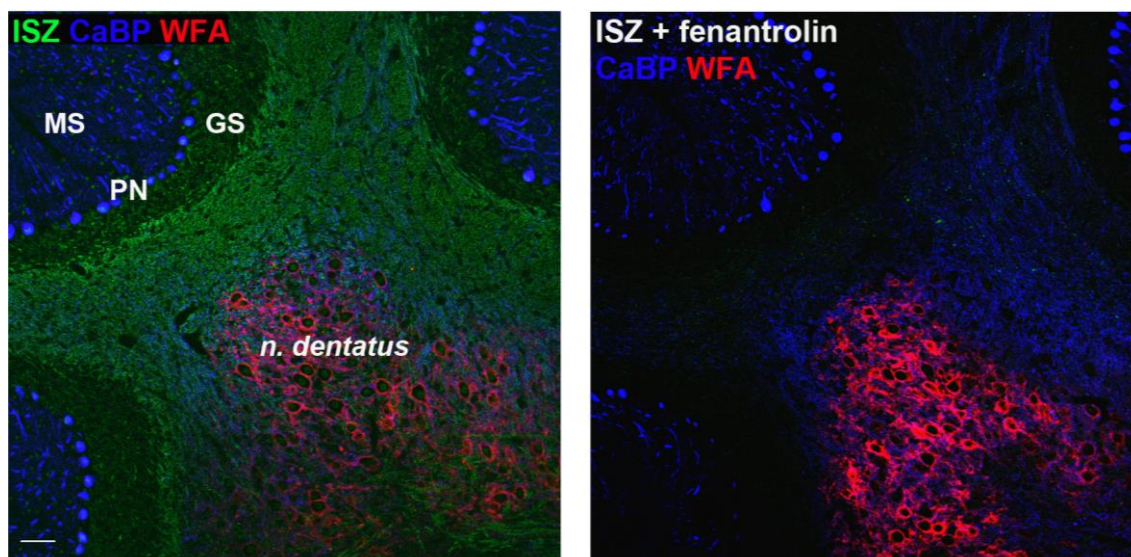
Na istim presecima je urađena ISZ zajedno sa WFA bojenjem i imunohistochemijom za presinaptičke markere, VGlut-2 ili CaBP, a zatim je na 3D snimcima analizirana distribucija želatinozne aktivnosti u odnosu na presinaptičke markere. Na Slici 19c i 19d dat je primer orto-projkcija na kojima se može uočiti aktivnost želatinaza u blizini sinaptičkih završetaka što jasno ukazuje na njihovu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti na nivou presinapse.



Slika 19. Distribucija aktivnosti želatinaza u odnosu na PNM i presinaptičke završetke u *n. dentatus* TnC+/+ miševa koji su gajeni 8 nedelja u SS. a) Konfokalni snimak sa lateralnim prikazom PNM obojenih sa WFA (crveno) i MMP aktivnosti (zeleno) nakon ISZ (orto-projeksija; vertikalna i horizontalna linija označavaju koordinate nivoa prikazanog preseka). Belim stelicama su naznačena mesta kolokalizacije (žuto). b) Grafički prikaz broja piksela WFA signala koji kolokalizuju sa pikselima ISZ signala izražen u procentima. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; *** $p < 0,001$; $n = 4$ životinje/grupi, 2-3 preseka/životinji. c, d) Konfokalni snimci sa lateralnim prikazom (orto-projeksije) PNM (WFA, tamno plavo pod c, odnosno svetlo plavo pod d), MMP aktivnosti (ISZ, zeleno, c i d) i ekscitatornih presinaptičkih završetaka (VGlu-2, crveno, c), odnosno inhibitornih presinaptičkih završetaka (CaBP, crveno, d). Belim stelicama su naznačena mesta bliskog kontakta MMP aktivnosti i presinaptičkih markera.

4.7 Aktivnost želatinaza unutar Purkinje neurona

Aksoni Purkinje neurona koji se projektuju na neurone dubokih jedara malog mozga predstavljaju glavni izvor inhibitornih signala. Na Slici 20a koja je dobijena na malom uvećanju jasno se može videti prostorni raspored CaBP – pozitivnih Purkinje neurona (plavo) iz ansiformnog režnja kore malog mozga u odnosu na neurone u *n. dentatus* koji su okruženi PNM obojenih WFA lektinom (crveno). Takođe, na Slici 20a se može uočiti i zeleni signal koji predstavlja aktivnost MMP-2 i MMP-9 enzima nakon ISZ. Na Slici 20b se vidi da je aktivnost ovih enzima značajno smanjena nakon upotrebe MMP inhibitora 1, 10 - fenantrolina, čime je potvrđena specifičnost reakcije.



Slika 20. Prostorni raspored Purkinje neurona iz ansiformnog režnja u odnosu na *n. dentatus*. ISZ (zeleno) je urađena na moždanim presecima TnC^{+/+} miševa gajenih u SS bez (levo) i sa (desno) inhibitorom fenantrolinom kako bi se ispitala specifičnost reakcije. PNM su obojene lektinom WFA (crveno) dok su tela Purkinje neurona kao i njihova dendritska stabla i aksonski završeci obojeni antitelom na CaBP (plavo). MS - molekularni sloj, PN – sloj Purkinje neurona, GS – granularni sloj. Kalibraciona oznaka iznosi 50 μ m.

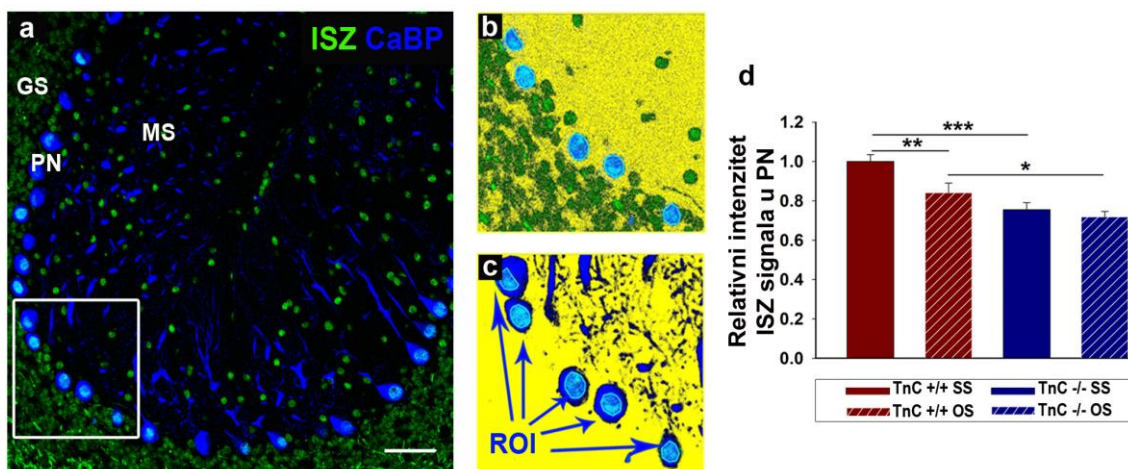
S obzirom da je pokazano da Purkinje neuroni u izvesnoj meri mogu biti uključeni u regulaciju sinteze komponenti PNM u dubokim jedrima malog mozga, analizirana je aktivnost MMP-2 i/ili MMP-9 enzima unutar Purkinje neurona TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa koji su izlagani SS i OS 8 nedelja. Nakon kvantifikacije srednje vrednosti intenziteta piksela ISZ signala unutar Purkinje neurona, dobijen je identičan

obrazac vrednosti intenziteta kao u *n. dentatus* (uporediti Slike 16g i 21d). Međutim, dvofaktorskom analizom varijanse nije pokazano postojanje interakcije genotipa i sredine, ali su pokazani značajni efekti pojedinačnih faktora (Tabela 10). *Post hoc* analizom je ustanovljeno da TnC^{-/-} miševi imaju smanjenu MMP-2 i/ili MMP-9 aktivnost u odnosu na TnC^{+/+} miševe kako u SS ($p < 0,001$) tako i u OS ($p = 0,034$). Takođe je ustanovljeno značajno smanjenje enzimske aktivnosti kod TnC^{+/+} miševa nakon izlaganja OS ($p = 0,004$).

Tabela 10. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za MMP aktivnost unutar Purkinje neurona

	$F_{1,123}$	p
Genotip	24,335	0,001
Sredina	6,790	0,010
Interakcija	2,670	n.z.

n.z. – nije statistički značajno



Slika 21. Aktivnost MMP-2 i/ili MMP-9 u telima Purkinje neurona (PN) kod TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja SS i OS 8 nedelja. a) Konfokalni snimak dela ansiformnog reznja; MMP aktivnost nakon ISZ (zeleno), dok su PN obojeni antitelom na CaBP (plavo). b, c) Primer analize ISZ signala unutar PN nakon obeležavanja regiona od interesa (ROI). Slika na kojoj su ručno oivičeni ROI (svetlo plavo) nakon uklanjanja pozadinskog signala (žuto) (b); Slika na kojoj se jasno vidi da ROI (svetlo plavo) predstavljaju ISZ signal (zeleno) unutar PN (plavo) (c). d) Grafički prikaz relativnog intenziteta ISZ signala u PN. Vrednosti su normalizovane u odnosu na srednji intenzitet TnC^{+/+} miševa gajenih u SS. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Kalibraciona oznaka iznosi 50 μm .

4.8 Perineuronalne mreže i aktivnost želatinaza nakon izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa standardnoj i obogaćenoj sredini 4 nedelje

S obzirom na izrazito smanjenje intenziteta WFA signala, kao i relativno slabu MMP aktivnost u *n. dentatus* TnC^{+/+} miševa nakon izlaganja OS 8 nedelja (Slika 16), sledeći eksperimentalni cilj je bio da se ispita vremenski sled strukturnih promena. Naime, testirana je hipoteza da se ushodna regulacija MMP-2 i/ili MMP-9 aktivnosti dešava pre nego što se završi period gajenja od 8 nedelja nakon čega dolazi do proteolitičke razgradnje PNM i pada enzimske aktivnosti. Stoga, ispitana je distribucija PNM, odnosno intenzitet WFA signala na moždanim presecima u nivou *n. dentatus*, kao i MMP-2 i MMP-9 aktivnost nakon izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa SS i OS 4 nedelje.

Nakon histohemiskog bojenja i analize srednje vrednosti intenziteta piksela WFA signala nakon gajenja životinja u SS i OS 4 nedelje (Slika 22), ustanovljeno je da se intenzitet PNM ne razlikuje između dva genotipa koji su izlagani istim uslovima, kao ni između jednog genotipa koji je izlagan različitim uslovima, što je i potvrđeno dvofaktorskom analizom varijanse. Nijedan od faktora nije imao značajan efekat na WFA intenzitet (Tabela 11). Takođe, nije pokazana ni interakcija dva faktora. Dobijeni rezultat ukazuje da se promene na nivou strukture PNM dešavaju u periodu između 4. i 8. nedelje izlaganja OS.

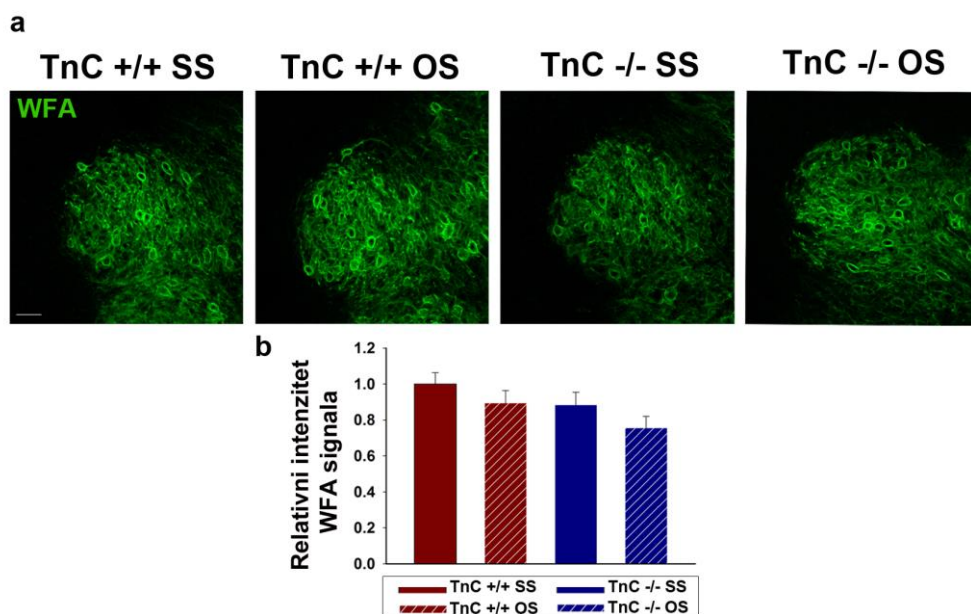
Zatim je nakon 4 nedelje izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa SS ili OS pomoću gel zimografije analizirana aktivnost MMP-2 i MMP-9 enzima. Za razliku od ISZ koja daje informacije o lokalizaciji aktivnosti ovih enzima u tkivu, gel zimografija omogućava identifikaciju ovih proteaza na osnovu njihove molekulske mase nakon gel elektroforeze. Na zimogramima se može uočiti da nakon 4 nedelje, OS uzrokuje povećanje aktivnosti MMP-9 enzima kod oba genotipa kako u dubokim jedrima malog mozga tako i u kori malog mozga (Slika 23), što je i potvrđeno dvofaktorskom analizom varijanse. U oba ispitivana regiona je pokazan značajan efekat sredine na MMP-9 aktivnost (Tabela 12 i 13). S druge strane, aktivnost MMP-2 enzima se ne menja nakon OS u oba ispitivana regiona (Slika 23, Tabela 12 i 13). Dobijeni rezultat ukazuje da bi TnC mogao biti neophodan molekul u regulaciji proteolitičke degradacije PNM od strane MMP-9 enzima, s obzirom na to da je kod oba genotipa nakon 4 nedelje

izlaganja OS pokazana povećana MMP-9 aktivnost, dok je samo kod TnC^{+/+} miševa pronađeno intenzivno smanjenje WFA signala nakon izlaganja ovih životinja 8 nedelja OS što ukazuje na degradaciju PNM.

Tabela 11. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za WFA signal nakon izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa SS i OS 4 nedelje

	$F_{1,78}$	p
Genotip	2,087	n.z.
Sredina	1,391	n.z.
Interakcija	0,897	n.z.

n.z. – nije statistički značajno



Slika 22. PNM u *n. dentatus* nakon izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa SS i OS 4 nedelje. a) Konfokalne slike dobijene nakon histohimijskog bojenja PNM sa WFA. b) Grafički prikaz relativnog intenziteta WFA signala. Vrednosti su normalizovane u odnosu na srednji intenzitet TnC^{+/+} miševa gajenih u SS. Dvofaktorska ANOVA, n = 4 životinje/grupi, 5 preseka/životinji. Kalibraciona oznaka iznosi 50 μ m.

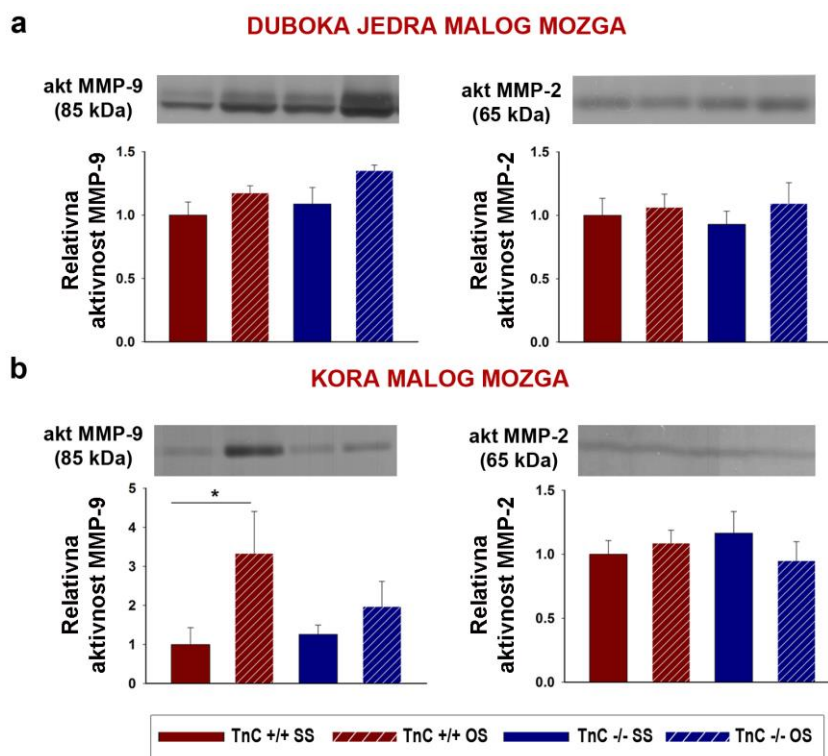
Tabela 12. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za aktivnost MMP-2 i MMP-9 enzima u dubokim jedrima malog mozga

	MMP-2		MMP-9	
	$F_{1,18}$	p	$F_{1,18}$	p
Genotip	0,007	n.z.	1,740	n.z.
Sredina	0,376	n.z.	4,816	0,042
Interakcija	0,376	n.z.	0,197	n.z.

Tabela 13. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za aktivnost MMP-2 i MMP-9 enzima u kori malog mozga

	MMP-2		MMP-9	
	$F_{1,18}$	p	$F_{1,18}$	p
Genotip	0,01	n.z.	0,119	n.z.
Sredina	0,226	n.z.	5,349	0,033
Interakcija	1,256	n.z.	1,439	n.z.

n.z. – nije statistički značajno



Slika 23. Gel zimografija aktivnosti MMP-2 i MMP-9 enzima nakon izlaganja TnC+/+ i TnC-/ miševa SS i OS 4 nedelje. a, b) Zimogram i grafici koji predstavljaju aktivnost MMP-9 (~85 kDa, levo) i MMP-2 (~65 kDa, desno) enzima u dubokim jedrima malog mozga (a) i kori malog mozga (b). Vrednosti su normalizovane u odnosu na vrednosti kod TnC+/+ miševa gajenih u SS u odgovarajućem regionu. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; * $p < 0,05$; $n = 6$ životinja/grupi/regionu izuzev kod TnC-/ miševa izlaganih OS gde je $n = 4$ životinja/grupi/regionu.

4.9 Perineuronalne mreže kod MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa nakon izlaganja standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja

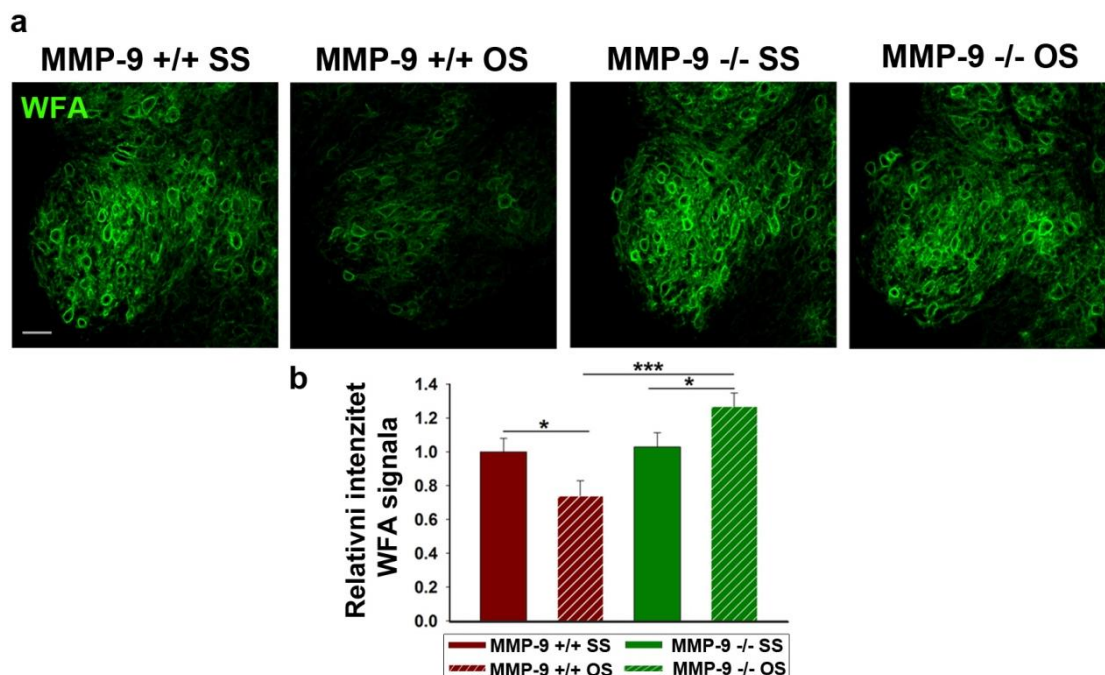
Kako bi dalje bila ispitana uloga MMP-9 enzima u degradaciji PNM, MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševi su izlagani SS i OS 8 nedelja, nakon čega su PNM u *n. dentatus* obojene lektinom WFA (Slika 24). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da genotip kao i interakcija genotipa i sredine imaju snažan efekat na srednji intenzitet piksela WFA signala (Tabela 14). Daljom analizom je ustanovljeno da u SS ne postoji razlika između MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa ($p = 0,560$). Međutim, izlaganje OS dovelo je do smanjenja intenziteta WFA signala kod MMP-9^{+/+} miševa ($p = 0,026$), dok je kod MMP-9^{-/-} ustanovljeno povećanje ($p = 0,012$). Značajna razlika je takođe pokazana i između MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa nakon izlaganja OS ($p < 0,001$).

Interesantno je zapaziti da je izlaganje OS kako TnC^{-/-} miševa, tako i MMP-9^{-/-} miševa u trajanju od 8 nedelja dovelo do sličnog efekta, odnosno do povećanja intenziteta WFA signala u *n. dentatus*, što ukazuje na važnost oba molekula u procesu razgradnje PNM koji se javlja kao posledica povećane plastičnosti mozga usled izlaganja životinja uslovima OS. Međutim, takođe treba zapaziti da je intenzitet WFA signala kod MMP-9^{-/-} miševa nakon OS jači i od intenziteta WFA signala kod MMP-9^{+/+} miševa koji su gajeni u SS, dok takav efekat nije primećen kod TnC^{-/-} miševa (uporediti sliku 16a i sliku 24a).

Tabela 14. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za WFA signal nakon izlaganja MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa SS i OS 8 nedelja

	$F_{1,55}$	p
Genotip	18,236	< 0,001
Sredina	0,0013	n.z.
Interakcija	11,834	0,001

n.z. – nije statistički značajno



Slika 24. PNM u *n. dentatus* nakon izlaganja MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa SS i OS 8 nedelja. a) Konfokalne slike dobijene nakon histoheimijskog bojenja PNM sa WFA. b) Grafički prikaz analize srednje vrednosti intenziteta piskela WFA signala. Vrednosti su normalizovane u odnosu na srednji intenzitet MMP-9^{+/+} miševa gajenih u SS. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$ životinje/grupi, 5 preseka/životinji. Kalibraciona oznaka iznosi 50 μm .

4.10 Sinaptička plastičnost kod MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa nakon izlaganja standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja

Nakon izlaganja MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa SS i OS 8 nedelja, ispitana je i uloga MMP-9 enzima u sinaptičkoj plastičnosti tako što su moždani preseci u nivou *n. dentatus* imunohistoheimijski obojeni sa antitelima na VGlut-2 i VGAT nakon čega je analizirana gustina i površina ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih završetaka (Slika 25).

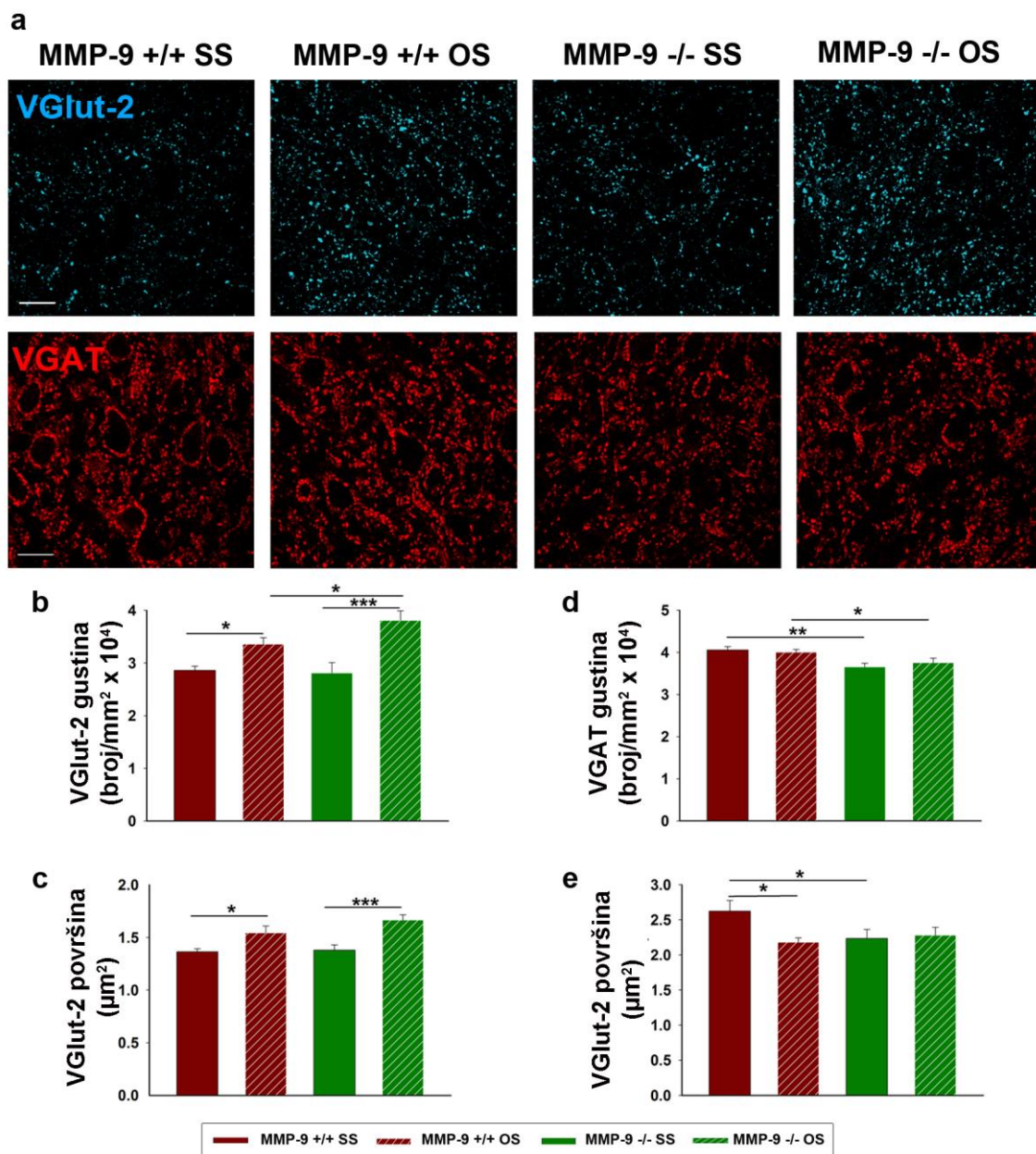
Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajan efekat sredine na oba ispitivana parametra kada su analizirani ekscitatorni VGlut-2 - pozitivni završeci (Tabela 15). Naime, izlaganje OS dovelo je do povećanja njihove gustine i površine kako kod MMP-9^{+/+} miševa (gustina: $p = 0,025$; površina: $p = 0,016$) tako i kod MMP-9^{-/-} miševa (gustina i površina: $p < 0,001$). Međutim, MMP-9^{-/-} miševi su imali značajno veću gustinu od MMP-9^{+/+} miševa ($p = 0,042$), ali ne i površinu ($p = 0,095$) nakon izlaganja OS.

Zatim je ispitano da li nedostatak MMP-9 ezima utiče na promene u gustini i površini inhibitornih VGAT - pozitivnih završetaka. Dvofaktorskom analizom varijanse je pokazano da genotip ima značajan efekat na gustinu ovih završetaka (Tabela 15), tako da je daljom *post hoc* analizom utvrđeno značajno smanjenje kod MMP-9^{-/-} miševa u odnosu na MMP-9^{+/+} miševе kako posle SS ($p = 0,002$) tako i posle OS ($p = 0,048$). Međutim, značajna interakcija genotipa i sredine je pokazana kada je analizirana površina ovih završetaka (Tabela 15). Ustanovljeno je da je kod MMP-9^{-/-} miševa u SS površina VGAT - pozitivnih završetaka smanjena u odnosu na MMP-9^{+/+} miševе koji su gajeni u istim uslovima ($p = 0,025$), dok je izlaganje OS dovelo do njenog smanjenja kod MMP-9^{+/+} miševa ($p = 0,011$), ali ne i kod MMP-9^{-/-} miševa ($p = 0,546$). Dobijeni rezultati ukazuju na važnu ulogu MMP-9 enzima u sinaptičkoj plastičnosti u *n.dentatus*, kao i da OS dovodi do različitih odgovora dva genotipa kada se analizira gustina ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih završetaka, ali ne i kada se analizira njihova površina.

Tabela 15. Statistički parametri za gustinu i površinu ekscitatornih (VGlut-2) i inhibitornih (VGAT) presinaptičkih završetaka kod MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa nakon dvofaktorske analize varijanse

VGlut-2				
	Gustina		Površina	
	<i>F</i> _{1,44}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,61}	<i>p</i>
Genotip	1,752	n.z.	1,854	n.z.
Sredina	24,182	< 0,001	21,111	< 0,001
Interakcija	2,676	n.z.	1,099	n.z.
VGAT				
	Gustina		Površina	
	<i>F</i> _{1,44}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,44}	<i>p</i>
Genotip	14,112	< 0,001	1,454	n.z.
Sredina	0,082	n.z.	2,825	n.z.
Interakcija	0,776	n.z.	4,267	0,045

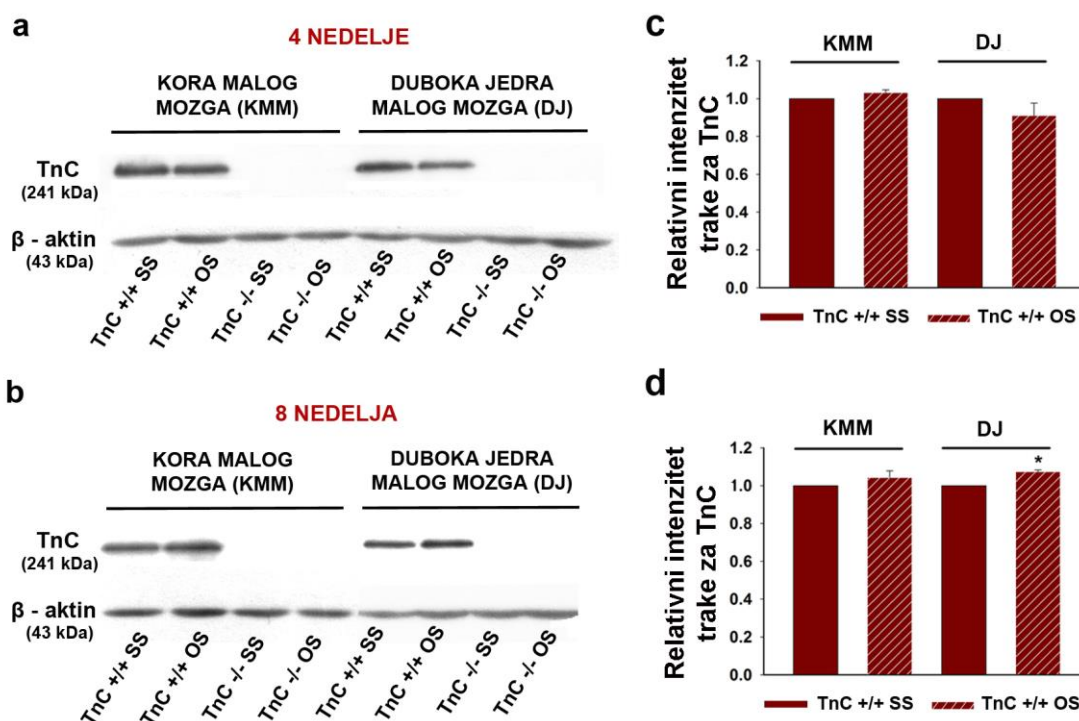
n.z. – nije statistički značajno



Slika 25. Promene u gustini i površini sinaptičkih završetaka u *n. dentatus* nakon izlaganja MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa SS i OS 8 nedelja. a) Konfokalne slike dobijene nakon imunohistohemijskog bojenja ekscitatornih sinapsi sa antitelom na VGlut-2 (plavo) i inhibitornih sinapsi sa antitelima na VGAT (crveno). b, c) Grafički prikaz gustine (broj završetaka/mm² x 10⁴) i površine (µm²) VGlut-2 - pozitivnih završetaka, odnosno d, e) VGAT - pozitivnih završetaka. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001; n = 3 životinje/grupi, 4 preseka/životinji, 2 slike/jedru. Kalibracione oznake iznose 20 µm.

4.11 Ekspresija tenascina-C nakon izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa standardnoj i obogaćenj sredini 4 i 8 nedelja

Ekspresija TnC opada sa starenjem organizama i ograničena je samo na moždane regione koji su podložni strukturnoj i funkcionalnoj plastičnosti. Kako bismo potvrdili prisustvo TnC u malom mozgu adultnih TnC^{+/+} miševa, odnosno njegovo odsustvo kod TnC^{-/-} miševa, ali i proverili da li izlaganje OS 4 i 8 nedelja menja nivo njegove ekspresije, urađena je *Western blot* analiza sa antitelom na TnC na homogenatima tkiva koja su izolovana iz kore i dubokih jedara malog mozga (Slika 26).



Slika 26. Ekspresija TnC u kori i dubokim jedrima malog mozga. a, b) *Western blot* analiza ekspresije TnC nakon izlaganja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa SS i OS 4 i 8 nedelja. Kod TnC^{+/+} miševa je uočena traka molekulske mase 241 kDa koja odgovara monomernoj formi ovog molekula, dok se ona ne uočava kod TnC^{-/-} miševa. β-aktin (43 kDa) je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka. c, d) Grafički prikazi relativnog intenziteta trake za TnC kod TnC^{+/+} miševa nakon izlaganja SS i OS 4 i 8 nedelja dobijenih denzitometrijskom analizom. Vrednosti su normalizovane u odnosu na srednji intenzitet trake TnC^{+/+} miševa gajenih u SS za odgovarajući region. Mann-Whitney U test; * $p < 0,05$; $n = 3$ životinje/grupi/regionu. Objedinjeni uzorci su analizirani u najmanje 4 nezavisna ponavljanja.

Nisu primećene promene u ekspresiji TnC u oba ispitivana regiona izolovana iz TnC+/+ miševa nakon izlaganja OS 4 nedelje (Slika 26a, c; Mann-Whitney test, $p > 0,05$). Međutim, izlaganje OS u trajanju od 8 nedelja dovelo je do povećane ekspresije TnC u dubokim jedrima (Slika 26b, d; Mann-Whitney test, $p = 0,029$), ali ne i u kori malog mozga ($p = 0,343$).

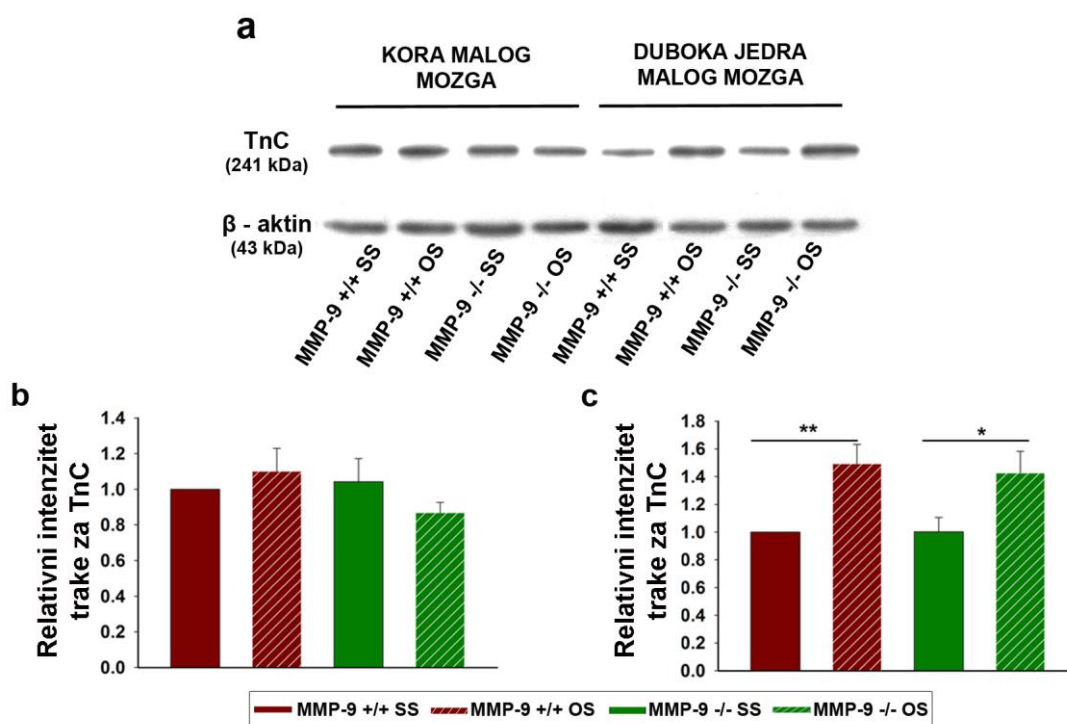
4.12 Ekspresija tenascina-C nakon izlaganja MMP-9+/+ i MMP-9-/- miševa standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja

Kako bi se ispitalo da li nedostatak MMP-9 enzima menja nivo ekspresije TnC, urađena je *Western blot* analiza na uzorcima dobijenim iz MMP-9+/+ i MMP-9-/- miševa koji su izlagani SS i OS 8 nedelja. Za razliku od kore malog mozga MMP-9+/+ i MMP-9-/- miševa gde dvofaktorskom analizom varijanse nije pokazan značajan efekat nijednog od ispitivanih faktora, u dubokim jedrima je pokazan značajan efekat sredine u kojoj su životinje gajene (Tabela 16). Daljom *post hoc* analizom je ustanovljeno da je izlaganje OS dovelo do značajnog povećanja ekspresije TnC kako kod MMP-9+/+ miševa (Slika 27c; $p = 0,009$) tako i kod MMP-9-/- miševa (Slika 27c; $p = 0,02$), ali nisu pokazane razlike između dva genotipa (Slika 27c; $p = 0,694$).

Tabela 16. Statistički parametri nakon dvofaktorske analize varijanse za ekspresiju TnC u kori i dubokim jedrima malog mozga MMP-9+/+ i MMP-9-/- miševa nakon izlaganja SS i OS 8 nedelja

	Kora malog mozga		Duboka jedra malog mozga	
	$F_{1,12}$	p	$F_{1,16}$	p
Genotip	0,975	n.z.	0,0761	n.z.
Sredina	0,141	n.z.	15,542	0,001
Interakcija	2,033	n.z.	0,0852	n.z.

n.z. – nije statistički značajno



Slika 27. Ekspresija TnC u kori i dubokim jedrima malog mozga nakon izlaganja MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa SS i OS 8 nedelja. A) *Western blot* analiza ekspresije TnC. Traka molekulske mase 241 kDa odgovara monomernoj formi TnC. β-aktin (43 kDa) je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka. b) Grafički prikaz relativnog intenziteta traka za TnC u kori malog mozga nakon denzitometrijske analize. c) Grafički prikaz relativnog intenziteta traka za TnC u dubokim jedrima malog mozga nakon denzitometrijske analize. Vrednosti su normalizovane u odnosu na srednji intenzitet trake MMP-9^{+/+} miševa gajenih u SS za odgovarajući region. Dvofaktorska ANOVA i Holm-Sidak *post hoc* test za utvrđivanje razlika između grupa; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 3$ životinje/grupi/regionu. Objedinjeni uzorci su analizirani u 4 nezavisna ponavljanja.

4.13 Merenje ponašanja TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja standardnoj i obogaćenoj sredini 8 nedelja

S obzirom na dobijene rezultate na histološkom nivou i uočenu smanjenu strukturnu plastičnost kod TnC^{-/-} miševa nakon gajenja u OS, sledeći eksperimentalni cilj je bio da se ispituju funkcionalne posledice tih promena. Naime, kako bi se ispitala uloga TnC u regulisanju različitih domena ponašanja, odnosno kako nedostatak TnC interaguje sa sredinskim faktorima prilikom oblikovanja određenog ponašajnog fenotipa, upoređeni su ponašajni profili TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa nakon gajenja oba genotipa u SS ili OS 8 nedelja (Slika 11). U studiji je korišćena baterija testova kako bi se ispitala neurološke funkcije svih životinja, senzomotorna koordinacija, eksploracija,

lokomotorna aktivnost, emocionalna reaktivnost i učenje/pamćenje. U tabeli 17 su prikazani rezultati statističke analize efekata glavnih faktora na praćene parametre ponašanja merene pomoću odgovarajućih testova.

Tabela 17. Rezultati statističke analize efekata glavnih faktora na parametare ponašanja životinja u različitim testovima

Test/Parametar	Interakcija		Genotip		Sredina	
	$F_{1,56}$	p	$F_{1,56}$	p	$F_{1,56}$	p
Telesna masa*	1,361	n.z.	0,109	n.z.	4,422	0,040
Test održavanja na žici #						
Latencija do pada sa žice	0,613	n.z.	1,718	n.z.	7,648	0,008
Test silaženja sa platforme‡						
Latencija do silaska sa platforme	3,009	n.z.	1,666	n.z.	58,692	<0,001
Test hodanja po gredi‡						
Latencija do prelaska grede	0,653	n.z.	0,817	n.z.	13,223	0,001
Vreme prelaska grede	1,647	n.z.	2,963	n.z.	4,980	0,030
Broj proklizavanja prednjih ekstremiteta	2,196	n.z.	3,904	0,053	7,381	0,009
Broj proklizavanja zadnjih ekstremiteta	1,577	n.z.	11,618	0,001	1,577	n.z.
Rota-rod test*						
Latencija do pada sa cilindra	1,293	n.z.	0,122	n.z.	7,103	0,010
Test otvorenog polja‡						
Ukupna pređena distanca	1,595	n.z.	0,266	n.z.	7,056	0,010
Broj propinjanja na zid arene	0,592	n.z.	0,651	n.z.	22,873	<0,001
Vreme provedeno u TZ	0,439	n.z.	0,636	n.z.	6,015	0,017
Vreme u mirovanju u TZ	1,737	n.z.	0,008	n.z.	19,637	<0,001
Latencija do ulaska u CZ	0,341	n.z.	0,189	n.z.	5,778	0,020
Vreme provedeno u CZ	0,441	n.z.	0,632	n.z.	6,011	0,017
Broj ulazaka u CZ	2,104	n.z.	0,084	n.z.	8,757	0,005
Pređena distanca u CZ	2,054	n.z.	0,037	n.z.	3,830	0,055
Spontana noćna aktivnost*						
Pređena distanca	9,049	0,004	8,833	0,004	19,342	<0,001

*Podaci su testirani analizom varijanse sa ponovljenim merenjima.

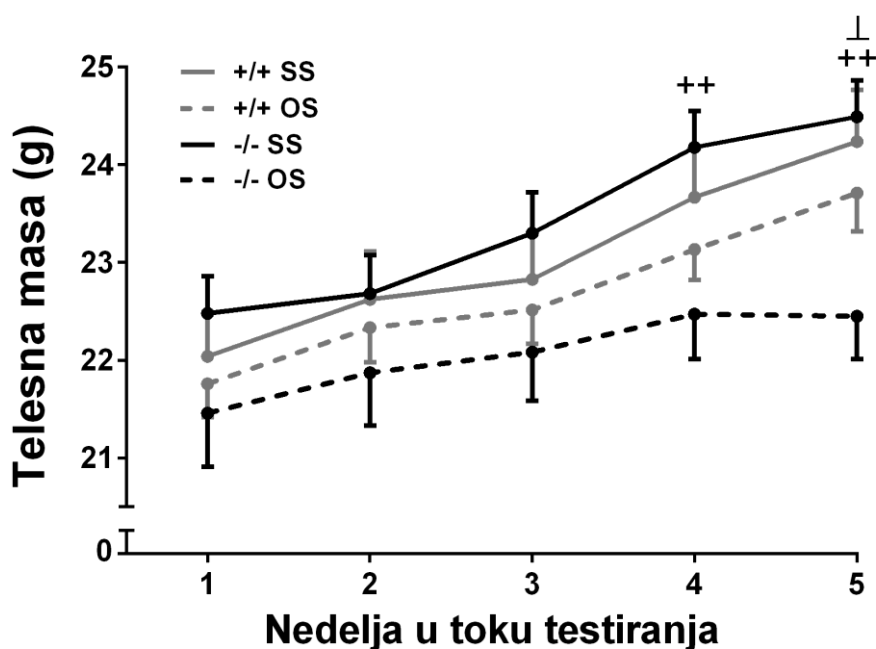
Podaci su testirani analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima u kojoj je telesna masa korišćena kao kovarijabla.

‡ Podaci su testirani analizom varijanse.

TZ - tigmotaksična zona; CZ - centralna zona; n.z. – nije statistički značajno.

4.13.1 Telesna masa

Miševi oba genotipa, bez obzira na uslove gajenja, su postepeno uvećavali svoju telesnu masu u toku 5 nedelja koliko je trajalo testiranje (Slika 28; Nedelja: $F_{4,224} = 104,213$, $p < 0,001$). Međutim, analiza varijanse sa ponovljenim merenjima je pokazala da pored faktora nedelje i faktor sredina ima značajan efekat na težinu životinja (Tabela 17), odnosno da su životinje gajene u OS bile lakše od životinja gajenih u SS. Dodatno, *post hoc* analizom je utvrđeno da je telesna masa TnC^{-/-} miševa izlaganih OS bila značajno niža od telesne mase TnC^{-/-} miševa gajenih u SS u toku poslednje dve nedelje testiranja ($p < 0,01$), kao i od telesne mase TnC^{+/+} miševa izlaganih OS u petoj nedelji testiranja ($p = 0,045$).



Slika 28. Telesna masa TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS ili OS u toku 5 nedelja koliko je trajalo izvođenje baterije testova. ++ $p < 0,01$: TnC^{-/-} SS vs. TnC^{-/-} OS; ⊥ $p < 0,05$: TnC^{+/+} OS vs. TnC^{-/-} OS, n = 15 životinja/grupi.

4.13.2 Neurološki testovi

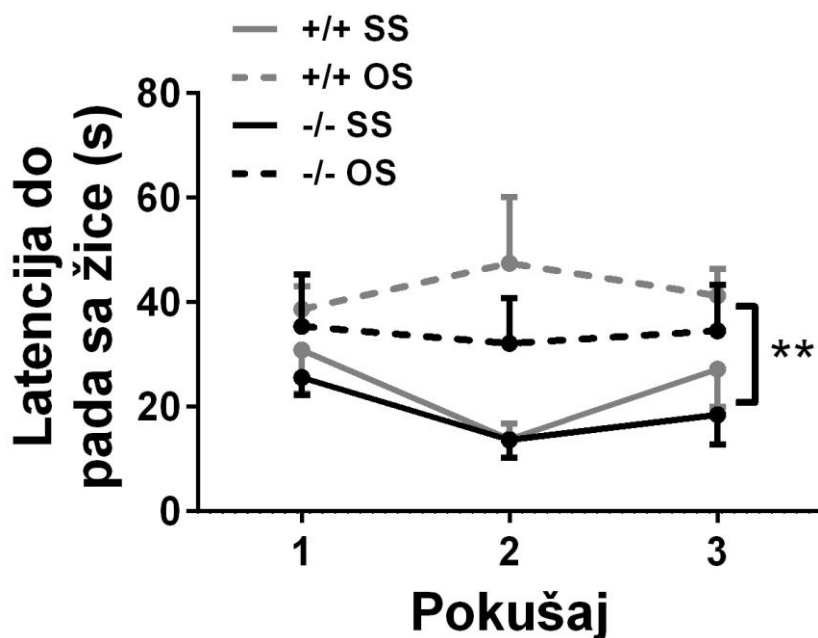
Životinje iz sve četiri eksperimentalne grupe su pokazale standardne odgovore prilikom testiranja vizuelnog refleksa, geotaksije i refleksa uspravljanja. Prilikom izvođenja refleksa spajanja zadnjih ekstremiteta primećeno je da određen broj miševa iz sve četiri grupe drži približene zadnje ekstremitete (Tabela 18), što je odgovaralo oceni 1 na skali od 0-3, međutim, nijedna životinja nije pokazala ozbiljan poremaćaj refleksa zadnjih ekstremiteta (što bi odgovaralo oceni 2 ili 3). Statistički značajne razlike između grupa nisu pronađene ni na početku ($\lambda^2 = 0,231$, n.z.) ni na kraju testiranja ($\lambda^2 = 1,8$, n.z.).

Tabela 18. Procenat miševa koji je imao približene zadnje ekstremitete prilikom izvođenja refleksa spajanja zadnjih ekstremiteta (ocena 1 na skali od 0-3) na početku i na kraju baterije testova

Grupa	+/+ SS	+/+ OS	-/- SS	-/- OS
Početak baterije testova	26,67 % (4/15)	33,33 % (5/15)	33,33 % (5/15)	33,33 % (5/15)
Završetak baterije testova	26,67 % (4/15)	26,67 % (4/15)	33,33 % (5/15)	46,67 % (7/15)

4.13.3 Test održavanja na žici

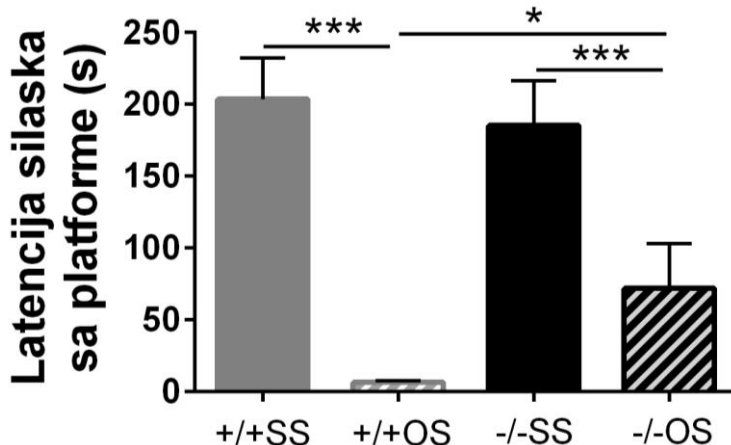
S obzirom da je pronađena značajna negativna korelacija između telesne mase i latencije u testu održavanja na žici, odnosno vremena koje životinja provede dok ne padne sa žice ($r_{60} = -0,447$, $p < 0,001$), telesna masa je uvedena u analizu kovarijanse kao dodatna nezavisna varijabla. Pokazano je da na latenciju utiče ne samo telesna masa, već i uslovi gajenja, odnosno faktor sredina (Tabela 17), kao i da je gajenje u OS doprinelo povećanju latencije kod oba genotipa (Slika 29).



Slika 29. Performanse TnC+/+ i TnC-/- miševa gajenih u SS ili OS u testu održavanja na žici. Miševi gajeni u OS su imali više latencije od miševa gajenih u SS, što ukazuje na to da OS, bez obzira na genotip, značajno pojačava izdržljivost prednjih ekstremiteta. $**p < 0,01$: SS vs. OS, $n = 15$ životinja/grupi.

4.13.4 Test silaženja sa platforme

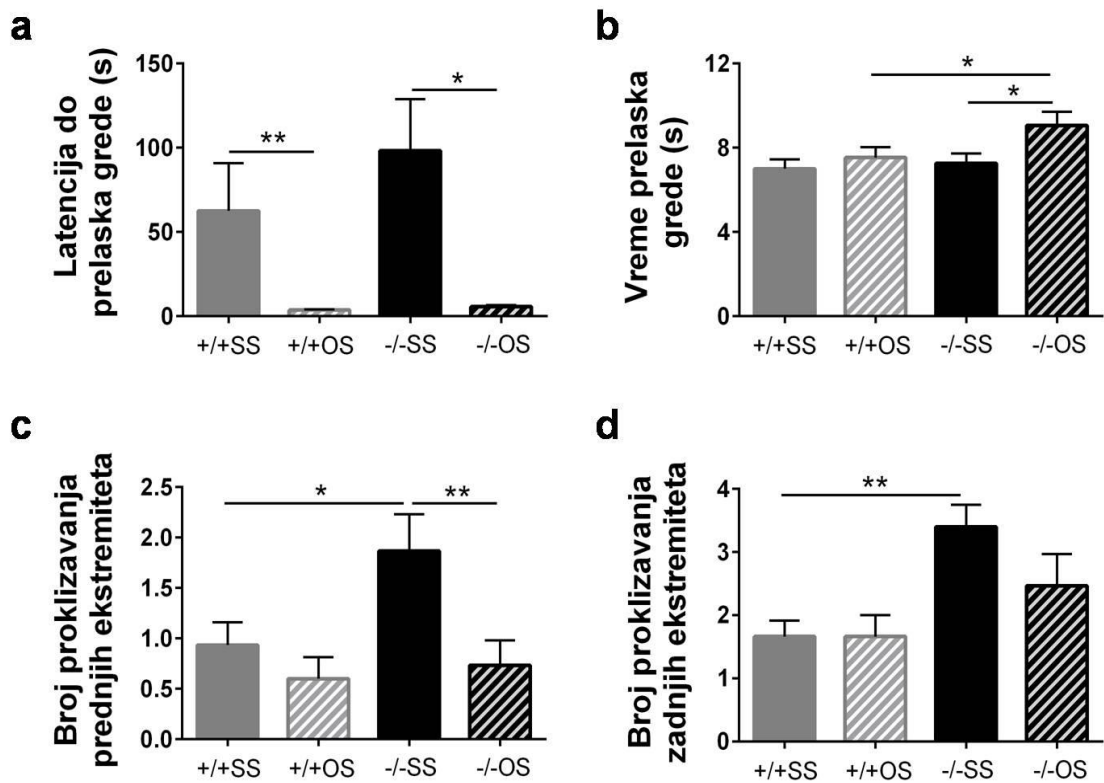
Miševi oba genotipa koji su gajeni u OS su pokazali nižu latenciju u testu silaženja sa platforme, što znači da im je trebalo manje vremena da se osmele i siđu sa izdignute platforme u osvetljenoj prostoriji (Tabela 17; Slika 30). Iako je interakcija genotipa i sredine pokazala samo statistički trend ($F_{1,56} = 3,009$, $p = 0,088$), poređenjem pojedinačnih grupa je dobijeno da TnC^{-/-} miševima iz OS treba više vremena da siđu sa platforme nego TnC^{+/+} miševima koji su izlagani istim uslovima (Slika 30; $p = 0,037$). Ovakav rezultat ukazuje da nedostatak TnC može da oslabi „anksiolitički” efekat OS u ovom testu.



Slika 30. Performanse TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS ili OS u testu silaženja sa platforme. Miševi gajeni u OS su pokazali niže latencije od miševa gajenih u SS. Međutim, primećen je slabiji uticaj OS na smanjenje straha od visine kod TnC^{-/-} miševa u odnosu na TnC^{+/+} miševa. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, $n = 15$ životinja/grupi.

4.13.5 Test hodanja po gredi

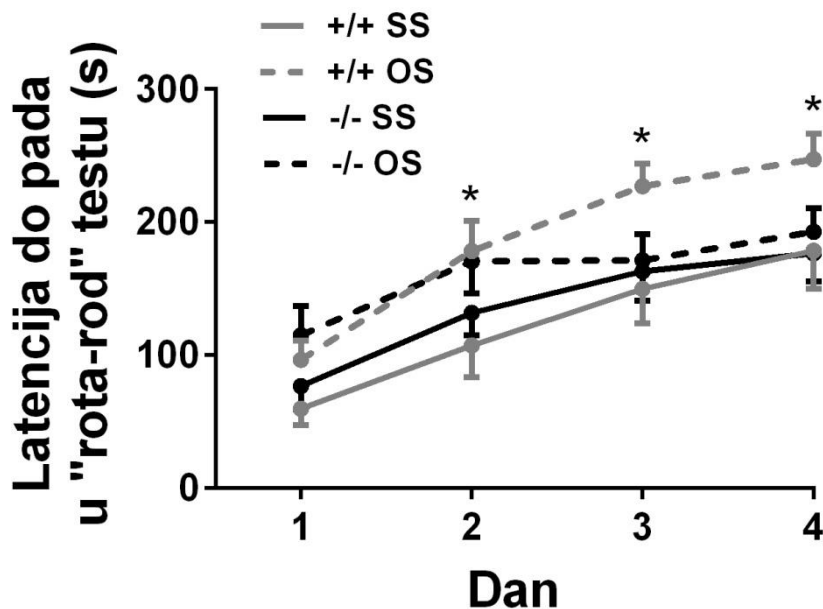
Kao i u prethodnom testu, primećeno je da miševi koji su izlagani OS ispoljavaju manje anksiozan odgovor u testu hodanja po gredi, odnosno da započinju znatno brže da prelaze izdignutu gredu u odnosu na miševe koji su gajeni u SS (Tabela 17; Slika 31a). Kada je analizirano vreme koje je potrebno miševima da pređu gredu, analiza varijanse je pokazala da faktor sredina ima uticaj i na ovaj parametar (Tabela 17). *Post hoc* analizom je ustanovljeno da su TnC^{-/-} miševi izlagani OS imali znatno duže vreme prelaska grede ne samo od TnC^{-/-} miševa izlaganih SS (Slika 31b; $p = 0,018$), već i od TnC^{+/+} miševa izlaganih OS (Slika 31b; $p = 0,043$). Dodatno, ovim testom je pokazano da TnC^{-/-} miševi iz SS imaju lošiju koordinaciju pokreta (Tabela 17; Slika 31c, d), što je bilo podržano većim brojem proklizavanja prednjih i zadnjih ekstremiteta kod ovih miševa u odnosu na TnC^{+/+} miševe gajene u istim uslovima (za prednje ekstremitete: $p = 0,018$; za zadnje ekstremitete $p = 0,002$). Iako je zabeležen značajan uticaj sredine na broj proklizavanja prednjih ekstremiteta (Tabela 17), dva genotipa nisu bila pogođena na isti način. Naime, izlaganje TnC^{-/-} miševa OS je smanjilo broj proklizavanja prednjih ekstremiteta ($p = 0,004$), dok s druge strane, OS nije imala efekat kod TnC^{+/+} miševa (Slika 31c). Nasuprot tome, značajan efekat sredine na broj proklizavanja zadnjih ekstremiteta nije zabeležen (Tabela 17, Slika 31d). Dobijeni rezultati ukazuju da OS ublažava uočene poremećaje u održavanju balansa kod TnC^{-/-} miševa tako što produžavajući vreme potrebno za prelaženje grede, ona smanjuje broj proklizavanja prednjih ekstremiteta. Međutim, koordinacija zadnjih ekstremiteta kod TnC^{-/-} miševa i dalje ostaje oslabljena. S druge strane, kako TnC^{+/+} miševi is SS ne prave veliki broj proklizavanja dok prelaze gredu, pozitivan efekat OS na taj parametar nije primećen.



Slika 31. Performanse TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS ili OS u testu hodanja po gredi. a) Miševi gajeni u OS, bez obzira na genotip, su brže započinjali da prelaze gredu od miševa gajenih u SS. Primećeni deficiti u održavanju balansa i koordinaciji pokreta kod TnC^{-/-} miševa su umanjeni u određenom stepenu gajenjem tih miševa u OS tako što je OS podužavajući vreme neophodno za prelaženje grede (b), dovela do smanjenja broja proklizavanja prednjih ekstremiteta kod tih životinja (c). d) Međutim, koordinacija zadnjih ekstremiteta je i dalje ostala oslabljena. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, $n = 15$ životinja/grupi.

4.13.6 „Rota-rod” test (rotirajući cilindar)

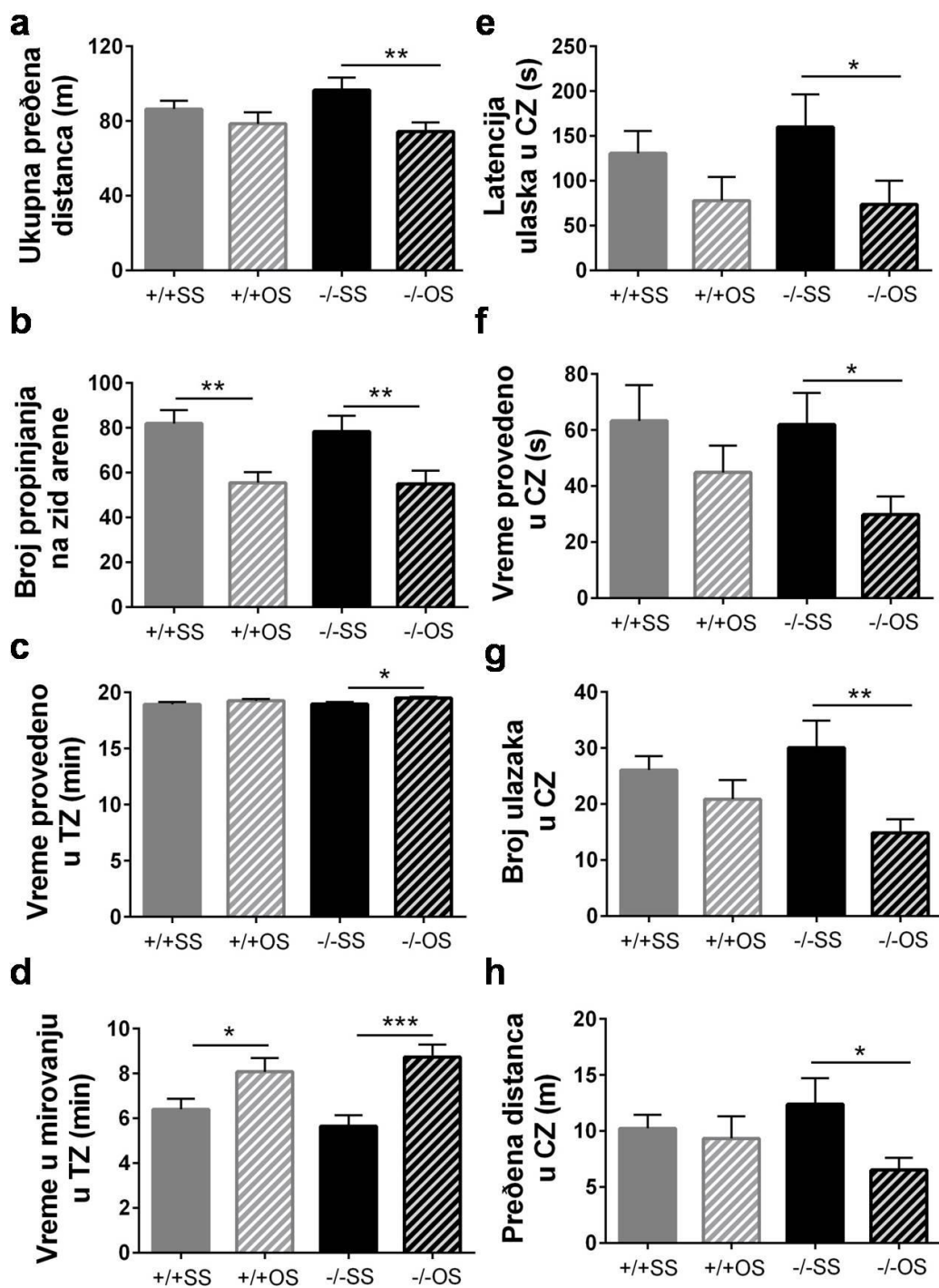
Iako su miševi iz sve četiri eksperimentalne grupe pokazivali napredak iz dana u dan (Dan: $F_{3,336} = 47,492$, $p < 0,001$), analiza varijanse sa ponovljenim merenjima je pokazala da i faktor sredina ima značajan efekat na latenciju u „rota-rod” testu (Tabela 17, Slika 32). Naime, TnC+/+ miševi koji su bili izlagani OS su značajno više vremena provodili na rotirajućem cilindru u odnosu na TnC+/+ miševe gajene u SS u toku 2, 3. i 4. dana ($p < 0,05$). Međutim, značajan efekat OS na povećanje latencije nije uočen kod TnC-/- miševa (Slika 32). Šta više, razlike između dva genotipa nakon izlaganja OS su pokazivale statistički trend 3. i 4. eksperimentalnog dana ($p = 0,071$, odnosno $p = 0,086$). Važno je napomenuti da nije pronađena značajna korelacija između telesne mase i latencije u „rota-rod” testu ($\rho_{60} = -0,062$, $p = 0,639$), čime je ustanovljeno da performanse životinja u ovom testu nisu zavisile od njihove telesne mase. Dobijeni rezultati ukazuju da TnC-/- miševi imaju sporiju dinamiku učenja senzomotornih radnji od TnC+/+ miševa, što se uočava tek nakon gajenja životinja u OS.



Slika 32. Performanse TnC+/+ i TnC-/- miševa gajenih u SS ili OS u „rota-rod” testu. Gajenje TnC+/+ miševa u OS je značajno poboljšalo njihovo senzomotorno učenje. S druge strane, ovakav efekat OS nije uočen kod TnC-/- miševa. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost 3 merenja za svakog miša po danu ($n = 15$ životinja/grupi). * $p < 0,05$: TnC+/+ SS vs. TnC+/+ OS.

4.13.7 Test otvorenog polja

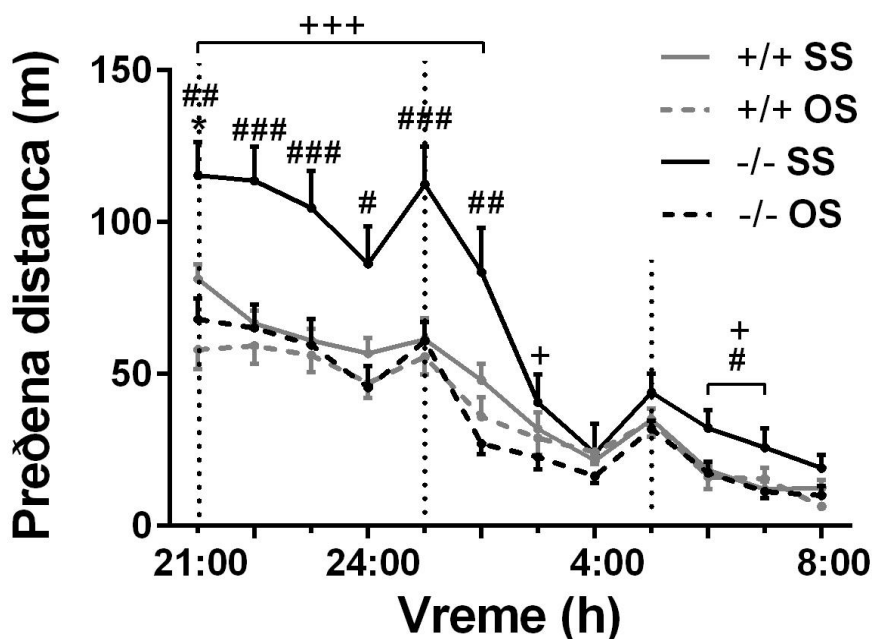
Dvofaktorskom analizom varijanse je dobijeno da faktor sredina ima bitan uticaj na sve analizirane parametre u testu otvorenog polja (Tabela 17). Naime, miševi koji su izlagani OS, bez obzira na genotip, su pokazali smanjen eksploratorni nagon, što je bilo praćeno malim pređenim distancama, smanjenim brojem propinjanja, kao i povećanom količinom vremena koje su provodili u mirovanju uglavnom na periferiji arene u tigmotaksičnoj zoni (TZ) (Slika 33a-d). Miševi gajeni u OS, iako su imali nižu latenciju ulaska u centralnu zonu (CZ) od miševa gajenih u SS, pokazivali su kraće zadržavanje i smanjen broj ulazaka u CZ, kao i prelazak kraćih distanci u toj zoni (Slika 33e-h). Poređenje između grupa je pokazalo prisustvo značajnih razlika uglavnom između TnC $-/-$ miševa koji su bili izlagani različitim sredinama, što je ukazalo na jači efekat OS na taj genotip.



Slika 33. Performanse TnC+/+ i TnC-/- miševa gajenih u SS ili OS u testu otvorenog polja. a) Ukupna pređena distanca, b) broj propinjanja na zid arene, c) vreme provedeno u tigmotaksičnoj zoni (TZ), d) vreme provedeno u mirovanju u TZ, e) latencija ulaska u CZ, f) vreme provedeno u CZ, g) broj ulazaka u CZ i h) pređena distanca u CZ. Faktor sredina je imao značajan efekat na sve ispitivane parametre. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 15$ životinja/grupi.

4.13.8 Spontana noćna aktivnost

Spontana noćna aktivnost životinja je praćena na osnovu pređene distance u toku 12 sati, sa početkom u 20:00 h. Kao što se može videti na Slici 34, kod životinja oba genotipa, bez obzira na uslove gajenja, ritam noćne aktivnosti je imao isti obrazac: najveća lokomotorna aktivnost zabeležena je 1 h nakon početka testa, zatim 1 h nakon ponoći, kao i u 5:00 h ujutru.



Slika 34. Spontana noćna aktivnost TnC+/+ i TnC-/- miševa gajenih u SS ili OS, prikazana na osnovu parametra pređene distance. Svaka tačka na grafiku predstavlja spontanu aktivnost u toku 1 sata u periodu od 20:00 – 8:00 h. TnC-/- miševi gajeni u SS su pokazali povećanu lokomotornu aktivnost u toku testiranja. Međutim, gajenje TnC-/- miševa u OS je smanjilo hiperlokomociju do nivoa lokomocije TnC+/+ životinja. Razlika u nivou aktivnosti nije zabeležena između TnC+/+ miševa gajenih u dve sredine, osim u prvom satu testiranja kada je primećeno da životinje iz OS prelaze kraće distance. *, +, # $p < 0.05$; ### $p < 0.01$; +++, ### $p < 0.001$; *: TnC+/+ SS vs. TnC+/+ OS, +: TnC-/- SS vs. TnC-/- OS, #: TnC+/+ SS vs. TnC-/- SS, i ±: TnC+/+ OS vs. TnC-/- OS.

Amplituda noćne aktivnosti TnC-/- miševa gajenih u SS je bila izrazito viša od amplituda preostale tri grupe, ukazujući na povećan eksploratorni nagon kod ovih životinja (Slika 34). Međutim, gajenje u OS dovelo je do smanjenja lokomotorne aktivnosti kod TnC-/- miševa do nivoa koji je zabeležen kod TnC+/+ miševa bez obzira na uslove gajenja. Analiza varijanse sa ponovljenim merenjima pokazala je da pored

značajnog uticaja genotipa i sredine na pređenu distancu, postoji i značajna interakcija dva faktora (Tabela 17). Takođe, primećeno je da miševi gajeni u OS pokazuju bržu habituaciju u prvih sat vremena testiranja od miševa gajenih u SS, što se ogledalo u prelaženju kraćih distanci (Sredina: $F_{1,56} = 7,770$, $p = 0,007$; Slika 34) i provođenju više vremena u mirovanju (Sredina: $F_{1,56} = 6,208$, $p < 0,001$, podaci nisu prikazani).

4.13.9 Morisov vodeni lavirint

Bez obzira na genotip, miševi gajeni u OS su prvog dana testiranja u Morisovom vodenom lavirintu pokazali značajno bolje opažanje i vizuo-motorno navođenje ka vidljivoj platformi od miševa gajenih u SS, na šta je ukazala smanjena latencija nalaženja platforme. Takođe, miševi iz OS su plivali sporije, zatim su prelazili kraće distance i provodili manje vremena u tigmotaksičnoj zoni (TZ) (Slika 35a, c, f). Analiza varijanse sa ponovljenim merenjima je pokazala značajan efekat sredine na sve ispitivane parametre (Tabela 19).

Prostorno učenje i pamćenje TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa nakon gajenja u SS ili OS je praćeno u toku naredna četiri dana akvizicije kada je platforma bila postavljena na istom mestu kao i prvog dana testiranja, ali ispod nivoa vode. Prvog dana akvizicije, TnC^{-/-} miševima, bez obzira na uslove gajenja, trebalo je znatno više vremena da pronađu nevidljivu platformu u odnosu na TnC^{+/+} miševima (Genotip: $F_{1,56} = 6,350$, $p = 0,015$; Slika 35a). Takođe, TnC^{-/-} miševi su prelazili duže distance (Genotip: $F_{1,56} = 6,226$, $p = 0,016$; Slika 35c) i zadržavali se duže u TZ (Genotip: $F_{1,56} = 8,075$, $p = 0,006$; Slika 35f). Iako su se latencije nalaženja platforme smanjivale kod sve četiri grupe u toku 4 dana akvizicije (Dan: $F_{3,168} = 54,808$, $p < 0,001$; Slika 35a), ipak je zabeležena sporija stopa prostornog učenja kod TnC^{-/-} miševa (Dan x Genotip: $F_{3,168} = 3,540$, $p = 0,016$; Slika 35a). Osim toga, iako je pronađen značajan efekat sredine na latenciju nalaženja platforme (Tabela 19), gajenje u OS je značajno doprinelo njenom smanjenju samo kod TnC^{+/+} miševa, dok je sličan efekat izostao kod TnC^{-/-} miševa (Slika 35a). Šta više, značajne razlike između dva genotipa koji su gajeni u OS su pronađene 4. i 5. dana testiranja, odnosno 3. i 4. dana akvizicije (Slika 35a; $p < 0,05$). S obzirom na to da su TnC^{-/-} miševi plivali sporije od TnC^{+/+} miševa (Slika 35e), analizom kovarijanse sa ponovljenim merenjima, gde je brzina plivanja korišćena kao

kovarijabla, ispitano je da li se duže latencije nalaženja platforme kod TnC^{-/-} miševa javljaju usled njihove smanjene brzine plivanja tokom dana akvizicije. Dodatna analiza je pokazala da efekat brzine plivanja na latenciju nije značajan ($p > 0,05$). Dodatno, kod TnC^{-/-} miševa je u toku faze akvizicije pronađen i povećan tigmotaksis, kao i veće pređene distance, što je potvrđeno značajnim efektom genotipa na analizirane parametre (Tabela 19; Slika 35c, f).

Šestog dana testiranja u Morisovom vodenom lavirintu, platforma je uklonjena iz bazena kako bi se ispitalo da li dva genotipa koriste različite strategije učenja. Analizom vremena provedenog u kvadrantu bazena gde je prethodnih dana bila pozicionirana platforma, dobijeno je da miševi iz sve četiri grupe provode većinu vremena u toku prvog pokušaja upravo u tom kvadrantu, što je ukazalo da svi poseduju prostornu strategiju učenja. Šta više, u toku naredna tri pokušaja, istog dana, vreme provedeno u tom kvadrantu se smanjivalo istom stopom kod sve četiri grupe i razlike između grupa nisu zabeležene (Tabela 19; Slika 35b). Međutim, kao i u toku prethodnih dana testiranja, TnC^{-/-} miševi su plivali sporije i prelazili kraće distance od TnC^{+/+} miševa (Tabela 19; Slika 35d, e). Gajenje u OS je dovelo do daljeg pada tih parametara, ali i do smanjenja vremena koje su te životinje provodile u TZ (Tabela 19; Slika 35d-f).

Sedmog dana testiranja, vidljiva platforma je bila postavljena u suprotni kvadrant bazena. U takvim eksperimentalnim uslovima, kod TnC^{-/-} miševa gajenih u OS je zabeležena najviša latencija nalaženja platforme, što se najverovatnije javlja kao posledica male brzine plivanja ovih životinja s obzirom na to da nisu dobijene grupne razlike u pređenim distancama (Tabela 19; Slika 35a, e).

Poslednjeg dana testiranja, kada je platforma bila postavljena u suprotni kvadrant bazena, ali ispod nivoa vode, TnC^{-/-} miševima je, kao i drugog dana testiranja, bilo potrebno više vremena da pronađu platformu (Tabela 19; Slika 35a), što se može dovesti u vezu sa produženim zadržavanjem u kvadrantu gde je platforma bila pozicionirana u toku prvih pet dana testiranja (Genotip: $F_{1,56} = 6.323$, $p = 0,015$; Slika 35b).

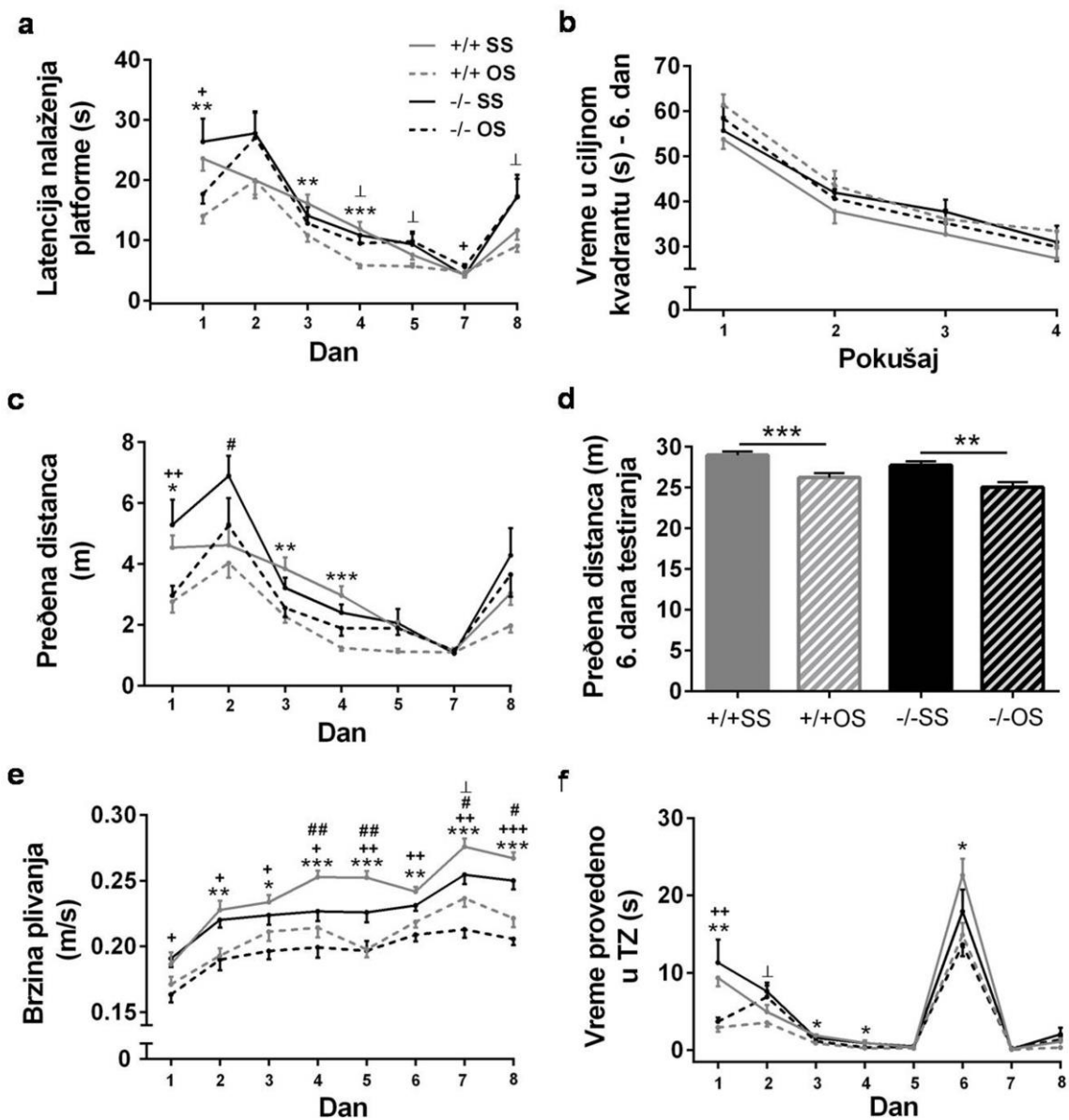
Rezultati dobijeni ovim testom ukazuju na pojačan emocionalni odgovor TnC^{-/-} miševa kada je platforma ispod nivoa vode, kao i na sporiju stopu učenja i smanjenu kognitivnu fleksibilnost. Naime, kako je gajenje u OS značajno poboljšalo prostorno

učenje i pamćenje kod TnC+/+ miševa, dok sličan efekat nije zabeležen kod TnC-/- miševa, dobijeni rezultati ukazuju da nedostatak TnC zaista pogađa funkcionisanje u prostoru i menja ponašajni odgovor. Osim toga, ovim testom je uočen i oslabljen senzomotorni kapacitet kod TnC-/- miševa koji se ogleda u smanjenoj brzini plivanja.

Tabela 19. Rezultati statističke analize za različite parametre ponašanja životinja u Morisovom vodenom lavirintu

Parametar	Dan 1		Dan 2- 5		Dan 6		Dan 7		Dan 8	
	<i>F</i> _{1,56}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,56}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,56}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,56}	<i>p</i>	<i>F</i> _{1,56}	<i>p</i>
Latencija nalaženja platforme										
Genotip	1,844	n.z.	9,359	0,003	-	-	1,060	n.z.	7,508	0,008
Sredina	14,641	<0,001	4,680	0,035	-	-	5,324	0,026	0,285	n.z.
Interakcija	0,031	n.z.	1,057	n.z.	-	-	1,258	n.z.	0,255	n.z.
Vreme provedeno u ciljnom kvadrantu										
Genotip	-	-	-	-	0,063	n.z.	0,810	n.z.	6,323	0,015
Sredina	-	-	-	-	1,470	n.z.	0,644	n.z.	0,454	n.z.
Interakcija	-	-	-	-	2,131	n.z.	0,031	n.z.	0,355	n.z.
Pređena distanca										
Genotip	0,858	n.z.	5,746	0,020	5,450	0,023	0,023	n.z.	5,628	0,021
Sredina	15,810	<0,001	19,226	<0,001	26,838	<0,001	0,076	n.z.	1,884	n.z.
Interakcija	0,282	n.z.	0,956	n.z.	0,004	n.z.	0,565	n.z.	0,122	n.z.
Brzina plivanja*										
Genotip	0,040	n.z.	4,861	0,032	4,818	0,032	10,887	0,002	7,719	0,007
Sredina	7,180	0,010	25,888	<0,001	18,974	<0,001	27,469	<0,001	49,334	<0,001
Interakcija	0,553	n.z.	1,177	n.z.	0,140	n.z.	0,026	n.z.	0,084	n.z.
Vreme provedeno u tigmotaksičnoj zoni										
Genotip	0,686	n.z.	9,128	0,004	2,066	n.z.	3,043	n.z.	3,373	n.z.
Sredina	18,283	<0,001	5,580	0,022	8,513	0,005	0,033	n.z.	1,811	n.z.
Interakcija	0,135	n.z.	0,493	n.z.	0,679	n.z.	3,478	n.z.	0,008	n.z.

* Urađena je analiza kovarijanse pri čemu je telesna masa uzimana kao kovarijabla. Efekat telesne mase na brzinu plivanja nije bio značajan tokom 8 dana testiranja ($p > 0,05$). '-'-analiza nije rađena, n.z.- nije značajno.



Slika 35. Performanse TnC+/+ i TnC-/- miševa gajenih u SS ili OS u Morisovom vodenom lavirintu. a) Latencija nalaženja platforme, b) vreme provedeno u ciljnom kvadrantu 6. dana testiranja, c) pređena distanca, d) pređena distanca 6. dana testiranja, e) brzina plivanja i f) vreme provedeno u tigmotaksičnoj zoni (TZ). Vrednosti na grafiku predstavljaju srednju vrednost 4 merenja za svakog miša po danu (n = 15 životinja/grupi), izuzev pod b) gde su prikazana 4 pojedinačna pokušaja 6. dana testiranja. *, +, #, †, $p < 0.05$; **, ++, ##, $p < 0.01$; ***, +++ $p < 0.001$; *: TnC+/+ SS vs. TnC+/+ OS, +: TnC-/- SS vs. TnC-/- OS, #: TnC+/+ SS vs. TnC-/- SS, i †: TnC+/+ OS vs. TnC-/- OS.

5. DISKUSIJA

Rezultati ove studije pokazuju da TnC, glikoprotein VCM, ima važnu ulogu u regulaciji strukturne plastičnosti malog mozga tako što moduliše razgradnju PNM od strane MMP-9 enzima i utiče na strukturne promene na nivou presinapse. Takođe, ova studija proširuje prethodna saznanja o ponašajnom fenotipu TnC^{-/-} miševa, pružajući uvid u njihovu osetljivost na sredinske faktore kao i široku sliku o ulozi TnC u regulaciji određenih domena ponašanja, kao što su spontana lokomotorna aktivnost, senzomotorna koordinacija, emocionalna reaktivnost, učenje i pamćenje.

5.1 Uloga TnC u strukturnoj plastičnosti malog mozga

5.1.1 Uloga TnC u sazrevanju i održavanju perineuronalnih mreža

Iako još uvek nije jasno utvrđeno da li TnC predstavlja strukturnu komponentu PNM, rezultati ove studije ukazuju da on ima važnu modulatornu ulogu u održavanju njihovog integriteta. Dvostrukim bojenjem moždanih preseka korišćenjem antitela na TnC i lektina WFA, pokazana je difuzna distribucija TnC u VCM, ali uočena su i mesta bliskog kontakta sa PNM u *n. dentatus* adultnih TnC^{+/+} miševa. S obzirom na to da su i prethode studije identifikovale TnC kao ligand za određene članove lektikanske familije koji ulaze u sastav PNM (Milev et al., 1997; Rauch et al., 1997; Day et al., 2004), može se pretpostaviti da TnC ostvaruje svoje funkcije preko modulacije drugih komponenti PNM.

Prethodna istraživanja PNM kod TnC^{-/-} miševa nisu pokazala izmenjenu morfologiju ovih struktura u hipokampusu TnC^{-/-} miševa, starosti između 4 i 6 nedelja (Evers et al., 2002). Slično tim nalazima, ova studija pokazuje da se PNM u *n. dentatus* malog mozga TnC^{-/-} miševa, starosti 7 nedelja, takođe ne razlikuju od PNM TnC^{+/+} miševa iste starosti. Međutim, pronađen je značajan pad u intenzitetu WFA signala kod adultnih TnC^{-/-} miševa, starosti 11 meseci koji su gajeni u standardnim uslovima, što ukazuje da TnC ipak tokom starenja životinja učestvuje u sazrevanju PNM, kao i u održavanju njihovog strukturnog integriteta u malom mozgu. Poznato je da se PNM formiraju u većini moždanih regiona u periodu između 2-3. postnatalne nedelje, nakon

čega se njihova morfologija menja zajedno sa sazrevanjem sinapsi i dostiže finalnu formu u ranom adolnom dobu (Pizzorusso et al., 2002; Carulli et al., 2006; Carulli et al., 2007; Galtrey et al., 2008; Yamada i Jinno, 2013; Ye i Miao, 2013; Horii-Hayashi et al., 2015). Prema tome, uočeno smanjenje intenziteta PNM u *n. dentatus* adultnih TnC^{-/-} miševa može se objasniti izmenjenim razvojem i stabilizacijom PNM usled nedostatka TnC. S obzirom na to da je pokazano da farmakološka supresija neuronalne aktivnosti pomoću inhibitora voltažno zavisnih Na⁺ kanala (Reimers et al., 2007) ili voltažno zavisnih Ca²⁺ kanala L tipa (Dityatev et al., 2007) snažno smanjuje vanćelijsku akumulaciju komponenti PNM, kao i da TnC može da moduliše aktivnost tih kanala direktno ili indirektno kroz interakciju sa integrinima (Srinivasan et al., 1998; Evers et al., 2002; Gall et al., 2003), može se pretpostaviti da je aktivacija ovih kanala pomoću TnC odgovorna za sazrevanje i održavanje PNM u fiziološkim uslovima.

5.1.2 Smanjena strukturna plastičnost kod TnC^{-/-} i MMP-9^{-/-} miševa nakon dugotrajnog izlaganja obogaćenoj sredini

Gajenje laboratorijskih životinja u OS je široko prihvaćena paradigma za koju je pokazano da pozitivno utiče na razvoj mozga i kod mladih i kod odraslih jedinki, tako što indukuje promene na molekularnom, ćelijskom i ponašajnom nivou (Baroncelli et al., 2010). Studija Foscari et al. (2011) je pokazala da izlaganje adultnih miševa divljeg soja OS u trajanju od 4 nedelje dovodi do povećane strukturne plastičnosti koja se ogleda u smanjenju broja PNM u dubokim jedrima malog mozga. S druge strane, rezultati ove studije pokazuju da izlaganje životinja OS u toku ranog razvića, u periodu od juvenilnog do adultnog stadijuma u trajanju od 8 nedelja, indukuje slične plastične promene u malom mozgu kontrolnih životinja.

Međutim, analiza distribucije PNM kod TnC^{-/-} i MMP-9^{-/-} miševa nakon gajenja u OS je ukazala na važnu ulogu TnC i MMP-9 u reorganizaciji ovih struktura. Naime, kod oba mutanta je primećen porast intenziteta WFA signala u uslovima povećane stimulacije, što ukazuje da njihov nedostatak utiče na regulaciju održavanja ravnoteže između sinteze i razgradnje u korist sinteze komponenti mreža u uslovima OS. Međutim, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost da je oslabljena razgradnja PNM i smanjena strukturna plastičnost posledica smanjene proteolitičke aktivnosti

MMP-9 enzima kod TnC^{-/-} miševa, odnosno njen potpuni izostanak kod MMP-9^{-/-} miševa.

Poznato je da izlaganje OS menja ekspresiju mnogih gena koji su uglavnom uključeni u regulaciju plastičnosti nervnog sistema (Rampon et al., 2000; Keyvani et al., 2004; Carulli et al., 2011). Ova studija pokazuje da izlaganja TnC^{+/+} miševa OS 8 nedelja dovodi do povećane ekspresije TnC u dubokim jedrima malog mozga, dok slične promene nisu zabeležene u kori malog mozga. Takođe, bitno je napomenuti da je OS indukovala povećanje u ekspresiji TnC ne samo kod divljeg soja, već i kod MMP-9^{-/-} miševa, što ukazuje da MMP-9 nije uključen u regulaciju ekspresije TnC, već da je obrnut scenario koji podrazumeva regulaciju ekspresije/aktivnosti MMP-9 od strane TnC više verovatan. U prilog tome ide i podatak da je, bez obzira na uslove gajenja, kod TnC^{-/-} miševa dobijena smanjena MMP-2 i/ili MMP-9 aktivnost nakon *in situ* zimografije, kao i nizak stepen kolokalizacije između PNM i MMP aktivnosti. Osim toga, prethodne studije takođe navode da bi TnC mogao da bude jedan od molekula uključenih u regulaciju MMP-9 ekspresije/aktivnosti. Naime, pokazano je da u toku ishemije jetre i reperfuzione povrede koja nastaje nakon uspostavljanja krvotoka, nedostatak TnC dovodi do nishodne regulacije MMP-9 sinteze/aktivnosti, što kao krajnji rezultat ima bolju regeneraciju jetre (Kuriyama et al., 2011). Zavisnost MMP-9 ekspresije od prisustva TnC je takođe opisana u studiji Kalebeyi et al. (2003), čiji autori pokazuju da izlaganje ćelija raka dojke izolovanih iz TnC^{-/-} miševa rastućim koncentracijama TnC dovodi do snažne i dozno zavisne indukcije MMP-9 ekspresije, ukazujući tako na direktnu ulogu TnC u signalnom putu MMP-9 sinteze. Takođe, postoje podaci koji ukazuju da je povećana ekspresija TnC praćena ushodnom regulacijom MMP-9 ekspresije/aktivnosti u različitim patološkim stanjima (Dang et al., 2004; Franz et al., 2013; Xu et al., 2015). Međutim, dodatna istraživanja su neophodna kako bi se ustanovio tačan signalni put koji leži u osnovi funkcionalnog odnosa ova dva molekula vanćelijskog matriksa što bi dalje doprinelo razumevanju mehanizama u različitim patologijama gde je primećena njihova koekspresija i kolokalizacija, kao i pojašnjenju njihove uloge tokom razvika i plastičnosti CNS u adultnom mozgu.

5.1.3 Uloga MMP-2 i MMP-9 u razgradnji perineuronalnih mreža

Ushodna regulacija i aktivacija želatinaza, MMP-2 i MMP-9, nakon pojačane neuronalne aktivnosti ukazuje da bi upravo ovi enzimi mogli da imaju važnu ulogu u strukturnom remodelovanju koje se javlja kao posledica pojačane aktivnosti neurona (Szkarczyk et al., 2002; Reeves et al., 2003; Michaluk et al., 2007). S tim u vezi, pokazano je da izlaganje OS može da dovede do aktivacije želatinaza u malom mozgu adultnih miševa (Foscarin et al., 2011). Takođe, opisana je ushodna regulacija MMP-9 ekspresije u hipokampusu nakon dugotrajnog izlaganja pacova uslovima OS u toku ranog razvića (Cao et al., 2014). S obzirom na te nalaze, smanjena aktivnost želatinaza u *n.dentatus* kontrolnih miševa nakon izlaganja OS u trajanju od 8 nedelja predstavljala je suprotan rezultat od očekivanog. Pošto je pretpostavljeno da je do aktivacije ovih proteolitičkih enzima moglo da dođe u ranijem vremenskom periodu, odnosno pre završetka 8. nedelje gajenja, urađeni su dodatni eksperimenti kako bi se testirala ova hipoteza. Zaista, pokazano je da izlaganje TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa OS 4 nedelje dovodi do ushodne regulacije aktivnosti MMP-9 enzima, ali ne i MMP-2, kod oba genotipa, dok promene u morfologiji PNM nisu bile uočene. Stoga, razgrađene PNM kod kontrolnih životinja nakon 8 nedelja izlaganja OS i nishodna regulacija aktivnosti želatinaza jasno ukazuju na vremenski okvir strukturnih promena u malom mozgu ovih životinja. Međutim, važno je istaći da uprkos povećanoj aktivnosti MMP-9 enzima nakon izlaganja TnC^{-/-} miševa OS u trajanju od 4 nedelje, kod ovih miševa nije uočena razgradnja PNM u *n. dentatus* ni posle 4, ali ni posle 8 nedelja izlaganja OS. Ovakav rezultat ukazuje da je TnC neophodan za regulaciju proteolitičke degradacije PNM od strane MMP-9. Rezultati ove studije koji se odnose na prisustvo kolokalizacije PNM i aktivnosti želatinaza, kao i na odsustvo razgradnje PNM kod MMP-9^{-/-} miševa nakon njihovog izlaganja OS podržavaju mogućnost da bi MMP-9 enzim mogao da bude uključen u proteolitičku razgradnju PNM u malom mozgu. Takođe, nekoliko prethodnih studija je dovelo u vezu degradaciju PNM sa povećanom aktivnosti MMP-9 (Gray et al., 2008; Pollock et al., 2014). Pored toga, ustanovljeno je da nekoliko komponenti PNM, uglavnom hondroitin sulfat proteoglikana, mogu predstavljati supstrate za želatinaze (Nakamura et al., 2000; Turk et al., 2001; Lu et al., 2011), dok je za TnC ustanovljeno

da ne podleže sečenju od strane MMP-9 enzima (Imai et al., 1994; Siri et al., 1995; Stegemann et al., 2013).

Poznato je da se aktivirane forme enzima iz familije MMP mogu naći u različitim unutarćelijskim odeljcima gde mogu seći određene ćelijske proteine, ili čak ispoljiti i neproteolitičke funkcije (Cauwe i Opdenakker, 2010). Na primer, predloženo je da u ćelijskim jedrima ovi enzimi mogu doprinositi procesima kao što su transkripcija, iskrajanje RNK ili replikacija DNK. Nekoliko MMP enzima, uključujući MMP-2 i MMP-9, su detektovani u jedru ćelija, pri čemu su ustanovljeni i mehanizmi za njihovu jedarnu translokaciju (Monferran et al., 2004; Zink et al., 2004; Yang et al., 2010). Iako je ova studija imala za cilj da ispita ulogu želatinaza u reorganizaciji PNM, a samim tim i u sinaptičkoj plastičnosti malog mozga, važno je istaći da je kod TnC^{-/-} miševa pronađena znatno slabija enzimaska aktivnost nego kod kontrolnih miševa bez obzira na to da li je analizirana sveukupna aktivnost ili po odeljcima (vanćelijski prostor i jedra ćelija). Takođe, ustanovljeno je da je kod oba genotipa aktivnost želatinaza u jedrima bila smanjena nakon produženog izlaganja OS, s tim što je kod TnC^{-/-} miševa ona bila generalno slaba bez obzira na uslove gajenja. Ovakav nalaz ukazuje da bi aktivnost želatinaza mogla da utiče na regulaciju transkripcije gena uključenih u formiranje i održavanje PNM, što je i podržano time da su PNM bile dosta izražene kod TnC^{-/-} i MMP-9^{-/-} miševa nakon OS. Međutim, dalje istraživanje je neophodno kako bi se okarakterisale tačne unutarćelijske funkcije ovih MMP enzima, odnosno kako bi se identifikovali njihovi unutarćelijski supstrati.

5.1.4 Uloga TnC u sinaptičkoj plastičnosti

S obzirom da hemijska ablacija glavnih inhibitornih presinaptičkih završetaka koji vode poreklo od Purkinje neurona dovodi do značajnog smanjenja broja PNM u dubokim jedrima malog mozga, pretpostavlja se da ovi presinaptički ulazi imaju važnu ulogu u održavanju strukture PNM (Foscarin et al., 2011; Carulli et al., 2013). Šta više, pokazano je da Purkinje neuroni mogu da kontrolišu molekularni sastav ovih struktura tako što vrše sintezu i oslobađanje određenih komponenti PNM (Carulli et al., 2013). Pretpostavka da nivo plastičnih promena zavisi od odnosa između ekscitacije i inhibicije je podržana nalazima koji pokazuju da smanjena GABAergetska transmisija pokreće

tzv. plastičnost zavisnu od iskustva, takođe dovodeći do razgradnje PNM u vizuelnom delu kore velikog mozga životinja kod kojih je urađena unilateralna deprivacija oka (Harauzov et al., 2010). Takođe, pokazano je da izlaganje adultnih pacova OS, kod kojih je prethodno izvršena unilateralna deprivacija oka, može da dovede do reaktivacije plastičnosti u vizuelnom delu kore velikog mozga koja je karakteristična za juvenilni period dovodeći do smanjenja nivoa inhibicije (Sale et al., 2007; Baroncelli et al., 2010). Novije studije sve više ukazuju na to da je smanjena inhibicija kritična za regulaciju plastičnih promena ne samo u vizuelnom delu kore velikog mozga, već i u njenom auditornom delu, kao i u hipokampusu i kičmenoj moždini (Begenisic et al., 2011; Zhou et al., 2011; Scali et al., 2013; Begenisic et al., 2014). U saglasnosti sa prethodnim navedenim nalazima, smanjena plastičnost kod TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja OS, koja se ogleda kroz prisustvo vrlo razvijenih PNM, može se objasniti povećanom inhibicijom neurona u *n. dentatus*. Naime, kod TnC^{-/-} miševa pronađen je povećan broj inhibitornih sinaptičkih završetaka, pri čemu je ustanovljeno da se njihova površina dodatno uvećava nakon izlaganja ovih životinja OS. S druge strane, kod kontrolnih miševa, pronađeno je da OS dovodi do smanjenja inhibitornog uticaja na neurone u *n. dentatus* tako što uzrokuje povećanje u gustini i površini ekscitatornih sinaptičkih završetaka, dok se površina inhibitornih završetaka smanjuje, a površina ostaje nepromenjena. Međutim, važno je spomenuti da je studija Foscarin et al. (2011) pokazala povećanje u površini inhibitornih završetaka nakon izlaganja miševa divljeg soja OS. Neslaganje u rezultatu može biti posledica toga što su u dve studije analizirana različita duboka jedra malog mozga, odnosno to što su korišćeni miševi različitog soja, starosti i pola, ali i to što je primenjen različit protokol za OS paradigmu.

Važno je napomenuti da nisu samo neuroni u dubokim jedrima malog mozga izvor želatinaza, već i da Purkinje neuroni mogu sintetisati ove enzime, pri čemu se može pretpostaviti da i ove ćelije preko svojih aksona aktivno doprinose reorganizaciji VCM u dubokim jedrima koja inervišu (Ayoub et al., 2005; Foscarin et al., 2011). Međutim, s obzirom na to da ti enzimi deluju uglavnom lokalno i utiču na morfologiju dendritskih trnova (Michaluk et al., 2009; Michaluk et al., 2011; Dziembowska et al., 2012), moguće je da primećene promene u aktivnosti želatinaza unutar Purkinje neurona dovode do lokalnih promena u aktivnosti samih Purkinje neurona menjajući na taj način

sinaptička kola u kori malog mozga, što kao krajnji efekat može imati izmenjena unutrašnja svojstva nishodnih neurona dubokih jedara i reorganizaciju PNM oko njih.

Uloga TnC u funkcionalnoj plastičnosti opisana je u elektrofiziološkoj studiji koja je pokazala oslabljenu dugotrajnu potencijaciju u Šaferovim kolaretalama i odsustvo dugotrajne depresije u CA1 regionu hipokampusa TnC^{-/-} miševa (Evers et al., 2002). Takođe, kod ovih životinja primećene su i izvesne promene u oslobađanju glutamata na Purkinje neurone (Andjus et al., 2005). Rezultati ove studije pokazuju da je TnC uključen u strukturnu reorganizaciju PNM i sinaptičkih ulaza u malom mozgu, odnosno da nakon izlaganja životinja uslovima OS TnC podstiče povećanje gustine i površine ekscitatornih (glutamatnih) sinaptičkih završetaka, dok s druge strane smanjuje gustinu i površinu inhibitornih (GABAergičkih) sinaptičkih završetaka. Ovakav rezultat ukazuje da TnC ima značajnu regulatornu ulogu u finom podešavanju ravnoteže između ekscitacije i inhibicije u korist ekscitacije neurona u dubokim jedrima malog mozga u uslovima OS.

5.1.5 Uloga MMP-9 u sinaptičkoj plastičnosti

Na 3D rekonstrukcijama konfokalnih slika uočeno je da se aktivnost želatinaza nalazi u neposrednoj blizini ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih markera u *n. dentatus*, što ukazuje na ulogu ovih enzima u sinaptičkom remodelovanju. Važno je napomenuti da proteoliza u vanćelijskom prostoru ne mora da doprinosi samo reorganizaciji okoloćelijskog prostora, već i oslobađanju pojedinih signalnih molekula kao što su na primer, faktori rasta (Tsilibary et al., 2014). Poslednjih godina sve je više studija koje se bave ispitivanjem uloge MMP-9 u remodelovanju dendritske arhitekture u uslovima pojačane neuronalne aktivnosti (Wang et al., 2008; Wilczynski et al., 2008; Gawlak et al., 2009; Michaluk et al., 2011; Stawarski et al., 2014). Međutim, efekat OS na gustinu i površinu ekscitatornih i inhibitornih presinaptičkih završetaka kod MMP-9^{-/-} miševa je prvi put ispitan u ovoj studiji.

Interesantno je da se u standardnim uslovima gajenja, gustina i površina glutamatnih završetaka kod MMP-9^{+/+} i MMP-9^{-/-} miševa ne razlikuje. Međutim, nakon izlaganja MMP-9^{-/-} miševa OS došlo je do značajnog povećanja broja ovih završetaka, što je ukazalo da nedostatak MMP-9 ne sprečava sinaptogenezu u

n. dentatus koja je indukovana gajenjem u OS, već naprotiv, doprinosi pojačanoj ekscitaciji. S obzirom na to da je u ovoj studiji prethodno pokazano da je TnC neophodan kako bi došlo do pojačane ekscitacije nakon izlaganja životinja OS, kao i da je ekspresija TnC kod MMP-9^{-/-} miševi pojačana nakon OS, TnC bi mogao da predstavlja jedan od ključnih molekula u signalnim putevima koji vode ka strukturnoj plastičnosti ekscitatornih sinapsi kod MMP-9^{-/-} miševa. Međutim, moguće je pretpostaviti da se korisni efekti OS javljaju delom i usled povećanja nivoa neurotrofičkog faktora BDNF i ushodne regulacije nivoa serin proteaze tPA, za koje je pokazano da mogu da imaju značajnu ulogu u regulaciji sinaptičke plastičnosti (Mataga et al., 2004; Pang et al., 2004; Baroncelli et al., 2010). Naime, pored MMP-9 (Mizoguchi et al., 2011; Cao et al., 2014), tPA takođe može vršiti konverziju proBDNF u BDNF (Pang et al., 2004) i na taj način imati kompenzatornu ulogu kod MMP-9^{-/-} miševa. S druge strane, unutarćelijska signalizacija ovog neurotrofičkog faktora može da pokrene različite programe transkripcije, što za krajnji efekat ima aktivaciju drugih gena koji pokreću plastične promene u mozgu (Baroncelli et al., 2010). Važno je napomenuti da je pokazano da nakon ranog izlaganja životinja uslovima OS dolazi do pojačane sinteze BDNF u malom mozgu (Angelucci et al., 2009). Isto tako, pronađena je i ushodna regulacija tPA nakon pojačane fizičke aktivnosti ili izlaganja životinja OS (Obiang et al., 2011; Sartori et al., 2011). S obzirom na to da reorganizacija ekscitatornih sinapsi kod MMP-9^{-/-} miševa nakon OS nije praćena opštom dezorganizacijom VĆM i razgradnjom PNM, može se pretpostaviti da kod ovih životinja dolazi do razgradnje specifičnih proteina VĆM. Ovakvo stanovište je podržano činjenicom da su ekscitatorne sinapse lokalizovane na dendritima neurona u dubokim jedrima malog mozga (Pugh i Raman, 2008), dok se PNM formiraju uglavnom oko tela neurona, proksimalnih delova dendrita i inicijalnog dela aksona.

S druge strane, ova studija otkriva smanjenu gustinu i veličinu GABAergičkih presinaptičkih završetaka u *n. dentatus* MMP-9^{-/-} miševa, bez obzira na uslove u kojima su oni gajeni. Iako mehanizam koji opisuje ove promene na strukturnom nivou ostaje nejasan, bitno je napomenuti da postoje podaci koji jasno ukazuju da MMP-9 ima suštinsku ulogu u toku postnatalnog razvića malog mozga, odnosno da nedostatak ovog enzima ili njegova inhibicija utiču na apoptozu granularnih ćelija i smanjuju izrastanje paralelnih vlakana koji se projektuju na Purkinje neurone (Vaillant et al., 1999; Vaillant

et al., 2003; Ayoub et al., 2005; Luo, 2005). Takođe, ova studija pokazuje da izlaganje OS ne menja gustinu i veličinu inhibitornih završetaka kod MMP-9^{-/-} miševa. Odsustvo plastičnosti inhibitornih sinapsi koje su lokalizovane na telima neurona u dubokim jedarima malog mozga (Pugh i Raman, 2008) može se dovesti u vezu sa odsustvom razgradnje PNM kod ovih miševa, najverovatnije usled nedostatka MMP-9 enzima.

Opšti zaključak prvog dela studije koji se odnosi na ulogu TnC u stuktornoj plastičnosti je da TnC ima važnu modulatornu ulogu u strukturnim promenama malog mozga koje nastaju kao posledica dugotrajnog izlaganja životinja uslovima OS. Osim toga, rezultati ukazuju na važnost funkcionalne interakcije TnC i MMP-9 molekula, odnosno da TnC predstavlja molekul koji je uključen u regulaciju MMP-9 aktivnosti. Modulišući aktivaciju MMP-9, TnC posreduje u razgradnji PNM kao i u sinaptičkom remodelovanju. Prema tome, ova studija otvara jednu novu temu za istraživanje koja se odnosi na rasvetljavanje signalnog puta u kome TnC posreduje u sintezi i/ili aktivaciji MMP-9.

5.2 Uloga TnC u oblikovanju ponašanja

Drugi deo rezultata ove doktorske disertacije se odnosi na ispitivanje uloge TnC u oblikovanju različitih domena ponašanja, koji su u manjoj ili većoj meri regulisani funkcijom malog mozga, pri čemu bitno doprinose povezivanju promena uočenih na strukturnom nivou sa funkcionalnim posledicama vidljivim na fenotipskom nivou. Iako je nekoliko prethodnih studija ispitalo ponašajni profil adultnih TnC^{-/-} miševa, ova studija je prva koja uzima u obzir ne samo genetički, već i sredinski faktor. Stoga, ona pruža širi uvid u ponašajni fenotip TnC^{-/-} miševa koji nastaje kao rezultat pojačane multisenzorne stimulacije u toku postnatalnog razvića.

5.2.1 Motorni deficiti koji se odnose na koordinaciju i sposobnost plivanja kod TnC^{-/-} miševa ostaju prisutni i nakon gajenja u obogaćenoj sredini

Motorna funkcija kod TnC^{+/+} i TnC^{-/-} miševa gajenih u SS i OS je ispitana korišćenjem različitih testova ponašanja koji su koncipirani tako da ispituju nivo spontane lokomotorne aktivnosti, senzomotornu koordinaciju i sposobnost plivanja. U saglasnosti sa prethodnim studijama (Fukamauchi et al., 1996; Fukamauchi et al., 1997a; Kiernan et al., 1999), dobijeno je da nedostatak TnC ne dovodi do izraženih motornih deficita, već da uzrokuje suptilne, ali značajne promene, kao što su povećana spontana lokomotorna aktivnost, oslabljena koordinacija i sporo plivanje. Međutim, ova studija pokazuje da fizička aktivnost i fina motorna stimulacija u toku razvića gajenjem životinja u OS u izvesnoj meri popravljaju pojedine deficite u ponašanju. Uočeno poboljšanje u izdržljivosti prednjih ekstremiteta u testu izdržaja na žici, kao i u motornoj koordinaciji u testu hodanja na gredi nakon gajenja u OS je u skladu sa prethodnim nalazima koji pokazuju da OS poboljšava ne samo motoričke sposobnosti, menjajući strukturna i funkcionalna svojstva mišićno-skeletnog sistema (Serradj et al., 2013), već menjajući i fiziološki razvoj mozga tako što stimuliše kognitivne funkcije i neurogenezu (van Praag et al., 2000).

Međutim, slaba koordinacija zadnjih ekstremiteta TnC^{-/-} miševa u testu hodanja na gredi, kao i sporo plivanje u Morisovom vodenom lavirintu ostaju prisutni i nakon

pojačane motorne stimulacije u toku postnatalnog razvića gajenjem u OS. Nekoliko studija je pokazalo pojačanu ekspresiju TnC u skeletno-mišićnim tkivima u toku embriogeneze i organogeneze, ukazujuću na važnu ulogu ovog molekula u razviću skeletno-mišićnog sistema (Chiquet i Fambrough, 1984; Riou et al., 1992; Kardon, 1998). Takođe, predloženo je da bi TnC mogao da ima funkcionalnu ulogu nalik vezivnom tkivu u toku razvića i morfogeneze mišića (Deries et al., 2010; Deries et al., 2012). S druge strane, ustanovljeno je da sa sazrevanjem organizma ekspresija TnC značajno opada u ovim tkivima. Međutim ona ostaje prisutna na mestima koja su izložena jakim mehaničkim silama i mestima koja imaju izrazita elastična svojstva, kao što su mesta spajanja mišića ili kostiju sa tetivama i površinski slojevi hrskavice zglobova (Kannus et al., 1998). Uzimajući u obzir da TnC poseduje izvesna elastična svojstva (Oberhauser et al., 1998), kao i da različiti intenziteti mehaničkog naprezanja kojima se izlaže skeletno-mišićno tkivo mogu da regulišu nivo ekspresije TnC na dozno-zavisan način (Jarvinen et al., 1999; Jarvinen et al., 2003), u literaturi se predlaže da TnC ima važnu ulogu u pružanju elastičnosti skeletno-mišićno tkivu. Stoga, smanjena motorna koordinacija i brzina plivanja kod TnC^{-/-} miševa koja ostaje prisutna i nakon gajenja u OS mogla bi se objasniti, bar delimično, niskim elastičnim svojstvima njihovih skeletno-mišićnih tkiva.

S druge strane, dve grupe istraživača su nezavisno ispitivale nervno-mišićne sinapse kod TnC^{-/-} miševa, kao i ulogu TnC u procesu reinervacije skeletnog mišića. Moscoso i kolege (Moscoso et al., 1998) su pronašle da se mišićno-skeletna tkiva razvijaju i funkcionišu normalno kod TnC^{-/-} miševa, ukazujući da TnC nije molekul od suštinske važnosti za razvoj nervno-mišićne sinapse i regeneraciju. S druge strane, treba spomenuti i morfološku studiju Cifuentes-Diaz et al. (1998), čiji su autori pronašli narušenu organizaciju presinaptičkih terminala i prekomerni rast aksona kod TnC^{-/-} miševa, ukazujući da je TnC uključen ne samo u proces mijelinizacije i rast aksona, već i u formiranje i stabilizaciju nervnih terminala na nervno-mišićnoj sinapsi. Pored toga, ista grupa autora je pokazala da se kod TnC^{-/-} miševa javlja i oslabljen proces reinervacije u skeletnom mišiću nakon ubrizgavanja botulinum toksina tipa A, što je dodatno ukazalo na važnu ulogu TnC i u procesima plastičnosti nervno-mišićnog sistema (Cifuentes-Diaz et al., 2002). Postoji dosta razloga usled kojih su mogli biti izvedeni suprotni zaključci u dve studije (sumirano u Mackie i Tucker, 1999). Primena

različitih metodoloških pristupa kao i to da su u prvoj studiji ispitivani preseki mišića, a ne celi mišići se čine najvažnijim. Da TnC ima važnu ulogu u procesu reinervacije potvrđuju i nalazi u studijama Langenfeld-Oster et al. (1994) i Mege et al. (1992) koji su pokazali da primena antitela protiv TnC *in vivo* dovodi do odložene reinervacije što je bilo u saglasnosti sa *in vitro* studijom koja je pokazala da TnC pospešuje izrastanje neurita kada se ravnomerno obloži kao supstrat (Faissner, 1997). Osim toga, Guntinas-Lichius i kolege su otkrile da je funkcionalni oporavak kod TnC^{-/-} miševa nakon povrede facijalnog nerva znatno smanjen (Guntinas-Lichius et al., 2005). Na osnovu svih navedenih nalaza koji ukazuju na važnost TnC u procesima formiranja, sazrevanja i stabilizacije nervno-mišićne sinapse, odnosno u procesima plastičnosti nervno-mišićnog sistema, može se pretpostaviti da se deficiti u ponašanju kao što su slaba motorna koordinacija i sporo plivanje kod TnC^{-/-} miševa, javljaju kao posledica poremećaja na nivou nervno-mišićne sinapse.

Treba napomenuti da prethodna studija koja je ispitivala ponašajni fenotip TnC^{-/-} miševa napravljenih od strane Evers et al. (2002) nije uspela da otkrije nepravilnost u motornoj koordinaciji u testu hodanja po gredi (Morellini i Schachner, 2006). Do neslaganja u rezultatima u dve studije je najverovatnije došlo usled različitog metodološkog pristupa. Naime, u ovoj studiji je korišćena greda debljine 0,8 cm napravljena od providnog pleksiglasa, dok je u studiji Morellini i Schachner korišćena drvena greda debljine 2,5 ili 1 cm. Osim toga, u ovoj studiji su miševi obučavani da pređu greda menjanjem tri početne pozicije na gredi, dok su u studiji Morellini i Schachner miševi obučavani da prvo prelaze greda debljine 5 cm sve dok ne počnu brzo da je prelaze, nakon čega su testirani na tanjim gredama. Takođe, njihovi rezultati su dobijeni na miševima sa C57BL/6J - 129SvJ genetičkom osnovom koji su dodatno podvrgnuti ukrštanju sa mišijim sojem C57BL/6 kroz tri uzastopne generacije pre nego što je na njima urađena studija ponašanja, dok su u ovoj studiji TnC^{-/-} miševi imali "čistiju" C57BL/6 genetičku osnovu s obzirom na to da su podvrgnuti dodatnim ukrštanjima. Da genetička osnova bitno utiče na motornu koordinaciju pokazano je u studiji Kiernan et al. (1999), čiji su autori utvrdili da se poremećaji u koordinaciji kod TnC^{-/-} miševa potpuno gube ukoliko se eksperimenti rade na 129SvJ genetičkoj osnovi, ali ne i ukoliko se rade na C57BL/6 osnovi.

5.2.2 Hiperlokomocija TnC^{-/-} miševa može biti ukinuta nakon gajenja u obogaćenoj sredini – brža habituacija na novu sredinu

Rezultati ove studije ponašanja jasno pokazuju da TnC^{-/-} miševi ispoljavaju povećanu spontanu lokomotornu aktivnost tokom 12 h tamne faze dnevnog ciklusa, kao i da gajenje u OS može potpuno ukinuti njihovu lokomotornu hiperaktivnost i vratiti je na vrednosti dobijene kod kontrolnih miševa. S obzirom na to da je pokazano da spontana lokomotorna aktivnost kod kontrolnih miševa ne zavisi od uslova gajenja, bitno je istaći prisustvo interakcije gena i sredine kada je u pitanju ovaj tip ponašanja. Iako u studiji Morellini i Schachner (2006) nisu uočene promene u opštoj lokomotornoj aktivnosti kod TnC^{-/-} miševa, ustanovljeno je da se kod ovih miševa u više različitih eksperimentalnih uslova javlja pojačana aktivnost nakon stavljanja u novu sredinu, ukazujući da je kod njih obazrivost prema novom okruženju skoro odsutna. Ipak, izražena dugotrajna hiperaktivnost i pojačan istraživački nagon je primećen kod TnC^{-/-} miševa u studijama Fukamauchi et al. (1996; 1997) i Kiernan et al. (1999). Ove studije navode da se takvo ponašanje, bar delimično, javlja usled poremećenog emocionalnog odgovora koji se javlja usled promena u dopaminskom sistemu. Naime, pokazano je da TnC^{-/-} miševi imaju nizak stepen transmisije dopamina u strijatumu i hipokampusu (Fukamauchi et al., 1996), kao i smanjenu ekspresiju enzima tirozin hidrosilaze koji je uključen u biosintezu kateholamina (Fukamauchi et al., 1997b). Takođe, važno je napomenuti da je upotreba različitih agonista dopaminskog receptora u potpunosti sprečila pojavu hiperaktivnosti kod TnC^{-/-} miševa (Fukamauchi et al., 1996; Fukamauchi et al., 1997a). Međutim, rezultati ove studije su u skladu sa prethodnim istraživanjama koja pokazuju da OS, takođe, ima sposobnost da smanji urođenu hiperaktivnost (Green et al., 2003; Oddi et al., 2015; Botanas et al., 2016). Uočen efekat se dovodi u vezu sa povećanom koncentracijom monoamina u određenim regionima mozga životinja koje su gajene u obogaćenim uslovima (Naka et al., 2002; Brenes et al., 2008; Brenes et al., 2009; Segovia et al., 2010; Darna et al., 2015). Istovremeno, rezultati ove studije ukazuju da su kod TnC^{-/-} miševa očuvani molekularni mehanizmi odgovorni za smanjenje hiperaktivnosti, kao i da se ti mehanizmi mogu pokrenuti gajenjem životinja u uslovima pojačane senzomotorne i kognitivne stimulacije u toku ranog razvoja.

Pored toga, u saglasnosti sa prethodnim nalazima (Varty et al., 2000; Zimmermann et al., 2001; Schrijver et al., 2002; Pietropaolo et al., 2004; Elliott i Grunberg, 2005; Del Arco et al., 2007; Amaral et al., 2008), rezultati ove studije pokazuju da bez obzira na genotip, OS poboljšava sposobnost životinja da obrađuju informacije iz neposrednog okruženja, dovodeći do njihovog bržeg privikavanja na novu sredinu. Naime, brža habituacija životinja iz OS, koja se ogledala u smanjenoj lokomotornoj aktivnosti tih životinja, bila je uočena u toku prvog sata praćenja spontane noćne aktivnost, kao i u testu otvorenog polja. Interesantno je da su miševi gajeni u OS i pored smanjene latencije ulaska u centralnu zonu arene u testu otvorenog polja, brzo napuštali tu zonu i veći deo vremena provodili na periferiji u stanju mirovanja. Takođe, brža habituacija životinja iz OS je uočena i u Morisovom vodenom lavirintu u toku prvog dana testiranja kada je zabeležen smanjen tigmotaksis kod ovih životinja. Smatra se da je povećan nivo monoamina, pre svega serotonina, odgovoran za takav odgovor životinja iz OS, s obzirom na to da postoji sve više podataka koji ukazuju da je upravo serotonin okidač za nastajanje plastičnih promena u mozgu (Brenes et al., 2008; Brenes et al., 2009). Uzimajući u obzir da su Fukamauchi i saradnici pokazali da pored dopamina, TnC^{-/-} miševi imaju i smanjenu transmisiju serotonina (Fukamauchi et al., 1996), izgleda da OS deluje kod ovih miševa tako što povećava nivo ovog neurotransmitera dovodeći ga na fiziološki značajne vrednosti.

5.2.3 Smanjen anksiolitički efekat obogaćene sredine kod TnC^{-/-} miševa

Emocionalna reaktivnost TnC^{-/-} miševa je još jedan domen ponašanja koji je praćen u ovoj studiji. Iako je OS imala anksiolitički efekat na oba genotipa u testu silaska sa platforme, uočeno je da ona ima slabiji efekat na smanjivanje straha od visine i osvetljenog prostora kod TnC^{-/-} miševa. Kako je pokazano da OS može izazvati promene u limbičkom sistemu (Ashokan et al., 2016; Mahati et al., 2016), moguće je da se smanjena sposobnost ovog sistema za plastičnost usled nedostatka TnC nalazi u osnovi ponašajnog fenotipa koji je uočen kod TnC^{-/-} miševa. Ovo stanovište je podržano prethodnim studijama koje su otkrile smanjenu neuronalnu plastičnost u različitim regionima mozga ovih miševa (Evers et al., 2002; Cybulska-Klosowicz et al., 2004).

Takođe, imajući u vidu da OS može imati anksiolitički efekat menjajući nivoe kortikosterona (Fox et al., 2006), može se pretpostaviti da funkcionalne promene u osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda kod TnC^{-/-} miševa mogu biti odgovorni za ovakvo ponašanje.

5.2.4 Gajenje u obogaćenoj sredini otkriva oslabljenu sposobnost učenja i pamćenja, kao i smanjenu „kognitivnu fleksibilnost” kod TnC^{-/-} miševa

Pored svih ispitivanih aspekata ponašanja, posebna pažnja je posvećena ispitivanju uticaja OS na senzomotorno i prostorno učenje i pamćenje kod TnC^{-/-} miševa. U skladu sa prethodnim nalazima (van Praag et al., 2000; Leggio et al., 2005; Nithianantharajah i Hannan, 2006; Leger et al., 2012), pokazano je da OS ima pozitivan efekat na učenje i pamćenje, što se dovodi u vezu sa činjenicom da pojačana multisenzorna stimulacija koja se postiže gajenjem u OS izaziva značajne plastične promene na molekularnom, anatomskom i funkcionalnom nivou koje zatim utiču na morfologiju, hemiju i fiziologiju mozga (van Praag et al., 2000). Međutim, važno je napomenuti da je u rota-rod testu, kao i u Morisovom vodenom lavirintu uočen umereni kognitivni deficit kod TnC^{-/-} miševa gajenih u OS, koji se ogledao u sporijoj stopi učenja u odnosu na kontrolne miševe gajene u istim uslovima. Osim toga, kod TnC^{-/-} miševa je uočena i pojačana emocionalna reaktivnost (povećan tigmotaksis) u situaciji kada je u Morisovom vodenom lavirintu platforma postavljena ispod nivoa vode, kao i smanjena „kognitivna fleksibilnost” kada je platforma bila pozicionirana u suprotnom kvadrantu bazena. Ispitujući samo uticaj genotipa na sposobnost učenja senzomotornih i prostornih zadataka, prethodne studije nisu pronašle njegove značajne efekte (Evers et al., 2002; Morellini i Schachner, 2006). Stoga, ova studija je po prvi put pokazala da su razlike u učenju i pamćenju između dva genotipa zaista prisutne i da se ispoljavaju tek nakon gajenja životinja u OS. Prema tome, ona ističe korišćenje OS kao važan eksperimentalni pristup za proučavanje efekata stimulusa iz spoljašnje sredine na neuronalnu i ponašajnu plastičnost.

Pojačana fizička aktivnost usled korišćenja točka za trčanje je prepoznata kao jedna od komponenti OS koja se čvrsto dovodi u vezu sa poboljšanjem kognitivne funkcije i performansi životinja prilikom učenja i pamćenja različitih zadataka

(Anderson et al., 2000; Lambert et al., 2005; Harburger et al., 2007). Prethodne studije su pokazale da je adultna neurogeneza u subgranularnoj zoni dentatnog girusa hipokampusa kritičan mehanizam koji se nalazi u osnovi pozitivnih efekata pojačane fizičke aktivnosti na učenje i pamćenje (van Praag et al., 1999; Olson et al., 2006; Fabel i Kempermann, 2008; Klaus i Amrein, 2012). S obzirom na to da je poznato da TnC ima važnu ulogu u različitim procesima tokom razvika, kao što su ćelijska proliferacija, migracija i izrastanje neurita i da se kod adulta zadržava u oblastima aktivne neurogeneze (Garcion et al., 2001; Garcion et al., 2004), može se pretpostaviti da je izmenjena neurogeneza kod TnC^{-/-} miševa nakon OS bar u izvesnoj meri odgovorna za oslabljene kognitivne performanse ovih miševa.

Takođe, važno je napomenuti da Morisov vodeni lavirint predstavlja kompleksan test koji podrazumeva da životinja istraži otvoren prostor pri čemu može koristiti različite putanje i strategije da bi rešila zadatak. Ovo zahteva aktivaciju brojnih moždanih struktura, uključujući neokortikalne regione (Colby i Duhamel, 1996; Porter et al., 2000; Pinto-Hamuy et al., 2004; Save et al., 2005), hipokampalna neuronalna kola (Rosenbaum et al., 2000; Chiba et al., 2002; Martin et al., 2005), bazalne ganglije (Packard i Knowlton, 2002; Dang et al., 2004; Yeshenko et al., 2004) i mali mozak (Petrosini et al., 1996; Rondi-Reig et al., 2002; Colombel et al., 2004; Gaytan-Tocaven i Olvera-Cortes, 2004) pri čemu je za neke od tih regiona već pokazano da imaju smanjenu plastičnost kod TnC^{-/-} miševa (Evers et al., 2002; Stamenkovic et al., 2017). Zato smanjena sposobnost učenja i pamćenja, kao i smanjena „kognitivna fleksibilnost” koja je uočena kod TnC^{-/-} miševa u ovom testu može da bude odraz smanjenog kapaciteta za plastične promene kod ovih životinja.

Poznato je da cerebralna plastičnost koja se dovodi u vezu sa učenjem motornih veština podrazumeva promene u aktivnosti kortiko-strijatalnih i kortiko-cerebelarnih nervih kola (Doyon et al., 2003). S obzirom na to da su TnC^{-/-} miševi koji su gajeni u OS pokazali sporiju brzinu učenja u rota-rod testu u toku 4 dana koliko je trajalo testiranje, ovakav nalaz može se objasniti, makar delom, smanjenom plastičnošću malog mozga ovih miševa koja je pokazana u ovoj studiji. Pored toga, prethodna istraživanja su ustanovila i izmenjenu funkcionalnu kratkotrajnu plastičnost u kori malog mozga ovih miševa (Andjus et al., 2005). Međutim, ne treba zanemariti da je kod TnC^{-/-} miševa pored oslabljene sposobnosti senzomotornog učenja, uočena i narušena motorna

koordinacija u testu hodanja po gredi, koja se ne menja ni nakon gajenja u OS, što takođe može doprinositi njihovom sporijem učenju u rota-rod testu.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da nedostatak TnC dovodi do spontane hiperaktivnosti i narušene senzomotorne koordinacije kod TnC^{-/-} miševa. Međutim, dok s jedne strane, gajenje TnC^{-/-} miševa u OS popravljaja izvesne poremećaje koji se odnose na motoričke funkcije, s druge strane, korišćenje OS paradigme pomaže u otkrivanju poremećaja kao što su pojačana emocionalna reaktivnost, oslabljena sposobnost učenja/pamćenja i smanjena „kognitivna fleksibilnost” koji nisu uočeni nakon gajenja u SS. Prema tome, rezultati ove studije pokazuju da pozitivni efekti OS na određene domene ponašanja mogu biti značajno oslabljeni što se javlja kao posledica nedostatka TnC, pri čemu ukazuju na smanjenu plastičnost mozga TnC^{-/-} miševa.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj studiji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kod adultnih miševa divljeg soja ekspresija TnC se zadržava u molekularnom sloju kore malog mozga i u dubokim jedrima (*n. dentatus*). Iako je distribucija TnC uglavnom difuzna u VCM, njegovo prisustvo se takođe uočava unutar PNM ili u njihovoj neposrednoj blizini.
2. Izlaganje miševa divljeg soja OS u trajanju od 8 nedelja povećava ekspresiju TnC u dubokim jedrima, što ukazuje da je ovaj molekul uključen u regulaciju plastičnih procesa u malom mozgu.
3. Smanjeni intenzitet PNM u *n. dentatus* adultnih TnC^{-/-} miševa gajenih u standardnim uslovima ukazuje na važnost TnC za sazrevanje i održavanje integriteta ovih struktura.
4. S obzirom na to da izlaganje OS u trajanju od 4 ili 8 nedelja ne indukuje razgradnju PNM u *n. dentatus* TnC^{-/-} miševa, što je s druge strane uočeno kod kontrolnih životinja nakon 8 nedelja, može se zaključiti da je prisustvo TnC neophodno kako bi došlo do remodelovanja ovih struktura koje se javlja kao posledica povećane plastičnosti nakon OS.
5. Ushodna regulacija aktivnosti MMP-9 kod kontrolnih miševa nakon izlaganja OS u trajanju od 4 nedelje koja je praćena razgradnjom PNM nakon 8 nedelja, kao i odsustvo razgradnje PNM kod MMP-9^{-/-} miševa nakon OS ukazuju na važnu ulogu MMP-9 u proteolitičkoj degradaciji PNM u malom mozgu.
6. Slaba aktivnost želatinaza kao i odsustvo degradacije PNM kod TnC^{-/-} miševa nakon izlaganja OS 8 nedelja uprkos povećanoj aktivnosti MMP-9 kod ovih miševa nakon 4 nedelje, ukazuje da je TnC uključen u regulaciju strukturne plastičnosti preko modulacije aktivnosti MMP-9.
7. Obrazac promena u organizaciji PNM i aktivnosti MMP-9 ukazuju da se strukturne promene u malom mozgu dešavaju u periodu između 4. i 8. nedelje izlaganja OS.
8. Analiza sinaptičkih markera je pokazala da je TnC uključen u regulaciju ravnoteže između ekscitacije i inhibicije pri čemu njegov nedostatak pomera ovu ravnotežu u

pravcu povećane inhibicije, što predstavlja još jedan uzrok smanjene plastičnosti u malom mozgu TnC^{-/-} miševa.

9. Prisustvo aktivnosti želatinaza u blizini sinaptičkih završetaka, kao i uočene promene u gustini i površini presinaptičkih markera kod MMP-9^{-/-} miševa jasno ukazuju na ulogu MMP-9 u sinaptičkoj plastičnosti.

10. Ispitivanje ponašajnog profila TnC^{-/-} miševa je pokazalo da TnC ima važnu ulogu u regulaciji lokomotorne aktivnosti, senzomotorne koordinacije, emocionalne reaktivnosti, kao i sposobnosti učenja i pamćenja.

11. Pozitivni efekti OS koji podrazumevaju poboljšanje senzomotorne koordinacije i kapaciteta za učenje i pamćenje, kao i smanjenje nivoa akrofobije, značajno su oslabljeni usled nedostatka TnC, što dodatno ističe važnost ovog molekula u regulaciji plastičnosti nervnog sistema.

12. Gajenje laboratorijskih životinja u OS predstavlja pouzdan eksperimentalni pristup za adekvatno ispitivanje funkcionalne uloge molekula uljučenih u kontrolu procesa plastičnosti nervnog sistema, kao što je TnC.

Ova studija pokazuje da TnC ima važnu ulogu u regulaciji strukturne plastičnosti tako što posreduje u razgradnji PNM i sinaptičkom remodelovanju preko modulacije aktivnosti MMP-9 enzima, pri čemu otvara jednu novu temu za istraživanje koja se odnosi na rasvetljavanje signalnog puta u kome TnC posreduje u sintezi i/ili aktivaciji MMP-9. Pored toga, ova studija proširuje prethodna saznanja o ulozi TnC u oblikovanju ponašanja.

7. LITERATURA

- Almonte AG, Sweatt JD (2011) Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior. *Brain Res* 1407:107-122.
- Alpar A, Gartner U, Hartig W, Bruckner G (2006) Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Res* 1120:13-22.
- Altman J, Bayer SA (1997) *Development of the cerebellar system*. New York: CRC.
- Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO (2008) Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav* 93:388-394.
- Anderson BJ, Rapp DN, Baek DH, McCloskey DP, Coburn-Litvak PS, Robinson JK (2000) Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav* 70:425-429.
- Anderson PA, Greenberg RM (2001) Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129:17-28.
- Andjus PR, Bajic A, Zhu L, Schachner M, Strata P (2005) Short-term facilitation and depression in the cerebellum: some observations on wild-type and mutant rodents deficient in the extracellular matrix molecule tenascin C. *Ann N Y Acad Sci* 1048:185-197.
- Angelucci F, De Bartolo P, Gelfo F, Foti F, Cutuli D, Bossu P, Caltagirone C, Petrosini L (2009) Increased concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat cerebellum after exposure to environmental enrichment. *Cerebellum* 8:499-506.
- Asher R, Perides G, Vanderhaeghen JJ, Bignami A (1991) Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of an hyaluronate-protein complex. *J Neurosci Res* 28:410-421.

- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 20:2427-2438.
- Ashokan A, Hegde A, Mitra R (2016) Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology* 69:189-196.
- Ayoub AE, Cai TQ, Kaplan RA, Luo J (2005) Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 481:403-415.
- Balmer TS, Carels VM, Frisch JL, Nick TA (2009) Modulation of perineuronal nets and parvalbumin with developmental song learning. *J Neurosci* 29:12878-12885.
- Barnea G, Grumet M, Milev P, Silvennoinen O, Levy JB, Sap J, Schlessinger J (1994) Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *J Biol Chem* 269:14349-14352.
- Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Sale A, Maffei L (2010) Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death Differ* 17:1092-1103.
- Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Maffei L, Sale A (2011) Brain plasticity and disease: a matter of inhibition. *Neural Plast* 2011:286073.
- Bartsch S, Bartsch U, Dorries U, Faissner A, Weller A, Ekblom P, Schachner M (1992) Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci* 12:736-749.
- Bauer DJ, Kerr AL, Swain RA (2011) Cerebellar dentate nuclei lesions reduce motivation in appetitive operant conditioning and open field exploration. *Neurobiol Learn Mem* 95:166-175.
- Bechara RG, Kelly AM (2013) Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behav Brain Res* 245:96-100.

- Begenisic T, Baroncelli L, Sansevero G, Milanese M, Bonifacino T, Bonanno G, Cioni G, Maffei L, Sale A (2014) Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 63:12-19.
- Begenisic T, Spolidoro M, Braschi C, Baroncelli L, Milanese M, Pietra G, Fabbri ME, Bonanno G, Cioni G, Maffei L, Sale A (2011) Environmental enrichment decreases GABAergic inhibition and improves cognitive abilities, synaptic plasticity, and visual functions in a mouse model of Down syndrome. *Front Cell Neurosci* 5:29.
- Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ (2011) Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol* 22:536-542.
- Bernardo MM, Fridman R (2003) TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* 374:739-745.
- Birch AM, McGarry NB, Kelly AM (2013) Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus* 23:437-450.
- Bjorklund M, Heikkila P, Koivunen E (2004) Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion. *J Biol Chem* 279:29589-29597.
- Blumcke I, Weruaga E, Kasas S, Hendrickson AE, Celio MR (1994) Discrete reduction patterns of parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in the dorsal lateral geniculate nucleus and the striate cortex of adult macaque monkeys after monocular enucleation. *Vis Neurosci* 11:1-11.
- Botanas CJ, Lee H, de la Pena JB, Dela Pena IJ, Woo T, Kim HJ, Han DH, Kim BN, Cheong JH (2016) Rearing in an enriched environment attenuated hyperactivity

- and inattention in the Spontaneously Hypertensive Rats, an animal model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Physiol Behav* 155:30-37.
- Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD (1983) Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res* 43:2796-2805.
- Bozdagi O, Nagy V, Kwei KT, Huntley GW (2007) In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J Neurophysiol* 98:334-344.
- Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 89:85-93.
- Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J (2009) A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res* 197:125-137.
- Briones TL, Klintsova AY, Greenough WT (2004) Stability of synaptic plasticity in the adult rat visual cortex induced by complex environment exposure. *Brain Res* 1018:130-135.
- Bruckner G, Hartig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K (1996) Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol* 25:333-346.
- Bruckner G, Grosche J, Schmidt S, Hartig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428:616-629.
- Bruckner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A (1993) Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8:183-200.

- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005) New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513-521.
- Bruno MA, Cuello AC (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6735-6740.
- Cao W, Duan J, Wang X, Zhong X, Hu Z, Huang F, Wang H, Zhang J, Li F, Zhang J, Luo X, Li CQ (2014) Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behav Brain Res* 265:76-83.
- Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW (2007) Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 501:83-94.
- Carulli D, Foscarin S, Rossi F (2011) Activity-dependent plasticity and gene expression modifications in the adult CNS. *Front Mol Neurosci* 4:50.
- Carulli D, Foscarin S, Faralli A, Pajaj E, Rossi F (2013) Modulation of semaphorin3A in perineuronal nets during structural plasticity in the adult cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 57:10-22.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* 494:559-577.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133:2331-2347.
- Cauwe B, Opdenakker G (2010) Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:351-423.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21:510-515.

- Chiba AA, Kesner RP, Jackson PA (2002) Two forms of spatial memory: a double dissociation between the parietal cortex and the hippocampus in the rat. *Behav Neurosci* 116:874-883.
- Chiquet-Ehrismann R (2004) Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:986-990.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200:488-499.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2004) Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1085-1089.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2011) Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47:131-139.
- Chiquet M, Fambrough DM (1984) Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol* 98:1926-1936.
- Chung CY, Erickson HP (1994) Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol* 126:539-548.
- Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP (1996) Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* 7:883-892.
- Cifuentes-Diaz C, Faille L, Goudou D, Schachner M, Rieger F, Angaut-Petit D (2002) Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *J Neurosci Res* 67:93-99.
- Cifuentes-Diaz C, Velasco E, Meunier FA, Goudou D, Belkadi L, Faille L, Murawsky M, Angaut-Petit D, Molgo J, Schachner M, Saga Y, Aizawa S, Rieger F (1998) The peripheral nerve and the neuromuscular junction are affected in the tenascin-C-deficient mouse. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:357-379.

- Colby CL, Duhamel JR (1996) Spatial representations for action in parietal cortex. *Brain Res Cogn Brain Res* 5:105-115.
- Colombel C, Lalonde R, Caston J (2004) The effects of unilateral removal of the cerebellar hemispheres on spatial learning and memory in rats. *Brain Res* 1004:108-115.
- Crespo D, Asher RA, Lin R, Rhodes KE, Fawcett JW (2007) How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol* 206:159-171.
- Crossin KL, Hoffman S, Grumet M, Thiery JP, Edelman GM (1986) Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol* 102:1917-1930.
- Cuzner ML, Opdenakker G (1999) Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 94:1-14.
- Cybulska-Klosowicz A, Zakrzewska R, Pyza E, Kossut M, Schachner M (2004) Reduced plasticity of cortical whisker representation in adult tenascin-C-deficient mice after vibrissotomy. *Eur J Neurosci* 20:1538-1544.
- Dang D, Yang Y, Li X, Atakilit A, Regezi J, Eisele D, Ellis D, Ramos DM (2004) Matrix metalloproteinases and TGFbeta1 modulate oral tumor cell matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 316:937-942.
- Darna M, Beckmann JS, Gipson CD, Bardo MT, Dwoskin LP (2015) Effect of environmental enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in medial prefrontal and orbitofrontal cortex. *Brain Res* 1599:115-125.
- Day JM, Olin AI, Murdoch AD, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, Hardingham TE, Aspberg A (2004) Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 279:12511-12518.
- De Wit J, De Winter F, Klooster J, Verhaagen J (2005) Semaphorin 3A displays a punctate distribution on the surface of neuronal cells and interacts with proteoglycans in the extracellular matrix. *Mol Cell Neurosci* 29:40-55.

- Dean RL, 3rd, Scozzafava J, Goas JA, Regan B, Beer B, Bartus RT (1981) Age-related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse. *Exp Aging Res* 7:427-451.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, Sugahara K, Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *J Biol Chem* 281:17789-17800.
- Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F (2007) Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res* 176:267-273.
- Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 159:852-859.
- Deries M, Schweitzer R, Duxson MJ (2010) Developmental fate of the mammalian myotome. *Dev Dyn* 239:2898-2910.
- Deries M, Goncalves AB, Vaz R, Martins GG, Rodrigues G, Thorsteinsdottir S (2012) Extracellular matrix remodeling accompanies axial muscle development and morphogenesis in the mouse. *Dev Dyn* 241:350-364.
- Diamond A (2000) Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and prefrontal cortex. *Child Dev* 71:44-56.
- Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR (1976) Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol* 7:75-85.
- Dityatev A, Schachner M (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 4:456-468.
- Dityatev A, Schachner M (2006) The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res* 326:647-654.
- Dityatev A, Rusakov DA (2011) Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol* 21:353-359.

- Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P (2010) The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11:735-746.
- Dityatev A, Bruckner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M (2007) Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol* 67:570-588.
- Doyon J, Penhune V, Ungerleider LG (2003) Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia* 41:252-262.
- Dziembowska M, Milek J, Janusz A, Rejmak E, Romanowska E, Gorkiewicz T, Tiron A, Bramham CR, Kaczmarek L (2012) Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9. *J Neurosci* 32:14538-14547.
- Elliott BM, Grunberg NE (2005) Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 165:187-196.
- Erickson HP, Inglesias JL (1984) A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature* 311:267-269.
- Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2011) Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3017-3022.
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2002) Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci* 22:7177-7194.
- Fabel K, Kempermann G (2008) Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Neuromolecular Med* 10:59-66.
- Faissner A (1997) The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res* 290:331-341.

- Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C (2010) Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 1803:3-19.
- Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 124:71-79.
- Ferhat L, Chevassus au Louis N, Jorquera I, Niquet J, Khrestchatsky M, Ben-Ari Y, Represa A (1996) Transient increase of tenascin-C in immature hippocampus: astroglial and neuronal expression. *J Neurocytol* 25:53-66.
- Fink AJ, Englund C, Daza RA, Pham D, Lau C, Nivison M, Kowalczyk T, Hevner RF (2006) Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci* 26:3066-3076.
- Foscarin S, Ponchione D, Pajaj E, Leto K, Gawlak M, Wilczynski GM, Rossi F, Carulli D (2011) Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS One* 6:e16666.
- Fox C, Merali Z, Harrison C (2006) Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 175:1-8.
- Franz M, Berndt A, Neri D, Galler K, Grun K, Pormann C, Reinbothe F, Mall G, Schlattmann P, Renner A, Figulla HR, Jung C, Kuthe F (2013) Matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, B(+) tenascin-C and ED-A(+) fibronectin in dilated cardiomyopathy: potential impact on disease progression and patients' prognosis. *Int J Cardiol* 168:5344-5351.
- Frick KM, Fernandez SM (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* 24:615-626.
- Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994) The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 125:669-680.

- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 12:897-904.
- Fukamauchi F, Aihara O, Kusakabe M (1998) The effects of central administration of neuropeptide Y on behavior of tenascin-gene knockout mice. *Neuropeptides* 32:461-464.
- Fukamauchi F, Wang YJ, Mataga N, Kusakabe M (1997a) Paradoxical behavioral response to apomorphine in tenascin-gene knockout mouse. *Eur J Pharmacol* 338:7-10.
- Fukamauchi F, Mataga N, Wang YJ, Sato S, Youshiki A, Kusakabe M (1996) Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 221:151-156.
- Fukamauchi F, Mataga N, Wang YJ, Sato S, Yoshiki A, Kusakabe M (1997b) Tyrosine hydroxylase activity and its mRNA level in dopaminergic neurons of tenascin gene knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 231:356-359.
- Galani R, Berthel MC, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, Cassel JC (2007) The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem* 88:1-10.
- Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, Libby P (1997) Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:483-489.
- Gall CM, Pinkstaff JK, Lauterborn JC, Xie Y, Lynch G (2003) Integrins regulate neuronal neurotrophin gene expression through effects on voltage-sensitive calcium channels. *Neuroscience* 118:925-940.
- Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW (2008) Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 27:1373-1390.

- Garcion E, Faissner A, French-Constant C (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128:2485-2496.
- Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C (2004) Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131:3423-3432.
- Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Steindler DA (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol* 361:249-266.
- Gawlak M, Gorkiewicz T, Gorlewicz A, Konopacki FA, Kaczmarek L, Wilczynski GM (2009) High resolution in situ zymography reveals matrix metalloproteinase activity at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:167-176.
- Gaytan-Tocaven L, Olvera-Cortes ME (2004) Bilateral lesion of the cerebellar-dentate nucleus impairs egocentric sequential learning but not egocentric navigation in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 82:120-127.
- Gelfo F, Cutuli D, Foti F, Laricchiuta D, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L, Angelucci F (2011) Enriched environment improves motor function and increases neurotrophins in hemicerebellar lesioned rats. *Neurorehabil Neural Repair* 25:243-252.
- Gogolla N, Caroni P, Luthi A, Herry C (2009) Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* 325:1258-1261.
- Golgi C (1893) Intorno all'origine del quarto nervo cerebrale e una questione istofisiologica che a questo argomento si collega. *Rendiconti della Reale Accademia Del Lincei* 2, 433-450.
- Golledge J, Clancy P, Maguire J, Lincz L, Koblar S (2011) The role of tenascin C in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 92:19-28.
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W (1997) Mechanism of

inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389:77-81.

Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S (2008) Elevated matrix metalloproteinase-9 and degradation of perineuronal nets in cerebrocortical multiple sclerosis plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:888-899.

Green TA, Cain ME, Thompson M, Bardo MT (2003) Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 170:235-241.

Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8075-8079.

Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU (1994) Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol Chem* 269:12142-12146.

Gundersen D, Tran-Thang C, Sordat B, Mourali F, Ruegg C (1997) Plasmin-induced proteolysis of tenascin-C: modulation by T lymphocyte-derived urokinase-type plasminogen activator and effect on T lymphocyte adhesion, activation, and cell clustering. *J Immunol* 158:1051-1060.

Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Morellini F, Lenzen M, Skouras E, Schachner M, Irintchev A (2005) Opposite impacts of tenascin-C and tenascin-R deficiency in mice on the functional outcome of facial nerve repair. *Eur J Neurosci* 22:2171-2179.

Gurevicius K, Kuang F, Stoenica L, Irintchev A, Gureviciene I, Dityatev A, Schachner M, Tanila H (2009) Genetic ablation of tenascin-C expression leads to abnormal hippocampal CA1 structure and electrical activity in vivo. *Hippocampus* 19:1232-1246.

Harauzov A, Spolidoro M, DiCristo G, De Pasquale R, Cancedda L, Pizzorusso T, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2010) Reducing intracortical inhibition in the

- adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *J Neurosci* 30:361-371.
- Harburger LL, Nzerem CK, Frick KM (2007) Single enrichment variables differentially reduce age-related memory decline in female mice. *Behav Neurosci* 121:679-688.
- Hartig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mader M, Reichenbach A, Bruckner G (1999) Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* 842:15-29.
- Hauso A, Ibrahim M, Bartsch U, Letiembre M, Celio MR, Menoud P (2000) Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Res* 864:142-145.
- Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Nishi M (2015) Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plast* 2015:256389.
- Hosseiny S, Pietri M, Petit-Paitel A, Zarif H, Heurteaux C, Chabry J, Guyon A (2015) Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. *Brain Struct Funct* 220:3435-3448.
- Husmann K, Faissner A, Schachner M (1992) Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. *J Cell Biol* 116:1475-1486.
- Imai K, Kusakabe M, Sakakura T, Nakanishi I, Okada Y (1994) Susceptibility of tenascin to degradation by matrix metalloproteinases and serine proteinases. *FEBS Lett* 352:216-218.
- Irintchev A, Rollenhagen A, Troncoso E, Kiss JZ, Schachner M (2005) Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex* 15:950-962.

- Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M (2001) Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *Embo j* 20:4782-4793.
- Jakovceviski I, Miljkovic D, Schachner M, Andjus PR (2013) Tenascins and inflammation in disorders of the nervous system. *Amino Acids* 44:1115-1127.
- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Kvist M, Hurme T, Isola J, Kalimo H, Jarvinen M (1999) Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *J Cell Sci* 112 Pt 18:3157-3166.
- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Hurme T, Kvist M, Peltto-Huikko M, Kalimo H, Jarvinen M (2003) Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *J Cell Sci* 116:857-866.
- Joester A, Faissner A (1999) Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J Biol Chem* 274:17144-17151.
- Jones BJ, Roberts DJ (1968) A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259:211.
- Jones FS, Jones PL (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218:235-259.
- Joyal CC, Strazielle C, Lalonde R (2001) Effects of dentate nucleus lesions on spatial and postural sensorimotor learning in rats. *Behav Brain Res* 122:131-137.
- Jung CK, Herms J (2014) Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: an in vivo imaging study. *Cereb Cortex* 24:377-384.
- Kalembeiyi I, Inada H, Nishiura R, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T, Yoshida T (2003) Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer* 105:53-60.

- Kammerer RA, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Fischer D, Engel J (1998) Tenascin-C hexabrachion assembly is a sequential two-step process initiated by coiled-coil alpha-helices. *J Biol Chem* 273:10602-10608.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Professional Publishing, New York.
- Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kvist M, Natri A, Jarvinen M (1998) Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J* 30:799-810.
- Kapadia M, Xu J, Sakic B (2016) The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference. *Neurosci Biobehav Rev* 68:195-217.
- Kardon G (1998) Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 125:4019-4032.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Keyvani K, Sachser N, Witte OW, Paulus W (2004) Gene expression profiling in the intact and injured brain following environmental enrichment. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:598-609.
- Kiernan BW, Garcion E, Ferguson J, Frost EE, Torres EM, Dunnett SB, Saga Y, Aizawa S, Faissner A, Kaur R, Franklin RJ, French-Constant C (1999) Myelination and behaviour of tenascin-C null transgenic mice. *Eur J Neurosci* 11:3082-3092.
- Klaus F, Amrein I (2012) Running in laboratory and wild rodents: differences in context sensitivity and plasticity of hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* 227:363-370.
- Klein T, Bischoff R (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 41:271-290.

- Koh S, Magid R, Chung H, Stine CD, Wilson DN (2007) Depressive behavior and selective down-regulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. *Epilepsy Behav* 10:26-31.
- Kruse J, Keilhauer G, Faissner A, Timpl R, Schachner M (1985) The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316:146-148.
- Kuriyama N, Duarte S, Hamada T, Busuttill RW, Coito AJ (2011) Tenascin-C: a novel mediator of hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 54:2125-2136.
- Kwok JC, Warren P, Fawcett JW (2012) Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. *Int J Biochem Cell Biol* 44:582-586.
- Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM (2005) Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem* 83:206-216.
- Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5:45-54.
- Lander C, Zhang H, Hockfield S (1998) Neurons produce a neuronal cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 18:174-183.
- Landers MS, Knott GW, Lipp HP, Poletaeva I, Welker E (2011) Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience* 199:143-152.
- Langenfeld-Oster B, Faissner A, Irintchev A, Wernig A (1994) Polyclonal antibodies against NCAM and tenascin delay endplate reinnervation. *J Neurocytol* 23:591-604.
- Leger M, Quiedeville A, Paizanis E, Natkunarajah S, Freret T, Boulouard M, Schumann-Bard P (2012) Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One* 7:e48043.

- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L (2005) Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* 163:78-90.
- Li Z, Takino T, Endo Y, Sato H (2017) Activation of MMP-9 by membrane type-1 MMP/MMP-2 axis stimulates tumor metastasis. *Cancer Sci* 108:347-353.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L (2003) Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol* 183:600-609.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Luo J (2005) The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. *Cerebellum* 4:239-245.
- Mackie EJ, Tucker RP (1999) The tenascin-C knockout revisited. *J Cell Sci* 112 (Pt 22):3847-3853.
- Mahati K, Bhagya V, Christofer T, Sneha A, Shankaranarayana Rao BS (2016) Enriched environment ameliorates depression-induced cognitive deficits and restores abnormal hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 134 Pt B:379-391.
- Mahler M, Ferhat L, Gillian A, Ben-Ari Y, Represa A (1996) Tenascin-C mRNA and tenascin-C protein immunoreactivity increase in astrocytes after activation by bFGF. *Cell Adhes Commun* 4:175-186.
- Marchese M, Cowan D, Head E, Ma D, Karimi K, Ashthorpe V, Kapadia M, Zhao H, Davis P, Sakic B (2014) Autoimmune manifestations in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 39:191-210.
- Martin SJ, de Hoz L, Morris RG (2005) Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43:609-624.

- Mataga N, Mizuguchi Y, Hensch TK (2004) Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* 44:1031-1041.
- Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castren E, Maffei L (2008) The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science* 320:385-388.
- McKay BE, Turner RW (2005) Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol* 567:829-850.
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 19:10778-10788.
- Mege RM, Nicolet M, Pincon-Raymond M, Murawsky M, Rieger F (1992) Cytotactin is involved in synaptogenesis during regeneration of the frog neuromuscular system. *Dev Biol* 149:381-394.
- Meiners S, Marone M, Rittenhouse JL, Geller HM (1993) Regulation of astrocytic tenascin by basic fibroblast growth factor. *Dev Biol* 160:480-493.
- Mesa-Gresa P, Perez-Martinez A, Redolat R (2013) Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav* 39:269-279.
- Michaluk P, Kaczmarek L (2007) Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. *Cell Death Differ* 14:1255-1258.
- Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D, Kaczmarek L (2009) Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci* 29:6007-6012.
- Michaluk P, Kolodziej L, Mioduszevska B, Wilczynski GM, Dzwonek J, Jaworski J, Gorecki DC, Ottersen OP, Kaczmarek L (2007) Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem* 282:16036-16041.
- Michaluk P, Wawrzyniak M, Alot P, Szczot M, Wyrembek P, Mercik K, Medvedev N, Wilczek E, De Roo M, Zuschratter W, Muller D, Wilczynski GM, Mozrzymas

- JW, Stewart MG, Kaczmarek L, Wlodarczyk J (2011) Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J Cell Sci* 124:3369-3380.
- Mikami T, Yasunaga D, Kitagawa H (2009) Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J Biol Chem* 284:4494-4499.
- Milev P, Fischer D, Haring M, Schulthess T, Margolis RK, Chiquet-Ehrismann R, Margolis RU (1997) The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. *J Biol Chem* 272:15501-15509.
- Mitrovic N, Schachner M (1995) Detection of tenascin-C in the nervous system of the tenascin-C mutant mouse. *J Neurosci Res* 42:710-717.
- Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, Kamei H, Nabeshima T, Itohara S, Takuma K, Sawada M, Sato J, Yamada K (2011) Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J Neurosci* 31:12963-12971.
- Mocholi E, Ballester-Lurbe B, Arque G, Poch E, Peris B, Guerri C, Dierssen M, Guasch RM, Terrado J, Perez-Roger I (2011) RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PLoS One* 6:e19236.
- Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N (2002) Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res* 138:109-133.
- Monferran S, Paupert J, Dauvillier S, Salles B, Muller C (2004) The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *Embo j* 23:3758-3768.
- Morawski M, Dityatev A, Hartlage-Rubsamen M, Blosa M, Holzer M, Flach K, Pavlica S, Dityateva G, Grosche J, Bruckner G, Schachner M (2014) Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20140046.

- Morellini F, Schachner M (2006) Enhanced novelty-induced activity, reduced anxiety, delayed resynchronization to daylight reversal and weaker muscle strength in tenascin-C-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23:1255-1268.
- Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM (2001) Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem* 276:47402-47410.
- Moscoco LM, Cremer H, Sanes JR (1998) Organization and reorganization of neuromuscular junctions in mice lacking neural cell adhesion molecule, tenascin-C, or fibroblast growth factor-5. *J Neurosci* 18:1465-1477.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562-573.
- Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, Kaczmarek L, Huntley GW (2006) Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* 26:1923-1934.
- Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N (2002) An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res* 924:124-126.
- Nakamura H, Fujii Y, Inoki I, Sugimoto K, Tanzawa K, Matsuki H, Miura R, Yamaguchi Y, Okada Y (2000) Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *J Biol Chem* 275:38885-38890.
- Nakic M, Mitrovic N, Sperk G, Schachner M (1996) Kainic acid activates transient expression of tenascin-C in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Res* 44:355-362.
- Nakic M, Manahan-Vaughan D, Reymann KG, Schachner M (1998) Long-term potentiation in vivo increases rat hippocampal tenascin-C expression. *J Neurobiol* 37:393-404.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ (2000) Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem* 275:9095-9098.

- Niederost BP, Zimmermann DR, Schwab ME, Bandtlow CE (1999) Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 19:8979-8989.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 39:569-578.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:697-709.
- Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M (2004) Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* 81:200-210.
- Noblett KL, Swain RA (2003) Pretraining enhances recovery from visuospatial deficit following cerebellar dentate nucleus lesion. *Behav Neurosci* 117:785-798.
- Oberhauser AF, Marszalek PE, Erickson HP, Fernandez JM (1998) The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* 393:181-185.
- Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, Vivien D, Agin V (2011) Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol Learn Mem* 96:121-129.
- Oddi D, Subashi E, Middei S, Bellocchio L, Lemaire-Mayo V, Guzman M, Crusio WE, D'Amato FR, Pietropaolo S (2015) Early social enrichment rescues adult behavioral and brain abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuropsychopharmacology* 40:1113-1122.
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H (1992) Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267:3581-3584.
- Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR (2006) Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 16:250-260.

- Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272:29975-29983.
- Oohira A, Matsui F, Katoh-Semba R (1991) Inhibitory effects of brain chondroitin sulfate proteoglycans on neurite outgrowth from PC12D cells. *J Neurosci* 11:822-827.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2006) Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett* 244:143-163.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563-593.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Paylor R, Nguyen M, Crawley JN, Patrick J, Beaudet A, Orr-Urtreger A (1998) Alpha7 nicotinic receptor subunits are not necessary for hippocampal-dependent learning or sensorimotor gating: a behavioral characterization of $\alpha 7$ -deficient mice. *Learn Mem* 5:302-316.
- Peterson TC, Villatoro L, Arneson T, Ahuja B, Voss S, Swain RA (2012) Behavior modification after inactivation of cerebellar dentate nuclei. *Behav Neurosci* 126:551-562.
- Petrosini L, Molinari M, Dell'Anna ME (1996) Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze. *Eur J Neurosci* 8:1882-1896.
- Pietro Paolo S, Branchi I, Cirulli F, Chiarotti F, Aloe L, Alleva E (2004) Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. *Physiol Behav* 81:443-453.
- Pinto-Hamuy T, Montero VM, Torrealba F (2004) Neurotoxic lesion of anteromedial/posterior parietal cortex disrupts spatial maze memory in blind rats. *Behav Brain Res* 153:465-470.

- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248-1251.
- Pollock E, Everest M, Brown A, Poulter MO (2014) Metalloproteinase inhibition prevents inhibitory synapse reorganization and seizure genesis. *Neurobiol Dis* 70:21-31.
- Porter MC, Burk JA, Mair RG (2000) A comparison of the effects of hippocampal or prefrontal cortical lesions on three versions of delayed non-matching-to-sample based on positional or spatial cues. *Behav Brain Res* 109:69-81.
- Prieto AL, Andersson-Fisone C, Crossin KL (1992) Characterization of multiple adhesive and counteradhesive domains in the extracellular matrix protein cytostactin. *J Cell Biol* 119:663-678.
- Pugh JR, Raman IM (2008) Mechanisms of potentiation of mossy fiber EPSCs in the cerebellar nuclei by coincident synaptic excitation and inhibition. *J Neurosci* 28:10549-10560.
- Pyka M, Wetzel C, Aguado A, Geissler M, Hatt H, Faissner A (2011) Chondroitin sulfate proteoglycans regulate astrocyte-dependent synaptogenesis and modulate synaptic activity in primary embryonic hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 33:2187-2202.
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y (2000) Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12880-12884.
- Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment selectively increases 5-HT_{1A} receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 53:285-290.
- Rauch U, Clement A, Retzler C, Frohlich L, Fassler R, Gohring W, Faissner A (1997) Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *J Biol Chem* 272:26905-26912.

- Reeves TM, Prins ML, Zhu J, Povlishock JT, Phillips LL (2003) Matrix metalloproteinase inhibition alters functional and structural correlates of deafferentation-induced sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci* 23:10182-10189.
- Reimers S, Hartlage-Rubsamen M, Bruckner G, Rossner S (2007) Formation of perineuronal nets in organotypic mouse brain slice cultures is independent of neuronal glutamatergic activity. *Eur J Neurosci* 25:2640-2648.
- Rettig WJ, Triche TJ, Garin-Chesa P (1989) Stimulation of human neuronectin secretion by brain-derived growth factors. *Brain Res* 487:171-177.
- Rhodes KE, Fawcett JW (2004) Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 204:33-48.
- Riou JF, Umbhauer M, Shi DL, Boucaut JC (1992) Tenascin: a potential modulator of cell-extracellular matrix interactions during vertebrate embryogenesis. *Biol Cell* 75:1-9.
- Rivera S, Khrestchatsky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM (2010) Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci* 30:15337-15357.
- Roderfeld M, Graf J, Giese B, Salguero-Palacios R, Tschuschner A, Muller-Newen G, Roeb E (2007) Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol Chem* 388:1227-1234.
- Rondi-Reig L, Le Marec N, Caston J, Mariani J (2002) The role of climbing and parallel fibers inputs to cerebellar cortex in navigation. *Behav Brain Res* 132:11-18.
- Rosenbaum RS, Priselac S, Kohler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M (2000) Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nat Neurosci* 3:1044-1048.
- Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 153:563-576.
- Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S (1992) Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821-1831.

- Sakic B, Szechtman H, Talangbayan H, Denburg SD, Carbotte RM, Denburg JA (1994) Disturbed emotionality in autoimmune MRL-lpr mice. *Physiol Behav* 56:609-617.
- Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L (2007) Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* 10:679-681.
- Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA (2011) The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience* 180:9-18.
- Sato Y, Endo T (2010) Alteration of brain glycoproteins during aging. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1:S32-40.
- Save E, Paz-Villagran V, Alexinsky T, Poucet B (2005) Functional interaction between the associative parietal cortex and hippocampal place cell firing in the rat. *Eur J Neurosci* 21:522-530.
- Scali M, Begenisic T, Mainardi M, Milanese M, Bonifacino T, Bonanno G, Sale A, Maffei L (2013) Fluoxetine treatment promotes functional recovery in a rat model of cervical spinal cord injury. *Sci Rep* 3:2217.
- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Wurbel H (2002) Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73:209-224.
- Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P, Mora F (2010) Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neural Transm (Vienna)* 117:1123-1130.
- Sekeljic V, Andjus PR (2012) Tenascin-C and its functions in neuronal plasticity. *Int J Biochem Cell Biol* 44:825-829.
- Serradj N, Picquet F, Jamon M (2013) Early postnatal motor experience shapes the motor properties of C57BL/6J adult mice. *Eur J Neurosci* 38:3281-3291.

- Settles DL, Kusakabe M, Steindler DA, Fillmore H, Erickson HP (1997) Tenascin-C knockout mouse has no detectable tenascin-C protein. *J Neurosci Res* 47:109-117.
- Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG (2009) PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* 326:592-596.
- Simpson J, Kelly JP (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 222:246-264.
- Siri A, Knauper V, Veirana N, Caocci F, Murphy G, Zardi L (1995) Different susceptibility of small and large human tenascin-C isoforms to degradation by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 270:8650-8654.
- Snow DM, Brown EM, Letourneau PC (1996) Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to laminin or fibronectin. *Int J Dev Neurosci* 14:331-349.
- Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15753-15757.
- Stamenkovic I (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200:448-464.
- Stamenkovic V, Stamenkovic S, Jaworski T, Gawlak M, Jovanovic M, Jakovcevski I, Wilczynski GM, Kaczmarek L, Schachner M, Radenovic L, Andjus PR (2017) The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C and matrix metalloproteinases modify cerebellar structural plasticity by exposure to an enriched environment. *Brain Struct Funct* 222:393-415.
- Stawarski M, Stefaniuk M, Włodarczyk J (2014) Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Front Neuroanat* 8:68.
- Steffensen B, Wallon UM, Overall CM (1995) Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 270:11555-11566.

- Stegemann C, Didangelos A, Barallobre-Barreiro J, Langley SR, Mandal K, Jahangiri M, Mayr M (2013) Proteomic identification of matrix metalloproteinase substrates in the human vasculature. *Circ Cardiovasc Genet* 6:106-117.
- Strekalova T, Sun M, Sibbe M, Evers M, Dityatev A, Gass P, Schachner M (2002) Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* 21:173-187.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270:5331-5338.
- Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L (2002) Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22:920-930.
- Tan SS, Crossin KL, Hoffman S, Edelman GM (1987) Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7977-7981.
- ter Horst JP, de Kloet ER, Schachinger H, Oitzl MS (2012) Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. *Cell Mol Neurobiol* 32:725-735.
- Tian L, Stefanidakis M, Ning L, Van Lint P, Nyman-Huttunen H, Libert C, Itohara S, Mishina M, Rauvala H, Gahmberg CG (2007) Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J Cell Biol* 178:687-700.
- Toole BP (2001) Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12:79-87.
- Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 93:83-90.
- Tsilibary E, Tzinia A, Radenovic L, Stamenkovic V, Lebitko T, Mucha M, Pawlak R, Frischknecht R, Kaczmarek L (2014) Neural ECM proteases in learning and synaptic plasticity. *Prog Brain Res* 214:135-157.

- Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R (2009) The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 1793:888-892.
- Tucker RP, Drabikowski K, Hess JF, Ferralli J, Chiquet-Ehrismann R, Adams JC (2006) Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC Evol Biol* 6:60.
- Turk BE, Huang LL, Piro ET, Cantley LC (2001) Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries. *Nat Biotechnol* 19:661-667.
- Uusisaari M, Knopfel T (2011) Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei. *Cerebellum* 10:637-646.
- Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A, Belin MF, Thomasset N (1999) Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci* 19:4994-5004.
- Vaillant C, Meissirel C, Mutin M, Belin MF, Lund LR, Thomasset N (2003) MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 24:395-408.
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37:375-536.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.
- Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA (2000) Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry* 47:864-873.
- Verslegers M, Lemmens K, Van Hove I, Moons L (2013) Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. *Prog Neurobiol* 105:60-78.

- Volpato FZ, Fuhrmann T, Migliaresi C, Hutmacher DW, Dalton PD (2013) Using extracellular matrix for regenerative medicine in the spinal cord. *Biomaterials* 34:4945-4955.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-422.
- Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83:482-504.
- Wang D, Fawcett J (2012) The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 349:147-160.
- Wang XB, Bozdagi O, Nikitczuk JS, Zhai ZW, Zhou Q, Huntley GW (2008) Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19520-19525.
- Wegner F, Hartig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Bruckner G (2003) Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 184:705-714.
- Wiera G, Wojtowicz T, Lebida K, Piotrowska A, Drulis-Fajdasz D, Gomulkiewicz A, Gendosz D, Podhorska-Okolow M, Capogna M, Wilczynski G, Dziegiel P, Kaczmarek L, Mozrzymas JW (2012) Long term potentiation affects intracellular metalloproteinases activity in the mossy fiber-CA3 pathway. *Mol Cell Neurosci* 50:147-159.
- Wilczynski GM, Konopacki FA, Wilczek E, Lasiacka Z, Gorlewicz A, Michaluk P, Wawrzyniak M, Malinowska M, Okulski P, Kolodziej LR, Konopka W, Duniec K, Mioduszewska B, Nikolaev E, Walczak A, Owczarek D, Gorecki DC, Zuschratter W, Ottersen OP, Kaczmarek L (2008) Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol* 180:1021-1035.

- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR (2004) Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol* 72:167-182.
- Williams ME, de Wit J, Ghosh A (2010) Molecular mechanisms of synaptic specificity in developing neural circuits. *Neuron* 68:9-18.
- Wlodarczyk J, Mukhina I, Kaczmarek L, Dityatev A (2011) Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Dev Neurobiol* 71:1040-1053.
- Xu Y, Li Z, Jiang P, Wu G, Chen K, Zhang X, Li X (2015) The co-expression of MMP-9 and Tenascin-C is significantly associated with the progression and prognosis of pancreatic cancer. *Diagn Pathol* 10:211.
- Yamada J, Jinno S (2013) Spatio-temporal differences in perineuronal net expression in the mouse hippocampus, with reference to parvalbumin. *Neuroscience* 253:368-379.
- Yamaguchi Y (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:276-289.
- Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA (2010) Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 112:134-149.
- Ye Q, Miao QL (2013) Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biol* 32:352-363.
- Yeshenko O, Guazzelli A, Mizumori SJ (2004) Context-dependent reorganization of spatial and movement representations by simultaneously recorded hippocampal and striatal neurons during performance of allocentric and egocentric tasks. *Behav Neurosci* 118:751-769.
- Yuasa S (1996) Bergmann glial development in the mouse cerebellum as revealed by tenascin expression. *Anat Embryol (Berl)* 194:223-234.

- Zhao HM, Wenthold RJ, Petralia RS (1998) Glutamate receptor targeting to synaptic populations on Purkinje cells is developmentally regulated. *J Neurosci* 18:5517-5528.
- Zhou X, Panizzutti R, de Villers-Sidani E, Madeira C, Merzenich MM (2011) Natural restoration of critical period plasticity in the juvenile and adult primary auditory cortex. *J Neurosci* 31:5625-5634.
- Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Wurbel H (2001) Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res* 121:11-20.
- Zink D, Fischer AH, Nickerson JA (2004) Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 4:677-687.

8. BIOGRAFIJA

Vera Stamenković (rođeno Šekeljić) je rođena 19. avgusta 1985. godine u Beogradu, gde je 2000. godine završila osnovnu školu „Filip Filipović” kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Od 2000. do 2004. godine pohađala je XII beogradsku gimnaziju „Dimitrije Tucović”, koju je takođe završila kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Tokom srednjoškolskog obrazovanja bila je dobitnik stipendije Ministarstva obrazovanja za školsku godinu 2002/2003. i 2003/2004. Godine 2004. upisuje Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, usmerenje Fiziologija životinja. Tokom osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva nauke za školsku godinu 2005/2006, 2006/2007. i 2007/2008, kao i stipendista grada Beograda za talentovane studente 2007, 2008. i 2009. godine. Godine 2009. je diplomirala na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,68. Godine 2010. upisuje Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Neuronauke, modul Neurofiziologija sa biofizikom. Eksperimentalni deo doktorske disertacije je uradila u Centru za lasersku mikroskopiju, Instituta za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kao student doktorskih studija postaje stipendista Ministarstva nauke i prosvete na projektu „Biomarkeri u neurodegenerativnim i malignim procesima” za školsku godinu 2010/2011. i 2011/2012. Od 2012. godine je preko istog projekta zaposlena kao istraživač-pripravnik, a potom iste godine izabrana u zvanje istraživač-saradnik na Institutu za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Koautor je četiri rada kategorije M21, četiri rada kategorije M22 i dva poglavlja u knjigama kategorije M14 i M42. Koautor je i 22 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i 7 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64). Radovi autora su do juna 2017. godine citirani 25 puta u časopisima sa JCR liste (bez autocitata).

Rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radovima:

- **Stamenkovic V**, Milenkovic I, Galjak N, Todorovic V, Andjus P. Enriched environment alters the behavioral profile of tenascin-C deficient mice. *Behav Brain Res.* 2017 Jul 28;331:241-253.
- **Stamenkovic V**, Stamenkovic S, Jaworski T, Gawlak M, Jovanovic M, Jakovcevski I, Wilczynski GM, Kaczmarek L, Schachner M, Radenovic L, Andjus PR. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C and matrix metalloproteinases modify cerebellar structural plasticity by exposure to an enriched environment. *Brain Struct Funct.* 2017 Jan;222(1):393-415.
- Tsilibary E, Tzinia A, Radenovic L, **Stamenkovic V**, Lebitko T, Mucha M, Pawlak R, Frischknecht R, Kaczmarek L. Neural ECM proteases in learning and synaptic plasticity. *Prog Brain Res.* 2014;214:135-57.
- **Šekeljić V**, Andjus PR. Tenascin-C and its functions in neuronal plasticity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jun;44(6):825-9.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Вера Стаменковић

број индекса Б3009/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање улоге молекула ванћелијског матрикса тенасцина-Ц у регулацији структурне и функционалне пластичности малог мозга и обликовању понашања миша након излагања условима обогаћене средине“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 7.7.2017.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вера Стаменковић

Број индекса Б3009/2010

Студијски програм Неуронауке

Наслов рада „Испитивање улоге молекула ванћелијског матрикса тенасцина-Ц у регулацији структурне и функционалне пластичности малог мозга и обликовању понашања миша након излагања условима обогаћене средине“

Ментор др Павле Р. Анђус, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани/а Вера Стаменковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 7.7.2017.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Испитивање улоге молекула ванћелијског матрикса тенасцина-Ц у регулацији структурне и функционалне пластичности малог мозга и обликовању понашања миша након излагања условима обогаћене средине“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 7.7.2017.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.