



Univerzita Karlova v Praze  
3. lékařská fakulta

**Úloha proteinázami aktivovaného receptoru 2 v patogenezi  
neurodegenerativních onemocnění**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Role of proteinase-activated receptor 2 in pathogenesis of  
neurodegenerative diseases**

DISSERTATION

MUDr. Zdeněk Rohan

Oddělení patologie a molekulární medicíny, Thomayerova nemocnice, Praha

Školitel: doc. MUDr. Radoslav Matěj, Ph. D.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání stejného nebo jiného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu *Theses.cz* za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 22. února 2016

MUDr. Zdeněk Rohan

## Identifikační záznam

ROHAN, Zdeněk. Úloha proteinázou aktivovaného receptoru 2 v patogenezi neurodegenerativních onemocnění. [Role of proteinase-activated receptor 2 in pathogenesis of neurodegenerative diseases.] Praha, 2016. Počet stran 114, počet příloh 0. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta. Oddělení patologie a molekulární medicíny, Thomayerova nemocnice, Praha. Školitel: doc. MUDr. Radoslav Matěj, Ph. D.

**Klíčová slova:** Proteinázami aktivované receptory; neurodegenerativní onemocnění; Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc; synukleinopatie; mnohotná systémová atrofie; prionová onemocnění; oligodendroglie

**Key words:** Proteinase-activated receptors; neurodegenerative diseases; Alzheimer disease; Parkinson disease; synucleinopathies; multiple system atrophy; prion diseases; oligodendroglia

## Poděkování

Na tomto místě bych v první řadě rád poděkoval svému školiteli doc. MUDr. Radoslavu Matějovi, Ph. D. za odborné vedení a cenné rady během mého postgraduálního studia a při zpracovávání této práce.

Doc. Dr. Gáborovi G. Kovácsovi, Ph. D. za odborné vedení během vědecko-výzkumných stáží na Ústavu Klinické Neurologie AKH/MUW ve Vídni.

MUDr. Tomášovi Olejárovi, Ph. D. za podnětné připomínky a rady v průběhu experimentálních prací a k finální verzi této práce.

Thomasovi Secrestovi, MSc. za korekturu anglicky psané části práce

Dále děkuji kolektivu pracovníků imunologické, bioptické a molekulárně-genetické laboratoře Oddělení patologie a molekulární medicíny Thomayerovy nemocnice za odbornou asistenci při realizaci jednotlivých výzkumných prací.

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Struktura a mechanismy aktivace PARs.</b>	<b>1</b>
1.1.1 Struktura PARs.	1
1.1.2 Aktivace PARs	3
1.1.3 Proteinázy	4
1.1.3.1 Mozkové proteinázy	5
1.1.3.1.1 P22	6
1.1.3.1.2 Kallikrein 6	7
1.1.3.1.3 Kallikrein 8	8
1.1.3.1.4 Trypsin IV.	9
1.1.3.1.5 Neurotrypsin	10
1.1.3.1.6 Tkáňové metaloproteinázy	10
1.1.4 Inhibitory proteináz.	10
1.1.5 Obecný vztah PAR–ligand	12
<b>1.2 Signalizace a regulace aktivity PARs.</b>	<b>13</b>
1.2.1 Signalizace G-proteiny	13
1.2.2 $\beta$ -arrestiny	16
1.2.3 Biased signalizace	17
1.2.4 Ukončení signalizace PARs.	18
1.2.5 Posttranslační translokace PARs na cytoplazmatickou membránu.	20
1.2.6 Komplexní vztahy mezi PARs	21
1.2.6.1 Homodimery a heterodimery PARs	21
1.2.6.2 Transaktivace PARs.	23
<b>1.3 Úloha PARs v patofyziologii základních orgánových systémů.</b>	<b>24</b>
1.3.1 Kardiovaskulární systém a hemostáza.	25
1.3.2 Respirační systém	26
1.3.3 Gastrointestinální systém.	27
1.3.4 Urogenitální systém.	28
1.3.5 Pohybový systém	29
1.3.6 Nádorová onemocnění	29
1.3.7 Periferní nervový systém	32
<b>1.4 Role PARs v centrálním nervovém systému</b>	<b>32</b>
1.4.1 Neuroprotektivní mechanismy.	34
1.4.2 Neurotoxické mechanismy	35

1.4.3	Vaskulární patologie CNS . . . . .	36
1.4.4	Alzheimerova nemoc . . . . .	38
1.4.5	Parkinsonova nemoc . . . . .	39
1.4.6	Prionová onemocnění. . . . .	41
1.4.7	Demyelinizující onemocnění. . . . .	42
1.4.8	Onemocnění motorického neuronu. . . . .	44
1.4.9	HIV-asociovaná encefalopatie . . . . .	45
1.5	Terapeutické aspekty. . . . .	47
1.6	Použitá literatura. . . . .	49
2	<b>Cíle práce</b>	<b>62</b>
2.1	<b>Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkérům</b>	<b>62</b>
2.2	<b>Charakterizace oligodendroglální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako model pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglální patologie.</b>	<b>62</b>
2.3	<b>Charakterizace topografie patologie <math>\alpha</math>-synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2</b>	<b>62</b>
2.4	<b>Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění</b>	<b>62</b>
2.5	<b>Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastnících se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů</b>	<b>62</b>
3	<b>Výsledky</b>	<b>63</b>
3.1	<b>Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkérům</b>	<b>63</b>
3.2	<b>Charakterizace oligodendroglální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako základní předpoklad pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglální patologie</b>	<b>71</b>
3.3	<b>Charakterizace topografie patologie <math>\alpha</math>-synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální</b>	

protektivní funkci PAR2 . . . . .	.80
3.4 Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění . . . . .	.85
3.5 Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastníci se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů . . . . .	.88
<b>4 Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz práce</b>	<b>100</b>
4.1 Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkérům . . . . .	100
4.2 Charakterizace oligodendroglální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako základní předpoklad pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglální patologie . . . . .	101
4.3 Charakterizace topografie patologie $\alpha$ -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2 . . . . .	102
4.4 Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění . . . . .	103
4.5 Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastníci se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů . . . . .	103
<b>5 Závěr</b>	<b>105</b>
<b>6 Summary</b>	<b>108</b>
<b>7 Přehled publikační a odborné aktivity</b>	<b>111</b>
7.1 Publikace v recenzovaných časopisech s IF . . . . .	111
7.2 Publikace v recenzovaných časopisech bez IF . . . . .	112
7.3 Monografické publikace . . . . .	112
7.4 Odborná sdělení na kongresech či seminářích . . . . .	113
7.5 Absolvované stáže a kurzy . . . . .	114
7.6 Získaná ocenění . . . . .	114

## Seznam zkratek

A $\beta$	amyloid beta
AC	adenylát cykláza
ADAM	a tissue disintegrator and metalloproteinase
ALIX	ALG-2-interacting protein X
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AMP	adenosin monofosfát
ATP	adenosin trifosfát
AP2	adaptorový protein 2
APC	aktivovaný protein C
APP	amyloidový prekurzorový protein
CNS	centrální nervový systém
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CA	cornu Ammonis
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CNPáza	2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
COX-2	cyklooxygenáza 2
CXCR	CXC chemokinový receptor
EAE	experimentální autoimunitní encefalitida
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EMT	epitelomezenchymová transdiferenciace
EPCR	endothelial protein C receptor
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
F2R	factor II receptor
F2RL1	F2R receptor-like 1
F2RL2	F2R receptor-like 2
F2RL3	F2R receptor like 3
GTP	guanosin trifosfát



GFAP	gliální fibrilární acidický protein
GPCR	G-protein coupled receptor
GRO/CINC-1	growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1
GRK	G-protein receptor kinase
HAND	HIV-associated neurocognitive disorder
HGF	hepatocyte growth factor
HIV	human immunodeficiency virus
HSP70	heat shock protein 70
IBD	inflammatory bowel disease
IL	interleukin
iNOS	inducibilní NO syntáza
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
IPF	idiopatická plicní fibróza
JNK	Jun-asociovaná kináza
KO	knock-out
MAP2	microtubule-associated protein 2
MAPK	mitogen-associated protein kinase
MMP	matrixová metaloproteináza
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MSA	mnohotná systémová atrofie
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PAR	proteinase-activated receptor
PDGF	platelet-derived growth factor
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C

PLP	fosfolipidový protein
RS	roztroušená skleróza mozkomíšni
RTK	receptor tyrosine kinase
SOD1	superoxid dismutáza
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
sVEGFR-1	soluble VEGF receptor-1
Tat	transactivator of transcription
TF/VIIa	komplex tkáňového faktoru a aktivovaného faktoru VII
TGF $\beta$	transforming growth factor beta
TGFBR	TGF $\beta$ receptor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TL	tethered ligand
TM1–TM7	transmembránová doména 1–7
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
tPA	tkáňový aktivátor plasminogenu
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	wild-type
ZO-1	zonula occludens protein 1

# 1 Úvod

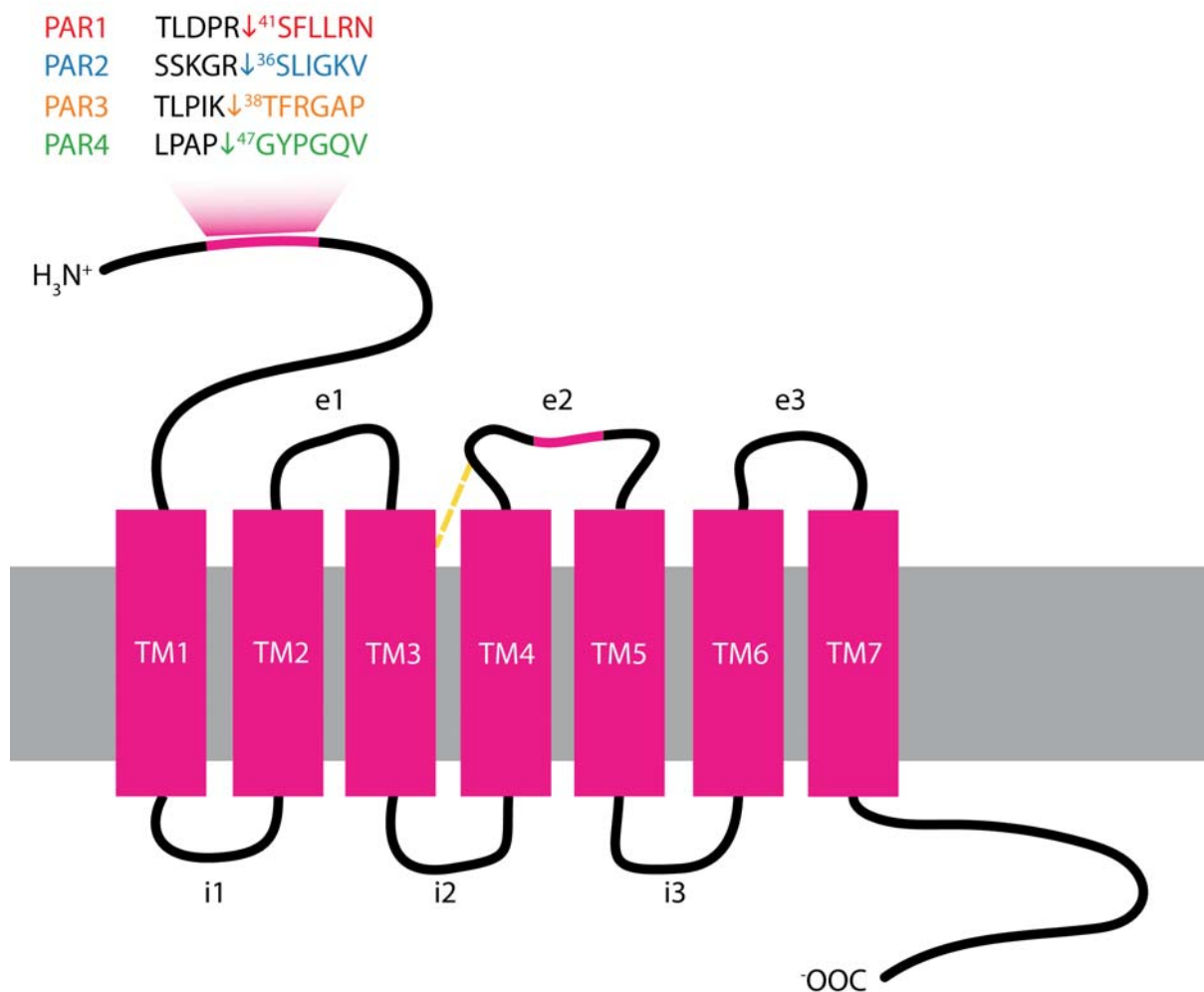
Základem homeostázy jednotlivých buněk a celého organismu je přenos informací a molekul přes membrány. Přenos signálů přes membránu je jedním z klíčových mechanismů regulace buněčné aktivity. Tato komunikace buňky s okolím probíhá přes systém membránových a cytoplazmatických receptorů a jejím výsledkem je ovlivnění prakticky všech aspektů života buňky – od buněčného dělení, přes regulaci genové exprese až po regulaci funkce jednotlivých komponent buňky, od úrovně jednotlivých biomolekul po celé organelové systémy. Pro tyto účely exprimují buňky celou řadu různých typů receptorů, z nichž nejvíce zastoupené jsou receptory spřažené s G-proteiny. Mezi ně patří tzv. proteinázami-aktivované receptory, které převádějí do buňky signály zprostředkované proteinázami. Ty mají kromě své proteolytické funkce i důležitou funkci informačních molekul, které ovlivňují celou řadu buněčných dějů a jsou tak klíčovými elementy ovlivňujícími fyziologické a patofyziologické děje.

## 1.1 Struktura a mechanismy aktivace PARs

Proteinázami aktivované receptory (PARs, dle Nomenclature Committee of International Union of Basic and Clinical Pharmacology) patří do superrodiny receptorů spřaženými s G-proteiny (G-protein coupled receptors, GPCRs). PARs jsou ubikvitně exprimované transmembránové receptory spřažené s G-proteinem, které se účastní regulace odpovědi buněk na přítomnost extracelulárních proteináz. Doposud byly popsány čtyři podtypy PARs: PAR1 (Rasmussen et al. 1991; Vu et al. 1991), PAR2 (Nystedt et al. 1994), PAR3 (Ishihara et al. 1997) a PAR4 (Kahn et al. 1998a; Xu et al. 1998), které se liší specificitou pro své ligandy, proteinázy, a charakterem signálních kaskád následujících po jejich aktivaci.

### 1.1.1 Struktura PARs

PAR1 (gen *F2R* – Factor 2 Receptor; Gene ID: 2149), PAR2 (gen *F2RL1* – coagulation Factor 2 Receptor-Like 1; Gene ID: 2150) a PAR3 (gen *F2RL2*; Gene ID: 2151) jsou kódovány na dlouhém raménku 5. chromozómu (5q31), PAR4 (gen *F2RL3*; Gene ID: 9002) je kódován na krátkém raménku 19. chromozómu (19p12). Každý gen je tvořen jedním intronem a dvěma exony, které



### Obrázek 1: Obecné schéma struktury PAR

Svislou šipkou je znázorněno místo štěpení proteinázou, barevně je vyznačena sekvence TL jednotlivých PARs, která se váže na e2 kličku (schématicky barevně znázorněno).

kódují signální peptid a vlastní protein (Kahn et al. 1998a; Schmidt et al. 1997).

Z PARs byl zatím úspěšně krystalizován PAR1 s navázaným agonistou, vorapaxarem (Zhang et al. 2012a). Krystalografické získání přesné struktury GPCR, a zvláště PARs, v aktivní konformaci je díky termodynamické nestabilitě aktivovaného receptoru komplikované a k udržení termodynamické stability komplexu je potřeba užít specifických modifikací (mutace, fúzní proteiny). V aktivní konformaci byly proto z GPCR zatím popsány lidský  $\beta$ 2-adrenergní receptor, lidský receptor pro adenosin (A2A) a krysí receptor pro neurotensin.

Proteinázami aktivované receptory patří do IV-B topologické třídy integrálních membránových proteinů (kam kromě GPCR patří transportéry pro glukózu – GLUT, napěťově řízené kalciové

kanály a také např. CFTR), které jsou tvořeny sedmi transmembránovými  $\alpha$ -helikálními doménami (TM1–TM7), extracelulárním N-koncem a intracelulárním C-koncem. Součástí N-konce je signální peptid o délce 17–26 aminokyselin a propeptid o délce 11–30 aminokyselin. Mezi transmembránovými doménami jsou tři intracelulární (i1–i3) a tři extracelulární (e1–e3) kličky, intracelulární C-konec je délky 13–51 aminokyselin. Terciární struktura PARs je stabilizována kovalentní disulfidovou vazbou mezi cysteiny TM2 a e2 kličky (Adams et al. 2011b) (Obrázek 1). Na základě dat z recentní úspěšné krystalizace struktury PAR1 se ukázalo, že PAR1 (a lze tedy očekávat že i PAR2, PAR3 a PAR4) jsou vzdálenějšími příbuznými rodiny A GPCR (tzv. rhodopsinová rodina). Přesněji, PAR1 patří do  $\delta$ -podrodiny spolu s purinergními, glykoproteinovými a čichovými receptory. Od  $\beta$ 2-adrenergního receptoru, strukturálního i funkčního „etalonu“ GPCRs, se PAR1 (a další PARs) liší zejména způsobem vazby ligandu a mechanismem konformační změny, která přenáší informaci z extracelulárního prostředí k cytoplazmatickým doménám interagujícím s G-proteiny.

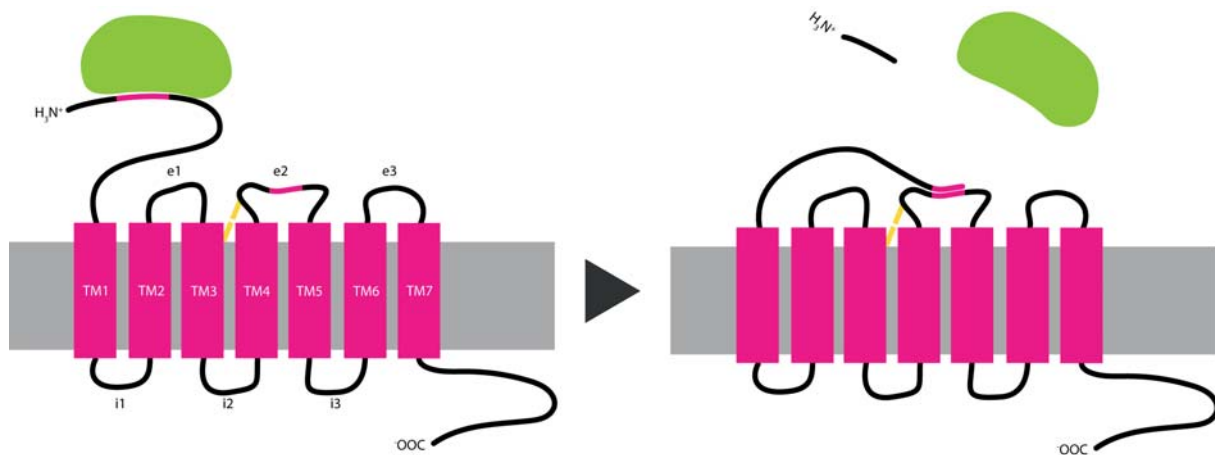
Posttranslační modifikace PARs zahrnují N-glykosylaci N-konce, e2 a e3, ubiquitylaci a fosforylaci na C-konci a i1–i3 a palmitoylaci na C-konci.

Na N-konci tzv. trombin-senzitivních PARs, PAR1 a PAR3, jsou hirudinové domény, které usnadňují vazbu trombinu, třetí trombin-senzitivní PAR, PAR4, ale hirudinovou doménu neobsahuje a vazba trombinu na PAR4 je nízkoafinitní a rychlost jeho disociace z PAR4 je snížena (Kahn et al. 1998b).

### 1.1.2 Aktivace PARs

Přirozeným ligandem PARs nejsou, jako v případě jiných GPCRs, relativně jednoduché molekuly (např. katecholaminy), ale makromolekuly – proteinázy, které interagují s N-koncem PARs, který ve specifické sekvenci rozštěpí, čímž dojde ke vzniku intrinsického neoligandu (tzv. tethered ligand, TL), který se následně ireverzibilně váže na e2 kličku PAR a tím jej aktivuje (Obrázek 2). PARs tak lze charakterizovat nejen vazebným místem a afinitou pro daný ligand (proteinázu), ale i sekvencí na N-konci, kterou proteináza štěpí a která je pro jednotlivé PARs specifická (Obrázek 1)(Adams et al. 2011b).

Zásadním poznatkem pro výzkum a pochopení účinku PARs na buněčné děje je princip ligandové pleiotropie a receptorové redundance. Ligandová pleiotropie je založena na schopnosti



**Obrázek 2: Schéma aktivace PAR**

*Zeleně je znázorněna aktivující proteináza, která odštěpí část N-konce PAR; odhalený TL na N-konci se pak váže na e2 kličku*

jedné proteinázy aktivovat různé PARs, receptorová redundance je schopnost jednoho PAR být aktivovaný více různými proteinázami. Spolu s tzv. biased agonismem, transaktivací, homodimerizací a heterodimerizací PARs, interakcemi s jinými makromolekulami a s řadou navazujících signálních kaskád, které mohou být s aktivací PARs asociované se tak jedná o komplexní faktory zásadně ovlivňující výsledné (pato)fyziologické děje.

### 1.1.3 Proteinázy

Od poloviny 60. let je známo, že pepsin a chymotrypsin mohou navodit hormonální efekt ve tkáních, např. syntézu glykogenu či indukovat mitogenní aktivitu (Ramachandran et al. 2012). Tyto poznatky postupně ukázaly, že proteinázy mají nejen digestivní, ale také signální hormonální funkci. Podobně jako v případě klasických hormonů je fyziologická aktivita proteináz realizována autokrinní, juxtakrinní a parakrinní sekrecí a významná je také jejich endokrinní aktivita, kterou lze předpokládat u různých patologických stavů spojených s masivním uvolněním proteináz do oběhu (typicky při akutní pankreatitidě či diseminované intravaskulární koagulopatii). Význam proteináz je mimo jiné podtržen i faktem, že přibližně 2 % lidského genomu kóduje proteinázy a jejich inhibitory (Hollenberg et al. 2014).

Pro pochopení funkce PARs je tak zásadní vzít v potaz aktivitu proteináz schopných interakce s PARs za fyziologických i patologických podmínek.

Ve vztahu k PARs lze proteinázy rozdělit na aktivační a inaktivační. Aktivační proteinázy štěpí

N-konec PAR a demaskují TL, který následně PAR aktivuje. Inaktivační proteínázy štěpí N-konec mimo oblast TL, blíže k TM1, čímž sekvenci TL odstraní z dosahu svého vazebného místa na receptoru.

Přesné místo štěpení N-konce PARs se pro různé proteínázy liší. Kromě kanonických sekvencí, ve kterých jsou PARs štěpeny trombinem či trypsinem, existují i jiná (nekanonická) místa, ve kterých dochází ke štěpení N-konce jinými proteínázami (Hollenberg et al. 2014) (Obrázek 3, Obrázek 4). Navíc bylo prokázáno, že přesné místo štěpení PARs může být ovlivněno i buněčným typem, který daný PAR exprimuje. Na modelu karcinomu prsu štěpila MMP1 N-konec PAR1 na fibroblastech ve stejném místě jako trombin (Obrázek 3) a potencovala tak invazivní růst nádoru. Na trombocytech však MMP1 štěpila PAR1 ve svém kanonickém místě (Obrázek 3) čímž došlo k aktivaci jiné signální dráhy a RhoA kinázy (Canto et al. 2012).

Inhibice aktivity proteínáz (vedle downregulace PARs) je zásadním regulačním mechanismem jejich správné fyziologické funkce. Proteolytická aktivita proteínáz a její přesná modulace je, v případě CNS, důležitá pro embryogenezi, synaptickou plasticitu a reparativní procesy v CNS (Lendeckel a Hooper 2005). Inhibice proteínázy může nepřímo vést jak k zabránění aktivace PARs (inhibicí aktivující proteínázy) tak i podpoře aktivace PARs inhibicí inaktivující proteínázy. Tímto se ke složitosti na úrovni signalizace jednotlivých PARs, jejich interakcemi mezi sebou či jinými receptory a různými aktivujícími a inaktivujícími proteínázami přidává další faktor, který interpretaci a snahu o porozumění role PARs ještě více komplikuje.

Ve fyziologii i patofyziologii organismu tak PARs spolu s proteínázami a jejich inhibitory tvoří komplexní a neoddělitelný funkční celek a právě specifická konfigurace těchto jednotlivých prvků spolu s příslušnými intracelulárními signálními ději určí výsledný fenotypický efekt.

### **1.1.3.1 Mozkové proteínázy**

Přítomnost aktivní proteínázy v mozkové tkáni implikuje její úlohu nejen v rámci digestivních či resorptivně-reparativních dějů, ale i její úlohu jako signální molekuly, která interaguje s PAR exprimovaným na povrchu buňky. V mozku je řada buněčných typů a každý z nich může či nemusí, ať už za fyziologických či patologických podmínek, PAR exprimovat. Pohled na buňku (například neuron) jako na zodpovědného hospodáře nabádá k úvaze, že PARs jsou exprimovány pouze při stavech, kdy buňka „očekává“ přítomnost proteínázy ve svém okolí. Mozek jako velmi

dynamická struktura tyto požadavky částečně splňuje, nicméně je potřeba rozlišit, zda se jedná o fyziologickou aktivitu proteináz či aktivitu indukovanou patogenním procesem. Z hlediska patofyziologické role PAR2 a PARs obecně tak záleží na charakteru léze. Zásadní je posouzení integrity hematoencefalické bariéry (typicky při ischemických, hemoragických, zánětlivých a traumatických lézích), časových aspektů (akutní infarkt, např. ischemie versus chronický proces, typicky neurodegenerativní onemocnění) a patofyziologického podkladu onemocnění (autoimunitní, způsobené exogenní noxou či obecně noxou endogenní, například patologicky konformovaným proteinem). PARs fungují v širším kontextu jako pouhé „převaděče“ informací z extracelulárního prostředí. Pro pochopení role signalizace PARs v mozku je tak důležitá znalost nejen typu PAR, ale i příčiny, která vedla k aktivitě specifické proteinázy, která s daným PAR interaguje. Původ proteináz v mozkové tkáni může být dvojitý: 1) intrinsický, syntézou a sekrecí proteináz gliálními elementy, neurony a v širším kontextu i endoteliemi či pericyty mozkových cév, nebo 2) extrinsický, kdy proteinázy pochází z krevní plasmy. Proteinázy extrinsického původu mají význam při stavech s narušením integrity hematoencefalické bariéry (hemoragie, ischemie, epileptický paroxysmus, akutní zánětlivé onemocnění) a jejich působení je v mozku velmi často neregulované (Lendeckel a Hooper 2005). V následujícím textu budou diskutovány, vzhledem k zaměření práce, pouze známé intrinsické mozkové proteinázy.

#### **1.1.3.1.1 P22**

Proteináza P22 byla původně purifikována z myšího mozku (Sawada et al. 2002), nicméně je přítomná i v lidském CNS. P22 je schopná štěpit složky extracelulární matrix jako je například laminin či kolagen IV. Laminin v mozku slouží mimo jiné jako podpůrná struktura pro růst neuritů a přežívání neuronů a kolagen IV zajišťuje integritu hematoencefalické bariéry. Neregulovaná aktivita P22 proto může významně přispívat k zániku neuronů a narušení selektivní permeability hematoencefalické bariéry (Wang et al. 2008).

Senzitivita k P22 byla zatím popsána pro PAR2 (Sawada et al. 2002). P22 tak může aktivací PAR2, kromě své vlastní proteolytické aktivity, významně přispívat k neuroprotektivním či neurotoickým dějům v mozku, přičemž ze studií zabývajících se rolí PAR2 v CNS plyne, že výsledný efekt, který může být protektivní či toxický, vždy závisí na charakteru infarktu. Konstitutivní aktivita P22 v mozku je relativně nízká, nicméně po mechanickém infarktu byla na přechodnou dobu v



kůře a hipokampu její aktivita akutně zvýšená (maximum v 8. hodině po inzultu), a to nejen ipsilaterálně k místu léze, ale i kontralaterálně (Sawada et al. 2002).

#### **1.1.3.1.2 Kallikrein 6**

Kallikrein 6 (neurosin) byl původně izolován z tkáně karcinomu prsu (Wang et al. 2008), ale jeho přítomnost byla potvrzena i v lidském mozku (Scarlsbrick et al. 2001). Inaktivní zymogen kallikreinu 6 může být aktivován činností enterokinázy a plasminu; kromě toho byla popsána limitovaná autoaktivační a autoinaktivační schopnost samotného zymogenu, respektive aktivního kallikreinu 6 (Wang et al. 2008).

Kallikrein 6 je v CNS exprimován na neuronech a gliálních elementech a specificky aktivuje PAR1 a PAR2. PAR4 je „kallikrein 6 resistantní“ a to i navzdory tomu, že kallikrein 6 má schopnost štěpit N-konec PAR4. Význam štěpení N-konce PAR4 kallikreinem 6 tak může spočívat v jeho inaktivaci (Scarlsbrick et al. 2001).

V mozcích pacientů s Alzheimerovou nemocí byla exprese kallikreinu 6 lokalizována zejména na mikroglia a v perivaskulárních prostorech, navíc bylo prokázáno, že kallikrein 6 je schopen štěpit N-konec APP (Wang et al. 2008).

Kallikrein 6 je významný z hlediska patogeneze synukleinopatií, kdy byl s cytochromem c lokalizován v mitochondriích, ze kterých byl po stresovém inzultu translokován do cytoplazmy. U Parkinsonovy nemoci byl kallikrein 6 lokalizován v centru Lewyho tělísek a také bylo prokázáno, že kallikrein 6 štěpí monomerní i oligomerní  $\alpha$ -synuklein (Spencer et al. 2013). V mozcích pacientů s nemocí s Lewyho tělísky (klinicky buď Parkinsonovou nemocí či demencí s Lewyho tělísky) i u transgenního myšího modelu byla snížená exprese kallikreinu 6 asociována se zvýšenou akumulací  $\alpha$ -synukleinu a v neuronální kultuře následná indukce exprese kallikreinu 6 vedla ke zlepšení synaptické integrity (Spencer et al. 2013).

Dalším typickým zástupcem synukleinopatií je mnohotná systémová atrofie (MSA) charakterizovaná predominantní degenerací mozečku, kmenových struktur, bazálních ganglií i neokortexu a pro kterou jsou patognomonické početné oligodendrogliaální cytoplasmatické (méně pak i neuronální i jaderné)  $\alpha$ -synuklein-imunoreaktivní inkluze. I v případě MSA byl prokázán inverzní vztah mezi koncentracemi kallikreinu 6 a akumulací  $\alpha$ -synukleinu. Podání kallikreinu 6 na myším modelu MSA navíc indukovalo snížení akumulace  $\alpha$ -synukleinu v oligodendroglia

doprovázené i zlepšením klinického obrazu (Spencer et al. 2015).

Z výše uvedeného vyplývá jednoznačný vztah mezi akumulací  $\alpha$ -synukleinu a koncentrací kallikreinu 6. Bohužel ani v jedné ze studií specificky se zabývajících tímto vztahem (Spencer et al. 2013; Spencer et al. 2015) nebyla exprese ani aktivita PAR2 či dalších PARs zkoumána, a tak lze o zapojení PAR2 v rámci aktivity kallikreinu 6 v patogenezi synukleinopatií zatím jen spekulovat. Vzhledem k expresi oligodendrocyty je role kallikreinu 6 důležitá i v patogenezi demyelinizujících onemocnění. Na myším modelu roztroušené sklerózy mozkomíšní, experimentální autoimunitní encefalitidě (EAE), byl u MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein)-indukované EAE kallikrein 6 zvýšeně exprimován v periplakové bílé i šedé hmotě (Terayama et al. 2005a). Podobná situace byla zjištěna i u PLP (proteolipid protein)-indukované EAE (Blaber et al. 2004). U obou modelů EAE (MOG- a PLP-indukovaných) byl užitím kallikreinu 6 inaktivujících protilátek zpomalen nástup a snížena závažnost onemocnění (Blaber et al. 2004; Terayama et al. 2005a; Wang et al. 2008). S těmito výsledky pak kontrastuje studie na cuprizonem-indukované EAE, ve které byl kallikrein 6 důležitý pro správnou remyelinizaci po poškození CNS (Bando et al. 2006). Kromě výše uvedených „primárních“ nemocí myelinu je kallikrein 6 zvýšeně exprimován v okolí ischemických a traumatických lézí a může přes PAR1 a PAR2 indukovat poškození neuronů (Yoon et al. 2013). Navíc bylo prokázáno, že kallikreinem 6 aktivovaný PAR2 přispívá k degenerativním změnám asociovanými s traumatickým postižením míchy (Radulovic et al. 2015). Takto aktivovaný PAR2 indukuje aktivitu STAT3 a tím stimuluje sekreci IL-6 z astrocytů, který se podílí na zvýšení exprese GFAP a vývoji reaktivní astrogliózy (Radulovic et al. 2015).

Kromě aktivace PAR2 s následným neuroprotektivním nebo neurotoxickým efektem tak může vlastní proteolytická aktivita kallikreinu 6 přispívat nejen k patogenezi řady nemocí CNS zahrnující Alzheimerovu nemoc, Parkinsonovu nemoc či demyelinizující onemocnění, ale i k průběhu reparačních procesů v CNS (Wang et al. 2008; Radulovic et al. 2015).

#### **1.1.3.1.3 Kallikrein 8**

Kallikrein 8 (neuropsin) je serinová proteináza, která je v lidském a myším mozku exprimována v limbických strukturách, zejména pyramidových neuronech polí CA1–CA3 hipokampu (Wang et al. 2008).

Specifita kallikreinu 8 vůči PARs je zatím stále nejasná (Wang a Liu 2008). Kallikrein 8 je

v mozku secernován do extracelulární matrix a jeho preferenční exprese v hipokampu může být spojena s jeho vlivem na synaptickou plasticitu, růst neuritů či dlouhodobou potenciaci (Wang et al. 2008). Kromě tohoto podílu na fyziologických procesech byla exprese kallikreinu 8, obdobně jako kallikreinu 6 v modelu EAE, zvýšena na oligodendrocytech exprimujících CNPázu a pozitivně asociovaná s progresí demyelinizovaných lézí (Terayama et al. 2005b). Negativní vliv aktivity kallikreinu 8 byl pozorován i na modelu traumatického postižení míchy, kdy přispíval k degeneraci axonů a oligodendrocytů (Terayama et al. 2007).

#### **1.1.3.1.4 Trypsin IV**

Trypsinogen IV, poprvé identifikovaný v mozku, je exprimován neurony i gliálními elementy, zejména astrocyty, a označuje se jako tzv. mozkový trypsinogen. Vzniká alternativním sestřihem genu pro mesotrypsinogen, který je vedle kationického a anionického trypsinogenu jednou ze tří isoform trypsinogenu popsanych v pankreatu. Rozdíl mezi mesotrypsinogenem a trypsinogenem IV je v jejich N-konci, kdy trypsinogen IV postrádá klasickou signální sekvenci a je tak možné, že se jedná o cytoplasmatický protein. Přítomnost trypsinogenu IV v extracelulární matrix mozku však naznačuje, že k jeho sekreci dochází, a to nejspíše díky přítomnosti furinové domény. Navíc je pravděpodobné, že původně intracelulární protein může být do mezibuněčného prostoru uvolněn při poškození buňky (Wang et al. 2008).

Tak jako pankreatické isoformy trypsinogenu jsou štěpitelné a aktivovatelné enterokinázou, je i trypsinogen IV cílem pro mozkovou enterokinázu, která je v malých množstvích detekovatelná v extracelulární matrix mozku. Aktivní trypsin IV vzniklý aktivitou enterokinázy je navíc totožný s mesotrypsinem (pankreatickou isoformou). Studie zabývající se specificitou trypsinu vůči PARs přišly s rozdílnými výsledky, které závisely na experimentálních podmínkách, zejména druhové specificitě či typu použitých buněčných kultur. Ve vybraných lidských epitelových extrapankreatických buněčných liniích může lidský mozkový trypsin IV aktivovat PAR2 a PAR4 (Cottrell et al. 2004), v krysí buněčné kultuře neuronálních dorsálních ganglií může aktivovat PAR1 a PAR2 (Knecht et al. 2007) a rekombinantní lidský mesotrypsin aktivuje v astrocytární kultuře PAR1 a neaktivuje PAR2 (Wang et al. 2006b). Senzitivita jednotlivých typů PARs k trypsinu IV je proto stále kontroverzní, nicméně zásadní pro pochopení protektivního či toxického působení PARs v CNS. Výsledky studií jsou zatím spíše nejednoznačné a zdá se, že trypsin IV může, podle užitého

modelu, aktivovat PAR1, PAR2 i PAR4 (Wang et al. 2008).

#### **1.1.3.1.5 Neurotrypsin**

Neurotrypsin je serinová proteináza exprimovaná v mozku i dalších orgánech. V myším mozku je neurotrypsin exprimován v rozdílných koncentracích během embryogeneze s vrcholem exprese v hipokampu a neokortexu přibližně 10. postnatální den a nejspíše se proto jedná o proteinázu důležitou pro vývoj CNS (Wang et al. 2008). V dospělém myším mozku je neurotrypsin exprimován zejména v limbických strukturách (Wang et al. 2008).

Specifita neurotrypsinu k PARs je zatím stále nejasná. Z patofyziologického hlediska je zajímavé, že delece v 7. exonu genu pro neurotrypsin (*PRSS12*; 4q28) jsou spojeny s autozomálně recesivní mentální retardací (OMIM 606709) (Molinari et al. 2002), což jen potvrzuje důležitou funkci neurotrypsinu ve vývoji CNS.

#### **1.1.3.1.6 Tkáňové metaloproteinázy**

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) a ADAMs (a desintegrin and metalloproteinases) tvoří skupinu metaloproteináz (v aktivním centru s metioninem a  $Zn^{2+}$ ) s významnou rolí v embryogenezi a patogenezi řady onemocnění. MMPs se dělí na extracelulární a membránové MMPs; ADAMs jsou molekuly membránové a působí jako tzv. sheddases, enzymy odštěpující z cytoplasmatické membrány buňky jiné molekuly (Baranger et al. 2014). Tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMPs) inhibují aktivitu MMPs a ADAMs. Abnormální aktivitu MMPs, ADAMs a TIMPs lze zjistit v patogenezi cerebrovaskulárního poškození, demyelinizačních procesů, nádorových a zánětlivých onemocnění CNS a také u neurodegenerativních onemocnění (Baranger et al. 2014; Lorenzl et al. 2004; Lorenzl et al. 2002). Podrobný přehled úlohy metaloproteináz a jejich inhibitorů v patogenezi nemocí CNS je shrnut v přehledném článku (Baranger et al. 2014).

PARs, které mohou být aktivovány MMPs, jsou zejména PAR1 a PAR2, nicméně v mozku je přesná interakce MMPs a PARs spíše nejasná.

### **1.1.4 Inhibitory proteináz**

Z pohledu aktivity PARs jsou, stejně jako aktivující a inaktivující proteinázy, velmi důležité inhibitory proteináz. Je to právě aktivita inhibitorů proteináz, která, kromě jejich syntézy a sekrece, významně ovlivňuje jejich dostupnost pro PARs a tím nepřímo ovlivňuje buněčnou,

PAR-asociovanou, odpověď. Mezi základní inhibitory proteináz patří tzv. serpiny (serpin – **serine** **proteinase inhibitor**), TIMPs či cystatiny inhibující cathepsiny.

V mozku jsou zatím nejlépe popsány serpiny. Mechanismus působení serpinů je založen na principu „návnady” – serpin se kovalentně naváže do aktivního centra serinové proteinázy, která jej rozštěpí a tím dojde k ireverzibilní konformační změně aktivního centra proteinázy a ireverzibilní inhibici její aktivity.

Mezi nejvýznamnější mozkové serpiny patří nexin-1. Nexin-1 je inhibitorem trombinu, v mozku je exprimován neurony i gliálními elementy a ve spinálních motorických neuronech je exprimován spolu s PAR1 (Wang et al. 2008). Koexpresí nexinu-1 a PAR1 je zajištěna regulovaná aktivita trombinu, zcela nezávislá na PAR1 (na rozdíl od regulace založené na modifikaci N-konce PAR1 či jeho downregulaci). Dalším serpinem v CNS je neuroserpin, který inhibuje aktivitu tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA) a i v tomto případě jsou neuroserpin a tPA koexprimovány. Serpin PAI-1 (plasminogen activator inhibitor I), je v CNS zvýšeně exprimován astrocyty při ischemii a narušení hematoencefalické bariéry. Expresí PAI-1 pericyty je indukována aktivací PAR1, čímž je zajištěna regulace aktivity serinových proteináz podobně jako v případě nexinu-1 (Wang et al. 2008).

Aberantní koncentrace PAI-1 a dalších inhibitorů a aktivátorů plasminogenu byly zjištěny v mozcích pacientů s Alzheimerovou nemocí (Barker et al. 2012) a zvýšené koncentrace PAI-1 byly detekovány v mozkomíšním moku pacientů s minimálním kognitivním deficitem (Oh et al. 2014). Ve vztahu k Alzheimerově nemoci byl zkoumán další serpin,  $\alpha$ 1-antichymotrypsin, který je v mozcích pacientů s Alzheimerovou nemocí, zvýšeně exprimován aktivovanými astrocyty a je tak možné, že se podílí na dysregulaci clearance  $A\beta$  (Abraham 2001).

Znalosti o endogenních mozkových proteinázách, jejich inhibitorech a specifitě vůči jednotlivým PARs jsou stále limitované. Je to právě komplexita daná vztahem mezi aktivujícími či inaktivujícími proteinázami, „jejich” serpiny a specifitou vůči různým typům PARs, která je zcela zásadní pro pochopení funkce PARs v CNS a její experimentální modelování. Pouze takto komplexní přístup pak může být podkladem pro využití serpinů či proteináz jako terapeutické modality.

### 1.1.5 Obecný vztah PAR–ligand

V klasickém pohledu na receptorovou biologii je agonista receptoru molekula, která má schopnost vazby a aktivace daného receptoru; antagonist je molekula, která inhibuje účinek agonisty, buď přímou kompeticí o vazebné místo na receptoru nebo vazbou na receptor a alosterickou modulací funkce receptoru.

V případě PARs je však klasické pojetí agonisty (a antagonisty) nepřesné. Agonistou PAR je, *sensu stricto*, PAR samotný, konkrétně sekvence TL na N-konci, která je demaskována proteolýzou N-konce (Adams et al. 2011b).

Znalost sekvence TL a jeho komplementární sekvence na e2 klíče jednotlivých PARs umožnila syntetizovat oligopeptidy, které se váží na e2 klíčku PAR a mohou tak napodobit úlohu agonisty či antagonisty. Zavedení syntetických oligopeptidů významně zjednodušilo výzkum funkce PARs a charakterizaci základních signálních dějů a jejich vliv na fenotyp buňky. Z metodického hlediska jde o velmi cenné, a pro funkční studie PARs zcela nezbytné prvky, které umožňují selektivní inhibici či aktivaci daného PAR (např. PAR1) a tím například přesnější charakterizaci dějů navozených aktivací neinhibovaného PAR (např. PAR2) (Adams et al. 2011b).

Syntetický oligopeptid modulující funkci PARs byl již úspěšně využit v rámci terapeutického ovlivnění funkce PAR1 (French 2015).

Na tomto místě je třeba zmínit, že aktivace či inhibice PARs pomocí syntetických oligopeptidů je pro PARs velmi nefyziologická, protože nerespektuje konformační změny navozené vazbou proteináz ani možné vztahy mezi PARs a dalšími transmembránovými molekulami. Bylo prokázáno, že například aktivace PAR1 trombinem a PAR1-aktivujícím peptidem indukovala odlišné signální dráhy. V kontextu tzv. „biased signalizace“ PARs je, mimo jiné, charakter ligandu (proteináza versus syntetický oligopeptid) zcela zásadní pro správnou interpretaci a translaci výsledků do farmakologického využití PARs (Zhao et al. 2014).

O proteináze lze hovořit jako o agonistovi PAR z funkčního hlediska, protože je to její proteolytická aktivita, která vede k aktivaci PAR. Analogicky, inaktivující proteináza svou vazbou PAR neinhibuje, ale je to její proteolytická aktivita, která odstraní část N-konce se sekvencí TL z dosahu vazebného místa na PAR. V širším slova smyslu tak lze mezi inhibitory funkce PARs zařadit také proteinázy, které inhibují aktivující proteinázy a tím i funkci PARs i přes to, že se s

PARs bezprostředně neinteragují. Recipročně lze o inhibitech proteináz uvažovat jako o molekulách podporujících signalizaci PARs, protože mohou inhibovat také inaktivační proteinázy. Další zásadní rozdíl oproti klasickým receptorovým agonistům či antagonistům je ten, že proteinázy jsou makromolekuly s mnohonásobně vyšší molekulovou hmotností než například katecholaminy. Do hry tak vstupují velmi komplexní alosterické vztahy mezi proteinázami, PARs a dalšími makromolekulami.

V rámci organismu tak existuje komplexní prostředí, v němž se vyskytuje řada proteináz s různou afinitou k PARs, které mohou PARs aktivovat i inhibovat, které mohou o vazbu na PAR kompetovat a navzájem antagonizovat své působení. Dále se v tomto prostředí vyskytují inhibitory proteináz s různou schopností inhibovat jejich proteolytickou aktivitu a tím ovlivnit aktivitu PARs. Tato komplexita je zásadním limitujícím faktorem pro výzkum biologie PARs, hodnocení následné aktivity signálních drah a přenosu získaných poznatků do širšího kontextu, například patogeneze nádorových nebo fibrotizujících onemocnění.

## **1.2 Signalizace a regulace aktivity PARs**

Poznání na poli signálních mechanismů PARs a GPCRs obecně doznalo během posledních deseti let obrovského rozmachu. Kromě klasických (tzv. kanonických) signálních kaskád navazujících na aktivované G-proteiny byly popsány dráhy spojené s aktivitou  $\beta$ -arrestinů. Fenomén „biased signaling” je v biologii GPCRs a PARs relativně nový, nicméně je již pevně etablován v chápání signalizační rozmanitosti molekul a umožňuje částečně vysvětlit mechanismy rozdílných efektů na buněčnou odpověď při aktivaci stejného receptoru. Stejně jako u jiných GPCRs jsou u PARs postupně popisovány komplexní mezireceptorové interakce – homodimerizace, heterodimerizace a transaktivace jednotlivých PARs mezi sebou i mezi PARs a receptory z jiných skupin GPCRs či dalších receptorových rodin. Komplexita signalizace PARs je dále potencována receptorovou pleiotropií, ligandovou redundancí a sterickými vlivy jiných membránových molekul v jejich těsné blízkosti.

### **1.2.1 Signalizace G-proteiny**

Klasický mechanismus aktivace GPCR je založen na vazbě ligandu, která indukuje konformač-



ní změnu intracelulárních domén GPCR a aktivaci tzv. G-proteinů (GTP-vázajících proteinů). G-proteiny mohou být monomery (např. proteiny Ras, Rab, Rho a další) či heterotrimery sestávající z monomeru  $G\alpha$  a dimeru  $G\beta\gamma$ .

Obě podjednotky,  $G\alpha$  a  $G\beta\gamma$ , jsou zakotveny ve vnitřním listu cytoplasmatické membrány a v kontaktu s C-terminální a TM doménami GPCR. Vazba ligandu vede ke konformační změně C-konce, která indukuje disociaci podjednotky  $G\alpha$  od  $G\beta\gamma$  komplexu. Oba systémy,  $G\alpha$  a  $G\beta\gamma$ , pak aktivují systém tzv. druhých posílů, které mají vliv na celou řadu buněčných dějů včetně desenzitizace aktivovaného GPCR. Podle aktivovaného systému druhých posílů je podjednotka  $G\alpha$  dále subtypizována – nejvýznamnější podtypy jsou  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  a  $G\alpha_{12/13}$ . Podjednotka  $G\alpha_s$  stimuluje a  $G\alpha_i$  inhibuje aktivitu adenylátcyklázy (AC), která přemění AMP na cyklický adenosin monofosfát (cAMP). Cyklický AMP aktivuje proteinkinázu A (PKA), která dále aktivuje řadu dalších signálních molekul, zejména MAPK. Podjednotka  $G\alpha_q$  aktivuje fosfolipázu C (PLC), která štěpí membránový fosfatidylinositol-4,5-difosfát ( $PIP_2$ ) na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát ( $IP_3$ ). Diacylglycerol následně aktivuje proteinkinázu C (PKC) a  $IP_3$  se váže na  $IP_3$ -sensitivní kalciové kanály na hladkém endoplasmatickém retikulu, ze kterého se následně uvolní do cytoplasmatického kompartmentu deponované ionty kalcia. Podjednotka  $G\alpha_{12/13}$  aktivuje RhoGEF a RhoA, přes které jsou dále aktivovány další systémy kináz (Siehler 2009).

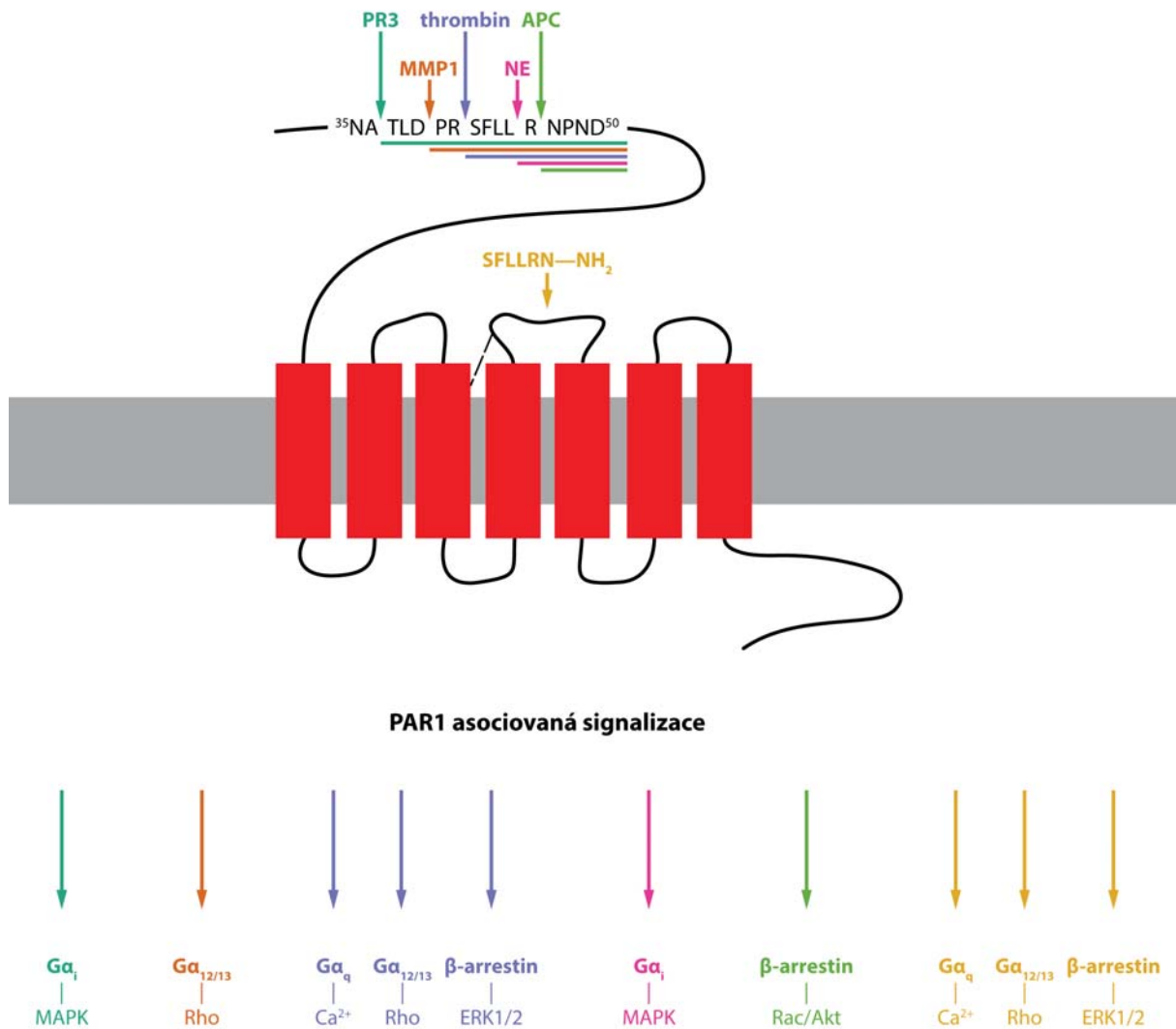
Dimer  $G\beta\gamma$  může aktivovat či inhibovat řadu signálních systémů a ovlivňuje změny cytoskeletu, moduluje aktivitu napěťově řízených kalciových kanálů a tím ovlivňuje koncentraci intracelulárního kalcia a může modulovat aktivitu AC i PLC (Tomankova a Mysliveček 2011).

Tradiční pohled na signalizaci G-proteiny uvažuje, že se tato signalizace odehrává v rámci cytoplasmatické membrány. Recentní data však ukazují, že internalizovaný GPCR (konkrétně  $\beta_2$ -adrenergní receptor) může po aplikaci agonisty isoprenalinu ještě omezenou dobu aktivovat  $G\alpha_s$  a odpovídající druhé posly (cAMP–PKA dráha) i z endosomálního kompartmentu (Irannejad et al. 2013).

Doposud bylo prokázáno, že PARs jsou spřaženy s  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  a  $G\alpha_{12/13}$  proteiny (Gieseler et al. 2013) (Obrázek 3, Obrázek 4).

Zásadní pro biologii PARs je, že po aktivaci různými proteinázami byla u různých PARs indukována různá signální dráha – např. elastáza indukovala na PAR1  $G\alpha_i$  a na PAR2 Rho/ERK1/2



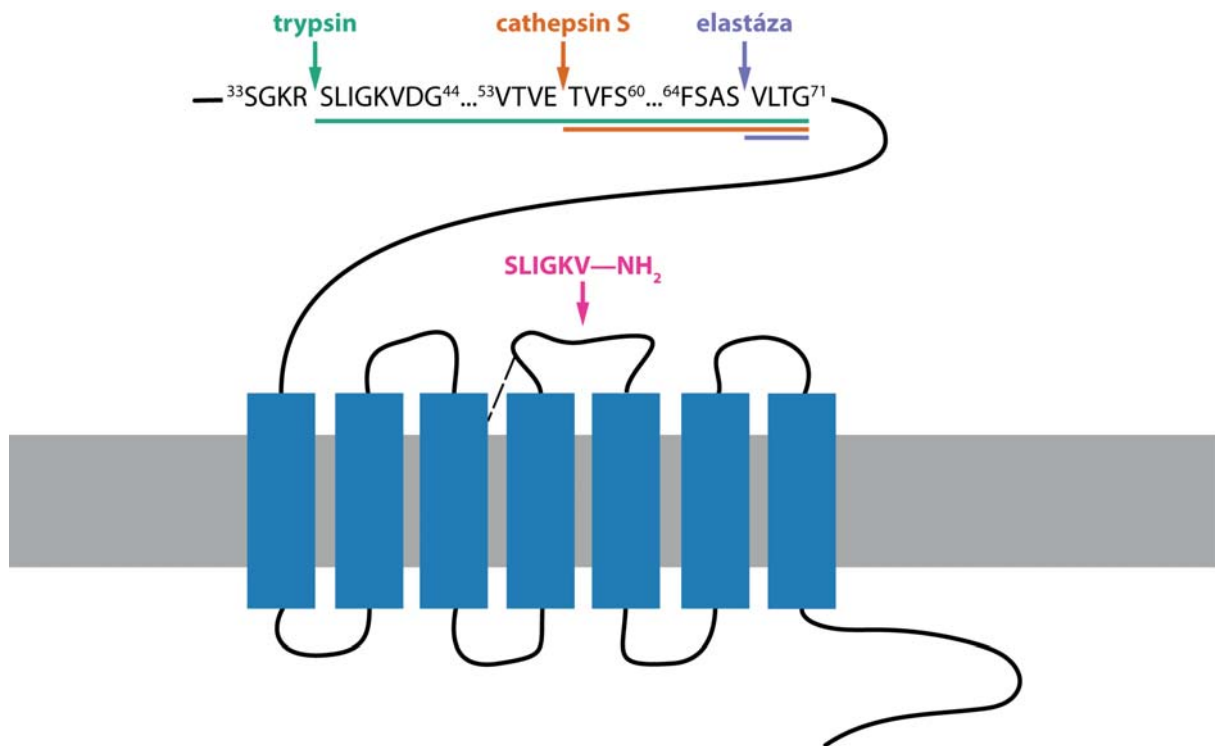


### Obrázek 3: Zjednodušené schéma signalizace PAR1

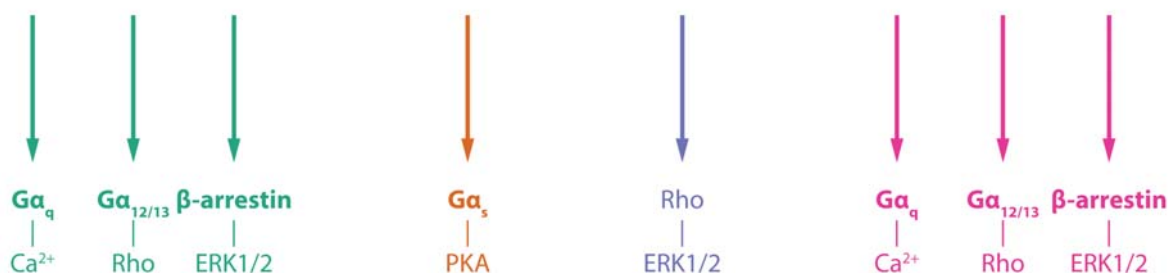
Jednotlivé proteinázy (PR3 proteináza 3; MMP1 tkáňová metaloproteináza 1; NE elastáza neutrofilů; APC aktivovaný protein C), příslušné sekvence TL a následně aktivované signální dráhy jsou barevně odlišeny.

dráhu. Na druhou stranu, trypzáza může přes PAR2 indukovat  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$  i  $G\alpha_{12/13}$  podjednotky a tak vede až k protichůdným efektům ( $G\alpha_s \times G\alpha_i$ ) (Canto et al. 2012). Toto analogicky platí i pro aktivaci PARs syntetickými oligopeptidy, kdy aktivace PAR proteinázou může mít opačný efekt než aktivace daného PAR syntetickým oligopeptidem. Například PAR1 aktivovaný trombinem indukuje  $G\alpha_{12/13}$  signalizaci, zatímco syntetický agonista PAR1 (SFLLRN) preferuje aktivaci  $G\alpha_q$  signalizace (Obrázek 3) (McLaughlin et al. 2005).

Je tedy zřejmé, že signalizace PARs podléhá komplexním dějům, pro které není pouhý vztah proteináza–PAR dostatečný k porozumění a vysvětlení mechanismu účinku dané proteinázy



#### PAR2 asociovaná signalizace



#### Obrázek 4: Zjednodušené schéma signalizace PAR2

Jednotlivé proteinázy, příslušné sekvence TL a následně aktivované signální dráhy jsou barevně odlišeny.

přes daný PAR. Stejně jako u jiných GPCRs se i u PARs uplatňují jiné, neklasické (nekanonické) způsoby aktivace a interakce jednotlivých PARs mezi sebou (homodimerizace, heterodimerizace, transaktivace).

#### 1.2.2 β-arrestiny

Aktivované PARs mohou (stejně jako i jiní členové rodiny GPCR) interagovat kromě G-proteinu

i s jinými adaptorovými proteiny. Nejlépe charakterizovanými adaptorovým proteiny jsou arrestiny (DeWire et al. 2007). Rodina arrestinů je tvořena čtyřmi členy, dva jsou exprimovány v sítnici (arrestin-1 v tyčinkách a arrestin-2 v čípcích) a dva jsou ubikvitní ( $\beta$ -arrestin 1 a  $\beta$ -arrestin 2) (DeWire et al. 2007). Recentně byly popsány další proteiny s obdobnými vlastnostmi,  $\alpha$ -arrestiny a Vps26 (Kang et al. 2014). Název „arrestiny“ je odvozen od jejich schopnosti narušit spřažení G-proteinu s GPCR a tím zastavit signalizaci GPCR.  $\beta$ -arrestiny se váží na fosforylované C-konce GPCRs a dosud byly popsány 2 základní funkce  $\beta$ -arrestinů:

1) interakce s C-koncem GPCR, adaptorovým proteinem AP2 a clathrinem vedoucí k desenzitizaci, internalizaci a downregulaci GPCRs a

2) indukce sestavení signálního komplexu na C-konci GPCRs.

Vzhledem k propojení těchto dvou funkcí se  $\beta$ -arrestiny většinou internalizují spolu s aktivovaným GPCR v rámci jeho downregulace a přitom může dojít k aktivaci dalších signálních mechanismů zahrnující ERK1, ERK2 a JNK3 (Reiter et al. 2012).

V případě PARs byla interakce s  $\beta$ -arrestiny popsána pro PAR1 a PAR2, znalosti o vztahu  $\beta$ -arrestinů a PAR3 a PAR4 jsou stále spíše omezené. U PAR1 byla po aktivaci trombinem a APC popsána signalizace  $\beta$ -arrestinem s aktivací ERK1/2 a Rac1-Akt systému (Zhao et al. 2014). Vazba  $\beta$ -arrestinu na PAR2 je naopak klíčovým krokem v procesu internalizace PAR2, nicméně i v tomto případě se zdá, že komplex PAR2- $\beta$ -arrestin může signalizovat z kompartmentu časných endosomů, ze kterých je spuštěna další vlna kaskád zahrnující Raf1 a ERK (Gieseler et al. 2013).

### 1.2.3 Biased signalizace

Komplexita signalizace a regulace aktivity GPCRs (a tím i PARs) je demonstrována relativně novým konceptem, tzv. biased signaling (Luttrell et al. 2015).

Klasický koncept aktivace GPCR počítá s výše popsanou vazbou ligandu a následnou aktivací G-proteinu a nově i se signalizací  $\beta$ -arrestiny. V klasickém modelu tak ligand, „nonbiased“ agonista aktivuje z kvantitativního hlediska receptor zcela či částečně (tzv. parciální agonista), nicméně kvalitativně „využije“ celý signalizační repertoár, který má daný receptor k dispozici. „Biased agonista“ ale po vazbě na GPCR preferuje (je „biased“) signalizaci jedním systémem (přes G-protein nebo  $\beta$ -arrestin), přičemž nevyužitá signalizační receptorová alternativa je neaktivní či dokonce aktivně inhibovaná. Koncept „biased“ agonismu je zásadní pro vývoj a využití arte-

ficiálních agonistů, protože jen znalost všech možných variant signalizace daným receptorem může spolehlivě podat informaci o funkci daného receptoru a jeho možném farmakologickém využití (Luttrell et al. 2015).

V případě PARs je funkční selektivita zásadním mechanismem regulace buněčných dějů a z hlediska výzkumu PARs problematickým aspektem. Řada proteináz neštěpí N-konec PARs pouze v „kanonické“ sekvenci, ale v různých místech na N-konci. S tím se také liší jejich vazebné místo a komplexní sterické vztahy nejen v rámci aktivovaného receptoru, ale i v kontextu vůči okolním makromolekulám. V případě PAR1 je to kompartmentalizace s EPCR v kaveolách cytoplazmatické membrány, v případě PAR2 je to jeho aktivace elastázou neutrofilů, které významně modifikují „kanonickou“ signalizaci PAR1, respektive PAR2 (Ramachandran et al. 2011; Russo et al. 2009). I pouhá vazba jiné proteinázy může u PAR preferovat jinou signální dráhu. Jako u GPCRs obecně se i u PARs jedná zejména o základní preferenci signalizace buď přes G-proteiny na straně jedné, nebo přes  $\beta$ -arrestin na straně druhé. Rovnováha a podíl jednotlivých signálů (G-protein vs.  $\beta$ -arrestin) v kombinaci s komplexní homologní a heterologní regulací aktivity PARs má pak zásadní vliv na výsledný (pato)fyziologický efekt a významně ovlivňuje farmakologický výzkum a možnosti terapeutického využití GPCRs včetně PARs (Griffin et al. 2015; Luttrell et al. 2015; Zhao et al. 2014).

#### **1.2.4 Ukončení signalizace PARs**

Obecně se v rámci regulace aktivity GPCRs (a PARs) mluví o tzv. desenzitizaci a downregulaci. Desenzitizace je rychlý proces, při kterém nedochází k redukci počtu molekul GPCRs na membráně, downregulace je pak proces, který trvá déle a dochází při něm ke snížení počtu GPCRs pomocí endocytózy. Základní mechanismy desenzitizace a downregulace PARs jsou analogické ostatním členům superrodiny GPCR a zahrnují 1) disociaci ligandu z jeho vazebného místa na N-konci a 2) fosforylaci serinů a threoninů na C-konci a klíče i3 aktivitou PKA a PKC a kinázami asociovaných s GPCR (GRKs). Aktivita GRKs následně zvýší afinitu  $\beta$ -arrestinů k fosforylovanému C-konci GPCR. Fosforylací C-konce PAR a vazbou  $\beta$ -arrestinu dojde ke sterické blokaci interakce PAR s G-proteinem. V případě aktivity PKA a PKC může dojít i k fosforylaci C-konců dalších, neaktivovaných, GPCRs – tzv. heterologní regulaci. Pokud GRKs fosforylují pouze aktivovaný GPCR jedná se o tzv. homologní regulaci (Tomankova a Mysliveček 2011).

Regulace aktivity PARs je, vzhledem ke specifickému způsobu jejich aktivace, založena především na modulaci komplexních sterických změn celého receptoru a na aktivitě výše zmiňovaných kináz (PKA, PKC, GRKs) a  $\beta$ -arrestinů. Podle klasického modelu se  $\beta$ -arrestiny váží na již fosforylovaný C-konec PAR a tato interakce vede k definitivnímu ukončení signalizace PAR.  $\beta$ -arrestiny pak slouží jako základní prvek pro sestavení internalizačního komplexu, nejčastěji s clathrinem, dynaminem a AP2, který následně vede k internalizaci PAR do endosomálně-lyzomálního kompartmentu. Tento proces je označován jako downregulace PARs (GPCRs).

Přestože obecně platí, že k internalizaci GPCRs je potřeba vazby  $\beta$ -arrestinu a jeho interakce s AP2 a clathrinem, některé GPCRs  $\beta$ -arrestin k internalizaci nepotřebují a místo toho mohou svým C-koncem interagovat s AP2 přímo nebo, jsou-li ubiquitinylované, s jinými adaptorovými proteiny jako je například epsin-1 (Marchese et al. 2008; Soh et al. 2010; Zhao et al. 2014), které se na internalizaci mohou rovněž podílet. Ubiquitylace má však kromě regulačního vlivu na internalizaci a degradaci PARs, také vliv na aktivaci některých druhých posílů. V případě ubiquitinylovaného PAR1 to je preferenční aktivace MAP kinázy p38, která následně indukuje zvýšení endoteliální permeability (Grimsey et al. 2015).

Přesný mechanismus desenzitizace jednotlivých PARs není zatím dobře objasněn. Oproti jiným členům superrodiny GPCRs se PARs významně liší svým osudem po internalizaci do endosomálně-lyzomálního systému. PARs jsou vazbou TL na e2 klíčku aktivovány jednorázově a trvale a po jejich internalizaci není jejich recyklace zpět na cytoplasmatickou membránu možná. Po přechodné fázi v časných endosomech míří PARs do lyzosomů, kde jsou degradovány.

Downregulace PAR1 probíhá cestou fosforylace C-konce receptoru GRKs a PKA či PKC a deubiquitylace, interakce s epsinem-1 a sestavením AP2-clathrin-dynaminového komplexu a internalizací, úloha  $\beta$ -arrestinů je v internalizaci PAR1 velmi omezená. PAR1 je, kromě této atypické netečnosti k  $\beta$ -arrestinům, odlišný také tím, že k namíření do lyzosomů nepotřebuje všechny členy ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport). Naopak je pro něj důležitá interakce s adaptorovým proteinem ALIX (ALG-2-interacting protein X), který přemostí většinu členů ESCRT a interaguje až s ESCRT-III, čímž navede PAR1 do multivezikulárních tělísek (Marchese a Trejo 2013).

V kontextu PARs je důležité brát také v potaz substrátovou specificitu aktivujících proteináz,

kteřá je podkladem „biased signalizace“ a tudíž i potenciálně „biased downregulace“ PARs. Toto bylo zatím prokázáno na  $\beta$ 2-adrenergním receptoru, kdy byly aktivitou různých agonistů aktivovány různé GRKs, které rozdílně fosforylovaly C-konec  $\beta$ 2-adrenergního receptoru, čímž vznikl jakýsi fosfátový kód pro vazbu  $\beta$ -arrestinů. Kinázová aktivita různých GRKs navíc nemusí být k navázání  $\beta$ -arrestinů a následné internalizaci GPCR dostatečná; u  $\mu$ -opiodního receptoru byla tato „nedostatečnost“ prokázána pro GRK5. Shodou okolností se jedná o stejnou GRK, která fosforyluje C-konec PAR1 na lidských endotelových buňkách a funkční vztah PAR1-GRK5 je tak možnou příčinou, proč nejsou  $\beta$ -arrestiny zapojeny do downregulace PAR1 (Zhao et al. 2014). Vazba  $\beta$ -arrestinu 1 a  $\beta$ -arrestinu 2 následovaná internalizací receptoru je naopak hlavní cestou downregulace PAR2. Aktivace PAR2 indukuje fosforylaci C-konce PAR2, která umožní pevnou vazbu  $\beta$ -arrestinů a endocytózu PAR2 do endosomálně-lyzomálního systému aktivitou ESCRT. PAR2, na rozdíl od PAR1, využívá při své cestě do lyzosomů všech členů ESCRT (Ramachandran et al. 2012).

Přesnější mechanismy desenzitizace PAR3 a PAR4 jsou zatím spíše neznámé. Pro PAR4 bylo zatím prokázáno, že jeho downregulace probíhá pomaleji než u PAR1 a s možným podílem  $\beta$ -arrestinu 2 (Ramachandran et al. 2012).

Přesné mechanismy internalizace a následného třídění PARs v rámci endosomálně-lyzomálního systému jsou v současné době předmětem intenzivního výzkumu. Zatím nejlépe popsáným mechanismem je ubiquitylaci a deubiquitylaci lysinů na i1–i3 kličkách a C-konci PARs (Marchese et al. 2008; Marchese a Trejo 2013). Internalizace GPCR však nemusí vždy znamenat ukončení signalizace, protože některé GPCRs mohou z endosomů signalizovat pomocí aktivovaných G-proteinů i přes  $\beta$ -arrestiny (Irannejad et al. 2013). Endosomální signalizaci tak nelze vyloučit ani pro některé typy PARs, zejména PAR2, který s  $\beta$ -arrestiny interaguje.

### **1.2.5 Posttranslační translokace PARs na cytoplazmatickou membránu**

Expres PARs na membránách probíhá vzhledem k ireverzibilní povaze jejich aktivace z *de novo* syntetizovaných PARs lokalizovaných v membránách sekrečních vezikul. Regulace transportu PARs v rámci vezikulárního sekrečního systému buňky sice podléhá mechanismům společným pro všechny transmembránové molekuly, přesné mechanismy regulace vesikulárního transportu PARs z a do cytoplazmatické membrány však dosud nejsou známy a jsou předmětem intenzivní-

ho výzkumu. Doposud získané poznatky ukazují, že se jedná o značně komplexní proces a že se jednotlivé typy PARs mohou pravděpodobně navzájem ovlivňovat. Příkladem může být interakce PAR2 a PAR4, kdy je pro správnou expresi PAR4 na membráně buňky potřeba jeho interakce s PAR2, která je navíc facilitována proteinem 14-3-3 $\zeta$  (Cunningham et al. 2012).

Pro cílení PARs na membránu je důležitá posttranslační modifikace jejich C- a N-konců. V případě PAR1 je palmitoylace N-konce signálem pro translokaci PAR1 do kaveol (Canto a Trejo 2013), v případě PAR2 je palmitoylace jeho N-konce nejspíše důležitým předpokladem pro translokaci PAR2 na cytoplazmatickou membránu (Botham et al. 2011). V případě PAR4 se pro správnou translokaci receptoru na cytoplazmatickou membránu zdá zásadní kromě interakce s PAR2 a proteinu 14-3-3 $\zeta$  také N-glykosylace (Cunningham et al. 2012).

### **1.2.6 Komplexní vztahy mezi PARs**

Výše popsané mechanismy aktivace GPCR (v užším smyslu PARs) a následné signalizace jsou pouze zjednodušenými modely. S rozvojem molekulární biologie se ukázalo, že GPCR mohou na cytoplazmatické membráně, v tzv. lipidových raftech, utvářet signální komplexy, které obsahují GPCRs a další, s membránou asociované receptory či noreceptorové molekuly a intracelulární systémy druhých posílů. Existence tohoto „signalosomu” na membráně tak může buňce sloužit k efektivnějšímu přenosu informace do buňky a regulaci či modifikaci signalizace, na kterém se podílí nejen zvýšení denzity daných receptorů, ale i jejich alosterická modulace (Ferre 2015).

#### **1.2.6.1 Homodimery a heterodimery PARs**

Podobně jako GPCR mohou i PARs vytvářet homodimery a heterodimery (Obrázek 5), nicméně zatím jsou známy jen některé možnosti kombinace PARs. Není vyloučena ani možnost existence oligomerů PARs (Ferre 2015; Lin et al. 2013).

Popsány byly homodimery PAR1-PAR1, PAR2-PAR2 a PAR4-PAR4 a jejich význam tkví nejspíše v zesílení indukovaných signálních kaskád. Mnohem komplikovanější je význam heterodimerů, jejichž vlivem může docházet ke komplexnějším signálním dějům, které mohou významně ovlivnit očekávaný efekt dané proteínázy na buňku (Lin et al. 2013).

Funkčně dobře popsáný je heterodimer PAR1-PAR4, který na trombocytech potencuje účinek trombinu (Nakanishi-Matsui et al. 2000). Popsán byl i heterodimer PAR1-PAR2, u kterého došlo



k transaktivaci mezi PAR1 a PAR2 (O'Brien 2000). U PAR1-PAR2 heterodimeru byla dále popsána aktivace PAR2 po podání trombinu, který po internalizaci dimeru PAR1-PAR2 indukuje signalizaci  $\beta$ -arrestinu z endosomů a aktivaci kináz ERK1/2. Aktivita heterodimeru je poté definitivně ukončena modifikací C-konce PAR1 a jeho degradací (Lin et al. 2013).

Heterodimer PAR3-PAR4 se zdá být funkčně nezbytný, protože pro PAR3 zatím není dobře popsán jeho přesný signální mechanismus a je hlavně považován za modulátor signalizace PAR4 (Adams et al. 2011b). Podobný význam má PAR3 u heterodimeru PAR1-PAR3, kdy působí jako alosterický modulátor signalizace PAR1 (McLaughlin et al. 2007). Analogický význam má i heterodimer PAR1-PAR4 kdy dochází k facilitaci aktivace PAR4 (Nakanishi-Matsui et al. 2000). Existence a vznik či zánik dimerů PARs na cytoplasmatické membráně, jejich asociace s dalšími GPCRs a dalšími s membránou-asociovanými molekulami mají zásadní vliv na charakter signalizace z hlediska aktivace G-proteinů či  $\beta$ -arrestinů (biased signaling) a významně tak ovlivňují (patofyziologické děje, dokonce byl v tomto ohledu navržen pojem „PAR-interaktom“ (Griffin et al. 2015). Zatím byl popsán protektivní efekt dimeru PAR1-PAR2 na endotel při sepsi (Kaneider et al. 2007), nicméně aktivita PAR1-PAR2 heterodimeru byla také asociována s hyperplázií hladkých svalových buněk medie cév, přičemž existence komplexu PAR1-PAR2 byla pro tento efekt nezbytná (Sevigny et al. 2011). Existence heterodimerů nemusí nutně ovlivňovat pouze signalizaci, ale může mít význam i pro samotnou expresi PARs – v případě heterodimeru PAR2-PAR4 PAR2 podporuje anterográdní transport PAR4 na cytoplasmatickou membránu (Cunningham et al. 2012).

Zda PARs tvoří heterodimery v aktivované či neaktivované formě, není zatím zcela jasné, nicméně pro heterodimer PAR1-PAR4 bylo prokázáno, že k jeho vzniku je třeba aktivace obou receptorů trombinem, přičemž dimerizace nebyla indukovaná, pokud byly PAR1 i PAR4 aktivovány arteficiálním aktivačním syntetickým oligopeptidem, kdy zůstaly jejich N-konce intaktní (Arachiche et al. 2013).

Na základě současných poznatků biologie GPCRs a PARs lze usoudit, že homo- a heterodimerizace GPCRs či PARs je, ne-li pravidlem, tak alespoň častým jevem, který významně ovlivňuje výsledný fenotyp buňky a potažmo celého (patofyziologického) systému.



### **1.2.6.2 Transaktivace PARs**

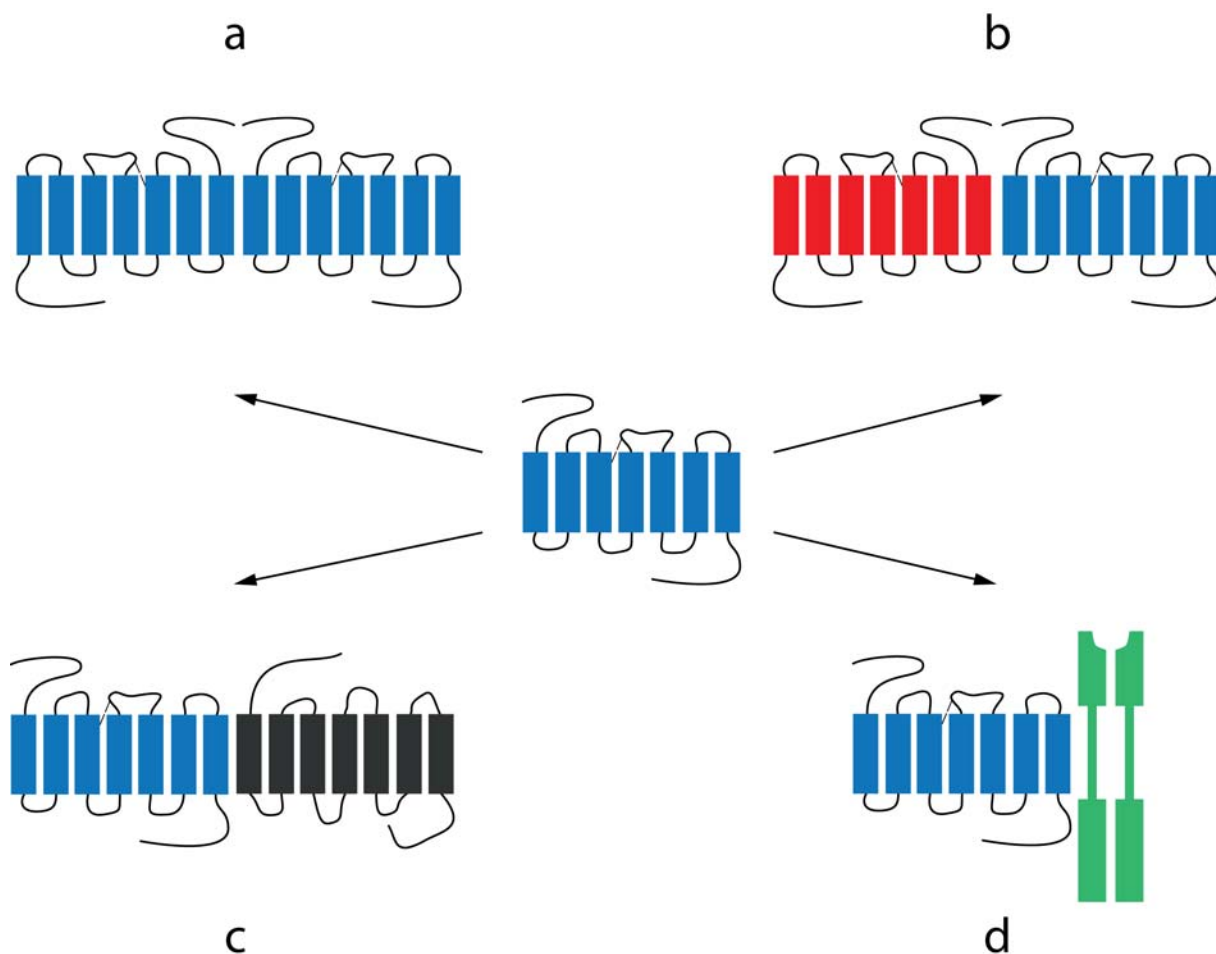
Transaktivaci lze shrnout jako situaci, kdy aktivace jednoho receptoru vede k aktivaci signální dráhy receptoru druhého. V případě PARs se tak proteolyticky demaskovaný neoligand na N-konci jednoho PAR nenaváže na „svou“ e2 klíčku, ale na e2 klíčku jiného PAR.

Transaktivace mezi PARs je zatím popsána mezi PAR1 a PAR2 – PAR1 aktivuje PAR2 (Lin a Trejo 2013) a mezi PAR3 a PAR1 – PAR3 aktivuje PAR1 (Kaufmann et al. 2005).

GPCRs (a PARs) mohou také interagovat se členy jiných receptorových rodin zahrnujících receptory s tyrosinkinázovou aktivitou (RTK, např. EGFR, HGFR, VEGFR či PGFR), Toll-like receptory (TLR) či chemicky řízené iontové kanály (např. NMDA receptory) a transaktivovat tím další signální kaskády (Obrázek 5) (Cattaneo et al. 2014; Gieseler et al. 2013). Významným partnerem PARs jsou v tomto ohledu RTK, kdy systém druhých posílů asociovaný s RTK může být PARs aktivován i v nepřítomnosti ligandu RTK (např. EGF) či naopak, aktivace PARs může vést k okamžitému uvolnění agonisty RTK, který pak autokrinně a parakrinně stimuluje příslušné signální kaskády (George et al. 2013; Gieseler et al. 2013). Vzhledem k významnému onkogennímu potenciálu RTK je intrinsická (aktivující mutace v tyrosinkinázové doméně) či extrinsická (např. transaktivace PARs) dysregulace jejich signalizace důležitým krokem v nádorovém zvratu buňky (Arora et al. 2008; Darmoul et al. 2004a; Darmoul et al. 2004b; Gieseler et al. 2013; Mussbach et al. 2015). Farmakologické ovlivnění aktivity PARs tak může být vedle již rutinně užívaných inhibitorů tyrosinkináz dalším přístupem k cílené inhibici onkogenní signalizace RTK u vybraných nádorových onemocnění.

Kromě nádorových onemocnění je aktivita RTK spojená i s patogenezí fibrotizujících onemocnění (Wynn a Ramalingam 2012). V tomto ohledu bylo prokázáno, že aktivovaný PAR2 může indukovat signální kaskády spojené s TGF $\beta$  a EGFR a přispívat tak k rozvoji renální fibrózy (Chung et al. 2013).

Kromě výše uvedeného byl prokázán vliv transaktivace PARs v rámci patogeneze onemocnění kardiovaskulárního systému, zánětlivých onemocnění a bolesti (Gieseler et al. 2013).



**Obrázek 5: Mezireceptorové interakce PARs**

*a) homodimerizace (např. PAR2-PAR2)*

*b) heterodimerizace (např. PAR1-PAR2)*

*c) heterodimerizace s jiným typem GPCR*

*d) funkční heterodimerizace s členem jiné receptorové rodiny (např. EGFR)*

### 1.3 Úloha PARs v patofyziologii základních orgánových systémů

Exprese PARs byla prokázána v endotelu, hladkých svalových buňkách, buňkách imunitního systému, trombocytech, fibroblastech a epitelích dýchacího a trávicího systému, v mozku, míše, periferním nervovém systému a nádorových buňkách (Adams et al. 2011b; D'Andrea et al. 1998). Úloha jednotlivých typů PARs v rámci orgánových systémů je velmi komplexní a jen obtížně lze jednomu typu PAR přiřadit pevnou, přesně charakterizovanou funkci s daným (pato)fyziologickým efektem. V dalších oddílech budou diskutovány dosud poznané funkce PARs v základních orgánových systémech.

### 1.3.1 Kardiovaskulární systém a hemostáza

Fyziologická a patofyziologická role PARs je nejlépe popsána u kardiovaskulárního a hemostatického systému. Svědčí pro to i skutečnost, že první identifikovaný PAR, PAR1, byl popsán jako trombinový receptor na krevních destičkách (Rasmussen et al. 1991; Vu et al. 1991). V rámci kardiovaskulárního systému jsou PARs exprimovány na endoteliích, krevních destičkách, hladkých svalových buňkách i fibroblastech. Na krevních destičkách jsou exprimovány trombin-senzitivní PAR1 a PAR4, kde slouží jako receptory pro trombin a jejich aktivace indukuje syntézu tromboxanů, degranulaci a agregaci krevních destiček a následný vznik trombu (Coughlin 2005). Endotelové buňky exprimují PAR1, PAR2 a PAR4, buňky hladké svaloviny PAR1 a PAR2. Fyziologický význam PARs v kardiovaskulárním systému se tak opírá především o regulaci permeability endotelové bariéry a regulaci tonu cév, na které se podílí zejména trombinem indukovaná signální aktivita oxidu dusného. V srdci má aktivita PARs vliv na rozsah ischemického poškození a rozvoj fibrózy myokardu či patogenezi virové myokarditidy (Alberelli a De Candia 2014). Zajímavostí je dvojí role aktivovaného PAR1 na tonus plicních arterií – PAR1 stimuluje produkci oxidu dusného endoteliemi a tím podporuje vasorelaxaci plicních tepen, nicméně toto je dáno akutní expozicí trombinu; při prodloužené expozici trombinu byla pozorována deplece cGMP a následně i oxidu dusného, což může být jednou z příčin narušené regulace vaskulárního tonu v plicním řečišti a může tak přispívat k rozvoji plicní hypertenze (Nickel et al. 2013). Na regulaci tonu koronárních tepen se podílí jak PAR1, PAR2 i PAR4. PAR1 měl při dysfunkci endotelu vasokonstrikční efekt, naproti tomu pro PAR2 a PAR4 byl popsán efekt vasorelaxační (Alberelli a De Candia 2014). Zajímavý je také potencující vliv PAR1 na fibrózu myokardu (Sonin et al. 2013) a toxický vliv aktivovaného PAR2 v modelu virové myokarditidy (Weithauser et al. 2013). Důležité je, že PAR1 je receptorem nejen pro trombin, ale pro aktivovaný protein C (APC), plasmin i komplex TF/VIIa. PAR1 tak může být aktivován proteinázami se zcela rozdílným efektem na průběh hemostázy a odlišnou odpovědí endotelových buněk (Griffin et al. 2015).

V případě trombinu a APC je nejlépe popsán a vysvětlen duální efekt PAR1 na permeabilitu endotelu. PAR1, aktivován trombinem, vede ke kontrakci a zvýšené permeabilitě endotelu (Alberelli a De Candia 2014). Toto je však antagonizováno působením APC, který rovněž aktivuje PAR1 (Griffin et al. 2015). Vazba trombinu na PAR1 preferenčně aktivuje  $G\alpha_{12/13}$ -RhoA dráhu, která

vede k narušení endotelové bariéry. APC se na PAR1 váže za pomoci EPCR (endothelial protein C receptor), který je s PAR1 lokalizován přes protein caveolin 1 do oblasti kaveol, preferenčně aktivuje  $G\alpha_i$ -Rac1 signalizaci a v konečném důsledku vede ke stabilizaci endoteliální bariéry (Bae et al. 2007; Russo et al. 2009). V případě PAR1 je také znám efekt při užití syntetického aktivčního oligopeptidu, kdy je N-konec PAR1 intaktní, TL je skryt a aktivovaný PAR1 preferenčně signalizuje přes  $G\alpha_q$  dráhu (Blackhart et al. 2000; McLaughlin et al. 2005).

Vliv PARs na hemostázu je zásadní z fyziologického, patofyziologického a terapeutického aspektu. Tyto poznatky již motivovaly k vývoji farmakologických preparátů, inhibitorů PAR1, obecně označovaných jako tzv. paxary (French et al. 2015).

### 1.3.2 Respirační systém

V plicích a dýchacích cestách jsou PARs exprimovány na pneumocytech, respiračním epitelu, mezotelu, endotelu, hladkých svalových buňkách a buňkách imunitního systému (Peters a Henry 2009). Z patofyziologického pohledu je nejvýznamnější vliv PARs na tonus hladké svaloviny stěny dýchacích cest, jejich podíl na alergické senzitivizaci a také vliv na patogenezi plicní fibrózy. Bronchorelaxační efekt byl prokázán u PAR2, který po své aktivaci indukuje syntézu prostaglandinu E2, kterou ale může indukovat rovněž aktivita PAR1 a PAR4 (Peters a Henry 2009). Prostaglandin E2 má v respiračním systému celou řadu efektů zahrnujících relaxaci hladké svaloviny, zvýšení sekrece hlenu, zvýšení sensitivity k acetylcholinu, snížení produkce kolagenu fibroblasty a imunomodulační efekt (Peters a Henry 2009).

Alergická senzitivizace či její modulace je nejčastěji spojována s PAR2, kdy byla u myší s vyřazeným genem pro PAR2 pozorována slabší alergická reakce evokovaná roztoči (produkují řadu proteináz) než u myší s normální expresí PAR2 (Davidson et al. 2013).

Proteinázy koagulační kaskády, zejména trombin, mohou působit jako fibrogenní faktory v patogenezi plicní fibrózy (Chambers a Scotton 2012; Jose et al. 2014; Wuyts et al. 2013). PAR1 po své aktivaci indukoval myoepitelový fenotyp lidských alveolárních buněk a lze tak soudit, že PAR1 se může podílet na indukci epitelomezenchymální transdiferenciace (EMT) pneumonocytů. Navíc aktivace PAR1 indukuje sekreci fibrogenního TGF $\beta$  fibroblasty a epiteliálními buňkami (Song et al. 2013). Recipročně, inhibice aktivity PAR1 antagonistickým peptidem snížila rozsah poškození bleomycinem indukované plicní fibrózy u myší (Lin et al. 2014).

Více než PAR1 je však jako profibrogenní faktor zkoumán PAR2. Na modelu bleomycinem indukované plicní fibrózy u myši PAR2 aktivovaný TF/VIIa indukoval proliferaci fibroblastů *in vitro* a ve tkáních z plic pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF) pak byla detekována zvýšená exprese PAR2 v myofibroblastických fokusech (Wygrecka et al. 2011). Bleomycin, stejně jako TGF $\beta$ , indukuje expresi PAR2 a EMT se zvýšenou syntézou kolagenu, přičemž v myším modelu s vyřazeným genem pro PAR2 byly fibrotické změny v plicích vyvolané bleomycinem menšího rozsahu, podobný nález byl i u wild-type myši, kterým byl podán antagonist PAR2 (Borensztajn et al. 2010; Lin et al. 2015a; Wygrecka et al. 2011). Pozorovaná zvýšená exprese PAR2 v těchto studiích však kontrastuje se studií provedené z bronchoalveolárních laváží pacientů s IPF, kde nebyl oproti kontrolám zjištěn rozdíl v expresi PAR2 (Park a Yoo 2013). Podobný závěr měla i studie porovnávající chronickou obstrukční plicní nemoc a asthma bronchiale jako dvě onemocnění charakterizované, podobně jako IPF, postupnou přestavbou dýchacích cest (Matej et al. 2014). Asociace PAR1 i PAR2 s patogenezí plicní fibrózy je ovlivněna možnou interakcí těchto receptorů. PAR1 a PAR2 nemusí mít, navzdory možným očekáváním, aditivní fibrogenní efekt, naopak se zdá, že hlavním profibrogenním faktorem bude spíše aktivita PAR2, protože inhibicí PAR2 antagonistou byl potlačen také fibrogenní efekt indukovaný PAR1 (Lin et al. 2014; Lin et al. 2015a; Lin et al. 2015b).

Zda je PAR2 vhodným terapeutickým cílem pro léčbu IPF je stále sporné, zejména s ohledem na rozdíly mezi přesně definovaným experimentálním modelem a etiologicky stále záhadnou IPF u lidí (Jose et al. 2014; Matej a Olejar 2012).

### **1.3.3 Gastrointestinální systém**

V gastrointestinálním traktu jsou PARs exprimovány na epitelu, v hladkých svalových buňkách i v neuronech a gangliových buňkách enterického nervového systému (Kawabata et al. 2008). Aktivace PAR1 a PAR2 vede ke zvýšení permeability epitelu tlustého střeva (Cenac et al. 2004; Chin et al. 2003) a PARs se komplexně podílejí na regulaci motility a tonu střevní hladké svaloviny i žlučových cest (Kawabata et al. 2008). PAR2 navíc stimuluje sekreci exokrinních žláz a je jedním z hlavních regulátorů exokrinní sekrece v pankreatu (Kawabata et al. 2008). Přítomnost PAR2 v acinech a duktech pankreatu je zásadní v patogenezi akutní pankreatitidy, kdy je exprese PAR2 zvýšená (Olejar et al. 2001). Přesná role PAR2 u akutní pankreatitidy však není stále

jasná, protože různé studie užívající různé experimentální metody podporují jak prozánětlivou tak i protizánětlivou roli PAR2 (Kawabata et al. 2008; Laukkarinen et al. 2008; Matej et al. 2006; Namkung et al. 2004; Olejar et al. 2001).

V rámci zánětlivých onemocnění vlastního trávicího traktu byla prozánětlivá role PAR2 prokázána na modelu enteritidy indukované toxinem A *Clostridium difficile* (Cottrell et al. 2007) a na modelu kolitidy indukované *Citrobacter rodentium* (Hansen et al. 2005). S tím kontrastuje spíše protizánětlivý efekt PAR2 u myšního modelu IBD a protektivní efekt na myším modelu ischemického poškození, který byl pozorován i pro PAR1 (Kawabata et al. 2008).

### 1.3.4 Urogenitální systém

PARs jsou urogenitálním systému, hojně exprimovány na tubulárních epiteliích nefronu, na mesangiálních buňkách a ve stromálních elementech (Vesey et al. 2007).

Aktivace PARs v ledvinách, zejména PAR2, má spíše prozánětlivý efekt (Vesey et al. 2013). Na modelu ischemicko-reperfúzního poškození ledviny byla demonstrována toxická role PAR1 a indiferentní role PAR2 (Sevastos et al. 2007). S tímto výsledkem kontrastuje studie, která se zabývala rolí parstatinu v modelu akutního renálního poškození. Parstatin je fragment N-konce PAR1, který je odštěpen aktivitou proteinázy, a který je uvolněn do extracelulárního prostředí. V *in vivo* studii na myších prokázali Diamantopoulos *et al.*, že intravenózní podání parstatinu před či ihned po dočasné bilaterální okluzi renálních cév či podání jodové kontrastní látky snižuje rozsah následného akutního ischemického renálního poškození i rozsah kontrastní látkou-indukované nefropatie (Diamantopoulos et al. 2012).

Na myším modelu srpkovité glomerulonefritidy byl prokázán toxický vliv aktivace PAR1 i PAR2 (Cunningham et al. 2000; Moussa et al. 2007).

Z funkčního hlediska je zajímavá role PAR2 v patogenezi renální fibrózy jako end-stage stavu chronického renálního onemocnění. Ve studii provedené na myším modelu s vyřazeným genem pro PAR2 Chung *et al.* ukázali, že absence PAR2 je nejen spojena s menším stupněm fibrózy ledvin, ale že aktivace PAR2 pomocí syntetického oligopeptidu indukuje dráhy typické pro signalizaci TGF $\beta$  (Chung et al. 2013). Protože je TGF $\beta$  obecně považován za fibrogenní faktor, který je také spojován s EMT, je synergický vztah PAR2 a TGF $\beta$  signalizace velmi zajímavá z terapeutického hlediska. Co však není známo je mechanismus aktivace TGF $\beta$ -asociované dráhy



aktivitou PAR2. Nejspíše půjde o tzv. crosstalk signálních drah, kdy systém druhých posílů indukovaný aktivací PAR2 vede k aktivaci TGF $\beta$ -asociovaných druhých posílů. Kromě „crosstalku“ na intracelulární úrovni, stojí také za povšimnutí i možná těsná prostorová asociace PAR2 a TGFBR na cytoplazmatické membráně a lze proto uvažovat také o možnosti transaktivace mezi PAR2 a TGFBR.

Další oblastí, kde je role proteináz koagulační kaskády zásadní, je patologie těhotenství. PAR1 a PAR3 jsou exprimovány na buňkách cytotrofoblastu a jsou důležité pro správný vývoj placenty (Even-Ram et al. 2003; Even-Ram et al. 2001). Význam PAR1 pro fyziologickou placentaci je podpořen výsledky studie, ve které byla snižená exprese mRNA pro PAR1 způsobená polymorfismy v regulačních sekvencích genu pro PAR1 asociována s opakovanými potraty (Grisaru-Granovsky et al. 2015). Trombin i PAR1-aktivující oligopeptid totiž mohou indukovat expresi sVEGFR-1, solubilního receptoru pro VEGF, který je spojován s patogenezí preeklampsie (Zhao et al. 2012).

### **1.3.5 Pohybový systém**

Pro patologii pohybového systému je důležitý význam PARs jako mediátorů zánětu a chronické zánětlivé bolesti. U zánětlivých onemocnění je důležitá role PAR2 v patogenezi degenerativní osteoartrózy a revmatoidní artritidy (Vergnolle 2009). PAR2 je u revmatoidní artritidy zvýšeně exprimován na synovii a svou aktivitou je schopen indukovat otok a hyperémii kloubů a stimulovat prozánětlivou reakci včetně sekrece cytokinů TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (Ferrell et al. 2003; Kelso et al. 2007). Tento efekt může být významně oslaben blokadou PAR2 pomocí siRNA, protilátkou proti PAR2 (klon SAM-11) či antagonistou PAR2 (Kelso et al. 2006). PAR2 je proto považován za atraktivní cíl léčby jinak farmakologicky velmi špatně ovlivnitelných artropatií (Neumann et al. 2014).

### **1.3.6 Nádorová onemocnění**

Role PARs v patogenezi nádorových onemocnění je spolu s jejich rolí v patofyziologii hemostázy v současné době pravděpodobně nejintenzivněji zkoumanou oblastí biologie PARs.

Tak jako v ostatních systémech je role jednotlivých PARs u různých typů nádorových onemocnění velmi komplexní. Výsledky studií jsou prakticky vždy ovlivněny řadou faktorů, které značně znesnadňují jejich „metaanalytickou“ interpretaci (Matej et al. 2007). Kromě přirozené variability

v signalizaci PARs a komplexními vztahy mezi PARs a jejich ligandy to jsou na experimentální úrovni zejména užití rozdílných modelů (nádorové buněčné linie, zvířecí, nejčastěji myši, modely či lidské tkáňové vzorky), různých metod aktivace a inaktivace PARs a různých markerů jejich aktivity. Výsledky studií jsou tak často závislé na daném modelu a experimentálním postupu a jejich reálný biologický význam je často spíše sporný.

Obecně jsou PARs, zejména PAR1 a PAR2, méně PAR3 a PAR4 exprimovány většinou nádorů (Elste a Petersen 2010). Aktivita PARs může podporovat nádorovou invazi, růst, angiogenezi, hematogenní šíření a obecně metastatický potenciál epitelových nádorů (Even-Ram et al. 2001; Shi et al. 2004; Yin et al. 2003), i když byla zároveň prokázána inhibice leukemogeneze PAR1 (Baumer et al. 2014). Přítomnost PARs na nádorových buňkách, stromálních elementech, endoteliích či nervových zakončeních a jejich interakce s trombinem, MMPs, kallikreiny a dalšími proteinázami jsou důležitými faktory pro rozvoj invazivního a metastatického potenciálu nádorových buněk a pro vznik nádorové bolesti (Kularathna et al. 2014). Zásadní pro interpretaci a pochopení role PARs v patogenezi nádorových onemocnění je lokalizace exprese PARs. PARs exprimované na nádorových buňkách převádí informace poskytované proteinázami koagulační kaskády (zejména trombinu v případě PAR1 či komplexu TF/VIIa v případě PAR2), proteinázami uvolněnými buňkami imunitního systému či proteinázami dané tkáni či orgánu vlastními (nejčastěji MMPs a kallikreiny). Koagulační faktory mají vliv spíše na metastatický potenciál nádorových elementů, MMPs a kallikreiny pak ovlivňují vztah nádorových buněk ke stromatu (Parisis et al. 2013). S tímto těsně souvisí význam PARs lokalizovaných na buňkách nenádorových struktur (stroma, epitelie, buňky imunitního systému), které mohou rovněž významně ovlivnit vztah nádorových buněk vůči nenádorové tkáni (Matej et al. 2012b).

U karcinomů gastrointestinálního traktu je role PARs, zejména PAR1 a PAR2 spíše onkogenní – stimulace nádorové progresy byla popsána u karcinomů jícnu (Han et al. 2013), žaludku (Sedda et al. 2014), kolorektálního karcinomu (Cai et al. 2014; Darmoul et al. 2004a; Darmoul et al. 2004b; Darmoul et al. 2001; Heider et al. 2004; Hu et al. 2013; Ma et al. 2013; Malfettone et al. 2013; Wu et al. 2013), dlaždicového karcinomu ústní dutiny (Al-Eryani et al. 2015; Al-Eryani et al. 2013) a nazofaryngeálního karcinomu (Yang et al. 2013). Zajímavá je role PARs v patogenezi karcinomů pankreatu, u kterých PAR2 nejspíše podporuje růst primárního nádoru, ale zároveň



tlumí lymfangiogenezi a metastatický potenciál (Shi et al. 2014). PAR1 může svou interakcí (na úrovni druhých posílů) s CXCR1 a VEGFR2 podpořit přežití nádorových buněk (Uzunoglu et al. 2013) a zároveň podpořit jejich růst (Queiroz et al. 2014).

U karcinomů prsu rovněž převažuje onkogenní potenciál aktivity PARs. PAR1 je zvýšeně exprimován v hyperplastických duktech (Yin et al. 2006) a ve tkáni karcinomů prsu (Hernandez et al. 2009). Exprese PAR1 je asociována s horší prognózou onemocnění, zvýšenou invazivitou nádorových elementů a progresí onemocnění (Keshava et al. 2013; Tiburcio et al. 2012; Yang et al. 2015). Vliv PAR1 na samotnou indukci vzniku karcinomu prsu je však sporný (Versteeg et al. 2008). Potenciál pro indukci růstu nádorových buněk byl prokázán pro PAR2, který je podobně jako PAR1 zvýšeně exprimován ve tkáni karcinomu a jehož aktivita je podobně jako v případě PAR1 pozitivně asociována s jeho invazivitou a progresí (Matej et al. 2007; Su et al. 2009). V tomto ohledu stojí za zmínku, že PAR1 má schopnost transaktivovat ErbB2 (HER2/neu) a tím přispívat k progresi nádorového onemocnění (Arora et al. 2008).

Massi et al. prokázali, že PAR1 je zvýšeně exprimován na buňkách atypických névů a maligního melanomu, přičemž nebyl zjištěn rozdíl v expresi PAR2 mezi benigními a maligními melanocytárními lézemi (Massi et al. 2005). V dalších studiích byl prokázán pozitivní vliv aktivace PAR1 na progresi maligního melanomu (Melnikova et al. 2009; Villares et al. 2011). V případě maligního melanomu a PAR2 byl prokázán potencující vliv PAR2 na růst primárního tumoru, přičemž jeho metastatický potenciál je aktivitou PAR2 tlumen (Matej et al. 2012b; Olejar et al. 2014).

U karcinomů plic podporuje PAR1 motilitu (Cisowski et al. 2011) a spolu s PAR2 proliferaci nádorových buněk (Jin et al. 2003). Pro PAR2 byl také prokázán antiapoptotický efekt (Michel et al. 2014).

Z dalších epitelových maligních nádorů byl onkogenní potenciál či zvýšená exprese PAR1 nebo PAR2 prokázán u karcinomů ovaria (Agarwal et al. 2008; Grisaru-Granovsky et al. 2005), u karcinomu prostaty je zvýšená exprese PAR1, PAR2 a PAR4 (Black et al. 2007) a aktivita PAR1 a PAR2 jsou asociovány s jeho progresí (Mize et al. 2008; Ramsay et al. 2008). Polymorfismy v genu pro PAR1 jsou asociovány s vyšší invazivitou renálního karcinomu (de Martino et al. 2013), stejně tak i aktivita PAR2 (Sun et al. 2015), která může u renálního karcinomu zvýšit expresi angiogenních faktorů (Zhang et al. 2013).

PAR1 a PAR2 také mohou podporovat progresi gliomů, respektive glioblastoma multiforme (Itsekson-Hayosh et al. 2015; Luo et al. 2014).

Z výše uvedeného plyne že lze obecně usoudit na spíše onkogenní potenciál PARs, čímž se nabízí významný terapeutický potenciál modulace aktivity PARs.

### **1.3.7 Periferní nervový systém**

Kromě níže diskutované role v CNS jsou PARs zapojeny i do patofyziologických dějů na úrovni periferního nervového systému, zejména patofyziologie bolesti.

Na základě dostupných poznatků lze považovat PAR2 za pronociceptivní a PAR1 a PAR4 spíše za proanalgetické (Vergnolle 2009). Aktivací PAR2 dochází ke stimulaci sekrece neuropeptidů CGRP a substance P a k indukci mechanických a termických hyperalgických podnětů (Vergnolle 2009).

Pro PAR2 byl popsán pronociceptivní význam u pankreatické bolesti (Ceppa et al. 2011) a význam v rámci syndromu dráždivého tračníku, kdy je aktivita PAR2 spojována s degranulací žírných buněk a stimulací viscerálních nervových zakončení (Cenac et al. 2007).

Jako pronociceptivní element má PAR2 význam v nádorové bolesti. Na kulturách dlaždicového karcinomu a myšího osteosarkomu bylo ukázáno, že po aplikaci trypsinu či PAR2 agonistů má supernatant z těchto kultur silný algický efekt, který je snížen až nepřítomen v přítomnosti inhibitorů serinových proteináz či při chybění genu pro PAR2 (Kularathna et al. 2014). Na myším modelu nádorového postižení kostí pak byla v neuronech dorsálních spinálních ganglií prokázána kolokalizace a zvýšená exprese PAR2 a PAR4 na úrovni mRNA s možným využitím inhibice PAR2 jako přístupu k léčbě kostní nádorové bolesti (Bao et al. 2015a; Bao et al. 2015b).

## **1.4 Role PARs v centrálním nervovém systému**

Přítomnost všech čtyř typů PARs v centrálním nervovém systému (CNS) byla prokázána imunohistochemicky u potkanů, přičemž PAR1 je exprimován nejvíce v neuronech pyramidové vrstvy cornu Ammonis hipokampu, méně pak v kortikálních oblastech, thalamu, hypothalamu, striatu a amygdale (Junge et al. 2004). PAR2 a PAR3 jsou ve zvýšené míře exprimovány ve všech vrstvách mozkové kůry, hipokampu, mediálních habenulárních jádrech, centrálních jádrech

amygdaly, ventrálních jádrech thalamu, hypothalamu a ve striatu. Podobný expresní profil má i PAR4 (Bushell et al. 2006; D'Andrea et al. 1998; Striggow et al. 2001). PAR2 byl také prokázán v CNS během embryonálního vývoje, což podporuje jeho možný význam při vývoji CNS.

Expres mRNA pro PAR1 byla prokázána v lidských neuronech a astrocytech; v oligodendrocytech a mikroglii je její expres nejistá (Ishida et al. 2006; Junge et al. 2004; Weinstein et al. 1995). Expres PAR4 u lidí je stále nejasná (Ishida et al. 2006). PAR1, PAR2 a PAR3 jsou také exprimovány na endoteliích mozkových cév (Bartha et al. 2000).

Význam PARs exprimovaných na neuronech či glii není zatím zcela jasný a výsledky studií zabývajících se funkcí PARs v CNS silně podporují význam PARs jako komplexních modulátorů fyziologických i patofyziologických dějů.

Role PAR1 je zřejmá v rámci vaskulárních dějů, kdy aktivace PAR1 trombinem může indukovat zvýšení permeability hematoencefalické bariéry a obecně protrombogenní fenotyp endotelu a nebo, vlivem APC, naopak endotel stabilizovat. PAR4, jako další trombin-senzitivní PAR plní nejspíše roli analogickou PAR1, nicméně jeho snížená senzitivita k trombinu spojená s jeho prolongovanou aktivací může vést k rozdílným efektům, a to zejména při patologických stavech spojených s kvalitativně a kvantitativně aberantním proteinázovým prostředím a expresí PARs na různých buněčných typech.

Z hlediska funkce PAR2 v CNS jsou zajímavé výsledky funkční studie, ve které se ukázalo, že PAR2 potlačuje synaptickou aktivitu mezi neurony pole CA1 hipokampu a Schafferovými kolaterálami. Aktivace PAR2 na astrocytech byla spojena s inhibicí ionotropních glutamátových receptorů a je tedy možné, že PAR2 tak plní úlohu v rámci negativní zpětné vazby potenciálně limitující glutamátovou toxicitu. V rámci obranných mechanismů byla prokázána role PARs jako induktorů sekrece cytokinů mikroglialními elementy (Noorbakhsh et al. 2003; Rohatgi et al. 2004).

Studie zabývající se rolí PARs v patofyziologii centrálního nervového systému lze zjednodušeně rozdělit na ty, které se zabývají spíše obecnými mechanismy neurotoxického či neuroprotektivního působení a na ty, které se zabývají patofyziologií PARs v kontextu definovaných modelů lézí CNS či přímo specifických lidských onemocnění CNS.

### 1.4.1 Neuroprotektivní mechanismy

Neuroprotektivní efekt byl popsán po aktivaci všech čtyř typů PARs. Přesné molekulární mechanismy neuroprotektivního působení PARs jsou však stále nejasné. Nejlépe je pravděpodobně popsán neuroprotektivní efekt aktivace PAR1 a PAR2 proti ceramidem indukované buněčné smrti na potkaní astrocytární kultuře. Kritickou roli zde hraje GRO/CINC-1, kryší analog lidského IL-8. Aktivací PAR1 a PAR2 dojde k aktivaci mitogeny-aktivovaných proteinkináz (MAPK): 1) c-Jun N-terminálních kináz 1 a 2 (JNK1 a JNK2), 2) extracelulárními signály regulovaných kináz 1 a 2 (ERK1, ERK2) a 3) p38 s následnou indukci sekrece GRO/CINC-1 (Wang et al. 2007b; Wang et al. 2007c; Wang et al. 2006a). Na sekreci GRO/CINC-1 má vliv i přesně regulovaná koncentrace intracelulárního kalcia – jeho bazální koncentrace je nezbytným předpokladem pro syntézu a sekreci GRO/CINC-1, ale zvýšené koncentrace negativně ovlivňují PAR1 indukovanou expresi GRO/CINC-1 (Wang et al. 2007c). GRO/CINC-1 se na své cílové buňce váže na CXCR2 a inhibuje tak ceramidem indukovanou translokaci cytochromu c z mitochondrií a tím zablokuje intrinsickou cestu apoptózy. Aktivace PAR1, PAR2 i PAR4 může indukovat expresi CINC-2 a CINC-3 s podobným účinkem jako GRO/CINC-1 (Wang et al. 2007a).

Aktivita MAPKs, JNK a ERK, je kromě indukce sekrece GRO/CINC-1 spojována i s neuroprotektivním působením PAR2 na myším modelu přechodné ischemie (Jin et al. 2005) a obecně také s protektivní rolí aktivity PAR1 (Jiang et al. 2002; Wang et al. 2002b; Xi et al. 2001). Protektivní působení PAR2 inhibuje aktivitu ERK a p38, ale nemění aktivitu JNK 1 a 2, které jsou tedy nejspíš základními efekty, jejichž aktivita indukuje protektivní efekt PAR2 (Greenwood a Bushell 2010; Wang et al. 2007a; Wang et al. 2007b).

Neuroprotektivní efekt PAR2 může být také založen na modulaci aktivity glutamátových receptorů obecně spojovaných s neurotoxickým působením – na myším modelu byly do amygdal zavedeny elektrody, které iniciovaly epileptogenní aktivitu. Ta byla potlačena intracerebrálním, subkutánním i intravenózním podáním PAR2-agonisty (Lohman et al. 2008).

PAR2 rovněž interaguje s  $\alpha$ A- a  $\alpha$ B-crystallinem (Li et al. 2009). Crystalliny jsou exprimované aktivovanými astrocyty a podobně jako tzv. heat-shock proteiny fungují jako molekulární chaperony. Jejich exprese je v CNS mimo jiné zvýšená u Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci a u Alexanderovy nemoci je součástí astrocytárních Rosenthalových vláken (Li et al. 2009).

Crystalliny lze rovněž prokázat v balónových neuronech u kortikobazální degenerace.  $\alpha$ B-crystallin byl také identifikován jako komponenta  $\alpha$ -synuklein-imunoreaktivních oligodendroglálních inkluzí u mnohotné systémové atrofie (MSA). V dalším typu  $\alpha$ -synuklein-imunoreaktivních inkluzí, Lewyho tělískách, typických pro Parkinsonovu nemoc a demenci s Lewyho tělísky, bylo množství  $\alpha$ B-crystallinu nižší než v případě MSA (Pountney et al. 2005).

Na modelu astrocytární kultury bylo prokázáno, že  $\alpha$ A- i  $\alpha$ B-crystalliny specificky interagují pouze s PAR2 a tato interakce snižuje míru apoptózy astrocytů po podání ceramidu či staurosporinu a tento protektivní efekt je dále potencionován zvýšením exprese  $\alpha$ A- a  $\alpha$ B-crystallinu (Li et al. 2009).

#### **1.4.2 Neurotoxické mechanismy**

Podkladem neurodegenerativního působení PARs je narušení intracelulární homeostázy kalcia, dysregulace transportu iontů přes membrány a vznik produktů oxidativního metabolismu v cytosolu i v mitochondriích. Toto vede, v kombinaci s dalšími faktory jako jsou zánět, hypoxie, ischemie, snížené pH, hypoglykémie či hyperglykémie, minerálová dysbalance a obecné narušení proteostázy k narušení funkce a viability neuronů a gliálních elementů. Navození apoptózy může být způsobeno vysokými koncentracemi trombinu, který přes PAR1 indukuje vzestup intracelulárního kalcia, stimuluje sekreci glutamátu a přes NMDA-receptory vede k toxickému poškození neuronů glutamátovou toxicitou (Gingrich et al. 2000; Hamill et al. 2009). Dále může docházet k indukci iNOS, COX-2, NF- $\kappa$ B signalizace a sekrece eikosanoidů a prozánětlivých cytokinů (Luo et al. 2007).

Toxické působení zvýšené koncentrace intracelulárního kalcia bylo pozorováno po aktivaci PAR1 a PAR2 (Luo et al. 2005; Smith-Swintosky et al. 2002; Striggow et al. 2001; Wang a Reiser 2003; Wang et al. 2002a). Signální kaskády vedoucí k toxickému efektu zahrnují RhoA GTPázu, aktivaci kaspázy-3 a modulaci aktivity ERK1 a ERK2, JNK1 a JNK2 a p38 (Choi et al. 2003a; Wang et al. 2007a; Wang et al. 2007b). PAR1 indukovaná aktivace ERK1 a ERK2 vede k proliferaci astrocytů a rozvoji reaktivní astroglie (Nicole et al. 2005; Wang et al. 2002b). Podobně může perzistentní aktivace PAR4 indukovat aktivaci mikroglie (Suo et al. 2003a). Je však otázkou, zda je aktivace astrocytů či mikroglie vždy nutně toxická. Lze však očekávat, že aberantní aktivita či excesivní sekrece prozánětlivých cytokinů mikroglie bude mít i nepříznivý efekt.

Zatím nejistý význam má zvýšená exprese PAR2 v mozcích krys po ozáření (Olejar et al. 2002).

### 1.4.3 Vaskulární patologie CNS

Úloha PARs v patogenezi ischemického či hemoragického postižení CNS spočívá zejména v modulaci patofyziologických dějů na neuronech či gliálních elementech v okolí postižené oblasti. Pro část mozkové tkáně bezprostředně postižené nejzávažnějším inzultem (typicky umbra v případě ischemického postižení) má aktivita PARs význam toxický a spolupodílí se na mechanismech regulované či neregulované buněčné smrti. Eventuální protektivní působení PARs se zde nemá šanci uplatnit. Nicméně v oblasti penumbry je rovnováha toxického a protektivního působení PARs jedním z faktorů rozhodujících o zániku či přežití neuronů, gliálních elementů a endotelií. V oblasti penumbry byla imunohistochemicky prokázána přechodně zvýšená exprese PAR1, PAR2, PAR3 i PAR4 (Henrich-Noack et al. 2006; Jin et al. 2005). Na mikroanatomické a subcelulární úrovni došlo po navození přechodné globální ischémie v krysích hipokampech ke ztrátě exprese PAR4 v poli CA1, aberantní intracytoplazmatické expresi PAR4 v poli CA3 a ztrátě exprese PAR4 na vláknech v poli CA4 (Henrich-Noack et al. 2010). Na úrovni mRNA je však exprese PARs v terénu ischémie odlišná, s výrazně sníženou expresí mRNA pro PAR1, méně sníženou expresí mRNA pro PAR2, přechodně zvýšenou expresí mRNA pro PAR3 a zvýšenou expresí mRNA pro PAR4 (Rohatgi et al. 2004).

Hlavní aktivující proteinázou aberantně přítomnou v mozkové tkáni při ischemicko-hemoragických inzultech je trombin, pro který byl, spolu s MMP-9, prokázán přímý toxický efekt na neurony. Trombin i MMP-9 aktivují PAR1 a indukují zánik neuronů, který je snížen inhibicí trombinu hirudinem, inhibicí MMP-9 i vyřazením genu pro PAR1 (Xue et al. 2009). Toxický efekt trombinu přes aktivaci PAR1 byl prokázán na myším modelu ischemického postižení indukovaného uzávěrem a. cerebri media (Chen et al. 2012) a intrahipokampální injekce trombinu indukovala aktivaci mikroglie a oxidativní stres v neuronech pole CA1 (Choi et al. 2005). Ani trombin však nemusí být vždy nutně asociován pouze s toxicitou. Nízké koncentrace trombinu i PAR1-agonista indukovaly na kultuře krysích astrocytů a neuronů PAR1-dependentní protektivní účinek při hypoglykémii, deprivaci růstových faktorů a podání peroxidu vodíku, přičemž vyšší koncentrace trombinu byly již toxické (Vaughan et al. 1995). Tento jev, kdy nízké koncentrace trombinu podpořily spíše protektivní efekt, byl potvrzen podáním agonisty PAR1, které mělo



analogický, protektivní, efekt, který byl spojen s aktivitou p44/42-MAPK (Hu et al. 2010; Jiang et al. 2002; Xi et al. 2001). Protektivní efekt agonisty PAR1 pak zlepšil přežití neuronů i při jejich následném vystavení vysokým koncentracím trombinu (Jiang et al. 2002).

Na kryším modelu ischemie vedlo podání baicalinu (flavonoid získaný z kořenů šišáku bajkalského [*Scutellaria baicalensis*], který je oblíbeným „lékem“ v tzv. celostní medicíně) ke snížení exprese PAR1 a ke zlepšení neurologického profilu i snížení apoptózy neuronů (Zhou et al. 2012); podobný účinek podání baicalinu byl pozorován i na modelu intracerebrální hemoragie (Zhou et al. 2014).

Studie na myších s přechodnou okluzí a. carotis či a. cerebri media byla absence PAR1 spojena s redukcí objemu infarktových ložisek (Hamill et al. 2009; Olson et al. 2004), přičemž jako jeden z možných mechanismů toxického působení aktivity PAR1 se ukázala být indukce NMDA-asociované toxicity (Hamill et al. 2009). Podobný výsledek přinesla další studie na modelu ischemie způsobené přechodnou okluzí a. cerebri media u krys, kdy byla inhibice exprese PAR1 pomocí siRNA rovněž asociována s redukcí objemu infarktových ložisek a lepším neurologickým profilem, přičemž autoři pozorovali u krys s vyřazeným PAR1 zvýšenou aktivitu stresových proteinů HSP70 a MAP2 (Zhang et al. 2012b). I při bilaterální okluzi společných karotid byl výsledek analogický – myši se zachovalou expresí PAR1 měly horší neurologický deficit, závažnější edém mozku a zvýšenou apoptózou neuronů (Wang et al. 2012).

V kontextu výše provedených studií prokazujících toxický efekt aktivace PAR1 je zajímavý výsledek studie na myším modelu permanentní okluze distální a. cerebri media, kdy byla aktivace PAR1 rekombinantním analogem APC spojena se snížením objemu infarktových ložisek, migrací neuroblastů do periischemické oblasti a zlepšením klinických parametrů (Wang et al. 2013). Protektivní efekt APC byl prokázán i v další studii, ve které měla aktivace PAR1 a PAR3 APC protektivní vliv na modelu NMDA a staurosporinem indukované apoptózy (Guo et al. 2004).

Role PAR2 v ischemicko-hemoragickém poškození je, na rozdíl od PAR1, prozkoumána výrazně méně, kdy je na rozdíl od PAR1, PAR2 asociován spíše s protektivním účinkem.

Při ischemii navozené přechodnou okluzí a. cerebri media bylo u myší s vyřazeným genem pro PAR2 pozorováno zvýšení objemu infarktového ložiska, zvýšení apoptózy a snížení exprese GFAP spolu s významně sníženou aktivitou ERK1/2 v neuronech, která byla u myší se zachovaným

PAR2 naopak zvýšená (Jin et al. 2005).

#### 1.4.4 Alzheimerova nemoc

Role PARs v patogenezi Alzheimerovy nemoci je komplexní, protože kromě vlastní aktivity PARs je v tomto případě důležitá i role proteináz, které mohou k patogenezi Alzheimerovy nemoci, kromě aktivace příslušných PARs, významně přispět i svou proteolytickou aktivitou vůči klíčovým patologicky modifikovaným molekulám asociovaným s Alzheimerovou nemocí. PAR1, PAR2 a PAR4 navíc svou aktivitou modulují jiné, zejména zánětlivé procesy, které významně přispívají k progresi neurodegenerativních změn.

V roce 1992, ještě před objevem PAR1, popsali Akiyama *et al.* zvýšené koncentrace trombinu v mozcích pacientů s Alzheimerovou nemocí a jeho akumulaci v amyloidových plakách a neurofibrilárních klucích (Akiyama et al. 1992). Původ trombinu nemusí být pouze exogenní, z krevní plasmy, ale i endogenní, protože byla prokázána exprese protrombinu v neuronech, astrocytech i mikroglia (Arai et al. 2006). Trombin má schopnost štěpit tau protein, přičemž hyperfosforylace tau proteinu tuto schopnost trombinu snižuje (Arai et al. 2005). Hyperfosforylace tau proteinu a jeho agregace mohou být navíc indukovány aktivací trombin-senzitivních PARs, PAR1 a PAR4. V tomto kontextu je důležitý rozdíl ve struktuře N-konce PAR1 a PAR4, kdy PAR1 má na svém N-konci hirudinovou doménu, která facilituje vazbu trombinu a zároveň usnadní jeho disociaci (Adams et al. 2011a). PAR4 hirudinovou doménu nemá a trombin se na něj váže méně ochotně, nicméně následná rychlost disociace trombinu je pomalejší a downregulační mechanismy tlumící aktivitu PAR4 tak nejspíše fungují pomaleji. Prolongovaná aktivace PAR4 trombinem tak může být, ve srovnání s PAR1, pro buňku škodlivější, protože jsou nadměrně stimulovány MAP kinázy ERK1 a ERK2, jejichž aktivita je považována za jednu z cest vedoucí k hyperfosforylaci a následné aktivaci tau proteinu (Ferrer 2001; Suo et al. 2003b). Aktivace PAR4, na rozdíl od PAR1, navíc vedla v mikrogliaální kultuře k sekreci potenciálně neurotoxického TNF $\alpha$  (Suo et al. 2003a); aktivita PAR1 je spojována s proliferací mikroglie (Suo et al. 2002).

Vliv endogenně syntetizovaného trombinu v CNS je spíše sporný (Wang a Reiser 2003). Navíc lze předpokládat že jeho exprese a aktivita je mnohem přesněji regulována než aktivita exogenního trombinu. Ta může být, spolu s následně aberantní aktivitou PAR1 a PAR4, jedním z faktorů přispívajících k poškození a zániku neuronů po narušení hematoencefalické bariéry. Poškození



hematoencefalické bariéry v rámci Alzheimerovy nemoci ale i stárnutí obecně není vzácné. Drobné hemoragie či mikroischémie v periventrikulární a subkortikální bílé hmotě a korových oblastech vznikající nejčastěji na podkladě hypertenzní angiopatie drobných cév či naopak, poklesu perfúzního tlaku v kapilárách vedoucího k jejich kolapsu a následné okluzi (Brown a Thore 2011). Jedná se o relativně častý fenomén a přítomnost těchto mikrovaskulárních změn, která je detekovatelná magnetickou rezonancí, je nezávislým prediktorem horšího klinického průběhu nejen Alzheimerovy nemoci, ale i dalších neurodegenerativních onemocnění (Prins a Scheltens 2015).

Afkhami-Goli *et al.* popsali dvojí roli PAR2 v rámci patogeneze Alzheimerovy nemoci. V kortikálních neuronech mozků pacientů s Alzheimerovou nemocí je exprese mRNA pro PAR2 snižena. Na myším modelu je přítomnost PAR2 na neuronech spojována s neuroprotektivním fenotypem, který spočíval ve sníženém toxickém působení vyvolaném podáním  $A\beta_{(1-42)}$  u myši s normálně exprimovaným PAR2 ve srovnání s PAR2-KO skupinou. Naopak přítomnost PAR2 na astrocytech a mikroglialních elementech indukovala sekreci prozánětlivých cytokinů zahrnujících IL-8 či IL-4 a byla spojena s jejich neurotoxickým působením (Afkhami-Goli *et al.* 2007). Z hlediska významu IL-8 tyto výsledky kontrastují s výsledky studií na krysím modelu, kde je krysí analog IL-8, GRO/CINC-1, spojován s neuroprotektivním působením (Wang *et al.* 2007a; Wang *et al.* 2007b; Wang *et al.* 2006a).

Pohled na Alzheimerovu nemoc jako na chronické „low-grade“ zánětlivé onemocnění indukované zejména toxicitou oligomerů  $A\beta$  a amyloidových plak doprovázenou aktivací mikroglie dále nepřímou podporuje roli PARs jako buněčných senzorů pro zánětem indukované proteinázy (Rubio-Perez a Morillas-Ruiz 2012).

Mimo vlastní aktivitu PARs jsou zajímavé výsledky studie na myším modelu, kde trypsin IV (tzv. mozkový trypsin), který může aktivovat i PARs, štěpil APP a indukoval expresi GFAP astrocyty (Wang *et al.* 2008).

#### **1.4.5 Parkinsonova nemoc**

Na modelech Parkinsonovy nemoci byla prokázána toxická i protektivní role trombinu působícího přes PAR1 a PAR4.

Na myším modelu s 6-OHDA (6-hydroxydopaminem) indukovanou degenerací dopaminergních

neuronů substantia nigra byl prokázán protektivní efekt trombinu závislý na koncentraci a také čase podání (Cannon et al. 2007; Cannon et al. 2005). Pokud byl trombin podán intracerebrálně v nízkých koncentracích několik dní před aplikací 6-OHDA, byl účinek protektivní, respektive byly pozorovány méně závažné neurologické příznaky a byla snížena ztráta dopaminergních synapsí. Tento efekt byl replikován podáním PAR1 antagonisty, jehož administrace spolu s prekondicí trombinem potencovala protektivní efekt. Oproti tomu aktivace PAR4 agonistou vedla ke zhoršení příznaků a tento účinek byl pozorován také při vysokých dávkách trombinu (Cannon et al. 2006). I zde, podobně jako u Alzheimerovy nemoci (Suo et al. 2003a), je zjevný rozdíl v charakteru aktivace PAR1 a PAR4 trombinem a jejího následného vlivu na osud buňky.

V dalších modelech měl trombin po injekci do substantia nigra s dávkou rostoucí toxický účinek, spojený s indukcí apoptózy dopaminergních neuronů (Choi et al. 2003a). V mikroglii takto podaný trombin indukoval aktivaci kináz p38, ERK1/2 a JNK zvýšenou expresí a aktivitu iNOS a COX-2, spolu se sekrecí prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL6 a TNF $\alpha$  (Choi et al. 2003b). Aktivace PAR1 trombinem na astrocytech vedla k jejich aktivaci a indukci aktivity glutathionperoxidázy, přičemž zvýšená sekrece cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-8 pozorována nebyla (Ishida et al. 2006).

Kromě trombinu mohou PAR1 aktivovat MMPs, které jsou ve zvýšené míře přítomny v substantia nigra pacientů s Parkinsonovou nemocí (Lorenzl et al. 2002) a také u progresivní supranukleární obrny, pro kterou je rovněž charakteristická degenerace substantia nigra (Lorenzl et al. 2004), i když v tomto případě jde o onemocnění asociované s patologií proteinu tau.

Na modelu toxicity  $\alpha$ -synukleinu v krysí mikroglialní kultuře bylo ukázáno, že  $\alpha$ -synukleinem aktivovaná mikroglie indukuje aktivitu iNOS a zvýší sekreci MMP1, MMP3, MMP8 a MMP9, TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (Lee et al. 2010). V této studii snížila inhibice MMP3, MMP8 a MMP9 aktivitu iNOS a expresi TNF $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Inhibice MMP3 a MMP9 navíc snížila aktivitu NF- $\kappa$ B a MAPK signalizace. Průkaz, že MMPs působí tyto změny přes PAR1 byl proveden podáním cathepsinu G (společný inhibitor PAR1, PAR2 a PAR3) a syntetického antagonisty PAR1, které aktivitu iNOS a sekreci prozánětlivých cytokinů inhibovaly.

Na dalším modelu Parkinsonovy nemoci byl myším do substantia nigra podán 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), který navodil degeneraci dopaminergních neuronů, zvýšení exprese  $\alpha$ -synukleinu, zvýšení exprese PAR2 a aktivující fosforylaci NF- $\kappa$ B. Inhibicí PAR2

došlo ke snížení aktivity NF- $\kappa$ B, což se projevilo nejen sníženou sekrecí IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ , ale také sníženou acetylací histonu H3 v oblasti promoteru genu pro  $\alpha$ -synuklein vedoucí k jeho snížené expresi (Liu et al. 2014). Zvýšení exprese PAR2 tak může spolu s NF- $\kappa$ B přispívat ke zvýšené syntéze  $\alpha$ -synukleinu a nepřímo tak přispívat ke vzniku inkluzí a zvýšením sekrece prozánětlivých cytokinů k degeneraci neuronů v substantia nigra.

Subkutánní podání MPTP myším indukovalo příznaky odpovídající extrapyramidovému syndromu, které byly vyjádřeny méně u PAR1-KO myši a které ustoupily po podání PAR1-antagonistického oligopeptidu; podání MPTP bylo navíc spojeno se zvýšením exprese MMP1 a snížením exprese PAI-1 jak u PAR1-WT tak i u PAR1-KO myši. PAR1-KO myši měly oproti PAR1-WT myším nižší aktivitu mikroglie, vyšší expresi dopaminového transportéru a vyšší koncentraci dopaminu a tyrosinhydroxylázy (Hamill et al. 2007).

Pro interpretaci výsledků studií s neuronálními či gliálními kulturami je důležitým faktem to, že Parkinsonova nemoc je onemocnění s definovanou časoprostorovou progresí patologie  $\alpha$ -synukleinu, která začíná v mozkovém kmeni a pokračuje přes limbické struktury a bazální ganglia do neokortikálních oblastí. Je to fenomén, který nemohou izolované buněčné kultury reprodukovat. Tento aspekt byl vzat v potaz ve studii provedené na mozcích pacientů s Parkinsonovou nemocí, ve které autoři prokázali variaci exprese PAR2, trypsinu a jeho inhibitorů (serpinů A5 a A13) v různých oblastech mozku. V nucleus dorsalis n. X. byla u Parkinsonovy nemoci snížená exprese serpinu A5 na neuronech, ale byla zvýšená na mikroglii. V locus coeruleus byla snížená exprese serpinu A13 na neuronech a v substantia nigra byla snížena neuronální exprese PAR2, trypsinu i serpinů A5 a A13, přičemž v pozdních stádiích Parkinsonovy nemoci byla zvýšená exprese mikrogliaálního serpinu A13. Tyto výsledky tak poukazují na komplexitu exprese PAR2 a jeho aktivátorů a inhibitorů v rámci patogeneze neurodegenerativních onemocnění (Hurley et al. 2015).

#### **1.4.6 Prionová onemocnění**

Úloha PARs v patogenezi prionových onemocnění je stále neznámá. Prionová onemocnění jsou charakterizována relativně dlouhou preklinickou fází, která se po přechodu do fáze klinické manifestují rychle progredující demencí se změnami chování i motoriky a vedou ke smrti v řádu několika měsíců. Tento rychlý průběh je spojen s rozsáhlými dystrofickými změnami, masivním

zánikem neuronů a aktivací astrocytů doprovázenými zvýšením koncentrace proteinu tau a přítomností proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku. Při takto dramatickém průběhu lze očekávat změny exprese PARs, které mohou i při intaktní hematoencefalické bariéře vlivem endogenních mozkových proteináz modulovat aktivitu glie a osud neuronů.

Ve studii na myším modelu s vyřazeným genem pro PAR2 a s indukovaným prionovým onemocněním bylo ukázáno, že u myši s geneticky vyřazeným PAR2 je nástup příznaků onemocnění opožděný a i jeho průběh pozvolnější. Tyto výsledky by tak mohly naznačovat modulační vliv aktivity PAR2 na patogenezi prionových onemocnění (Matej et al. 2012a).

#### **1.4.7 Demyelinizující onemocnění**

Nejčastějším a z medicínského hlediska nejdůležitějším demyelinizujícím onemocněním je roztroušená skleróza mozkomíšní (RS). Během akutních stádií RS dochází ke zvýšení permeability hematoencefalické bariéry a migraci lymfocytů a dalších buněk imunitního systému do perivaskulárních prostor a dále do bílé hmoty. Postižena může být prakticky jakákoliv část CNS. Po odeznění zánětu dochází k restituci s omezenou remyelinizací a většinou s jen minimální destrukcí axonů (u tzv. remitující-relabující formy RS; u vzácnější, primárně progredující formy, aktivita nemoci postupně graduje). PARs se tak mohou v rámci patogeneze RS nejvíce uplatnit během aktivní fáze. Vzhledem k jejich expresi na endotelu se mohou podílet na zvýšení permeability hematoencefalické bariéry a indukci prozánětlivých změn v perivaskulárním i neuropilovém kompartmentu.

Na myším modelu RS, experimentální autoimunitní encefalidě (EAE) se ukázalo, že inhibice PAR1 arteficiálním antagonistou vede ke zmírnění příznaků (Kim et al. 2015a). Autoři v této studii prokázali, že inhibice PAR1 stabilizuje hematoencefalickou bariéru zachováním exprese adhesivních molekul occludinu a ZO-1 na endoteliích. Dále také snižuje sekreci MMP9 astrocyty, která má schopnost štěpit složky bazálních membrán. Inhibice PAR1 v pak snížila rozsah demyelinizace a zánětlivé infiltrace (Kim et al. 2015a; Lakhan et al. 2013).

Výše popsaná aktivita PAR1 tak poukazuje na možný význam trombinu jako zesilujícího faktoru během aktivní fáze EAE, respektive RS. V tomto případě (a obecně ani v dalších) však nelze aktivaci PAR1 vzhledem k jeho funkční selektivitě asociovat pouze s jedním typem buněčné odpovědi. Patologická role trombinu a tudíž i PAR1 byla prokázána na myších s indukovanou EAE, kdy

byla závažnost průběhu EAE snížena podáním inhibitoru trombinu (hirudin). Podání agonisty PAR1, aktivovaného proteinu C (APC), však indukovalo na rozdíl od trombinu snížení exprese TNF $\alpha$ , IL-6 a IL-17, snížení Th1 a Th17 cytokinů a inhibici signální dráhy NF- $\kappa$ B (Feistritzer a Riewald 2005; Han et al. 2008). Tyto studie tudíž potvrzují výše diskutovaný rozdíl ve výsledném fenotypu endotelu po aktivaci PAR1 trombinem či APC, kdy APC navázaný na EPCR aktivuje přes PAR1 rozdílné signální dráhy než trombin.

I přes dominantní asociaci s vaskulární komponentou patogeneze EAE, respektive RS, může být role PAR1 v patogenezi těchto demyelinizujících onemocnění důležitá i v rámci postižení oligodendrocytů. Aktivace PAR1 kallikreinem-6, proteinázou hojně exprimovanou v lidském mozku zejména oligodendrocyty (Scarlsbrick et al. 2001), vedla k degenerativním změnám oligodendrocytů a snížení exprese PLP (Burda et al. 2013). Kromě toho je exprese kallikreinu 6 a jeho aktivita asociována s patogenezí demyelinizace na virovém modelu RS u myši (Scarlsbrick et al. 2012a; Scarlsbrick et al. 2012b) a v případech lidské RS je kallikrein 6 asociován se sekundárně progredující RS (Scarlsbrick et al. 2008).

V mozkové tkáni myši s indukovanou EAE a mozkové tkáni pacientů s RS byla v oblastech postižených demyelinizací pozorována zvýšená exprese PAR2 na makrofázích a astrocytech. Aktivita PAR2 vedla k horšímu průběhu onemocnění, což bylo recipročně prokázáno také na myších s vyřazeným genem pro PAR2, u kterých byl průběh onemocnění příznivější (Noorbakhsh et al. 2006). V rámci této studie se také ukázalo, že po podání bakteriálního endotoxinu byla přítomnost PAR2 u wildtype myši spojena s indukcí iNOS v astrocytech a u PAR2-KO myši se sníženou sekrecí IL-10 makrofágy. Toxický efekt PAR2 na oligodendrocyty byl prokázán aplikací supernatantu z kultury makrofágů aktivovaných PAR2-agonistickým oligopeptidem na oligodendrogliální kulturu, ve které následně došlo k degenerativním změnám. Aktivace PAR2 na makrofázích agonistickým oligopeptidem indukovala iNOS a sekreci TNF $\alpha$ , IL-6 a IL-12. U PAR2-KO myši s indukovanou EAE byla navíc pozorována snížená infiltrace mozkové tkáně zánětlivými elementy. Na základě těchto výsledků lze dobře posoudit roli PAR2, která v závislosti na buněčném typu (makrofágy) přispívá k rozvoji zánětlivé reakce a poškození oligodendrocytů v rámci patogeneze imunitního demyelinizujícího onemocnění a to nejen aktivitou T-lymfocytů, ale i přímo cytokiny secernovanými makrofágy vlivem aktivity PAR2 (Noorbakhsh et al. 2006).

Pro patogenezi demyelinizujících onemocnění je tak nejspíše zásadní přítomnost kallikreinu 6 a v případě aktivních stavů spojených se zvýšenou permeabilitou hematoencefalické bariéry také trombinu. Kombinovaná aktivace PAR1 a PAR2 na endotelu, oligodendrocytech a makrofázích v bílé hmotě zřejmě významně přispívá k patogenezi těchto onemocnění.

Přesná patogeneze RS je stále neznámá a předpokládá se indukce autoimunitní reakce proti autogennímu antigenu v CNS (Compston a Coles 2008), přičemž výsledky výše diskutovaných studií jsou založeny na podání exogenního antigenu, navíc často spolu s adjuvans, nejčastěji Freundovým agens či toxinem *B. pertussis*. Proto je potřeba hodnotit výsledky studií založených na indukci EAE u myši a jejich translaci do patogeneze lidské RS kriticky.

#### **1.4.8 Onemocnění motorického neuronu**

Zajímavé výsledky poskytla studie na myším modelu lidského onemocnění motorického neuronu, konkrétně modelu s mutovanou superoxiddismutázou 1 (SOD1, p.G93A) (Zhong et al. 2009). Mutace SOD1 je asociována s přibližně 20 % hereditárních případů amyotrofické laterální sklerózy (ALS) u lidí (Robberecht a Philips 2013).

Klíčovou molekulou je v tomto případě APC, která po periferním podání prostoupila hematoencefalickou bariérou a v motorických neuronech indukovala snížení exprese mutované SOD1 a tím i toxicitu asociovanou s kyslíkovými radikály. Toto bylo spojeno s lepším neurologickým profilem a delším přežíváním myši s mutovanou SOD1. Snížení exprese SOD1 korelovalo s expresí PAR1 a PAR3, jejichž aktivita byla spojena se snížením exprese transkripčního faktoru SP1, jehož aktivita je podobně jako např. aktivita NF- $\kappa$ B asociována se spíše toxickým efektem. Inhibice PAR1 a PAR3 pak vedla ke zvýšení exprese SOD1. Kromě snížení exprese SOD1 v neuronech APC také snížil expresi SOD1 v endoteliích malých cév míchy, a celkově stabilizoval hematoencefalickou bariéru, která je u pacientů s ALS typicky narušená (Winkler et al. 2013; Zhong et al. 2009). Na důležitou roli serinových proteináz a jejich inhibitorů (serpinů) v patogenezi ALS nepřímo poukazuje také studie, která prokázala narušenou rovnováhu aktivity serpinů a proteináz v rámci vzniku neuronálních cytoplasmatických inkluzí (Chou et al. 1998).

Přestože klinicky i neuropatologicky dominuje u ALS postižení motorických neuronů, nelze zcela opomenout klíčový vztah mezi funkcí a viabilitou neuronů a správnou funkcí oligodendrocytů. Ty nejen myelinizují axony, ale také zásadním způsobem přispívají k jejich správnému metabolis-



mu (Nave 2010a; Nave 2010b). Postižení oligodendrocytů v rámci patogeneze ALS tak může být asociováno s aberantní aktivitou proteináz a PARs, které tak mohou významně participovat na patogenezi neurodegenerativních onemocnění charakterizovaných poškozením myelinu a axonů.

#### **1.4.9 HIV-asociovaná encefalopatie**

Postižení centrálního nervového systému spojeného s infekcí HIV je u pacientů neléčených antiretrovirovou terapií velmi časté – až v 50 % případů. Klinicky se chronické postižení CNS při infekci HIV označuje jako spektrum tzv. HIV-asociovaného neurokognitivního postižení klasifikovaného podle míry neurologického postižení a v pokročilé podobě až HIV-asociovanou demencí (Antinori et al. 2007). Subakutní HIV encefalitida se díky zavedené diagnostice a terapii vyskytuje výrazně méně. V periferním nervovém systému se infekce HIV často manifestuje jako HIV-indukovaná distální sensorická polyneuropatie (Kaku a Simpson 2014).

V mozcích pacientů s HIV encefalidou byla oproti neurologicky zdravým kontrolám a případům roztroušené sklerózy mozkomíšni zjištěna zvýšená exprese PAR1 i trombinu na astrocytech, kdy na astrocytární kultuře aktivace PAR1 trombinem i PAR1-agonistou stimulovala sekreci IL-1 $\beta$ , aktivitu iNOS a expresi PAR1 mRNA, přičemž supernatant z této kultury indukoval na neuronální kultuře NMDA-asociovanou neurotoxicitu. Intrastriatální aplikace PAR1-agonisty myším pak indukovala astrocytózu a zánětlivé změny v CNS potvrzující toxický a prozánětlivý efekt aktivace PAR1 (Boven et al. 2003).

PAR1 může na svém N-konci vázat proteiny označované jako proprotein konvertázy, mezi které patří furin. Furin má schopnost se navázat na N-konec PAR1 aniž by jej aktivoval a zároveň má schopnost štěpit glykoprotein HIV, gp160, na gp120 a gp41. Tento proces je důležitým krokem pro infekci buňky virem HIV (Ozdener 2005). Zvýšená exprese PAR1 na neuronech tak může vést k sekvestraci membránového furinu, čímž se sníží jeho dostupnost pro štěpení gp160 a tím významně omezí vniknutí virových partikulí HIV do buňky (Kim et al. 2015b).

Toxický efekt aktivace PAR1 byl také prokázán u HIV-asociované distální sensorické polyneuropatie, při které dochází k degeneraci neuronů dorsálních spinálních ganglií. Na těchto neuronech byla působením IL-1 $\beta$  stimulována exprese PAR1, který po své aktivaci vedl ke zvýšení intracelulárního kalcia a degenerativním změnám neuronů, které byly sníženy podáním IL-1 $\beta$  antagonisty (Acharjee et al. 2011).

U HIV-asociované demence byla exprese PAR2 spolu s expresí IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$  v mozcích pacientů zvýšená. Upregulace neuronálního PAR2 se ukázala být právě výsledkem aktivity IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$  a působila protektivně proti Tat-indukované neurotoxicitě (Tat – Trans-activator of transcription, je protein kódovaný HIV, který stimuluje transkripci virové RNA) (Noorbakhsh et al. 2005; Ozdener 2005). Aktivita TNF $\alpha$  byla u myši s normálně přítomným genem pro PAR2 na neurolech protektivní, ale u myši s vyřazeným genem pro PAR2 byla toxická (Noorbakhsh et al. 2005).



## 1.5 Terapeutické aspekty

Ubikvitní exprese PARs, proteináz a jejich inhibitorů a jejich rozsáhlé zapojení v myriádě fyziologických funkcí a patofyziologických dějů přímo vybízí k terapeutickému využití aktivace či inhibice PARs a proteináz. Prakticky každá práce zabývající se patofyziologií PARs u lidských onemocnění je na svém konci uzavřena tím, že PARs mohou být využity k léčbě daného onemocnění a řada prací již pracuje s přesně definovanými modelovými systémy daných onemocnění s cílem zjistit, zda je modulace aktivity PARs možnou cestou k objevení nových terapeutických možností. Komplexita interakcí PARs a proteináz v řadě orgánových systémů, která ale také zásadním limitujícím faktorem znesnadňujícím jejich léčebné využití (Sidhu et al. 2014).

Zmíněná komplexita fyziologie PARs se odráží i v řadě možných přístupů k jejímu farmakologickému ovlivnění. Kromě využití klasických arteficiálních agonistů a antagonistů PARs (Adams et al. 2011b; Ramachandran et al. 2012) je to také užití pepducinů, lipopeptidů, které se inkorporují do vnitřního listu cytoplazmatické membrány a interakcí s intracytoplazmatickými kličkami GPCRs, respektive PARs, mohou aktivovat, inhibovat či jinak modulovat jejich aktivitu a tím ovlivnit například prometastatický fenotyp nádorových buněk (Agarwal et al. 2008; Yang et al. 2009). Zejména na poli léčby nádorových onemocnění je terapeuticky slibným přístupem ovlivnění aktivity proteináz (Overall a Kleinfeld 2006).

Zatím jediný preparát modulující aktivitu PARs zavedený do klinické praxe, konkrétně v léčbě tromboembolické nemoci, je antagonist PAR1 vorapaxar. Do klinických studií původně postoupily dva preparáty: vorapaxar (SCH530348) a atopaxar (E5555). Atopaxar neprošel druhou fází klinických studií pro hemoragické a další kardiovaskulární komplikace spojené s jeho podáváním; vorapaxar byl úspěšnější a v roce 2014 byl v USA i Evropské unii schválen pod firemním názvem Zontivity (MSD) pro užití v rámci prevence infarktu myokardu či ischemické cévní mozkové příhody u pacientů s vysokým kardiovaskulárním rizikem (French et al. 2015).

V současné době existují volně dostupné přípravky, které obsahují proteinázy či jejich inhibitory, nicméně jejich účinnost není doložena dostatkem dat z klinických studií. Na tomto poli se také uplatňuje i užití fytofarmak obsahujících řadu přirozených proteináz (Kakarala a Jamil 2014). Užití a další výzkum fytofarmak může být, zejména v kontextu udělení Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu pro rok 2015 za objev artemisininu, původně izolovaného z rostliny *Artemisia*

*annua* (pelyněk noční), pro léčbu malárie, také jednou z možných cest pro modulaci aktivity PARs u různých onemocnění.

Postupným poznáváním biologie a přesných signálních mechanismů jednotlivých PARs, proteináz a jejich inhibitorů se otevírá více možností jak přesněji a spolehlivěji zacílit na příslušný (pato)fyzilogický efekt. Je zřejmé, že ovlivnění aktivity PARs nejspíše nebude onou „magickou kulkou“ léčící dané onemocnění. Význam intervence na úrovni PARs je hlavně na úrovni nemoc-modifikující. V budoucnu lze očekávat, že ovlivnění aktivity PARs, proteináz a jejich inhibitorů bude součástí léčby alespoň některých systémových onemocnění, zejména nádorových či zánětlivých, ať už přímo ovlivňující progresi onemocnění nebo v rámci paliativní analgetické léčby (Vergnolle 2009). Slibná je možnost cílené lokální intrartikulární aplikace inhibitorů PARs u degenerativních onemocnění kloubů (Neumann et al. 2014) či perspektiva využití modulace aktivity PARs v rámci léčby akutních ischemických onemocnění CNS či využití modulace PARs v rámci prevence sekundárního poškození při traumatech míchy.

## 1.6 Použitá literatura

- ABRAHAM, C. R. Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, Nov-Dec 2001, 22(6), 931-936.
- ADAMS, M. N., et al. The role of palmitoylation in signalling, cellular trafficking and plasma membrane localization of protease-activated receptor-2. *PLoS One*, 2011a, 6(11), e28018.
- ADAMS, M. N., et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther*, Jun 2011b, 130(3), 248-282.
- AFKHAMI-GOLI, A., et al. Proteinase-activated receptor-2 exerts protective and pathogenic cell type-specific effects in Alzheimer's disease. *J Immunol*, 2007, 179, 5493-5503.
- AGARWAL, A., et al. Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, Sep 2008, 7(9), 2746-2757.
- ACHARJEE, S., et al. Proteinase-activated receptor-1 mediates dorsal root ganglion neuronal degeneration in HIV/AIDS. *Brain*, Nov 2011, 134(Pt 11), 3209-3221.
- AKIYAMA, H., et al. Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, Nov 9 1992, 146(2), 152-154.
- AL-ERYANI, K., et al. Protease-activated receptor 2 modulates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Hum Pathol*, Jul 2015, 46(7), 991-999.
- AL-ERYANI, K., et al. Hemophagocytosis-mediated keratinization in oral carcinoma in situ and squamous cell carcinoma: a possible histopathogenesis of keratin pearls. *J Cell Physiol*, Oct 2013, 228(10), 1977-1988.
- ALBERELLI, M. A. AND DE CANDIA, E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascul Pharmacol*, 8// 2014, 62(2), 72-81.
- ANTINORI, A., et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*, Oct 30 2007, 69(18), 1789-1799.
- ARACHICHE, A., et al. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by alpha-thrombin. *J Biol Chem*, Nov 8 2013, 288(45), 32553-32562.
- ARAI, T., et al. Proteolysis of non-phosphorylated and phosphorylated tau by thrombin. *J Biol Chem*, Feb 18 2005, 280(7), 5145-5153.
- ARAI, T., et al. Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, Jan 2006, 65(1), 19-25.
- ARORA, P., et al. Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene*, Jul 24 2008, 27(32), 4434-4445.
- BAE, J. S., et al. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb 20 2007, 104(8), 2867-2872.
- BANDO, Y., et al. Implications of protease M/neurosin in myelination during experimental demyelination and remyelination. *Neurosci Lett*, Sep 25 2006, 405(3), 175-180.
- BAO, Y., et al. Protease-activated receptor 2 antagonist potentiates analgesic effects of systemic morphine in a rat model of bone cancer pain. *Reg Anesth Pain Med*, Mar-Apr 2015a, 40(2), 158-165.
- BAO, Y., et al. Increased expression of protease-activated receptor 2 and 4 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain. *J Mol Neurosci*, Mar 2015b, 55(3), 706-714.
- BARANGER, K., et al. Endogenous and synthetic MMP inhibitors in CNS physiopathology. *Prog Brain Res*, 2014, 214, 313-351.
- BARKER, R., et al. Activators and inhibitors of the plasminogen system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, Apr

2012, 16(4), 865-876.

BARTHA, K., et al. Identification of thrombin receptors in rat brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, Jan 2000, 20(1), 175-182.

BAUMER, N., et al. Proteinase-Activated Receptor 1 (PAR1) regulates leukemic stem cell functions. *PLoS One*, 2014, 9(4), e94993.

BLABER, S. I., et al. Targeting kallikrein 6 proteolysis attenuates CNS inflammatory disease. *FASEB J*, May 2004, 18(7), 920-922.

BLACK, P. C., et al. Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate*, May 15 2007, 67(7), 743-756.

BLACKHART, B. D., et al. Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide. *Mol Pharmacol*, Dec 2000, 58(6), 1178-1187.

BORENSZTAJN, K., et al. Protease-activated receptor-2 induces myofibroblast differentiation and tissue factor up-regulation during bleomycin-induced lung injury: potential role in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, Dec 2010, 177(6), 2753-2764.

BOTHAM, A., et al. Palmitoylation of human proteinase-activated receptor-2 differentially regulates receptor-triggered ERK1/2 activation, calcium signalling and endocytosis. *Biochem J*, Sep 1 2011, 438(2), 359-367.

BOVEN, L. A., et al. Up-regulation of proteinase-activated receptor 1 expression in astrocytes during HIV encephalitis. *J Immunol*, Mar 1 2003, 170(5), 2638-2646.

BROWN, W. R. AND THORE, C. R. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*, Feb 2011, 37(1), 56-74.

BURDA, J. E., et al. Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendroglial pathology. *Glia*, Sep 2013, 61(9), 1456-1470.

BUSHELL, T. J., et al. Characterization of proteinase-activated receptor 2 signalling and expression in rat hippocampal neurons and astrocytes. *Neuropharmacology*, May 2006, 50(6), 714-725.

CAI, W. S., et al. Activated protease receptor-2 induces GATA6 expression to promote survival in irradiated colon cancer cells. *Arch Biochem Biophys*, Aug 2014, 555-556, 28-32.

CANNON, J. R., et al. The effect of thrombin on a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease depends on timing. *Behav Brain Res*, Nov 2 2007, 183(2), 161-168.

CANNON, J. R., et al. Thrombin preconditioning provides protection in a 6-hydroxydopamine Parkinson's disease model. *Neurosci Lett*, Jan 20 2005, 373(3), 189-194.

CANNON, J. R., et al. Protease-activated receptor-1 mediates protection elicited by thrombin preconditioning in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res*, Oct 20 2006, 1116(1), 177-186.

CANTO, I., et al. Allosteric Modulation of Protease-activated Receptor Signaling. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12, 804-811.

CANTO, I. AND TREJO, J. Palmitoylation of protease-activated receptor-1 regulates adaptor protein complex-2 and -3 interaction with tyrosine-based motifs and endocytic sorting. *J Biol Chem*, May 31 2013, 288(22), 15900-15912.

CATTANEO, F., et al. Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11), 19700-19728.

CENAC, N., et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest*, Mar 2007, 117(3), 636-647.

CENAC, N., et al. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol*, Aug 1 2004, 558(Pt 3), 913-925.

CEPPA, E. P., et al. Serine proteases mediate inflammatory pain in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest*

Liver Physiol, Jun 2011, 300(6), G1033-1042.

CISOWSKI, J., et al. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer. *Am J Pathol*, Jul 2011, 179(1), 513-523.

COMPSTON, A. AND COLES, A. Multiple sclerosis. *The Lancet*, 2008, 372(9648), 1502-1517.

COTTRELL, G. S., et al. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem*, Apr 2 2004, 279(14), 13532-13539.

COTTRELL, G. S., et al. Protease-activated receptor 2, dipeptidyl peptidase I, and proteases mediate *Clostridium difficile* toxin A enteritis. *Gastroenterology*, Jun 2007, 132(7), 2422-2437.

COUGHLIN, S. R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, Aug 2005, 3(8), 1800-1814.

CUNNINGHAM, M. A., et al. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med*, Feb 7 2000, 191(3), 455-462.

CUNNINGHAM, M. R., et al. Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *J Biol Chem*, May 11 2012, 287(20), 16656-16669.

D'ANDREA, M. R., et al. Characterization of Protease-activated Receptor-2 Immunoreactivity in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem*, 1998, 46(2), 157-164.

DARMOUL, D., et al. Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem*, May 14 2004a, 279(20), 20927-20934.

DARMOUL, D., et al. Activation of Proteinase-Activated Receptor 1 Promotes Human Colon Cancer Cell Proliferation Through Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. *Mol Cancer Res*, 2004b, 2(9), 514-522.

DARMOUL, D., et al. Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *Br J Cancer*, Sep 1 2001, 85(5), 772-779.

DAVIDSON, C. E., et al. Proteinase-activated receptor-2 activation participates in allergic sensitization to house dust mite allergens in a murine model. *Clin Exp Allergy*, Nov 2013, 43(11), 1274-1285.

DE MARTINO, M., et al. The protease activated receptor 1 gene variation IVSn -14 A>T is associated with distant metastasis and cancer specific survival in renal cell carcinoma. *J Urol*, Oct 2013, 190(4), 1392-1397.

DEWIRE, S. M., et al.  $\beta$ -Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69(1), 483-510.

DIAMANTOPOULOS, A., et al. Parstatin prevents renal injury following ischemia/reperfusion and radiocontrast administration. *Am J Nephrol*, 2012, 36(3), 278-286.

ELSTE, A. P. AND PETERSEN, I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Histol*, Apr 2010, 41(2-3), 89-99.

EVEN-RAM, S. C., et al. The pattern of expression of protease-activated receptors (PARs) during early trophoblast development. *J Pathol*, May 2003, 200(1), 47-52.

EVEN-RAM, S. C., et al. Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the alpha vbeta 5 integrin. *J Biol Chem*, Apr 6 2001, 276(14), 10952-10962.

FEISTRITZER, C. AND RIEWALD, M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*, Apr 15 2005, 105(8), 3178-3184.

FERRE, S. The GPCR heterotetramer: challenging classical pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, Mar 2015, 36(3), 145-152.

FERRELL, W. R., et al. Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest*, 2003, 111(1), 35-41.

FERRER, I. Phosphorylated Map Kinase (ERK1, ERK2) Expression is Associated with Early Tau Deposition in

Neurons and Glial Cells, but not with Increased Nuclear DNA Vulnerability and Cell Death, in Alzheimer Disease, Pick's Disease, Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. *Brain Pathol*, 2001.

FRENCH, S. L., et al. Approval of the first protease-activated receptor antagonist: Rationale, development, significance, and considerations of a novel anti-platelet agent. *Blood Rev*, May 2015, 29(3), 179-189.

GEORGE, A. J., et al. Unravelling the molecular complexity of GPCR-mediated EGFR transactivation using functional genomics approaches. *FEBS J*, Nov 2013, 280(21), 5258-5268.

GIESELER, F., et al. Proteinase-activated receptors (PARs) -- focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Communication and Signaling*, 2013, 11(86).

GINGRICH, M. B., et al. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci*, Jun 15 2000, 20(12), 4582-4595.

GREENWOOD, S. M. AND BUSHELL, T. J. Astrocytic activation and an inhibition of MAP kinases are required for proteinase-activated receptor-2-mediated protection from neurotoxicity. *J Neurochem*, Jun 2010, 113(6), 1471-1480.

GRIFFIN, J. H., et al. Activated protein C: biased for translation. *Blood*, May 7 2015, 125(19), 2898-2907.

GRIMSEY, N. J., et al. Ubiquitin plays an atypical role in GPCR-induced p38 MAP kinase activation on endosomes. *J Cell Biol*, Sep 28 2015, 210(7), 1117-1131.

GRISARU-GRANOVSKY, S., et al. Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int J Cancer*, Jan 20 2005, 113(3), 372-378.

GRISARU-GRANOVSKY, S., et al. Protease-activated-receptor 1 polymorphisms correlate with risk for unexplained recurrent pregnancy loss: a pilot study querying an association beyond coagulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, Feb 2015, 185, 13-18.

GUO, H., et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*, Feb 19 2004, 41(4), 563-572.

HAMILL, C. E., et al. Exacerbation of dopaminergic terminal damage in a mouse model of Parkinson's disease by the G-protein-coupled receptor protease-activated receptor 1. *Mol Pharmacol*, Sep 2007, 72(3), 653-664.

HAMILL, C. E., et al. Protease-activated receptor 1-dependent neuronal damage involves NMDA receptor function. *Exp Neurol*, May 2009, 217(1), 136-146.

HAN, M. H., et al. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature*, Feb 28 2008, 451(7182), 1076-1081.

HAN, S., et al. Autocrine extra-pancreatic trypsin 3 secretion promotes cell proliferation and survival in esophageal adenocarcinoma. *PLoS One*, 2013, 8(10), e76667.

HANSEN, K. K., et al. A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jun 7 2005, 102(23), 8363-8368.

HEIDER, I., et al. PAR1-type thrombin receptor stimulates migration and matrix adhesion of human colon carcinoma cells by a PKCepsilon-dependent mechanism. *Oncol Res*, 2004, 14(10), 475-482.

HENRICH-NOACK, P., et al. Focal ischemia induces expression of protease-activated receptor1 (PAR1) and PAR3 on microglia and enhances PAR4 labeling in the penumbra. *Brain Res*, Jan 27 2006, 1070(1), 232-241.

HENRICH-NOACK, P., et al. Cellular expression pattern of the protease-activated receptor 4 in the hippocampus in naive rats and after global ischaemia. *J Neurosci Res*, Mar 2010, 88(4), 850-857.

HERNANDEZ, N. A., et al. PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: a cohort study. *J Transl Med*, 2009, 7, 47.

HOLLENBERG, M. D., et al. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. *Br J Pharmacol*, Mar 2014, 171(5), 1180-1194.

HU, H., et al. Thrombin-induced neuronal protection: role of the mitogen activated protein kinase/ribosomal protein



S6 kinase pathway. *Brain Res*, Nov 18 2010, 1361, 93-101.

HU, L., et al. TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKC $\alpha$  and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. *Tumour Biol*, Oct 2013, 34(5), 2573-2581.

HURLEY, M. J., et al. Altered Expression of Brain Proteinase-Activated Receptor-2, Trypsin-2 and Serpin Proteinase Inhibitors in Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci*, May 17 2015.

CHAMBERS, R. C. AND SCOTTON, C. J. Coagulation cascade proteinases in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, Jul 2012, 9(3), 96-101.

CHEN, B., et al. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia. *J Neurosci*, May 30 2012, 32(22), 7622-7631.

CHIN, A. C., et al. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 16 2003, 100(19), 11104-11109.

CHOI, S.-H., et al. Thrombin induces nigral dopaminergic neurodegeneration in vivo by altering expression of death-related proteins. *Neurobiol Dis*, 2003a, 14(2), 181-193.

CHOI, S. H., et al. Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci*, Jul 2 2003b, 23(13), 5877-5886.

CHOI, S. H., et al. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. *J Neurosci*, Apr 20 2005, 25(16), 4082-4090.

CHOU, S. M., et al. Serpin=serine protease-like complexes within neurofilament conglomerates of motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, Oct 1998, 160 Suppl 1, S73-79.

CHUNG, H., et al. Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis. *J Biol Chem*, Dec 27 2013, 288(52), 37319-37331.

IRANNEJAD, R., et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*, Mar 28 2013, 495(7442), 534-538.

ISHIDA, Y., et al. Upregulation of Protease-Activated Receptor-1 in Astrocytes in Parkinson Disease: Astrocyte-Mediated Neuroprotection Through Increased Levels of Glutathione Peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006, 65(1), 66-77.

ISHIHARA, H., et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, Apr 3 1997, 386(6624), 502-506.

ITSEKSON-HAYOSH, Z., et al. Thrombin Activity and Thrombin Receptor in Rat Glioblastoma Model: Possible Markers and Targets for Intervention? *J Mol Neurosci*, Jul 2015, 56(3), 644-651.

JIANG, Y., et al. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*, Apr 2002, 22(4), 404-410.

JIN, E., et al. Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas. *Cancer*, Feb 1 2003, 97(3), 703-713.

JIN, G., et al. Deficiency of PAR-2 gene increases acute focal ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, Mar 2005, 25(3), 302-313.

JOSE, R. J., et al. Proteinase-activated receptors in fibroproliferative lung disease. *Thorax*, Feb 2014, 69(2), 190-192.

JUNGE, C. E., et al. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Exp Neurol*, Jul 2004, 188(1), 94-103.

KAHN, M. L., et al. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem*, Sep 4 1998a, 273(36), 23290-23296.

KAHN, M. L., et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, Aug 13 1998b, 394(6694),

690-694.

KAKARALA, K. K. AND JAMIL, K. Protease activated receptor-2 (PAR2): possible target of phytochemicals. *J Biomol Struct Dyn*, Dec 13 2014, 1-20.

KAKU, M. AND SIMPSON, D. M. HIV neuropathy. *Curr Opin HIV AIDS*, Nov 2014, 9(6), 521-526.

KANEIDER, N. C., et al. Role reversal for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol*, Dec 2007, 8(12), 1303-1312.

KANG, D. S., et al. Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, Apr 2014, 27, 63-71.

KAUFMANN, R., et al. Proteinase-activated receptors (PARs)--the PAR3 Neo-N-terminal peptide TFRGAP interacts with PAR1. *Regul Pept*, Feb 15 2005, 125(1-3), 61-66.

KAWABATA, A., et al. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol*, Mar 2008, 153 Suppl 1, S230-240.

KELSO, E. B., et al. Expression and proinflammatory role of proteinase-activated receptor 2 in rheumatoid synovium: ex vivo studies using a novel proteinase-activated receptor 2 antagonist. *Arthritis Rheum*, Mar 2007, 56(3), 765-771.

KELSO, E. B., et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, Mar 2006, 316(3), 1017-1024.

KESHAVA, S., et al. Influence of endothelial cell protein C receptor on breast cancer development. *J Thromb Haemost*, Nov 2013, 11(11), 2062-2065.

KIM, H. N., et al. Protease activated receptor-1 antagonist ameliorates the clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibiting breakdown of blood brain barrier. *J Neurochem*, Aug 18 2015a.

KIM, W., et al. Neuroinflammation-induced interactions between protease-activated receptor 1 and proprotein convertases in HIV-associated neurocognitive disorder. *Mol Cell Biol*, Aug 17 2015b.

KNECHT, W., et al. Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia. *J Biol Chem*, Sep 7 2007, 282(36), 26089-26100.

KULARATHNA, P. K., et al. Tumour progression and cancer-induced pain: a role for protease-activated receptor-2? *Int J Biochem Cell Biol*, Dec 2014, 57, 149-156.

LAKHAN, S. E., et al. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol*, 2013, 4, 32.

LAUKKARINEN, J. M., et al. Protease-activated receptor-2 exerts contrasting model-specific effects on acute experimental pancreatitis. *J Biol Chem*, Jul 25 2008, 283(30), 20703-20712.

LEE, E. J., et al. Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1. *J Immunol*, Jul 1 2010, 185(1), 615-623.

LENDECKEL, U. AND HOOPER, N. M. Proteases in the brain. In N.M. HOOPER AND U. LENDECKEL. *Proteases in biology and disease*. Springer Science, 2005.

LI, R., et al. Alpha A-crystallin and alpha B-crystallin, newly identified interaction proteins of protease-activated receptor-2, rescue astrocytes from C2-ceramide- and staurosporine-induced cell death. *J Neurochem*, Sep 2009, 110(5), 1433-1444.

LIN, C., et al. Targeting protease activated receptor-1 with P1pal-12 limits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Thorax*, Feb 2014, 69(2), 152-160.

LIN, C., et al. Pharmacological targeting of protease activated receptor-2 affords protection from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Mol Med*, Jun 29 2015a.

LIN, C., et al. Protease-activated receptor (PAR)-2 is required for PAR-1 signalling in pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med*, Jun 2015b, 19(6), 1346-1356.



LIN, H., et al. Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(4), 1198-1213.

LIN, H. AND TREJO, J. Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits beta-arrestin-mediated endosomal signaling. *J Biol Chem*, Apr 19 2013, 288(16), 11203-11215.

LIU, P., et al. PAR2-mediated epigenetic upregulation of alpha-synuclein contributes to the pathogenesis of Parkinsons disease. *Brain Res*, May 27 2014, 1565, 82-89.

LOHMAN, R. J., et al. Protease-activated receptor-2 regulates trypsin expression in the brain and protects against seizures and epileptogenesis. *Neurobiol Dis*, Apr 2008, 30(1), 84-93.

LORENZL, S., et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases-9 and -1 and of tissue inhibitors of MMPs, TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci*, Mar 15 2004, 218(1-2), 39-45.

LORENZL, S., et al. Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and Their Endogenous Counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in Postmortem Brain Tissue of Parkinson's Disease. *Exp Neurol*, 2002, 178(1), 13-20.

LUO, R., et al. Activation of protease-activated receptor 2 reduces glioblastoma cell apoptosis. *J Biomed Sci*, 2014, 21, 25.

LUO, W., et al. Two types of protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2) mediate calcium signaling in rat retinal ganglion cells RGC-5. *Brain Res*, Jun 21 2005, 1047(2), 159-167.

LUO, W., et al. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev*, Dec 2007, 56(2), 331-345.

LUTTRELL, L. M., et al. Fulfilling the Promise of „Biased“ G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol*, Sep 2015, 88(3), 579-588.

MA, Y., et al. MicroRNA-34a mediates the autocrine signaling of PAR2-activating proteinase and its role in colonic cancer cell proliferation. *PLoS One*, 2013, 8(8), e72383.

MALFETTONE, A., et al. High density of tryptase-positive mast cells in human colorectal cancer: a poor prognostic factor related to protease-activated receptor 2 expression. *J Cell Mol Med*, Aug 2013, 17(8), 1025-1037.

MARCHESE, A., et al. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48, 601-629.

MARCHESE, A. AND TREJO, J. Ubiquitin-dependent regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling. *Cell Signal*, Mar 2013, 25(3), 707-716.

MASSI, D., et al. Expression of protease-activated receptors 1 and 2 in melanocytic nevi and malignant melanoma. *Hum Pathol*, Jun 2005, 36(6), 676-685.

MATEJ, R., et al. Acute Pancreatitis: Proteinase-Activated Receptor-2 as Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Physiol Res*, 2006, 55, 467-474.

MATEJ, R., et al. Proteinase-activated receptor-2 expression in breast cancer and the role of trypsin on growth and metabolism of breast cancer cell line MDA MB-231. *Physiol Res*, 2007, 56(4), 475-484.

MATEJ, R. AND OLEJAR, T. The role of proteinase-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis: is there really novel therapeutic potential here? *Am J Respir Crit Care Med*, Feb 15 2012, 185(4), 458-459; author reply 459-460.

MATEJ, R., et al. Deletion of protease-activated receptor 2 prolongs survival of scrapie-inoculated mice. *J Gen Virol*, Sep 2012a, 93(Pt 9), 2057-2061.

MATEJ, R., et al. Higher TGF-beta with lower CD124 and TSLP, but no difference in PAR-2 expression in bronchial biopsy of bronchial asthma patients in comparison with COPD patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, Aug 2014, 22(7), 543-549.

MATEJ, R., et al. PAR2 knock-out C57Bl6 mice as a model for evaluating metastases of cancer cells: pilot in vivo study of the metastatic potential of B16 melanoma in knock-out (PAR2<sup>-/-</sup>) animals. *Folia Biol (Prague)*, 2012b,

58(2), 81-86.

MCLAUGHLIN, J. N., et al. Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 27 2007, 104(13), 5662-5667.

MCLAUGHLIN, J. N., et al. Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem*, Jul 1 2005, 280(26), 25048-25059.

MELNIKOVA, V. O., et al. Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (MCAM/MUC18) expression and melanoma metastasis. *J Biol Chem*, Oct 16 2009, 284(42), 28845-28855.

MICHEL, N., et al. Growth and survival of lung cancer cells: regulation by kallikrein-related peptidase 6 via activation of proteinase-activated receptor 2 and the epidermal growth factor receptor. *Biol Chem*, Sep 2014, 395(9), 1015-1025.

MIZE, G. J., et al. Prostate-specific kallikreins-2 and -4 enhance the proliferation of DU-145 prostate cancer cells through protease-activated receptors-1 and -2. *Mol Cancer Res*, Jun 2008, 6(6), 1043-1051.

MOLINARI, F., et al. Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science*, Nov 29 2002, 298(5599), 1779-1781.

MOUSSA, L., et al. Protease-activated receptor-2 augments experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol*, Sep 2007, 171(3), 800-808.

MUSSBACH, F., et al. Proteinase-activated receptor 1- and 4-promoted migration of Hep3B hepatocellular carcinoma cells depends on ROS formation and RTK transactivation. *J Cancer Res Clin Oncol*, May 2015, 141(5), 813-825.

NAKANISHI-MATSUI, M., et al. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, Apr 6 2000, 404(6778), 609-613.

NAMKUNG, W., et al. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 2004, 126(7), 1844-1859.

NAVE, K. A. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, Nov 11 2010a, 468(7321), 244-252.

NAVE, K. A. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci*, Apr 2010b, 11(4), 275-283.

NEUMANN, E., et al. G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*, Jul 2014, 10(7), 429-436.

NICKEL, K. F., et al. Thrombin has biphasic effects on the nitric oxide-cGMP pathway in endothelial cells and contributes to experimental pulmonary hypertension. *PLoS One*, 2013, 8(6), e63504.

NICOLE, O., et al. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury. *J Neurosci*, Apr 27 2005, 25(17), 4319-4329.

NOORBAKHS, F., et al. Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med*, Feb 20 2006, 203(2), 425-435.

NOORBAKHS, F., et al. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, Dec 2003, 4(12), 981-990.

NOORBAKHS, F., et al. Proteinase-activated receptor-2 induction by neuroinflammation prevents neuronal death during HIV infection. *J Immunol*, 2005, 174, 7320-7329.

NYSTEDT, S., et al. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 27 1994, 91(20), 9208-9212.

O'BRIEN, P. J. Thrombin Responses in Human Endothelial Cells. CONTRIBUTIONS FROM RECEPTORS OTHER THAN PAR1 INCLUDE THE TRANSACTIVATION OF PAR2 BY THROMBIN-CLEAVED PAR1. *J Biol Chem*, 2000, 275(18), 13502-13509.

OH, J., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 as an early potential diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, Dec 2014, 60, 87-91.

OLEJAR, T., et al. Expression of proteinase-activated receptor 2 during taurocholate-induced acute pancreatic lesion development in Wistar rats. *Int J Gastrointest Cancer*, 2001, 30(3), 113-121.

OLEJAR, T., et al. Proteinase-activated receptor-2 expression on cerebral neurones after radiation damage: immunohistochemical observation in Wistar rats. *Int J Tissue React*, 2002, 24(3), 81-88.

OLEJAR, T., et al. Dual role of host Par2 in a murine model of spontaneous metastatic B16 melanoma. *Anticancer Res*, Jul 2014, 34(7), 3511-3515.

OLSON, E. E., et al. PAR-1 deficiency protects against neuronal damage and neurologic deficits after unilateral cerebral hypoxia/ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, Sep 2004, 24(9), 964-971.

OVERALL, C. M. AND KLEIFELD, O. Tumour microenvironment – Opinion: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(3), 227-239.

OZDENER, H. Molecular mechanisms of HIV-1 associated neurodegeneration. *J Biosci*, 2005, 30(3), 391-405.

PARISIS, N., et al. Pseudopodial and beta-arrestin-interacting proteomes from migrating breast cancer cells upon PAR2 activation. *J Proteomics*, Jan 9 2013, 80C, 91-106.

PARK, Y. S. AND YOO, C. G. The clinical assessment of protease-activated receptor-2 expression in inflammatory cells from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, Jun 2013, 74(6), 264-268.

PETERS, T. AND HENRY, P. J. Protease-activated receptors and prostaglandins in inflammatory lung disease. *Br J Pharmacol*, Oct 2009, 158(4), 1017-1033.

POUNTNEY, D. L., et al.  $\alpha$ B-Crystallin is a major component of glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurotox Res*, 2005, 7(1-2), 77-85.

PRINS, N. D. AND SCHELTENS, P. White matter hyperintensities, cognitive impairment and dementia: an update. *Nat Rev Neurol*, Mar 2015, 11(3), 157-165.

QUEIROZ, K. C., et al. Protease-activated receptor-1 drives pancreatic cancer progression and chemoresistance. *Int J Cancer*, Nov 15 2014, 135(10), 2294-2304.

RADULOVIC, M., et al. Genetic Targeting of Protease Activated Receptor 2 Reduces Inflammatory Astrogliosis and Improves Recovery of Function after Spinal Cord Injury. *Neurobiol Dis*, 2015.

RAMACHANDRAN, R., et al. Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem*, Jul 15 2011, 286(28), 24638-24648.

RAMACHANDRAN, R., et al. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, Jan 2012, 11(1), 69-86.

RAMSAY, A. J., et al. Prostatic trypsin-like kallikrein-related peptidases (KLKs) and other prostate-expressed tryptic proteinases as regulators of signalling via proteinase-activated receptors (PARs). *Biol Chem*, Jun 2008, 389(6), 653-668.

RASMUSSEN, U. B., et al. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett*, Aug 19 1991, 288(1-2), 123-128.

REITER, E., et al. Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52, 179-197.

ROBBERECHT, W. AND PHILIPS, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, Apr 2013, 14(4), 248-264.

ROHATGI, T., et al. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain. *Neuroscientist*, Dec 2004, 10(6), 501-512.

RUBIO-PEREZ, J. M. AND MORILLAS-RUIZ, J. M. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*, 2012, 2012, 756357.

RUSSO, A., et al. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr 14 2009, 106(15), 6393-6397.

SAWADA, K., et al. Purification and Characterization of a Trypsin-Like Serine Proteinase from Rat Brain Slices that Degrades Laminin and Type IV Collagen and Stimulates Protease-Activated Receptor-2. *J Neurochem*, 2002, 74(4), 1731-1738.

SCARISBRICK, I. A., et al. MSP, a trypsin-like serine protease, is abundantly expressed in the human nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 2001, 431(3), 347-361.

SCARISBRICK, I. A., et al. Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol Chem*, Jun 2008, 389(6), 739-745.

SCARISBRICK, I. A., et al. Kallikrein 6 is a novel molecular trigger of reactive astrogliosis. *Biol Chem*, Apr 2012a, 393(5), 355-367.

SCARISBRICK, I. A., et al. Kallikrein 6 regulates early CNS demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *Brain Pathol*, Sep 2012b, 22(5), 709-722.

SEDDA, S., et al. Proteinase activated-receptors-associated signaling in the control of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, Sep 14 2014, 20(34), 11977-11984.

SEVASTOS, J., et al. Tissue factor deficiency and PAR-1 deficiency are protective against renal ischemia reperfusion injury. *Blood*, Jan 15 2007, 109(2), 577-583.

SEVIGNY, L. M., et al. Protease-activated receptor-2 modulates protease-activated receptor-1-driven neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Dec 2011, 31(12), e100-106.

SHI, K., et al. Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. *J Pathol*, Nov 2014, 234(3), 398-409.

SHI, X., et al. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*, Jul 2004, 2(7), 395-402.

SCHMIDT, V. A., et al. The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tightly linked on chromosome 5q13. *Br J Haematol*, 1997, 97(3), 523-529.

SIDHU, T. S., et al. Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4), 6169-6183.

SIEHLER, S. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, Sep 2009, 158(1), 41-49.

SMITH-SWINTOSKY, V. L., et al. Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) Is Present in the Rat Hippocampus and Is Associated with Neurodegeneration. *J Neurochem*, 2002, 69(5), 1890-1896.

SOH, U. J., et al. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol*, May 2010, 160(2), 191-203.

SONG, J. S., et al. Thrombin induces epithelial-mesenchymal transition via PAR-1, PKC, and ERK1/2 pathways in A549 cells. *Exp Lung Res*, Oct 2013, 39(8), 336-348.

SONIN, D. L., et al. Protease-activated receptor 1 inhibition by SCH79797 attenuates left ventricular remodeling and profibrotic activities of cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, Sep 2013, 18(5), 460-475.

SPENCER, B., et al. Lentivirus mediated delivery of neurosin promotes clearance of wild-type alpha-synuclein and reduces the pathology in an alpha-synuclein model of LBD. *Mol Ther*, Jan 2013, 21(1), 31-41.

SPENCER, B., et al. A brain-targeted, modified neurosin (kallikrein-6) reduces alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. *Mol Neurodegener*, 2015, 10(1), 48.

STRIGGOW, F., et al. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci*, Aug 2001, 14(4), 595-608.

SU, S., et al. Proteinase-activated receptor 2 expression in breast cancer and its role in breast cancer cell migration. *Oncogene*, Aug 27 2009, 28(34), 3047-3057.

SUN, Z., et al. Protease-activated receptor 2 enhances renal cell carcinoma cell invasion and migration via PI3K/AKT signaling pathway. *Exp Mol Pathol*, Jun 2015, 98(3), 382-389.

SUO, Z., et al. Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation. *J Neurochem*, Feb 2002, 80(4), 655-666.

SUO, Z., et al. Persistent protease-activated receptor 4 signaling mediates thrombin-induced microglial activation. *J Biol Chem*, Aug 15 2003a, 278(33), 31177-31183.

SUO, Z., et al. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J Biol Chem*, Sep 26 2003b, 278(39), 37681-37689.

TERAYAMA, R., et al. Differential expression of protease M/neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett*, Jul 1-8 2005a, 382(1-2), 82-87.

TERAYAMA, R., et al. Neuropilin promotes oligodendrocyte death, demyelination and axonal degeneration after spinal cord injury. *Neuroscience*, Aug 10 2007, 148(1), 175-187.

TERAYAMA, R., et al. Involvement of neuropilin in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, Nov 1 2005b, 52(2), 108-118.

TIBURCIO, M., et al. Characterization of PAR1 and FGFR1 expression in invasive breast carcinomas: Prognostic significance. *Oncol Lett*, Oct 2012, 4(4), 647-657.

TOMANKOVA, H. AND MYSLIVECEK, J. Mechanisms of G protein-coupled receptors regulation. *Neuroendocrinology Letters*, 2011, 32(5).

UZUNOGLU, F. G., et al. VEGFR-2, CXCR-2 and PAR-1 germline polymorphisms as predictors of survival in pancreatic carcinoma. *Ann Oncol*, May 2013, 24(5), 1282-1290.

VAUGHAN, P. J., et al. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci*, Jul 1995, 15(7 Pt 2), 5389-5401.

VERGNOLLE, N. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther*, Sep 2009, 123(3), 292-309.

VERSTEEG, H. H., et al. Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. *Cancer Res*, Sep 1 2008, 68(17), 7219-7227.

VESEY, D. A., et al. Potential physiological and pathophysiological roles for protease-activated receptor-2 in the kidney. *Nephrology (Carlton)*, Feb 2007, 12(1), 36-43.

VESEY, D. A., et al. PAR2-induced inflammatory responses in human kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, Mar 15 2013, 304(6), F737-750.

VILLARES, G. J., et al. Protease activated receptor-1 inhibits the Maspin tumor-suppressor gene to determine the melanoma metastatic phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jan 11 2011, 108(2), 626-631.

VU, T. K., et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, Mar 22 1991, 64(6), 1057-1068.

WANG, H. AND REISER, G. Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. *Biol Chem*, Feb 2003, 384(2), 193-202.

WANG, H., et al. Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia*, Jan 2002a, 37(1), 53-63.

WANG, H., et al. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, Nov 2002b, 283(5), C1351-1364.

WANG, J., et al. Role of protease-activated receptor-1 in brain injury after experimental global cerebral ischemia. *Stroke*, Sep 2012, 43(9), 2476-2482.

WANG, J. Z. AND LIU, F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of



neurons. *Prog Neurobiol*, Jun 2008, 85(2), 148-175.

WANG, Y., et al. Activation of protease-activated receptors in astrocytes evokes a novel neuroprotective pathway through release of chemokines of the growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant family. *Eur J Neurosci*, Dec 2007a, 26(11), 3159-3168.

WANG, Y., et al. Proteinase-activated receptor-1 and -2 induce the release of chemokine GRO/CINC-1 from rat astrocytes via differential activation of JNK isoforms, evoking multiple protective pathways in brain. *Biochem J*, Jan 1 2007b, 401(1), 65-78.

WANG, Y., et al. The role of calcium in protease-activated receptor-induced secretion of chemokine GRO/CINC-1 in rat brain astrocytes. *J Neurochem*, Oct 2007c, 103(2), 814-819.

WANG, Y., et al. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, Jan 2008, 65(2), 237-252.

WANG, Y., et al. Protease-activated receptor-1 protects rat astrocytes from apoptotic cell death via JNK-mediated release of the chemokine GRO/CINC-1. *J Neurochem*, Aug 2006a, 98(4), 1046-1060.

WANG, Y., et al. Mesotrypsin, a brain trypsin, activates selectively proteinase-activated receptor-1, but not proteinase-activated receptor-2, in rat astrocytes. *J Neurochem*, Nov 2006b, 99(3), 759-769.

WANG, Y., et al. Activated protein C analog promotes neurogenesis and improves neurological outcome after focal ischemic stroke in mice via protease activated receptor 1. *Brain Res*, Apr 24 2013, 1507, 97-104.

WEINSTEIN, J. R., et al. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci*, Apr 1995, 15(4), 2906-2919.

WEITHAUSER, A., et al. Protease-activated receptor-2 regulates the innate immune response to viral infection in a coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, Nov 5 2013, 62(19), 1737-1745.

WINKLER, E. A., et al. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, Jan 2013, 125(1), 111-120.

WU, B., et al. Involvement of PKC $\alpha$  activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumour Biol*, Apr 2013, 34(2), 837-846.

WUYTS, W. A., et al. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur Respir J*, May 2013, 41(5), 1207-1218.

WYGRECKA, M., et al. Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, Jun 15 2011, 183(12), 1703-1714.

WYNN, T. A. AND RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, Jul 2012, 18(7), 1028-1040.

XI, G., et al. Activation of p44/42 mitogen activated protein kinases in thrombin-induced brain tolerance. *Brain Res*, Mar 23 2001, 895(1-2), 153-159.

XU, W. F., et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jun 9 1998, 95(12), 6642-6646.

XUE, M., et al. Relative importance of proteinase-activated receptor-1 versus matrix metalloproteinases in intracerebral hemorrhage-mediated neurotoxicity in mice. *Stroke*, Jun 2009, 40(6), 2199-2204.

YANG, E., et al. Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis. *Cancer Res*, Aug 1 2009, 69(15), 6223-6231.

YANG, E., et al. Dysregulated protease activated receptor 1 (PAR1) promotes metastatic phenotype in breast cancer through HMGA2. *Oncogene*, Jul 13 2015.

YANG, R., et al. Combined upregulation of matrix metalloproteinase-1 and proteinase-activated receptor-1 predicts unfavorable prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *Onco Targets Ther*, 2013, 6, 1139-1146.

- YIN, Y. J., et al. Mammary gland tissue targeted overexpression of human protease-activated receptor 1 reveals a novel link to beta-catenin stabilization. *Cancer Res*, May 15 2006, 66(10), 5224-5233.
- YIN, Y. J., et al. Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Jun 1 2003, 23(6), 940-944.
- YOON, H., et al. Kallikrein 6 signals through PAR1 and PAR2 to promote neuron injury and exacerbate glutamate neurotoxicity. *J Neurochem*, Oct 2013, 127(2), 283-298.
- ZHANG, C., et al. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*, Dec 20 2012a, 492(7429), 387-392.
- ZHANG, J., et al. siRNA-mediated silence of protease-activated receptor-1 minimizes ischemic injury of cerebral cortex through HSP70 and MAP2. *J Neurol Sci*, Sep 15 2012b, 320(1-2), 6-11.
- ZHANG, X., et al. Protease-activated receptor 2 signaling upregulates angiogenic growth factors in renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*, Feb 2013, 94(1), 91-97.
- ZHAO, P., et al. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5, 67.
- ZHAO, Y., et al. Thrombin enhances soluble Fms-like tyrosine kinase 1 expression in trophoblasts; possible involvement in the pathogenesis of preeclampsia. *Fertil Steril*, Oct 2012, 98(4), 917-921.
- ZHONG, Z., et al. Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells. *J Clin Invest*, Nov 2009, 119(11), 3437-3449.
- ZHOU, Q. B., et al. Baicalin attenuates focal cerebral ischemic reperfusion injury by inhibition of protease-activated receptor-1 and apoptosis. *Chin J Integr Med*, Feb 2014, 20(2), 116-122.
- ZHOU, Q. B., et al. Effects of baicalin on protease-activated receptor-1 expression and brain injury in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Chin J Physiol*, Jun 30 2012, 55(3), 202-209.

## **2 Cíle práce**

### **2.1 Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkerům**

**Hypotéza H1:** Hodnoty koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku korelují s přítomností proteinu 14-3-3 a celkového tau jako markerů neuronálního poškození u rychle progredujících neurodegenerativních onemocnění.

### **2.2 Charakterizace oligodendroglální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako model pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglální patologie**

**Hypotéza H2:** Degenerace glie a neuronů charakterizovaná přítomností inkluzí proteinu TDP-43 u onemocnění motorického neuronu je spojena s reakcí oligodendrocytů.

### **2.3 Charakterizace topografie patologie $\alpha$ -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2**

**Hypotéza H3:** MSA existuje kromě klasické cerebelární a parkinsonské formy ve formě atypické charakterizované kognitivním deficitem a specifickou topografií patologie  $\alpha$ -synukleinu.

### **2.4 Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění**

### **2.5 Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastnících se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů**



## **3 Výsledky**

### **3.1 Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkerům**

ROHAN, Z., et al. Proteinase-activated receptor 2 and disease biomarkers in cerebrospinal fluid in cases with autopsy-confirmed prion diseases and other neurodegenerative diseases. *BMC Neurol*, 2015, 15, 50.

[IF 2014: 2,0]

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Proteinase-activated receptor 2 and disease biomarkers in cerebrospinal fluid in cases with autopsy-confirmed prion diseases and other neurodegenerative diseases

Zdenek Rohan<sup>1,2</sup>, Magdalena Smetakova<sup>1,2</sup>, Jaromir Kukul<sup>3</sup>, Robert Rusina<sup>4,5</sup> and Radoslav Matej<sup>1,2,5\*</sup>

## Abstract

**Background:** Proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) has been shown to promote both neurotoxic and neuroprotective effects. Similarly, other routinely used nonspecific markers of neuronal damage can be found in cerebrospinal fluid (CSF) and can be used as biomarkers for different neurodegenerative disorders.

**Methods:** Using enzyme-linked immunosorbent assays and western blotting we assessed PAR-2, total-tau, phospho-tau, beta-amyloid levels, and protein 14-3-3 in the CSF of former patients who had undergone a neuropathological autopsy after death and who had been definitively diagnosed with a prion or other neurodegenerative disease.

**Results:** We did not find any significant correlation between levels of PAR-2 and other biomarkers, nor did we find any differences in PAR-2 levels between prion diseases and other neurodegenerative conditions. However, we confirmed that very high total-tau levels were significantly associated with definitive prion diagnoses and exhibited greater sensitivity and specificity than protein 14-3-3, which is routinely used as a marker.

**Conclusions:** Our study showed that PAR-2, in CSF, was not specifically altered in prion diseases compared to other neurodegenerative conditions. Our results also confirmed that very high total-tau protein CSF levels were significantly associated with a definitive Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) diagnosis and should be routinely tested as a diagnostic marker. Observed individual variability in CSF biomarkers provide invaluable feedback from neuropathological examinations even in “clinically certain” cases.

**Keywords:** Proteinase-activated receptor 2, Tau, Phospho-tau, Beta-amyloid, Protein 14-3-3, Creutzfeldt-Jakob disease

## Background

Protease-activated receptor 2 (PAR-2) belongs to the family of protease-activated receptors (PARs) that consists of four members: PAR-1, PAR-2, PAR-3, and PAR-4. PARs are activated by proteolytic cleavage of their extracellular N-terminus to unveil a neo-ligand that subsequently binds to the extracellular domain on the receptor itself and activates it irreversibly. PAR-1, PAR-3 and PAR-4 are mainly

activated by thrombin, while PAR-2 is preferentially activated by trypsin. Intracellular PAR-activated signaling, via gene expression, influences cellular activity [1].

In the CNS, PARs are expressed on neurons, glia, ependymal cells and endothelial cells and modulate both neuroprotective and neurotoxic effects [2]. In a recent study using a murine prion disease model, PAR-2 knockout scrapie-inoculated mice showed delayed onset of symptoms and longer survival than PAR-2 wild-type mice [3]. This suggests a possible modulatory role for PAR-2 in the dynamics of prion diseases. Although, the complete role of PAR-2 in brain pathology remains unclear.

Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers are being increasingly used in the clinical diagnosis of neurodegenerative

\* Correspondence: radoslav.matej@ftn.cz

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, National Reference Laboratory for Diagnostics of Human Prion Diseases, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Institute of Pathology, Third Medical Faculty of Charles University in Prague and Kralovske Vinohrady Teaching Hospital, Prague, Czech Republic  
Full list of author information is available at the end of the article

disorders. Total-tau (T-tau), phosphorylated tau (P-tau), beta-amyloid (A $\beta$ ) levels, and protein 14-3-3 status are routinely assessed in differential diagnostic workups of dementia. These biomarkers have also diagnostic potential for other neurodegenerative diseases such as Lewy body diseases [4,5] and frontotemporal lobar degenerations (FTLD) [6].

The aim of this study was to evaluate PAR-2 as a possible differential marker of neurodegenerative processes. As part of the study we also completed an *ante mortem* evaluation of T-tau, P-tau, A $\beta$  levels, and 14-3-3 status and compared the results and associations with PAR-2 values.

## Methods

### Study design and case selection

The study was designed as a retrospective analysis of diagnostic samples collected by our institution. Patients referred to our institution for dementia (including possible/probable Creutzfeldt-Jakob disease; CJD) were clinically and neuropsychologically assessed, and then underwent neuroimaging and CSF examinations as part of a routine diagnostic workup.

Cases with a neuropathologically confirmed diagnosis of neurodegenerative disease and an *ante mortem* CSF analysis of T-tau, P-tau, A $\beta$ , and protein 14-3-3 were included in the study. Of 59 patients, 36 had a neuropathologically confirmed prion disease and 23 were diagnosed with some other neurodegenerative disease (see Table 1 and the Additional file 1).

The patients or their relatives agreed with the storage of CSF samples and brain tissue for research purposes and signed informed consents. The study was approved by the Ethics committee of our institution, Thomayer Hospital, Prague.

### Cerebrospinal fluid analysis

Non-hemolytic CSF samples were briefly vortexed and T-tau, P-tau, A $\beta$ , and PAR-2 levels were analyzed using commercially available ELISA kits (INNOGENICS® INNOTEST® hTAU Ag, cat. #80323, INNOTEST® PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub>, cat. #80317, INNOTEST®  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>, cat. #80324 and USCN ELISA Kit for PAR-2, cat. #SEA852Hu). Protein 14-3-3 status was assessed using sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and western blot using polyclonal IgG antibody against protein 14-3-3 (K-19; Santa Cruz Biotechnology; sc-629), followed by chemiluminescent detection (Pierce® ECL Plus; #32132).

### Neuropathology assessment

Brains were fixed in 10% formalin for 2 – 4 weeks. Samples were embedded in paraffin blocks and diagnosed using standardized recommendations [7]. A definite diagnosis of CJD was confirmed through neuropathological

examination and western blot detection of the proteinase K resistant form of prion protein. In positive cases, the prion protein gene (*PRNP*) was analyzed for codon 129 polymorphisms and disease-associated mutations.

### Statistical analysis

Patient data were split to CJD (n = 36) and non-CJD (n = 23) groups (Table 1). The Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) nonparametric test was used for the median equity hypothesis H<sub>0</sub> at a significance level of 0.05 for six variables (age at death, duration of illness, and CSF levels of T-tau, P-tau, A $\beta$ , and PAR-2). The Fisher exact test of independence hypothesis H<sub>0</sub>, in a 2 × 2 contingency table, was used for CJD/non-CJD group vs. categorical data at a significance level of 0.05 for two variables (protein 14-3-3, categorized T-tau). Significance levels were decreased using the Bonferroni correction for multiple testing. Due to the non-gaussian nature of experimental data, a non-parametric approach to correlation analyses was used. The Spearman rho correlation coefficient was calculated and the hypothesis of independence was tested using a critical level of 0.05.

## Results

Summarized results of case groups are included in Table 1, detailed results of each case are presented in the Additional file 1.

### PAR-2 CSF levels did not differ significantly among studied neurodegenerative diseases

Using the WMW and a Bonferroni correction of significance levels (0.05/6 = 0.0083), no statistically significant difference was found between PAR-2 CSF levels in the CJD and non-CJD groups (p-value = 0.085).

### Greatly increased T-tau levels, decreased disease duration and age at death as well as a positive protein 14-3-3 status were significantly associated with prion diseases

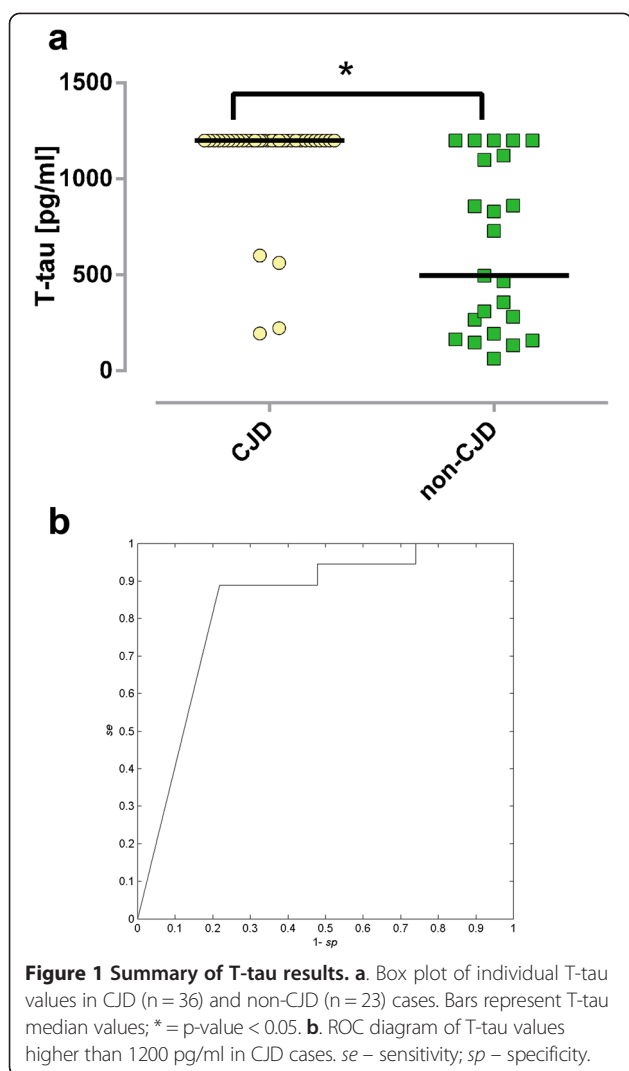
Values of T-tau were significantly higher in the CJD group (p-value = < 0.001; Figure 1a), while disease duration (p-value < 0.001) and age of death (p-value = 0.006) were significantly lower in the CJD group when evaluated using the WMW test with a Bonferroni correction. No differences in P-tau and A $\beta$  CSF values were found between evaluated groups.

Statistically significant dependences between groups and categorical variables were found for both groups (evaluated using the Fisher exact test with decreased significance levels and a Bonferroni correction of 0.05/2 = 0.025). Positive and weakly positive protein 14-3-3 status (p-value < 0.001, sensitivity 77.7%, specificity 69.5%) as well as T-tau values greater than 1200 pg/ml were shown to be significant indicators for a CJD diagnosis (p-value < 0.001,

**Table 1 Summary of the obtained results for CJD and non-CJD cases**

Cases	n	Male/Female	Disease duration [months]	Age at death [years]	PAR-2 [ng/ml]	T-tau [pg/ml]	P-tau [pg/ml]	Aβ [pg/ml]	14-3-3		
									P	W	N
CJD	36	12/24	6.8 ± 8.3 [1–48]	63.1 ± 8.3 [39–81]	8.78 ± 6.40 [1.25–28.49]	1111.47 ± 264.48 [195–1201]	52.69 ± 30.86 [16–166]	619.39 ± 297.34 [212–1407]	21	7	8
non-CJD	23	15/8	24.1 ± 22.2 [2–84]	71.0 ± 10.4 [53–90]	9.31 ± 8.71 [1.22–41]	632.43 ± 434.03 [65–1201]	47.48 ± 28.38 [15–103]	561.22 ± 421.20 [94–1672]	4	3	16
AD	6	4/2	28.67 ± 29.87 [2–84]	70 ± 10.66 [54–82]	13.26 ± 14.62 [1.22–41]	926.83 ± 366.99 [268–1201]	53.83 ± 27.67 [29–102]	401 ± 409.04 [94–1109]	1	2	3
FTLD-TDP	11	7/4	17.2 ± 14.86 [3–46]	70.8 ± 11.4 [53–90]	8.15 ± 5.96 [1.73–21.79]	558.27 ± 424.44 [134–1201]	39.10 ± 24.35 [15–94]	517.64 ± 241.35 [265–1065]	2	0	9
VD	4	3/1	27.5 ± 31 [2–72]	70.5 ± 7.1 [62–79]	5.03 ± 1.61 [2.79–6.44]	547 ± 521.99 [65–1201]	52.25 ± 38.45 [20–103]	945 ± 755.50 [186–1672]	1	1	2
PSP	2	1/1	38 ± 2.83 [36–40]	76.5 ± 17.68 [64–89]	12.36 ± 6.05 [8.08–16.64]	328 ± 239 [159–497]	65 ± 42.43 [35–95]	514 ± 55.15 [475–553]	0	0	2

Results are shown as mean ± S.D. (min–max); P – positive, W – weakly positive, N – negative. AD – Alzheimer’s disease; FTLD-TDP – frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions; PSP – progressive supranuclear palsy; VD – vascular dementia.



**Figure 1 Summary of T-tau results.** **a.** Box plot of individual T-tau values in CJD (n = 36) and non-CJD (n = 23) cases. Bars represent T-tau median values; \* = p-value < 0.05. **b.** ROC diagram of T-tau values higher than 1200 pg/ml in CJD cases. se – sensitivity; sp – specificity.

sensitivity 88.8%, specificity 78.2%). The ROC diagram of T-tau is presented in Figure 1b.

The mean levels of Aβ were lowest in AD compared to other neurodegenerations. However, the small number of AD cases did not allow confirmation of significance.

**No statistically significant correlation between PAR-2 and T-tau in CSF in either the CJD or the non-CJD group**

We found no statistically significant correlation between PAR-2 and CSF levels of T-tau and protein 14-3-3 status in either the CJD group (T-tau R = 0.11, p = 0.51) or the non-CJD group (T-tau R = 0.01, p = 0.97). However, PAR-2 levels were significantly and inversely correlated with protein 14-3-3 status in the non-CJD group (R = -0.45; p = 0.03).

Other biomarkers, less relevant as prion disease biomarkers (e.g. P-tau and Aβ), were statistically significantly correlated with PAR-2 CSF levels (P-tau R = 0.4, p = 0.01; Aβ R = 0.4, p = 0.02).

**Discussion**

Our goal was to evaluate PAR-2 CSF levels in patients with various neurodegenerative diseases. Our results showed that PAR-2 CSF levels did not differ between CJD and non-CJD groups, suggesting that changes in PAR-2 CSF levels are not specifically associated with prion disease. Based on our results, PAR-2 cannot serve as a biomarker for distinguishing prion diseases from other neurodegenerative diseases. However, based on recent results obtained in mice [3], PAR-2 may act as a nonspecific enhancer of neurodegenerative processes. This concept of PAR-2, as a neurodegeneration-promoting factor, has also been supported by other studies.

We also did not find any significant correlation between PAR-2 and T-tau CSF levels in the CJD or non-CJD groups. Interestingly, in the non-CJD group, protein 14-3-3 status correlated with PAR-2 CSF levels; however, this is most probably a biased observation since non-CJD cases with positive or weak protein 14-3-3 were also often associated with increased T-tau levels, which probably reflects neuronal damage rather than a relationship to PAR-2 mediated pathogenesis, although, it could also be involved in neuronal damage mechanisms in general.

Another goal of our study was to retrospectively evaluate results of CSF biomarkers routinely used in diagnostics of neurodegenerative diseases. Our results are in agreement with larger studies [8-13]. In our cohort, presence of protein 14-3-3 positivity and isolated T-tau CSF values were significantly higher in prion diseases than in other neurodegenerative diseases, regardless of whether the prion disease had a sporadic or genetic origin and regardless of codon 129 PRNP polymorphisms.

T-tau is generally considered to be a marker of neuronal damage in AD and lesions caused by ischemic brain injury, CNS infections, and epileptic seizures [14]. Human prion diseases are often characterized by sudden onset, rapid progression, extensive neuronal damage, and being rapidly fatal (months). T-tau levels may initially be low, but tend to increase during the disease course [15]. Isolated T-tau levels greater than 1200 pg/ml were almost always associated with prion disease. In non-prion neuropathology, we found high T-tau levels in one case of vascular dementia associated with severe ischemic white matter lesions (case 38), in three AD patients with rapid progression (cases 46–48), and in two cases of neuropathologically confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions (FTLD-TDP; cases 54 and 59). In the AD subgroup (n = 6), T-tau values ranged from 497 pg/ml to over 1200 pg/ml, with the highest T-tau levels associated with either increased P-tau or decreased Aβ levels. Conversely, slowly progressive diseases, such as AD and FTLDs, generally have lower rates of neuronal damage and longer survival times (on the order of years). Additionally, they have rather low T-tau levels, although,

levels can increase to over 1200 pg/ml during disease progression; a pattern similar to what was seen in this study.

Levels of P-tau and A $\beta$  did not significantly differ between groups. Nevertheless, P-tau values in some CJD and non-AD-non-CJD cases reached the cutoff value that is usually regarded as specific for AD (median of 60 pg/ml) [16] and therefore could be a potential diagnostic pitfall in differential diagnostic workups for dementia. Moreover, in four of six cases of definite AD, we observed decreased (under 400 pg/ml) levels of A $\beta$  in the CSF (cases 44–47). This result further supports the diagnostic utility of lower levels of A $\beta$  in AD cases.

The strengths of our study were: (1) it only included neuropathologically confirmed cases with an *ante mortem* CSF analysis and (2) it excluded cases with mixed neuropathology. This approach provides objective results when studying prion disease and other neurodegeneration biomarkers.

## Conclusions

We showed that PAR-2 CSF levels do not differ among prion diseases and other neurodegenerative diseases. This may suggest a disease-nonspecific modulatory role in neurodegeneration processes. Our results also confirmed that very high T-tau CSF levels and 14-3-3 protein positivity are significantly associated with a definite CJD diagnosis. Individual variability in CSF biomarkers, however, was commonly observed, which led us to conclude that neuropathological examinations, of even “clinically certain” cases, can still provide invaluable feedback to clinicians.

## Additional file

**Additional file 1: Cases included in the study.**

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MS carried out the immunoassays. ZR and RM performed neuropathological diagnoses. JK carried out statistical analysis of the data. RM, RR, ZR and MS participated in the design of the study. ZR, RM and RR drafted the manuscript and checked for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

Authors would like to thank Tom Secrest for revision of the English version of this article. This study was partly supported by grants IGA MZ NT12094-5/2011 and NT14145-3/2013 from the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and grant P303/12/1791 from the Grant Agency of the Czech Republic.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, National Reference Laboratory for Diagnostics of Human Prion Diseases, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>2</sup>Institute of Pathology, Third Medical Faculty of Charles University in Prague and Kralovske Vinohrady Teaching Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>Department of Software Engineering, Faculty of

Nuclear Science and Physical Engineering, Czech Technical University, Prague, Czech Republic. <sup>4</sup>Thomayer Hospital, Department of Neurology, Prague, Czech Republic. <sup>5</sup>Department of Neurology and Centre of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic.

Received: 14 November 2014 Accepted: 11 March 2015

## References

- Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther.* 2011;130(3):248–82.
- Luo W, Wang Y, Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev.* 2007;56(2):331–45.
- Matej R, Olejar T, Janouskova O, Holada K. Deletion of protease-activated receptor 2 prolongs survival of scrapie-inoculated mice. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 9):2057–61.
- Parnetti L, Castrioto A, Chiasserini D, Persichetti E, Tambasco N, El-Agnaf O, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(3):131–40.
- Kaerst L, Kuhlmann A, Wedekind D, Stoek K, Lange P, Zerr I. Using cerebrospinal fluid marker profiles in clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(1):63–73.
- Hu WT, Watts K, Grossman M, Glass J, Lah JJ, Hales C, et al. Reduced CSF p-Tau181 to Tau ratio is a biomarker for FTL-D-TDP. *Neurology.* 2013;81(22):1945–52.
- Kovacs GG, Budka H. Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: neurodegenerative diseases. *Clin Neuropathol.* 2010;29(5):271–88.
- Muayqil T, Gronseth G, Camicioli R. Evidence-based guideline: diagnostic accuracy of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2012;79(14):1499–506.
- Stoek K, Sanchez-Juan P, Gawinecka J, Green A, Ladogana A, Pocchiari M, et al. Cerebrospinal fluid biomarker supported diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and rapid dementias: a longitudinal multicentre study over 10 years. *Brain.* 2012;135(Pt 10):3051–61.
- Schoonenboom NS, Reesink FE, Verwey NA, Kester MI, Teunissen CE, van de Ven PM, et al. Cerebrospinal fluid markers for differential dementia diagnosis in a large memory clinic cohort. *Neurology.* 2012;78(1):47–54.
- Meiner Z, Kahana E, Baitcher F, Korczyn A, Chapman J, Cohen O, et al. Tau and 14-3-3 of genetic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients in Israel. *J Neurol.* 2011;258(2):255–62.
- Ladogana A, Sanchez-Juan P, Mitrova E, Green A, Cuadrado-Corralles N, Sanchez-Valle R, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in human genetic transmissible spongiform encephalopathies. *J Neurol.* 2009;256(10):1620–8.
- Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, Cuadrado-Corralles N, Sanchez-Valle R, Mitrova E, et al. CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 2006;67(4):637–43.
- Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(3):131–44.
- Matej R, Kovacs GG, Johanidesova S, Keller J, Matejckova M, Novakova J, et al. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease with R208H mutation presenting as progressive supranuclear palsy. *Mov Disord.* 2012;27(4):476–9.
- Hort J, Bartos A, Pirttila T, Scheltens P. Use of cerebrospinal fluid biomarkers in diagnosis of dementia across Europe. *Eur J Neurol.* 2010;17(1):90–6.

Additional file 1: Cases included in the study.

case #	Age at death	Gender	Duration [months]	14-3-3 status	T-tau [pg/ml]	P-tau [pg/ml]	A $\beta$ [pg/ml]	PAR-2 [ng/ml]	PRNP codon 129	Neuropathological diagnosis	Clinical diagnosis
1	71	F	2	N	195	20	640	7,79	MM	sCJD	RPD
2	60	F	4	P	600	46	421	6,01	MM	sCJD	CJD
3	57	F	10	N	1201	114	1080	7,29	MM	sCJD	CJD
4	52	M	4	P	1201	62	476	23,7	VV	sCJD	CJD
5	54	M	3	P	1201	49	590	8,6	MM	sCJD	CJD
6	81	F	2	P	1201	39	446	28,49	MM	sCJD	CJD
7	62	F	1	P	1201	60	619	8,05	MM	sCJD	CJD
8	62	F	5	P	1201	72	497	17,23	MV	sCJD	CJD
9	68	M	6	P	1201	63	639	6,22	VV	sCJD	CJD
10	68	M	6	P	1201	42	351	6,75	VV	sCJD	CJD
11	68	M	4	N	223	44	255	4,26	MM	sCJD	RPAD/CJD
12	71	F	4	P	1201	166	1123	13,13	VV	sCJD	CJD
13	74	F	17	P	1201	21	481	8,8	MV	sCJD	CJD
14	49	M	3	P	1201	19	294	10,37	MM	sCJD	CJD
15	58	M	16	W	1201	66	1407	14,22	MV	sCJD	CJD
16	61	F	1	P	1201	41	812	7,02	MM	sCJD	CJD
17	59	F	n/a*	N	563	42	909	7,25	MM	sCJD	CJD
18	69	M	1	P	1201	50	1160	15,16	MM	sCJD	CJD
19	69	F	8	P	1201	49	680	12,86	MM	sCJD	CJD
20	65	M	2	P	1201	29	609	5,83	MM	sCJD	CJD
21	69	F	2	P	1201	102	1047	16,76	MM	sCJD	CJD
22	70	F	11	P	1201	48	927	8,30	MV	sCJD	CJD
23	53	F	4	W	1201	19	272	1,54	MM	sCJD	CJD
24	63	F	1	N	1201	18	231	1,42	MM	sCJD	CJD
25	71	M	2	N	1201	55	776	2,99	MM	sCJD	CJD
26	74	F	7	P	1201	58	329	1,58	VV	sCJD	CJD
27	62	F	12	W	1201	82	747	3,30	MM	sCJD	CJD
28	65	F	5	W	1201	37	600	2,85	MM	sCJD	CJD
29	71	F	1	P	1201	53	663	2,50	MM	sCJD	CJD
30	58	F	5	W	1201	21	229	1,25	MM	sCJD	CJD
31	58	F	8	N	1201	59	799	15,96	MM	fCJD (E200K mutation)	CJD
32	62	F	11	W	1201	20	518	5,42	VV	fCJD (R208H mutation)	PSP/CJD
33	53	F	11	W	1201	75	673	7,79	MV	fCJD (E200K mutation)	CJD
34	62	F	6	P	1201	48	315	1,77	MM	fCJD (E200K mutation)	CJD
35	39	M	48	N	1201	16	212	7,66	MV	GSS (P102L mutation)	GSS
36	65	M	4	P	1201	92	471	16,12	MM	GSS (P102L mutation)	CJD
37	62	F	12	N	65	25	410	2,79	n/a	VaD	VaD/mtb
38	69	M	2	P	1201	20	186	5,00	n/a	VaD	VaD/mtb/CJD



39	79	M	72	N	728	103	1512	5,92	n/a	VaD	VaD/AD
40	62	F	6	W	357	28	552	1,728	n/a	VaD	CJD
41	72	M	24	N	194	61	1672	6,44	n/a	PSP	AD
42	64	M	40	N	159	35	553	16,64	n/a	PSP	PSP
43	89	F	36	N	497	95	475	8,08	n/a	AD (Braak stage V)	depression
44	76	M	27	W	860	29	256	6,58	n/a	AD (Braak stage V)	CJD
45	68	M	84	N	830	102	94	10,62	n/a	AD (Braak stage VI)	AD
46	78	F	2	N	1201	65	143	40	n/a	AD (Braak stage VI)	CJD
47	62	M	36	P	1201	58	125	1,215	n/a	AD (Braak stage VI)	AD/FTD
48	82	F	7	W	1201	35	679	3,659	n/a	AD (Braak stage IV)	CJD
49	54	M	16	N	268	34	1109	16,47	n/a	FTLD-TDP	FTD
50	62	M	4	P	1121	54	595	13,35	n/a	FTLD-TDP	CJD
51	90	M	46	N	857	69	1065	8,38	n/a	FTLD-TDP	AD
52	75	M	9	N	148	26	265	5,22	n/a	FTLD-TDP	MSA/CJD
53	70	M	n/a	N	164	34	748	10,68	n/a	FTLD-TDP	FTD
54	80	F	12	N	1099	94	281	11,68	n/a	FTLD-TDP	FTD/AD
55	69	M	12	N	282	40	494	4,71	n/a	FTLD-TDP	FTD
56	78	M	3	N	467	16	339	6,72	n/a	FTLD-TDP	CJD
57	58	M	20	N	311	33	647	21,79	n/a	FTLD-TDP	FTD/MSA/CJD
58	53	F	20	N	134	15	348	2,321	n/a	FTLD-TDP	CJD
59	82	F	40	P	1201	21	360	3,111	n/a	FTLD-TDP	CJD

Supplemental table legend: codon 129 polymorphisms: **MM** – methionine/methionine, **MV** – methionine/valine, **VV** – valine/valine; protein 14-3-3 status: **P** – positive, **W** – weak, **N** – negative; **AD** – Alzheimer’s disease; **FTD** – frontotemporal dementia; **FTLD-TDP** – frontotemporal lobar degeneration with phosphorylated TDP-43 inclusions without motor neuron involvement; **GSS** – Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease; **MSA** – multiple system atrophy; **mtb** – metabolic encephalopathy; **fCJD** – familial Creutzfeldt-Jakob disease; **PSP** – progressive supranuclear palsy; **RPAD** – rapidly progressive Alzheimer’s disease; **RPD** – rapidly progressive dementia; **sCJD** – sporadic Creutzfeldt-Jakob disease; **VaD** – vascular dementia; **n/a** – not available; **n/a\*** – diagnosis made on brain biopsy

### **3.2 Charakterizace oligodendroglální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako základní předpoklad pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglální patologie**

ROHAN, Z., et al. Oligodendroglial response in the spinal cord in TDP-43 proteinopathy with motor neuron involvement. *Neurodegener Dis*, Aug 5 2014, 14(3), 117-124.

[IF 2014: 3,5]

# Oligodendroglial Response in the Spinal Cord in TDP-43 Proteinopathy with Motor Neuron Involvement

Zdenek Rohan<sup>a,c</sup> Radoslav Matej<sup>a,c,d</sup> Robert Rusina<sup>b,d</sup> Gabor G. Kovacs<sup>e</sup>

Departments of <sup>a</sup>Pathology and Molecular Medicine and <sup>b</sup>Neurology, Thomayer Hospital, <sup>c</sup>Institute of Pathology, Third Medical Faculty, Charles University in Prague, and <sup>d</sup>Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital, Prague, Czech Republic; <sup>e</sup>Institute of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

## Key Words

Amyotrophic lateral sclerosis · Myelin basic protein · Oligodendroglia · Perineuronal oligodendrocyte · p62 · Spinal cord · TDP-43 · TPPP/p25

## Abstract

**Background:** TDP-43 proteinopathies represent a spectrum of neurodegenerative disorders. Variable clinical presentations including frontotemporal dementia, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and mixed forms are associated with the spatial heterogeneity of the TDP-43 pathology. Recent studies have emphasized the role of oligodendrocytes in the pathogenesis of ALS. **Objective:** To evaluate whether TDP-43 proteinopathies are associated with an oligodendroglial response. **Methods:** We performed a study on 7 controls and 10 diseased patients with spinal cord involvement. Using the oligodendroglia-specific antibody TPPP/p25, we assessed oligodendrocyte density in the lateral corticospinal tracts (LCSs) along with the presence of perineuronal oligodendrocytes (PNOGs) in the anterior horns. We performed a densitometry of myelin basic protein (MBP) immunoreactivity. The numbers of TDP-43 and p62 immunoreactive inclusions were counted in both the LCSs and the anterior horns. **Results:** Double immunolabeling confirmed that oligodendrocytes harbor TDP-43 inclusions. In the LCSs, MBP density, but

not the number of oligodendrocytes, was decreased in the diseased group. However, oligodendrocyte counts in the LCS correlated positively, and the density of MBP inversely, with the number of neuronal inclusions in the anterior horn, suggestive of a compensatory response of oligodendrocytes. The number of neurons with PNOGs correlated with the amount of inclusions. **Conclusion:** Our study further emphasizes the importance of oligodendroglia in the pathogenesis of TDP-43 proteinopathies with spinal cord involvement.

© 2014 S. Karger AG, Basel

## Introduction

The clinicopathological spectrum of TDP-43 (trans-activation-responsive DNA-binding protein of 43 kDa) proteinopathies includes disorders characterized by intracellular accumulation of misfolded and phosphorylated TDP-43 (pTDP-43) [1, 2]. Moreover, TDP-43 immunodeposits are ubiquitinated and show immunoreactivity for p62, which is a multifunctional protein involved in intracellular signaling and the regulation of both the ubiquitin-proteasome system and autophagy [3]. Disorders recognized in this spectrum clinically present as frontotemporal dementia, motor neuron disease (MND)

or combined forms. The neuropathological classification corresponds to the entities designated as frontotemporal lobar degeneration (FTLD)-TDP, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and FTLD-MND, respectively [4]. Cases with ALS symptomatology show TDP-43- and p62-immunoreactive inclusions in both neurons and glia of the spinal cord. Numerous mechanisms have been proposed to explain the pathogenesis of TDP-43 proteinopathies, including an imbalance in RNA metabolism [5], protein p62 dysfunction [3], damage caused by astrocyte and microglial activation, glutamate toxicity and, generally speaking, proteostasis imbalances [6–8]. Even though the role of neurons in the pathogenesis of ALS has been studied extensively, the role of oligodendrocytes, the cells responsible for axon myelination and support, is less well known [8, 9]. However, recent studies have shown that oligodendrocytes may be involved in the pathogenesis of ALS. Failure of oligodendrocytes to metabolically support axons, due to monocarboxylate transporter (MCT-1) deficiency, was shown to lead to axonal degeneration and neuronal loss [10]. Other studies have shown that during the pathogenesis of ALS, neuron-glia antigen 2-positive (NG2+) oligodendrocyte progenitors proliferate and generate differentiated oligodendrocytes, which show an aberrant phenotype that could lead to the degeneration of axons [11, 12]. Another study showed that oligodendrocytes release exosomes upon glutamate activation and that these exosomes are endocytosed by neurons [13]. This could be a pathway for oligodendrocytes to support neurons during harmful events such as oxidative stress or nutrient deficiency [13]. Apart from oligodendrocyte progenitors and myelinating oligodendrocytes, another peculiar oligodendroglial population called perineuronal oligodendrocytes (PNOGs) seem to contribute to the pathogenesis of various neurodegenerative disorders and have been shown to differ from myelinating oligodendrocytes by having a role that is probably directed towards metabolic support of neurons rather than myelination of axons [14–16].

Due to the lack of reliable markers that can be used in postmortem formalin-fixed human tissue samples, oligodendrocyte pathology has been less investigated in ALS [8]. Through the application of a marker of differentiated oligodendrocytes, TPPP/p25 (tubulin polymerization-promoting protein), in the present study we assess and quantify the oligodendroglial response in cases characterized by TDP-43 proteinopathy with motor neuron involvement. This marker has been used to characterize oligodendrocyte pathology in postmortem samples originating from individuals with multiple sclerosis [17],

$\alpha$ -synucleinopathies [18, 19] and temporal lobe epilepsy [20]. Additionally, our study evaluated whether pTDP-43 and p62 pathologies were associated with myelin alterations in the lateral corticospinal tract (LCS) of the spinal cord.

## Material and Methods

### Material

Paraffin-embedded 4- $\mu$ m-thick tissue sections from a total of 10 diseased patients (6 women) and 7 controls (3 women) were evaluated. The mean age at death in the control group was 48.4 years (median: 38; range: 21–84), and in the disease group, it was 64.4 years (median: 64; range: 49–73). Causes of death in the diseased patients were bronchopneumonia or pulmonary embolism. Causes of death in the controls included cancer not affecting the brain or spinal cord, heart failure, hypertensive intracranial hemorrhage and pulmonary embolism. Brains were fixed in buffered formalin and examined using routine neuropathological protocols. The neuropathological classification of the 10 diseased patients included ALS or FTLD-TDP with associated MND; thus, all cases showed the TDP-43 pathology in the spinal cord. The diseased group represented sporadic cases of clinically observed MND/ALS only (n = 5) and frontotemporal dementia with subsequently developed MND (n = 5) with no detected abnormality in the *C9ORF72* and *TARDBP* genes. Moreover, FUS (fused in sarcoma) pathology was excluded. Cases with other concomitant neurodegenerative conditions were excluded from the present study. Blocks from the cervical spinal cord were used from both diseased patients and controls.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded sections using antibodies prepared against TPPP/p25 (monoclonal, 1:1,000; Höftberger et al. [17]), p62 (monoclonal, 1:500; BD Biosciences, San Jose, Calif., USA), pTDP-43 (monoclonal pS409/410, 1:2,000; Cosmo Bio, Tokyo, Japan) and myelin basic protein (MBP; polyclonal, 1:200; DAKO, Glostrup, Denmark). For visualization of the primary antibodies, a DAKO EnVision™ kit with a peroxidase-DAB system (rabbit/mouse) was used.

### Double Immunolabeling and Laser Confocal Microscopy

Polyclonal anti-TPPP/p25 (1:3,000; Haider et al. [21]) antibody was used with Alexa Fluor 488 (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories Inc., USA). Monoclonal anti-pTDP-43 antibody was used with Cy3 (1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Nuclei were stained with TO-PRO 3 (1:8,000; Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands). Immunofluorescent signals were elicited using argon 488-nm and helium/neon 550-nm lasers. Immunofluorescence labeling was evaluated using a Leica TCS SP5 II confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) with a HCX PL APO 40 $\times$ /1.2–0.75 OIL CS objective.

### Cell Counting and Inclusion Quantification

Counting was performed by a diagnosis-blinded observer (Z.R.) using the grid method. At  $\times$ 400 magnification, each grid corresponds to an area of 0.25  $\times$  0.25 mm. Using  $\times$ 400 magnifica-

tion, TPPP/p25 immunoreactive cells were counted in a total of 16 grids, thus covering an area of 1 mm<sup>2</sup>. TPPP/p25 immunoreactive cells were counted in prepared sections from the LCS and the ipsilateral dorsal column. Additionally, in the ipsilateral anterior horns, the numbers of neurons with 0 or 1 or more PNOGs (defined as TPPP/p25-immunoreactive cells located next to neurons without any intervening neuropil) were counted. For this purpose, a neuron was defined as a cell displaying at least two of the following: (1) a nucleus with a visible nucleolus, (2) lipofuscin in the cytoplasm, (3) Nissl's substance in the cytoplasm or (4) an apical dendrite.

The degree of neuronal and glial p62 and pTDP-43 immunoreactivities was measured by counting the number of inclusions per 1 mm<sup>2</sup> in the LCS. In the ipsilateral anterior horn, this was evaluated in the area around 10 neurons at  $\times 200$  magnification.

To assess the severity of pTDP-43 pathology in the primary motor cortex (Brodmann area 4) of diseased patients, we semi-quantitatively evaluated the amount of neuronal cytoplasmic and neuritic pTDP-43 immunoreactivities in a four-tiered manner (none-mild-moderate-severe).

#### *MBP Densitometry*

Sections of spinal cord immunolabeled for MBP were scanned with a digital slide scanner (NanoZoomer 2.0-HT; C9600-13; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) and further analyzed using ImageJ software (ImageJ 1.47q; W.S. Rasband; National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA). Regarding regions of interest for MBP densitometry, areas from the LCS were selected at  $\times 400$  magnification and imported into the ImageJ software. After conversion to 8-bit images, the MBP density was measured, applying the same threshold for all sections and expressed as the integrated density (the algorithm takes into account different pixel values across the region of interest, which provides a better correlation to uneven diaminobenzidine-based staining) of threshold pixel values in the region of interest.

#### *Statistical Evaluation*

The cases included in the study ( $n = 17$ ) were grouped as controls ( $n = 7$ ) and diseased patients characterized by pTDP-43 pathology ( $n = 10$ ); the latter were designated as the 'diseased group' in the study. The quantity of p62 and pTDP-43 inclusions in neurons and glia, the quantity of TPPP/p25-immunoreactive cells and the density of MBP immunoreactivity in the white matter were subjected to statistical analysis. To compare the mean values of these variables, the Mann-Whitney test was used. For assessment of the relationship between variables, the Spearman correlation test was performed.  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## **Results**

### *Patterns of p62, pTDP-43, TPPP/p25 and MBP Immunoreactivities*

In the sections from the cervical spinal cord, no p62- or pTDP-43-immunoreactive inclusions were found in any of the examined areas in the control group. In the diseased group, irrespective of the predominant clinical fea-

ture, p62- or pTDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions and neuritic profiles were found to variable extents in all the areas examined (fig. 1a–d). The number of p62 and pTDP-43 inclusions correlated well with each other in all the regions examined ( $p < 0.05$ ). Double immunolabeling for pTDP-43 and TPPP/p25 demonstrated that inclusions in the white matter were associated with oligodendroglial cells, and cytoplasmic immunolabeling partly overlapped; a few globular inclusions showed a clear TPPP/p25 immunoreactivity (fig. 1e–h). TPPP/p25 immunoreactivity was observed in oligodendrocytes in both white and gray matter. In addition, a weak immunoreactivity of myelin sheaths was also present. Although there was a trend for a decreased number of TPPP/p25-immunoreactive cells in the diseased group (fig. 2a, b), this was not significant ( $p > 0.1$ ). PNOGs were recognized mainly in the ALS cases (fig. 2c). Immunoreactivity for MBP was present as diffuse staining of myelin sheaths in both the white and gray matter of the areas examined. In the LCS, we found significant differences in MBP density between the control and the diseased group ( $p = 0.050$ ; fig. 2d–f), but not in the dorsal column ( $p = 0.62$ ). In the motor cortex, we observed neuronal cytoplasmic and/or neuritic pTDP-43 immunoreactivities in all the diseased patients ( $n = 10$ ).

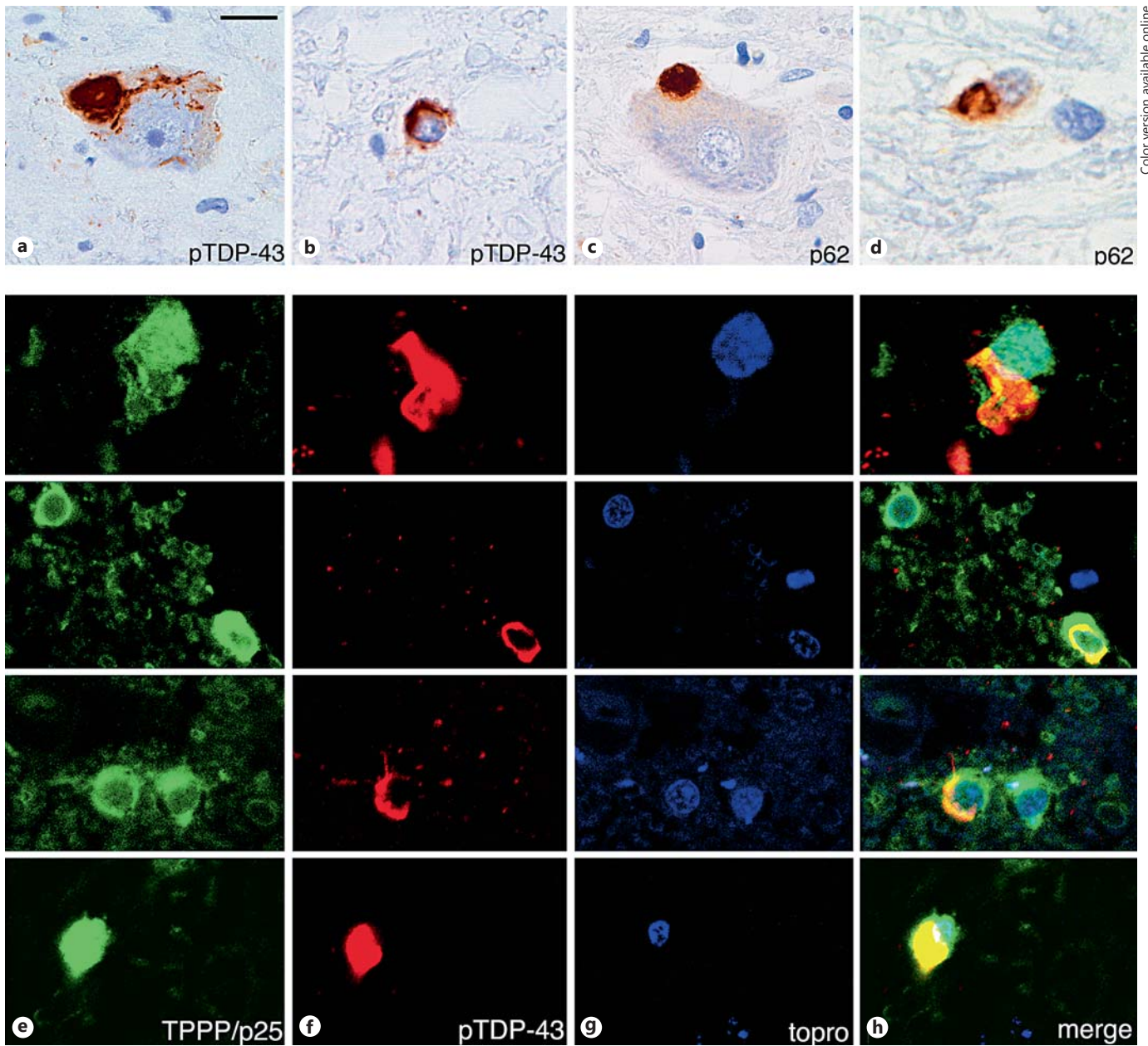
### *Relationship between MBP Density and p62 and pTDP-43 Inclusion Load*

The Spearman correlation test revealed no significant correlations between MBP density and the number of TPPP/p25-immunoreactive oligodendrocytes in the spinal cords of the control ( $R = -0.39$ ;  $p = 0.38$ ) and the diseased group ( $R = -0.45$ ;  $p = 0.18$ ). In the diseased group, we observed an inverse correlation between the number of p62-immunoreactive neuronal inclusions in the anterior horn and MBP density in the corticospinal tract ( $R = -0.87$ ;  $p = 0.001$ ). No correlation between the extent of neuritic or neuronal cytoplasmic pTDP-43 pathology in the motor cortex and MBP density in the LCS was observed ( $p > 0.8$  for both).

### *Relationship between Perineuronal and Corticospinal TPPP/p25-Immunoreactive Oligodendrocytes and p62 and pTDP-43 Inclusion Load*

We found no significant difference between the control and the diseased group ( $p > 0.1$ ) relative to the number of neurons with no or 1 or more PNOGs in the anterior horn. However, in the diseased group, we found that the number of neurons with 1 or more adjacent PNOGs was related to the increased number of neuronal p62 (p62

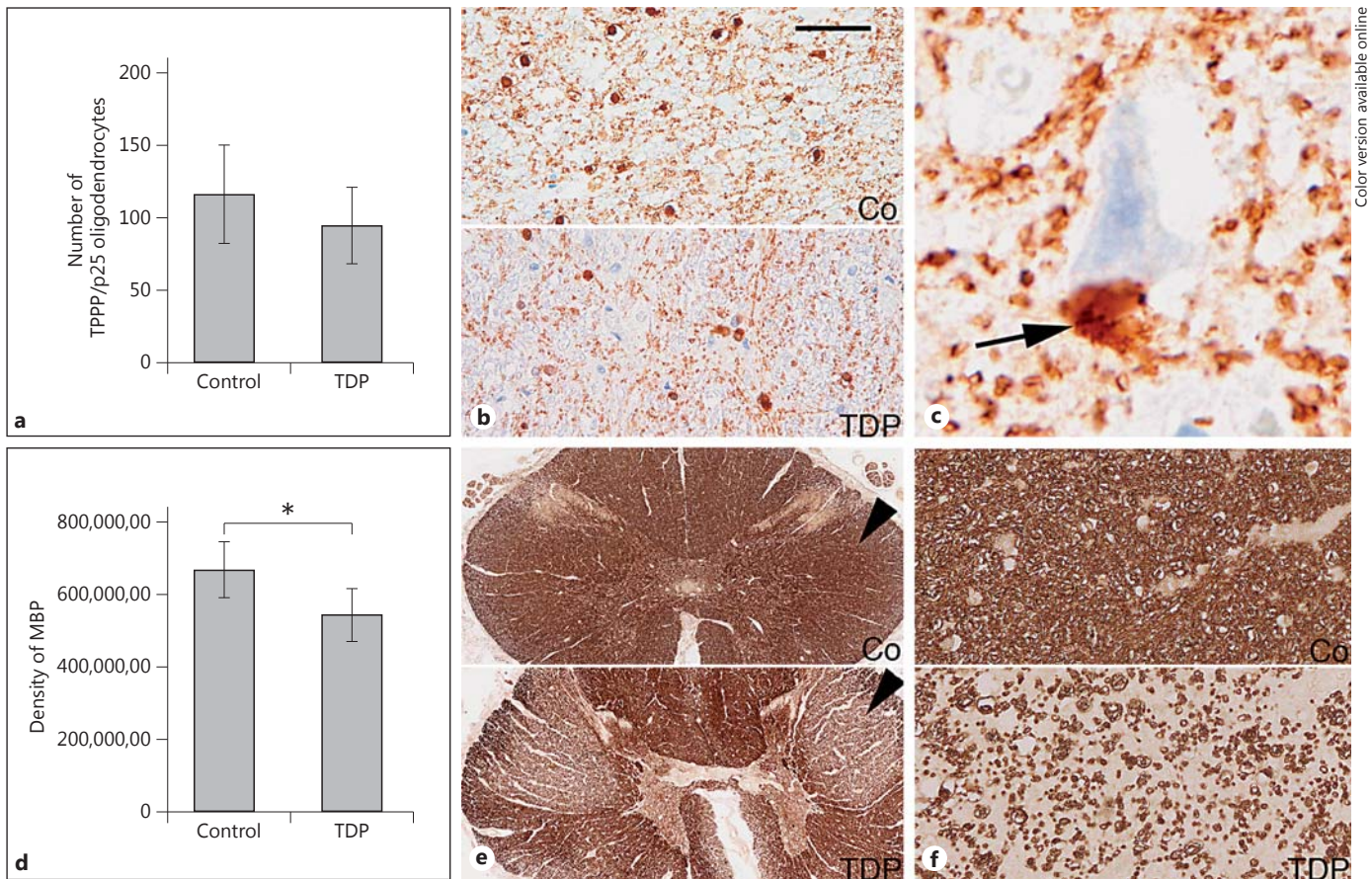




Color version available online

**Fig. 1.** pTDP-43 immunohistochemistry shows a neuronal cytoplasmic globose and skein-like inclusion (**a**) and a cytoplasmic glial coiled-body-like inclusion (**b**). Immunohistochemistry for p62 shows a globose neuronal cytoplasmic inclusion (**c**) and a glial cytoplasmic inclusion (**d**). Confocal microscopy shows a green signal (colors in online version only) for TPPP/p25 (**e**), red for pTDP-43 (**f**) and blue for TO-PRO 3 DNA staining (**g**) with colocalization

of pTDP-43 and TPPP/p25 signals (**h**). Note that TPPP/p25 immunoreactivity overlays the nucleus and labels the cytoplasm of oligodendrocytes and that pTDP-43-immunoreactive inclusions variably overlap with the cytoplasmic TPPP/p25 immunolabeling. Scale bar = 15 μm (**a**, **c**), 7.5 μm (**b**, **d**), 2.5 μm (**e-h**, uppermost row of panels) and 5 μm (**e-h**, lower 3 rows of panels).



Color version available online

**Fig. 2.** **a, d** Bar graphs showing TPPP/p25-immunoreactive cell counts (**a**) and MBP density values (**d**) in controls and TDP-43 proteinopathy (TDP) cases. \*  $p < 0.05$ . **b** TPPP/p25 immunoreactivity in a control (Co) and an ALS case (TDP) showing cytoplasmic and nuclear staining of oligodendrocytes along with weak my-

elin staining. **c** PNOG (arrow) defined as a TPPP/p25-immunoreactive cell that touches the neuron. **e, f** MBP-stained sections from a control (Co) and an ALS case (TDP) showing a clear loss of MBP staining in the LCS in the ALS case (**e**, arrowheads). Scale bar = 25  $\mu\text{m}$  (**b, f**), 7.5  $\mu\text{m}$  (**c**) and 0.15 mm (**e**).

neuronal  $R = 0.826$ ,  $p = 0.03$ ; p62 glial  $R = 0.524$ ,  $p = 0.12$ ) and neuronal and glial pTDP-43 (pTDP-43 neuronal  $R = 0.68$ ,  $p = 0.03$ ; pTDP-43 glial  $R = 0.83$ ,  $p = 0.003$ ) inclusions in the anterior horn. In the diseased group, we observed more PNOG-bearing neurons with inclusions (43.25% of the neurons with neuronal cytoplasmic inclusions showed PNOGs, while 23% of the neurons without neuronal cytoplasmic inclusions showed PNOGs). However, this did not reach statistical significance ( $\chi^2$  test;  $p = 0.13$ ). The number of neurons with 1 or more PNOGs also positively correlated with the severity of neuritic, but not with that of neuronal cytoplasmic, pTDP-43 pathology in the motor cortex ( $R = 0.63$ ;  $p = 0.051$ ). The number of neuronal p62- and pTDP-43-immunoreactive inclusions in the anterior horn positively correlated with the num-

ber of TPPP/p25-immunoreactive oligodendrocytes in the LCS (pTDP-43 neuronal  $R = 0.66$ ,  $p = 0.03$ ; pTDP-43 glial  $R = 0.49$ ,  $p = 0.14$ ; p62 neuronal  $R = 0.61$ ,  $p = 0.057$ ; p62 glial  $R = 0.56$ ,  $p = 0.08$ ). The severity of the motor cortex neuritic pTDP-43 pathology correlated variably with the number of TPPP/p25-expressing oligodendrocytes in the LCS ( $R = 0.76$ ;  $p = 0.011$ ), p62 glial ( $R = 0.68$ ;  $p = 0.029$ ) and neuronal ( $R = 0.59$ ;  $p = 0.069$ ), pTDP-43 glial ( $R = 0.55$ ;  $p = 0.093$ ) and pTDP-43 neuronal ( $R = 0.62$ ;  $p = 0.056$ ) inclusions in the anterior horn. No correlation was found between motor cortex neuritic pTDP-43 pathology and p62 glial ( $R = 0.403$ ;  $p = 0.248$ ) and pTDP-43 glial ( $R = 0.530$ ;  $p = 0.115$ ) inclusions in the LCS. The severity of neuronal cytoplasmic pTDP-43 pathology did not correlate with these variables.



### *Relationship between Age and TPPP/p25-Immunoreactive Cell Count*

The Spearman correlation test showed a significant negative correlation between the age at death of the subjects in the diseased group and the number of TPPP/p25-immunoreactive cells in the LCS ( $R = -0.64$ ;  $p = 0.046$ ). The presence of both p62 and pTDP-43 immunoreactivities did not correlate with age or MBP density values in the diseased group.

## **Discussion**

In this study, we demonstrated the oligodendroglial response in the spinal cord in TDP-43 proteinopathy cases (diseased group) with motor neuron symptomatology. Major findings of our study are the following: (1) we provided evidence that TPPP/p25-immunoreactive oligodendrocytes contain pTDP-43 inclusions; (2) we found a decreased density of MBP in the LCS of the diseased group, which was not paralleled by a loss of TPPP/p25-expressing oligodendrocytes; (3) inclusions in the anterior horn correlated inversely with the density of MBP and positively with the number of TPPP/p25-immunoreactive oligodendrocytes in the corticospinal tract, and (4) we demonstrated a positive correlation between the amount of p62- and pTDP-43-immunoreactive inclusions and increased numbers of motor neurons with PNOGs. In addition, our observations suggest that the age of patients may potentially influence the oligodendroglial response in the corticospinal tract.

To quantify oligodendrocytes, we used brain-specific TPPP/p25 as a marker of differentiated myelinating oligodendrocytes. This marker provides robust results in formalin-fixed paraffin-embedded tissue; its antigenicity is preserved even after prolonged fixation in routinely used fixatives and has been successfully used in previous studies [17–21]. Apart from neurons, oligodendrocytes are considered to be the other major cell type having pTDP-43-immunoreactive inclusions in TDP-43 proteinopathies. This is mainly based on the morphology of the cells and inclusions. However, definite confirmation that these cells are of oligodendroglial origin has been missing due to lack of a marker specific for mature myelinating oligodendrocytes that could be reliably used in human post-mortem formalin-fixed tissues [8]. In our study, we demonstrated that pTDP-43-immunoreactive inclusions colocalize with TPPP/p25, and, therefore, we confirmed that the cells containing the inclusions are indeed oligodendrocytes. The partly overlapping immunoreactivity

could suggest a redistribution of cytoskeletal elements into the glial inclusions, reminiscent of the inclusions in the  $\alpha$ -synucleinopathy called multiple system atrophy [18, 19]; however, this merits further analysis. As with neurons, the majority of pTDP-43-immunoreactive inclusions in oligodendrocytes was ubiquitinated and contained p62.

Our finding that the number of TPPP/p25-expressing oligodendrocytes in the LCS does not show a significant difference between the control and the diseased group is in agreement with recently published studies using different markers for differentiated oligodendrocytes [11, 12]. However, in cases with developed MND, the loss of myelin in the LCS was obvious, and we also found a decrease in the MBP density within this group when compared with the controls. We noted a trend for decreased numbers of TPPP/p25+ cells in the diseased group, which could be associated with the loss of myelin and tract degeneration. Although we did not perform an exact somatotopic comparison, interestingly, MBP density in the LCS in the diseased group did not correlate with the extent of neuronal/neuritic pTDP-43 pathology in the motor cortex, but it correlated inversely with the number of neuronal p62-immunoreactive inclusions in the anterior horn. In contrast, neuronal p62- and pTDP-43-immunoreactive inclusions in the anterior horn positively correlated with increased numbers of TPPP/p25-expressing oligodendrocytes in the LCS. This opposing effect suggests that a subset of oligodendrocytes, in a pool of quiescent cells, start to express TPPP/p25 during the course of the disease as a reaction to ongoing distress in motor neurons and myelin loss. Most likely, this is a compensatory phenomenon, which, however, is not enough to reach or to exceed the level seen in the nondiseased group. Since dysfunctional oligodendrocytes have been shown to contribute to axonal degeneration and myelin loss, this could suggest that the myelin loss in the LCS is not just secondary to upper motor neuron damage [10, 11, 13, 22]. This is also supported by studies on mice harboring mutations that cause oligodendroglial dysfunction and showing axonal degeneration, albeit in the presence of relatively preserved myelin sheaths [23, 24]. This implies that oligodendrocytes may contribute to non-cell-autonomous damage to neurons before myelin loss occurs. Indeed, an oligodendroglia-mediated non-cell-autonomous loss of neurons was suggested by Philips et al. [11], who demonstrated that mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) causes posttranscriptional decreases in MCT-1 levels, and thus impairs trophic support to the axons. Kang et al. [12] selectively deleted mutated SOD1

(G37R) from the NG2+ oligodendrocyte precursors in mice, causing a delayed disease onset and prolonged survival. Moreover, in the same study, MCT-1 expression was partially preserved in some cases during the early stages of disease.

The finding of a positive correlation between the number of TPPP/p25-expressing PNOGs and the number of neuronal p62-immunoreactive and neuronal and glial pTDP-43-immunoreactive inclusions in the anterior horns is intriguing. To plausibly explain this phenomenon, a deeper understanding of PNOG function is necessary. Recent studies have shown that PNOGs may trophically and metabolically support neurons [25] and protect them from apoptosis [14]. PNOGs were shown to be decreased in the prefrontal cortex of patients suffering from schizophrenia [26], while being increased in the temporal lobe resection specimens from patients with epilepsy [20]. Szuchet et al. [16] defined PNOGs as differentiated nonmyelinating oligodendrocytes (A2B5+ and OTMP+) derived from oligodendrocyte precursors, distinct from their myelinating counterparts. The authors of the study suggested that PNOGs may serve as a reserve oligodendrocyte population that is primarily nonmyelinating but can participate in remyelination during various pathologic conditions. In the same study, PNOGs were shown to be negative for CC1 (a clone of adenomatous polyposis coli), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) and myelin proteolipid protein, which are markers of myelinating oligodendrocytes; this is in conflict with results of the study by Takasaki et al. [15], who used CNP positivity to define PNOGs, and also contravenes our study, in which we define PNOGs by the expression of TPPP/p25, which has been shown to be coexpressed with CNP in differentiated myelinating oligodendrocytes [17, 27]. PNOGs can be defined by morphological criteria such as those used in our study and in the studies by Taniike et al. [14], Vostrikov et al. [26] and Takasaki et al. [15]; on the other hand, there are molecular-genetic criteria, as used in a study by Szuchet et al. [16]. Since these two approaches yield contradictory results, a more comprehensive characterization of PNOGs, at the molecular-genetic and morphological levels, is needed. Despite this inconsistency, reported CC1 negativity in PNOGs [16] becomes more interesting in the context of more recent studies that investigated oligodendroglial pathology in ALS [11, 12]. Kang et al. [12] showed that in the mouse model of ALS with the SOD1 G93A mutation, NG2+ oligodendrocyte precursors increased in number, but CC1+ oligodendrocyte numbers remained rather stable, implying that there

is a concomitant loss of CC1+ oligodendrocytes. This was described in another study carried out on SOD1 G93A mice as well, in which the authors observed an increase in NG2+ oligodendrocyte precursors; moreover, the CC1+ oligodendrocytes showed an impaired morphology and failure in myelination and the metabolic support of neurons [11]. Therefore, we can speculate that increases in NG2+ precursors may also lead to increases in CC1- PNOGs, which could then metabolically, trophically and antiapoptotically support distressed neurons. This would suggest an important role for PNOGs in the pathogenesis of ALS.

In conclusion, our study shows that TDP-43 proteinopathy cases presenting with motor neuron involvement show a complex oligodendroglial response. We hypothesize that there is a compensatory response during the progression of the disease and that this is why we see a positive correlation with the number of inclusions and TPPP/p25-positive cells. However, this reaction is not enough to reach or to exceed the number of TPPP/p25-expressing cells in nondiseased tissue. A comparable phenomenon has also been observed in multiple sclerosis [17] and temporal lobe epilepsy [20]. If TPPP/p25 is a marker of functionally matured oligodendrocytes, capable of myelination and providing metabolic support to the neurons, a reactive increase in oligodendrocytes expressing TPPP/p25 could be related to ongoing damage to the CNS. Based on this study, TPPP/p25 seems to be triggered by neuronal distress, as indicated by the presence of p62- and pTDP-43-immunoreactive inclusions in the diseased group. Whether the 'responding' TPPP/p25-expressing oligodendrocytes contribute to the repair of myelin or offer metabolic support to neurons, as two different populations, merits further investigations. Our demonstration of the important role of oligodendrocytes in TDP-43 proteinopathies could serve as a rationale for the development of glia-based therapies.

## Acknowledgements

The study was supported by grant IGA NT12094-5 from the Grant Agency of the Ministry of Health, Research Project MSMT 0021620849, Charles University Project PRVOUK P26/1/4 as well as by a grant from the AKTION Austria-Czech Republic. It was performed in the frame of the European Commission's 7th Framework Programme under GA No. 278486, DEVELAGE (G.G.K.). The authors wish to thank Tom Secret, MSc, for revisions on the English version of this article.

## References

- 1 Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR, Pickering-Brown S, du Plessis D, Neary D, Snowden JS, Mann DM: Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43. *Acta Neuropathol* 2007;113:521–533.
- 2 Josephs KA, Hodges JR, Snowden JS, Mackenzie IR, Neumann M, Mann DM, Dickson DW: Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* 2011;122:137–153.
- 3 Salminen A, Kaarniranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H, Alafuzoff I: Emerging role of p62/sequestosome-1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2012;96:87–95.
- 4 Robberecht W, Philips T: The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2013;14:248–264.
- 5 da Cruz S, Cleveland DW: Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 2011;21:904–919.
- 6 Rothstein JD: Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009;65(suppl 1):S3–S9.
- 7 Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE: Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 2009;78:959–991.
- 8 Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ: Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol* 2011;122:657–671.
- 9 Lasiene J, Yamanaka K: Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* 2011; 2011:718987.
- 10 Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD: Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 2012;487:443–448.
- 11 Philips T, Bento-Abreu A, Nonneman A, Haeck W, Staats K, Geelen V, Hersmus N, Kusters B, van den Bosch L, van Damme P, Richardson WD, Robberecht W: Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2013;136: 471–482.
- 12 Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, Cleveland DW, Ostrow LW, Rothstein JD, Bergles DE: Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2013; 16:571–579.
- 13 Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, Kirchhoff F, Möbius W, Goebels S, Nave KA, Schneider A, Simons M, Klugmann M, Trotter J, Krämer-Albers EM: Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* 2013; 11:e1001604.
- 14 Taniike M, Mohri I, Eguchi N, Beuckmann CT, Suzuki K, Urade Y: Perineuronal oligodendrocytes protect against neuronal apoptosis through the production of lipocalin-type prostaglandin D synthase in a genetic demyelinating model. *J Neurosci* 2002;22:4885–4896.
- 15 Takasaki C, Yamasaki M, Uchigashima M, Konno K, Yanagawa Y, Watanabe M: Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *Eur J Neurosci* 2010;32:1326–1336.
- 16 Szuchet S, Nielsen JA, Lovas G, Domowicz MS, de Velasco JM, Maric D, Hudson LD: The genetic signature of perineuronal oligodendrocytes reveals their unique phenotype. *Eur J Neurosci* 2011;34:1906–1922.
- 17 Höftberger R, Fink S, Aboul-Enein F, Botond G, Olah J, Berki T, Ovadi J, Lassmann H, Budka H, Kovacs GG: Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis. *Glia* 2010;58:1847–1857.
- 18 Kovacs GG, Gelpi E, Lehotzky A, Höftberger R, Erdei A, Budka H, Ovadi J: The brain-specific protein TPPP/p25 in pathological protein deposits of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 2007;113:153–161.
- 19 Kovacs GG, Laszlo L, Kovacs J, Jensen PH, Lindersson E, Botond G, Molnar T, Perczel A, Hudecz F, Mezo G, Erdei A, Tirian L, Lehotzky A, Gelpi E, Budka H, Ovadi J: Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of  $\alpha$ -synucleinopathies. *Neurobiol Dis* 2004;17: 155–162.
- 20 Stefanits H, Czech T, Pataria E, Baumgartner C, Derhaschnig N, Slana A, Kovacs GG: Prominent oligodendroglial response in surgical specimens of patients with temporal lobe epilepsy. *Clin Neuropathol* 2012;31:409–417.
- 21 Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witzum JL, Lassmann H: Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011;134:1914–1924.
- 22 Higuchi M, Zhang B, Forman MS, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM: Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J Neurosci* 2005;25:9434–9443.
- 23 Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA: Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 1998;280:1610–1613.
- 24 Edgar JM, McLaughlin M, Werner HB, McCulloch MC, Barrie JA, Brown A, Faichney AB, Snaidero N, Nave KA, Griffiths IR: Early ultrastructural defects of axons and axon-glia junctions in mice lacking expression of Cnp1. *Glia* 2009;57:1815–1824.
- 25 Du Y, Dreyfus CF: Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res* 2002; 68:647–654.
- 26 Vostrikov VM, Uranova NA, Orlovskaya DD: Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res* 2007;94:273–280.
- 27 Skjoerringe T, Lundvig DM, Jensen PH, Moos T: P25 $\alpha$ /tubulin polymerization promoting protein expression by myelinating oligodendrocytes of the developing rat brain. *J Neurochem* 2006;99:333–342.

### **3.3 Charakterizace topografie patologie $\alpha$ -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologií crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2**

ROHAN, Z., et al. Screening for alpha-synuclein immunoreactive neuronal inclusions in the hippocampus allows identification of atypical MSA (FTLD-synuclein). *Acta Neuropathol*, Aug 2015, 130(2), 299-301.

[IF 2014: 10,7]

## Screening for $\alpha$ -synuclein immunoreactive neuronal inclusions in the hippocampus allows identification of atypical MSA (FTLD-synuclein)

Zdenek Rohan<sup>1,2</sup> · Jasmin Rahimi<sup>3</sup> · Serge Weis<sup>4</sup> · Istvan Kapas<sup>5</sup> · Eduard Auff<sup>6</sup> · Nenad Mitrovic<sup>7</sup> · Pawel P. Liberski<sup>8</sup> · Beata Sikorska<sup>8</sup> · Radoslav Matej<sup>1,2,9</sup> · Gabor G. Kovacs<sup>3</sup>

Received: 3 June 2015 / Revised: 15 June 2015 / Accepted: 16 June 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Atypical multiple system atrophy (aMSA) is a term recently introduced by Aoki et al. to describe cases that show hallmark neuropathological changes of glial cytoplasmic inclusions (Papp–Lantos bodies) characteristic of MSA, while clinically presenting with frontotemporal dementia (FTD) syndromes associated with frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and severe limbic and cortical  $\alpha$ -synuclein neuronal pathology [2]. The authors evaluated FTD syndrome cases and showed that the evaluation of  $\alpha$ -synuclein immunoreactive neuronal cytoplasmic inclusions (NCIs) in the hippocampus (dentate gyrus and CA1/Subiculum) seems to be of great importance [2]. We aimed to determine if these morphological features in the hippocampus are reliable to identify similar cases in our archives.

We evaluated  $\alpha$ -synuclein immunostaining in the hippocampus from a cohort of 18 neuropathologically confirmed MSA cases [10]: all cases contained characteristic Papp–Lantos bodies and NCIs in the basal ganglia,

brainstem, and cerebellum. According to Aoki et al. [2], we used a four-tiered scoring system (none—0, mild—1, moderate—2, severe—3) for the evaluation of  $\alpha$ -synuclein NCIs regardless of their morphology (ring, NFT, or Pick body like). The selection was blinded to the clinical diagnosis, age, gender, and macroscopic observations. We observed  $\alpha$ -synuclein immunoreactive NCIs in the granule cells of the dentate gyrus in seven cases (38 %). Five out of seven cases (online supplemental file 1) showed only relatively few NCIs in the dentate gyrus and CA1/Subiculum (score 1) (Fig. 1a, b). There was a lack of  $\alpha$ -synuclein immunoreactive thin neurites and eosinophilic Pick body-like spherical inclusions in the hematoxylin and eosin (H&E) staining. Three of these five cases did not show clinical symptoms of dementia. Gait disturbance, parkinsonism, cerebellar symptoms, and dementia (not compatible with FTD) were reported in the two additional cases (57- and 71-year-old women) during the final 24 months of illness (total duration of illness was 120 and 75 months, respectively). Both brains showed A $\beta$  plaques (both Thal phase 3) [9] and neurofibrillary degeneration (both Braak stage II) [1, 3]. In the

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00401-015-1455-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gabor G. Kovacs  
gabor.kovacs@meduniwien.ac.at

<sup>1</sup> Department of Pathology and Molecular Medicine, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Third Faculty of Medicine, Institute of Pathology, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> Institute of Neurology, Medical University of Vienna, AKH 4J, Währinger Gürtel 18-20, 1097 Vienna, Austria

<sup>4</sup> Laboratory of Neuropathology, Department of Pathology and Neuropathology, State Neuropsychiatric Hospital Wagner-Jauregg, Medical School, Johannes Kepler University Linz, Linz, Austria

<sup>5</sup> Department of Neurology, St. Janos Hospital, Budapest, Hungary

<sup>6</sup> Department of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

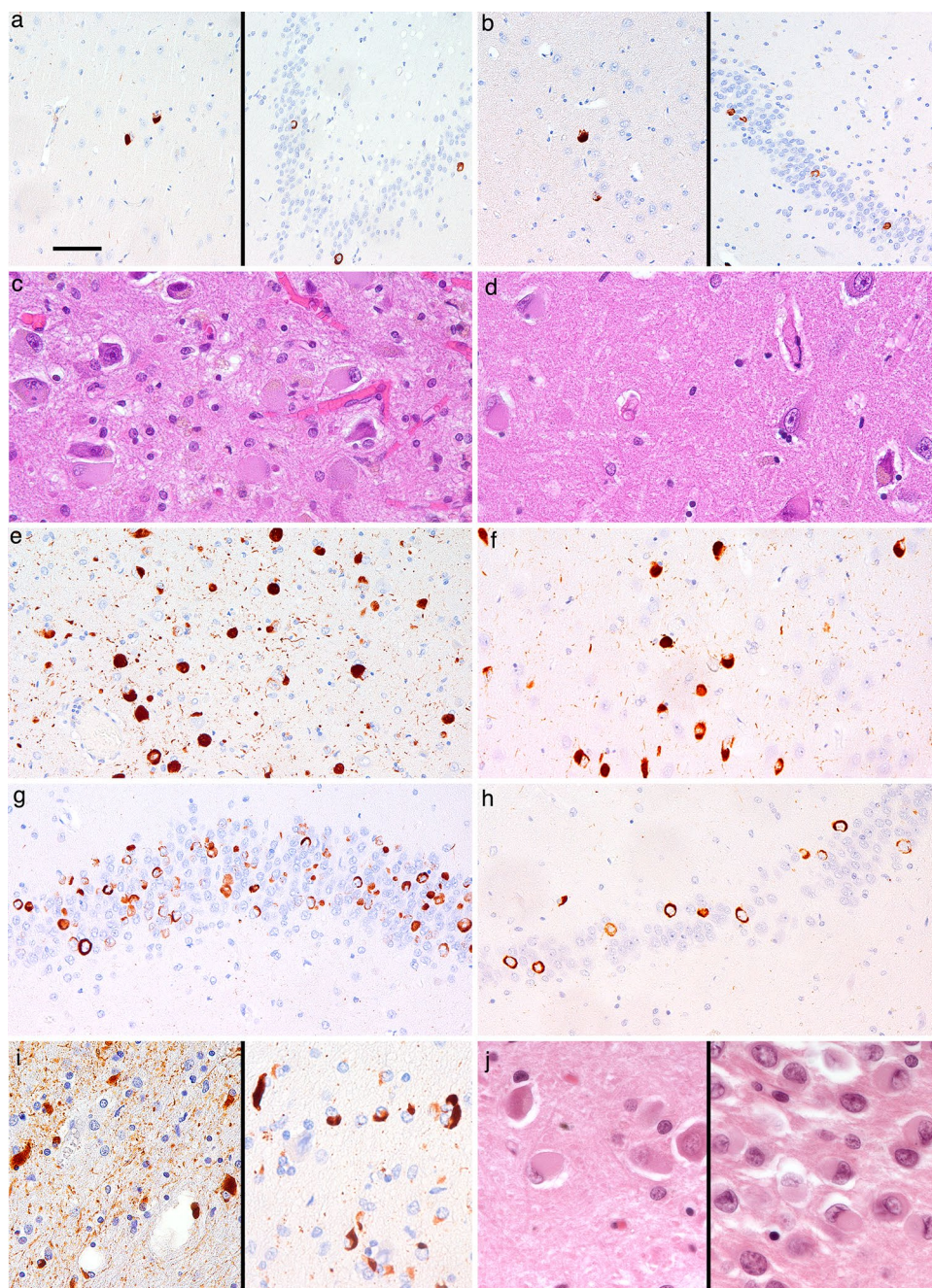
<sup>7</sup> Department of Neurology, Salzkammergut-Klinikum, Vöcklabruck, Austria

<sup>8</sup> Department of Molecular Pathology and Neuropathology, Chair of Oncology, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>9</sup> Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic



**Fig. 1** Microscopic findings in the reported atypical MSA cases. Few spherical [left side of images (a) and (b); CA1 sub-region] and ring-shaped [right side of images (a) and (b); dentate gyrus] neuronal  $\alpha$ -synuclein immunoreactive inclusions in two cases with typical MSA and dementia in the last phase of the disease course. Spherical eosinophilic inclusions in atypical MSA (FTLD-synuclein) in the CA1 subregion (c case 1; d case 2). Many Pick body-like and NFT-like inclusions in the CA1/Subiculum in case 1 (e) and 2 (f).  $\alpha$ -Synuclein immunoreactive ring-shaped inclusions in the granule cells of the dentate gyrus in case 1 (g) and 2 (h). Immunostaining for phospho-tau (AT8 antibody) reveals oligodendroglial inclusions in the hippocampal white matter partly with globular morphology (i left side of image) resembling  $\alpha$ -synuclein immunoreactive Papp-Lantos bodies (i right side of image). Spherical eosinophilic inclusions in atypical MSA (FTLD-synuclein) reported by Sikorska et al. [8] (j left side of image shows CA1 and right side of image shows dentate gyrus). The black bar in the bottom of image (a) represents a length of 100  $\mu$ m for images a and b; 30  $\mu$ m for images c, d and j; and 50  $\mu$ m for images e–i



cases lacking hippocampal NCIs, FTD-like symptoms have not been reported.

An additional two cases showed severe NCI pathology in the hippocampus, both in the dentate gyrus and the CA1/Subiculum. NCIs in the dentate gyrus mostly had ring-shaped immunoreactivity. Aoki and colleagues considered numerous Pick body-like inclusions in the hippocampus to be highly characteristic of aMSA [2]; indeed, we also observed many of these together with NFT-like inclusions [2] (Fig. 1c–h) and therefore interpreted these cases as aMSA. Evaluation of the clinical data revealed FTD

syndromes in these two cases, associated with macroscopic signs of FTLD. Patient 1 (72-year-old man) presented with parkinsonism, and soon developed dysarthria, dysphagia, vertical gaze palsy and FTD symptoms (i.e., utilization behavior and frontal lobe symptoms) during the disease course, which lasted 42 months (online supplemental file 1). The clinical diagnosis was progressive supranuclear palsy with frontal dementia. The second patient (79-year-old woman) presented with non-fluent aphasia, impaired word finding, and subsequent memory disturbance associated with gait disorder and parkinsonism, which rapidly

progressed and was accompanied by akinetic mutism in the terminal phase. EEG revealed transient left temporal sharp wave complexes. Since the disease course was shorter than 18 months and the laboratory examinations did not suggest an alternative cause for the symptoms, a tentative diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease was rendered. Neither of the two cases had documented autonomic dysfunction.

In the cohort of Aoki et al. [2], hippocampal tau pathology spanned from mild to severe NFT pathology with variable A $\beta$  pathology. These pathologies were not significantly different from typical MSA cases [2]. In our two aMSA cases, we observed moderate neurofibrillary degeneration (Braak III and II) and also A $\beta$  deposits (online supplemental file 1). It is noteworthy, however, that both cases showed oligodendroglial AT8 immunopositive inclusions only in the hippocampal white matter, despite the lack of argyrophilic or p62-positive grains. Although some of these showed globular morphology (Fig. 1i), the amount and their anatomically restricted distribution was not compatible with that reported in globular glial tauopathies [5].

As the next step, we re-evaluated the case reported by Sikorska et al. [8]. Indeed, the early clinical symptoms of this individual included behavioral changes followed by psychotic symptoms, with aggression and later delusion and hallucinations followed by rapidly progressive dementia. Although not covered by current diagnostic criteria, psychotic symptoms seem to be common in FTD patients [6]. This clinical phenotype together with the prominent degree of FTLN and abundant presence of NCIs (including NFT, Pick body, and ring like) in the hippocampus and dentate gyrus (Fig. 1j) allows this case to be diagnosed as aMSA (FTLN-synuclein). In that paper [8], cortical Lewy bodies were described in the cortex, which strongly resemble the Pick body-like inclusions reported by Aoki et al. [2]. Indeed, the archival diagnosis was Pick's disease [8]. It is worth noting that the clinical phenotype of the cases considered to be FTLN-synuclein (see Table 4 in the paper by Aoki et al. [2]) was classified based on the presence of FTLN and an abundance of limbic and cortical NCIs, although the clinical symptoms were not fully compatible with FTD.

Based on these observations, we have expanded the series reported by Aoki et al. [2] by reporting two previously unpublished cases. Additionally, we can confirm that the case reported by Sikorska et al. [8] also belongs to the group of aMSA. All three cases have shorter illness durations than those reported in Japan and bear similarity to those reported in the USA [2]. We agree that these cases show either or both features of FTLN or clinical symptoms of FTD. In addition, we have also observed that the clinical progression can suddenly become quite rapid, which can introduce a differential diagnosis of prion disease. Our

findings support the suggestion that diagnostic screening of the hippocampus for neurodegeneration-related proteins can reliably suggest a neurodegenerative condition [4, 7]. Accordingly, detection of a moderate or severe degree of eosinophilic and  $\alpha$ -synuclein immunoreactive NCIs with NFT-, or Pick body-like appearance in the CA1/subiculum and ring-like or spherical NCIs in the granule cells of the dentate gyrus and  $\alpha$ -synuclein immunoreactive thin neurites and reactive astrogliosis strongly suggests aMSA (FTLN-synuclein) warranting a systematic evaluation.

**Acknowledgments** B. S., P. P. L., and G. G. K. are supported by ÖAD Austria-Poland (PL 04/2014) and the Healthy Ageing Research Centre project (REGPOT-2012-2013-1, 7FP). R. M. and Z. R. are supported by grant IGA NT12094-5 from Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic. Z. R. was supported by AVASTipendium for Human Brain, Alzheimer Foundation and Avast project.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors report no conflict of interest.

#### References

- Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S et al (2008) Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol* 18:484–496
- Aoki N, Boyer PJ, Lund C et al (2015) Atypical multiple system atrophy is a new subtype of frontotemporal lobar degeneration: frontotemporal lobar degeneration associated with alpha-synuclein. *Acta Neuropathol*. doi:10.1007/s00401-015-1442-z
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretzschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112:389–404
- Kovacs GG, Budka H (2010) Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: neurodegenerative diseases. *Clin Neuropathol* 29:271–288
- Kovacs GG, Majtenyi K, Spina S et al (2008) White matter tauopathy with globular glial inclusions: a distinct sporadic frontotemporal lobar degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:963–975
- Landqvist Waldo M, Gustafson L, Passant U, Englund E (2015) Psychotic symptoms in frontotemporal dementia: a diagnostic dilemma? *Int Psychogeriatr* 27:531–539
- Milenkovic I, Petrov T, Kovacs GG (2014) Patterns of hippocampal tau pathology differentiate neurodegenerative dementias. *Dement Geriatr Cogn Disord* 38:375–388
- Sikorska B, Papierz W, Preusser M, Liberski PP, Budka H (2007) Synucleinopathy with features of both multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:126–129
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791–1800
- Trojanowski JQ, Revesz T (2007) Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:615–620



Variable	aMSA Case 1		aMSA Case 2		Hippocampus NCI Case 1		Hippocampus NCI Case 2		Hippocampus NCI Case 3		Hippocampus NCI Case 4		Hippocampus NCI Case 5	
	72	79	79	female	71	female	63	male	54	male	48	female		
Age	72	79	79	female	71	female	63	male	54	male	48	female		
Sex	male	female	female	1.5	6.25	10	6	4	6	4	6	6		
Duration of illness (years)	3.5	1.5	1.5											
Initial symptoms	Rigidity and bradykinesia	Aphasia and gait disorder	Aphasia and gait disorder		Gait disturbance, dizziness	Falls, Rigidity and bradykinesia	Rigidity and bradykinesia	Rigidity and bradykinesia	Rigidity and bradykinesia	Rigidity and bradykinesia	Rigidity and bradykinesia	Rigidity and bradykinesia		
Overview of symptoms														
	-	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-		
Aphasia	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
Parkinsonism	+	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+		
Dysarthria	+	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+		
Dysphagia	-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
Cerebellar signs	-	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-		
Myoclonus	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
Early memory impairment	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
Early memory decline in late stage of disease	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+		
Pyramidal signs	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-		
Utilization Behavior	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-		
Gaze palsy	+	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-		
Orthostatic hypotension	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+		
Clinical diagnosis	PSP-FTD	CJD	CJD		Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia	Parkinson syndrome + Dementia		
Cerebral atrophy	Frontotemporal and Striatal	Frontotemporal and Striatal	Frontotemporal and Striatal		Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar	Striatal and cerebellar		
Braak NFT stage	III	II	II		II	II	II	II	II	II	II	II		
Thal phase	4	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3		
TDP-43 pathology	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-		
GClis in CblI, BGG, Brainstem	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
Neuronal loss/Gliosis (score)	2	2	2		0	0	0	0	0	0	0	0		
Dentate gyrus	2	2	2		0	0	0	0	0	0	0	0		
CA1/subiculum	2	2	2		0	0	0	0	0	0	0	0		
Eosinophilic spherical NClis (score)	2	2	2		0	0	0	0	0	0	0	0		
$\alpha$ -synuclein NClis (score)	3	3	3		1	1	1	1	1	1	1	1		
Dentate gyrus	3	3	3		1	1	1	1	1	1	1	1		
CA1-4/Subiculum	3	3	3		1	1	1	1	1	1	1	1		
Temporal Cx	2	2	2		1	1	1	1	1	1	1	1		
Frontal Cx	2	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1		
$\alpha$ -synuclein NT-CA1/subiculum (score)	3	2	2		0	0	0	0	0	0	0	0		
$\alpha$ -synuclein GClis (score)	2	0	0		2	2	2	2	2	2	2	2		
Frontal WM	3	1	1		2	2	2	2	2	2	2	2		
Temporal WM	3	1	1		2	2	2	2	2	2	2	2		
Hippocampus (AIveus)	3	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2		

### **3.4 Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění**

ROHAN, Z., et al. Re: Shi et al. Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. J Pathol 2014;234: 398-409. J Pathol, Dec 9 2014.

[IF 2014: 7,4]

## Re: Shi et al. Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. J Pathol 2014;234: 398–409

Received 24 November 2014; Revised 24 November 2014; Accepted 4 December 2014

### PAR-2 in various carcinogenesis models: not the only PARTICIPANT

We read with great interest the article by Shi *et al* [1] in the November 2014 issue of *The Journal of Pathology*, which discussed the role of proteinase-activated receptor (PAR)-2 in the growth and metastasis of pancreatic cancer in a murine model.

In addition to the well-known role of PAR-2 in the primary proliferation of various cancer cells [2,3], including pancreatic cancer [4], the results presented highlighted convincingly the importance of stromal host receptors relative to local progression in the orthotopic pancreatic cancer model. The authors recorded an increase in the average volume of primary tumours in wild-type animals compared with *PAR-2*<sup>-/-</sup> knockouts. However, they found that metastatic spread to abdominal organs and lymph node metastasis was more extensive in *PAR-2*<sup>-/-</sup> knockout animals than in wild-type animals.

The authors noted the importance of the different roles of PAR-2 in metastasis, which vary depending on the model of metastasis (ie the important role of the host receptor). However, while a similar receptor (PAR-1), which is activated by thrombin, is (1) involved in cancer cell proliferation and invasion, (2) generally considered pro-carcinogenic, and (3) unambiguously considered to be a pro-metastatic factor [5], the same level of certainty regarding these events cannot be extended to PAR-2. Nevertheless, even though the data set describing this receptor in different models and/or experimental settings is small, the available results provide a good indication of its role.

No differences in the size and number of lung metastases in the murine melanoma model (using injections into the tail vein) were described by Camerer *et al* [6]. In contrast, our team recently published data that showed larger primary B16 melanomas growing subcutaneously in *PAR-2*<sup>-/-</sup> knockouts, while distant metastases (mainly to the lungs) were significantly more frequently recorded in wild-type controls [7]. Additionally, survival was prolonged in *PAR-2*<sup>-/-</sup> knockouts.

The available data make it clear that the absence of host PAR-2 leads to different outcomes depending on (1) primary tumour type (melanoma versus pancreatic cancer), (2) primary tumour location (skin versus pancreas), and (3) the model of metastatic induction (primary tumour growth versus intravenous application). Based on the three variations mentioned above, a variety of mechanisms for PAR-2 action have been discussed, including (a) antigen presentation in dendritic cells (DCs) [8]; (b) the role of PAR-2 in DC maturation

[9]; and (c) the role of tissue factor/factor VIIa PAR-2 in tumour proliferation [10] and in capillary endothelia in distant locations [6,11]. Recently, Shi *et al* suggested an additional role for PAR-2 with regard to lymphatic vessel maturation [1].

To evaluate the influence of PAR-2 on lymphatic vessel growth, Shi *et al* utilized both artificial [agonist peptide (AP)] and more natural, *in vivo*-generated cell culture extracts to activate PAR-2. It is worth pointing out that ligand pleiotropy and receptor redundancy are characteristic features of PARs that can adversely affect virtually all PAR-based experiments and, as the authors noted in their conclusion, often lead to ambiguous results and further complicate therapeutic applications of PAR-based research. Together with PAR-2 hetero- and homo-dimerization [12], and probably also transactivation [13], these features lead to the extreme variability of effects observed under different physiological, pathological, and research conditions. *In vitro* or *ex vivo* research in this field allows only limited use of well-defined proteases or APs. Nonetheless, these can help to assign a specific role to the receptor after activation by a given ligand. In an organism where complex systems of interacting proteases and anti-proteases affect virtually all receptors, PARs (namely PAR-2 in the study by Shi *et al*) are exposed to the influence of various proteases, including both activating and inactivating proteases, as well as several different types of protease inhibitors. Moreover, serum-activating and -inactivating proteases can also significantly affect tissue phenotype from the perspective of PAR-2 activation status. Using complex mixtures of tissues or cell culture extracts can more reliably simulate *in vivo* conditions; however, this makes assessing the real composition and individual protease concentrations, and their receptor affinities, problematic under physiological conditions. When combined with complex steric interactions between ligands (both natural, ie proteases, and artificial, APs) and membrane receptors, there is a potential for 'biased' signalling of the PAR-2 or modified downstream signalling interactions in general. Surrogate markers for PAR-2 (eg ERK1, 2 activity, used by Shi *et al*) and other markers of PAR activation usually reflect only one (often the dominant) signalling axis, but do not reflect other potentially co-activated cascades that may potentially modify, or even oppose, the effect of the original stimulus.

### Conclusion

The study by Shi *et al* offers compelling evidence that both stromal and tumour PAR-2 significantly

influence pancreatic tumour growth and lymphatic metastatic potential. However, given the extreme variability in PAR-2 modes of activation, subsequent signalling, and the resulting cellular or secretory phenotype, the role of PAR-2 in pancreatic cancer and other cancers should be viewed as non-uniform and dependent (in large measure) on the individual tumour environment, as well as being very dependent on the experimental model used in the study. Therefore, PAR-2 should be regarded less as a specific pro-carcinogenic/anti-cancer factor and more as an important and complex disease modifier with pharmacokinetic and pharmacodynamic properties that complicate possible therapeutic uses of PAR-2 inhibitors and activators in different diseases.

Zdenek Rohan,<sup>1</sup> Tomas Olejar<sup>2</sup> and Radoslav Matej<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, National Reference Laboratory for Human Prion Diseases, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Membrane Transport Biophysics, No 75, Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, 14220, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Pathology, Third Medical Faculty and Kralovske Vinohrady Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

\*Correspondence to: Associate Professor Radoslav Matej, MD, PhD, Department of Pathology and Molecular Medicine, National Reference Laboratory for Human Prion Diseases, Thomayer Hospital, Videnska 800, 14059 Prague – Krc, Czech Republic.

E-mail: radoslav.matej@ftn.cz

No conflicts of interest were declared.

## Acknowledgments

We wish to thank Tom Secrest, MSc, for English revisions of the manuscript. This study was partly supported by grant IGA MZ NT12094-5/2011 of the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and grant P303/12/1791 of the Grant Agency of the Czech Republic.

## Author contribution statement

All three authors (ZR, TO, and RM) drafted the manuscript and checked its intellectual content.

## References

- Shi K, Queiroz KC, Roelofs JJ, *et al.* Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. *J Pathol* 2014; **234**: 398–409.
- Hu L, Xia L, Zhou H, *et al.* TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKC $\alpha$  and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. *Tumour Biol* 2013; **34**: 2573–2581.
- Han S, Lee CW, Trevino JG, *et al.* Autocrine extra-pancreatic trypsin 3 secretion promotes cell proliferation and survival in esophageal adenocarcinoma. *PLoS One* 2013; **8**: e76667.
- Chang LH, Pan SL, Lai CY, *et al.* Activated PAR-2 regulates pancreatic cancer progression through ILK/HIF- $\alpha$ -induced TGF- $\alpha$  expression and MEK/VEGF-A-mediated angiogenesis. *Am J Pathol* 2013; **183**: 566–575.
- García-López MT, Gutiérrez-Rodríguez M, Herranz R. Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy? *Curr Med Chem* 2010; **17**: 109–128.
- Camerer E, Qazi AA, Duong DN, *et al.* Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 2004; **104**: 397–401.
- Olejar T, Vetvicka D, Zadinova M, *et al.* Dual role of host Par2 in a murine model of spontaneous metastatic B16 melanoma. *Anticancer Res* 2014; **34**: 3511–3515.
- Ramelli G, Fuertes S, Narayan S, *et al.* Protease-activated receptor 2 signalling promotes dendritic cell antigen transport and T-cell activation *in vivo*. *Immunology* 2010; **129**: 20–27.
- Jiang B, Grage-Griebenow E, Csernok E, *et al.* The role of proteinase 3 (PR3) and the protease-activated receptor-2 (PAR-2) pathway in dendritic cell (DC) maturation of human-DC-like monocytes and murine DC. *Clin Exp Rheumatol* 2010; **28**: 56–61.
- van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, *et al.* The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood* 2012; **119**: 924–932.
- Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, *et al.* Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 11832–11836.
- Lin H, Trejo J. Transactivation of the PAR1–PAR2 heterodimer by trombin elicits  $\beta$ -arrestin-mediated endosomal signaling. *J Biol Chem* 2013; **288**: 11203–11215.
- Arora P, Cuevas BD, Russo A, *et al.* Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion. *Oncogene* 2008; **27**: 4434–4445.

### **3.5 Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastnící se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů**

MATEJ, R., et al. The Contribution of Proteinase-Activated Receptors to Intracellular Signaling, Transcellular Transport and Autophagy in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 2015, 12, 2-12.

[IF 2014: 3,8]

# The Contribution of Proteinase-Activated Receptors to Intracellular Signaling, Transcellular Transport and Autophagy in Alzheimer's Disease

Radoslav Matěj<sup>1,2</sup>, Zdeněk Rohan<sup>1</sup>, Karel Holada<sup>3</sup> and Tomáš Olejář<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, Thomayer Hospital, Videnská 800, Prague, 14059, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, Prague, 10000, Czech Republic; <sup>3</sup>Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Studnickova 7, Prague, 128 20, Czech Republic; <sup>4</sup>Department of Membrane Transport Biophysics, No. 75, Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, 14220, Czech Republic



**Abstract:** The etiopathogenesis of Alzheimer's disease is characterized by beta amyloid A $\beta_{(1-42)}$  toxic fragment aggregation and its association with impaired autophagy. In mitochondria, chronic damage due to transport and enzymatic processes together with the production of reactive oxygen species (ROS) are followed by the subsequent accumulation of A $\beta$  in the form of senile plaques and the accumulation of hyperphosphorylated tau protein in intracellular deposits called tangles. Proteinase-activated receptors (PARs), members of the G protein-coupled receptor (GPCR) family, facilitate and modulate the transcellular transport and distribution of a variety of subcellular molecular components to the lysosomal system and, thus, influence their degradation. A review of the data shows that the activation or inhibition of PARs leads to changes in the process of autophagy, which may influence ROS production and A $\beta_{(1-42)}$  degradation in lysosomes and result in AD pathogenesis.

**Keywords:** Amyloid  $\beta$ , Alzheimer's disease, autophagy, protein tau, proteinase-activated receptor, reactive oxygen species.

## 1. ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's disease (AD) is currently the most common neurodegenerative disorder: at least 30% of the population over 85 years in developed countries is affected, and AD is the fourth leading cause of death in the USA [1]. Indeed, the high prevalence of AD represents an important socioeconomic problem related to the aging population in industrialized countries, and 5.4 million people are currently suffering from the disease in the USA alone [2]. AD is characterized by amyloid protein deposits with the extracellular formation of senile (neuritic) amyloid beta (A $\beta$ ) plaques and intracellular tangles containing hyperphosphorylated tau protein [3-5]. In general, AD is associated with neuronal loss, synaptic dysfunction and functional abnormalities of mitochondrial structures [6]. The clinical course of the disease correlates with the temporospatial progression of tau pathology, which is associated with neuronal loss and is the basis for AD staging [7, 8]; however, the extent of A $\beta$  pathology is not as tightly linked to AD progression as is the pathology of tau. Although the etiopathogenesis of AD is still only partially understood, a number of genetic factors [9], such as mutations in the amyloid precursor protein (APP) and presenilin genes (PSEN1 and PSEN2), allelic variants of the apolipoprotein E gene (APOE), sortilin-related receptor 1 (SORCS1) and the clusterin (CLU), complement component receptor 1 (CR1), MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33, TREM2 and EPHA-1 (EPHT) genes have all been linked to AD incidence [10-14].

Additionally, various environmental factors can influence the risk of AD development, including exposure to metals, such as mercury, aluminum, zinc, copper and lead [15], the subject of our previous study [16]. The metabolism of different metals is closely related to mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species (ROS) production and the initiation of apoptotic signaling.

The pathophysiology of familiar and sporadic forms of AD share many similarities: 1) intracellular production and accumulation of toxic A $\beta$  resulting from  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase cleavage of APP, 2) phosphorylation and aggregation of tau protein and 3) impairment of intracellular/axonal transport. Together, these events cause toxic damage to organelles, resulting in an increase in ROS production, which closes a vicious circle through the additional phosphorylation of tau and oxidative damage to organelles. Another important factor in AD is the alternatively spliced variants of the mRNAs of the above-mentioned target proteins related to disease morphology (A $\beta$ , tau), APP generation (presenilins, Apo E, BACE) and lipid metabolism [17, 18]. Because alternative mRNA splicing is considered to play a significant role in genome expression, it is possible that epigenetic regulation during the relatively long evolution of AD could be an important control mechanism [19].

The non-amyloidogenic cleavage of APP by  $\alpha$ -secretase occurs at the plasma membrane. After amyloidogenic cleavage by  $\beta$ -secretase, APP [20], in complex with lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) and adaptor Fe-65, undergoes accelerated endocytosis via clathrin-coated pits and delivery to late endosomes [21, 22]. A $\beta$  is then released to the cytosol, forming stable complexes with TOM-40 and TIM-23, the outer and inner mitochondrial membrane trans-

\*Address correspondence to this author at the Department of Membrane Transport Biophysics, No. 75, Institute of Physiology, Academy of Sciences, 142 20 Prague, Czech Republic; Tel: +420 241 062 424; Fax: +420 241 062 488; E-mail: [tomas.olejar@seznam.cz](mailto:tomas.olejar@seznam.cz)

locase, respectively [23]. However, two major forms of A $\beta$  (40 and 42 amino acids) are generated, and it has been suggested that the longer peptide is more toxic, prone to aggregation, and more readily accumulates into deposits [24, 25]. A $\beta$  production is generally thought to trigger and facilitate tau hyperphosphorylation in AD brains [26], and its association with the microtubule-associated protein tau is, therefore, not surprising [27, 28]. Hyperphosphorylated tau impairs transcellular and axonal organelle transport [29], mainly affecting metabolic pathways in the mitochondria [30], i.e., the Krebs cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS). Transition metals play important roles in AD development: in biological systems, these metals undergo redox cycling reactions and possess the ability to produce reactive radicals, such as superoxide anion radical and nitric oxide [31]. Subsequent oxidative stress resulting in additional mitochondrial DNA (mtDNA), protein and membrane damage is caused by the cyclic pathological loop. Additionally, tau itself may directly influence mitochondrial metabolism: it has been found that the N-terminal-truncated 20-22 kDa fragment of tau localizes to mitochondrial membranes, and its amount correlates with pathological synaptic changes and mitochondrial functional impairment [32]. In addition, a dramatic decrease in OXPHOS has been observed, and adenine nucleotide translocator has been identified as the unique mitochondrial target of the 26-44 tau fragment [33]. It has been proposed that A $\beta$ , acting together with truncated tau, is the cause of abnormal mitochondrial dynamics and defective function, including increased ROS, decreased cytochrome c oxidase, and decreased ATP production, resulting in neuronal damage. Furthermore, nuclear-encoded pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase (KDH) activities are reduced in AD subjects [34, 35], and the relationship between Krebs cycle abnormalities and enhanced ROS production has been connected to cognitive loss in AD as well as in movement disorders such as Huntington's disease [36]. Additionally, reduced cytochrome oxidase activity in AD brain mitochondria [37], together with ATP depletion, reduces non-amyloidogenic APP cleavage [38-40] and facilitates the production of A $\beta$  derivatives by  $\beta$ -secretase (BACE). Free radicals also appear to activate BACE [41], and fibrillar A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> up-regulates BACE expression [42].

The relevance of oxidative damage to AD pathogenesis was demonstrated by the detection of lipid peroxidation products (e.g., 4-hydroxynonenal, isoprostans, malondialdehyde) in brain tissue and cerebrospinal fluid (CSF), with their levels correlating with the clinical evolution of AD [43]. Such lipid peroxidation products can be detected in peripheral blood in the early stages of mild cognitive impairment (MCI) [44] and can distinguish the progression of MCI to clinically developed AD [45]. However, the levels of these products have never been linked to the neuropathological grading of AD. The presence of oxidatively modified proteins ( $\alpha$ -enolase, ATP synthase,  $\beta$ -synuclein) has also been previously reported as being related to the eventual development of AD, but only in animal models [46].

## 2. THE ROLE OF AUTOPHAGY AND LYSOSOMAL DEGRADATION IN ALZHEIMER'S DISEASE AND OTHER NEURODEGENERATION PROCESSES

Autophagy (from the Greek for "self-eating") is a process of intracellular clearance of membranous or molecular com-

ponents by lysosomal degradation. Its relationship to human diseases is currently being widely discussed [47], and impaired or dysfunctional intracellular trafficking related to autophagy is also being considered as an important factor in neurodegenerative disorders, including AD [48]. Autophagy plays a critical role related to ROS modulation and production and the cytoprotective functions of various pathophysiological processes [49], which is particularly true with regard to the maintenance of mitochondrial quality [50]. Autophagy also appears to be an important factor in cellular antioxidant protection in neurodegenerative disorders [51, 52].

For example, in Parkinson's disease, direct defects in the PINK-1/Parkin mitophagic pathway accompanied by oxidative stress and  $\alpha$ -synuclein aggregation are prototypical for impaired mitochondrial function [53, 54]. Autophagy induction has been shown to promote the degradation of  $\alpha$ -synuclein in neuronal cells [55], and the PINK-1 protein interacts with the autophagy-initiating protein beclin-1, thus promoting autophagy [56].

In the early stages of AD in humans, expression of the central autophagy effector beclin 1 (BECN-1) has been found to be decreased in affected brain regions. Impaired autophagy accompanied by the accumulation of  $\beta$ -amyloid under beclin 1-deficient conditions is closely related to the pathogenesis of AD [57, 58], whereas beclin 1 overexpression reduces APP levels in cell lines [59]. In the human SK-N-BE neuroblastoma cell line, toxic monomers of A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> block the formation of the bcl2- beclin 1 complex, which leads to the inhibition of apoptosis and perpetuation of autophagy induction, followed by the accumulation of autophagosomes and the inhibition of final degradation in lysosomes. In contrast, A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> oligomers cause an induction of bcl2- beclin 1 complex formation that favors apoptosis [60].

The induction of autophagy via blockade of mTOR (mammalian target of rapamycin) by rapamycin improves learning deficits and ameliorates  $\beta$ -amyloid and tau protein accumulation in animal AD models [61, 62]. In prion pathology experiments, insoluble misfolded prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) showed co-expression with the autophagosomal marker LC3b, and the inhibition of autophagy by 3-methyladenine led to its increased accumulation in cells, suggesting that autophagy functions as a control mechanism that limits the buildup of misfolded PrP<sup>Sc</sup> [63]. In accordance, autophagy induction by rapamycin in a mouse model of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease delays the onset of symptoms and prevents the brain accumulation of PrP<sup>Sc</sup> [64].

Impaired lysosomal degradation is also considered to be essential to the accumulation of the proteins found in AD, and inadequate acidification associated with mutations in the PSEN1 gene are also suspected [65]. However, some authors have been unable to confirm the evidence that autophagy, acidity and lysosomal functions are reduced in animal AD models lacking presenilins [66].

## 3. PROTEINASE-ACTIVATED RECEPTORS

Proteinase-activated receptors (PARs) are ubiquitous surface molecules that participate in numerous physiological



and pathological processes. PARs belong to a family of seven transmembrane domain G protein-coupled receptors (GPCR; for details, see information in the “G Protein-Coupled Receptor Data Base” at [www.gpcr.org](http://www.gpcr.org)), comprising hundreds of surface receptors activated by a variety of ligands that are involved in different hormonal regulation processes, prostaglandin response, vision (rhodopsin), olfaction and the sense of taste. GPCRs are coupled to heterotrimeric G proteins that cause the activation of different intracellular signaling cascades upon ligand stimulation (see below). Many GPCRs, such as cannabinoid receptors, opioid receptors, and acetylcholine receptors, are expressed directly in the brain. Interestingly, the activity of the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase complex is also modulated by a response to the activation of muscarinic acetylcholine receptors, glutamate receptors, 5-hydroxytryptamine receptors, opioid receptors, and  $\beta$ 2 adrenergic receptors, which are all suspected to play a role in AD [67]. Dysfunction and cytosolic dislocation of GPCR protein kinases (GRKs) 2 and 5 have been identified as a consequence of A $\beta$  accumulation [68], whereas a deficiency in GRK 5 was found to accelerate the accumulation of A $\beta$  in transgenic mice [69].  $\beta$ -arrestins 1 and 2, which are responsible for GPCR inactivation and internalization after phosphorylation by GRKs, regulate  $\gamma$ -secretase activity and the production of A $\beta$  in AD [70, 71]. Thus, GPCRs, together with  $\beta$ -arrestins, have become targets for the potential treatment of AD and other neurodegenerative disorders [72, 73].

PARs are activated by a tethered ligand sequence within the amino terminal region of the molecule, which is made accessible by site-specific proteolysis. PAR activated by thrombin, trypsin or other specific proteolytic enzymes participates in cell and tissue growth and differentiation, regeneration and repair, edema, fibrosis, inflammatory response regulation, blood coagulation, local and systemic effects on blood circulation, neurodegeneration, and malignant transformation [74].

There are four different PARs that respond to activation by specific proteinases. PAR-1 can be activated by thrombin, a complex of coagulation factors TF-VIIa-Xa or Xa, plasmin, activated protein C, MMP-1 and granzyme. Trypsin, tryptase, a complex of coagulation factors TF-Va and TF-VIIa-Xa and TF-VIIa, matriptase, bacterial, fungal, and parasitic frass proteinases can activate PAR-2. PAR-3 can be activated by thrombin, and PAR-4 can be activated by thrombin, trypsin, a complex of coagulation factors TF-VIIa-Xa, plasmin, cathepsin G, certain bacterial proteinases, kallikreins, and matriptase. A soluble, synthesized peptide of the tethered ligand can also activate PAR: SFLLRN for PAR-1, SLIGKV for PAR-2, TFRGAP for PAR-3, and GYGQV for PAR-4 (in humans). An overview of the receptor cleavage sites together with the respective activating and inactivating enzymes is presented in (Table 1).

### 3.1. General Aspects of PAR-Associated Signaling

The signaling cascades initiated by PAR activation are common with other members of the GPCR family. Hence, PARs have been shown, or are implicated, to interact with G-proteins and  $\beta$ -arrestins and to elicit signaling via receptor homodimerization or heterodimerization and even transactivation by members of other membrane-bound receptor fami-

lies. However, despite being members of one of the best described receptor families, the exact molecular mechanisms of PAR-associated signaling and its effects on cell biology remain not well understood.

The detailed mechanisms of G-protein signaling are reviewed elsewhere [75]. For the purposes of this review, we merely state that PARs are associated with  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{12/13}$  proteins, which further inhibit the adenylyl cyclase-cAMP-MAPK pathway (for  $G\alpha_i$ ) or activate the phospholipase C-diacylglycerol/inositol-1,4,5-phosphate-protein kinase C pathway, leading to the release of  $Ca^{2+}$  ions from the endoplasmic reticulum ( $G\alpha_q$ ).  $G\alpha_{12/13}$  acts as an activator of Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), which trigger Rho protein kinase phosphorylation of proteins regulating cell shape and motility.

$\beta$ -arrestins play a double role in GPCR/PAR signaling: they induce GPCR/PAR down regulation by binding to the phosphorylated C-terminus and recruiting adaptor complexes that mediate clathrin-dependent receptor internalization or are able to recruit other molecules such as ERK1/2, MAPK or JNK3 and elicit signaling independent of G-proteins [76]. However, thus far,  $\beta$ -arrestin endosome-associated signaling has been demonstrated only for PAR-2 [77]. The desensitization and downregulation of PARs is mainly mediated via C-terminus phosphorylation by PKA, PKC and G-protein-associated kinases (GRKs). Phosphorylation of the PAR C-terminus significantly increases its affinity toward  $\beta$ -arrestins, which can either elicit signaling or induce PAR internalization into the endolysosomal compartment [78, 79].

The aspects of GPCR/PAR signaling mediated by either G-proteins or  $\beta$ -arrestins is, however, more complex, which may be due to the existence of various active conformations of a particular GPCR/PAR and also to its interaction with other cytoplasmic membrane-bound molecules and macromolecular complexes. This situation influences the subsequent signaling cascades, and the receptor is, thus, “biased” toward a particular signaling axis [80]. For PARs, this is best illustrated by PAR-1: activation by thrombin induces  $G\alpha_{12/13}$  signaling, leading to the prothrombotic phenotype of endothelial cells, whereas activation by APC leads to assembly of the PAR-1-EPCR-caveolin complex, which preferentially triggers the  $G\alpha_i$  signaling axis and exerts an antithrombotic phenotype on endothelial cells [81-84].

Knowledge about PAR homo- or heterodimerization is still rather limited. However, it has been shown that the PAR-1-PAR-4 interaction potentiates the effect of thrombin on platelets [85] and that activated PAR-1-tethered ligand can bind to PAR-2 and activate signaling [86]. The extreme variability of PAR signaling is also potentiated by the possible transactivation of PARs by other receptors, such as tyrosine-kinase receptors including EGFR, HGFR or VEGFR. This can represent one of the possible mechanisms of PAR-mediated effects in various types of cancers as well as neurodegenerative diseases [87].

After the site-specific proteolysis of PARs, intracellular processes occur, including  $Ca^{2+}$  mobilization, PKC and MAP kinase activation, accompanied by internalization, and intracellular sorting, resulting in cell shape changes, adhesion, secretion, growth or motility. PAR activation causes

**Table 1. Summarized overview of PAR-1 - 4 cleavage sites in common species (h - human, r - rat, m - mouse), activating proteinases, G coupling, and inactivation. For details, see body text.**

	Cleavage Site	Activating Proteinases	G Protein Coupling	Inactivation
PAR1	R <sub>41</sub> ! S <sub>42</sub> FLLRN (h) R <sub>41</sub> ! S <sub>42</sub> FLLRN (r,m)	Thrombin, TF-VIIa-Xa complex or Xa, aPC/ EPCR, Trypsin, Plasmin, MMP-1, Granzyme A	G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>12/13</sub>	phosphorylation (GRKs), beta arrestins, internalisation
PAR2	R <sub>36</sub> ! S <sub>37</sub> LIGKV (h) R <sub>36</sub> ! S <sub>37</sub> LIGRL (r) R <sub>34</sub> ! S <sub>35</sub> LIGRL (m)	Trypsin, Trypsin, TF-VIIa complex or TF-VIIa-Xa complex, MT-SP1, Kallikreins, Granzyme A	G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>12/13</sub> , beta arrestins	phosphorylation (GRKs), beta arrestins
PAR3	K <sub>38</sub> ! T <sub>39</sub> FRGAP (h) K <sub>37</sub> ! S <sub>38</sub> FNGGP (m)	Thrombin	G <sub>q</sub>	?
PAR4	R <sub>47</sub> ! G <sub>48</sub> YPGQV (h) R <sub>58</sub> ! G <sub>59</sub> FPGKP (r) R <sub>59</sub> ! G <sub>60</sub> YPGKF (m)	Thrombin, Trypsin, VIIa-Xa complex, Plasmin, Cathepsin G, Kallikreins	G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub>	internalisation

Abbreviations: ! - cleavage site, VIIa - activated coagulation factor VII, Xa - activated coagulation factor X, TF - tissue factor, MT-SP1 - Membrane-Type Serine Protease 1, GRKs - G protein-coupled receptor protein kinase, MMP-1 - matrix metalloproteinase-1, aPC-EPCR - activated Protein C/ endothelial protein C receptor.

not only an enhancement of different intracellular mechanisms linked to G-protein and  $\beta$ -arrestins but also appears to have a role in non-specific enhancement in the membrane internalization, sorting and transcellular transport or degradation of different extracellular and membrane components [88]. Despite their similarity, individual PARs undergo different routes of internalization, utilizing different membrane enzymatic systems. Uncleaved PAR-1 undergoes recycling dependent on adaptor protein complex 2, and cleaved phosphorylated and ubiquitinated PAR-1 [89] is rapidly degraded in lysosomes ( $t_{1/2} = 1$  h) [90]. In contrast, PAR-2 requires dynamin-dependent coupling with  $\beta$ -arrestins before sorting to lysosomes ( $t_{1/2} = 3$  h) [91] and does not undergo recycling.  $\beta$ -arrestins mediate activated PAR-2 internalization, promoting signaling from endocytic vesicles, and activated PAR-2 is modified with ubiquitin, which facilitates its lysosomal degradation. The internalization of both receptors begins and occurs via dynamin-dependent clathrin-coated pits (Fig. 1). The recycling of PAR-1 but not PAR-2 may explain their different neuroprotective and neurotoxic behaviors in AD pathology (see below).

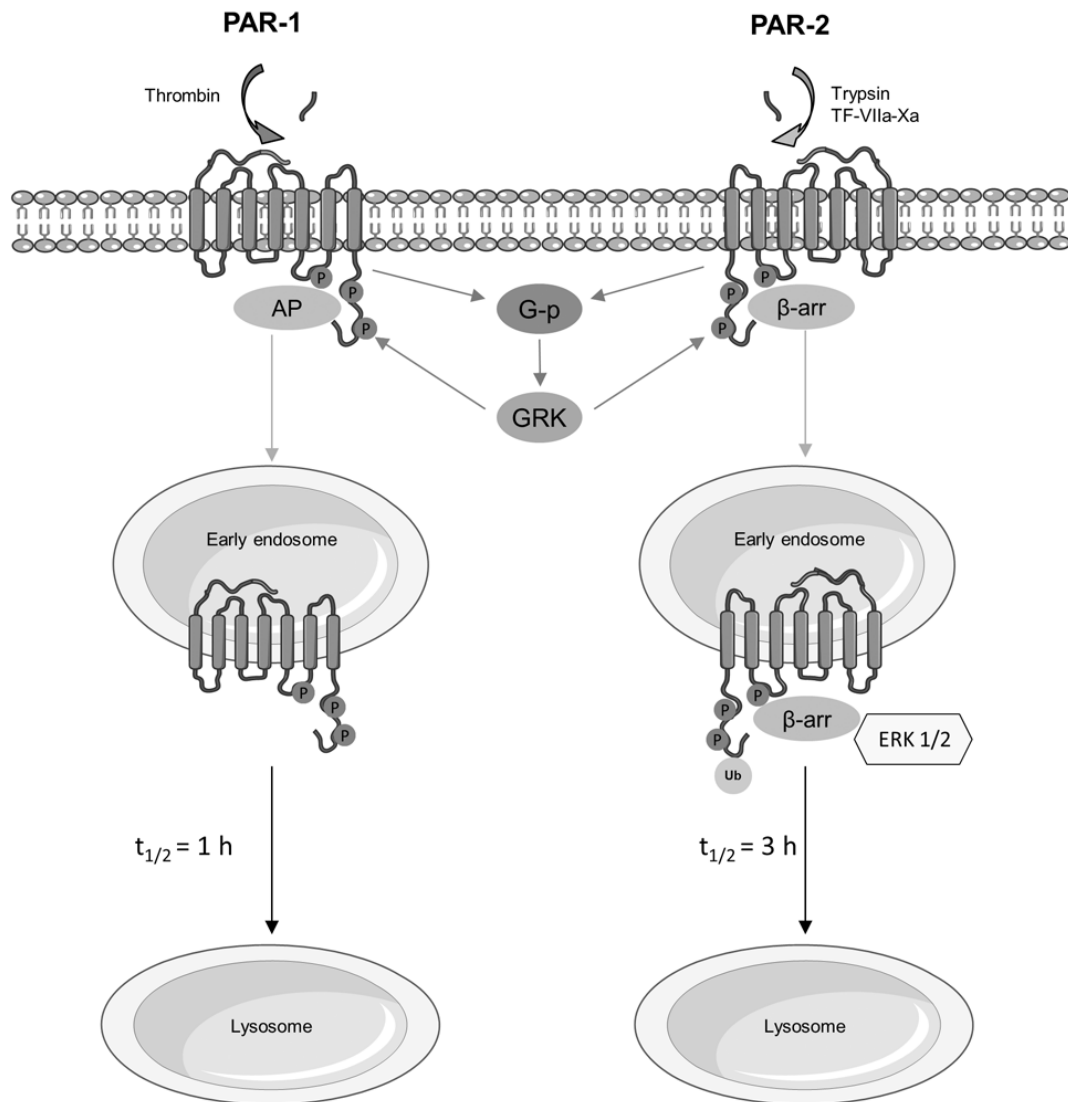
### 3.2. PARs, ROS Production and Inflammation

The role of PARs in relationship to ROS production has been largely investigated in association with inflammation and inflammatory cells. For example, PAR-2 activation by trypsin induces the release of eosinophil superoxide anions, whereas thrombin acting on PAR-1, 3 and 4, shows minimal effects [92]. In endothelial cells, PAR activation was found to be directly related to mitochondrial ROS signaling, sharing ERK-1/2 and p38 MAPK pathways [93]. Thrombin was also shown to induce pulmonary vasoconstriction via PAR-1 activation and ROS production [94], and stimulation of PAR-2 on murine lymphocytes induces adhesion and ROS production [95]. Additionally, proteinases in neutrophils induce superoxide generation in parallel with the production of IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ , suggesting a role for PARs in the exacerbation of bronchial asthma [96].

However, it has been shown that controlled PAR-2 activation potentiates the anti-inflammatory, anti-oxidative and protective effects of S100A8 in a mouse model of LPS-induced endotoxemia, leading to an improvement in the survival of the investigated animals [97]. Similarly, a PAR-2 agonistic peptide also increases Mn-superoxide dismutase in the rat heart after ischemia-reperfusion injury [98], and PAR-2 deficiency has been shown to reduce cardiac ischemia/reperfusion injury [99] and prolong survival in prion-infected mice [100].

### 3.3. Relationship Between Autophagy and PARs

The autophagosomal membrane originates from different sources, including the mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and plasma membrane-derived endosomes. At the plasma membrane, the autophagy-related proteins ATG9 and ATG16L1 co-localize with clathrin-coated pits and are trafficked to pre-autophagic structures [101]. An analysis of the part of the autophagosomal membrane that originates from and contains elements of the plasma membrane [102] suggests that PARs could be involved in the pathogenesis of AD and the respective pathogenic protein processing. Considering PARs as non-specific enhancers of different cellular processes leads us to question whether their activation or inactivation either positively or negatively affects amyloidogenic or non-amyloidogenic cleavage, internalization and intracellular sorting of APP/ A $\beta$  (see Fig. 2). It has been shown that the modulation of PAR-2 regulates autophagy through mTOR signaling in hepatocellular carcinoma [103]. This observation is in compliance with our preliminary unpublished data showing slightly increased amounts of phosphatidylethanolamine-conjugated fragments of LC3b after subacute and chronic treatment with trypsin in SH-SY5Y neuroblastoma cells, suggesting a general role for PARs in autophagic flux, even in intracellular neuronal turnaround and degradation. Furthermore, different enzymatic mechanisms accompanying the internalization of PAR-1 and PAR-2 may explain the different modes of action of proteinases in AD.



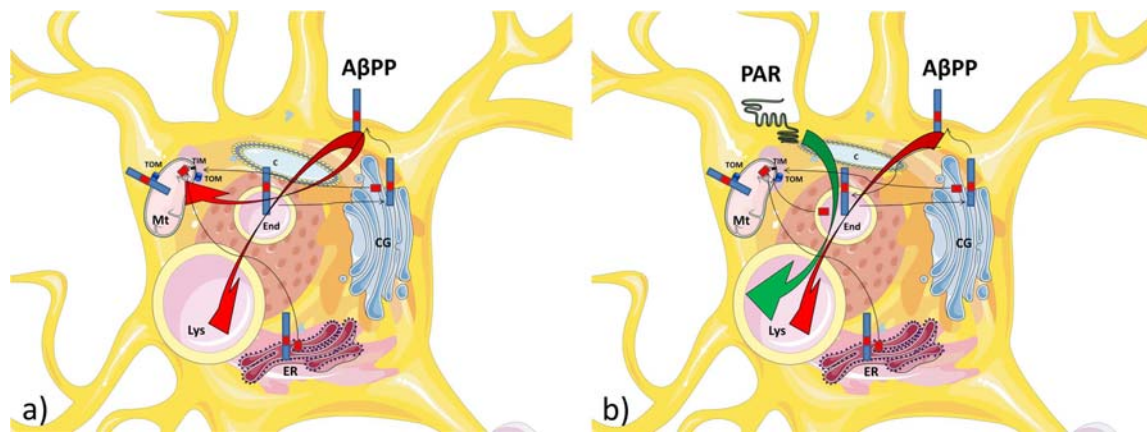
**Fig. (1).** Simplified diagram of PAR-associated signaling. After the site-specific cleavage of PAR, either canonical G-proteins (G-p) utilizing adaptor protein (AP) or non-canonical  $\beta$ -arrestin ( $\beta$ -arr)/extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)-associated signaling occurs. PAR desensitization and downregulation is mediated by G-protein-associated kinases (GRK) and  $\beta$ -arrestin binding. PARs are further modified in early endosomes, e.g. they are ubiquitinated (Ub) prior to degradation in lysosomes. For details, see the main text. The figure was generated using Servier Powerpoint image bank: [www.servier.com](http://www.servier.com)

### 3.4. The Role of PARs in Neurodegeneration

In the brain, PARs have been shown to promote both protective and toxic effects. PARs have an important role in the survival and death of brain cells in different models of neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, HIV infection and multiple sclerosis [104,105]. The different proteinases that can activate PARs (thrombin, trypsin, mast cell tryptase, FVIIa, FXa) can leak through the blood-brain barrier during various pathological events (traumatic brain injury, inflammation, irradiation, intoxication) [106-110]. In addition, thrombin, trypsin and trypsin-like proteinases are commonly expressed in the brain and play important roles in neural development, plasticity, neurodegeneration and neuroregeneration [111]. Several specific PAR inhibitors have been described to date, and their use in the treatment of various CNS disorders is being contemplated [112, 113]. Although the involvement of PARs in oxidative

damage to the brain during neurodegeneration has not been studied, PAR activation was reported in relationship to increased ROS production in other, non-CNS, locations [114, 115]. However, physiologically, general GPCR activation, which results in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and subsequently in NADPH oxidase-independent mitochondrial ROS production, does not alter mitochondrial function or trigger cell death [116]. Rather, mitochondrial ROS demonstrate their role as a downstream molecule that translates receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signals into proinflammatory signals.

Within the context of neurodegenerative diseases, Suo *et al.* demonstrated that thrombin can induce tau aggregation via PAR-1 and PAR-4 signaling; PAR-4 activation appears to be more harmful because it leads to the prolonged activation of the p44/42 MAPK pathway, which is thought to be at least partly responsible for tau aggregation [117]. These authors have also shown that PAR-4 activation may lead to



**Fig. (2).** Shared transcellular sorting pathways of A $\beta$ / A $\beta$ PP and PARs. A $\beta$  (red bar) can migrate among organelles (black arrows), but once inside the mitochondria (Mt), it forms stable toxic complexes with TIM and TOM (part a). The parallel transcellular transport of activated PARs (see ref. [89,90]) may facilitate the sorting of A $\beta$ /A $\beta$ PP (green arrow) directly to lysosomes for degradation (part b). This may help to limit the pool of A $\beta$ PP at the plasma membrane. Both molecules share the same pathway of internalization via clathrin-coated pits (C) and early endosomes (End) to lysosomes (Lys). In addition, the regulation of autophagy by PAR-2 [103] likely utilizes the same parallel clearance pathway of PARs and A $\beta$ /A $\beta$ PP. These possible pathways of enhanced A $\beta$  clearance could be a mechanism for reducing/increasing ROS formation in neurons and subsequently the development of AD. The figure was generated using Servier PowerPoint image bank: [www.servier.com](http://www.servier.com).

the release of potentially neurotoxic TNF- $\alpha$  [118]. Afkhami-Goli *et al.* studied the role of PAR-2 in AD and observed a decrease in PAR-2 mRNA levels in the cortical neurons of AD brains. According to their results, the dual effect of PAR-2 is influenced by the cell type on which it is expressed. Neurodegeneration was found to be mediated through the production of proinflammatory cytokines such as IL-8 by microglia or the suppression of anti-inflammatory cytokines such as IL-4 in astrocytes. In contrast, neuronal PAR-2 activation appeared to be neuroprotective, as PAR-2 knockout (KO) mice were more susceptible to A $\beta$ <sub>(1-42)</sub>-induced toxicity than wild-type (WT) mice, and this protective effect was thought to be mediated by the PAR-2-dependent induction of chaperones that protect the cell from endoplasmic reticulum (ER) stress [119]. Noorbakhsh *et al.* suggested that PAR-2 is a harmful agent in multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In their study, they showed that enhanced PAR-2 expression on macrophages in CNS white matter was responsible for a more severe disease course. Reciprocally, PAR-2 deficiency in PAR-2 KO mice was shown to be neuroprotective in EAE, which supports an alternative view of MS pathogenesis that involves the possibility of macrophage-released proinflammatory cytokine-mediated oligodendrocyte death in the absence of lymphocytes [120].

Wang *et al.* showed that the PAR-1-, PAR-2- and PAR-4-mediated release of chemokine cytokine-induced neutrophil chemo-attractants (CINC) 1 and 3 from rat astrocytes could protect cortical neurons from C2-ceramide-induced neuron apoptosis [121-124].

In addition, Lee *et al.* demonstrated that  $\alpha$ -synuclein-induced microglial activation leads to an increase in matrix metalloproteinases (MMPs), together with an increase in TNF- $\alpha$ , IL-1b and in iNOS activity and ROS generation. Moreover, MMP inhibitors also suppress nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)/AP-1 and MAPK activity, and a similar

effect was produced by the inhibition of PAR-1 by PAR-1-antagonist peptide or cathepsin G, which generally inhibits PAR-1, -2 and -3. Moreover, Lee *et al.* also observed that cathepsin G induced the inhibition of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression, nitric oxide generation and expression of MMP mRNA to a greater extent than did selective PAR-1 inhibition by a peptide [125]. In a rat model of PD, the increased expression of PAR-2 in the substantia nigra was recorded, and PAR-2 inhibition led to reduced  $\alpha$ -synuclein production and NF- $\kappa$ B phosphorylation. The levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression were also decreased in the substantia nigra after the abolition of PAR-2 signaling [126].

Considering AD as a “low-grade systemic inflammatory disturbance” joins NF- $\kappa$ B with acetylcholine deficiency and PARs [127]. The cholinergic hypothesis assumes the loss of cholinergic neurons in the basal forebrain that provide cholinergic input to the cortex and hippocampus [128,129], whereas cholinergic vagus nerve signaling inhibits the systemic production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- $\alpha$  in macrophages through selective  $\alpha_7$  nicotinic acetylcholine receptors [130]. These cytokines are increased in the systemic fluids of AD patients and can be used as markers for inflammatory AD activity [131,132]. NF- $\kappa$ B participates in the expression of these genes, as do IL-6 and APP in glia and neurons [133]. The loss of cholinergic input from the hippocampus increases interactions between protein kinase A and NF- $\kappa$ B, leading to the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B [134] and strongly suggesting its involvement as an inflammatory component in AD. PARs increase pro-inflammatory cytokine production via prostaglandins in the acute phase after cyclooxygenase 2 (COX-2) gene up-regulation [135], which also involves the NF- $\kappa$ B pathway. The stimulation of both PAR-1 and PAR-2 leads to NF- $\kappa$ B nuclear translocation and COX-2 protein production. However, only PAR-1 stimulation causes acute-phase prostaglandin synthesis, whereas PAR-2 stimulated synthesis is detectable only later after 2-4 h. Additionally, NF- $\kappa$ B-adenovirus

luciferase activity after PAR-2 stimulation was not as high as after PAR-1 stimulation [136]. This difference most likely also contributes to the observed differences in the pro- and anti-inflammatory and/or neurodegenerative and neuroprotective behavior exhibited by PARs. Nonetheless, only PAR-2 is regulated by IL-1 and TNF- $\alpha$ , involving NF- $\kappa$ B [137]. Taken together, the above data suggest that cholinergic blockade of NF- $\kappa$ B may represent a method of anti-inflammatory action against PAR stimulation.

Although the importance of PARs in neuronal and astrocytic cells has been demonstrated, their involvement in oligodendrocyte physiology is less understood, despite their crucial role in maintaining a functional neuroglial network [138-140]. A study by Burda *et al.* showed that oligodendrocyte PAR-1 activation by kallikrein 6 led to an alteration in oligodendrocyte maturation, loss of myelin basic protein and subsequently to myelopathy in mice [141], suggesting that PAR signaling may also play an important role in these cells.

#### 4. PERSPECTIVES

It is obvious that PARs and A $\beta$  share similar mechanisms and pathways, such as internalization via clathrin-coated pits with physiological termination in lysosomes. In sporadic AD and Down's syndrome, endocytic pathway alteration is present and precedes A $\beta$  deposit formation, suggesting the involvement of the endosomal-lysosomal system in different types of neuronal toxicity [142]. Neurotoxic thrombin has been found in amyloid plaques, and higher production has been observed in brain endothelial cells from AD patients [143] during conditions of oxidative stress. It is proposed that thrombin, via PAR-1 activation, exacerbates brain damage at high concentrations, whereas low concentrations of thrombin can rescue neural cells from death after brain insults [144,145]. PAR-2 in AD exerts neuroprotective effects on neurons, but the activation of PAR-2 in glia is neurotoxic via the secretion of neurotoxic factors and also contributes to A $\beta$ -mediated neurodegeneration [119]. Other studies have confirmed the suppressed expression of this receptor in neurons of AD patients. Thus, the modulation of PAR activity represents a potential pharmacologic strategy for the treatment of neurodegenerative diseases. For example, in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), mutations in superoxide dismutase (SOD) in familial cases leads to its misfolding and cell toxicity [146]. In mice bearing mutated SOD-1, activated protein C signaling on PAR-1 was found to inhibit the synthesis of SOD and delay the progression of the disease [147].

#### CONCLUSION

The role of PARs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases is only lately being discovered, and several levels of research are needed to comprehend fully the role of PARs in these diseases. First, different types of PARs (PAR-1-PAR-4) exert different effects on different cell types in the brain after activation or inactivation and can influence each other. Second, the characterization of brain-specific proteinases that preferentially activate each type of PAR in the absence of blood-brain barrier damage is also a crucial prerequisite for understanding PAR physiology and pathophysiology in the brain. PARs, which are members of the GPCR

group of membrane-bound receptors, can be found associated with both the cell membrane and intracellular compartment membranes. In both cases, GPCRs (thus, PARs) have been shown to use second messengers as their signaling mechanism. The intricacy of G-protein and  $\beta$ -arrestin signaling, receptor functional selectivity and most likely even PAR dimerization and interaction with members of different receptors families vastly increases the complexity of PAR-related effects on cell metabolism and function, and their ubiquitous expression in the brain combined with contemporary research results suggest that PARs are rather non-specific modulators of neurodegenerative processes. PARs share common degradation pathways with A $\beta$ , which creates an interconnection between A $\beta$ , PARs and tau pathology in AD. The newly described PAR-2 regulation of autophagy and the involvement of NF- $\kappa$ B in PAR-mediated intracellular signaling brings attention to these possibly promising mechanisms for therapeutic targeting.

PAR inhibitors have been used as therapeutic agents for thrombotic disease in several trials, and the use of PAR-specific inhibitors or activators may offer new pharmacologic approaches for the future treatment neurodegenerative diseases. However, to determine the viability of this approach, additional, intensive research in the field of PARs and related molecules is needed.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by the research project RVO67985823 and grants IGA NT12094-5 from Grant Agency of Ministry of Health and P303/12/1791 from Grant Agency of the Czech Republic.

#### REFERENCES

- [1] Fratiglioni L. Epidemiology of Alzheimer's disease and current possibilities for prevention. *Acta Neurol Scand Suppl* 165: 33-40 (1996).
- [2] Alzheimer's Association, Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 7: 208-44 (2011).
- [3] Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW *et al.* National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol* 123(1): 1-11 (2012).
- [4] LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8(7): 499-509 (2007).
- [5] Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000): 631-9 (2004).
- [6] LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11(4): 170-6 (2005).
- [7] Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, *et al.* National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 8(1): 1-13 (2012).
- [8] Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112(4): 389-404 (2006).
- [9] Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurol Clin* 25: 611-67 (2007).
- [10] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid

- precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349(6311): 704-6 (1991).
- [11] Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, *et al.* Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43(5): 429-35 (2011).
- [12] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41(10): 1088-93 (2009).
- [13] Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogava E, Majounie E, *et al.* Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368(2): 117-27 (2013).
- [14] Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, *et al.* Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368(2): 107-16 (2013).
- [15] Bush AI. Copper, zinc, and the metallobiology of Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 17: 147-50 (2003).
- [16] Rusina R, Matěj R, Kašparová L, Kukul J, Urban P. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data transformation. *Neurotox Res* 20(4): 329-33 (2011).
- [17] Mills JD, Nalpathamkalam T, Jacobs HI, Janitz C, Merico D, Hu P, *et al.* RNA-Seq analysis of the parietal cortex in Alzheimer's disease reveals alternatively spliced isoforms related to lipid metabolism. *Neurosci Lett* 536: 90-5 (2013).
- [18] Mills JD, Janitz M. Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 33(5): 1012.e11-24 (2012).
- [19] Barbash S, Soreq H. Threshold-independent meta-analysis of Alzheimer's disease transcriptomes shows progressive changes in hippocampal functions, epigenetics and microRNA regulation. *Curr Alzheimer Res* 9(4): 425-35 (2012).
- [20] Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440): 735-41 (1999).
- [21] Ulery PG, Beers J, Mikhaillenko I, Tanzi RE, Rebeck GW, Hyman BT, *et al.* Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275(10): 7410-5 (2000).
- [22] Bu G, Cam J, Zerbinatti C. LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1086: 35-53 (2006).
- [23] Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26(35): 9057-68 (2006).
- [24] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362(4): 329-44 (2010).
- [25] Reddy PH, Manczak M, Mao P, Calkins MJ, Reddy AP, Shirendeb U. Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J Alzheimers Dis* 20(2): S499-512 (2010).
- [26] LaFerla FM. Pathways linking Abeta and tau pathologies. *Biochem Soc Trans* 38(4): 993-5 (2010).
- [27] Fein JA, Sokolow S, Miller CA, Vinters HV, Yang F, Cole GM, *et al.* Co-localization of amyloid beta and tau pathology in Alzheimer's disease synaptosomes. *Am J Pathol* 172(6): 1683-92 (2008).
- [28] Takahashi RH, Capetillo-Zarate E, Lin MT, Milner TA, Gouras GK. Co-occurrence of Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid and  $\tau$  pathologies at synapses. *Neurobiol Aging* 31(7): 1145-52 (2010).
- [29] Reddy PH. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1415: 136-48 (2011).
- [30] Swerdlow RH. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1812(12): 1630-9 (2011).
- [31] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283(2-3): 65-87 (2011).
- [32] Amadoro G, Corsetti V, Atlante A, Florenzano F, Capsoni S, Busani R, *et al.* Interaction between NH(2)-tau fragment and A $\beta$  in Alzheimer's disease mitochondria contributes to the synaptic deterioration. *Neurobiol Aging* 33(4): 833.e1-833.e25 (2012).
- [33] Atlante A, Amadoro G, Bobba A, de Bari L, Corsetti V, Pappalardo G, *et al.* A peptide containing residues 26-44 of tau protein impairs mitochondrial oxidative phosphorylation acting at the level of the adenine nucleotide translocator. *Biochim Biophys Acta* 1777(10): 1289-300 (2008).
- [34] Gibson GE, Blass JP, Beal MF, Bunik V. The alpha-ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31(1-3): 43-63 (2005).
- [35] Gibson GE, Sheu KF, Blass JP. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm* 105(8-9): 855-70 (1998).
- [36] Gibson GE, Starkov A, Blass JP, Ratan RR, Beal MF. Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802(1): 122-34 (2010).
- [37] Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, *et al.* Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 59(2): 776-9 (1992).
- [38] Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem* 269(18): 13623-8 (1994).
- [39] Gasparini L, Benussi L, Bianchetti A, Binetti G, Curti D, Govoni S, *et al.* Energy metabolism inhibition impairs amyloid precursor protein secretion from Alzheimer's fibroblasts. *Neurosci Lett* 263(2-3): 197-200 (1999).
- [40] Webster MT, Pearce BR, Bowen DM, Francis PT. The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells. *J Neural Transm* 105(8-9): 839-53 (1998).
- [41] Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, *et al.* Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 10(3): 279-88 (2002).
- [42] Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M. The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med* 41(2): 202-12 (2006).
- [43] Kester MI, Scheffer PG, Koel-Simmeling MJ, Twaalfhoven H, Verwey NA, Veerhuis R, *et al.* Serial CSF sampling in Alzheimer's disease: specific versus non-specific markers. *Neurobiol Aging* 33(8): 1591-8 (2011).
- [44] Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, *et al.* Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26(1): 59-68 (2011).
- [45] López N, Tormo C, De Blas I, Linares I, Alom J. Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity. *J Alzheimers Dis* 33(3): 823-9 (2013).
- [46] Sultana R, Robinson RA, Di Domenico F, Abdul HM, St Clair DK, Markesbery WR, *et al.* Proteomic identification of specifically carbonylated brain proteins in APP(NLh)/APP(NLh)  $\times$  PS-1(P264L)/PS-1(P264L) human double mutant knock-in mice model of Alzheimer disease as a function of age. *J Proteomics* 74(11): 2430-40 (2011).
- [47] Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res* 24(1): 69-79 (2014).
- [48] Wang X, Huang T, Bu G, Xu H. Dysregulation of protein trafficking in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 9(1): 31 (2014).
- [49] Wen X, Wu J, Wang F, Liu B, Huang C, Wei Y. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radic Biol Med* 65: 402-10 (2013).
- [50] Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic Biol Med* 63: 207-21 (2013).
- [51] Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biol* 2: 82-90 (2013).
- [52] Meng Y, Yong Y, Yang G, Ding H, Fan Z, Tang Y, *et al.* Autophagy alleviates neurodegeneration caused by mild impairment of oxidative metabolism. *J Neurochem* 126(6): 805-18 (2013).
- [53] Rochet JC, Hay BA, Guo M. Molecular insights into Parkinson's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107: 125-88 (2012).



- [54] Valente EM, Arena G, Torosantucci L, Gelmetti V. Molecular pathways in sporadic PD. *Parkinsonism Relat Disord* 18(1): S71-3 (2012).
- [55] Lu JH, Tan JQ, Durairajan SS, Liu LF, Zhang ZH, Ma L, *et al.* Isorhynchophylline, a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein in neuronal cells via inducing autophagy. *Autophagy* 8(1): 98-108 (2012).
- [56] Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, Lombardi F, Romano F, Marongiu R, *et al.* The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ* 17(6): 962-74 (2010).
- [57] Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118(6): 2190-9 (2008).
- [58] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, Ojala J, Haapasalo A, Soininen H, *et al.* Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Prog Neurobiol* 106-107: 33-54 (2013).
- [59] Jaeger PA, Pickford F, Sun CH, Lucin KM, Masliah E, Wyss-Coray T. Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One* 5(6): e11102 (2010).
- [60] Guglielmotto M, Monteleone D, Piras A, Valsecchi V, Tropiano M, Ariano S, *et al.* A $\beta$ 1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy* 10(10): (2014).
- [61] Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem* 285(17): 13107-20 (2010).
- [62] Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5(4): e9979 (2010).
- [63] Cortes CJ, Qin K, Norstrom EM, Green WN, Bindokas VP, Mastrianni JA. Early Delivery of Misfolded PrP from ER to Lysosomes by Autophagy. *Int J Cell Biol* 2013: 560421 (2013).
- [64] Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA. Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *J Neurosci* 32(36): 12396-405 (2012).
- [65] Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, *et al.* Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141(7): 1146-58 (2010).
- [66] Zhang X, Garbett K, Veeraraghavalu K, Wilburn B, Gilmore R, Mirmics K, *et al.* A role for presenilins in autophagy revisited: normal acidification of lysosomes in cells lacking PSEN1 and PSEN2. *J Neurosci* 32(25): 8633-48 (2012).
- [67] Thathiah A, De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12(2): 73-87 (2011).
- [68] Suo WZ, Li L. Dysfunction of G protein-coupled receptor kinases in Alzheimer's disease. *ScientificWorld Journal* 10: 1667-78 (2010).
- [69] Cheng S, Li L, He S, Liu J, Sun Y, He M, *et al.* GRK5 deficiency accelerates {beta}-amyloid accumulation in Tg2576 mice via impaired cholinergic activity. *J Biol Chem* 285(53): 41541-8 (2010).
- [70] Thathiah A, Horr  K, Snellinx A, Vandeweyer E, Huang Y, Ciesielska M, *et al.*  $\beta$ -arrestin 2 regulates A $\beta$  generation and  $\gamma$ -secretase activity in Alzheimer's disease. *Nat Med* 19(1): 43-9 (2013).
- [71] Liu X, Zhao X, Zeng X, Bossers K, Swaab DF, Zhao J, *et al.*  $\beta$ -arrestin 1 regulates  $\gamma$ -secretase complex assembly and modulates amyloid- $\beta$  pathology. *Cell Res* 23(3): 351-65 (2013).
- [72] Nickols HH, Conn PJ. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Dis* 61: 55-71 (2014).
- [73] Jiang T, Yu JT, Tan MS, Zhu XC, Tan L.  $\beta$ -Arrestins as potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 48(3): 812-8 (2013).
- [74] Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, *et al.* Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther* 130(3): 248-82 (2011).
- [75] Tomankova H, Myslivecek J. Mechanisms of G protein-coupled receptors regulation. *Neuro Endocrinol Lett* 32(5): 607-15 (2011).
- [76] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69: 483-510 (2007).
- [77] Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal* 11: 86 (2013).
- [78] DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, D ry O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148(6): 1267-81 (2000).
- [79] Chen CH, Paing MM, Trejo J. Termination of protease-activated receptor-1 signaling by beta-arrestins is independent of receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 279(11): 10020-31 (2004).
- [80] Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 9(5): 373-86 (2010).
- [81] Feistritzer C, Schuepbach RA, Mosnier LO, Bush LA, Di Cera E, Griffin JH, *et al.* Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem* 281(29): 20077-84 (2006).
- [82] Russo A, Soh UJ, Trejo J. Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Mol Interv* 9(2): 87-96 (2009).
- [83] Russo A, Soh UJ, Paing MM, Arora P, Trejo J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(15): 6393-7 (2009).
- [84] Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 67 (2014).
- [85] Arachiche A, Mumaw MM, de la Fuente M, Nieman MT. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by  $\alpha$  thrombin. *J Biol Chem* 288(45): 32553-62 (2013).
- [86] O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, *et al.* Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem* 275(18): 13502-9 (2000).
- [87] Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal* 11: 86 (2013).
- [88] Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 160: 191-203 (2010).
- [89] Trejo J, Altschuler Y, Fu HW, Mostov KE, Coughlin SR. Protease-activated receptor-1 down-regulation: a mutant HeLa cell line suggests novel requirements for PAR1 phosphorylation and recruitment to clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275(40): 31255-65 (2000).
- [90] Trejo J, Hammes SR, Coughlin SR. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13698-702 (1998).
- [91] Roosterman D, Schmidlin F, Bunnett NW. Rab5a and rab11a mediate agonist-induced trafficking of protease-activated receptor 2. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(5): C1319-29 (2003).
- [92] Miike S, McWilliam AS, Kita H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167(11): 6615-22 (2001).
- [93] Banfi C, Brioschi M, Barbieri SS, Eligini S, Barcella S, Tremoli E, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species: a common pathway for PAR1- and PAR2-mediated tissue factor induction in human endothelial cells. *J Thromb Haemost* 7(1): 206-16 (2009).
- [94] Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H, Hirano K. Involvement of reactive oxygen species in thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 182(11): 1435-44 (2010).
- [95] Lim SY, Tennant GM, Kennedy S, Wainwright CL, Kane KA. Activation of mouse protease-activated receptor-2 induces lymphocyte adhesion and generation of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* 149(5): 591-9 (2006).
- [96] Hiraguchi Y, Nagao M, Hosoki K, Tokuda R, Fujisawa T. Neutrophil Proteases Activate Eosinophil Function *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 146 Suppl 1: 16-21 (2008).



- [97] Sun Y, Lu Y, Engeland CG, Gordon SC, Sroussi HY. The anti-oxidative, anti-inflammatory, and protective effect of S100A8 in endotoxemic mice. *Mol Immunol* 53(4): 443-9 (2013).
- [98] Napoli C, Cicala C, Wallace JL, de Nigris F, Santagada V, Caliendo G, *et al.* Protease-activated receptor-2 modulates myocardial ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7): 3678-83 (2000).
- [99] Antoniak S, Rojas M, Spring D, Bullard TA, Verrier ED, Blaxall BC, *et al.* Protease-activated receptor 2 deficiency reduces cardiac ischemia/ reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(11): 2136-42 (2010).
- [100] Matej R, Olejar T, Janouskova O, Holada K. Deletion of protease-activated receptor 2 prolongs survival of scrapie-inoculated mice. *J Gen Virol* 93(Pt 9): 2057-61 (2012).
- [101] Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 10(1): 182-4 (2014).
- [102] Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res* 24(1): 58-68 (2014).
- [103] Chen KD, Wang CC, Tsai MC, Wu CH, Yang HJ, Chen LY, *et al.* Interconnections between autophagy and the coagulation cascade in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 5: e1244 (2014).
- [104] Luo W, Wang Y, Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev* 56: 331-45 (2007).
- [105] Noorbakhsh F, Vergnolle N, McArthur JC, Silva C, Vodjgani M, Andrade-Gordon P, *et al.* Proteinase-activated receptor-2 induction by neuroinflammation prevents neuronal death during HIV infection. *J Immunol* 174(11): 7320-9 (2005).
- [106] de Garavilla L, Vergnolle N, Young SH, Ennes H, Steinhoff M, Ossovskaya VS, *et al.* Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by aneurogenic mechanism. *J Pharmacol* 133(7): 975-87 (2001).
- [107] Olejar T, Matej R, Zadinova M, Pouckova P. Proteinase-activated receptor-2 expression on cerebral neurones after radiation damage: immunohistochemical observation in Wistar rats. *Int J Tissue React* 24: 81-8 (2002).
- [108] Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84: 579-621 (2004).
- [109] Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA. Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 22(3): 267-71 (1996).
- [110] Chapman J. Thrombin in inflammatory brain diseases. *Autoimmun Rev* 5(8): 528-31 (2006).
- [111] Wang Y, Luo W, Reiser G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 65: 237-52 (2008).
- [112] Bushell, T. The emergence of proteinase-activated receptor-2 as a novel target for the treatment of inflammation-related CNS disorders. *J Physiol* 581: 7-16 (2007).
- [113] Severino B, Santagada V, Perissutti E, Fiorino F, Frecentese F, De Angelis F, *et al.* Recent advances in synthesis of PAR ligands as therapeutic strategy for inflammatory diseases. *Mini Rev Med Chem* 9: 653-63 (2009).
- [114] Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H, Hirano K. Involvement of reactive oxygen species in thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 182(11): 1435-44 (2010).
- [115] Patel M, Patel M, Shah G. Investigation of Possible Role of the PAR-2 Receptor in Intestinal Inflammation. *J Young Pharm* 2(1): 54-8 (2010).
- [116] Hawkins BJ, Solt LA, Chowdhury I, Kazi AS, Abid MR, Aird WC, *et al.* G protein-coupled receptor Ca<sup>2+</sup>-linked mitochondrial reactive oxygen species are essential for endothelial/leukocyte adherence. *Mol Cell Biol* 27(21): 7582-93 (2007).
- [117] Suo Z, Wu M, Citron BA, Palazzo RE, Festoff BW. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling. *J Biol Chem* 278(39): 37681-9 (2003).
- [118] Suo Z, Wu M, Ameenuddin S, Anderson HE, Zoloty JE, Citron BA, *et al.* Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation. *J Neurochem* 80(4): 655-66 (2002).
- [119] Afkhami-Goli A, Noorbakhsh F, Keller AJ, Vergnolle N, Westaway D, Jhamandas JH, *et al.* Proteinase-activated receptor-2 exerts protective and pathogenic cell type-specific effects in Alzheimer's disease. *J Immunol* 179: 5493-503 (2007).
- [120] Noorbakhsh F, Tsutsui S, Vergnolle N, Boven LA, Shariat N, Vodjgani M, *et al.* Proteinase-activated receptor 2 modulates neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Exp Med* 203: 425-35 (2006).
- [121] Wang Y, Luo W, Reiser G. Activation of protease-activated receptors in astrocytes evokes a novel neuroprotective pathway through release of chemokines of the growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant family. *Eur J Neurosci* 26(11): 3159-68 (2007).
- [122] Wang Y, Luo W, Reiser G. The role of calcium in protease-activated receptor-induced secretion of chemokine GRO/CINC-1 in rat brain astrocytes. *J Neurochem* 103(2): 814-9 (2007).
- [123] Wang Y, Luo W, Reiser G. Proteinase-activated receptor-1 and -2 induce the release of chemokine GRO/CINC-1 from rat astrocytes via differential activation of JNK isoforms, evoking multiple protective pathways in brain. *Biochem J* 401(1): 65-78 (2007).
- [124] Wang Y, Luo W, Stricker R, Reiser G. Protease-activated receptor-1 protects rat astrocytes from apoptotic cell death via JNK-mediated release of the chemokine GRO/CINC-1. *J Neurochem* 98(4): 1046-60 (2006).
- [125] Lee EJ, Woo MS, Moon PG, Baek MC, Choi IY, Kim WK, *et al.* Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1. *J Immunol* 185(1): 615-23 (2010).
- [126] Liu P, Sun L, Zhao XL, Zhang P, Zhao XM, Zhang J. PAR2-mediated epigenetic upregulation of  $\alpha$ -synuclein contributes to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res* 1565: 82-9 (2014).
- [127] Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13(12): RA214-21 (2007).
- [128] Pinto T, Lancôt KL, Herrmann N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Res Rev* 10(4): 404-12 (2011).
- [129] Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, Coto-Montes A, Boga JA, Manchester LC, Fuentes-Broto L, *et al.* Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res* 52(2): 167-202 (2012).
- [130] Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6): 1037-40 (2006).
- [131] Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, *et al.* Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129(2): 318-20 (1991).
- [132] Cacabelos R, Barquero M, García P, Alvarez XA, Varela de Seijas E. Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta (IL-1 beta) in Alzheimer's disease and neurological disorders. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 13(7): 455-8 (1991).
- [133] Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 107(3): 247-54 (2001).
- [134] Lim CS, Hwang YK, Kim D, Cho SH, Banuelos C, Bizon JL, *et al.* Increased interactions between PKA and NF-kB signaling in the hippocampus following loss of cholinergic input. *Neuroscience* 192: 485-93 (2011).
- [135] Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(9): 901-10 (2004).
- [136] Syeda F, Grosjean J, Houlston RA, Keogh RJ, Carter TD, Paleolog E, *et al.* Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *J Biol Chem* 281(17): 11792-804 (2006).
- [137] Sokolova E, Aleshin S, Reiser G. Expression of protease-activated receptor (PAR)-2, but not other PARs, is regulated by inflammatory cytokines in rat astrocytes. *Neurochem Int* 60(3): 276-85 (2012).
- [138] Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol* 23(12): 644-51 (2013).
- [139] Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468(7321): 244-52 (2010).

- [140] Nave KA. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11(4): 275-83 (2010).
- [141] Burda JE, Radulovic M, Yoon H, Scarisbrick IA. Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendroglial pathology. *Glia* 61(9): 1456-70 (2013).
- [142] Nixon RA, Mathews PM, Cataldo AM. The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 3(1): 97-107 (2001).
- [143] Yin X, Wright J, Wall T, Grammas P. Brain endothelial cells synthesize neurotoxic thrombin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 176(4): 1600-6 (2010).
- [144] Sokolova E, Reiser G. Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases. *Thromb Haemost* 100(4): 576-81 (2008).
- [145] Festoff BW, D'Andrea MR, Citron BA, Salcedo RM, Smirnova IV, Andrade-Gordon P. Motor neuron cell death in wobbler mutant mice follows overexpression of the G-protein-coupled, protease-activated receptor for thrombin. *Mol Med* (5): 410-29 (2000).
- [146] Liscic RM, Breljak D. Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(2): 370-2 (2011).
- [147] Zhong Z, Ilieva H, Hallagan L, Bell R, Singh I, Paquette N, *et al.* Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells. *J Clin Invest* 119(11): 3437-49 (2009).

---

Received: August 18, 2014    Revised: November 14, 2014    Accepted: November 26, 2014

## 4 Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz práce

### 4.1 Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkerům

Výsledek práce nepotvrdil alternativní hypotézu (H1), že hodnoty koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku korelují s přítomností proteinu 14-3-3 a celkového tau jako markerů neuronálního poškození u rychle progredujících neurodegenerativních onemocnění.

V práci byla analyzována koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku pacientů s neuropatologicky ověřenými neurodegenerativními onemocněními zahrnující prionová onemocnění, Alzheimerovu nemoc, progresivní suranukleární obrnu a frontotemporální lobární degeneraci s inkluzemi proteinu fosfo-TDP-43 a vaskulární encefalopatii.

Spolu s koncentracemi PAR2 byly v mozkomíšním moku zhodnoceny koncentrace rutinně užívaných biomarkerů: celkového tau (h-tau), fosforylovaného tau (p-tau<sub>(181P)</sub>), amyloidu beta (A $\beta$ <sub>(1-42)</sub>) a proteinu 14-3-3.

Z těchto markerů korelují vysoké koncentrace h-tau (typicky > 800–1200 pg/ml) a přítomnost proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku s akutním poškozením neuronů, které je typické pro rychle probíhající demenci u prionových onemocnění a které však může být přítomno i u akutních infarktů CNS jako jsou ischemické či traumatické léze.

V naší studii jsme stanovenou hypotézu nepotvrdili: na celkem 59 vzorcích jsme stanovili koncentrace PAR2 v rozmezí 1,22–40,00 ng/ml (průměr 8,97 ng/ml, SD  $\pm$ 7,24 ng/ml) a tyto hodnoty nekorelovaly se zvýšenými koncentracemi h-tau ani přítomností proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku a ani nebyly statisticky významně rozdílné mezi jednotlivými diagnostikovanými jednotkami. Rovněž nebyl zjištěn rozdíl v koncentracích PAR2 mezi sporadickou a familiální Creutzfeldtovou-Jakobovou nemocí (CJN) ani jednotlivými podtypy CJN podle polymorfismů na 129. kodonu genu pro prionový protein.

Limitací naší studie je, z hlediska hodnocení patofyziologického významu změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku, absence zdravých kontrol, jejichž získání ve statisticky významném

počtu je problematické a záležitostí prospektivního výzkumného sledování koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku všech pacientů, u kterých lze s dostatečnou mírou jistoty, ideálně neuropatologicky, vyloučit významnější postižení CNS.

Výsledek této studie tedy přímý vztah mezi koncentrací PAR2 a hodnotami koncentrace markerů poškození neuronů nepotvrdil, z čehož lze usoudit, že přítomnost PAR2 v mozkomíšním moku nelze považovat za marker dynamiky neurodegenerativního procesu. Nicméně vzhledem ke komplexnímu zapojení PAR2 a dalších PARs v patogenezi neurodegenerativních onemocnění nelze vyloučit jejich modulující roli.

## **4.2 Charakterizace oligodendroglální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako základní předpoklad pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglální patologie**

Výsledek práce potvrdil alternativní hypotézu (H2), že degenerace glie a neuronů charakterizovaná přítomností inkluzí proteinu TDP-43 u onemocnění motorického neuronu je spojena s reakcí oligodendrocytů.

Role oligodendrocytů v patogenezi neurodegenerativních onemocnění, a to včetně tzv. oligodendroglapatií jako je mnohotná systémová atrofie či tauopatie s globulárními gliálními inkluzemi, je stále neznámá. Jednou z příčin byla také nemožnost, na rozdíl od neuronů či astrocytů, spolehlivě identifikovat terminálně diferencované myelinizující oligodendrocyty ve formalinem fixovaných a do parafínu zalitých vzorcích. Tento problém překonal nový marker, TPPP/p25 $\alpha$  (tubulin polymerisation promoting protein p25 $\alpha$ ), který specificky značí diferencované myelinizující oligodendrocyty.

V této studii jsme analyzovali oligodendroglální reakci u onemocnění motorického neuronu s přítomností inkluzí proteinu TDP-43 (také amyotrofická laterální skleróza, ALS). Tyto inkluze se vyskytují v neuronech i oligodendrocytech, přičemž význam oligodendroglálních inkluzí je zcela nejasný, neuronální inkluze TDP-43 jsou pak přímo asociovány s poškozením neuronů. V případě ALS jsme prokázali, že s degenerací postranních kortikospinálních provazců míšních ubývá imunoreaktivita myelin-bazického proteinu, nicméně bez snížení počtu TPPP/p25 $\alpha$ -imu-

noreaktivních oligodendrocytů. Naopak, počet TPPP/p25 $\alpha$ -imunoreaktivních oligodendrocytů rostl spolu s přítomností inkluzí TDP-43 v neuronech, přičemž s přítomností těchto inkluzí vzrostl také počet tzv. perineuronálních oligodendrocytů, kterým je přisuzována neuroprotektivní role. Zdá se, že degenerace neuronů předních rohů míšních a axonů kortikospinální dráhy tedy není nutně doprovázena snížením absolutního počtu oligodendrocytů. V kontextu dalších studií zabývajících se oligodendriální patologií u ALS lze naopak uvažovat o reaktivní mobilizaci a finální diferenciaci oligodendroglálních prekurzorů.

Pomocí TPPP/p25 $\alpha$  jsme tak jako první charakterizovali oligodendroglální status u ALS. Tato morfologická data tak bude v budoucnosti možno dále korelovat s výsledky funkčních *in vitro* studií a lépe analyzovat roli významných molekul, zahrnujících PARs, včetně PAR2 a s nimi interagujících proteináz, které se podílí na průběhu neurodegenerativních či neuroprotektivních dějů v rámci ALS.

### **4.3 Charakterizace topografie patologie $\alpha$ -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2**

Výsledek práce potvrdil alternativní hypotézu H3, že kromě klasické cereberální a parkinsonské formy mnohotné systémové atrofie (MSA-C a MSA-P) existuje také atypická forma MSA (aMSA). Ta je charakterizována klinickým obrazem s podílem kognitivního deficitu a neuropatologicky specifickou topografií patologie  $\alpha$ -synukleinu.

Přítomnost oligodendroglálních inkluzí  $\alpha$ -synukleinu u mnohotné systémové atrofie (MSA) je jejím základním diagnostickým parametrem. Kromě oligodendroglálních inkluzí jsou u MSA přítomny i inkluze neuronální, které jsou u typických forem MSA, MSA-C a MSA-P přítomny v menšině.

Na základě neuropatologických nálezů byla popsána nová, atypická varianta MSA (tzv. atypická MSA, aMSA), pro kterou je charakteristická klinická symptomatologie oproti typické MSA rozdílná a zahrnuje kromě extrapyramidových a mozečkových příznaků zejména postižení kognitivních funkcí (syndrom demence).

V naší práci jsme hypotézu existence neuropatologicky specifické varianty MSA potvrdili a zá-

roven jsme prokázali, že přítomnost neuronálních cytoplasmatických inkluzí ve fascia dentata hipokampu je pro aMSA definující a že lze tento nález využít pro stanovení definitivní diagnózy aMSA, která je v dalších neuropatologických ohledech, jako je postižení mozečku, pontu, bazálních ganglií, totožná s typickými formami MSA.

V kontextu patologie  $\alpha$ -synukleinu a jeho vztahu k PAR2 a proteinům, které s PAR2 fyziologicky interagují (např. crystalliny) a které mohou touto interakcí indukovat například protektivní efekt, je tak přesné rozlišení jednotlivých klinickopatologických forem MSA zásadní pro další studie role PAR2 u MSA.

#### **4.4 Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění**

V tomto sdělení jsme rozvinuli diskuzi na téma role PAR2 v patogenezi karcinomů pankreatu, konkrétně jeho vlivu na růst primárního ložiska a na metastatický potenciál nádorových buněk. Při interpretaci role PAR2 v kancerogenezi je třeba brát v potaz řadu faktorů. Jedním je histologický typ primárního tumoru, jeho lokalizace v rámci experimentálního modelování (ortotopicky či heterotopicky) a také indukce metastatického šíření tumoru (intravaskulární injekce nádorových buněk či jejich šíření z primárního ložiska). Další skupinou faktorů je přítomnost aktivátorů a inhibitorů aktivity PAR2 v živém organismu v kontrastu s experimentálním užitím izolovaných molekul, které mají stimulovat či potlačit signalizaci PAR2, s čímž souvisí třetí skupina faktorů a to je vlastní objasnění signálních mechanismů, které vedou k danému fenotypu. Tato část tak zahrnuje komplikovanou analýzu aktivity řady druhých poslů, která se může významně lišit podle užitých agonistů PAR2. Právě na základě syntézy těchto informací pak lze usuzovat na možné farmakologické ovlivnění aktivity PAR2 v rámci léčby nádorových onemocnění.

#### **4.5 Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastníci se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů**

Role PAR2 v patogenezi Alzheimerovy nemoci je komplexní; podle specifických podmínek může

PAR2 indukovat toxický i protektivní účinek a je zřejmé, že se na výsledném účinku aktivity PAR2 spolupodílí řada dalších faktorů. Jedním z těchto faktorů je možnost společné endosomálně-lysosomální cesty degradace s rozštěpeným APP. Ten se může intracelulárně translokalizovat do mitochondrií a vytvářet zde toxické komplexy s mitochondriálními transmembránovými proteiny. PAR2 sdílí s APP mechanismus internalizace přes clathrinové jamky a následné intracelulární cesty degradace. PAR2 tak může facilitovat lysosomální degradaci intracelulárního APP, které může jinak toxicky poškozovat mitochondrie.

Kromě této role v endosomálně-lysosomální degradaci APP se může PAR2 podílet na patogenezi Alzheimerovy nemoci na řadě úrovní zahrnujících možné interakce s PAR1, tzv. cross-talk jejich signálních drah, které mohou indukovat jak prozánětlivý NF- $\kappa$ B či protektivní dráhy kináz JNK a ERK.



## 5 Závěr

V předkládané práci je zpracován komplexní pohled na problematiku role proteinázami aktivovaných receptorů (PARs) v patogenezi nemocí CNS a částečně též nemocí nádorových.

Ze studie na mozkomíšních mocích vyplývá, že koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku nelze považovat za marker neuronálního poškození ani marker typický pro jednotlivá neurodegenerativní onemocnění. V kontextu výsledků z myšího modelu prionového onemocnění je možné, že přítomnost PAR2 má modifikující vliv na průběh tohoto onemocnění. Exprese a aktivita PAR2 v CNS tak může i v případě lidských prionových onemocnění odrážet aktivitu těchto onemocnění. Pro přesnější analýzu významu PAR2 v mozkomíšním moku je tak třeba provést dlouhodobější prospektivní studii, ve které budou v dostatečné míře zahrnuty kontrolní subjekty a bude analyzována i časová dynamika koncentrace PAR2.

Pro studium role PAR2 v patogenezi neurodegenerativních onemocnění je zásadní poznání jednotlivých faktorů přispívajících k jejich patogenezi a to včetně mikromorfologických projevů. V některých případech, jako je například Alzheimerova nemoc či ischemické postižení CNS jsou tyto faktory poměrně dobře poznány, u dalších nemocí, například ALS či MSA je znalost faktorů přispívajících k jejich patogenezi stále omezená. Tradiční pohled na patogenezi neurodegenerativních onemocnění je stále spíše „neuronocentrický“ a patologie gliálních elementů je stále posouvána na druhou kolej spíše jen jako užitečných diagnostických markerů některých neurodegenerativních onemocnění. Význam degenerace gliálních elementů je však v mnoha ohledech, a to především vzhledem k existenci komplexní a z funkčního hlediska zcela nezbytné glioneuronální sítě, klíčovým prvkem v patogenetických mechanismech neurodegenerativních změn. V rámci patologie oligodendrocytů je významná duální, toxická a zřejmě i protektivní, role osy kallikrein 6–PAR2 v bílé hmotě, kdy je přesná kvantifikace oligodendroglialní patologie zásadní pro další interpretaci role PAR2. V případě ALS tak může potenciální mobilizace oligodendroglialních prekurzorových buněk směrem k terminálně diferencovaným oligodendrocytům zahrnovat také změny v expresi či aktivitě PAR2 či dalších PARs.

Hypoteticky lze uvažovat o možném protektivním vlivu osy kallikrein 6–PAR2 u oligodendrocytů v laterálních kortikospinálních traktech v míše či u perineuronálních oligodendrocytů, kdy aktivace PAR2 může působit neuroprotektivně, podpořit remyelinizaci či naopak stimulovat

indukci GFAP v astrocytech a přispět tak k rozvoji astrogliózy. Astroglióza nemusí vždy nutně znamenat patologii, ale představuje též mechanismus hojení v CNS, který může sloužit k izolaci patogenního agens. V případě neurodegenerativních onemocnění lze za takové agens, s přihlédnutím k hypotéze takzvaného „prion-like“ šíření patologicky konformovaných proteinů, považovat patologicky konformovaný protein (tau,  $\alpha$ -synuklein či TDP-43), který se může axonálně i transaxonálně šířit v rámci celého CNS.

Protektivní role aktivity kallikrein 6–PAR2 systému byla prokázána na myším modelu MSA. I v tomto případě je třeba přesně definovat morfologický substrát lidské MSA, která byla až do nedávné doby považována za relativně homogenní klinickopatologickou jednotku. Závěry recentních prací, včetně práce naší, ukazují, že i v tomto případě je možné vyčlenit atypickou formu MSA (aMSA) charakterizovanou kognitivním postižením, které bylo donedávna považováno za exkluzivní kritérium pro diagnózu MSA. Atypická MSA se totiž od typických forem liší predominancí neuronální patologie v hipokampu, přičemž základní diagnostické parametry typické pro MSA, přítomnost oligodendroglálních inkluzí, se mezi aMSA a typickou MSA neliší. Je zřejmé, že na predominanci změn směrem do hipokampu se v tomto ohledu nepodílí pouze vlastní patologie  $\alpha$ -synukleinu, ale i další, dosud nepoznané faktory. V tomto ohledu je důležitá role kallikrein 6–PAR2 systému, jehož aktivita snižuje agregaci  $\alpha$ -synukleinu a může být v případě MSA deficientní. Lze předpokládat, že predominantní deficiencie aktivity kallikrein 6–PAR2 v hipokampu může být jedním z faktorů, který umožní vznik neuronálních inkluzí  $\alpha$ -synukleinu u aMSA a v širším kontextu také dalších synukleinopatií.

PAR2 a proteiny spojené s neurodegenerativními onemocněními jako jsou produkty štěpení APP (fragment  $A\beta_{(1-42)}$ ) či  $\alpha$ -synuklein, mohou do určité míry sdílet společné cesty a mediátory degradace cestou ESCRT do lyzosomů či přes komplex retromeru do *trans*-Golgi sítě. Je zřejmé, že ireverzibilní aktivace PARs povede spíše k jejich degradaci v lyzosomech než k recyklaci do *trans*-Golgi sítě. Hypoteticky lze uvažovat, že kapacita degradačních komplexů potřebných pro správnou degradaci či recyklaci proteinů je omezená a že zahlcení těchto mechanismů, spolu s defekty či přetížením dalších cest degradace proteinů, jako je například ubiquitin-proteázomový systém, chaperony-mediovaná autofagie či makroautofagie, může vést ke komplexnímu narušení proteostázy buňky. Přílišné zvýšení exprese PARs na cytoplazmatické membráně a jejich

následná aktivace spojená s vytižením transportních mechanismů tak může být spojena právě s defektní degradací či transportem jiného proteinu, například tau,  $\alpha$ -synukleinu či TDP-43 a je tak možné, že se zvýšená aktivita PARs může nepřímo spolupodílet na komplexním narušení proteostázy buňky.

Na základě poznání z různých orgánových systémů včetně CNS samotného se ukazuje, že jednotlivé PARs nejsou izolovaně aktivovány jednou proteinázou aktivující jeden typ PAR indukující jednu signální dráhu vedoucí ke specifickému fenotypu, ale že se jedná o komplexní interakce řady proteináz, jejich inhibitorů, vlastního inzultu, PARs mezi sebou či jinými receptory a jimi indukovaných signálních drah. Je to až kombinace těchto faktorů, která v konečném důsledku ovlivní finální fenotyp buňky a patofyziologický průběh daného onemocnění.

Pouze přesná charakterizace exprese PARs, jejich signálních aktivit, aktivity proteináz a jejich inhibitorů a přesná specifikace daných onemocnění na morfologické a následně funkční úrovni umožní potenciální úspěšnou modifikaci těchto dějů v rámci terapie řady onemocnění, zejména nádorových a zánětlivých, na jejichž patogenezi se PARs významně podílejí.

## 6 Summary

This Thesis discusses the complex topic of the role of proteinase-activated receptors (PARs) in the physiology and pathophysiology of central nervous system diseases, and to some extent, the role of PARs in cancer pathobiology.

From a study performed using cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with neuropathologically confirmed prion and other neurodegenerative diseases, we can conclude that PAR2 levels in the CSF do not track neuronal damage; therefore, unlike the levels of total-tau or the presence of protein 14-3-3, PAR2 cannot be used as a marker of neuronal damage. Together with results from the murine model of prion disease, we can conclude that PAR2 exerts disease-modulatory effects. Expression and activity of PAR2 in the brain appears to be mostly related to the activity of the disease process itself. However, more extensive studies performed on both diseased and control samples with an assessment of PAR2 CSF levels, using a prospective methodology, are needed to better understand the role of PAR2 relative to prion disease pathophysiology.

To study the role of PAR2 in neurodegenerative diseases, a precise understanding of the role of various elements contributing to the pathogenesis is essential. In certain diseases, such as in cerebrovascular diseases or Alzheimer disease, the general elements of the pathogenesis are already fairly well understood. In other diseases, such as motor neuron disease or multiple system atrophy, the understanding of the underlying mechanisms is still rather limited. The traditional “neurocentric” view of neurodegenerative diseases leads to a underestimation and under recognition of the role of glial elements, which are still being used mainly as diagnostic markers. Nevertheless, degeneration of glial elements is, due to the existence of glioneural networks, in many aspects integral to the pathogenesis of neurodegenerative diseases. If we consider oligodendrocytes, the kallikrein 6-PAR2 axis mediates both the toxic and possibly also the protective effects, therefore, the exact description of oligodendroglial pathology is essential for a better understanding of the exact role of PAR2. In motor neuron disease, we may, based on the results of our study, suggest that induced differentiation of oligodendroglial precursors in terminally differentiated oligodendrocytes can result in changes in PAR2 or other PARs expression and activity. Moreover, the protective role of kallikrein 6-PAR2 axis activity in oligodendrocytes in the lateral corticospinal tracts or in perineuronal oligodendrocytes in the anterior horns may be involved in remyelination.

on or it may induce GFAP expression in astrocytes, which can lead to astrogliosis and formation of a glial scar. This may not necessarily be an inherently pathologic process, since scar formation is also part of the healing process and, in general, may prevent further spread of noxious agents. In neurodegenerative diseases, a “noxious” agent might take the form of a misfolded protein (e.g., tau,  $\alpha$ -synuclein, or TDP-43) that might, in a “prion-like” manner, spread throughout the central nervous system along the axonal pathways.

The kallikrein 6-PAR2 axis has been shown to exert a protective role in the murine model of MSA. In this case, a precise definition of MSA-associated morphology, along with a full understanding of the clinical symptomatology, is essential. The clinical features of MSA have been, until recently, considered to be rather uniform (i.e., cerebellar symptoms and parkinsonism along with autonomic nervous system disturbances) with cognitive impairment actually being an exclusion criterion for an MSA diagnosis. However, the atypical form of MSA (aMSA) has recently been described and can manifest with a wide spectrum of neurological symptoms, including cognitive impairment. In our work, we successfully replicated these results and suggested a possible screening approach for a neuropathological diagnosis of aMSA. Typical MSA as well as aMSA share a common  $\alpha$ -synuclein pathology; however, in aMSA, severe neuronal  $\alpha$ -synuclein pathology can often be found in the hippocampus. The exact explanation for why the  $\alpha$ -synuclein pathology spreads to such an extent in the hippocampus, in aMSA cases, is still not known. We can speculate that the attenuation of kallikrein 6-PAR2 axis activity, which has been shown to reduce  $\alpha$ -synuclein aggregation, may be one of the causes of local hippocampal vulnerability as well as contributing to the pathogenesis of synucleinopathies in general.

Regarding the degradation of PAR2, certain degradation pathways may be shared with PAR2 and other proteins associated with neurodegenerative processes, such as APP fragments ( $A\beta_{(1-42)}$ ) or  $\alpha$ -synuclein. These common mechanisms include the ESCRT and retromer pathways. Irreversible activation of potentially up-regulated PARs may thus lead to consumption of ESCRT components and depletion for degradation of other proteins. In a similar manner, depletion of other degradation mechanisms such as ubiquitin-proteasome system, chaperone-mediated autophagy, or macro-autophagy can eventually lead to severe disturbances in the cellular homeostasis. Therefore, overexpression of PARs on the cytoplasmic membrane followed by their down-regulation may

indirectly lead to a pathological accumulation of other, often already aggregation-prone, proteins, such as tau,  $\alpha$ -synuclein, or TDP-43.

Based on our understanding of PARs in other organ systems, we can now say that individual PARs are not activated by a single proteinase that elicits a single signaling pathway that then leads to a single specific phenotypic effect. In reality there is a set of complex interactions between various proteinases, their inhibitors, the noxious agent itself, different PARs, and other receptors that eventually lead to the activation of an interconnected network of signaling pathways that leads to a final, often multifaceted outcome.

Only a precise characterization of PARs expression, PARs-associated signaling pathways, organ specific proteinases, and their inhibitors, along with a precise understanding of the structural-functional aspects of the associated diseases will allow for further development of tools to specifically modulate PARs-associated physiological and pathophysiological events. This may eventually lead to a successful treatment for many of serious diseases, mainly neoplastic and inflammatory, which are largely associated with PAR activity.



## 7 Přehled publikační a odborné aktivity

### 7.1 Publikace v recenzovaných časopisech s IF

ROHAN, Z., et al. Screening for alpha-synuclein immunoreactive neuronal inclusions in the hippocampus allows identification of atypical MSA (FTLD-synuclein). *Acta Neuropathol*, Aug 2015, 130(2), 299-301. [IF 2014 10,7]

ROHAN, Z., et al. Proteinase-activated receptor 2 and disease biomarkers in cerebrospinal fluid in cases with autopsy-confirmed prion diseases and other neurodegenerative diseases. *BMC Neurol*, 2015, 15, 50. [IF 2014 2,0]

MATEJ, R., et al. The Contribution of Proteinase-Activated Receptors to Intracellular Signaling, Transcellular Transport and Autophagy in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 2015, 12, 2-12. [IF 2014 3,8]

ROHAN, Z., et al. Re: Shi et al. Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. *J Pathol* 2014;234: 398-409. *J Pathol*, Dec 9 2014. [IF 2014 7,4]

ROHAN, Z., et al. Oligodendroglial response in the spinal cord in TDP-43 proteinopathy with motor neuron involvement. *Neurodegener Dis*, Aug 5 2014, 14(3), 117-124. [IF 2014 3,5]

ROHAN, Z., et al. Překrývání neurodegenerativních demencí. *Cesk Slov Neurol N*, 2015, 78/111(6), 641-648. [IF 2014 0,1]

ROHAN, Z., et al. Lidská prionová onemocnění v České republice. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, Fall 2015, 64(3), 115-120. [IF 2014 0,3]

CACACE, R., et al. Rare Variants in PLD3 do not Affect Risk for Early-Onset Alzheimer Disease in a European Consortium Cohort. *Hum Mutat*, Sep 28 2015. [IF 2014 5,3]

CUYVERS, E., et al. Genetic variability in SQSTM1 and risk of early-onset Alzheimer dementia: a European early-onset dementia consortium study. *Neurobiol Aging*, May 2015, 36(5), 2005 e2015-2022. [IF 2014 5,0]

ROHAN, Z. a MATEJ, R. Current concepts in the classification and diagnosis of frontotemporal lobar degenerations: a practical approach. *Arch Pathol Lab Med*, Jan 2014, 138(1), 132-138. [IF 2014 2,8]

ROHAN, Z., et al. Lidská prionová onemocnění v České republice – 10 let zkušeností s diagnostikou. *Cesk Slov Neurol N*, 2013, 76(109(3)), 300-306. [IF 2013 0,1]

BENES, J., et al. Corticotropin-releasing hormone affects short immobilization stress-induced changes in lung cytosolic and membrane glucocorticoid binding sites. *Cell Mol Neurobiol*, May 2013, 33(4), 503-511. [IF 2013 2,2]

## **7.2 Publikace v recenzovaných časopisech bez IF**

ROHAN, Z. a MATEJ, R. Pitva mozku a míchy při diagnóze neurodegenerativního onemocnění – praktický postup pro optimalizaci vyšetření. *Cesk Patol*, Fall 2015, 51(4), 199-204.

ROHAN, Z., et al. Molekulární patologie plicních karcinomů. *Cesk Patol*, Apr 2014, 50(2), 71-75.

SUTORIS, K., et al. Ileocekálna aktinomykóza – kazuistika. *Rozhl Chir*, Jul 2013, 92(7), 395-399.

## **7.3 Monografické publikace**

ROHAN, Z. Historické aspekty neurodegenerativních onemocnění; ROHAN Z., MATĚJ R. Synukleinopatie - obecný úvod; ROHAN, Z., MATĚJ, R. Onemocnění s opakováním tripletů; KOVACS, G. G., ROHAN, Z., MATĚJ, R. Překrývání neurodegenerativních onemocnění. V: RUSINA, R., MATĚJ, R. a kol. Neurodegenerativní onemocnění. Mladá Fronta, a.s. 2014; ISBN 978-80-204-3300-8

## 7.4 Odborná sdělení na kongresech či seminářích

- duben 2012** 15. seminář mladých patologů a 39. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl
- červen 2012** 10<sup>th</sup> European Congress of Neuropathology, Edinburgh, Skotsko  
ROHAN, Z. et al. Expression of proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) in human prion diseases: a pilot study. [poster] Abstrakt publikován v: Clin Neuropathol, 2012, 31(4), p. 280
- listopad 2012** 26. slovenský a český neurologický sjezd, Martin  
ROHAN Z. et al. Neuropatologické vyšetření demence: Novinky v neuropatologické klasifikaci Alzheimerovy nemoci a frontotemporálních lobárních degenerací. [přednáška] Abstrakt publikován v: Česk Slov. Neurol. N. 2012, 75/108 (suppl), p. 36
- duben 2013** 16. seminář mladých patologů a 40. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl
- září 2013** 58th Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy, Göttingen, Německo  
ROHAN, Z. et al. PAR-2 expression in cerebrospinal fluid (CSF) of human prion diseases and other neurodegenerations and its comparison to routinely used CSF biomarkers. Abstrakt publikován v: Clin Neuropathol, 2013, 32(5), p. 438
- listopad 2013** 27. český a slovenský neurologický sjezd a Dunajské sympozium 2013, Praha  
ROHAN, Z. et al. Expres PAR-2 v mozkomíšním moku u lidských prionových onemocnění a dalších neurodegenerací.[poster]. Abstrakt publikován v: Česk Slov. Neurol. N. 2013, 76/109, 2013 (suppl 2), p. S272
- duben 2014** 17. seminář mladých patologů a 41. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl
- září 2014** 26<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Londýn, Velká Británie  
ROHAN, Z. et al. Expression of proteinase-activated receptor 2 in human prion diseases. [poster] Abstrakt publikován v: Virchows Archiv, Aug 2015, 465 (Supplement: 1), p. S250
- listopad 2014** 21. sjezd českých a slovenských patologů, Praha
- duben 2015** 18. seminář mladých patologů a 42. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl

## 7.5 Absolvované stáže a kurzy

<b>říjen 2013</b>	Vědecko výzkumná a výuková stáž v Institutu klinické Neurologie, AKH/
<b>říjen 2014</b>	MUW, Vídeň
<b>březen 2015</b>	školitel Assoc. Prof. Priv. Doz. Dr. Gabor G. Kovacs, Ph. D.
<b>říjen 2011</b>	Motolský minikurz cytometrie, Praha
<b>listopad 2011</b>	Blood Tests in Diagnostics of Prion Diseases, Edinburgh, Skotsko
<b>březen 2012</b>	Third Basic Course in Neuropathology, Aachen, Německo
<b>říjen 2012</b>	Kurz Získání a zpracování mikroskopického obrazu, Praha
<b>únor 2013</b>	Kurz Pokroky v biologii buňky, Praha
<b>listopad 2013</b>	37. Pokroky v molekulární biologii a genetice, Praha
<b>leden 2014</b>	Tonsil Biopsy in vCJD Diagnostics, Edinburgh, Skotsko
<b>duben 2015</b>	RT-QuIC Training Workshop, Edinburgh, Skotsko

## 7.6 Získaná ocenění

### Lamblova cena za rok 2014

Udělovaná výborem Společnosti českých patologů ČLS JEP za nejlepší původní práci v oboru patologie publikovanou v předchozím roce členem Společnosti českých patologů ČLS JEP ve věku do 35 let.