



**Univerzita Karlova v Praze
3. lékařská fakulta**

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

MUDr. Zdeněk Rohan

Praha 2016

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor:	Biologie a patologie buňky
Předseda oborové rady:	prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.
Školící pracoviště:	Oddělení patologie a molekulární medicíny, Thomayerova nemocnice, Praha
Autor:	MUDr. Zdeněk Rohan
Školitel:	doc. MUDr. Radoslav Matěj, Ph. D.
Oponenti:	prof. MUDr. Markéta Hermannová, Ph. D. prof. MUDr. Josef Zámečník, Ph. D.

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Proteinázami aktivované receptory	1
1.1.1	Aktivace PARs.	1
1.1.2	Signální mechanismy PARs a regulace jejich aktivity	1
1.2	Úloha PARs v patofyziologii orgánových systémů	2
1.2.1	Kardiovaskulární systém a hemostáza	2
1.2.2	Respirační systém.	3
1.2.3	Gastrointestinální systém	3
1.2.4	Urogenitální systém	3
1.2.5	Pohybový systém	3
1.2.6	Nádorová onemocnění.	4
1.2.7	Periferní nervový systém.	4
1.3	Úloha PARs v patofyziologii centrálního nervového systému	4
1.3.1	Vaskulární patologie CNS	4
1.3.2	Alzheimerova nemoc.	5
1.3.3	Parkinsonova nemoc.	5
1.3.4	Prionová onemocnění	5
1.3.5	Demyelinizující onemocnění	6
1.3.6	Onemocnění motorického neuronu	6
1.3.7	HIV-asociovaná encefalopatie.	6
1.4	Terapeutické aspekty	7
2	Hypotézy a cíle práce	7
2.1	Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkerům.	7
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.	7
2.3	Charakterizace topografie patologie α -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2.	7
2.4	Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění.	7
2.5	Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastnících se jak neuropro-	

	tektivních tak i neurotoxických dějů.	8
3	Materiál a metody	8
3.1	Vzorky mozkomíšního moku	8
3.2	Vzorky mozkové tkáně	8
3.3	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	8
3.4	Western blotting.	9
3.5	Imunohistochemická analýza	9
3.6	Konfokální laserová mikroskopie	9
3.7	Analýza denzity oligodendrocytů a inkluzí	9
3.8	Denzitometrie MBP	10
3.9	Statistická analýza.	10
4	Výsledky	10
4.1	Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkerům.	10
4.2	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.	10
4.3	Charakterizace topografie patologie α -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2.	11
4.4	Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění	11
4.5	Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastníci se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů.	11
5	Diskuze a závěry	11
5.1	Popis změn koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku u neuropatologicky definovaných neurodegenerativních onemocnění a jejich vztah k rutinně užívaným biomarkerům.	11
5.2	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.	12

5.3	Charakterizace topografie patologie α -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologií crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2.	12
5.4	Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění	13
5.5	Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastníci se jak neuroprotektivních tak i neurotoxických dějů.	13
6	Použitá literatura	14
7	Přehled publikační a odborné aktivity	18
7.1	Publikace v časopisech s IF, které jsou součástí dizertační práce. .	18
7.2	Publikace v recenzovaných časopisech s IF, které nejsou součástí dizertační práce	18
7.3	Publikace v recenzovaných časopisech bez IF	19
7.4	Monografické publikace	19
7.5	Odborná sdělení na kongresech či seminářích	20
7.6	Absolvované stáže a kurzy	21
7.7	Získaná ocenění.	21

Souhrn

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

Z výsledků této práce studie vyplývá, že koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku nelze považovat za marker neuronálního poškození ani marker typický pro jednotlivá neurodegenerativní onemocnění. Exprese a aktivita PAR2 v CNS však může v případě lidských neurodegenerativních onemocnění odrážet aktivitu těchto onemocnění.

Pro studium role PAR2 v patogenezi neurodegenerativních onemocnění charakterizovaných poškozením bílé hmoty a oligodendrocytů je zásadní přesný morfologický popis patologie jednotlivých onemocnění. Ve studii zaměřené na patologii onemocnění motorického neuronu jsme prokázali, že s degenerací bílé hmoty kortikospinálních provazců dochází k reaktivní mobilizaci oligodendrocytů. Dále jsme potvrdili existenci nové varianty mnohotné systémové atrofie (MSA), atypické MSA, charakterizované specifickou degenerací hipokampálních neuronů. Z hlediska PAR2 je důležitá role kallikrein 6–PAR2 systému, jehož aktivita snižuje agregaci α -synukleinu a může být v případě MSA deficientní. Lze předpokládat, že predominantní deficece aktivity kallikrein 6–PAR2 systému v hipokampu může být jedním z faktorů, který umožní vznik neuronálních inkluzí α -synukleinu u atypické MSA.

Dále jsme diskutovali vztah PAR2 a proteinů spojených s neurodegenerativními onemocněními, které mohou do určité míry sdílet společné cesty a mediátory endosomálně-lyzozomální degradace. Dysfunkce těchto mechanismů tak může přispívat k defektní degradaci či abnormálnímu transportu dalších proteinů zahrnujících produkty štěpení amyloidového prekurzorového proteinu, protein tau, α -synukleinu či TDP-43 a je tak možné, že se zvýšená aktivita PARs tak může nepřímo spolupodílet na narušení proteostázy buňky.

Při hodnocení funkce PARs *in vivo* a *in vitro* modelech patogeneze neurodegenerativních a dalších, zejména nádorových, onemocnění je nutné zohlednit celou řadu faktorů zahrnujících interakce PARs a aktivitu proteináz a jejich inhibitorů, protože tyto modely jsou často zatíženy selektivitou užitých metod aktivace či inhibice aktivity PARs a následné analýzy indukovaných signálních funkcí a výsledného, často komplexního, fenotypu.

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.

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.

Based on the results from this Thesis, we can conclude that PAR2 levels in the CSF do not track neuronal damage; therefore, PAR2 cannot be used as a marker of neuronal damage. Expression and activity of PAR2 in the brain appears to be mostly related to the activity of the disease process itself.

To study the role of PAR2 in neurodegenerative diseases characterized by white matter and oligodendrocyte degeneration, a precise morphological description of individual diseases is essential. In the study aimed pathology of motor neuron disease we found reactive increase in oligodendrocyte density in corticospinal tracts in reaction to white matter damage. In other study we confirmed the existence of a new variant of multiple system atrophy, atypical MSA (aMSA) characterized by specific degeneration of hippocampal neurons. Since the activity of kallikrein 6-PAR2 axis attenuates α -synuclein aggregation, its deficiency in hippocampus may be a prerequisite for its dominant degeneration leading to the development of α -synuclein neuronal inclusions and aMSA phenotype.

Regarding the degradation of PAR2, we discussed that certain degradation pathways may be shared with PAR2 and other proteins associated with neurodegenerative processes that may share common mechanisms of degradation in endosomal-lysosomal pathway. Therefore, dysfunction of these mechanisms may lead to a pathological accumulation of aggregation-prone, proteins, such as amyloid precursor protein, tau, α -synuclein, or TDP-43. Enhanced PAR2 activity may thus indirectly contribute to disruption of cellular proteostasis.

When evaluating role of PARs in neurodegenerative and other diseases, it is important to consider complex interactions between PARs and proteinases and their inhibitors in both *in vivo* and *in vitro* model systems that are limited by selective use of different methods of PAR activity assessment and of often multifaceted PAR-activity related phenotype.

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.

1 Úvod

Proteinázy a proteinázami aktivované receptory se podílí na udržování homeostázy jednotlivých buněk a v konečném důsledku celého organismu. Kromě zapojení v celé řadě fyziologických funkcí se proteinázy a proteinázami aktivované receptory podílí na komplexní patogenezi patofyziologických dějů zahrnujících poruchy hemostázy, patogenezi fibrotizujících onemocnění, imunopatologických reakcí, zánětlivých, neurodegenerativních a nádorových onemocnění.

1.1 Proteinázami aktivované receptory

Proteinázami aktivované receptory (PARs) patří do superrodiny transmembránových receptorů spřaženými s G-proteiny (G-protein coupled receptors, GPCRs). 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 specifivitou pro proteinázy a charakterem signálních kaskád následujících po jejich aktivaci.

Proteinázami aktivované receptory jsou, podobně jako další GPCRs, tvořeny sedmi transmembránovými α -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 disulfidovou vazbou mezi cysteiny TM2 a e2 kličky (Adams et al. 2011b).

Posttranslační modifikace PARs zahrnují N-glykosylaci N-konce, e2 a e3, ubiquitinylace a fosforylace na C-konci a i1–i3 a palmitoylace na C-konci.

Součástí 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 proto nízkoafinitní a rychlost jeho disociace z PAR4 je snížena (Kahn et al. 1998b).

1.1.1 Aktivace PARs

Proteinázy interagují s N-koncem PARs, který v jeho specifické sekvenci rozštěpí, čímž dojde ke vzniku intrinsického neoligandu, tzv. vázaného (tethered) ligandu (TL), který se ireverzibilně váže na e2 kličku PAR a tím jej aktivuje. PARs tak lze charakterizovat nejen vazebným místem a afinitou pro danou proteinázu, ale také sekvencí na N-konci, kterou proteináza štěpí a která je pro jednotlivé PARs specifická (Adams et al. 2011b).

1.1.2 Signální mechanismy PARs a regulace jejich aktivity

Proteinázami aktivované receptory jsou spřaženy s $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ a $G\alpha_{12/13}$ podjednotkami G-proteinů (Gieseler 2013). Systémy druhých posílů zahrnují aktivaci (pro $G\alpha_s$) či inhibici (pro $G\alpha_i$) adenylát cyklázy, která katalyzuje syntézu cAMP, který aktivuje protein kinázu A (PKA) a mitogeny-aktivované proteinkinázy (MAPK), které dále ovlivňují komplexní buněčné děje včetně genové exprese. Aktivace $G\alpha_q$ stimuluje fosfolipázu C, která katalyzuje vznik inositol-3-fosfátu (IP_3) a diacylglycerolu (DAG). Vazba IP_3 na receptory na hladkém endoplasmatickém retikulu indukuje uvolnění zde deponovaného kalcia, které, mimojině, spolu s DAG aktivuje protein kinázu C (PKC). Aktivita $G\alpha_{12/13}$ podjednotky indukuje aktivitu RhoA a RhoGEF, které aktivují další systémy kináz (Siehler 2009, Gieseler 2013). Regulace aktivity PARs spočívá jednak ve vazbě β -arrestinů na C-konec PAR fosforylovaného aktivitou PKA, PKC či tzv. kinázami asociovanými s GPCRs (GRKs). Fosforylace C-konce a vazba β -arrestinu zamezí interakci PAR s G-proteinem a zároveň indukuje vznik clathrinového internalizačního komplexu potřebného pro downregulaci ireverzibilně aktivovaného PAR. Vazba β -arrestinu byla popsána pro PAR2, PAR1 s β -arrestinem neinteraguje a sestavení internalizačního komplexu probíhá pomocí jiných adaptorových proteinů. Po své internalizaci jsou PARs degradovány v lyzosomech, k recyklaci ireverzibilně aktivovaných PARs nejspíše nedochází (Ramachandran 2012).

1.2 Úloha PARs v patofyziologii orgánových systémů

1.2.1 Kardiovaskulární systém a hemostáza

Expresce PARs v kardiovaskulárním systému byla prokázána na endoteliích, krevních destičkách, hladkých svalových buňkách i fibroblastech. Endotelové buňky exprimují PAR1, PAR2 a PAR4 a buňky hladké svaloviny PAR1 a PAR2. Fyziologický význam PARs v kardiovaskulárním systému se tak opírá především o regulaci tonu cév, zejména přes trombinem indukovanou aktivitu NO syntázy. Tonus cév je aktivitou PARs modulován komplexně: PAR1 má při endoteliální dysfunkci vasokonstrikční efekt, naproti tomu aktivace PAR2 a PAR4 má efekt vasorelaxační (Alberelli a De Candia 2014). Kromě cévní stěny je exprese PARs důležitá pro patofyziologii myokardu; aktivita PAR1 má potencující vliv na fibrózu myokardu (Sonin et al. 2013) a na modelu virové myokarditidy byl prokázán toxický efekt PAR2 (Weithauser et al. 2013). Kromě trombinu je ligandem PAR1 také aktivovaný protein C (APC). Vliv PAR1 na endoteliální funkce je duální: aktivace PAR1 trombinem indukuje zvýšení permeability endoteliální bariéry, zatímco aktivace PAR1 APC endoteliální bariéru stabilizuje (Griffin et al. 2015).

Na krevních destičkách jsou exprimovány PAR1 a PAR4, které slouží jako receptory pro trombin. Jejich aktivace vede k syntéze tromboxanů, degranulaci a agregaci krevních destiček a vzniku trombu (Coughlin 2005). Dominantní vliv má aktivace PAR1, a proto již

byly vyvinuty preparáty, inhibitory PAR1, obecně označované jako “paxary” (French et al. 2015).

1.2.2 Respirační systém

V patofyziologii respiračního systému je důležitá role PAR2 v potenciaci alergické senzitivace, kromě toho byl popsán významný vliv PAR1 a PAR2 na patogenezi plicní fibrózy. Zapojení PAR1 a PAR2 do fibrogenního procesu je značně komplexní a zahrnuje stimulaci sekrece TGF β , podíl na indukci epitelomezenchymální transdiferenciace, aktivaci myofibroblastů v myofibroblastických fokusech a komplexní interakce s proteinázami koagulační kaskády. Proteinázami aktivované receptory se tak významně podílí na ireverzibilních přestavbových procesech plicní tkáně zahrnující kromě idiopatické plicní fibrózy také změny spojené s asthma bronchiale a chronickou obstrukční bronchopulmonální nemocí (Jose 2014, Matej 2014).

1.2.3 Gastrointestinální systém

V rámci trávicího traktu jsou PARs exprimovány ubikvitně: epitelii střevní výstelky a ductů pankreatobiliárního systému, acinárními buňkami pankreatu, buňkami hladké svaloviny i enterického nervového systému (Kawabata 2008). Nejlépe prozkoumaná je role PARs v patogenezi zánětlivých onemocnění trávicího traktu, zejména akutní pankreatitidy. Zde se předpokládá dominující vliv PAR2 jako trypsinového receptoru jehož aberantní exprese a signalizace je spojována s jak prozánětlivým tak protizánětlivým účinkem (Matej 2006). Kromě vztahu k akutní pankreatitidě byla popsána prozánětlivá role PAR2 v patogenezi bakteriálních zánětů, zejména u poškození střevní sliznice indukované toxinem *Clostridium difficile* (Cottrell 2007). Na modelu IBD a ischemické kolitidy byl však prokázán opačný, protektivní, vliv PAR2 (Kawabata 2008).

1.2.4 Urogenitální systém

V patogenezi onemocnění ledvin a vývodných cest močových byla na modelu ischemického poškození ledvin prokázána toxická role PAR1 (Sevastos 2007); toxická role PAR1 a PAR2 byla také prokázána na modelu akutní glomerulonefritidy (Cunningham et al. 2000; Moussa et al. 2007). Aktivita PAR2 je rovněž spojována s patogenezi renální fibrózy, nejspíše aktivací signalizace asociované s TGF β (Chung et al. 2013).

Propojení aktivity PARs a aktivity proteináz koagulační kaskády je důležité v patologii těhotenství. PAR1 a PAR3 jsou důležité pro vývoj trofoblastu a placentaci; snížená exprese PAR1 byla dokonce asociována s opakovanými potraty (Grisaru-Granovsky et al. 2015). Rovněž je zkoumána role PAR1 v patogenezi preeklampsie (Zhao et al. 2012).

1.2.5 Pohybový systém

V nemocích muskuloskeletálního systému se aktivita PARs uplatňuje zejména v patoge-

nezi artropatií a to jak v případě degenerativní osteoartrózy tak i zánětlivých artropatií (Vergnolle 2009). V těchto případech je patogenetický proces asociován s prozánětlivou a pronociceptivní aktivitou PAR2, která je snížena inhibicí aktivace PAR2; inhibice PAR2 je tak slibnou cestou možné terapie revmatologických onemocnění (Neumann et al 2014).

1.2.6 Nádorová onemocnění

Většina nádorů exprimuje PARs, zejména PAR1 a PAR2, méně pak PAR3 a PAR4 (Elste a Petersen 2010). 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). Výsledný fenotyp nádorových buněk je tak dán složitou interakcí mezi proteinázami a PARs exprimovanými na nádorových buňkách a buňkách nenádorových (stroma, epitelie, buňky imunitního systému) (Matej et al. 2012a).

Převážně proonkogenní role PARs, zejména PAR1 a PAR2, byla prokázána pro celou řadu nádorových onemocnění zahrnující karcinomy trávicího traktu a jeho přídatných žláz, prsu, plic, maligního melanomu i gliomů.

1.2.7 Periferní nervový systém

Na úrovni periferního nervového systému je dobře popsána role PAR2 v modulaci nocicepce (Vergnolle 2009). Zejména se jedná o jeho pronociceptivní působení u pankreatické a nádorové bolesti (Ceppa 2011, Bao 2015).

1.3 Úloha PARs v patofyziologii centrálního nervového systému

Přítomnost všech čtyř typů PARs v centrálním nervovém systému (CNS) byla prokázána u potkanů, přičemž PAR1 je exprimován nejvíce v neuronech hipokampu, 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 habikulárních 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).

Funkce PARs v CNS je značně komplexní a odvíjí se od složité intrakce mezi proteinázami, které mohou být vůči CNS exogenní, tzn. z krevní plasmy (koagulační faktory, pankreatické proteinázy, mikrobiální proteinázy) či endogenní, syntetizované „uvnitř“ hematoencefalické bariéry neuronů, gliálními elementy a buňkami imunitního systému.

1.3.1 Vaskulární patologie CNS

Na modelech ischemického a hemoragického poškození CNS byla prokázána toxická role PAR1, která je velmi těsně asociována s působením vysokých koncentrací exogenního

trombinu. Snížení exprese či aktivity PAR1 je spojována s redukcí objemu infarktových ložisek, snížení apoptózy neuronů a méně závažným neurologickým deficitem (Wang 2012). Na rozdíl od PAR1 je aktivita PAR2 v patogenezi vaskulárních lézí spíše protektivní a jeho exprese a aktivita je asociována s menším objemem infarktových ložisek (Jin 2005).

1.3.2 Alzheimerova nemoc

Vztah mezi patogenezi Alzheimerovy nemoci a PARs je zřejmý z těsné asociace mezi aktivitou trombin-senzitivních PARs, PAR1 a PAR4, s agregací tau proteinu (Suo 2003a) a indukci sekrece prozánětlivého TNF α mikroglíí (Suo 2003b).

Role PAR2 u Alzheimerovy nemoci je duální, neuroprotektivní i toxická. V tomto případě je pro výsledný efekt důležité, zda je aktivita PAR2 vázaná na neurony či astrocyty. Aktivita PAR2 na neuronech je spíše neuroprotektivní, zatímco aktivace PAR2 na astrocytech je spíše neurotoxická (Afkhami-Goli 2007).

Kromě vlastních PARs je v patogenezi Alzheimerovy nemoci zajímavá role některých proteínáz, které jsou schopny štěpit APP, například trypsinu IV (Wang 2008). Ten může aktivovat PARs, nicméně vztah mezi čistě „digestivní“ a signální funkcí trypsinu IV v patogenezi Alzheimerovy nemoci není zatím znám.

1.3.3 Parkinsonova nemoc

Toxická i protektivní role aktivity PARs byla prokázána jak v *in vitro* studiích tak i na animálních modelech degenerace dopaminergních neuronů substantia nigra a na vzorcích z mozků pacientů s Parkinsonovou nemocí. Podobně jako u vaskulárních lézí, i zde může mít na degeneraci dopaminergních neuronů vliv aberantní aktivita trombinu a jeho receptorů (PAR1 a PAR4). Výsledný fenotyp je v tomto případě závislý na koncentraci a délce expozice trombinu (Cannon 2007). Kromě trombinu se v patogenezi Parkinsonovy nemoci mohou uplatňovat tkáňové metaloproteinázy (MMP), jejichž exprese je být indukována toxickým působením α -synukleinu a spolu se sekrecí prozánětlivých cytokinů tak mohou MMP přispívat k degeneraci dopaminergních neuronů a synapsí (Lee 2010). Toxický efekt byl prokázán nejen pro PAR1, eventuálně PAR4, ale i pro PAR2, jehož exprese je v mozcích pacientů s Parkinsonovou nemocí variabilní a liší se v závislosti na anatomické lokalizaci i stádiu onemocnění a lze tedy předpokládat, že aktivita PAR2 a jeho interakce s aktivujícími a inaktivujícími proteinázami má velmi komplexní vliv na průběh patogeneze Parkinsonovy nemoci (Hurley 2015).

1.3.4 Prionová onemocnění

Role PARs v patogenezi prionových onemocnění je neznámá. Dostupná studie na myším modelu prionového onemocnění s vyřazeným genem pro PAR2 však poukazuje na možný modulující vliv PAR2 na průběh onemocnění. Na myším modelu prionového onemocnění

s vyřazeným genem pro PAR2 byla absence PAR2 spojena s pozdějším nástupem příznaků a delším přežíváním (Matej 2012b).

1.3.5 Demyelinizující onemocnění

Demyelinizující onemocnění jsou charakterizované degenerací myelinu, oligodendrocytů a často (auto)imunitní komponentou. Vliv aktivity PARs se tak může v patogenezi demyelinizace projevit na několika úrovních. Typickým experimentálním modelem demyelinizujících onemocnění, respektive roztroušené sklerózy mozkomíšní (RS), je experimentální autoimunitní encefalitida (EAE). U EAE byl prokázán toxický efekt PAR1, typicky v akutní fázi, kdy je narušená hematoencefalická bariéra a v bílé hmotě je proto zvýšená koncentrace trombinu (Kim 2015). Kromě trombinu však může s PAR1 interagovat také APC jehož působení má naopak spíše protektivní vliv (Feistritz 2005).

V patogenezi postižení bílé hmoty má důležitou roli také PAR1 exprimovaný na oligodendrocytech. PAR1 může být aktivován kallikreinem-6 a tato interakce vedla k poškození oligodendroglie a následně také bílé hmoty (Burda 2013).

Role PAR2 u demyelinizujících onemocnění byla podrobně prozkoumána jak na modelové EAE tak i ve vzorcích CNS z pacientů s RS (Noorbakhsh et al. 2006). V této studii byl prokázán toxický efekt aktivity PAR2, která byla spojena s aktivací mikroglie, indukci aktivity NO syntázy a sekrecí prozánětlivých cytokinů.

1.3.6 Onemocnění motorického neuronu

Zatím jedinou studií zabývající se vztahem PARs a patogenezi onemocnění motorického neuronu byla studie na myších s mutovanou superoxid dismutázou 1 (SOD1) (Zhong 2009). V této studii byl prokázán protektivní vliv APC, který, snížil expresi mutované SOD1, snížil aktivitu oxidačního poškození a následně také zlepšil neurologický profil.

Na patogenezi onemocnění motorického neuronu se však nepodílí pouze degenerace neuronů, ale také dysfunkce oligodendrocytů (Philips 2013), které se tak mohou nezávisle podílet na degeneraci bílé hmoty i neuronů v rámci patogeneze onemocnění motorického neuronu.

1.3.7 HIV-asociovaná encefalopatie

V mozcích pacientů s HIV encefalitidou byla oproti neurologicky zdravým kontrolám a případům roztroušené sklerózy mozkomíšní zjištěna zvýšená koncentrace trombinu a zvýšená exprese PAR1 na astrocytech. Toxický vliv PAR1 byl následně na myších demonstrován intrastriální aplikací PAR1-agonisty, které indukovalo astrocytózu a zánětlivé změny v CNS (Boven et al. 2003).

Na rozdíl od toxické role PAR1 byla pro PAR2 prokázána role protektivní. Aktivita PAR2 byla spojena se zvýšenou expresí TNF α a chránila neurony před neurotoxitou indukovanou

vanou proteinem Tat, který je kódován HIV a který podporuje transkripci virové RNA (Noorbakhsh 2005).

1.4 Terapeutické aspekty

Komplexní role PARs v patogenezi řady onemocnění vybízí k její modulaci pomocí farmakologických přístupů. Je to ale právě komplexita interakce PARs a proteináz a aktivovaných signálních kaskád, která znesnadňuje specifické zacílení na aktivitu jednotlivých PARs.

Zatím jediným preparátem schváleným pro humánní farmakologické využití je vorapaxar, inhibitor PAR1, který je indikován v rámci prevence tromboembolické nemoci (French 2015).

Další využití farmakologického ovlivnění aktivity PARs lze očekávat u léčby onemocnění muskuloskeletálního systému a léčby bolesti a jako možnou součást komplexní onkologické léčby vybraných nádorových onemocnění.

2 Hypotézy a 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 inkluzí 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 α -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 α -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 Materiál a metody

3.1 Vzorky mozkomíšního moku

Pro účely studie zabývající se koncentrací PAR2 v mozkomíšním moku u definovaných neurodegenerativních onemocnění byly analyzovány vzorky mozkomíšního moku pacientů s neuropatologicky ověřenými diagnózami neurodegenerativních onemocnění. Celkem bylo analyzováno 59 případů (n=59), z toho 36 bylo diagnostikováno jako prionové onemocnění (n=36; muži 12, ženy 24; průměrný věk 63 při rozpětí 39–81 let) zahrnující sporadickou i hereditární Creutzfeldtovu-Jakobovu nemoc a Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom a 23 případů (n=23) bylo diagnostikováno jako jiná neurodegenerativní onemocnění zahrnující Alzheimerovu nemoc (n=6; M 4, F 2; věk 71 [53–90]), progresivní supranukleární obrnu (n=2; M 1, F 1; věk 64 a 89 let), frontotemporální lobární degeneraci s TDP-43-pozitivními inkluzemi (FTLD-TDP; n=11; M 7, F 4; věk 71 [53–90]) a vaskulární demenci (n=4; M 3, F 1; věk 71 [62–79]).

3.2 Vzorky mozkové tkáně

Analýza probíhala na vzorcích ze standardizovaně odebraných oblastí mozku a míchy fixovaných v 10 % formalínu a zalitých do parafínu.

Pro účely studie na případech onemocnění motorického neuronu byly zhodnoceny řezy z krční a lumbální míchy a z motorické kůry a to v oblasti předních rohů a postranních a zadních provazců míšních a v celé šíři kůry u celkem 10 případů (n=10) amyotrofické laterální sklerózy (medián věku 64, rozpětí 49–73) a 7 kontrolních subjektů (n=7) (medián věku 38, rozpětí 21–84).

Pro účely studie na případech atypické mnohotné systémové atrofie byly zhodnoceny řezy z temporální a frontální kůry a hipokampu; zde byla hodnocena kůra v celé šíři včetně subkortikální bílé hmoty, v hipokampu byly hodnoceny gyrus dentatus a pole CA1–CA4 a oblast pre-/subicula s navazující entorhinální kůrou.

3.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Koncentrace celkového tau (h-Tau), fosforylovaného tau (p-tau), amyloidu $\beta_{(1-42)}$ a PAR2 byly stanoveny pomocí ELISA kitů INNOGENICS® INNOTEST® hTAU Ag, kat. č. #80323, INNOTEST® PHOSPHO-TAU(181P), kat. č. 80317, INNOTEST® β -AMYLOID(1–42), kat. č. 80324 a USCN ELISA Kit for PAR-2, kat. č. SEA852Hu). Zhodnocení koncentrace bylo

provedeno pomocí destičkového spektrofotometru BioTek ELx800 při detekčním spektru 450 nm.

3.4 Western blotting

Status proteinu 14-3-3 byl stanoven pomocí vertikální diskontinuální elektroforézy (SDS-PAGE) následované transferem na nitrocelulózovou membránu a inkubací s primární polyklonální protilátkou proti proteinu 14-3-3 (K-19, IgG; Santa Cruz Biotechnology; kat. č. sc-629) a poté odpovídající sekundární protilátkou (IgG goat-anti-rabbit-HRP; Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-2004;). Následná detekce signálu byla provedena pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL Plus (Pierce*, kat. č. 32132).

3.5 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemická analýza byla prováděna na řezech z formalínem fixovaných a do parafínu zalitých bloků z výše uvedených oblastí mozku a míchy. Použity byly protilátky proti TPPP/p25 (monoklonální, 1:1000; Hoftberger et al. 2010), p62 (monoklonální, 1:500, BD Biosciences), fosfo-TDP-43 (pTDP-43, monoklonální, pS409/410, 1:2000, Cosmo Bio), myelin-bazickému proteinu (MBP, polyklonální 1:200, DAKO) a α -synukleinu (monoklonální, klon 5G4, 1:2000, Roboscreen). K detekci byl použit systém peroxidáza-diaminobenzidin (EnVision, DAKO).

3.6 Konfokální laserová mikroskopie

Pro analýzu exprese a kolokalizační analýzu byla použita polyklonální protilátka anti-T-PPP/p25 (1:3000; Haider et al. 2010) s Alexa Fluor 488 (goat-anti-rabbit, 1:200, Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) a monoklonální protilátka anti-pTDP-43 s Cy3 (goat-anti-mouse, 1:100, Jackson Immuno Research Laboratories Inc.). Jádra byla znázorněna pomocí TO-PRO 3 (1:8000, Molecular Probes Europe BV). K excitaci byly použity Ar-488 nm a He/Ne-550 nm lasery a imunofluorescenční signál byl analyzován pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH) s objektivem HCX PL APO 40 \times /1.2–0.75 Oil CS.

3.7 Analýza denzity oligodendrocytů a inkluzí

Počet TPPP/p25-imunoreaktivních oligodendrocytů byl stanoven pomocí okulárové mřížky na světelném mikroskopu Olympus BX51, která při zvětšení 400 \times pokryla oblast 0,25 \times 0,25 mm (0,0625 mm²). Z každého analyzovaného řezu bylo hodnoceno celkem 16 polí, čímž byla pokryta oblast o velikosti 1 mm² (0,0625 \times 16). Počet p62- a pTDP-43-imunoreaktivních inkluzí na 1 mm² byl stanoven v postranních míšních provazcích a předních rozích míšních. V motorické kůře bylo množství p62- a pTDP-43-imunoreaktivních inkluzí

zhodnoceno semikvantitativně pomocí čtyřstupňové škály (-/+/+/+++).

U studie zabývající se patologií α -synukleinu u atypických případů MSA bylo množství inkluzí viditelných ve standardním barvení hematoxylin-eosinem a α -synuklein-imunoreaktivních inkluzí hodnoceno semikvantitativně (-/+/+/+++).

3.8 Denzitometrie MBP

Řezy z míchy označené protilátkou proti MBP byly naskenovány pomocí digitálního skeneru (NanoZoomer 2.0-HT: C9600-13; Hamamatsu Photonics K.K.). Vlastní denzitometrická analýza byla provedena pomocí programu ImageJ (ImageJ v. 1.47q; W. S. Rasband; National Institutes of Health). Vybrané oblasti byly ve zvětšení 400 \times importovány do programu ImageJ, kde byly převedeny na 8bitovou škálu šedi. Vlastní denzitometrická analýza pak byla provedena za užití konstantní hodnoty stupně šedi pro všechny obrazy jako prahové hodnoty pro pozitivitu MBP reakce. Výsledné hodnoty byly získány jako tzv. integrovaná denzita, hodnota, která lépe zohledňuje rozdílné hodnoty stupně šedi jednotlivých pixelů v oblasti zájmu a lépe tak reflektuje nehomogenní intenzitu MBP imunoreaktivity.

3.9 Statistická analýza

Homogenita rozptylu a normalita jednotlivých skupin v rámci prováděných experimentů byly otestovány pomocí Shapirova-Wilkova testu, respektive Levenova testu a analýzou Q-Q grafu. Vzhledem nehomogennímu rozložení analyzovaných skupin byla platnost alternativních hypotéz testována neparametrickými testy (Mannův-Whitneyův test, Kruskalův-Wallisův test s Bonferroniho korekcí a Spearmanův korelační test). Kategorické proměnné byly analyzovány pomocí Fisherova testu v 2 \times 2 kontingenční tabulce. Pro všechny testy byla hodnota $p < 0,05$ považována za statisticky významnou.

4 Výsledky

4.1 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]

4.2 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.

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]

4.3 Charakterizace topografie patologie α -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protěktivní 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]

4.4 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]

4.5 Přehled problematiky role PARs u neurodegenerativních onemocnění jako komplexních členů patogenetických drah účastníci 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]

5 Diskuze a závěry

5.1 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. 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 T-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 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 postižení CNS.

Z této studie tedy vyplývá, že hodnoty koncentrace PAR2 v mozkomíšním moku nejspíše nelze považovat za marker poškození neuronů ani jednoznačný marker dynamiky neurodegenerativního procesu. Nicméně vzhledem ke komplexnímu zapojení PAR2 a dalších PARs v patogenezi neurodegenerativních onemocnění nelze vyloučit jejich modulující roli.

5.2 Charakterizace oligodendroglíální reakce u onemocnění motorického neuronu s inkluzemi proteinu TDP-43 jako model pro následné studie role PAR2 a dalších typů PARs v kontextu oligodendroglíální 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.

V této studii jsme analyzovali oligodendroglíální reakci u onemocnění motorického neuronu s přítomností inkluzí proteinu TDP-43 (amyotrofická laterální skleróza, ALS). Prokázali jsme, že s degenerací postranních kortikospinálních provazců míšních ubývá imunoreaktivita myelin-bazického proteinu, nicméně bez snížení počtu TPPP/p25 α -imunoreaktivních oligodendrocytů. Naopak, počet TPPP/p25 α -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.

Degenerace neuronů předních rohů míšních a axonů kortikospinální dráhy tak nemusí být nutně doprovázena redukcí počtu oligodendrocytů. V kontextu dalších studií zabývajících se oligodendriální patologií u ALS lze uvažovat o reaktivní mobilizaci a finální diferenciaci oligodendroglíálních prekurzorů.

Pomocí TPPP/p25 α jsme jako první charakterizovali oligodendroglíální “status” u ALS. Tato “morfologická” data 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.

5.3 Charakterizace topografie patologie α -synukleinu u atypické formy mnohotné systémové atrofie jako synukleinopatie s těsným vztahem k patologii crystallinů a potenciální protektivní funkci PAR2.

Na základě neuropatologických nálezů byla navržena nová, atypická varianta MSA (aMSA), u které je charakteristická klinická symptomatologie oproti typické MSA rozdílná a zahrnuje kromě extrapyramidových a mozečkových příznaků také postižení kognitivních funkcí (Aoki et al. 2015).

Výsledek naší studie 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), kterou lze od klasických forem MSA odlišit na základě klinického obrazu a specifické patologie α -synukleinu.

V naší práci jsme potvrdili, že případy aMSA jsou kromě klasických parkinsonských a cerebelárních příznaků charakterizované také různě vyjádřeným kognitivním deficitem. Navíc 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 α -synukleinu a jeho vztahu k PAR2 a proteinům, které s PAR2 fyziologicky interagují (např. crystalliny) a které mohou touto interakcí indukovat protektivní efekt, je tak přesné rozlišení jednotlivých klinickopatologických forem MSA zásadní pro další studie role PAR2 u MSA.

5.4 Zdůraznění problematiky komplexity funkce PAR2 v patogenezi nádorových onemocnění

V tomto sdělení jsme rozvinuli diskuzi o úloze PAR2 v patogenezi karcinomů pankreatu, konkrétně o vlivu jeho aktivity na růst primárního ložiska a na metastatický potenciál nádorových buněk.

Při interpretaci modelových studií zabývajících se úlohou PAR2 v kancerogenezi (Shi et al. 2014) je třeba zohlednit řadu faktorů zarnující histologický typ nádoru, jeho lokalizaci v rámci experimentálního modelování (ortotopická či heterotopická lokalizace) a indukci metastatického šíření tumoru (intravaskulární injekce nádorových buněk či jejich šíření z primárního ložiska). Dále je třeba brát v potaz 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 vedoucích danému fenotypu. Právě na základě syntézy těchto informací pak lze usuzovat na možné farmakologické ovlivnění aktivity PAR2 v rámci léčby nádorových onemocnění.

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

V této práci byla zdůrazněna komplexní role PAR2 v patogenezi Alzheimerovy nemoci. PAR2 může indukovat toxický i protektivní účinek a je tak zřejmé, že na výsledném účinku PAR2 se spolupodílí řada dalších faktorů. Jedním z těchto faktorů je možnost společné endosomálně-lyzosomální cesty degradace s rozštěpeným APP, který se může intracelulárně translokalizovat do mitochondrií a vytvářet zde toxické komplexy s mitochondriálními transmembránovými proteiny. PAR2 sdílí s APP mechanismus internalizace a následné cesty degradace a může tak facilitovat lyzosomální degradaci intracelulárního APP, který jinak může toxicky poškozovat mitochondrie. Kromě této role v endosomálně-lyzosomální degradaci APP se může PAR2 podílet na patogenezi Alzheimerovy nemoci na řadě úrovní zahrnujících možné interakce s PAR1 a PAR1-asociovaných signálních kaskád.

6 Použitá literatura

- ADAMS, M. N., et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther*, Jun 2011, 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.
- ALBERELLI, M. A. A DE CANDIA, E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascul Pharmacol*, 8// 2014, 62(2), 72-81.
- AOKI, N., et al. Atypical multiple system atrophy is a new subtype of frontotemporal lobar degeneration: frontotemporal lobar degeneration associated with alpha-synuclein. *Acta Neuropathol*, May 12 2015.
- 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 2015, 40(2), 158-165.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

ELSTE, A. P. A 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.

FEISTRITZER, C. A 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.

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.

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).

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

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.

HAIDER, L., et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, Jul 2011, 134(Pt 7), 1914-1924.

HOFTBERGER, R., et al. Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis. *Glia*, Nov 15 2010, 58(15), 1847-1857.

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.

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.

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

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.

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

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 2015.

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.

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.

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. 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^{-/-}) animals. *Folia Biol (Prague)*, 2012b, 58(2), 81-86.

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

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

NOORBAKHSF, 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.

NOORBAKHSF, 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.

PHILIPS, T., et al. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, Feb 2013, 136(Pt 2), 471-482.

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

RASMUSSEN, U. B., et al. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett*, Aug 19 1991, 288(1-2), 123-128.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

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, 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, 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.

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.

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.

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.

7 Přehled publikační a odborné aktivity

7.1 Publikace v časopisech s IF, které jsou součástí dizertační práce

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]

7.2 Publikace v recenzovaných časopisech s IF, které nejsou součástí dizertační práce

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]

7.3 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.

7.4 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

7.5 Odborná sdělení na kongresech či seminářích

- duben 2012** 15. seminář mladých patologů a 39. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl
- červen 2012** 10th 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** 26th 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

7.6 Absolvované stáže a kurzy

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

7.7 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