

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Michaela Rusková**

Role genů Pin1 a CDK5 při fosforylaci proteinu CRMP2 a jeho šíření v neuronech spojené s patogenezí Alzheimerovy choroby

The role of Pin1 and CDK5 in Alzheimer's disease-linked phosphorylation and spread of CRMP2 pathology in neurons

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Martin Balašík, Ph.D.

Praha, 31.7.2020

**Prohlášení:**

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

V Praze, 9. 8. 2020

Podpis

Děkuji panu doktoru Balaščíkovi za vstřícný přístup a profesionální vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala svým kolegům z laboratoře molekulární neurobiologie, kteří mi velmi ochotně ukázali všechny nové metody. Děkuji i všem dalším, se kterými jsem mohla svou práci diskutovat.

## **Abstrakt**

U pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (AD) byla pozorována zvýšená aktivita CDK5 i snížená aktivita Pin1. Také u nich pozorujeme agregaci hyperfosforylovaného proteinu CRMP2 (*Collapsin response mediator protein 2*) do neurofibrilárních shluků. Zároveň jedním z rizikových faktorů AD je traumatické poškození mozku, které také vede ke zvýšenému hromadění nerozpustných proteinů.

V této práci je charakterizován vliv zvýšené aktivity kinázy CDK5 a nízké hladiny izomerázy Pin1 (podobně jako se nachází u Alzheimerovy choroby) na tvorbu hyperfosforylovaných agregátů CRMP2 v *in vivo* modelu mírného traumatického poškození mozku. Pomocí western blot analýzy a imunohistochemického barvení bylo analyzováno ukládání fosforylovaného CRMP2A v nerozpustných frakcích mozku a fosforylace proteinu CRMP2 na C konci v rozpustné frakci. Z výsledků vyplývá, že zvýšená fosforylace, konformační stres a TBI, vedou ke snížení rozpustnosti fosforylovaného CRMP2A v mozku, které může přispívat k patologii AD akumulací insolubilních agregátů. Aditivita těchto procesů však nebyla potvrzena.

.

**Klíčová slova:** CRMP2A, CRMP2, CDK5, Pin1, p25, Alzheimerova choroba, traumatické poškození mozku

## **Abstract**

One of the pathologies associated with Alzheimer's disease (AD) is increased activity of CDK5 kinase and downregulation of isomerase Pin1. Other observed pathology is aggregation of phosphorylated protein CRMP2 (Collapsin response mediator protein 2) in insoluble neurofibrillary tangles. One of the risk factors of AD is traumatic brain injury, which leads to increased accumulation of insoluble proteins.

In this work is characterized the effect of high CDK5 kinase activity and low Pin1 level (similar as found in Alzheimer's disease) on formation and spread of hyperphosphorylated CRMP2 aggregates *in vivo* in models of mild repetitive traumatic brain injury. Western blot and immunostaining was used for characterization of specific accumulation of insoluble CRMP2A in brain and his phosphorylation and also for phosphorylation of C-terminal of CRMP2.

The results suggest that increased phosphorylation, conformational stress, and TBI leads to an increase of insoluble phosphorylated CRMP2A in brain, which can lead to pathology of AD, due to accumulation of insoluble aggregates. However, the additivity of these processes has not been confirmed.

Keywords: CRMP2A, CRMP2, Pin1, p25, CDK5, Alzheimer disease, traumatic brain injury

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Přehled literatury .....	10
2.1	Alzheimerova choroba (Alzheimer disease's AD).....	10
2.2	CRMP2.....	14
2.3	CDK5 .....	21
2.4	Pin1 .....	25
2.5	Traumatické poškození mozku.....	29
3	Cíle práce .....	32
4	Materiál a metody.....	33
4.1	Materiál .....	33
4.2	Metody .....	36
5	Výsledky .....	46
5.1	Etablování a optimalizace metody opakovaného mírného traumatického poškození mozku.....	46
5.2	Analýza rozpustnosti fosforylovaného proteinu CRMP2A.....	47
5.3	Imunohistochemická detekce výskytu pS27 CRMP2A v mozku.....	54
5.4	Analýza fosforylace CRMP2 na C konci proteinu.....	56
6	Diskuze.....	61
6.1	Metoda mírného opakovaného poškození mozku .....	61
6.2	Rozpustnost fosforylovaného proteinu CRMP2A.....	61
6.3	Analýza fosforylace CRMP2 na C konci proteinu .....	66
7	Souhrn .....	68
8	Seznam použité literatury.....	69

## Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba (alzheimer's disease)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
CDK5	Cyklin dependentní kináza 5
CRMP2	Collapsin response mediator protein 2
CTE	Chronická traumatická encefalopatie
<i>DPYSL2</i>	Dihydropyrimidinase Like 2
GluN2B	Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-2
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kináza 3 beta
K	Kontrola
KO	knockout (vyřazení genu)
MAP	S mikrotubuly asociovaný protein
min	Minuta
NFT	Neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles)
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
P/Pro	Prolyn
PHF	Spirálovitá vlákna (párová helikální filamenta)
Pin1	Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerase, NIMA-Interacting 1
PP	Protein phosphatase (proteinová fosfatáza)
PSE	Presenilin
ROCK	Rho-asociovaná protein kináza
S/Ser	Serin
Sema3	Semaforin 3
Sra1	Steroid Receptor RNA Activator 1
T/Thr	Threonin
TBI	Traumatické poškození mozku (traumatic brain injury)
tg	Transgen (s přeneseným genem)
TGF	Transforming growth factor
WAVE1	WASP-family verprolin homologous protein 1
WT	Divoký typ (wild type)

# 1 Úvod

Mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí a zhoršení kvality života ve stáří patří rozvinutí demence. Nejčastější forma demence je Alzheimerova choroba (AD), která se vyskytuje stále častěji s průměrně stárnoucí populací. Do dnešní doby není jasné, jaké mechanismy k jejímu rozvinutí vedou.

Mezi patologie objevujících se u této nemoci patří mimo jiné hromadění nerozpustných hyperfosforylovaných proteinů v mozku. Jedním z takto uložených proteinů je i CRMP2. CRMP2A je fosforylován mimo jiné kinázami CDK5, která je primingová a GSK3 $\beta$ , která fosforyluje protein následně. Obě tyto kinázy jsou popsány jako deregulované při AD. Jsou to zároveň stejné kinázy, které fosforylují protein Tau a APP. Zároveň je CRMP2A regulován izomerázou Pin1, která je také u AD deregulovaná a také reguluje Tau a APP proteiny. Další protein, který je u AD deregulovaný je Pin1. Tento protein svou izomerázovou aktivitou mění konformaci a stabilitu proteinů a může být dalším pojítkem mezi CRMP2 a AD.

Je mnoho rizik pro rozvinutí AD a jedním z nich je i opakované mírné traumatické poškození mozku vyskytující se nejčastěji u profesionálních sportovců a vojáků. Toto poškození i v mladém věku může vést k rozvinutí AD ve stáří.

V této práci se soustředí na pochopení regulace fosforylace proteinu CRMP2. Dále se pokusím zjistit, jak fosforylace ovlivňuje ukládání proteinu CRMP2A v mozku a jeho rozpustnost.

Pro zkoumání fosforylace a rozpustnosti proteinu CRMP2A byl použit myší model s mutací způsobující hyperaktivaci CDK5, zároveň s mutací Pin1 proteinu, která způsobuje jeho inaktivaci. U těchto myší bylo prováděno opakované mírné poškození mozku a bylo sledováno, zda toto zacházení u myší povede k rychlejšímu rozvinutí patologie. Úroveň fosforylace byla studována pomocí western blotu a imunohistochemického barvení.

V následující práci vám nejprve představím, z jakých informací vychází naše hypotéza a jaké jsme si vytyčili cíle. Poté představím použité metody, výsledky práce a nakonec shrnutí těchto výsledků v diskuzi a závěru.



## 2 Přehled literatury

### 2.1 Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease AD)

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění a nejčastější příčina vzniku demence. Projevuje se ztrátou paměti, řeči a celkově kognitivních schopností. Dochází při ní k výraznému úbytku mozkové hmoty a neuronů a vede ke ztrátě mozkových funkcí a následně smrti (Katzman, 1976). Touto chorobou je postiženo stále větší množství lidí, hlavně díky přirozeně stárnoucí populaci. Vysoký věk je největším rizikovým faktorem pro vznik této choroby.

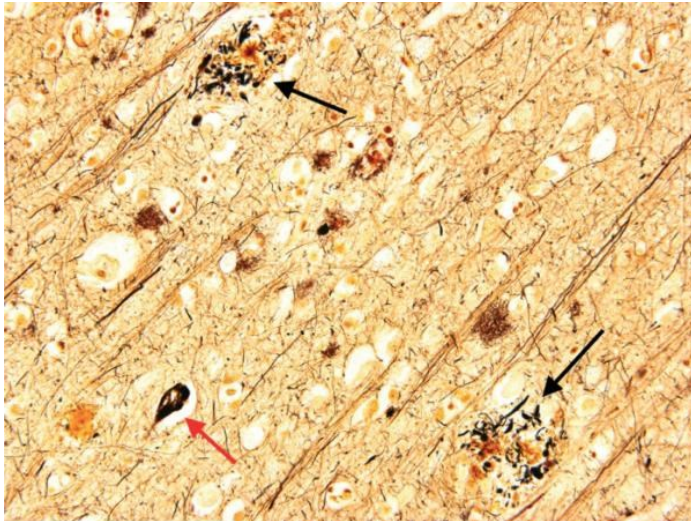
Mezi další rizikové faktory patří genetické pozadí, chromozomální pohlaví a stres. Chromozomální ženy mají vyšší riziko vzniku této choroby a to částečně i díky vyššímu průměrnému věku dožití (Riedel et al., 2016).

Rozlišujeme dva typy choroby, familiární a sporadickou. Familiární Alzheimerova choroba je spojena s mutacemi v genech *PSEN1* (presenilin-1), *PSEN2* (presenilin-2) tvořící podjednotky gamma-sekretázy, či *APP* (amyloid precursor protein). Nástup choroby u familiárního typu je i před 45 rokem života.

Sporadická forma Alzheimerovy choroby se dále dělí na chorobu s dřívějším nástupem (Early onset Alzheimer disease, EOAD), tj. před 65 rokem života a s pozdějším nástupem (Late onset Alzheimer disease LOAD).

#### 2.1.1 Patologie

Po histologické stránce je AD charakteristická hromaděním senilních plaků v extracelulární mozkové tkáni a usazováním intracelulárních neurofibrilárních klubek nerozpustných proteinů v tělech pyramidálních neuronů (Obr. 1) (Perl, 2010).



**Obr. 1: Mozek pacienta s AD barvený Bielschowskeho barvením pro odhalení proteinových shluků.**

Černé šipky ukazují Senilní plakety, červené neurofibrilární klubka v pyramidálním neuronu (Perl, 2010).

### **Neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles NFT)**

Tato klubka nerozpustných proteinů se tvoří u pacientů v pyramidálních neuronech. Jejich hlavní složkou jsou spirálovitá vlákna (paired helical filaments, PHF), což jsou abnormální fibrily stočené v párech do spirál (Wisniewski et al., 1976).

Hlavní složkou těchto vláken je abnormálně fosforylovaný protein Tau (Ferrer et al., 2005; Lee et al., 1991). Není to však jediný protein, který tyto klubka obsahují. Můžeme zde najít například protein CRMP2, GAPDH a další (Wang et al., 2005; Yoshida et al., 1998). Většina z nich je, stejně jako Tau, abnormálně fosforylovaná.

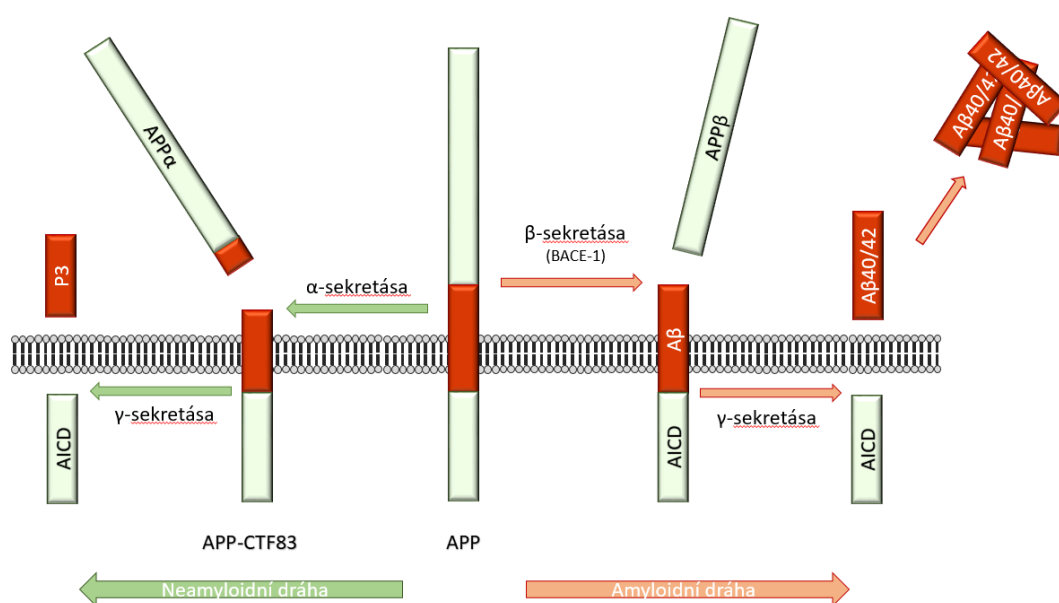
Klubka se vyskytují nejčastěji v oblasti prefrontálního kortexu a hippocampu a jejich množství koreluje se závažností projevů choroby, na rozdíl od množství senilních plaků (Bierer et al., 1995).

Za fyziologických podmínek je Tau s mikrotubuly asociovaný protein, který udržuje jejich stabilitu převážně v axonech neuronů. Po jeho abnormální hyperfosforylaci dochází k disociaci Tau z mikrotubulů a jeho přesunu do těla buňky, kde se akumuluje ve formě NFT. Po hyperfosforylaci dochází ke změně konformace tohoto proteinu, což mění jeho solubilitu a náchylnost k defosforylaci. Výzkum naznačuje, že takto modifikovaný protein může vázat další Tau proteiny a tím způsobovat i jejich modifikaci, což vede ke shlukování (Nizynski et al., 2017). Hromadění nerozpustných proteinů zvyšuje buněčný stres, který u neuronů může indukovat apoptózu (Ahmed et al., 2014). Takovéto hromadění proteinu v buňkách se nazývá tauopathie a může se vyskytovat u většího množství onemocnění.

## Senilní plaky

V extracelulárních oblastech mozku pacientů s AD se vyskytují nerozpustné shluky proteinu Amyloid- $\beta$ . Nerozpustný  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  vzniká při nesprávném proteolitickém štěpení proteinu APP. Konkrétní funkce APP v buňce není prozatím známa. Známe však tři jeho izoformy, z nichž APP 695 se exprimuje primárně v neuronech. Víme, že během svého působení se tento protein dostane na periferii buňky, k buněčné membráně, kde dochází k jeho štěpení. Nejčastěji je APP štěpen  $\alpha$ -sekretásou, jejímž působením vzniká dlouhý solubilní protein APP $\alpha$ . Poté dochází ke štěpení zbytku proteinu APP-CTF83 pomocí  $\gamma$ -Sekretázy za produkce P3 fragmentu a AICD (APP Intracellular Domain).

U Alzheimerovy choroby dochází ke štěpení APP nejprve  $\beta$ -sekretásou ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 BACE-1), čímž vzniká solubilní APP $\beta$ , které je dále štěpeno  $\gamma$ -Sekretázou, na toxický peptid  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$  a AICD (Obr. 2) (Perl, 2010; Zhou et al., 2018).



**Obr. 2: Rozdílné štěpení proteinu APP v amyloidní a neamyloidní dráze.**

V neamyloidní dráze dochází ke štěpení proteinu  $\alpha$ -sekretásou a  $\gamma$ -Sekretásou. Vzniká rozpustný APP $\alpha$ , P3 a AICD. V amyloidní dráze se účastní BACE-1 a vznikají rozpustné proteiny APP $\beta$  a nerozpustné plaky  $A\beta$ .

### 2.1.2 Mechanismy vzniku

Jak a proč Alzheimerova choroba vzniká, je mezi vědci stále otázka, na kterou dosud nemáme přesvědčivou odpověď. Původně se předpokládalo, že senilní plaky a ukládání  $A\beta$  v mozku je hlavní příčinou vzniku AD. To však nekoreluje se zjištěním, že ne plaky, ale množství akumulovaných neurofibrilárních klubek ukazuje míru projevu symptomů, v tomto případě

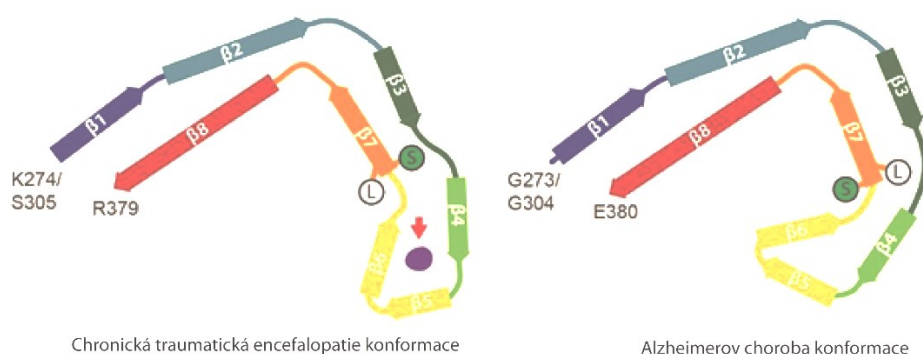
kognitivních disfunkcí, u pacienta (Bierer et al., 1995). Ukazuje se však, že na patologii AD by mohl mít vliv spíše intracelulární solubilní oligomery A $\beta$  a porucha oxidativního řetězce a mitochondrií (Calvo-Rodriguez and Bacskai, 2020) více, než senilní plaky.

Za další možný faktor, který by mohl indukovat degenerace neuronů je považována patologická hyperfosforylace proteinu Tau. Tauopathie se však mohou vyskytovat i u jiných onemocnění než je AD, např. Chronická traumatická encefalopatie, nebo Pickova choroba, i když formy skládání, či izoformy Tau mohou být u těchto chorob jiné než u AD (Obr. 3) (Falcon et al., 2018; Falcon et al., 2019; Geddes et al., 1996). Zda jsou tauopathie původcem, či pouze dalším ze symptomů však dosud nebylo přesvědčivě zodpovězeno.

Je však ukázáno, že mimo jiné hyperfosforylace a akumulování nerozpustných proteinů je jedním z prvotních událostí při vzniku AD. Toto je patrné jak u proteinu Tau, tak u CRMP2 (Cole et al., 2007; Ercan-Herbst et al., 2019).

Významným faktorem při vzniku AD mohou být též změny metabolismu a přenosu vápníku. Mezi další příčiny, či faktory, jež byly spojeny se vnikem AD, patří bakterie zubního plaku, které jsou schopny vstoupit do mozku přes hematoencefalitickou bariéru a narušit tak jeho homeostázu, jak svou přítomností a aktivací imunitní odpovědi, tak vypouštěním toxinů (Dominy et al., 2019).

Vliv jednotlivých faktorů a genetického pozadí na vznik AD je však stále nejasný.



**Obr. 3: Rozdílné skládání proteinu Tau u CTE a AD (Falcon et al., 2019).**

Rozdíl mezi CTE a AD je v rozdílném skládání proteinů Tau. Na obrázku jsou značena místa změny konformace Ser356 a Leu357, kdy u AD dochází fosforylaci na Ser356. Fialové místo značí místo zvýšené hustoty u CTE proteinu, které obsahuje další neproteinové molekuly.

## 2.2 CRMP2

Collapsin responsive mediator protein 2 (CRMP2) je členem rodiny proteinů CRMP, která obsahuje lidské proteiny CRMP1 - CRMP5. Všechny tyto proteiny mají vysokou strukturní homologii, některé až 75 % (Byk et al., 1998; Inatome et al., 2000).

Jedná se o proteiny asociované s mikrotubuly (takzvané MAP proteiny). Přednostně se váží na heterodimery tubulinu a pomáhají jejich nasedání na konce mikrotubulů, kde tyto struktury stabilizují a ovlivňují jejich růst a rozpad, což vede k navádění a větvení axonů (Fukata et al., 2002). I když můžeme proteiny rodiny CRMP najít i v jiných tkáních, primárně se exprimují v tkáních nervových a to konkrétně při vývoji mozku a později v oblastech vzniku nových neuronů, kde ovlivňují migraci neuronů do své finální lokace, větvení a růst axonů/dendritů a vznik nových synapsí. Jakákoli chyba ve vývoji může vést k poškození mozku a vzniku nejružnějších chorob, jako je na příklad epilepsie nebo autismus (Ziak et al., 2020).

Proteiny rodiny CRMP obsahují specifická fosforylační místa na serinu a threoninu, díky kterým může pomocí kináz docházet k rychlé změně aktivity proteinu. Mezi důležité kinázy, které tuto fosforylaci zajišťují, patří například GSK-3 $\beta$  (Cole et al., 2004), Rho (Arimura et al., 2000), Fes/Fps (Mitsui et al., 2002), Fyn (Uchida et al., 2009) a CDK5 (Cole et al., 2006).

### 2.2.1 CRMP2 úloha v neuronech

Procesy morfologických přestaveb jsou řízeny především pomocí buněčného skeletu – dynamikou aktinových vláken a mikrotubulů. Pomocí mikrotubulů dochází k transportu organel, membrán a dalších molekul důležitých pro vývoj. Zároveň přestavba mikrotubulů ovlivňuje tvar buňky, růst dendritů a axonů a jejich navádění. S mikrotubuly je asociováno velké množství MAP proteinů, jejichž funkcí je například stabilizace cytoskeletu, či transport molekul (Goshima et al., 2016).

CRMP2 je jedním z MAP proteinů. Vyskytuje se ve většině neuronů ve vyvíjejícím se mozku a v některých specifických neuronech v mozku dospělém. Mezi tyto neurony patří například Purkyňovy buňky v mozečku, pyramidální buňky hippocampu a senzorické neurony míšních nervových uzlin (Wang and Strittmatter, 1996). V hippocampu dochází vlivem učení k velké remodelaci neuronů, a to i v dospělosti. Právě proto se předpokládá výskyt CRMP2 právě v této oblasti.

Poprvé byl CRMP2 identifikován jako UNC-33 homologní protein, přičemž UNC-33 je protein vyskytující se v neuronech nematod a je nezbytný při cíleném navádění axonů (Hedgecock et al., 1985; Li et al., 1992). CRMP2 (tehdy popsáný u kuřat jako CRMP64 na

základě své molekulární hmotnosti) byl popsán jako protein vyskytující se pouze ve vyvíjející se nervové soustavě kuřete a také jako člen signální dráhy přes Semaforin3A (Goshima et al., 1995; Uchida et al., 2005; Yoshimura et al., 2005). Protilátky ke specifickému regionu CRMP2A blokovaly Semaforinem způsobený rozpad růstových kuželů (Goshima et al., 1995).

Semaforiny jsou exkretované a membránové proteiny, které byly původně popsány jako proteiny retraktující axony (Luo et al., 1993) a tím způsobující jejich navádění. Dnes již víme, že mohou neurony jak retrahovat, tak atrahovat (Bagnard et al., 1998). Dále určují polarizaci neuronů lokálním potlačením růstu axonů (Shelly et al., 2011). CRMP2 je intracelulární protein zajišťující rozpad mikrotubulů po signalizaci semaforinem.

Protein CRMP2 se váže přednostně na heterodimery tubulinu, funguje jako nosič tubulinových heterodimerů a napomáhá jejich sestavení na plus konci mikrotubulů a stabilizaci těchto konců. Tímto se protein CRMP2 podobá například proteinu Tau, který stabilizuje mikrotubuly po jejich délce (Fukata et al., 2002). Právě tato stabilizace konců je snížena po fosforylaci způsobené signalizací přes Semaforin3A dráhu.

Dále CRMP2 váže heterodimery tubulinu ke kinesinu a umožňuje tak jejich transport na konce mikrotubulů do oblasti růstového kužele (Kimura et al., 2005).

CRMP2 se účastní regulace navádění axonů jak v centrální, tak v periferní nervové soustavě. U *crmp2KO* myši, v periferním nervovém systému, vedl nedostatek CRMP2 například k přerůstání a zvýšenému větvení oftalmické větve trigeminálního nervu. V centrální nervové soustavě bylo detekováno defektní postnatální navádění axonů a jejich růst v oblasti *corpus callosum*. Oba tyto systémy jsou regulovány přes Semaforin3A (Ziak et al., 2020).

CRMP2 je dále zapojen v klatrinem indukované endocytóze proteinu L1 a to interakcí s proteinem Numb, který je součástí Notch signální dráhy (Nishimura et al., 2003). K endocytóze L1 dochází v růstových kuželech a tato molekula je důležitá pro růst axonů. L1 je asociován s komplexem neuropilin/plexin a hraje roli při přepínání mezi atraktivním a retraktivním působením semaforinu při navádění axonů (Castellani et al., 2002).

Dále CRMP2 interaguje s komplexem Sra1/WAVE1. Tento komplex se účastní tvorby lamellipodií ve fibroblastech a formování axonů u drozofily a hraje důležitou roli v dynamickém přeskupování aktinu v buňce (Steffen et al., 2004). CRMP2 se účastní přepravy komplexu Sra1/WAVE1 pomocí kinesinu, kdy se lehký řetězec proteinu CRMP2 váže na kinesin a přichycuje na něm právě komplex Sra1/WAVE1. Přepravuje ho tím do růstového kužele axonu a tím reguluje jeho růst (Kawano et al., 2005).

Dále se CRMP2 podíly na prořezávání axonu a remodelaci dendritických trnů, které je ovlivněné Semaforin3F (Ziak et al., 2020).

### **CRMP2 v interakci s vápníkem**

Mezi nejdůležitější signální molekuly v mozku patří vápenaté ionty  $Ca^{2+}$ . Tyto ionty aktivují celou řadu enzymu. Zároveň v buňkách nervové soustavy napomáhají přenosu nervového signálu (Llinas et al., 1981).  $Ca^{2+}$  je přenášen specifickými vápenatými kanály. Jedním z nejhodnější se vyskytujících vápenatých kanálů je  $CaV_{2.2}$  (N-*typ*), který se vyskytuje na membránách presynaptických buněk a umožňuje influx iontů do buňky (Issa and Hudspeth, 1994; Robitaille et al., 1990).

S kanálem  $CaV_{2.2}$  interaguje více intracelulárních proteinů, mezi nimiž má velkou úlohu i CRMP2. Zvýšená exprese CRMP2 sice nezvyšuje aktivitu  $CaV_{2.2}$  kanálů, ale zvyšuje jejich koncentraci na plazmatické membráně a tím i množství vstupujících vápenatých iontů. To vede následně k většímu množství exkretovaného neurotransmiteru, ve zkoumaném případě glutamátu (Brittain et al., 2009; Chi et al., 2009). Fosforylace CRMP2 CDK5 kinázou na Ser522 zvyšuje jeho afinitu k  $CaV_{2.2}$  receptoru a tím i množství vnášených vápenatých iontů (Brittain et al., 2012b). Toto spojení je výjimečně důležité v oblasti rehabilitace neuropatické bolesti, kdy inhibice komplexu CRMP2 s vápenatými ionty vede ke snížení neuropatického chování u myši. To spolu naznačuje, že molekula CRMP2 by mohla být cílovou molekulou pro její léčbu (Brittain et al., 2011).

V dalších studiích byla identifikována interakce CRMP2 s NMDA receptory. Tyto receptory patří mezi další z receptorů umožňující vstup iontů  $Ca^{2+}$  do buněk. U CRMP2<sup>-/-</sup> myši bylo prokázáno ovlivnění množství GluN2B NMDA receptorů v hipokampu. GluN2B podjednotka receptoru je důležitá ve vývoji nervové soustavy (Zhang et al., 2016a).

NMDA receptory taky hrají výraznou roli v excitotoxickém působení CRMP2. Mimo intracelulárního působení dochází i k možnému extracelulárnímu působení CRMP2. I když není dokázáno, že CRMP2 se vyskytuje jako extracelulární protein v přirozeném prostředí, ukazuje se, že může dojít k jeho uvolnění u degradujících neuronů či gliových buněk. Tento extracelulární CRMP2 má efekt na NMDA receptory a jeho působení zvyšuje koncentraci vápenatých iontů v buňkách hipokampu (Castillo et al., 2018). O výskyt extracelulárního CRMP2 už dříve spekulovali studie zabývající se extracelulárním přidáním anti-crm2 protilátek a jejich vlivem na vývoj neuronů i oligodendrocytů (Goshima et al., 1995; Ricard et al., 2001).

### ***CRMP2 degradace calpainem***

Calpain je na vápníku závislá proteáza. Nejvýznamnější působení bylo zaznamenáno při poškození neuronů, kdy vlivem influxu vápenatých iontů dochází k její aktivaci a calpain následně štěpí cytoskeletární molekuly a mezi nimi i CRMP 2 (Zhang et al., 2007). Sestřih CRMP2 calpainem vede ke zvýšené degradaci axonů a narušení buněčného transportu, to dále vede k degeneraci neuronů (Zhang et al., 2016b).

Endogenní inhibitor tohoto proteinu se nazývá Calpastatin. Jeho overexprese se však nezdá být efektivní pro snížení účinku calpainem indukovaného poškození (Schoch et al., 2012). Ovšem calpain se zdá být dobrým cílovým proteinem v redukce neuronálního poškození.

### **2.2.2 CRMP2A/B**

U většiny genů rodiny CRMP byly identifikovány alespoň 2 sestřihové varianty.

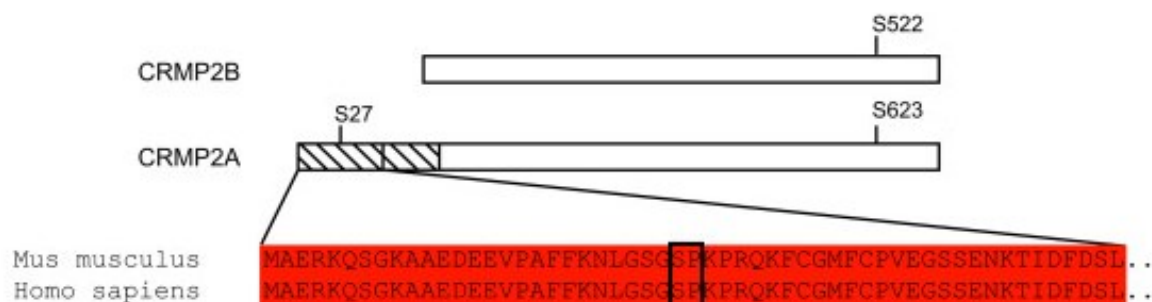
Navíc, proteiny rodiny CRMP mohou formovat homo i heterotetrametry, jejichž přesné složení může dále ovlivňovat funkci CRMP proteinů. Bylo prokázáno, že kationty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  mohou indukovat tvorbu homotetramerů CRMP2 in vitro, zatímco způsobují destabilizaci tetramerů CRMP-1 a CRMP-5 (Majava et al., 2008).

CRMP2 podléhá alternativnímu sestřihu, díky kterému mohou vznikat dvě izoformy (Quinn et al., 2003; Yuasa-Kawada et al., 2003). Jedná se o CRMP2A a CRMP2B. Rozdíl mezi těmito subtypy je jejich N-koncová oblast, která je v případě CRMP2A delší a obsahuje další fosforylační místo na Serinu 27 (Obr. 4) (Balastik et al., 2015). Tyto izofoty se dále liší rozdílným místem exprese, která je pravděpodobně buněčně i vnitrobuněčně specifická, například v oligodendrocytech se nachází pouze CRMP2B (Bretin et al., 2005).

Také při vývoji mozku se lokalizace proteinů rodiny CRMP mění, kdy v raných stádiích vývoje jsou všechny formy proteinu CRMP obsaženy ve většině buněk, avšak postupně s dospíváním z některých buněk vymizí. Například mechová vlákna v mozku v dospělosti obsahují pouze CRMP2 (Bretin et al., 2005). Dále bylo v práci na gangliových buňkách sítnice kuřete pozorováno, že CRMP2B je exprimován v axonu i dendritech, zatímco CRMP2A pouze v axonech (Yuasa-Kawada et al., 2003).

CRMP2A a 2B má mimo koncové oblasti i rozdílnou funkci v buňkách. Bylo pozorováno, že nadexprese CRMP2B indukuje větvení axonů, zatímco co-overexprese CRMP2A tento efekt blokuje (Yuasa-Kawada et al., 2003). Pro správnou morfologii axonů je tedy důležitá rovnoměrná distribuce obou forem proteinu CRMP2.





#### Obr. 4: Rozdíly izoform proteinu CRMP2 – CRMP2A a CRMP2B

Izoforma CRMP2A má delší N koncovou oblast, jejíž sekvenci z člověka (*Homo sapiens*) a myši (*Mus musculus*) vidíme na obrázku. Navíc obsahuje zvýrazněné fosforylační místo kinázy CDK5 na Serinu 27 a další místo kinázy CDK5 na Ser623 homologní s místem Ser522 na C koncové části CRMP2B (Balastik et al., 2015).

### 2.2.3 CRMP2 posttranslační modifikace

#### Oxidace

CRMP2 se mimo nervovou soustavu podílí i na migraci T lymfocytů (Vincent et al., 2005) a právě v nich hraje oxidace a redukce CRMP2 významnou roli (Pace et al., 2018). Cystein504 na CRMP2 může podléhat oxidaci umožňující formaci kovalentně vázaných homodimerů s Thioredoxinem (TRX), proteinem podílejícím se na odpovědi buněk při expozici kyslíkovým radikálům. Oxidace souběžně s fosforylací na Ser522 usnadňuje další fosforylací pomocí kinázy GSK3 $\beta$  a tím usnadňuje odbourávání mikrotubulů v růstových kuželech (Morinaka et al., 2011).

#### O-GlcNAc-modifikace

Tato modifikace proteinu CRMP2 je známá již od roku 2001 (Cole and Hart, 2001), bohužel však stále plně neznáme její účel. CRMP2 je modifikován O-glykosilací na serinu 517, kde může zároveň docházet i k fosforylací. Existuje více hypotéz, zda a jak se tyto modifikace vzájemně ovlivňují (Leney et al., 2017). Je známo, že fosforylace na S518, či 514 inhibuje O-glykosilaci na S517. Dále je také známo, že O-glykosilace se vyskytuje převážně v synaptických zakončeních a její nedostatek způsobuje mírné poškození vývoje mozku a kognice (Muha et al., 2019).

## **SUMOylace**

Jako další modifikaci CRMP2 lze uvést SUMOylaci, která byla sice u CRMP2 objevena, ale často se také používá jako pravděpodobně chybné vysvětlení horního proužku na western blotu (WB) protilátky anti - CRMP2. Dochází zde k přidání sumo o velikosti 10 kD. Horní proužek na WB byl však identifikován jako CRMP2A (Balastik et al., 2015; Ziak et al., 2020).

SUMOylace spolu s dalšími post translačními modifikacemi reguluje vazbu CRMP2 na sodíkový iontový kanál NaV1.7. (Dustrude et al., 2013). Tento transportér hraje důležitou roli v neuropatické bolesti, kdy je prokázána jeho disregulace a inhibice. SUMOylace může být strategie při léčbě této bolesti (Moutal et al., 2018). SUMOylace proteinu CRMP2 je ovlivněna jeho fosforylací, kdy fosforylace CDK5 indukuje SUMOylaci, zatímco fosforylace kinázou Fyn SUMOylaci inhibuje (Dustrude et al., 2016).

## **Fosforylace**

### ***CDK5 a GSK3 $\beta$***

Modifikace fosforylací je jednou z nejvíce studovaných post translačních modifikací proteinu CRMP2. Účastní se jí několik kináz, z nichž důležitou roli má kináza CDK5, která fosforyluje CRMP2 na Serinu522 (Uchida et al., 2005). Tato fosforylace způsobuje změnu konformace proteinu a umožňuje fosforylaci prostřednictvím dalších kináz. Sekundární fosforylace po iniciaci kinázou CDK5 probíhá například prostřednictvím kinázy GSK3 $\beta$  na reziduích T509-Thr514-S518. S touto fosforylací se setkáváme právě u semaforinové signalizace popsané výše, kdy po fosforylaci dochází k snížení afinity CRMP2 k mikrotubulům, jejich uvolnění a rozpad růstového kužele (Cole et al., 2006; Uchida et al., 2005; Yoshimura et al., 2005).

CDK5 může také fosforylovat izoformu CRMP2A, který má o jedno CDK5 fosforylační místo více než CRMP2B a to na svém N-terminálním konci - Serin 27. Tato fosforylace vede k proteasomální degradaci proteinu (Balastik, 2015).

### ***Fyn a Fes***

Src-kináza Fyn a Tyrosin-kináza Fes se také účastní signalizace přes Sema3A, kdy tyto kinázy disociují z receptorového komplexu Npn-1-PlexA1 po navázání Sema3A a poté fosforylují CRMP2 na Tyrosinu 32. Účel této fosforylace není dosud plně známý. Mutanti CRMP2Y32F mají potlačený kolaps růstových kuželů indukovaný Sema3A (Uchida et al., 2009).

### ***Rho kináza***

G-proteiny rodiny Rho zahrnují malé GTP-ázy jako RhoA, Cdc42 či Rac1. Tyto proteiny slouží jako signální molekuly v mnoha buněčných pochodech, jako je například modifikace cytoskeletu či buněčná migrace. G-proteiny je dále regulována Rho dependentní kináza ROCKII, která fosforyluje lehké řetězce myosinu a je důležitá pro migraci buněk. Právě tuto kinázu dokáže svou přímou vazbou protein CRMP2 inhibovat (Yoneda et al., 2012). ROCKII také reguluje retrakci axonů indukovanou proteinem Nogo, který se váže na receptor NgR a spouští kaskádu reakcí zahrnující i aktivaci ROCKII, Limk1 a Kofilinu (Montani et al., 2009), což jsou mimo jiné proteiny účastníci se Sema3A signalizace. Při aktivaci ROCKII přes NgR receptor může docházet i k fosforylaci CRMP2 na Threoninu 555 a následně ke kolapsu mikrotubulů a retrakci axonů (Arimura et al., 2000).

Rho kináza se účastní i signalizace Efrinem A5. Ten po vazbě na specifický receptor aktivuje Rho faktor a ten dále kinázu ROCKII (Wahl et al., 2000). Dochází k fosforylaci CRMP2 a snížení jeho vazby na mikrotubuly a na protein Numb. Tímto způsobem CRMP2 negativně ovlivňuje endocytózu proteinu L1 (Nishimura et al., 2003).

### ***Fosfatázy a CRMP2***

Funkce proteinu CRMP2 je též významně regulována fosfatázami. Fosforylace na reziduích T509-Thr514-S518 podléhá defosforylaci například kinázami PP1, PP2 a PP3. Z nichž PP1 je v tomto případě nejdůležitější. Toto však neplatí u residua Ser522, kde je CRMP2 fosforylován kinázou CDK5. Zde dochází pouze k mírné defosforylaci kinázou PP1. Toto fosforylační místo je vysoce stabilní a nedochází zde ani po farmakologické inhibici CDK5 k výrazné ztrátě fosforylace, zatímco inhibice GSK3 $\beta$  vede k dramatickému poklesu fosforylace na reziduích T509-Thr514-S518. Vyšší stabilita fosforylace na Ser522 je patrně dána vlivem okolních bazických residuí (konkrétně Lys-525) (Cole et al., 2008). Snížená schopnost defosforylace je typická u substrátů fosforylovaných kinázou CDK5 na C koncích, jako je například protein Tau, který se stejně jako CRMP2 ve své hyperfosforylované formě vyskytuje v neurofibrilárních shlucích (Cruz et al., 2003; Gu et al., 2000).

## 2.3 CDK5

CDK5 byla poprvé popsána jako CDC2-like protein a to díky své schopnosti fosforylovat na motivu lysine-serin-prolin a díky vysoké aminokyselinové podobnosti s myším CDK1 a lidským CDK2 proteinem (Hellmich et al., 1992). Ačkoli je CDK5 členem rodiny serin threonin cyklin-dependentních kináz, na rozdíl od ostatních se neúčastní regulace buněčného cyklu (Meyerson et al., 1992). Exprimuje se sice ve všech tkáních, ale její největší exprese a kinetická aktivita byla objevena v buňkách nervové soustavy (Hellmich et al., 1992; Ino et al., 1994; Tsai et al., 1993).

### 2.3.1 Regulace CDK5

Stejně jako ostatní kinázy této rodiny, potřebuje i CDK5 pro svou aktivaci aktivátor. Tím je v tomto případě protein p35, nebo p39, či jejich zkrácené verze p25 a p29 (Ishiguro et al., 1994), které se exprimují převážně v nervové tkáni (Ishiguro et al., 1994; Lee et al., 1996; Lew et al., 1992; Patrick et al., 1998; Tsai et al., 1993). Aktivace CDK5 je také ovlivněna lokalizací těchto proteinů, kdy p35 a p39 jsou vázány na buněčnou membránu (Humbert et al., 2000). Protein p39 je lokalizován v perinukleární oblasti a p35 v oblasti periferních lamelipodií. Vazba p35 na F-aktin podporuje tvorbu aktinových svazků a stabilizuje ho (Xu et al., 2011). Tato vazba však přímo neovlivňuje aktivitu CDK5, na rozdíl od vazby G-tubulinu, který se váže přímo na CDK5 a inhibuje její aktivitu (Ito et al., 2014).

Další aktivátor specifický pro CDK5 je cyklin I, který je exprimován v diferencovaných buňkách a reguluje expresi BCL-2 a BCL-XL, což jsou proapoptotické proteiny (Brinkkoetter et al., 2009).

Inhibice CDK5 je rozdílná od ostatních cyklin dependentních kináz. Fosforylace na Tyrosinu 15 kinázou Fyn zvyšuje aktivitu CDK5. Tato fosforylace je důležitá v Sema3A signalizaci pro rozpad růstového kužele (Sasaki et al., 2002). Jiná studie ovšem ukazuje, že fosforylace na Y15 je inhibovaná po vazbě aktivátoru cyklinu I, p35 či p39 a není tak nutná pro funkci CDK5. V této studii ukazují, že Fyn zvyšuje aktivitu CDK5 stabilizací proteinu p35 (Kobayashi et al., 2014).

### P-35 vs p-25

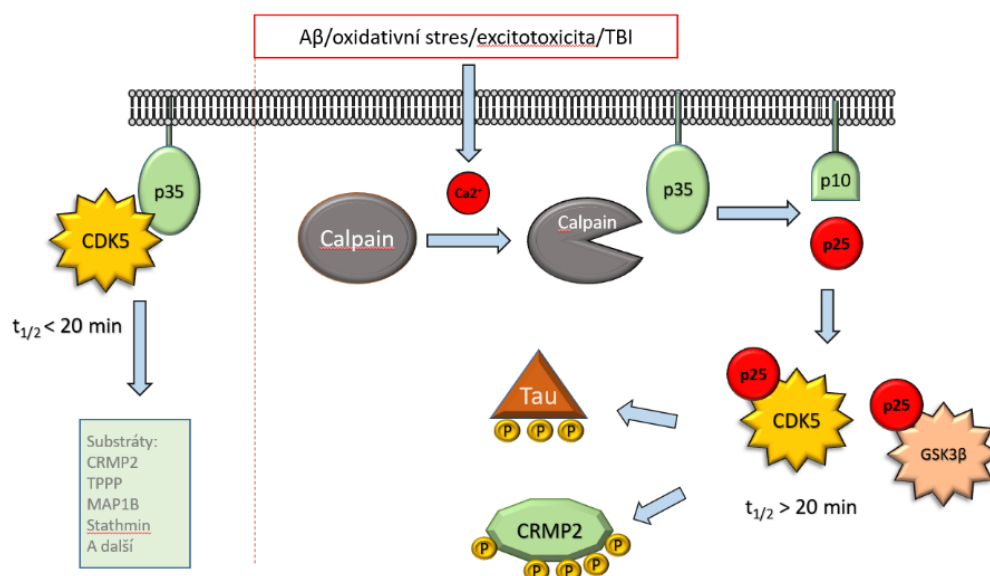
U velkého množství neurodegenerativních chorob je pozorována zvýšená aktivita CDK5. Jako příklady lze zmínit například Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu či Amyotrofni laterální sklerózu. Buněčný stres spojený s patogenezi těchto chorob, vede k narušení

homeostázy vápníku a následně ke změně aktivity calpainu v buňkách. Přičemž calpain štěpí a tím ovlivňuje funkci regulačních proteinů kinázy CDK5: p39 štěpí na p29 a p10 a p25 na p25 a p10 pomocí calpainu (Obr. 5). p25 byl detekován v neuronech obsahujících neurofibrilární shluky vyskytující se při neurodegenerativních chorobách. Vazba p25 na CDK5 mění její substráty a buněčnou lokalizaci a působí neurotoxicky, například zvýšenou fosforylací proteinu Tau a snížením jeho vazby na mikrotubuly (Patrick et al., 1999).

Protein p35 má velmi nízký poločas rozpadu 20-30 minut (Patrick et al., 1998), zatímco p25 má delší poločas rozpadu a lokalizuje se v tělech a jádrech neuronu (Patrick et al., 1999).

N koncový fragment štěpení p35 proteinu, p10, umožňuje jeho vazbu na mikrotubuly, membrány i mikrotubulární proteiny (Amin et al., 2016). P10 může také regulovat neurotoxický efekt komplexu CDK5/p25 a přidání p10 redukuje vznik kyslíkových radikálů v buňce (Zhang et al., 2012). Na druhou stranu studie ukazují i možný vliv p10 na neurodegeneraci a apoptózu (Chew et al., 2010), které však vylučuje Zhang ve své studii z roku 2012 (Zhang et al., 2012).

Překvapivě se zdá, že kromě CDK5 aktivuje p25 i kinázu GSK3 $\beta$ , která se také podílí na fosforylaci MAP proteinů, jako je například Tau a CRMP2 (Chow et al., 2014).



**Obr. 5: Aktivace kinázy CDK5 a fosforylace jejích substrátů za fyziologických a stresových podmínek**

Vlevo na obrázku – situace v buňce za fyziologického stavu. Protein p35 je spojen s membránou a aktivuje CDK5. Při stresové reakci dochází k influxu vápenatých iontů, což aktivuje Calpain, který štěpí protein p35 na p25 a p10. Svou vazbou na CDK5 způsobuje p25 její nadměrnou aktivaci a dislokaci v buňce. Také poločas rozpadu tohoto komplexu je vyšší, než komplexu CDK5/p35. Z toho důvodu dochází k hyperfosforylaci a změně substrátů CDK5, na obrázku CRMP2 a Tau. (Dhavan and Tsai, 2001)

### 2.3.2 Substráty CDK5 a její úloha v neuronech

CDK5 fosforyluje velké množství substrátů, mezi kterými jsou převážně proteiny asociované s mikrotubuly, jako jsou například proteiny Tau, CRMP,  $\beta$ -APP, MAP1B a další. Tím se podílí na dynamickém přetváření a pohybu cytoskeletu, vývoji dendritických trnů, na transportu molekul v buňkách a dalších buněčných pochodech (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008; Dhavan and Tsai, 2001; Jin et al., 2016). Hlavní úlohu zastává CDK5 ve vývoji nervové soustavy.

#### CDK5 v interakci s mikrotubuly a mikrotubul asociovanými proteiny

##### *Acetylace mikrotubulů*

CDK5 se přímo podílí na acetylaci a deacetylaci mikrotubulů. Mikrotubuly jsou deacetylovány proteinem Sirtuin-2, který je přímo inhibován fosforylací kinázou CDK5 na Serinu 331 (Pandithage et al., 2008). Zvýšená acetylace tubulinu vede k jeho zvýšené stabilitě (North et al., 2003).

##### *CRMP2*

CDK5 reguluje CRMP2 a jeho vazbu na mikrotubuly přes dvě dráhy a to buď fosforylací, nebo defosforylací. K fosforylací dochází přímo a to přes signální dráhu Semaforinu3A, kdy je CDK5 po navázání Sema3A na svůj receptor aktivována kinázou Fyn na Tyrosinu 15 (Sasaki et al., 2002). Dále asociací CDK5/p35 přes protein  $\alpha$ 2-chimaerin dochází k fosforylací CRMP2 na Ser522 (Brown et al., 2004), tato fosforylace pak iniciuje další fosforylací kinázou GSK3 $\beta$  a ta způsobuje snížení vazby na mikrotubuly, rozpad růstového kužele a navádění axonu (Fukata et al., 2002).

K inhibici fosforylace může napomáhat CDK5 nepřímo. V reakci na neurotrofín faktor a neurotrofín-3 CDK5 fosforyluje protein Axin na Threoninu 485. Toto místo sousedí s vazebnou doménou Axinu pro GSK3 $\beta$ . Fosforylace pozměňuje konformaci tohoto vazebného místa a usnadňuje tím vazbu Axinu na tuto kinázu. Vazbou Axinu dochází k inhibici GSK3 $\beta$  pravděpodobně umožněním její další fosforylace kinázou Akt na Serinu 9. Snížením aktivity GSK3 $\beta$  dochází ke snížení fosforylace proteinu CRMP2 (Fang et al., 2011). Defosforylovaný protein má větší afinitu k mikrotubulům a tím pádem udržuje mikrotubulární stabilitu (Fukata et al., 2002). Podobný mechanismus už byl navržen i u fosforylace proteinu Tau (Plattner et al., 2006).

### ***Další mikrotubul asociované proteiny (MAP)***

Mezi další proteiny fosforylované kinázou CDK5 patří například MAP1B, Tau, tubulin polymerization-promoting protein (TPPP), či stathmin.

TPPP/p25 je ve velké míře přítomen v nervových shlicích a Lewyho tělískách u synukleinopathií, jako je například Parkinsonova choroba (Kovacs et al., 2004).

Fosforylace proteinu Tau je regulována přes lokalizaci p35 a p39. Při vývoji mozku je protein Tau přirozeně fosforylován CDK5-p39 na Ser202 a Thr205 a tím je regulována jeho afinita k mikrotubulům, ale není fosforylován CDK5-p35 (Takahashi et al., 2003).

Dalším proteinem asociovaným s mikrotubuly je aktivátor CDK5 p35. Tento protein interaguje s polymerovanými mikrotubuly, ne však s heterodimery tubulinu a je důležitý při vytváření mikrotubulárních spojů. Interakcí s CDK5 může p35 ovlivňovat její aktivitu. Po štěpení proteinu p35 na p25 a p10 pomocí calpainu se ztrácí jeho schopnost vazby na MT (Hou et al., 2007).

## 2.4 Pin1

Jednou z důležitých vlastností proteinů je jejich konformace. Změna konformace proteinu z polohy *cis* do polohy *trans* nebo naopak je důležitou součástí post translačních modifikací a může výrazně ovlivňovat jeho funkce. Protein Pin1 složený ze 163 aminokyselin a o hmotnosti 18 kDa (Lu et al., 1996) je izomeráza, která katalyzuje konformační změnu proteinů z *cis* do *trans* na specifickém motivu - fosforylovaný Ser/Thr-Pro. Tato modifikace může radikálně ovlivnit další fosforylaci a defosforylaci proteinu (Yaffe et al., 1997). Některé známé fosfatázy a kinázy vykazují konformační specifitu (Weiwad et al., 2000; Zhou et al., 2000).

Pin1 se skládá ze dvou domén a to z N-koncové WW domény a C-koncové PPI domény spojené flexibilním spojovníkem (Ranganathan et al., 1997). WW doména je důležitá pro vazbu na fosforylované proteiny a může ovlivnit aktivitu PPI domény v závislosti na fosforylaci vazebného místa (Lu et al., 2002). PPI doména je katalitickou doménou, způsobující konformační změnu cílového proteinu (Lu et al., 1996; Ranganathan et al., 1997). Disregulace proteinu Pin1 se vyskytuje u mnoha chorob. U neurodegenerativních onemocnění byla v mozku pacientů odhalena snížená exprese, nebo oxidace proteinu Pin1 a to jak u Alzheimerovy choroby, kde je Pin1 uložen hyperfosforylovaný v nerozpustných granulárních váčcích (Dakson et al., 2011; Lanke et al., 2018), tak například i u Parkinsonovy choroby (Ryo et al., 2006), nebo Huntingtonovy choroby. Zde bylo dokázáno, že v buňkách s nadexprimovaným proteinem Pin1 dochází ke sníženému hromadění huntingtinu. (Carnemolla et al., 2017).

Důležitou roli hraje Pin1 i v buněčném cyklu a rakovině. V rakovinných buňkách je Pin1 nadexprimován. Podílí se na aktivaci více než padesáti proonkogenů a proliferačních transkripčních faktorů a inhibuje více než 20 tumor supresorových a proliferaci umlčujících faktorů. Proto se o proteinu Pin1 mluví jako o možném terapeutickém cíli léčby rakoviny (Chen et al., 2018; Lu, 2003).

Toto spojení je o to důležitější, nakolik jsou neurodegenerativní onemocnění a rakovina inverzní, neboť u lidí, kteří prodělali rakovinu, byl potvrzen snížený výskyt Alzheimerovy a dalších neurodegenerativních chorob (Lanni et al., 2020; Musicco et al., 2013; Sorensen et al., 1999). Zajímavé je, že specifický polymorfismus genu Pin1 a to rs2233678, vede ke snížené expresi tohoto proteinu a zvýšení rizika AD (Segat et al., 2007). Naopak tento polymorfismus, a tím pádem snížená exprese, vedou ke sníženému riziku vzniku rakoviny prsu a plic (Han et al., 2010; Lu et al., 2011).



### 2.4.1 Substráty

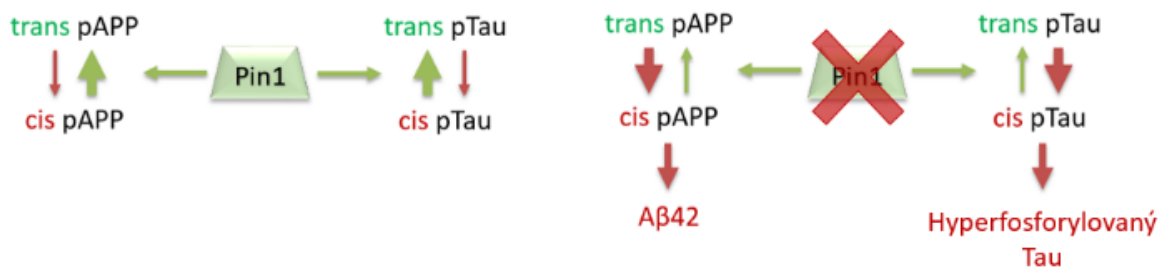
Mezi významné substráty Pin1 patří protein p53, který je ve velké míře deregulovaný v rakovinových buňkách. Studie ukazují, že se Pin1 na p53 váže a mění jeho konformaci. Zároveň oba tyto proteiny spolu s dalšími regulují expresi proonkogenů (Baquero et al., 2019; Grison et al., 2011). Pin1 je nezbytný pro apoptózu buňky při stresu spuštěnou drahou přes p53 a ovlivňuje jak dráhu zahrnující aktivaci transkripce, tak s velkou pravděpodobností i na transkripčně nezávislou (Li et al., 2019; Sorrentino et al., 2013; Zacchi et al., 2002). Inhibice proteinu Pin1 vede ke zvýšené ubiquitinaci proteinu p53 a jeho následné degradaci (Jentsch and Siepe, 2009).

Mezi významné substráty proteinu Pin1 patří proteiny hrající úlohu v neurodegenerativních onemocněních. Kromě již zmíněného huntingtinu, akumulujícího se v neuronech pacientů s Huntingtonovou chorobou (Carnemolla et al., 2017), to je např. APP, Tau a CRMP2, které se akumulují v neurofibrilárních klucích u pacientů s AD (Obr. 6) (Yoshida et al., 1998).

#### **Tau**

I když tento protein obsahuje několik míst, kde by se mohl navázat (pSer/Thr-Pro), váže se Pin1 na pThr231 (Lu et al., 1999). U této fosforylace bylo prokázáno, že se zvyšuje s progresí Alzheimerovy choroby (Hampel et al., 2001). Pin1 však může vázat i jiná místa proteinu Tau, například pT212 a pS235, nebo další fosforylační místa kinázy CDK5-p25 a GSK3 $\beta$  (Kimura et al., 2013; Smet et al., 2004).

Je ukázáno, že vazba Pin1 na pThr231 mění konformaci fosforylovaného proteinu Tau z cis na trans (Kondo et al., 2015). Tím umožňuje jeho defosforylaci fosfatázami PP2A na CDK5 místech, čímž umožňuje vazbu proteinu Tau na mikrotubuly a tím zvyšuje jejich stabilitu (Lu et al., 1999; Zhou et al., 2000). Protilátky proti specifickým cis a trans formám proteinu Tau odhalily mnoho dalších skutečností. Cis konformace znesnadňuje defosforylaci a degradaci proteinu. Takto konformovaný protein se také více vyskytuje v poškozených neuronech u AD a obecně zvýšení cis formy pozitivně koreluje s neurofibrilární degenerací (Kondo et al., 2015; Nakamura et al., 2012).



**Obr. 6: Regulace proteinů Tau a APP isomerázou Pin1**

Nalevo – běžná regulaci proteinů izomerázou Pin1 v mozku, kdy tato izomeráza mění konformaci proteinů přednostně z polohy *cis* do polohy *trans*. Tím protein stabilizuje a v některých případech i umožní jeho defosforylaci. Napravo – situace snížené aktivity Pin1, kdy dochází ke konformačnímu stresu proteinů. Zvyšuje se množství *cis* konformace a to vede k ukládání hyperfosforylovaného proteinu.

## APP

APP je další z proteinů hrající klíčovou roli v Alzheimerově chorobě. Jeho sestřihem  $\gamma$ -secretasou dochází ke vzniku nerozpustného Amyloidu- $\beta$ . Proces sestřihu APP je regulován fosforylací na C-konci APP na T668-P motivu, kdy nefosforylovaný protein APP se vyskytuje v *trans*, zatímco fosforylovaný v *cis* konformaci. Na tento motiv se po fosforylaci váže isomeráza Pin1 a mění jeho konformaci zpět z *cis* na *trans*. Nadexprimování proteinu Pin1 snižuje sekreci  $A\beta$  a jeho umlčení zvyšuje extracelulární hromadění nerozpustného  $A\beta_{42}$  (Pastorino et al., 2006). Za fosforylaci APP je zodpovědné větší množství kináz, mezi nimiž i dříve zmíněná kináza CDK5, či GSK3 $\beta$ . Hyperaktivita GSK3 $\beta$  zvyšuje sekreci  $A\beta$  a její inhibice snižuje množství senilních plaků. Pin1 se na tuto kinázu váže a inhibuje ji. To vede ke snížení sekrece  $A\beta$ , což je druhý regulační mechanismus APP pomocí proteinu Pin1 (Ma et al., 2012).

## CRMP2A

Další z proteinů vyskytujících se v neurofibrilárních shlucích je CRMP2. Má vysokou funkční i strukturní podobnost s Tau, diskutuje se o něm jako o možném cíli pro terapii AD (Hensley and Kursula, 2016). CRMP2 je stejně jako Tau fosforylován mimo jiné kinázami CDK5 a GSK3 $\beta$ . Obsahuje funkčně homologní místo k Ser235 u Tau a to Ser522 na CRMP2B sloužící jako iniciační místo pro další fosforylaci. CRMP2B se neukázal být primárním cílem proteinu Pin1. Tímto substrátem je izoforma CRMP2A, která má jedno fosforylační místo navíc proti CRMP2B a to Ser27. Na tomto místě se také váže protein Pin1 a mění konformaci a stabilizuje CRMP2A, zároveň se může Pin1 vázat i na Ser623 proteinu CRMP2A. (Balastik et

al., 2015). Při inhibici Pin1 dochází k degradaci CRMP2A, snížené stabilitě axonů a rozpadu růstových kuželů (Balastik et al., 2015).

#### **2.4.2 Regulace Pin1 posttranslačními modifikacemi**

Z posttranslačních modifikací podléhá Pin1 v první řadě oxidaci, dále také fosforylaci, SUMOylaci, acetylaci a dalším. Ukazuje se, že posttranslační modifikace Pin1 se mohou lišit mezi zvířecími a buněčnými modely AD, proto je nutné přistupovat ke všem získaným datům obezřetně (Eckerdt et al., 2005).

##### **Fosforylace**

Pin1 je fosforylovaný na několika reziduích, nejdůležitější z nich je residuum Ser16 na N-koncové doméně WW. Na tomto Serinu je Pin1 hyperfosforylován v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Fosforylaci na Ser16 umožňuje cAMP-protein kináza A (PKA). Tato fosforylace zabraňuje translokaci pinu1 do jádra buňky (Lu et al., 2002). Fosforylace na Ser16 může být zajištěna i kinázou Aurora A a Ribozomal protein S6 kinázou 2 (RSK2). Tyto jsou důležité převážně v buněčném cyklu a jejich narušení je významné při tumorogenezi. Celkový vliv fosforylace S16 na funkci proteinu Pin1 není doposud známý (Chen et al., 2020).

Další fosforylace kinázou Polo-like kinase 1 na Ser65 stabilizuje Pin1 (Eckerdt et al., 2005).

Dále je Pin1 fosforylován calmodulin-dependentní Ser/Thr kinázou Death-associated protein kinase 1 (DAPK1) na Ser71 v PPI doméně. Tato fosforylace inhibuje jeho prolyl izomerační aktivitu, nukleární lokalizaci a buněčné funkce (Lee et al., 2011).

##### **Oxidace**

Změny oxidace proteinů byly spojovány s progresí mírného kognitivního poškození (mild cognitive impairment MCI) pacientů směrem k Alzheimerově chorobě. Vlivem oxidativního poškození kyslíkovými radikály dochází také ke snížení aktivity proteinu Pin1 v hipokampu u pacientů s AD a MCI (Butterfield et al., 2006; Sultana et al., 2006). K modifikaci oxidací dochází na Cys113, tato modifikace neovlivňuje vazbu Pin1 k jeho substrátům, ale potlačuje jeho izomerizační aktivitu, což vede k blokaci substrátu. Dále blokuje jadernou lokalizaci, zvyšuje stabilitu Tau a APP a sekreci A $\beta$  (Chen et al., 2015).

V souvislosti se zvýšenou oxidací se mluví také o následném nárůstu ubiquitinilace Pin1 proteinu u pacientů s AD (Tramutola et al., 2018).

## 2.5 Traumatické poškození mozku

Traumatické poškození mozku je definováno jako poranění mozku způsobené vnější mechanickou silou.

Je to jedno z nejčastěji se vyskytujících poranění a nejčastější příčina smrti u dospělých jedinců do 45 let v rozvinutých zemích. Traumatické poškození můžeme definovat jako mírné, střední, nebo závažné. Nejznámější je rozdělení dle Glasgowské stupnice hloubky bezvědomí, kdy u mírného poškození dochází ke krátké, či žádné ztrátě vědomí (Meredith et al., 1998). V souvislosti s traumatickým poraněním se dále mluví i o opakovaném traumatickém poranění mozku, kterému jsou nejčastěji vystaveni profesionální vojáci a sportovci. O tomto poranění se často diskutuje mimo jiné v souvislosti s dřívějším nástupem demence, což bylo poprvé popsáno v článku o boxerech již v 70. letech a dále zkoumáno (Corsellis et al., 1973; Roberts et al., 1990). V posledních dvou dekádách vzniklo několik metastudií, kdy bylo porovnáváno velké množství pacientů s diagnostikovaným jak traumatickým poškozením mozku, tak neurodegenerativními onemocněními. Tyto studie naznačují, že převážně u mužů je opakované, či závažné traumatické poškození mozku rizikovým faktorem vzniku Alzheimerovi choroby, či chronické traumatické encefalopatie a dalších (Fleminger et al., 2003; Nordstrom and Nordstrom, 2018).

### 2.5.1 Průběh TBI

Po prvotním impaktu, který způsobuje mechanické poškození mozkové tkáně a může vést ke vzniku léze a poškození neuronů, dochází také k takzvaným sekundárním poškozením, které často vedou k větším problémům, než impakt samotný. Dochází k neregulovanému uvolňování neurotransmiterů a iontů způsobujících oxidativní stres, dále pak k rozpadu axonů, mitochondriálními disfunkcím a dalším událostem způsobených změnou biochemických reakcí v mozku. Tyto události mohou pokračovat i několik měsíců po prvotním poranění.

Patofyziologické reakce, které pokračují několik hodin až dní po prvotním impaktu, zapříčiňuje větší množství faktorů. Například uvolnění  $Fe^{3+}$  iontů z feritinu a transferin, který je způsobený sníženým pH po inpaktu, dojde ke katalýze reakce tvořící reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály. Radikály v procesu peroxidace rozkládají molekuly lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Způsobují mimo jiné zvýšenou permeabilitu cytoplazmatické membrány, mitochondriální disfunkce, nebo sníženou aktivitu adenosintrifosfatázy (Hall et al., 2010).

Důležitou úlohu v sekundárním poškození má nárůst extracelulárního glutamátu. Jeho hladiny jsou regulovány transportéry excitatorních aminokyselin (excitatory amino acid transporters (EAATs) umístěnými na postsynaptických membránách neuronů a astrocytů (Dorsett et al., 2017; Hinzman et al., 2012). Glutamát způsobuje prodlouženou excitaci neuronů, která může vést až k excitotoxicitě. Přes NMDA receptory dochází v neuronech a gliích k influxu vápenatých iontů do nitra buněk a zároveň uvolnění těchto iontů z intracelulárních zásobáren. Ca<sup>2+</sup> pak modifikují další buněčné procesy.

Na homeostáze iontů při TBI se velkou měrou podílejí gliové buňky, které udržují homeostázu uvnitř mozku a svým působením mohou buď akcelarovat opravu tkáně, nebo způsobit neuronální léze. Mezi prvotní reakce na poranění patří astroglióza, neboli hromadění reaktivních astrocytů v místě poranění. Zároveň astrocyty v různých částech mozku vykazují rozdílnou reakci na poškození. Pro komunikaci a následný urychlený pohyb astrocytů do místa poškození jsou důležité vápenaté a sodné ionty a právě tyto astrocyty zpracovávají a reagují na ně různým způsobem v hipokampu a kortexu. Konkrétně hipokampální neurony exprimují méně NCX proteinu, což je sodno-vápenatý výměník (Hwang et al., 2006; Zhao et al., 2008; Ziemens et al., 2019).

Stejně jako astrocyty jsou po TBI aktivovány i mikroglie, které migrují do místa poškození mozku po koncentračním gradientu bradikininu (Bar and Barak, 2019). Pro migraci je také důležitý influx sodných a vápenatých iontů pomocí NCX receptoru (Ifuku et al., 2007). V místě léze pak mikroglie mohou sekretovat cytotoxické cytokiny a neurotrofní faktory, což může vést k hypersenzitivitě. Mikroglie také mohou sekretovat TGF- $\beta$  a tím upregulovat expresi NKCC1 a prodlužovat záchvatový stav v mozku (Wang et al., 2017).

Celkově vede traumatické poškození ke zhoršení kognitivních schopností, poruchám paměti, soustředění a učení (McInnes et al., 2017). Tyto funkce jsou lokalizovány v hipokampu, který je díky svému anatomickému umístění chráněn před primárním poraněním souvisejícím s TBI. Proto nejsou v hipokampu pozorovány žádné léze, ani přímé ztráty neuronů. Zároveň je však hipokampus náchylnější na sekundární poranění v důsledku změny biochemických procesů. Nejvíce je diskutována právě prodloužená excitabilita neuronů. Až 48 hodin po impaktu přijímají buňky vápenaté ionty z extracelulárního prostředí a uvolňují vápenaté ionty z intracelulárních zásobáren. K těmto prvotním procesům přispívají NMDA receptory. Po úderu dochází u jedinců k akutní excitotoxicitě a to několika způsoby. Ta poté umožní influx iontů do buněk neuronů (Gurkoff et al., 2012).

## 2.5.2 Vliv TBI na rozvinutí chorob

Traumatické poškození mozku je rizikovým faktorem vzniku neurodegenerativních onemocnění a to převážně tauopathií. Mezi tyto nemoci patří i Alzheimerova choroba (Guo et al., 2000; Nordstrom and Nordstrom, 2018) a chronická traumatická encefalopatie (Omalu et al., 2005), které se ve své patologii mírně liší, například rozdílnou konformací proteinu Tau (Falcon et al., 2019). U obou ovšem v prvotní tvorbě patologie dochází k změně konformace proteinu Tau z přirozené a mikrotubuly stabilizující formy *trans* do formy *cis* a za změnu této konformace je zodpovědná izomeráza Pin1 (Kondo et al., 2015; Nakamura et al., 2012). Forma *cis* se ukládá ve formě NFT.

## 2.5.3 Kinázy CDK5 a GSK3 $\beta$ při TBI

Další s patologií TBI je opět způsobena zvýšeným influxem vápenatých iontů, kdy už bylo dříve popsáno, že tento influx způsobuje nárůst koncentrace p25 proteinu v buňkách, což je aktivátor kinázy CDK5 (Patrick et al., 1999). Po TBI a dalších úrazech způsobujících dlouhodobou excitaci neuronů dochází v prvotním krátkodobém stádiu ke zvýšení aktivity GSK3 $\beta$  a poté je pozorováno snížení její aktivity a fosforylace na jejích residuích (Zhao et al., 2012). Tyto změny aktivity také ovlivňují protein CRMP2 po TBI. Z dalších studií vyplývá, že snížení fosforylace u CRMP2 na residuích pro GSK3 $\beta$  může snížení primingové aktivity CDK5 v delším horizontu po TBI (Wilson et al., 2014).

## 2.5.4 CRMP2 TBI

Disregulace kináz po TBI vede ke změně fosforylace proteinu CRMP2. Zároveň může vlivem aktivace calpainu po influxu vápenatých iontů, který je s TBI spojen, docházet ke zvýšenému štěpení proteinu. Je dokázáno, že protein CRMP2 napomáhá rekonvalescenci po TBI a snižuje poškození paměti (Sun et al., 2020).

Zároveň samotný protein má efekt i na influx vápenatých iontů ve spojení s NMDA receptory (Brittain et al., 2012a). Jelikož TBI způsobuje v mozku a dokonce i jeho jednotlivých částech velké množství rozdílných efektů, je těžké najít jednoho společného jmenovatele. V tomto je TBI podobné AD. Dosud není známá přesná regulace proteinu CRMP2 po TBI, ale výzkum naznačuje tento protein jako potenciální vhodný terapeutický cíl pro léčbu a zmírnění následků TBI.

### **3 Cíle práce**

#### **Hypotéza:**

Protein p25 hyperaktivuje kinázu CDK5, což vede ke zvýšení fosforylace CRMP2A na Ser27. Zároveň snížení aktivity isomerázy Pin1 vede k destabilizaci, neboli větší degradaci solubilní frakce CRMP2A. Absence Pin1 vytváří konformační stres, který se projevuje akumulací hyperfosforylovaného, insolubilního CRMP2, tak jak je pozorujeme například u pacientů s AD.

Traumatické poškození mozku indukuje podobné procesy in vivo a zvyšuje fosforylaci a insolubilitu CRMP2 in vivo, která je ještě potencována u p25 transgenních a Pin1 deficitních myší.

#### **Cíle práce:**

1. Zavedení metody opakovaného mírného traumatického poškození mozku.
2. Analýza fosforylace proteinu CRMP2A v myším modelu s expresí transgenu p25 pod neuron specifickým promotorem (Neuron-specifická enoláza, ENO2), v myším modelu Pin1 deficiencie a v kombinaci obou. Stanovení změn rozpustnosti a fosforylace u modelu traumatického poškození mozku v daných genotypech.
3. Analýza fosforylace CRMP2B a CRMP2A na C konci proteinu u modelu traumatického poranění mozku za stavu zvýšené exprese p25 a deficiencie Pin1.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

V této práci byla použita laboratorní zvířata dlouhodobě patřící laboratoři molekulární neurobiologie fyziologického ústavu akademie věd. Byly použity Pin1KO na pozadí C57Bl/6J myši popsané v Balastik 2015 (Balastik et al., 2015) a p25tg myši s vneseným genem pro p25, aktivační protein kinázy CDK5. Jedná se o linii FVB/N-Tg(Eno2CDK5R1)1Jdm/J (The Jackson laboratory). Tyto dvě linie myši byly nakříženy a byl vytvořen dvojitý mutant p25tg/Pin1KO.

#### 4.1.2 Protilátky

**Tabulka 1: Protilátky použité při imunodetekci po WB a imunohistochemickém barvení**

<b>Primární protilátky</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Ředění pro WB</b>	<b>Ředění pro IHC</b>
Anti-CRMP2 antibody (9F)	Myší monoklon.	WAKO	1:5000	1:150
Anti-pSer27 CRMP2A	Králičí polyklon.		1:20000	1:1200 + 1:700 nefosfo peptid
Anti-pSer522 CRMP2 (S761B)	Ovčí polyklon.	MRC PPU Reagents	1:1000 + 1:4000 nefosfo peptid	
Anti-CRMP2 phospho Thr509 + Thr 514	Ovčí polyklon.	MRC PPU Reagents	1:1000 + 1:8000 nefosfo peptid	1:250 + 1:1000 nefosfo peptid
Anti-CRMP2A	Králičí polyklon.		1:10000	1:1000
Anti-GFAP antibody	Myší monoklon.	Sigma Aldrich		1:600
anti-GAPDH	Králičí polyklon.	Sigma Aldrich	1:30000	
<b>Sekundární protilátky</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Ředění pro WB</b>	<b>Ředění pro IHC</b>
Vectastain ABC Kit anti-rabbit	Anti - králík	Vector Laboratories		1:400
Vectastain ABC Kit anti-mouse	Anti - myš	Vector Laboratories		1:400
donkey anti-sheep 555	Anti - ovce	Life Technologies		1:400
anti-mouse HRP	Anti - myš	Life Technologies	1:1000	
goat anti-rabbit HRP	Anti - králík	Life Technologies	1:1000	
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 conjugate	Anti - králík	Life Technologies		1:400
Alexa Fluor® 405 Goat Anti-Mouse IgG	Anti - myš	Life Technologies		1:400
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 conjugate	Anti - myš	Life Technologies		1:400



### 4.1.3 Ostatní chemikálie

**Tabulka 2: Přehled použitých chemikálií**

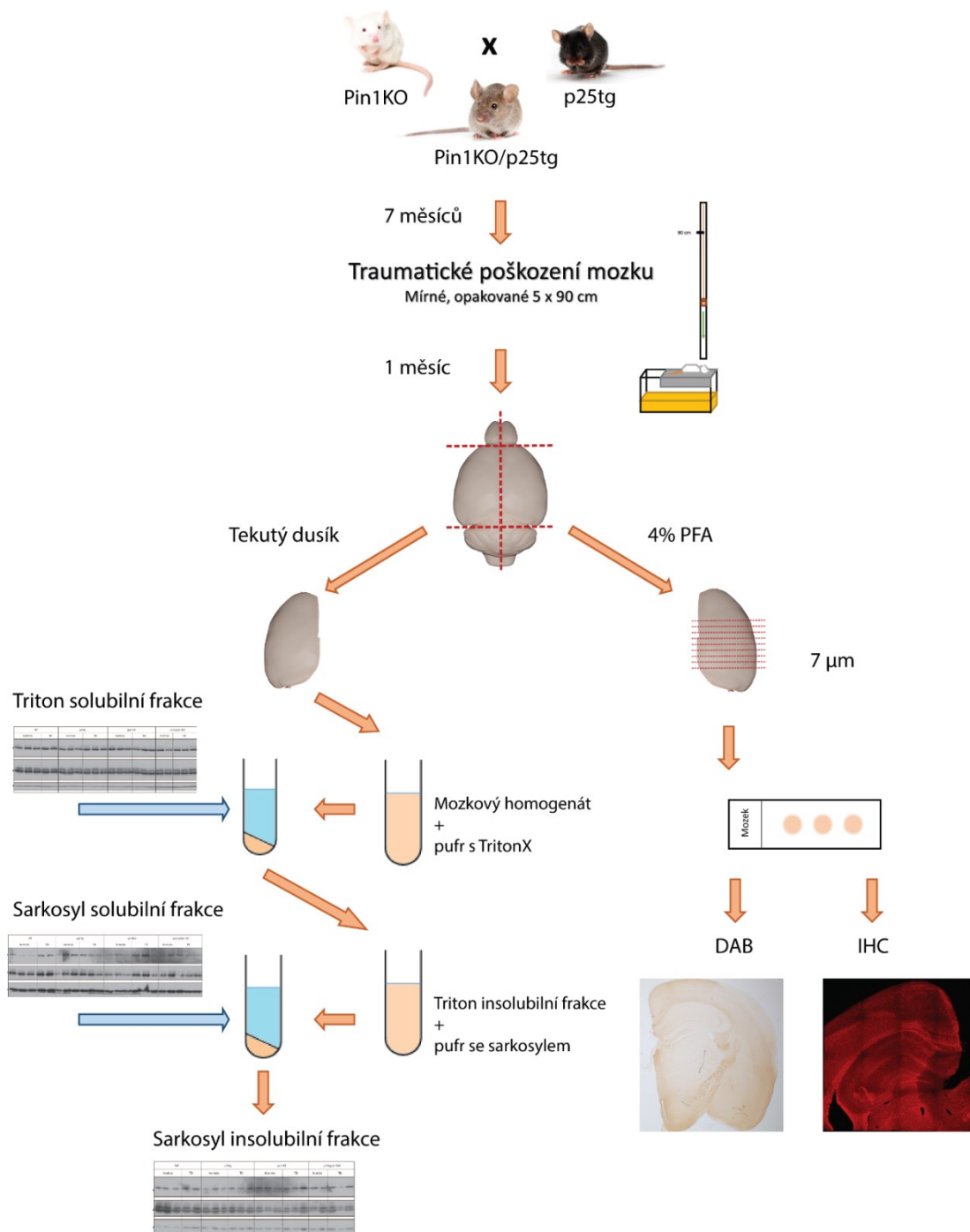
Výrobce	Chemikálie
Aspen	Emla
BIOGEN	Dream Taq Green Buffer, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Gene Ruler DNA Ladder Mix
Bioveta	Rometar
Sigma-Aldrich	Tetramethylethylenediamine (TEMED), Triton X-100, Tween 20, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 99.8+%, Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution, Agaróza, Albumin, from bovine serum, Bromphenol Blue Indicator, kyselina kumarová, mix deoxynukleotidů, Ethylendiamine-tetraacetic acid disodium salt hydrate (EDTA), Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), diethylamin, Eukitt (Quick hardening mounting medium), glycerol, glycin, HEPES (hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer), Luminol, Mercaptoethanol, Mowiol, paraformaldehyd, N-lauryl sarkosyl, Fluorid sodný (NaF), chlorid sodný (NaCl), ortovanadát sodný (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ), chlorid hořečnatý (MgCl <sub>2</sub> ), peroxid vodíku (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Nippon genetics	Midori Green Advance DNA stain
Penta	Sacharóza, hydroxid sodný
P-LAB	kyselina boritá
Roche	cOmpete, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials, cOmpete (mini), EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials
Roth	Milchpulver
Sanofi	Ibalgin baby
Serva	Coomassie Brilliant Blue R 250
ThermoFisher	PAGE ruler Plus prestained protein ladder, SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Femto)
Vector	Antigen unmasking solution, citric acid based
Vetpharma animal health	Isoflurin
Virbac	Zoletil
VWR	Xylen, ethanol, methanol, isopropanol, kyselina octová, kyselina chlorovodíková (HCl)
Ybux	DAB+, liquid

#### 4.1.4 Roztoky a pufrů

**Tabulka 3: Přehled použitých roztoků a pufrů a jejich složení**

Roztoky a pufrů	Složení/Příprava
TBS (Tris buffered saline)	100 mM TrisCl (pH7,5), 0,9 % NaCl ve vodě
PBS (Phosphate-buffered saline)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a do 1000 ml doplnit vodou, vyrovnat pH pomocí HCl na 7,4
10x SDS pufr pro elektroforézu	30,3 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS v 1 l vody
10x Transfer pufr wet	58 g Tris, 29 g Glycin, 37 g SDS v 800 ml vody
10x Transfer pufr semi-dry	58 g Tris, 29 g Glycin, 37 g SDS v 800 ml vody
Odbarvovací roztok	250 ml methanolu, 50 ml kyseliny octové, 200 ml vody
Coomasie	5 g Coomasie brilliant blue R-250, 1 l methanolu, 200 ml kyseliny octové, 800 ml vody
Vyvolávací roztok	333 µl TrisCl (pH 8,8), 25 µl luminol (250 mM v DMSO), 25 µl p-kyseliny kumarové (40 mM v DMSO), 1 µl peroxidu vodíku v 5 ml vody
Lyzační pufr pro extrakci DNA	100 mM TrisCl (pH8.5), 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl ve vodě
Lyzační pufr s Tritonem pro extrakci proteinů	2,5 ml HEPES (pH 7,4, filtrovaný, 1M), 1,5 ml NaCl (5M), 5 ml glycerolu (100%), 5 ml TritonX-100 (10%), 75 µl MgCl <sub>2</sub> (1M), 250 µl EGTA (0,2M), 50 µl DTT (1M), 100 µl Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (500mM), 5 ml NaF (1M), tableta inhibitoru proteáz
TBE (tris-borát-EDTA)	108 g Tris, 55 g kyseliny borité a 7,5 g EDTA rozpustit v 1 l destilované vody
Vzorkovací pufr (SB) 1x	Tris Cl (pH8.8) 50 mM, 2 % SDS, 2 % β-mercaptoethanol, 10 % glycerol, 0,1 % bromfenolová modř
HSB (High salt/High sucrose buffer)	TrisCl (pH 7,3) 10mM, NaCl 0,8 M, EGTA 10 mM, Sacharóza 10 %, NaF 20 mM, Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mM, tableta inhibitory proteáz

## 4.2 Metody



**Obr. 7: Schéma prováděného experimentu detekce rozpustnosti CRMP2A v mozku**

U myší 4 genotypů WT, p25tg, Pin1KO a p25tg/Pin1KO bylo v 7 měsících věku provedeno opakované mírné traumatické poškození mozku u poloviny myší. Po dalším měsíci byl preparován mozek a rozdělen na dvě poloviny. Polovina byla zalita do parafinu, krájena a barvena imunochemickým barvením (IHC). Druhá polovina byla homogenizována a rozdělena centrifugací na 3 frakce: triton solubilní, sarkosyl solubilní a sarkosyl insolubilní frakci. Proteiny v těchto frakcích byly detekovány pomocí Western blotu (WB).

#### 4.2.1 Genotypování modelových zvířat

Myši byly genotypovány na potvrzení genotypů Pin1KO (Pin1 knock out), p25tg (p25 transgen) a p25tg/Pin1KO (Pin1 knock out p25 transgen – dvojitý mutant). Pro účely genotypování byl myším odstrižen konec ocásku. Tkáň byla nejprve lyzována v 500 µl lyzačního pufru obsahujícího 1,87 µl proteinazy K a poté inkubovaná přes noc při 55°C v termomixéru (Mixing Block MB – 102), při rychlosti třepání 600. Lyzované vzorky byly zvortexovány a stočeny na stolní centrifuze (eppendorf centrifuge 5424) při maximálním rpm 5 minut. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky (eppendorf) a bylo k němu přidáno 50 µl 3M ostanu sodného (pH 5,2) a 500 µl isopropanolu. Po protřepání byly vzorky inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky opět stočeny (5 min. max. rpm). Supernatant byl odpipetován a pelet omyt 70% ethanolem. Po opětovném stočení (5 min. max. rpm) byl ethanol odpipetován a bylo k DNA přidáno 200 µl vody, ve které byla DNA rozpuštěna. Pro úplné rozpuštění byl vzorek třepán v termomixeru po dobu 30 minut při 37 °C.

Extrahovaná DNA byla amplifikována metodou PCR s použitím specifických primerů zobrazených v tabulce 4. Složky PCR směsi jsou popsány v tabulce 5 a tabulce 6 a teplotní podmínky a časové profily pro jednotlivé genotypy v tabulkách 7 a 8.

**Tabulka 4: Přehled primerů použitých k amplifikaci vzorků DNA**

Název primeru	Nukleotidová sekvence	Výrobce	Autor
p25-oIMR0958	5' TGTCCAATTATGTCACACC 3'	Merck	Barbora Pukajová
p25-oIMR0959	5' TCCTCCTCAGTCAAGAAAGCC 3'	Merck	Barbora Pukajová
p25-oIMR8744-control-F	5' CAAATGTTGCTTGTCTGGTG 3'	Merck	Barbora Pukajová
p25-oIMR8745-control-R	5' GTCAGTCGAGTGCACAGTTT 3'	Merck	Barbora Pukajová
MB-Pin1WT-R	5' GGATTAGAAGCAAGATTCGACT 3'	Merck	(Balastik et al., 2015)
MB-Pin1KO-R	5' CCACTTCCTGTTCTGCAAAC 3'	Merck	(Balastik et al., 2015)
MB-WT-KO-F	5' CCGATCCTGTTCTGCAAAC 3'	Merck	(Balastik et al., 2015)

**Tabulka 5: Složky PCR směsi pro určení genotypu myši pro p25tg**

Komponenty reakce	Finální koncentrace
ddH <sub>2</sub> O	/
10x Green Buffer	1,00 X
10 mM dNTP	0,20 mM
MB-Pin1 WT-R	1,00 uM
MB-Pin1 KO-R	1,00 uM
MB-WT-KO-F	1,00 ul
5 U/ul Taq DNA Polymerase	0,03 U/ul
DNA	

**Tabulka 6: Složky PCR směsi pro určení genotypu myši pro Pin1KO**

Komponenty reakce	Finální koncentrace
ddH <sub>2</sub> O	/
10x Green Buffer	1,00 X
10 mM dNTP	0,20 mM
20 uM oIMR0958 p25 1	1,00 uM
20 uM oIMR0959 p25 2	1,00 uM
20 ul oIMR8744 p25 cont. F	0,50 ul
20 uM oIMR8745 p25 cont. R	0,50 uM
5 U/ul Taq DNA Polymerase	0,03 U/ul
DNA	

**Tabulka 7: teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro *Pin1* DNA**

Fáze PCR reakce pro stanovení <i>Pin1</i>	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	3 min	95	1
Denaturace DNA	A: 50 vteřin B: 45 vteřin	95	A: 8 B: 35
Annealing	A: 40 vteřin B: 30 vteřin	A: 68 B:60	
Extenze	2 min	72	
Finální extenze	3 min	72	1

**Tabulka 8: teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro p25 DNA**

Fáze PCR reakce pro stanovení p25	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	1,5 min	94	1
Denaturace DNA	30 vteřin	94	35
Annealing	1 min	54	
Extenze	1 min	72	
Finální extenze	2 min	72	1

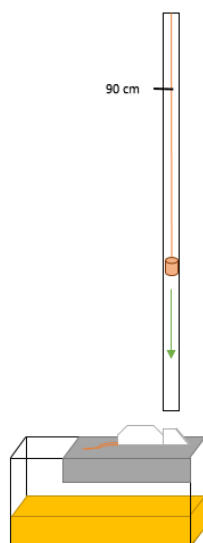
Dále byl produkt PCR reakce nanesen na gel a provedena elektroforéza v TBE pufru. Pomocí UV světla byla zviditelněna namnožená DNA a určen genotyp zkoumaných myší.

#### **4.2.2 Opakované mírné traumatické poškození mozku**

V 7 měsících věku bylo u myší provedeno opakované mírné traumatické poškození mozku dle protokolu publikovaného v (Kane et al., 2012) a podle protokolu pokusu schváleného odbornou resortní komisí AV ČR. K modelaci opakovaného mírného traumatického poškození bylo využito závaží s přilepenou kovovou ploškou (pro zacílení) o hmotnosti 50 g spouštěné na myš z výšky 90 cm.

Myš byla pro účely pokusu umístěna na hliníkovou fólii, přes kterou mohla po nárazu volně propadnout až na měkkou podložku pod sebou (Obr. 8). Kontrolní zvířata prošla celou procedurou vyjma impaktu.

Myš byla anestetizována inhalací 3,5% isofluranu (Vetpharma animal health) po dobu 1,5 minuty a po usnutí okamžitě položena na připravenou hliníkovou folii s hlavou v cestě padajícího závaží. Závaží bylo spuštěno z výšky 90 cm a po impaktu došlo k propadnutí myši fólií na podložku. Na myší hlavu byla nanesena mast Emla (Aspen) pro místní anestezii a myš byla navrátna zpět do klece. Klec byla položena na zahřevnou podložku, pro lepší rekonvalescenci. Proces se opakoval denně po dobu pěti po sobě jdoucích dní v přibližně stejnou hodinu – mezi 15:00 a 17:00. Myším byla po celou dobu experimentu a tři dny po posledním impaktu podávána voda s rozpuštěným analgetikem ibuprofenem (Sanofi).



**Obr. 8: Schématické znázornění modelu traumatického poškození mozku**

Myš je umístěna na hliníkovou folii a z výšky 90 cm je na její hlavu spuštěno závaží. Po impaktu myš propadne na měkkou podložku pod sebou.

#### **4.2.3 Perfuze myši a zpracování vzorků tkáně**

Po jednom měsíci po traumatickém poškození byly myši usmrceny metodou perfuze dle následujícího protokolu.

Uspaná myš 150  $\mu$ l 10% roztoku zoletil/rometar v PBS a byla ponechána deset minut v kleci do úplného nevědomí. Dále byla upevněna na podložku a byl umožněn přístup k srdci rozříznutím hrudníku a odklopením žeber. Pro správnou perfuzi bylo nutné nastříhnout pravou srdeční předsň a přes levou srdeční komoru vsunout jehlu do aorty. Myš byla perfuzována přes srdce, dvě minuty, za použití PBS pomocí peristaltického čerpadla.

Mozek myši byl následně preparován a sagitálně rozdělen na dvě poloviny. První polovina byla zmrazena v tekutém dusíku a uchována v tekutém dusíku pro western blot analýzu. Druhá polovina mozku byla vložena do 4% roztoku PFA. Mozky byly nejprve přes noc v PFA a poté koronálně rozděleny na třetiny. Následně byly vzorky přečištěny ethanolem a zality do parafínu na zalévací stanici.

#### 4.2.4 Krájení řezů

Vzorky byly krájeny pomocí mikrotomu (Leica RM2255) na 7 $\mu$ m plátky. Řezy byly následně napínány na 40°C ve vodní lázni (Medite) po dobu 30 minut a poté přeneseny na sklíčko. Sklíčka byla sušena nejprve na sušící podložce (Medite) po dobu alespoň 30 minut při 42°C a poté přes noc v inkubátoru (VWR) při 37 °C.

#### 4.2.5 Imunohistochemická barvení

Řezy na sklíčkách byly barveny více způsoby na přítomnost a lokalizaci konkrétních proteinů a na prokázání proteinových agregátů.

Sklíčka prošla deparafinizační řadou:

1. 2 x 10 minut xylén
2. 2 x 10 minut 96% ethanol
3. 3 minuty 90% ethanol
4. 3 minuty 70% ethanol
5. 3 minuty 50% ethanol
6. 2 x 3 minuty PBS

Poté podrobena odmaskování, které bylo prováděno podle typu protilátky.

Do 100 ml vody byl přidán 1 ml Unmasking solution (Vector). Sklíčka byla vložena do unmaskovacího roztoku a vařena v mikrovlnné troubě nejprve při výkonu 700 W, než začala vařit a poté na nižší výkon 400 W byla dále vařena po dobu 3 minut. Po vyjmutí byl odpařený roztok doplněn PBS, aby nedocházelo k vysušení řezů, a celý roztok byl ponechán vychladnout na pokojovou teplotu.

Poté došlo na samotný proces barvení dle následujících protokolů.

#### 4.2.6 Barvení DAB

Okolo řezů byly na sklíčku namalovány kruhy parafínovou fixou (Vector). Na řezy byl nanesen 3% peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) v PBS na dobu 15 minut. Poté byla sklíčka promyta 3 x 5 minut v PBS-T (PBS + 0,2% Tween). Na řezy byl nanesen blokovací roztok 1% BSA v PBS-T na 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Na řezy byla nanesena primární protilátka v potřebné koncentraci (tabulka 1) v 1% BSA a probíhala inkubace přes noc při 4°C. Sklíčka byla opět promyta v PBS-T 3 x 5 minut. Na řezy byla nanesena sekundární myší či králičí protilátka v poměru 1:200 v 1% BSA a probíhala inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě. Sklíčka byla promyta v PBS-T 3 x 5 minut. Na řezy byla nanesena terciální protilátka smíchaná z A a B (kit Vector) každé v poměru 1:100 v 1% BSA a probíhala inkubace 1 hodinu při pokojové



teplotě. Sklíčka byla promyta v PBS-T 3 x 5 minut. Signál byl zviditelněn přidáním mixu DAB (4,5 ml PBS, 0,5 ml Diaminobenzidine a 17 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – vývoj byl sledován pomocí optického mikroskopu (Nikon H600L). Sklíčka byla dvakrát promyta v PBS a poté prošla zpět xylen ethanolou řadou. Po promytí v xyleny byla sklíčka zalita Eukitem (Sigma) a překryta krycím sklem.

DAB barvení bylo pozorováno pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX53).

#### **4.2.7 Imunofluoresenční barvení**

Okolo řezů byly na sklíčko namalovány kruhy parafinovou fixou. Poté byla sklíčka promyta 3 x 5 minut v PBS-T (PBS + 0,2% Tween) Na řezy byl nanesen blokovací roztok 1% BSA (bovine serový albumin) v PBS-T na 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Na řezy byla nanesena primární protilátka v potřebné koncentraci v 1% BSA a probíhala inkubace přes noc při 4°C. Sklíčka byla promyta v PBS-T 3 x 5 minut. Na řezy byla nanesena sekundární protilátka v poměru 1:400 v 1% BSA a probíhala inkubace 2 hodiny ve tmě při pokojové teplotě. Sklíčka byla promyta v PBS-T 3 x 5 minut. Po promytí byla sklíčka zalita Mowiolem s přidáním Hoechstu 1:1000 a překryta krycím sklem. Takto barvená skla byla uchovávána v alobalu při 4°C a sledována ve fluorescenčním mikroskopu (Leica SP8).

#### **4.2.8 Příprava vzorků pro western blot**

Příprava vzorku byla prováděna na ledu. Poloviny mozku z -80 stupňů byly přidány do 4 ml lyzačního pufru a homogenizovány pístovým homogenizátorem. Byl odebrán 1 ml homogenátu, ten byl pak dále sonikován a stáčen ve 4 °C, 20 minut při maximálních otáčkách. Z tohoto byla oddělena první použitá frakce a to frakce triton solubilní, jak je popsáno na schématu (Obr. 7). V této frakci byla určena metodou Bradfordové koncentrace proteinů a byla vyrovnána na 2  $\mu$ g/ $\mu$ l u všech vzorků.

K peletu bylo přidáno 150  $\mu$ l HSB s 1 % sarkosylu a pelet byl rozpouštěn přes noc při 4 °C a za stálého překlápění. Další den bylo odebráno 150  $\mu$ l vzorku a stočeno na ultracentrifuze 30 min, při 20 °C na 68000 rpm. Supernatant byl odebrán a smíchán s 50  $\mu$ l 4x koncentrovaného nanášecího pufru. Toto je sarkosyl solubilní frakce. Pelet byl rozsuspendován v 30  $\mu$ l 1x koncentrovaného nanášecího pufru, sonikován 15 min při 25 kHz v sonikátoru při 4 °C, toto je sarkosyl insolubilní frakce.

Poté byly vzorky povařeny 10 min při 98 °C a nanášeny na gel.

## 4.2.9 SDS polyakrylamidová elektroforéza

Proteiny jsou rozděleny na gelu podle své molekulové hmotnosti.

### *Příprava gelu*

Do aparatury byla uchycena skla a byl do nich nalit roztok pro rozdělovací gel (tabulka 9), přibližně 1,5 cm pod okraj skel a převrstven isopropanolem. Po ztuhnutí (~40 minut) byl gel opláchnut vodou a vysušen. Poté byla nalita druhá vrstva zaostřovacího gelu a vložen hřebínek. Po ztuhnutí gelu (~20 minut) byl hřebínek vyjmut a gel nejméně na jeden den uložen do lednice obalený mokřým papírem, aby nedošlo k jeho vysušení.

**Tabulka 9: Složení gelů na SDS-page elektroforézu, startovací a 7,5% rozdělovací**

Chemikálie	Typ gelu a koncentrace			
	Rozdělovací gel 7,5%		Zaostřovací gel	
H <sub>2</sub> O		11,04 ml		3,73 ml
1,5M TrisCl	pH 8,8	5,75 ml	pH 6,8	0,625 ml
Akrylamid 30% (w/v)		5,75 ml		0,53 ml
SDS 10% (w/v)		230 µl		50 µl
APS 10% (w/v)		115 µl		50 µl
TEMED		11,5 µl		5 µl
Celkový objem	23 ml - 2 velké gely		5 ml - 2 velké gely	

### **Elektroforéza:**

Gely byly vloženy do vaničky aparatury (eppendorf) a zality SDS pufrem až po okraj. Poté byly na gel nanášeny vzorky, které byly předtím vortexovány. Vzorky byly tradičně nanášeny v objemu 15 µl. Po nanesení vzorků a žebříčku pro stanovení molekulové hmotnosti proteinů, byla aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného napětí (VWR). Vzorky putovaly při napětí 100 V až do konce zaostřovacího gelu, poté byl proud zvýšen na 115 – 120 V. Po rozdělení byl gel vyjmut a vložen do připravené misky s transferovým pufrem.

#### **4.2.10 Western blot**

Tato metoda slouží k přenosu proteinů z gelu na membránu. Byly použity dva typy, polosuchý (semi-dry) a mokrý přenos (wet).

##### **Semi Dry**

PDF membrána pro přenos proteinů byla inkubována v methanolu po dobu 5 minut a poté v transferovém pufru po dobu 10 minut. Gel byl po elektroforéze vyjmut a oplachován v transferovém pufru po dobu 15 minut. Dále byly v transferu navlhčeny pijáky.

Na aparaturu pro přenos (Bio-rad) byl blot skládán v pořadí piják, membrána, gel a druhý piják. Poté byl co nejlépe vysušen a uzavřen v aparatuře. Přenos probíhal při konstantním napětí 15 V (později zvýšeno na 20 V) a proud nesměl přesáhnout 3 mA na 1 cm<sup>2</sup> vzorku. Přenos trval 2 hodiny.

##### **Wet**

Po inkubaci membrány v methanolu a transferovém pufru a opláchnutí gelu byl poskládán blot a to v pořadí: plastová destička, nasávací houba, 4 pijákové papíry, gel, membrána, 3 pijákové papíry, savá houba a plastová destička. Blot byl uchycen v aparatuře a zalit transferovým pufrům pro wet western. Přenos probíhal přes noc ve 4 °C za stálého míchání při napětí 40 mA.

Po přenosu byla membrána inkubována s Coomasie blue pro zviditelnění proteinů a určení správnosti nanášky po dobu 5 minut. Coomasie byla odbarvena odbarvovacím roztokem po dobu 5 minut a membrána byla oskenována. Byl obtáhnut marker molekulové hmotnosti a membrána opláchnuta v TBS-T (TBS + 0,1% Tween) – 3x5 minut. Poté byla membrána blokována v 5% mléku po dobu 1,5 hodiny.

#### **4.2.11 Imunodetekce**

Pro zviditelnění proteinu byla membrána inkubována se specifickými primárními protilátkami v 5% mléku přes noc ve 4 °C za stálého houpání. Ráno byla membrána opláchnuta 3x5 minut v TBS-T a inkubována se sekundární protilátkou opět v 5% mléku po dobu 1,5 hodiny. Membrána byla opláchnuta TBST a bylo provedeno vyvolávání vyvolávacím roztokem, nebo při horším signálu pomocí roztoku Femto (Thermofisher) v TBS-T 1:3. Membrány byly vyvolávány na film na vyvolávače a filmy poté naskenovány do počítače a hodnoceny.

## **Opakovaná imunodetekce**

Membrána byla po prvním vyvolávání stripována s použitím stripovacího pufru po dobu 30 minut v 55 °C. Poté promyta 4x5 minut TBST a opět blokována 5% mlékem 1,5 hodiny. Po této proceduře mohla být membrána inkubována s další sadou primárních protilátek.

### **4.2.12 Vyhodnocení WB**

Membrány byly hodnoceny v programu ImageJ (Fiji) a poté pomocí Excel 2013 (Microsoft) provedeny výpočty finálních hodnot. Je vypočtena relativní intenzita pruhů odpovídající relativnímu množství proteinu. Celkové hodnoty intenzity byly vztaženy k průměru hodnot WT  $K = 1$  a dále k sobě navzájem. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 7.03. (GraphPad Software) a bylo zde provedeno i statistické hodnocení signifikancí pomocí t-testu a normality rozložení hodnot testem Shapiro – Wilk. Signifikance je značena hvězdičkou a na grafech jsou znázorněni střední chyby průměru. Obrázky byly upraveny v programech PowerPoint 2013 (Microsoft), Photoshop CS6 (Adobe) a Adobe Illustrator CS6 (Adobe).

## 5 Výsledky

### 5.1 Etablování a optimalizace metody opakovaného mírného traumatického poškození mozku

TBI je jedno z rizikových faktorů rozvinutí Alzheimerovy choroby. Existuje více metod, kterými se traumatické poranění v myším mozku způsobuje. Metoda mírného traumatického poranění mozku byla v naší laboratoři etablována po vzoru publikovaného protokolu (Kane et al., 2012), podle projektu pokusu schváleného odbornou resortní komisí. Byly testovány rozdíly ve fosforylaci proteinů po mírném a závažném poranění, kdy při mírném poranění docházelo k menší fosforylaci a patologii u myší. Největší rozdíly ve fosforylaci byly u myší pozorovatelné v 6 měsících věku, což vyplývá z předchozích výsledků laboratoře.

U závažného poranění docházelo u myší k vytvoření hematomu, což následně vedlo ke smrti. Z první skupiny, která absolvovala proceduru úderu z výšky 150 cm, nepřežilo více než 50 % myší. Skupina nejvíce ohrožená TBI se ukázala být Pin1KO, kde přežila pouze 1 myš ze 7. Ve skupině p25tg myší přežilo 40 % a u p25tg/Pin1KO 60 % (tabulka 10). Z WT zahynula pouze 1 myš z 5. Toto naznačuje, že mutantní myší linie mají vyšší riziko smrti po TBI.

U druhé skupiny se testoval vliv věku na poranění, kdy u myší starších 7 měsíců docházelo i při mírnějším poranění k vysoké úmrtnosti.

Třetí skupina byla zvolena z myší ve věku 7 měsíců a traumatické poškození bylo prováděno z výšky 90 cm. Tento postup vykazoval nulovou mortalitu u všech linií a proto byl vybrán pro další analýzu rozpustnosti a fosforylace proteinů.

**Tabulka 10: přehled použitých myší pro pokusy vlivu traumatického poškození mozku.**

<b>1. série</b>					
Genotyp	Výška TBI	Věk myší	Počet myší celkový	Počet myší pro TBI	Přežilo TBI
WT	1,5 m	6 měsíců	8	5	4
p25tg	1,5 m	6 měsíců	13	10	4
Pin1KO	1,5 m	6 měsíců	10	7	1
p25tg/Pin1KO	1,5 m	6 měsíců	8	5	3
<b>2. série</b>					
Genotyp	Výška TBI	Věk myší	Počet myší celkový	Počet myší pro TBI	Přežilo TBI
WT	70 cm	8 měsíců	6	3	2
p25tg	70 cm	8 měsíců	6	3	1
<b>3. série</b>					
Genotyp	Výška TBI	Věk myší	Počet myší celkový	Počet myší pro TBI	Přežilo TBI
WT	90 cm	7 měsíců	5	2	2
p25tg	90 cm	7 měsíců	8	5	5
Pin1KO	90 cm	7 měsíců	7	4	4
p25tg/Pin1KO	90 cm	7 měsíců	5	3	3

## 5.2 Analýza rozpustnosti fosforylovaného proteinu CRMP2A

Pro detekci rozpustnosti a fosforylace proteinu CRMP2A v mozku myši byla využita metoda western blot analýzy a imunohistochemického barvení. Vzorky předního mozku byly odebrány z myši 4 genotypů a to kontrolní (WT), p25tg, Pin1KO a p25tg/Pin1KO. Myši p25tg mají zvýšené množství proteinu p25, který aktivuje kinázu CDK5, která následně fosforyluje protein CRMP2. Deficience Pin1 u Pin1KO způsobuje konformační stres proteinů. Pin1 stabilizuje fosforylované proteiny a v jeho nepřítomnosti dochází ke zvýšené degradaci některých proteinů, nebo hromadění alternativně poskládaných, hyperfosforylovaných proteinů v nerozpustných frakcích mozku.

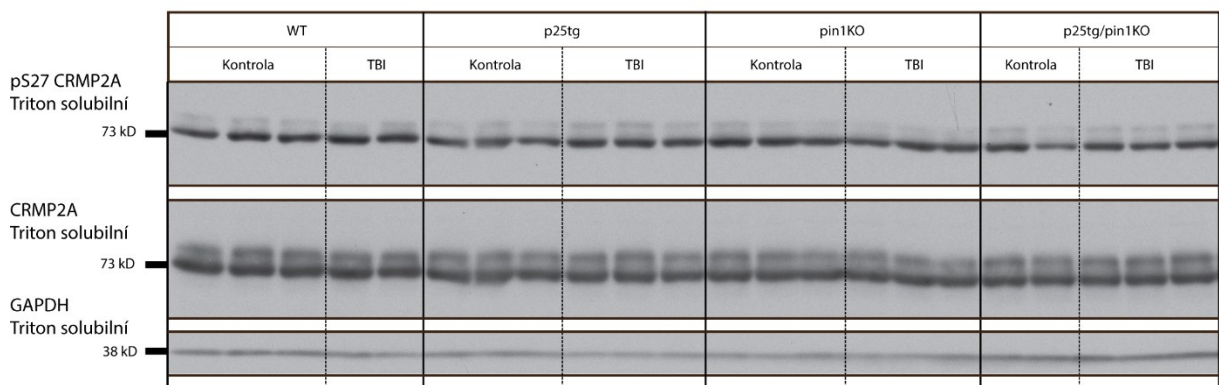
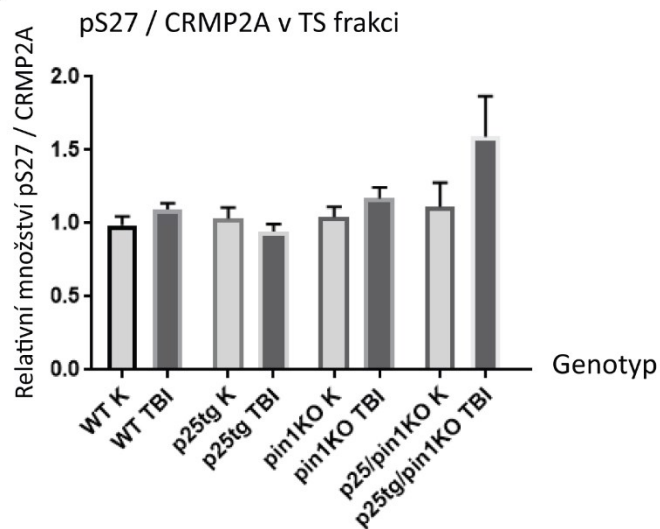
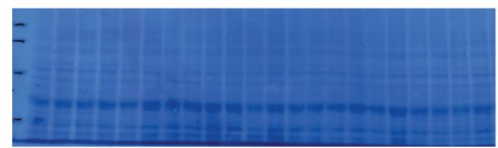
U poloviny myši bylo provedeno traumatické poškození mozku (TBI), polovina vzorků jsou kontroly bez TBI (K). TBI byl použit jakožto rizikový faktor AD indukující nesprávné skládání proteinů a zvyšující aktivitu kinázy CDK5.

V první části práce bylo sestaveno finální schéma experimentu, které můžeme vidět na obrázku 7 v části Metody. Ze vzorků byly extrahovány proteiny na základě rozdílné rozpustnosti v detergentech. Byly separovány tři frakce vzorku. Frakce rozpustná v degergentu Triton X-100 (dále v textu jako triton solubilní TS), frakce rozpustná v n-laurylsarkosylu (dále jako sarkosyl solubilní SS) a poslední a nejméně rozpustná frakce byla rozpuštěna v SDS (sodium dodecyl sulfát, dále jako sarkosyl insolubilní SI). Vzorky byly dlouhodobě uchovávány před zpracováním v kapalném dusíku a po zpracování v -80 °C.

### 5.2.1 Fosforylace proteinu CRMP2A v Triton rozpustné frakci mozkového lyzátu

Nejprve byla separována frakce Triton solubilní. V této frakci se v mozku vyskytuje většina solubilních buněčných proteinů. CRMP2A je fosforylován kinázou CDK5 na Ser27. U p25tg a p25tg/Pin1KO mozkových lyzátů, se zvýšeným aktivátorem CDK5, jsme však překvapivě nepozorovali v této frakci vyšší množství fosforylovaného CRMP2A (Obr. 9, graf B).

Jelikož v této frakci nebyly patrné statisticky významné změny CRMP2A fosforylace, rozhodli jsme se analyzovat CRMP2A fosforylaci v Triton insolubilních frakcích.

**A****B****C**

**Obr. 9:** Analýza fosforylace Ser27 proteinu CRMP2A v Triton solubilní frakci

**A** – Proteiny pSer27 CRMP2A – na Ser27 fosforylovaný protein CRMP2A, CRMP2A – Collapsin responsive mediator protein 2 izoforma A celkový a GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza. U genotypů WT, p25tg, Pin1KO, p25tg/Pin1KO a zacházení: TBI – traumatické poškození mozku a kontrol **B** – Na grafu je znázorněn relativní poměr fosforylovaného k celkovému proteinu CRMP2A u porovnávaných genotypu (WT, p25tg, Pin1KO, p25tg/Pin1KO) a zacházení (TBI – traumatické poškození mozku a kontroly). Z grafu vyplývá, že relativní fosforylace proteinu CRMP2A se mezi genotypy ani zacházeními výrazně nemění. U p25tg/Pin1KO je pozorován trend zvýšení fosforylace po TBI **C** – celkové množství proteinů zviditelněné barvením Coomassie

## 5.2.2 Analýza fosforylace Ser27 proteinu CRMP2A v Triton insolubilní, sarkosyl solubilní frakci

Extrakce sarkosyl solubilní frakce z Triton insolubilních proteinů se používá u mozků pacientů s AD a 3xTg myši k detekci částečně nerozpustné složky proteinů zahrnující například PHF. PHF jsou patrné již při počínající patologii AD a obsahují hyperfosforylované nerozpustné proteiny (Ferrer et al., 2005; Oddo et al., 2003; Perl, 2010).

Rozpustnost proteinů může být ovlivněna izomerázou Pin1, jak to bylo ukázáno u APP, či Tau (Kondo et al., 2015; Pastorino et al., 2006). Při absenci Pin1 dochází ke změně konformace z *trans* do *cis*, která způsobuje ukládání těchto proteinů. Také zvýšená fosforylace proteinů napomáhá k jejich ukládání. To můžeme pozorovat například u modelu p25 tg myši se zvýšenou aktivitou CDK5 (Cruz et al., 2003; Huang et al., 2020).

Námi extrahované protein sarkosyl solubilní frakce ukazují, že většina CRMP2A v této frakci je fosforylována na Ser27, neboť podíl Ser27 fosforylovaného/totálního CRMP2A se u všech kategorií signifikantně neliší od 1 (graf B Obr. 10).

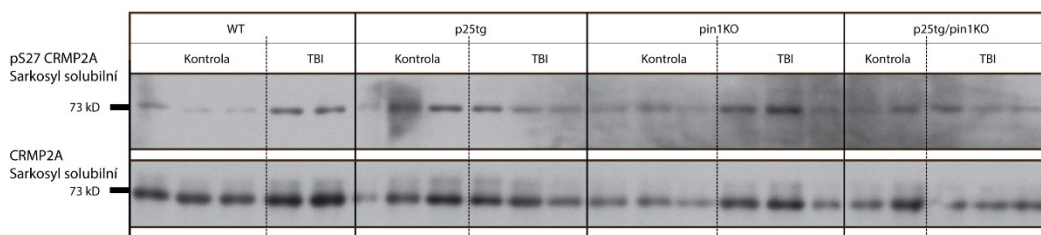
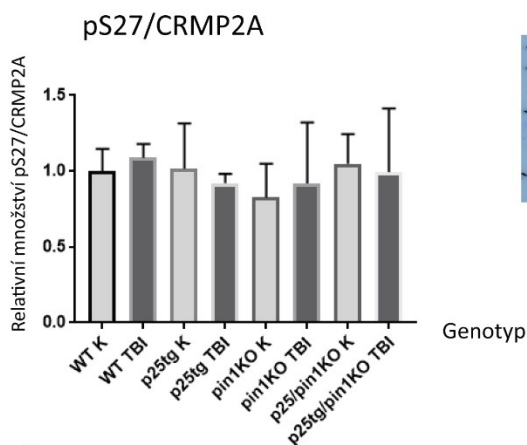
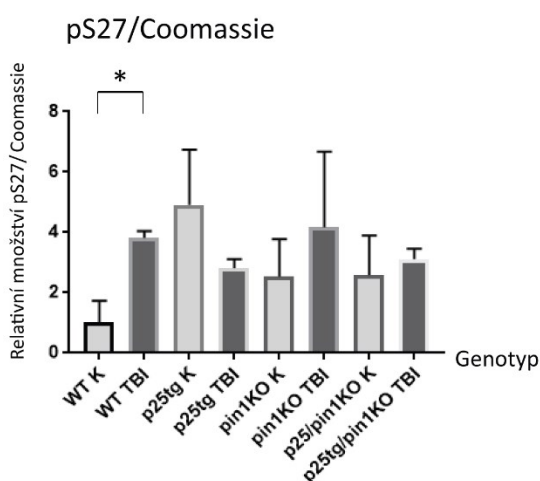
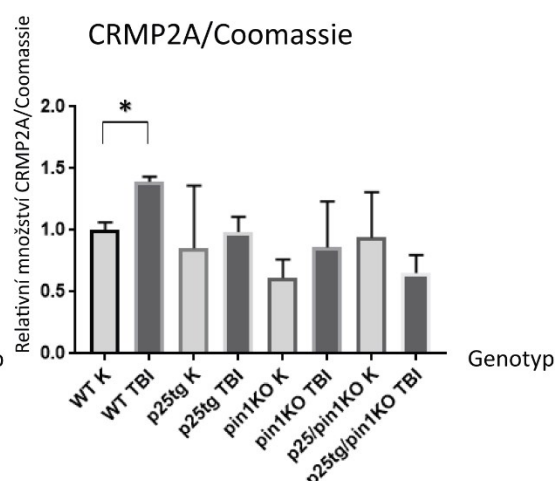
U WT po TBI oproti kontrole (K) je patrné signifikantně zvýšené množství celkového a tím pádem i fosforylovaného proteinu. To odpovídá zvýšené aktivitě kinázy CDK5 po TBI způsobené štěpením p35 proteinu calpainem na aktivátor kinázy p25, který má vyšší poločas rozpadu a způsobuje delší aktivaci kinázy. To potvrzuje i trend zvýšené fosforylace p25tg K, s vneseným aktivátorem, oproti WT K. Překvapivě, TBI u p25tg vedlo ke snížení pSer27 (nesignifikantnímu) oproti p25tg kontrole.

U Pin1KO v této frakci sledujeme trend zvýšení fosforylace a akumulace CRMP2A po TBI, stejně jako u WT, což naznačuje, že tato Triton insolubilní frakce fosforylovaného CRMP2A není ovlivněna deficiencí Pin1 na rozdíl od Triton solubilní frakce, v tom směru, že absence Pin1 vede k destabilizaci phosphorylovaného Ser27 CRMP2A (Balastik, et al 2015). V SS frakci se však také ukazuje snížení celkového množství CRMP2A u Pin1KO K, oproti WT K. To naznačuje, že absence Pin1 může mít efekt na celkovou stabilitu proteinu.

Mutanti p25tg/Pin1KO nevykazují žádné změny fosforylace, ani hromadění CRMP2A. Je tedy možné, že vliv těchto dvou genotypů není aditivní.

Snížení fosforylovaného proteinu u některých genotypů vedlo k otázce, kde se fosforylovaný protein ukládá. Na WB nebylo pozorováno jeho výraznější štěpení, proto jsme se rozhodli zjistit, zda ho můžeme najít v další, méně rozpustné, neboli sarkosyl insolubilní frakci.



**A****B****C****D****E**

**Obr. 10: Detekce fosforylace a rozpustnosti proteinu CRMP2A v SS frakci**

**A** – Proteiny pSer27 CRMP2A - na Ser27 fosforylovaný protein CRMP2A, CRMP2A - Collapsin responsive mediator protein 2 izoforma A celkový u genotypů WT, p25tg, Pin1KO, p25tg/Pin1KO a zacházení: TBI – traumatické poškození mozku a kontrol. **B** – pSer27 vztaženo k celkovému množství CRMP2A. Je patrné vyrovnání hodnot oproti D a E, což naznačuje, že většina proteinu v této frakci bude fosforylovaná a zacházením a genotypy bude ovlivněno i celkové množství proteinu CRMP2A. **C** – barvení membrány coomassie **D** – fosforylace pS27 vztažena ke Coomassie. Pozorujeme nesignifikantní zvýšení fosforylace u WT TBI oproti K. Snížení fosforylace u p25tg TBI oproti K a také zvýšení fosforylace p25tg K oproti WT kontrole. U Pin1KO po TBI trend zvýšení fosforylace a u p25tg/Pin1KO nepozorujeme žádné změny. **E** – celkový CRMP2A ke Coomassie, signifikantní zvýšení WT TBI oproti K.

### 5.2.3 Analýza fosforylace Ser27 proteinu CRMP2A v Triton insolubilní, sarkosyl insolubilní frakci

V sarkosyl insolubilní frakci se vyskytují v mozku nejméně rozpustné proteiny. Jedná se o shluky proteinů, jako jsou například NFT a plaky u AD. Proteiny v této frakci bývají velkou měrou hyperfosforylovány a jedná se především o proteiny konformačně změněné způsobující patologie (Falcon et al., 2019; Kondo et al., 2015).

Tato frakce je z mozku velmi složitě extrahovatelná a obtížně rozpustitelná. K tomuto účelu bylo použito SDS, vzorek byl rozpuštěn v malém objemu (30  $\mu$ l) a výsledné proužky na WB vztaženy k celkovému množství proteinů barveného Coomasie (C Obr. 11).

Z výsledků vyplývá, že podíl fosforylovaného CRMP2A na Ser27 v Sarkosyl insolubilní frakci kolísá. Ze dvou barvení, které vidíme na WB (A Obr. 11), kdy vzor anti-CRMP2A protilátky ukazuje tři pruhy, ovšem anti-pS27 pouze dva je patrné, že fosforylovaný protein na Ser27 odpovídá prostřednímu pruhu a částečně pruhu hornímu. Dolní pruh CRMP2A není téměř fosforylován na Ser27. To naznačuje, že i protein, který není fosforylován na S27 se může v nerozpustných frakcích ukládat.

Dále z barvení vyplývá rozdílné ukládání fosforylovaného a nefosforylovaného proteinu u jednotlivých genotypů a zacházení. To můžeme vidět na grafech D a E vztažených ke Coomasie. Nejvíce proteinu CRMP2A v nerozpustné frakci se vyskytuje u WT a nejméně u Pin1KO. Naopak však nejméně fosforylovaného proteinu můžeme najít u WT K a nejvíce u Pin1KO. To naznačuje, že absence Pin1 zvyšuje insolubilitu fosforylovaného CRMP2A.

Po TBI dochází jak u WT tak u p25tg k ukládání fosforylovaného CRMP2A do SI frakce. Další zvýšení fosforylovaného CRMP2A v SI frakci po TBI však nepozorujeme u již zvýšeného fosforylovaného CRMP2A u Pin1KO či p25tg/Pin1KO vzorků. To naznačuje, že TBI nepotencuje ukládání insolubilního Ser27 fosforylovaného CRMP2A u Pin1 deficitních myší (graf E Obr. 11).

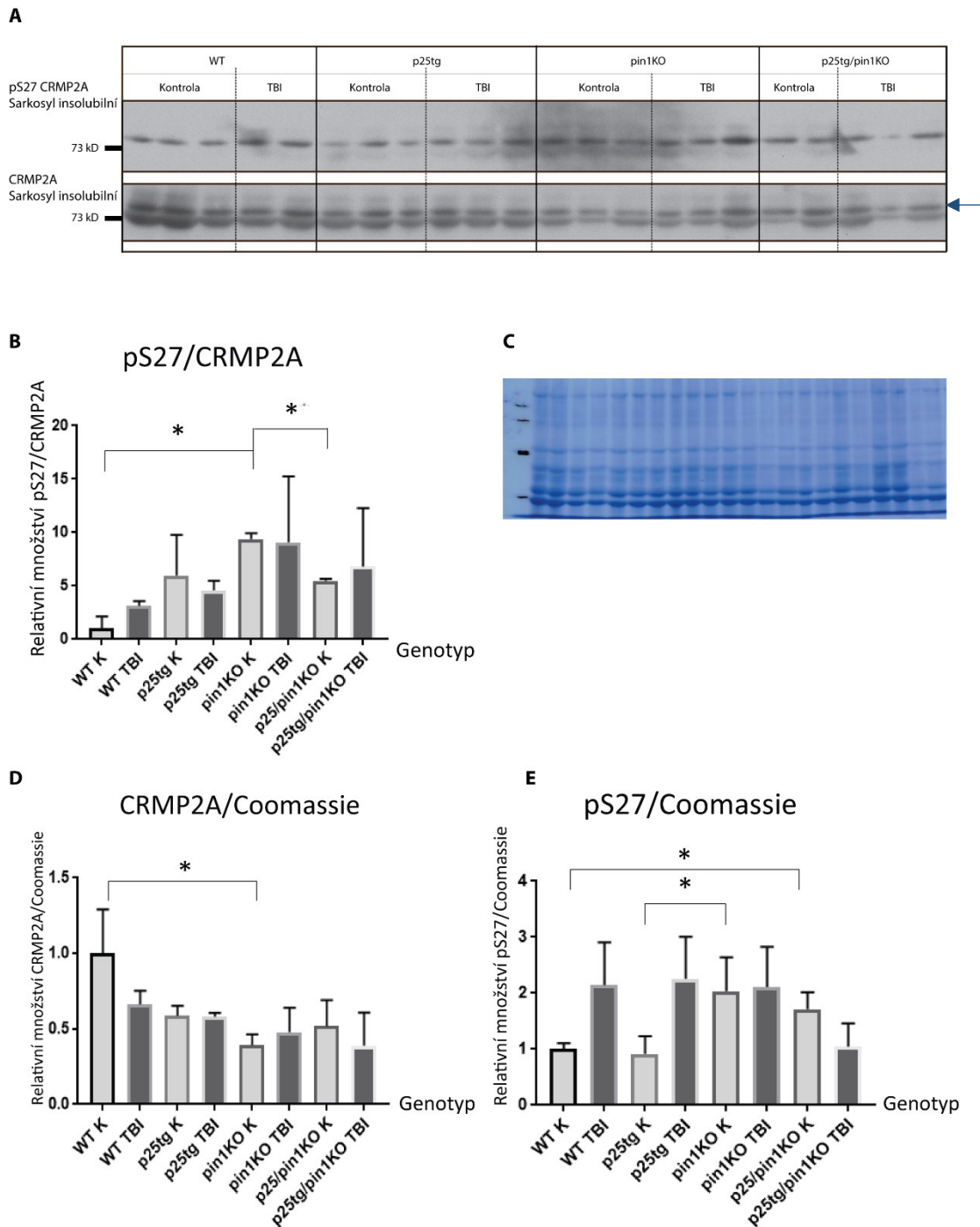
Celkově můžeme WB shrnout do několika zjištění.

1. TBI snižuje solubilitu Ser27 fosforylovaného CRMP2A u WT.
2. Nadregulace p25 u p25tg myší podporuje přesun fosforylovaného proteinu po TBI z frakce SS do frakce SI.

3. Pin1 deficiencie u Pin1KO myší snižuje solubilitu fosforylovaného CRMP2A přenesením do SI frakce.

4. Jak zvýšená aktivita CDK5 tak absence Pin1, stejně tak jako TBI snižuje solubilitu fosforylovaného CRMP2A. Vliv jednotlivých faktorů však není aditivní, neboť kombinace mutací u p25tg/Pin1KO nevede k dalšímu hromadění fosforylovaného CRMP2A v Triton insolubilních, SS nebo SI frakcích.

Pro potvrzení výsledků WB analýzy a buněčnou lokalizaci hyperfosforylovaného proteinu, který se v mozku myší ukládá, bylo následně použito imunohistochemické barvení.



**Obr. 11: Detekce rozpustnosti a fosforylace proteinu CRMP2A v SI frakci**

**A** – Proteiny pSer27 CRMP2A – na Ser27 fosforylovaný protein CRMP2A odpovídá hornímu pruhu CRMP2A (modrá šipka), CRMP2A – celkový Collapsin responsive mediator protein 2 izoforma A U genotypů WT, p25tg, Pin1KO, p25tg/Pin1KO a zacházení: TBI – traumatické poškození mozku a kontrol. **B** – Graf relativního množství pS27 k celkovému CRMP2A. Signifikantní zvýšení fosforylovaného proteinu u Pin1KO K oproti WT K a p25tg/Pin1KO K. Nejsou patrné změny v množství fosforylovaného proteinu k celkovému mezi zacházeními u jednotlivých genotypů. **C** – celkové proteiny barvené Coomassie. **D** – Celkový Crmp2A ke Coomassie. Signifikantní rozdíl patrný mezi WT K a Pin1KO K. Patrné celkové snížení CRMP2A u Pin1KO. **E** – pS27 ke Coomassie. Trend zvýšení fosforylace u WT i p25tg TBI vůči K. Pin1KO celkové zvýšení fosforylace, ale žádné změny po TBI. U p25tg/Pin1KO K zvýšená pS27 oproti WT K.

### 5.3 Imunohistochemická detekce výskytu pS27 CRMP2A v mozku

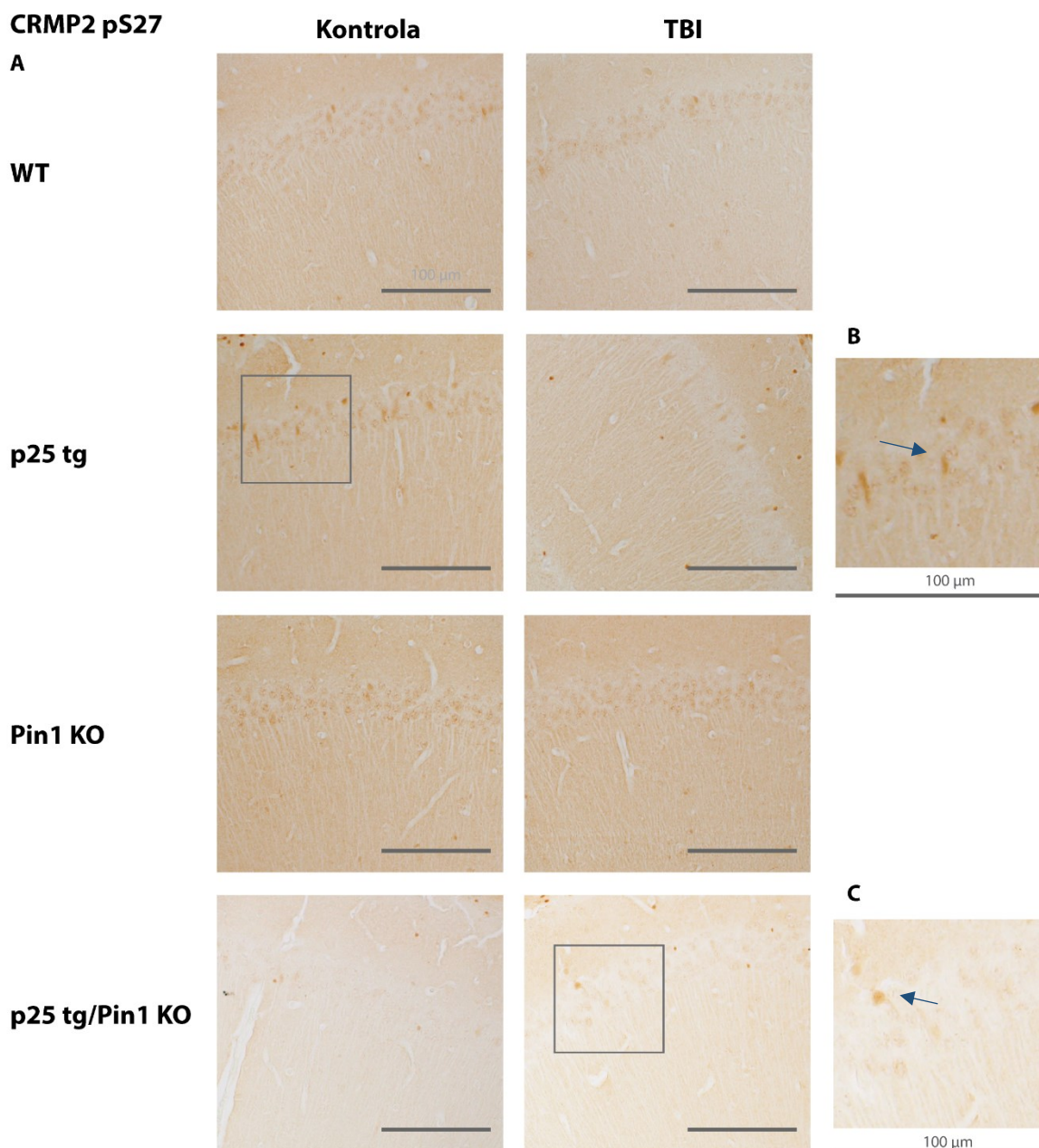
Z analýzy pomocí WB vyplívá zvýšené hromadění fosforylovaného CRMP2A u některých genotypů a zacházení. Očekávali jsme, že stejně jako například protein Tau, budeme moci pozorovat hromadící se protein CRMP2A v myším hipokampu a mozkové kůře. CRMP2A se exprimuje v pyramidálních buňkách, proto jsme sledovali převážně tyto buňky, jak budou postižené hromaděním proteinu a zda v nich budou patrné fosforylované shluky. Pyramidové neurony se vyskytují v hipokampu i mozkové kůře.

Imunohistochemické barvení protilátkou anti-pS27, které můžeme na obrázku 12 vidět v hipokampu, ukázalo zvýšené množství fosforylovaného proteinu v tělech neuronů u p25tg myši. To odpovídá zvýšené aktivaci kinázy CDK5. Dále jsou patrné abnormálně fosforylované proteiny v hipokampu p25tg/Pin1KO myši po TBI.

V mozku jsme pozorovali neurony s vyšším množstvím nahromaděného fosforylovaného proteinu. Takovýchto neuronů se však nepodařilo v mozku najít dostatek a ukázat tak další rozdíly v ukládání pCRMP2A mezi genotypy či zacházeními.

Na imunohistochemickém barvení byl sledován i kortex v oblasti nad CA1 oblastí hipokampu. Jedná se o oblast motorického kortexu a v této oblasti nebyly pozorovatelné změny mezi genotypy.

Imunohistochemické barvení odhalilo mírně zvýšenou fosforylaci v tělech neuronů u p25tg myši a částečně u p25tg/Pin1KO TBI. Dále mezi genotypy ani zacházeními nepozorujeme žádné výrazné změny. Jelikož tento výsledek nejvíce odpovídá TS frakci WB, kde také nepozorujeme rozdíly, je možné, že většina pCRMP2A v mozku se vyskytuje právě v této frakci a rozdíly ve frakcích nerozpustných nejsou na IHC dobře detekovatelné.



**Obr. 12: Imuhistochemické barvení pSer27 CRMP2A CA1 oblastí hipokampu**

A - Anti-pSer27 byl barven fosforylovaný protein CRMP2A v hipokampu. Na obrázku jsou porovnány genotypy a zacházení (TBI a kontroly). Na zvětšených výřezech B a C jsou znázorněny buňky s nahromaděným fosforylovaným proteinem CRMP2 na pSer27, značené modrými šipkami. U p25tg je patrná zvýšená fosforylace proteinu v tělech neuronů v hipokampu u kontroly oproti TBI. U p25tg/Pin1KO je efekt opačný, kdy byly po TBI detekovány jednotlivé neurony se zvýšenou fosforylací Ser27 CRMP2A v oblasti buněčných těl. Vzhledem k nízkému množství těchto neuronů. U Pin1KO a WT pozorujeme oproti ostatním genotypům nižší fosforylací v hipokampu. Veškerý jaderný signál je pouze nespecifické barvení, což odhalilo barvení CRMP2KO mozků.

## 5.4 Analýza fosforylace CRMP2 na C konci proteinu

CRMP2A je fosforylován kinázou CDK5 na N konci v pozici Ser27 a zároveň na Ser623 na svém C konci. Po vizualizaci pSer27 v triton solubilní frakci, kde se u p25tg nenašli i přes vnesený p25 žádné rozdíly, jsme se rozhodli detekovat fosforylaci Ser623 na WB pomocí fosforylačně specifických protilátek anti-pSer522 a anti-pThr514/509 (tabulka 1). Protilátka anti-pSer522 byla vizualizovaná fosforylace na CRMP2B Ser522 a CRMP2A Ser623. Tato dvě fosforylační místa jsou identická u obou izoform proteinu CRMP2. Po zviditelnění fosforylace proteinu na Ser623 (Obr. 13 anti-pSer522 horní proužek), se ukázalo, že stejně jako na Ser27, ani na Ser623 nedochází k výrazným změnám fosforylace mezi genotypy. Můžeme pozorovat pouze zvýšení fosforylace u p25tg/Pin1KO (graf E Obr. 13). Toto odpovídá i trendu, který jsme viděli u CRMP2A pSer27 (Obr. 9).

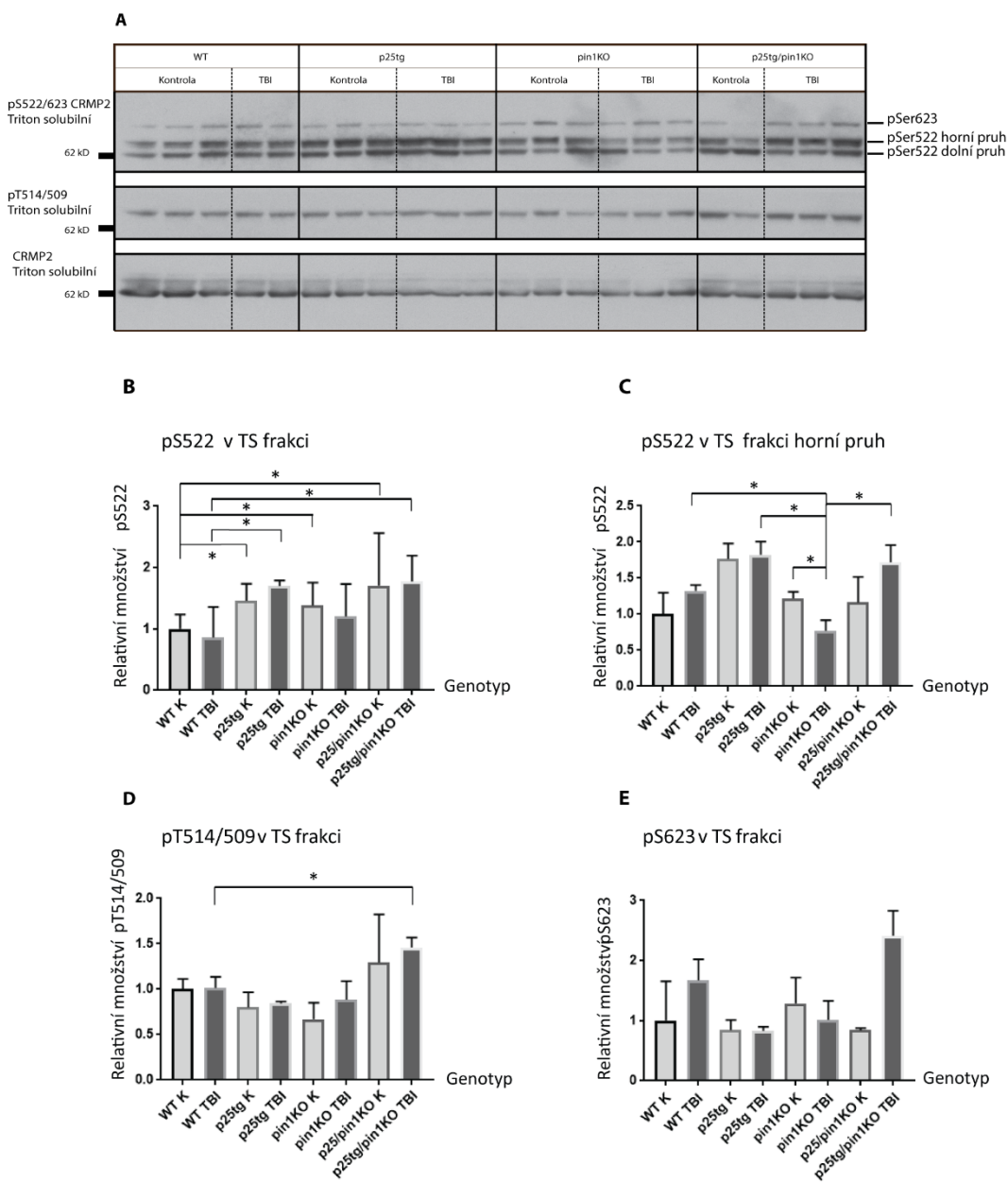
Zvýšení fosforylace C-konce proteinu CRMP2 u p25tg myši jsme však detekovali u izoformy CRMP2B na Ser522. Použitím protilátky anti-pSer522. Tyto výsledky naznačují rozdílný efekt kinázy CDK5 na CRMP2A a CRMP2B v TS frakci.

Při barvení anti-Ser522 jsme dále pozorovali změny u fosforylačního paternu proteinu CRMP2B. U p25tg i p25tg/Pin1KO bylo patrné zvýšení celkové fosforylace na Ser522 oproti WT a Pin1KO (graf B Obr. 13). Zároveň po TBI došlo k přesunu fosforylovaného proteinu do horního pruhu pS522 u p25tg/Pin1KO myši (na blotu se jedná o prostřední pruh, horní je CRMP2A pSer623). Tento přesun jsme detekovali výlučně u p25tg/Pin1KO po TBI. Na grafu C, kde je vypočítána pouze hodnota horního pruhu je patrné zvýšení fosforylace u p25tg/Pin1KO po TBI. Zároveň je patrné snížení fosforylace po TBI u Pin1KO myši.

Jelikož horní pruh pSer522 by měl ukazovat proteiny více posttranslačně modifikované, rozhodli jsme se vizualizovat pThr514/509, což je fosforylační místo kinázy GSK3 $\beta$ , které je fosforylováno jako druhé po iniciační fosforylaci Ser522 (Uchida et al., 2005). Tato fosforylace je také jedním z markeru hyperfosforylace u AD. Z grafu D (Obr. 13) je patrné zvýšení fosforylace právě u p25tg/Pin1KO po TBI na Thr515/509 jako u jediného z genotypů. Zároveň pozice signálu pro Thr515/509 na WB odpovídá prostřednímu pruhu na pS522/623 WB, což potvrzuje, že zvýšený signál u pS522/623 WB odpovídá zvýšené fosforylaci Thr515/509.

Dalším krokem byla vizualizace těchto fosforylací v nerozpustných frakcích, abychom zjistili, zda se protein CRMP2B u ostatních genotypů nefosforyluje, defosforyluje, či zda se přesouvá do nerozpustných složek, jako CRMP2A. Barvení SS a SI složek protilátkou anti-pSer522 a pThr514/509 však nebylo dobře proveditelné, neboť protilátky u hůře rozpustných frakcí

vedou k nespecifickému barvení. Jelikož nešlo vizualizovat pSer522 a pThr514/509 na membránách, pokusili jsme se o to alespoň imunohistochemickým barvením v mozku.



**Obr. 13: Detekce fosforylace a rozpustnosti fosforylovaného proteinu CRMP2A na Ser623 a CRMP2B na Ser522 v TS frakci**

**A** – WB Proteiny pSer522/623 CRMP2, barveno anti-pSer522 protilátkou, pT514/509 – barveno protilátkou anti pThr514/509, vizualizován fosforylovaný Thr514/509 CRMP2B. Odpovídá hornímu pruhu CRMP2 pS522 CRMP2 – Collapsin responsive mediator protein 2 celkový u genotypů WT, p25tg, Pin1KO, p25tg/Pin1KO a zacházení: TBI – traumatické poškození mozku a kontrol. **B** – graf relativního množství proteinu pSer522 CRMP2B, porovnání genotypů a zacházení U p25tg a p25tg/Pin1KO myši se zvyšuje fosforylace oproti WT. **C** – graf relativního množství pSer522 CRMP2B v horním pruhu, kde by měl být více fosforylovaný protein CRMP2B. U p25tg/Pin1KO a p25tg je pruh výrazně silnější oproti WT a Pin1KO TBI. Pozorujeme i snížení fosforylace Pin1KO TBI oproti Pin1KO kontrole. **D** – graf relativního množství fosforylovaného CRMP2B na Thr514/509, signifikantní zvýšení této fosforylace u p25tg/Pin1KO. **E** – graf relativního množství proteinu pSer623 CRMP2A, mírné zvýšení u p25tg/Pin1KO



#### 5.4.1 Imunodetekce pSer522 a pThr514/509 v mozcích

Fosforylace na Ser522 a Ser623 je způsobena kinázou CDK5. Fosforylace Thr514/509 kinázou GSK3 $\beta$ . Obě tyto kinázy mohou být disregulovány jak vlivem AD, tak traumatického poškození mozku (Shah and Lahiri, 2017; Wilson et al., 2014). Zároveň se ukazuje, že izomeráza Pin1 stabilizuje proteiny fosforylované těmito kinázami (Balastik et al., 2007).

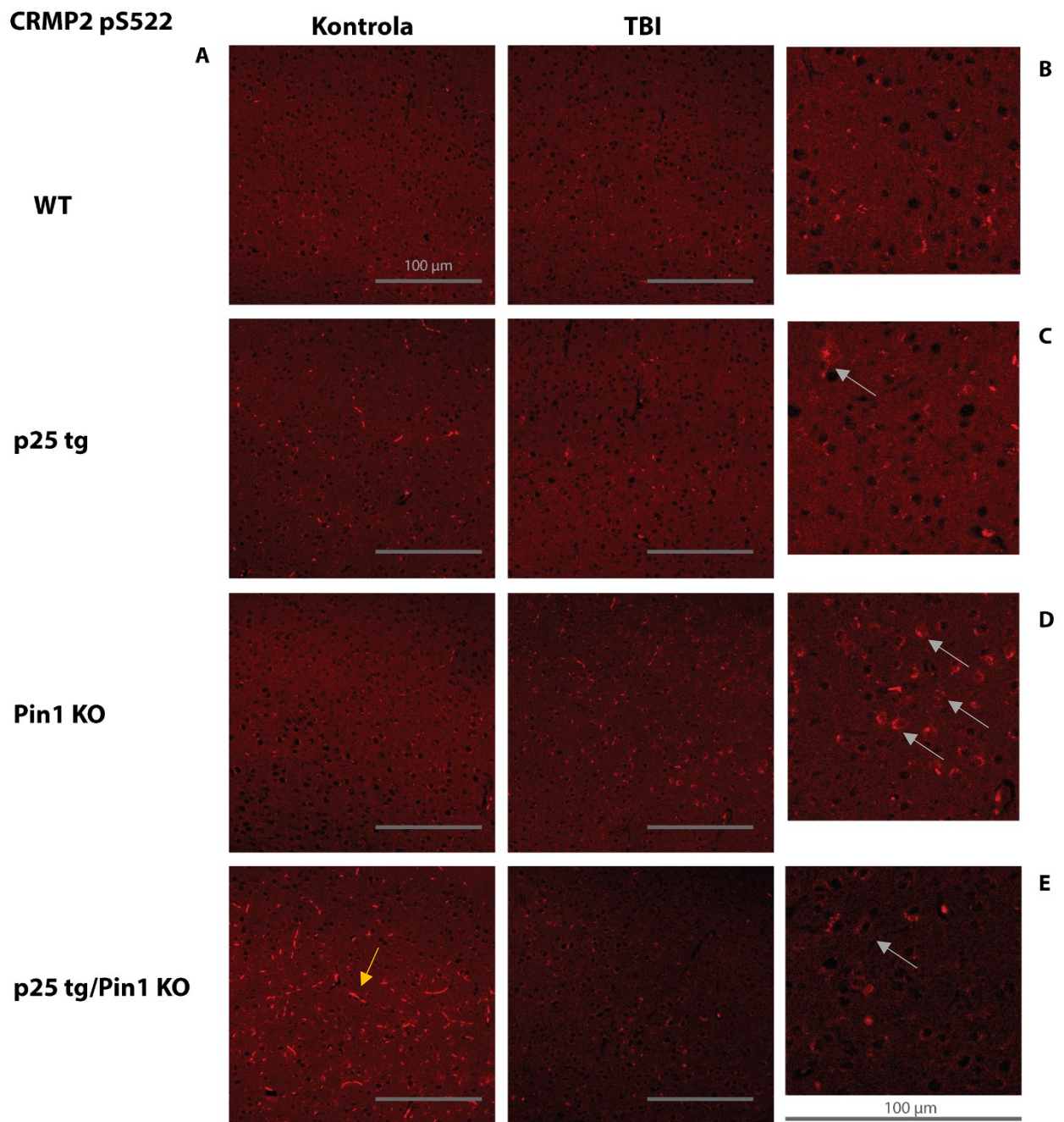
Lokalizace pSer522 a pThr514/509 je v mozku pacientů s AD i 3xTg myši v NFT, které se vyskytují v kortexu i hipokampu (Gu et al., 2000; Uchida et al., 2005; Yoshida et al., 1998). Na imunohistochemickém barvení byl sledován protein v obou těchto oblastech. Rozdíly však byly patrné pouze v kortexu. Je to možná právě vlivem TBI, které má na hromadění fosforylovaných proteinů vliv.

Nárůst v množství fosforylovaného proteinu v mozku barvených anti-pS522 jsou patrné u p25tg (Obr. 14) Pin1KO a částečně p25tg/Pin1KO po TBI. U Pin1KO se zdá být nárůst fosforylace nejvyšší. Vzhledem k tomu, že jsme podobné zvýšení nedetekovali v TS frakci WB a SS a SI frakce u pSer522 barvení nebylo možné analyzovat (viz výše), je možné, že právě u Pin1KO dochází k přesunu fosforylovaného proteinu CRMP2B do nerozpustných frakcí.

U p25tg a p25tg/Pin1KO je patrné zvýšené množství fosforylace v neuronech po TBI.

Změny fosforylace proteinu na Thr514/509 odpovídají WB, kdy je patrné, že zvýšenou fosforylací na těchto reziduích vidíme převážně v mozku p25tg/Pin1KO (Obr. 15). Také zde pozorujeme přesun fosforylovaného proteinu z těl neuronů do oblasti dendritů. Na barvení je zároveň viditelná výraznější fosforylace po TBI v některých buňkách u WT. Je tedy možné, že tu dochází ke stejnému efektu přesunu fosforylovaného proteinu do nerozpustných frakcí, který je však, stejně jako pS27 (Obr. 12) špatně detekovatelný na IHC.

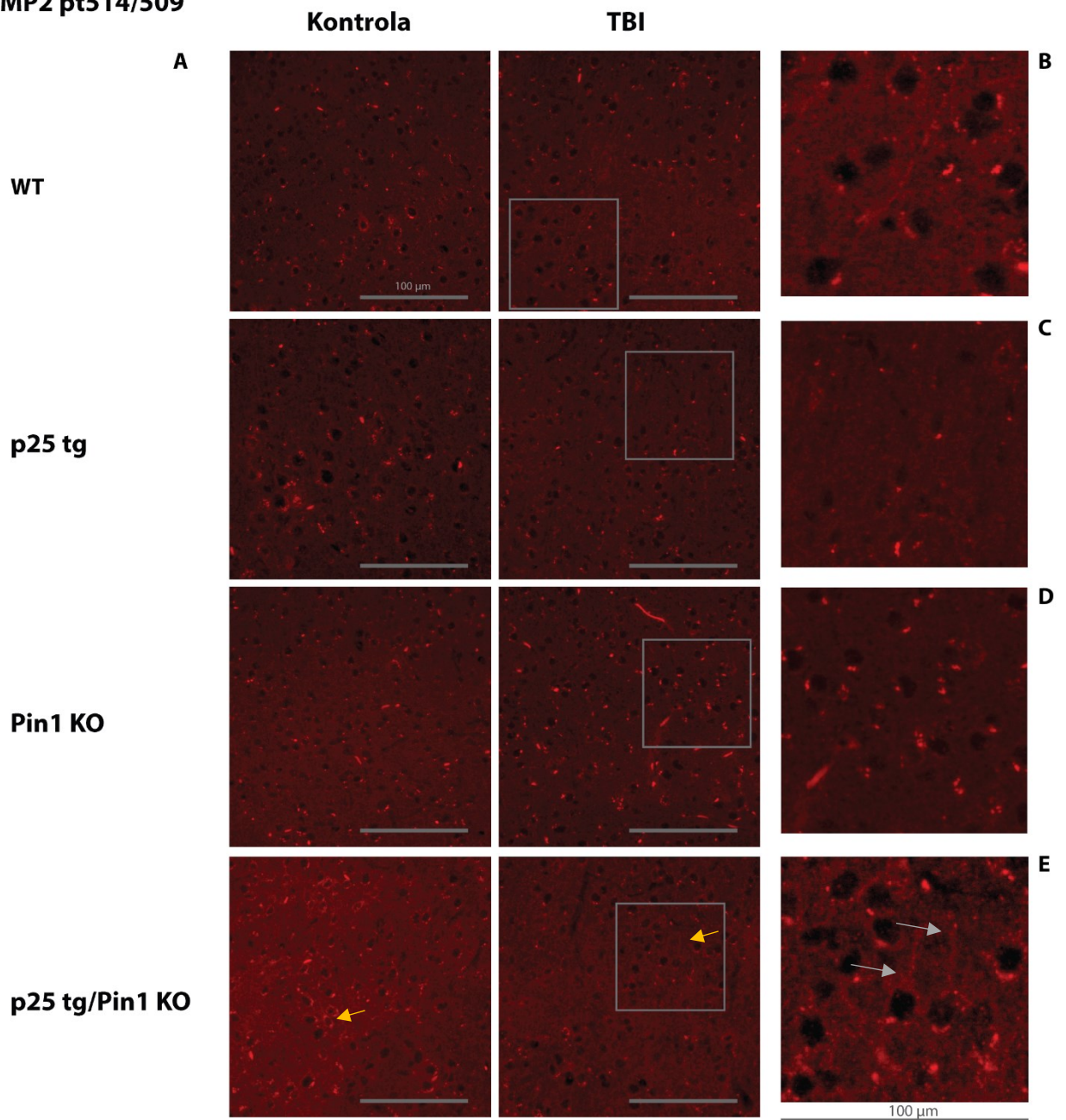
Imunohistochemické barvení tedy ukazuje částečnou shodu s WB a naznačuje možný přesun fosforylovaného CRMP2B do insolubilních frakcí, stejně, jako můžeme pozorovat u CRMP2A.



**Obr. 14: Detekce fosforylace na Ser522 v myším kortexu**

A – Anti-pSer522 byl barven fosforylovaný protein CRMP2 v kortexu. Na obrázku jsou porovnány genotypy a zacházení (TBI a kontroly). U p25tg/Pin1KO K je patrný nespecifický signál způsobený nedokonalou perfuzí mozku (žlutá šipka). Na zvětšených výřezech **B C D E** jsou mozky po TBI **B** – WT TBI nepozorujeme zvýšení fosforylace **C** – p25tg TBI buňky s fosforylovaným proteinem na Ser522 (šedá šipka) **D** – Pin1KO TBI – zvýšení fosforylace v buněčných tělech (šedé šipky) **E** – p25tg/Pin1KO TBI, mírné zvýšení fosforylace v tělech (šedá šipka)

## CRMP2 pt514/509



### Obr. 15: Detekce fosforylace CRMP2 na Thr514/509 v kortexu

A – Anti-pThr514/509 byl barven fosforylovaný protein CRMP2 v kortexu. Na obrázku jsou porovnány genotypy a zacházení (TBI a kontroly). Mezi K a TBI se nezdají být u genotypů rozdíly. Zvýšená fosforylace je patrná u p25tg/Pin1KO K i TBI (žlutá šipka). Na zvětšených výřezech jsou genotypy po TBI. Tečkovitý signál v tělech neuronů je patrný u všech genotypů, zvýšení fosforylace porovnáváme k WT B – WT TBI, patrná jedna buňka se zvýšenou fosforylací C – p25tg TBI, není patrné zvýšení fosforylace D – Pin1KO TBI není patrné zvýšení fosforylace E – p25tg/Pin1KO TBI patrná fosforylace v tělech a dendritech (šedé šipky)

## 6 Diskuze

### 6.1 Metoda mírného opakovaného poškození mozku

Při volbě metody mírného traumatického poškození je nutné sledovat mnoho aspektů. Existuje několik základních metod, které se v biologii používají. Mnoho z nich však způsobuje značné primární poškození, nebo jsou příliš invazivní či náročné pro mnohonásobné opakování a sledování poškození způsobeného repetitivním TBI. Námi testovaná metoda pádu závaží je vhodná pro napodobení nekontrolovaného nárazu způsobeného například při autonehodě, pádu, či jiné nehodě. Nedochází k poškození mozku v jednom místě, kde by byla patrná léze v místě poškození, jako je tomu například u kontrolovaného kortikálního impaktu (Ma et al., 2019). Naopak dostáváme větší možnost zkoumat sekundární vlivy poškození, neboť mozková hmota je po TBI v intaktním stavu.

Tato metoda byla etablovaná u nás v laboratoři pro pokusy detekující vliv mírného traumatického poškození na ukládání fosforylovaných proteinů v mozku a vliv na rozvinutí AD. Byla předpokládána zvýšená patologie ukládání CRMP2A u myši po TBI, stejně jako je tomu například u proteinu Tau (Kane et al., 2012). K pokusům byly použity myši s rozdílnými genotypy a to WT, myši s přidaným proteinem p25, aktivátorem CDK5 kinázy fosforylující CRMP2A, myši s KO Pin1 a dvojité mutanti p25tg/Pin1KO, kteří mají obě tyto mutace. Pin1KO myši vykazovaly po TBI nejvyšší úmrtnost (Tabulka 7). Což odpovídá tomu, že Pin1 má neuroprotektivní vlastnosti (Liou et al., 2003) a že jeho absence pravděpodobně vede k vyššímu poškození mozku u těchto myši po TBI.

### 6.2 Rozpustnost fosforylovaného proteinu CRMP2A

V této práci jsem se zaměřovala na stanovení rozpustnosti fosforylovaného proteinu CRMP2A v mozku. Z předběžných výsledků naší laboratoře a dostupných publikací byla sestavena hypotéza, že zvýšení fosforylace proteinu CRMP2A ovlivňuje jeho rozpustnost.

V naší laboratoři jsme ukázali, že ve Triton solubilní frakci Pin1 stabilizuje fosforylovaný protein CRMP2A vazbou v pozici Ser27 v *trans* konformaci (Kondo et al., 2015), tím pádem při jeho snížení dochází k degradaci fosforylovaného proteinu (Balastik et al., 2015). CDK5 fosforyluje CRMP2A na Ser27 a Ser623 (Balastik et al., 2015) a nadexprimováním p25 je aktivita CDK5 zvýšena (Patrick et al., 1999). To následně vede ke zvýšení fosforylace na Ser27 a Ser623. Předpokládali jsme, že snížení Pin1 (Dakson et al., 2011; Lanke et al., 2018) a zvýšení aktivity CDK5, stejně jako je tomu u patologie AD, může vést k ukládání takto

hyperfosforylovaného proteinu CRMP2A do nerozpustných frakcí (párových helikálních filament). Proteazom totiž nestihne hyperfosforylovaný protein CRMP2A degradovat a při absenci Pin1 nedochází k jeho stabilizaci v *trans* formě. Další část hypotézy se zaměřovala na vliv TBI na ukládání fosforylovaných proteinů, neboli že po TBI bude docházet k výraznějšímu hromadění fosforylovaného proteinu v nerozpustných frakcích.

Rozpustnost proteinu byla detekována ve třech frakcích lišících se rozpustností proteinů Triton solubilní, sarkosyl solubilní a sarkosyl insolubilní. V Triton insolubilních, (SS, SI) frakcích u pacientů s AD se vyskytuje protein Tau a APP v hyperfosforylované formě. Toto ukazuje na výskyt neurofibrilárních shluků nerozpustných proteinů v mozku těchto pacientů. Stejně tak u 3x tg AD myši byl pozorován společný výskyt Tau, Crmp2, ale i například proteinu WAVE1 a GAPDH v NFT (Watanabe et al., 2016).

Jediná fosforylace, která prokazatelně odlišuje CRMP2A a CRMP2B je fosforylace na Ser27 CDK5 kinázou (Balastik et al., 2015). Právě proto jsme se snažili detekovat protein fosforylovaný na tomto residuu. Na toto místo se také, pouze u CRMP2A, váže isomeráza Pin1 a reguluje konformaci CRMP2A proteinu. Fosforylace na Ser27 je však v buněčných lysátech vysoce nestabilní (jak v naší laboratoři ukázala Mgr. B. Pukajová). Již po týdnu dochází u vzorků uskladněných v -80 °C k jejich postupné defosforylaci. K tomu může docházet více vlivy a to buď vlivem fosfatáz, či např. dále zvýšenou degradací fosforylovaného proteinu. Stejně vymizení fosforylovaného CRMP2A si můžeme všimnout i u imunohistochemického barvení, kdy po pár týdnech od nakrájení již není pSer27 ve vzorku téměř detekovatelná. Pro analýzu imunohistochemického barvení byly tedy vybrány čerstvě připravené parafinové řezy.

### **6.2.1 Fosforylace proteinu CRMP2A v Triton rozpustné frakci mozku**

V triton solubilní frakci jsme detekovali pouze minimální rozdíly v hodnotách fosforylovaného proteinu. Očekávali jsme nárůst fosforylace u p25tg myši, neboť by mělo docházet ke zvýšené aktivitě CDK5 přidáním p25. I když zvýšení fosforylace pozorujeme u CRMP2B na Ser522 (Obr. 13), což naznačuje, že tato aktivace je úspěšná, nezdá se, že by měla efekt na CRMP2A. CRMP2A je CDK5 kinázou fosforylovaný, ovšem je možné, že je v TS frakci již plně saturován a tím pádem nemůže docházet k další fosforylaci.

U vzorků je detekovatelný trend k vyšší fosforylaci u p25tg/Pin1KO myši po TBI. Dostupná literatura však uvádí, že celková fosforylace, bráno u CRMP2B by se měla po TBI snižovat

(Wilson et al., 2014). To však platí pro CRMP2B, je tedy otázkou, zda je toto případ i CRMP2A.

Je nutné zvážit i možnost, že ke změně hodnot fosforylovaného proteinu došlo při zpracování vzorku, neboť u iniciálního WB se fosforylace měnila u p25tg myši, že se zvyšuje u kontrolní skupiny a že dochází ke snížení u p25tg po TBI. V dalších barveních se však již nepodařilo tyto změny pozorovat.

### **6.2.2 Analýza fosforylace Ser27 proteinu CRMP2A v sarkosyl solubilní frakci**

Pro detekci částečně nerozpustných složek v mozku myši byla použita metoda extrakce sarkosyl solubilní frakce. Data z naší analýzy naznačují, že většina proteinu CRMP2A v této frakci je fosforylovaná na Ser27, neboť podíl Ser27 fosforylovaného/totálního CRMP2A se u všech kategorií signifikantně neliší od 1 (graf B Obr. 10). Zvýšení množství proteinu v této frakci po TBI je patrné u WT a Pin1KO. Oba tyto genotypy se v sarkosyl solubilní frakci chovají přibližně stejně. Trend však naznačuje snížení celkového množství proteinu v této frakci u Pin1KO oproti WT. Snížení celkového množství proteinu u Pin1KO odpovídá dosavadním zjištěním, které ukazují, že Pin1 stabilizuje protein a jeho absence v buňce vede ke zvýšené degradaci proteinu.

U WT je zvýšení fosforylovaného proteinu po TBI očekávatelné, neboť vlivem TBI dochází k hyperaktivaci kináz. Můžeme tedy předpokládat, že zvýšení fosforylace u tohoto genotypu vede i ke zvýšenému ukládání proteinu do méně rozpustných frakcí, jak jsme to předpokládali v naší stanovené hypotéze.

U p25tg, který by měl mít více aktivovanou kinázu CDK5 však nepozorujeme další zvýšení fosforylace a ukládání proteinu v SS frakci po TBI. Naopak pozorujeme snížení fosforylovaného proteinu. To naznačuje možnost dalšího ukládání v insolubilních frakcích mozku.

Dvojitý mutant p25tg/Pin1KO nevykazuje žádné změny mezi TBI a kontrolami, což poukazuje na absenci aditivního efektu p25 nadexprese a Pin1 deficience v této frakci. Jestli Pin1 deficience spolu s p25 nadregulací eliminují efekt TBI na CRMP2A fosforylaci v insolubilních frakcích zatím není jasné a bude dále analyzováno.

### 6.2.3 Analýza fosforylovaného a celkového proteinů CRMP2A v sarkosyl insolubilní frakci

V sarkosyl insolubilní frakci detekujeme nejméně rozpustné proteiny v mozku. U WT pozorujeme zvýšené množství fosforylace v této frakci po TBI, což potvrzuje, že TBI vede ke zvýšenému ukládání fosforylovaného proteinu v nerozpustných frakcích mozku. Je zde však patrné, že pouze malá část z celkového proteinu CRMP2A je fosforylovaná (graf B Obr. 11). U p25tg TBI je patrný výrazný nárůst fosforylovaného proteinu v SI frakci oproti SS frakci. Můžeme předpokládat, že zde došlo k přesunu proteinu z částečně nerozpustné, do více nerozpustné frakce a tím k vyšší patologii. U p25tg je pozorováno hromadění nerozpustných proteinů. Vyšší patologie může být způsobena i zvýšenou aktivací GSK3 $\beta$ , která může být aktivována proteinem p25 (Chow et al., 2014). Vyšší aktivita CDK5 může vést ke zvýšené iniciaci fosforylace a poté zvýšená aktivita GSK3 $\beta$  vede k hyperfosforylaci proteinu a jeho ukládání (Cruz et al., 2003).

Pin1KO myši nevykazují změny v množství fosforylovaného proteinu po TBI oproti kontrolám. Celkově je však u těchto myši množství CRMP2A v SI frakci sníženo, což odpovídá jeho větší degradaci. V SI frakci je tedy patrné, že u Pin1KO dochází k uložení větší množství fosforylovaného proteinu, vůči proteinu celkovému, než u ostatních genotypů.

U P25g/Pin1KO také nepozorujeme změny po TBI v SI frakci, stejně jako u Pin1KO. Zároveň však nepozorujeme ani výrazně vyšší hromadění fosforylovaného proteinu CRMP2A. Celkově se zdá, že Vyšší míra fosforylace u p25tg/Pin1KO je pouze v TS frakci.

### 6.2.4 Změny fosforylace na Ser27 mezi frakcemi a genotypy

Naše data ukázala, že po TBI dochází k většímu hromadění fosforylovaného proteinu v nerozpustných frakcích mozku u WT (Obr. 10 a 11) a může tak přispívat ke vzniku chorob spojených s ukládáním hyperfosforylovaných proteinů, jako CRMP2A.

Dále bylo potvrzeno, že u Pin1KO dochází k ukládání více fosforylovaného proteinu CRMP2A v SI frakci, což naznačuje, že Pin1 stabilizuje fosforylovaný CRMP2A pouze v solubilních frakcích. I když u Pin1KO dochází u proteinu k větší degradaci, což již bylo potvrzeno (Balastik et al., 2015), dochází také pravděpodobně k ukládání jinak konformovaného proteinu v SS a SI frakci, stejně jako u proteinu Tau. Toto by bylo dále nutné potvrdit specifickým barvením protilátkami proti rozličně poskládaným proteinům (Kondo et al., 2015).

U p25tg a p25tg/Pin1KO myši byla potvrzena zvýšená aktivita CDK5 přidáním proteinu p25 díky objevení více fosforylovaného proteinu v SS frakci oproti WT. Data naznačují, že TBI

způsobuje v mozku podobnou aktivaci CDK5 jakou pozorujeme při přidání p25. Také se zdá, že TBI má na p25tg genotyp výraznější vliv, neboť pravděpodobně dochází i k hyperaktivaci dalších kináz, které vedou k ukládání CRMP2A do SI, hůře rozpustné frakce mozku.

U p25tg a p25tg/Pin1KO myši byla potvrzena zvýšená aktivita CDK5 přidáním proteinu p25 díky objevení více fosforylovaného proteinu v SS frakci oproti WT. Zdá se, že TBI způsobuje v mozku stejnou aktivaci CDK5 jakou pozorujeme při přidání p25. Také se zdá, že TBI má na p25tg genotyp výraznější vliv, neboť pravděpodobně dochází i k hyperaktivaci dalších kináz, které vedou k ukládání CRMP2A do SI, hůře rozpustné frakce mozku.

U p25tg/Pin1KO bychom v daném případě očekávali, že bude patologie nejhorší ze všech genotypů. Už první experimenty TBI však naznačovali, že tomu tak není, neboť p25tg/Pin1KO myši přežívaly tuto proceduru častěji než Pin1KO (tabulka 10). Je možné, že zvýšená fosforylace CRMP2A, kde nedochází ke stabilizaci proteinem Pin1 vede k rychlejší degradaci proteinu oproti normální fosforylaci CDK5 a GSK3 $\beta$  u Pin1KO. Tím pádem se nestihne dostatečné množství nesprávně složeného proteinu CRMP2A uložit v nerozpustných frakcích. Toto bychom mohli opět vizualizovat barvením protilátkami proti proteinu se specifickou konformací. Alternativně se u těchto dvojitých mutantů mohl vyvinout kompenzační mechanismus pomocí jiných prolyl izomeráz.

TBI se zdá mít jiný vliv na samce a samice, což naznačují i různé další studie (Giatti et al., 2020). V našich experimentech se však nepodařilo sestavit homogenní jednopohlavní skupinu p25tg/Pin1KO myši. Vliv pohlaví bude zohledněn v dalších experimentech.

Také se nepodařilo odhalit výrazné změny v mozku při IHC. Je možné, že protilátka anti-pS27 barvila pouze protein TS frakce a nebylo možno s ní vizualizovat nesolubilní proteiny, které mohou mít rozličnou konformaci a barvení tím znemožnit. Další z možností je, že se hyperfosforylované proteinové agregáty nevyskytovali ve sledované části mozku, ale například v entorinálním nebo spánkovém laloku, které jsou AD více poškozeny (Kaufman et al., 2018; Perl, 2010). Sledovali jsme kortex motorický, kde by měl být nejvíce patrný vliv TBI a hipokampus, kvůli detekci vlivu sekundárního poškození.



## **6.3 Analýza fosforylace CRMP2 na C konci proteinu**

### **6.3.1 Fosforylace Ser623 CRMP2A**

Fosforylace CRMP2A na C-koncovém Ser623 v TS frakci se neukázala signifikantně zvýšená u žádného genotypu. Mírné zvýšení pozorujeme pouze u p25tg/Pin1KO po TBI, což odpovídá i fosforylaci na Ser27. Detekovaný rozdíl fosforylace C-koncového S522 izoformy CRMP2B, však naznačuje, že fosforylace u těchto dvou proteinů je regulována rozličným způsobem a že na něj může mít značný vliv izomeráza Pin1, která se váže pouze na CRMP2A (Balastik et al., 2015).

Pro další zkoumání fosforylace CRMP2A by bylo třeba lépe detekovat jeho fosforylaci na Ser623 a Thr514/509, které je však s použitými protilátkami velmi slabé, neboť CRMP2A se v mozku vyskytuje v nižším množství, než CRMP2B. Zároveň většina protilátek proti fosforylačním místům CRMP2A zároveň barví stejná místa na CRMP2B, proto je nejde při imunohistochemickém barvení rozlišit.

Pro lepší prozkoumání těchto fosforylačních míst by bylo třeba dalších pokusů, například na CRMP2A KO myších, kde by se daly zkoumat fosforylaci čistě CRMP2B. Nebo na CRMP2B KO myši, kterou však nelze dostupnými prostředky vytvořit, neboť při knockoutu izoformy CRMP2B by došlo i ke knockoutu izoformy CRMP2A.

Mimo fosforylaci proteinu by bylo třeba prozkoumat i další možné posttranslační modifikace, jako je oxidace a to převážně na Ser27, SUMOylaci či O-GlcNAci a jejich vliv na fosforylaci proteinů CRMP2 i vliv fosforylace na tyto modifikace, která může být dle dostupných zdrojů značná (Leney et al., 2017).

### **6.3.2 Změny fosforylace Ser522 CRMP2B u jednotlivých zkoumaných genotypů**

CRMP2B je fosforylován na Ser522 kinázou CDK5. Jedná se o iniciační fosforylaci, na kterou navazuje fosforylace kinázou GSK3 $\beta$  na Thr514/509 a dalších residuích.

Z našich výsledků je patrná zvýšená fosforylace CRMP2B na serinu 522 u p25tg a p25tg/Pin1KO myši oproti WT a Pin1KO. Tento výsledek je očekávatelný, neboť u myši dochází k vyšší expresi proteinu p25 a tím k vyšší aktivaci CDK5, která na Ser 522 svůj substrát CRMP2 fosforyluje (Fukata et al., 2002). I když v jedné publikaci bylo ukázáno, že po TBI se míra fosforylace dlouhodobě snižuje (Wilson et al., 2014), neprojevalo se to signifikantně u žádné z našich skupin.

U p25tg/Pin1KO myši (výrazněji po TBI) jsme si všimli zvýšení fosforylace v horním pruhu CRMP2B proti pruhu dolnímu, kterýžto rozdíl jsme u p25tg nepozorovali. Tento pruh je protein CRMP2B s vyšší molekulovou hmotností způsobenou zvýšeným množstvím fosforylace na dalších residuích, jako je například Threonin 514 a Theronin 509, což jsou fosforylační místa kinázy GSK3 $\beta$  (Cole et al., 2007; Uchida et al., 2005). Proto jsme analyzovaly fosforylaci na Thr514/509 (Obr. 13). Naše data ukázala, že u p25tg/Pin1KO dochází u CRMP2B ke zvýšení fosforylace na Thr514/509 oproti všem ostatním genotypům. Stejně zvýšení však není pozorovatelné u p25 tg myši (graf D). Také je patrné zvýšení fosforylace u p25tg/Pin1KO na imunohistochemickém barvení v myším kortexu (Obr. 15). Toto naznačuje, že i když dochází po TBI ke zvýšení aktivace calpainu, štěpení p35 na p25 a tím k nárůstu množství aktivátoru CDK5 v buňkách, nestačí tato aktivace pro zvýšení fosforylace na residuích pro kinázu GSK3 $\beta$ . Za fosforylaci na těchto residuích může být částečně zodpovědné zvýšená aktivace GSK3 $\beta$ , která může být také aktivována p25 proteinem (Chow et al., 2014). Tomu však neodpovídá zvýšení celkové fosforylace proteinu CRMP2 u p25tg myši (graf B Obr. 13). GSK3 $\beta$  je však také substrátem Pin1 isomerázy, která dokáže její aktivitu inhibovat. U p25tg/Pin1KO myši není GSK3 $\beta$  utlučená, tím pádem dochází ke zvýšené fosforylaci. U Pin1KO myši není fosforylace zvýšena, protože u nich není zvýšena iniciační fosforylace kinázou CDK5, potažmo aktivace GSK3 $\beta$  proteinem p25. Toto již bylo pozorováno u proteinu APP (Ma et al., 2012) a zde se zdá, že by stejným mechanismem mohl být ovlivněn i CRMP2B.

U Pin1KO nepozorujeme signifikantní změnu fosforylace CRMP2B oproti WT a to ani po TBI. Pin1 však s proteinem CRMP2B ve větší míře přímo neinteraguje (Balastik et al., 2015), dochází zde pouze k nepřímému ovlivnění přes interakci pomocí CRMP2A.

Bohužel, u CRMP2B byla testována pouze triton solubilní frakce, neboť ostatní frakce nebyly komerčními protilátkami detekovatelné. Je tedy možné, že se hyperfosforylovaný protein CRMP2B ukládá i do jiných, nerozpustných, frakcí, jak tomu bylo u CRMP2A.

Zvýšená fosforylace na Thr514/509 u p25tg/Pin1KO myši byla detekována i na imunohistochemickém barvení (Obr. 15). To odpovídá zvýšení fosforylace na WB.

## 7 Souhrn

V rámci méj diplomové práce jsem testovala hypotézu, že protein p25 hyperaktivuje kinázu CDK5, která více fosforyluje CRMP2A na Ser27 a že absence Pin1, která vede k destabilizaci a degradaci CRMP2A, vytváří konformační stres, který se projevuje akumulací hyperfosforylovaného CRMP2A v buňkách, tak jak je pozorováno u pacientů s AD. Zároveň jsme předpokládali, že TBI bude zvyšovat patologii vedoucí k AD, neboli ukládání fosforylovaného proteinu CRMP2A u použitých myších modelů v nerozpustných frakcích mozku.

Výsledky této práce potvrzují hypotézu o ukládání fosforylovaného CRMP2A v nerozpustných frakcích u Pin1KO. Zároveň naznačuje, že absence Pin1 vede k destabilizaci a degradaci celkového proteinu CRMP2A, jak již bylo ukázáno dříve (Balastik et al., 2015) My jsme ukázali, že tato regulace postihuje především rozpustnou frakci CRMP2A ale ovlivňuje i nerozpustné frakce.

Dále jsme ukázali, že traumatické poškození vede k vyšší fosforylaci a ukládání proteinu CRMP2A do nerozpustných frakcí mozku.

Z výsledků se však nepodařilo stanovit, jak a zda se vzájemně ovlivňují mutace Pin1KO a p25tg u myšího modelu dvojité mutace při TBI a jak tato dvojitá mutace ovlivňuje ukládání proteinů v nerozpustných frakcích. To převážně z důvodu malého množství vzorků a nehomogenosti skupiny sestavené ze samců i samic.

Dále byla zkoumána fosforylace proteinu CRMP2A a B na Ser522 (C-konci). Zde jsme detekovali rozdílnou regulaci fosforylace CRMP2B a CRMP2A v TS frakci. Je patrná zvýšená fosforylace CRMP2B proteinu kinázou CDK5 u p25tg myší, což potvrzuje zvýšenou aktivaci CDK5 proteinem p25. Naše data naznačují, že CRMP2B je fosforylován podobným mechanismem jako protein APP (Ma et al., 2012), kdy Pin1 ovlivňuje fosforylaci CRMP2B regulací kinázy GSK3 $\beta$ .

## 8 Seznam použité literatury

- Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T.K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., Parhizkar, S., Ward, M.A., Cavallini, A., Jackson, S., Bose, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., Lavenir, I., Goedert, M., Hutton, M.L. and O'Neill, M.J., 2014. A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: the pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathologica*. 127, 667-683.
- Amin, N.D., Zheng, Y., Bk, B., Shukla, V., Skuntz, S., Grant, P., Steiner, J., Bhaskar, M. and Pant, H.C., 2016. The interaction of Munc 18 (p67) with the p10 domain of p35 protects in vivo Cdk5/p35 activity from inhibition by TFP5, a peptide derived from p35. *Mol Biol Cell*. 27, 3221-3232.
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Menager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y. and Kaibuchi, K., 2000. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem*. 275, 23973-80.
- Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Puschel, A.W. and Bolz, J., 1998. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development*. 125, 5043-53.
- Balastik, M., Lim, J., Pastorino, L. and Lu, K.P., 2007. Pin1 in Alzheimer's disease: multiple substrates, one regulatory mechanism? *Biochim Biophys Acta*. 1772, 422-9.
- Balastik, M., Zhou, X.Z., Alberich-Jorda, M., Weissova, R., Ziak, J., Pazyra-Murphy, M.F., Cosker, K.E., Machonova, O., Kozmikova, I., Chen, C.H., Pastorino, L., Asara, J.M., Cole, A., Sutherland, C., Segal, R.A. and Lu, K.P., 2015. Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Axon Guidance by Stabilizing CRMP2A Selectively in Distal Axons. *Cell Rep*. 13, 812-828.
- Baquero, J., Varriano, S., Ordonez, M., Kuczaj, P., Murphy, M.R., Aruggoda, G., Lundine, D., Morozova, V., Makki, A.E., Alonso, A.D.C. and Kleiman, F.E., 2019. Nuclear Tau, p53 and Pin1 Regulate PARN-Mediated Deadenylation and Gene Expression. *Front Mol Neurosci*. 12, 242.
- Bar, E. and Barak, B., 2019. Microglia roles in synaptic plasticity and myelination in homeostatic conditions and neurodevelopmental disorders. *Glia*. 67, 2125-2141.
- Bierer, L.M., Hof, P.R., Purohit, D.P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K.L. and Perl, D.P., 1995. Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 52, 81-8.
- Bretin, S., Reibel, S., Charrier, E., Maus-Moatti, M., Auvergnon, N., Thevenoux, A., Glowinski, J., Rogemond, V., Premont, J., Honnorat, J. and Gauchy, C., 2005. Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 486, 1-17.
- Brinkkoetter, P.T., Olivier, P., Wu, J.S., Henderson, S., Krofft, R.D., Pippin, J.W., Hockenbery, D., Roberts, J.M. and Shankland, S.J., 2009. Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *J Clin Invest*. 119, 3089-101.
- Brittain, J.M., Duarte, D.B., Wilson, S.M., Zhu, W., Ballard, C., Johnson, P.L., Liu, N., Xiong, W., Ripsch, M.S., Wang, Y., Fehrenbacher, J.C., Fitz, S.D., Khanna, M., Park, C.K., Schmutzler, B.S., Cheon, B.M., Due, M.R., Brustovetsky, T., Ashpole, N.M., Hudmon, A., Meroueh, S.O., Hingtgen, C.M., Brustovetsky, N., Ji, R.R., Hurley, J.H., Jin, X., Shekhar, A., Xu, X.M., Oxford, G.S., Vasko, M.R., White, F.A. and Khanna, R., 2011. Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca(2)(+) channel complex. *Nat Med*. 17, 822-9.
- Brittain, J.M., Pan, R., You, H., Brustovetsky, T., Brustovetsky, N., Zamponi, G.W., Lee, W.H. and Khanna, R., 2012a. Disruption of NMDAR-CRMP-2 signaling protects against focal cerebral ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Channels (Austin)*. 6, 52-9.

- Brittain, J.M., Piekarz, A.D., Wang, Y., Kondo, T., Cummins, T.R. and Khanna, R., 2009. An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem.* 284, 31375-90.
- Brittain, J.M., Wang, Y., Eruvwetere, O. and Khanna, R., 2012b. Cdk5-mediated phosphorylation of CRMP-2 enhances its interaction with CaV2.2. *FEBS Lett.* 586, 3813-8.
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R.Z., Leung, T., Lim, L. and Hall, C., 2004. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci.* 24, 8994-9004.
- Butterfield, D.A., Poon, H.F., St Clair, D., Keller, J.N., Pierce, W.M., Klein, J.B. and Markesbery, W.R., 2006. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 22, 223-32.
- Byk, T., Ozon, S. and Sobel, A., 1998. The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties. *Eur J Biochem.* 254, 14-24.
- Calvo-Rodriguez, M. and Bacskai, B.J., 2020. High mitochondrial calcium levels precede neuronal death in vivo in Alzheimer's disease. *Cell Stress.* 4, 187-190.
- Carnemolla, A., Michelazzi, S. and Agostoni, E., 2017. PIN1 Modulates Huntingtin Levels and Aggregate Accumulation: An In vitro Model. *Front Cell Neurosci.* 11, 121.
- Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S. and Rougon, G., 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.* 21, 6348-57.
- Castillo, C., Martinez, J.C., Longart, M., Garcia, L., Hernandez, M., Carballo, J., Rojas, H., Matteo, L., Casique, L., Escalona, J.L., Rodriguez, Y., Rodriguez, J., Hernandez, D., Balbi, D. and Villegas, R., 2018. Extracellular Application of CRMP2 Increases Cytoplasmic Calcium through NMDA Receptors. *Neuroscience.* 376, 204-223.
- Cole, A.R., Causeret, F., Yadirgi, G., Hastie, C.J., McLauchlan, H., McManus, E.J., Hernandez, F., Eickholt, B.J., Nikolic, M. and Sutherland, C., 2006. Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem.* 281, 16591-8.
- Cole, A.R., Noble, W., van Aalten, L., Plattner, F., Meimaridou, R., Hogan, D., Taylor, M., LaFrancois, J., Gunn-Moore, F., Verkhatsky, A., Oddo, S., LaFerla, F., Giese, K.P., Dineley, K.T., Duff, K., Richardson, J.C., Yan, S.D., Hanger, D.P., Allan, S.M. and Sutherland, C., 2007. Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression. *J Neurochem.* 103, 1132-44.
- Cole, A.R., Soutar, M.P., Rembutsu, M., van Aalten, L., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Peggie, M., Balastik, M., Lu, K.P. and Sutherland, C., 2008. Relative resistance of Cdk5-phosphorylated CRMP2 to dephosphorylation. *J Biol Chem.* 283, 18227-37.
- Cole, R.N. and Hart, G.W., 2001. Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J Neurochem.* 79, 1080-9.
- Corsellis, J.A., Bruton, C.J. and Freeman-Browne, D., 1973. The aftermath of boxing. *Psychol Med.* 3, 270-303.
- Cruz, J.C., Tseng, H.C., Goldman, J.A., Shih, H. and Tsai, L.H., 2003. Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron.* 40, 471-83.
- Dakson, A., Yokota, O., Esiri, M., Bigio, E.H., Horan, M., Pendleton, N., Richardson, A., Neary, D., Snowden, J.S., Robinson, A., Davidson, Y.S. and Mann, D.M., 2011. Granular expression of prolyl-peptidyl isomerase PIN1 is a constant and specific feature of Alzheimer's disease pathology and is independent of tau, Abeta and TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol.* 121, 635-49.
- Dhariwala, F.A. and Rajadhyaksha, M.S., 2008. An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell Mol Neurobiol.* 28, 351-69.
- Dhavan, R. and Tsai, L.H., 2001. A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 749-59.

- Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L.J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M.I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G.D., Reynolds, E.C., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., Dragunow, M. and Potempa, J., 2019. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 5, eaau3333.
- Dorsett, C.R., McGuire, J.L., DePasquale, E.A.K., Gardner, A.E., Floyd, C.L. and McCullumsmith, R.E., 2017. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma.* 34, 263-272.
- Dustrude, E.T., Moutal, A., Yang, X., Wang, Y., Khanna, M. and Khanna, R., 2016. Hierarchical CRMP2 posttranslational modifications control Nav1.7 function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, E8443-E8452.
- Dustrude, E.T., Wilson, S.M., Ju, W., Xiao, Y. and Khanna, R., 2013. CRMP2 protein SUMOylation modulates Nav1.7 channel trafficking. *J Biol Chem.* 288, 24316-31.
- Eckerdt, F., Yuan, J., Saxena, K., Martin, B., Kappel, S., Lindenau, C., Kramer, A., Naumann, S., Daum, S., Fischer, G., Dikic, I., Kaufmann, M. and Strebhardt, K., 2005. Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. *J Biol Chem.* 280, 36575-83.
- Ercan-Herbst, E., Ehrig, J., Schondorf, D.C., Behrendt, A., Klaus, B., Gomez Ramos, B., Prat Oriol, N., Weber, C. and Ehrnhoefer, D.E., 2019. A post-translational modification signature defines changes in soluble tau correlating with oligomerization in early stage Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun.* 7, 192.
- Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Vidal, R., Crowther, R.A., Ghetti, B., Scheres, S.H.W. and Goedert, M., 2018. Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature.* 561, 137-140.
- Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A.G., Garringer, H.J., Vidal, R., Crowther, R.A., Newell, K.L., Ghetti, B., Goedert, M. and Scheres, S.H.W., 2019. Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature.* 568, 420-423.
- Fang, W.Q., Ip, J.P., Li, R., Ng, Y.P., Lin, S.C., Chen, Y., Fu, A.K. and Ip, N.Y., 2011. Cdk5-mediated phosphorylation of Axin directs axon formation during cerebral cortex development. *J Neurosci.* 31, 13613-24.
- Ferrer, I., Gomez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribe, E., Dalfo, E. and Avila, J., 2005. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2, 3-18.
- Fleminger, S., Oliver, D.L., Lovestone, S., Rabe-Hesketh, S. and Giora, A., 2003. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 74, 857-62.
- Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H. and Kaibuchi, K., 2002. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol.* 4, 583-91.
- Geddes, J.F., Vowles, G.H., Robinson, S.F. and Sutcliffe, J.C., 1996. Neurofibrillary tangles, but not Alzheimer-type pathology, in a young boxer. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22, 12-6.
- Giatti, S., Diviccaro, S., Serafini, M.M., Caruso, D., Garcia-Segura, L.M., Viviani, B. and Melcangi, R.C., 2020. Sex differences in steroid levels and steroidogenesis in the nervous system: Physiopathological role. *Front Neuroendocrinol.* 56, 100804.
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P. and Strittmatter, S.M., 1995. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature.* 376, 509-14.
- Goshima, Y., Yamashita, N., Nakamura, F. and Sasaki, Y., 2016. Regulation of dendritic development by semaphorin 3A through novel intracellular remote signaling. *Cell Adh Migr.* 10, 627-640.
- Grisson, A., Mantovani, F., Comel, A., Agostoni, E., Gustincich, S., Persichetti, F. and Del Sal, G., 2011. Ser46 phosphorylation and prolyl-isomerase Pin1-mediated isomerization of p53 are key

- events in p53-dependent apoptosis induced by mutant huntingtin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 17979-84.
- Gu, Y., Hamajima, N. and Ihara, Y., 2000. Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry*. 39, 4267-75.
- Guo, Z., Cupples, L.A., Kurz, A., Auerbach, S.H., Volicer, L., Chui, H., Green, R.C., Sadovnick, A.D., Duara, R., DeCarli, C., Johnson, K., Go, R.C., Growdon, J.H., Haines, J.L., Kukull, W.A. and Farrer, L.A., 2000. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology*. 54, 1316-23.
- Gurkoff, G.G., Shahlaie, K. and Lyeth, B.G., 2012. In vitro mechanical strain trauma alters neuronal calcium responses: Implications for posttraumatic epilepsy. *Epilepsia*. 53 Suppl 1, 53-60.
- Hall, E.D., Vaishnav, R.A. and Mustafa, A.G., 2010. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 7, 51-61.
- Hempel, H., Buerger, K., Kohnken, R., Teipel, S.J., Zinkowski, R., Moeller, H.J., Rapoport, S.I. and Davies, P., 2001. Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol*. 49, 545-6.
- Han, C.H., Lu, J., Wei, Q., Bondy, M.L., Brewster, A.M., Yu, T.K., Buchholz, T.A., Arun, B.K. and Wang, L.E., 2010. The functional promoter polymorphism (-842G>C) in the PIN1 gene is associated with decreased risk of breast cancer in non-Hispanic white women 55 years and younger. *Breast Cancer Res Treat*. 122, 243-9.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Thomson, J.N. and Perkins, L.A., 1985. Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev Biol*. 111, 158-70.
- Hellmich, M.R., Pant, H.C., Wada, E. and Battey, J.F., 1992. Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 10867-71.
- Hensley, K. and Kursula, P., 2016. Collapsin Response Mediator Protein-2 (CRMP2) is a Plausible Etiological Factor and Potential Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: Comparison and Contrast with Microtubule-Associated Protein Tau. *J Alzheimers Dis*. 53, 1-14.
- Hinzman, J.M., Thomas, T.C., Quintero, J.E., Gerhardt, G.A. and Lifshitz, J., 2012. Disruptions in the Regulation of Extracellular Glutamate by Neurons and Glia in the Rat Striatum Two Days after Diffuse Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 29, 1197-1208.
- Hou, Z., Li, Q., He, L., Lim, H.Y., Fu, X., Cheung, N.S., Qi, D.X. and Qi, R.Z., 2007. Microtubule association of the neuronal p35 activator of Cdk5. *J Biol Chem*. 282, 18666-70.
- Huang, Y., Huang, W., Huang, Y., Song, P., Zhang, M., Zhang, H.T., Pan, S. and Hu, Y., 2020. Cdk5 Inhibitory Peptide Prevents Loss of Neurons and Alleviates Behavioral Changes in p25 Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis*. 74, 1231-1242.
- Humbert, S., Lanier, L.M. and Tsai, L.H., 2000. Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport*. 11, 2213-6.
- Hwang, I.K., Yoo, K.Y., Kim, D.W., Kang, T.C., Choi, S.Y., Kwon, Y.G., Han, B.H., Kim, J.S. and Won, M.H., 2006. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger 1 alters in pyramidal cells and expresses in astrocytes of the gerbil hippocampal CA1 region after ischemia. *Brain Res*. 1086, 181-90.
- Chen, D., Wang, L. and Lee, T.H., 2020. Post-translational Modifications of the Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1. *Front Cell Dev Biol*. 8, 129.
- Chen, C.H., Li, W., Sultana, R., You, M.H., Kondo, A., Shahpasand, K., Kim, B.M., Luo, M.L., Nechama, M., Lin, Y.M., Yao, Y., Lee, T.H., Zhou, X.Z., Swomley, A.M., Butterfield, D.A., Zhang, Y. and Lu, K.P., 2015. Pin1 cysteine-113 oxidation inhibits its catalytic activity and cellular function in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 76, 13-23.
- Chen, Y., Wu, Y.R., Yang, H.Y., Li, X.Z., Jie, M.M., Hu, C.J., Wu, Y.Y., Yang, S.M. and Yang, Y.B., 2018. Prolyl isomerase Pin1: a promoter of cancer and a target for therapy. *Cell Death Dis*. 9, 883.

- Chew, J., Chen, M.J., Lee, A.Y., Peng, Z.F., Chong, K.W., He, L., Bay, B.H., Ng, J.M., Qi, R.Z. and Cheung, N.S., 2010. Identification of p10 as a neurotoxic product generated from the proteolytic cleavage of the neuronal Cdk5 activator. *J Cell Biochem.* 111, 1359-66.
- Chi, X.X., Schmutzler, B.S., Brittain, J.M., Wang, Y., Hingtgen, C.M., Nicol, G.D. and Khanna, R., 2009. Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons. *J Cell Sci.* 122, 4351-62.
- Chow, H.M., Guo, D., Zhou, J.C., Zhang, G.Y., Li, H.F., Herrup, K. and Zhang, J., 2014. CDK5 activator protein p25 preferentially binds and activates GSK3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, E4887-95.
- Ifuku, M., Farber, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Miyamoto, T., Nolte, C., Merrino, V.F., Kita, S., Iwamoto, T., Komuro, I., Wang, B., Cheung, G., Ishikawa, E., Ooboshi, H., Bader, M., Wada, K., Kettenmann, H. and Noda, M., 2007. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca<sup>2+</sup> influx via reverse-mode activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Neurosci.* 27, 13065-73.
- Inatome, R., Tsujimura, T., Hitomi, T., Mitsui, N., Hermann, P., Kuroda, S., Yamamura, H. and Yanagi, S., 2000. Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain. *J Biol Chem.* 275, 27291-302.
- Ino, H., Ishizuka, T., Chiba, T. and Tatibana, M., 1994. Expression of CDK5 (PSSALRE kinase), a neural cdc2-related protein kinase, in the mature and developing mouse central and peripheral nervous systems. *Brain Res.* 661, 196-206.
- Ishiguro, K., Kobayashi, S., Omori, A., Takamatsu, M., Yonekura, S., Anzai, K., Imahori, K. and Uchida, T., 1994. Identification of the 23 kDa subunit of tau protein kinase II as a putative activator of cdk5 in bovine brain. *FEBS Lett.* 342, 203-8.
- Issa, N.P. and Hudspeth, A.J., 1994. Clustering of Ca<sup>2+</sup> channels and Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 7578-82.
- Ito, Y., Asada, A., Kobayashi, H., Takano, T., Sharma, G., Saito, T., Ohta, Y., Amano, M., Kaibuchi, K. and Hisanaga, S., 2014. Preferential targeting of p39-activated Cdk5 to Rac1-induced lamellipodia. *Mol Cell Neurosci.* 61, 34-45.
- Jentsch, S. and Siepe, D., 2009. Pin1, a novel switch in the ubiquitin pathway. *Cell Cycle.* 8, 3800-1.
- Jin, X., Sasamoto, K., Nagai, J., Yamazaki, Y., Saito, K., Goshima, Y., Inoue, T. and Ohshima, T., 2016. Phosphorylation of CRMP2 by Cdk5 Regulates Dendritic Spine Development of Cortical Neuron in the Mouse Hippocampus. *Neural Plast.* 2016, 6790743.
- Kane, M.J., Angoa-Perez, M., Briggs, D.I., Viano, D.C., Kreipke, C.W. and Kuhn, D.M., 2012. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 203, 41-9.
- Katzman, R., 1976. Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer. *Arch Neurol.* 33, 217-8.
- Kaufman, S.K., Del Tredici, K., Thomas, T.L., Braak, H. and Diamond, M.I., 2018. Tau seeding activity begins in the transentorhinal/entorhinal regions and anticipates phospho-tau pathology in Alzheimer's disease and PART. *Acta Neuropathol.* 136, 57-67.
- Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., Takenawa, T. and Kaibuchi, K., 2005. CRMP-2 is involved in kinesin-1-dependent transport of the Sra-1/WAVE1 complex and axon formation. *Mol Cell Biol.* 25, 9920-35.
- Kimura, T., Tsutsumi, K., Taoka, M., Saito, T., Masuda-Suzukake, M., Ishiguro, K., Plattner, F., Uchida, T., Isobe, T., Hasegawa, M. and Hisanaga, S.I., 2013. Isomerase Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau Protein at Cyclin-dependent Kinase (Cdk5)-dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *Journal of Biological Chemistry.* 288, 7968-7977.
- Kimura, T., Watanabe, H., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K., 2005. Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J Neurochem.* 93, 1371-82.
- Kobayashi, H., Saito, T., Sato, K., Furusawa, K., Hosokawa, T., Tsutsumi, K., Asada, A., Kamada, S., Ohshima, T. and Hisanaga, S., 2014. Phosphorylation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) at



- Tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J Biol Chem.* 289, 19627-36.
- Kondo, A., Shahpasand, K., Mannix, R., Qiu, J., Moncaster, J., Chen, C.H., Yao, Y., Lin, Y.M., Driver, J.A., Sun, Y., Wei, S., Luo, M.L., Albayram, O., Huang, P., Rotenberg, A., Ryo, A., Goldstein, L.E., Pascual-Leone, A., McKee, A.C., Meehan, W., Zhou, X.Z. and Lu, K.P., 2015. Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature.* 523, 431-436.
- Kovacs, G.G., Laszlo, L., Kovacs, J., Jensen, P.H., Lindersson, E., Botond, G., Molnar, T., Perczel, A., Hudecz, F., Mezo, G., Erdei, A., Tirian, L., Lehotzky, A., Gelpi, E., Budka, H. and Ovadi, J., 2004. Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies. *Neurobiol Dis.* 17, 155-62.
- Lanke, V., Moolamalla, S.T.R., Roy, D. and Vinod, P.K., 2018. Integrative Analysis of Hippocampus Gene Expression Profiles Identifies Network Alterations in Aging and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 10, 153.
- Lanni, C., Masi, M., Racchi, M. and Govoni, S., 2020. Cancer and Alzheimer's disease inverse relationship: an age-associated diverging derailment of shared pathways. *Mol Psychiatry.*
- Lee, K.Y., Rosales, J.L., Tang, D. and Wang, J.H., 1996. Interaction of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and neuronal Cdk5 activator in bovine brain. *Journal of Biological Chemistry.* 271, 1538-1543.
- Lee, T.H., Chen, C.H., Suizu, F., Huang, P., Schiene-Fischer, C., Daum, S., Zhang, Y.J., Goate, A., Chen, R.H., Zhou, X.Z. and Lu, K.P., 2011. Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function. *Mol Cell.* 42, 147-59.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Jr. and Trojanowski, J.Q., 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science.* 251, 675-8.
- Leney, A.C., El Atmioui, D., Wu, W., Ovaa, H. and Heck, A.J.R., 2017. Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114, E7255-E7261.
- Lew, J., Beaudette, K., Litwin, C.M. and Wang, J.H., 1992. Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain. *J Biol Chem.* 267, 13383-90.
- Li, L., Su, Z., Zou, Z., Tan, H., Cai, D., Su, L. and Gu, Z., 2019. Ser46 phosphorylation of p53 is an essential event in prolyl-isomerase Pin1-mediated p53-independent apoptosis in response to heat stress. *Cell Death Dis.* 10, 96.
- Li, W., Herman, R.K. and Shaw, J.E., 1992. Analysis of the *Caenorhabditis elegans* axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*. *Genetics.* 132, 675-89.
- Liou, Y.C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.X., Huang, H.K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T. and Lu, K.P., 2003. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature.* 424, 556-61.
- Llinas, R., Steinberg, I.Z. and Walton, K., 1981. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J.* 33, 323-51.
- Lu, J., Yang, L., Zhao, H., Liu, B., Li, Y., Wu, H., Li, Q., Zeng, B., Wang, Y., Ji, W. and Zhou, Y., 2011. The polymorphism and haplotypes of PIN1 gene are associated with the risk of lung cancer in Southern and Eastern Chinese populations. *Hum Mutat.* 32, 1299-308.
- Lu, K.P., 2003. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer Cell.* 4, 175-80.
- Lu, K.P., Hanes, S.D. and Hunter, T., 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature.* 380, 544-7.
- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P. and Lu, K.P., 1999. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature.* 399, 784-8.
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Liou, Y.C., Noel, J.P. and Lu, K.P., 2002. Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J Biol Chem.* 277, 2381-4.
- Luo, Y., Raible, D. and Raper, J.A., 1993. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell.* 75, 217-27.

- Ma, S.L., Pastorino, L., Zhou, X.Z. and Lu, K.P., 2012. Prolyl isomerase Pin1 promotes amyloid precursor protein (APP) turnover by inhibiting glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) activity: novel mechanism for Pin1 to protect against Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 287, 6969-73.
- Ma, X., Aravind, A., Pfister, B.J., Chandra, N. and Haorah, J., 2019. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol Neurobiol.* 56, 5332-5345.
- Majava, V., Loytynoja, N., Chen, W.Q., Lubec, G. and Kursula, P., 2008. Crystal and solution structure, stability and post-translational modifications of collapsin response mediator protein 2. *FEBS J.* 275, 4583-96.
- McInnes, K., Friesen, C.L., MacKenzie, D.E., Westwood, D.A. and Boe, S.G., 2017. Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) and chronic cognitive impairment: A scoping review. *PLoS One.* 12, e0174847.
- Meredith, W., Rutledge, R., Fakhry, S.M., Emery, S. and Kromhout-Schiro, S., 1998. The conundrum of the Glasgow Coma Scale in intubated patients: a linear regression prediction of the Glasgow verbal score from the Glasgow eye and motor scores. *J Trauma.* 44, 839-44; discussion 844-5.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E. and Tsai, L.H., 1992. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* 11, 2909-17.
- Montani, L., Gerrits, B., Gehrig, P., Kempf, A., Dimou, L., Wollscheid, B. and Schwab, M.E., 2009. Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system. *J Biol Chem.* 284, 10793-807.
- Morinaka, A., Yamada, M., Itofusa, R., Funato, Y., Yoshimura, Y., Nakamura, F., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Goshima, Y., Hoshino, M., Kamiguchi, H. and Miki, H., 2011. Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Sci Signal.* 4, ra26.
- Moutal, A., Dustrude, E.T., Largent-Milnes, T.M., Vanderah, T.W., Khanna, M. and Khanna, R., 2018. Blocking CRMP2 SUMOylation reverses neuropathic pain. *Mol Psychiatry.* 23, 2119-2121.
- Muha, V., Williamson, R., Hills, R., McNeilly, A.D., McWilliams, T.G., Alonso, J., Schimpl, M., Leney, A.C., Heck, A.J.R., Sutherland, C., Read, K.D., McCrimmon, R.J., Brooks, S.P. and van Aalten, D.M.F., 2019. Loss of CRMP2 O-GlcNAcylation leads to reduced novel object recognition performance in mice. *Open Biol.* 9, 190192.
- Musicco, M., Adorni, F., Di Santo, S., Prinelli, F., Pettenati, C., Caltagirone, C., Palmer, K. and Russo, A., 2013. Inverse occurrence of cancer and Alzheimer disease: a population-based incidence study. *Neurology.* 81, 322-8.
- Nakamura, K., Greenwood, A., Binder, L., Bigio, E.H., Denial, S., Nicholson, L., Zhou, X.Z. and Lu, K.P., 2012. Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell.* 149, 232-44.
- Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., Yamaguchi, T., Matsuura, Y., Kamiguchi, H. and Kaibuchi, K., 2003. CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol.* 5, 819-26.
- Nizynski, B., Dzwolak, W. and Nieznanski, K., 2017. Amyloidogenesis of Tau protein. *Protein Sci.* 26, 2126-2150.
- Nordstrom, A. and Nordstrom, P., 2018. Traumatic brain injury and the risk of dementia diagnosis: A nationwide cohort study. *PLoS Med.* 15, e1002496.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. and Verdin, E., 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell.* 11, 437-44.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. and LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 39, 409-21.
- Omalu, B.I., DeKosky, S.T., Minster, R.L., Kamboh, M.I., Hamilton, R.L. and Wecht, C.H., 2005. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery.* 57, 128-34; discussion 128-34.

- Pace, P.E., Peskin, A.V., Konigstorfer, A., Jasoni, C.J., Winterbourn, C.C. and Hampton, M.B., 2018. Peroxiredoxin interaction with the cytoskeletal-regulatory protein CRMP2: Investigation of a putative redox relay. *Free Radic Biol Med.* 129, 383-393.
- Pandithage, R., Lilischkis, R., Harting, K., Wolf, A., Jedamzik, B., Luscher-Firzlaff, J., Vervoorts, J., Lasonder, E., Kremmer, E., Knoll, B. and Luscher, B., 2008. The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol.* 180, 915-29.
- Pastorino, L., Sun, A., Lu, P.J., Zhou, X.Z., Balastik, M., Finn, G., Wulf, G., Lim, J., Li, S.H., Li, X., Xia, W., Nicholson, L.K. and Lu, K.P., 2006. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature.* 440, 528-34.
- Patrick, G.N., Zhou, P., Kwon, Y.T., Howley, P.M. and Tsai, L.H., 1998. p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 273, 24057-64.
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L.H., 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 402, 615-22.
- Perl, D.P., 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77, 32-42.
- Plattner, F., Angelo, M. and Giese, K.P., 2006. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem.* 281, 25457-65.
- Quinn, C.C., Chen, E., Kinjo, T.G., Kelly, G., Bell, A.W., Elliott, R.C., McPherson, P.S. and Hockfield, S., 2003. TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J Neurosci.* 23, 2815-23.
- Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T. and Noel, J.P., 1997. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell.* 89, 875-86.
- Ricard, D., Rogemond, V., Charrier, E., Aguera, M., Bagnard, D., Belin, M.F., Thomasset, N. and Honnorat, J., 2001. Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. *J Neurosci.* 21, 7203-14.
- Riedel, B.C., Thompson, P.M. and Brinton, R.D., 2016. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 160, 134-47.
- Roberts, G.W., Allsop, D. and Bruton, C., 1990. The occult aftermath of boxing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 53, 373-8.
- Robitaille, R., Adler, E.M. and Charlton, M.P., 1990. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron.* 5, 773-9.
- Ryo, A., Togo, T., Nakai, T., Hirai, A., Nishi, M., Yamaguchi, A., Suzuki, K., Hirayasu, Y., Kobayashi, H., Perrem, K., Liou, Y.C. and Aoki, I., 2006. Prolyl-isomerase Pin1 accumulates in lewy bodies of parkinson disease and facilitates formation of alpha-synuclein inclusions. *J Biol Chem.* 281, 4117-25.
- Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., Ohno, S., Nakamura, F. and Goshima, Y., 2002. Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron.* 35, 907-20.
- Segat, L., Pontillo, A., Annoni, G., Trabattoni, D., Vergani, C., Clerici, M., Arosio, B. and Crovella, S., 2007. PIN1 promoter polymorphisms are associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 28, 69-74.
- Shah, K. and Lahiri, D.K., 2017. A Tale of the Good and Bad: Remodeling of the Microtubule Network in the Brain by Cdk5. *Mol Neurobiol.* 54, 2255-2268.
- Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P.L., Gao, H. and Poo, M.M., 2011. Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron.* 71, 433-46.
- Schoch, K.M., Evans, H.N., Brelsfoard, J.M., Madathil, S.K., Takano, J., Saido, T.C. and Saatman, K.E., 2012. Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 236, 371-82.

- Smet, C., Sambo, A.V., Wieruszeski, J.M., Leroy, A., Landrieu, I., Buee, L. and Lippens, G., 2004. The peptidyl prolyl cis/trans-isomerase Pin1 recognizes the phospho-Thr212-Pro213 site on Tau. *Biochemistry*. 43, 2032-40.
- Sorensen, S.A., Fenger, K. and Olsen, J.H., 1999. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer*. 86, 1342-6.
- Sorrentino, G., Mioni, M., Giorgi, C., Ruggeri, N., Pinton, P., Moll, U., Mantovani, F. and Del Sal, G., 2013. The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53. *Cell Death Differ*. 20, 198-208.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. and Stradal, T.E., 2004. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J*. 23, 749-59.
- Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon, H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Markesbery, W.R., Zhou, X.Z., Lu, K.P. and Butterfield, D.A., 2006. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging*. 27, 918-25.
- Sun, Y.Y., Zhu, L., Sun, Z.L. and Feng, D.F., 2020. CRMP2 improves memory deficits by enhancing the maturation of neuronal dendritic spines after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 328, 113253.
- Takahashi, S., Saito, T., Hisanaga, S., Pant, H.C. and Kulkarni, A.B., 2003. Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules. *J Biol Chem*. 278, 10506-15.
- Tramutola, A., Triani, F., Di Domenico, F., Barone, E., Cai, J., Klein, J.B., Perluigi, M. and Butterfield, D.A., 2018. Poly-ubiquitin profile in Alzheimer disease brain. *Neurobiol Dis*. 118, 129-141.
- Tsai, L.H., Takahashi, T., Caviness, V.S., Jr. and Harlow, E., 1993. Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development*. 119, 1029-40.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J. and Goshima, Y., 2005. Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells*. 10, 165-79.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F. and Goshima, Y., 2009. Semaphorin3A signaling mediated by Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *J Biol Chem*. 284, 27393-401.
- Vincent, P., Collette, Y., Marignier, R., Vuillat, C., Rogemond, V., Davoust, N., Malcus, C., Cavagna, S., Gessain, A., Machuca-Gayet, I., Belin, M.F., Quach, T. and Giraudon, P., 2005. A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration. *J Immunol*. 175, 7650-60.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K. and Mueller, B.K., 2000. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol*. 149, 263-70.
- Wang, F., Wang, X., Shapiro, L.A., Cotrina, M.L., Liu, W., Wang, E.W., Gu, S., Wang, W., He, X., Nedergaard, M. and Huang, J.H., 2017. NKCC1 up-regulation contributes to early post-traumatic seizures and increased post-traumatic seizure susceptibility. *Brain Struct Funct*. 222, 1543-1556.
- Wang, L.H. and Strittmatter, S.M., 1996. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci*. 16, 6197-207.
- Wang, Q., Woltjer, R.L., Cimino, P.J., Pan, C., Montine, K.S., Zhang, J. and Montine, T.J., 2005. Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. *FASEB J*. 19, 869-71.
- Watamura, N., Toba, J., Yoshii, A., Nikkuni, M. and Ohshima, T., 2016. Colocalization of phosphorylated forms of WAVE1, CRMP2, and tau in Alzheimer's disease model mice:

- Involvement of Cdk5 phosphorylation and the effect of ATRA treatment. *J Neurosci Res.* 94, 15-26.
- Weiwad, M., Kullertz, G., Schutkowski, M. and Fischer, G., 2000. Evidence that the substrate backbone conformation is critical to phosphorylation by p42 MAP kinase. *Febs Letters.* 478, 39-42.
- Wilson, S.M., Ki Yeon, S., Yang, X.F., Park, K.D. and Khanna, R., 2014. Differential regulation of collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) phosphorylation by GSK3 $\alpha$  and CDK5 following traumatic brain injury. *Front Cell Neurosci.* 8, 135.
- Wisniewski, H.M., Narang, H.K. and Terry, R.D., 1976. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci.* 27, 173-81.
- Xu, J., Tsutsumi, K., Tokuraku, K., Estes, K.A., Hisanaga, S. and Ikezu, T., 2011. Actin interaction and regulation of cyclin-dependent kinase 5/p35 complex activity. *J Neurochem.* 116, 192-204.
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C. and Lu, K.P., 1997. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science.* 278, 1957-60.
- Yoneda, A., Morgan-Fisher, M., Wait, R., Couchman, J.R. and Wewer, U.M., 2012. A collapsin response mediator protein 2 isoform controls myosin II-mediated cell migration and matrix assembly by trapping ROCK II. *Mol Cell Biol.* 32, 1788-804.
- Yoshida, H., Watanabe, A. and Ihara, Y., 1998. Collapsin response mediator protein-2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 273, 9761-8.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A. and Kaibuchi, K., 2005. GSK-3 $\beta$  regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell.* 120, 137-49.
- Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M. and Noda, M., 2003. Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur J Neurosci.* 17, 2329-43.
- Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C. and Del Sal, G., 2002. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature.* 419, 853-7.
- Zhang, H., Kang, E., Wang, Y., Yang, C., Yu, H., Wang, Q., Chen, Z., Zhang, C., Christian, K.M., Song, H., Ming, G.L. and Xu, Z., 2016a. Brain-specific Crmp2 deletion leads to neuronal development deficits and behavioural impairments in mice. *Nat Commun.* 7.
- Zhang, J.N., Michel, U., Lenz, C., Friedel, C.C., Koster, S., d'Hedouville, Z., Tonges, L., Urlaub, H., Bahr, M., Lingor, P. and Koch, J.C., 2016b. Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration. *Sci Rep.* 6, 37050.
- Zhang, L., Liu, W., Szumlanski, K.K. and Lew, J., 2012. p10, the N-terminal domain of p35, protects against CDK5/p25-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 20041-6.
- Zhang, Z., Ottens, A.K., Sadasivan, S., Kobeissy, F.H., Fang, T., Hayes, R.L. and Wang, K.K., 2007. Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 24, 460-72.
- Zhao, S., Fu, J., Liu, X., Wang, T., Zhang, J. and Zhao, Y., 2012. Activation of Akt/GSK-3 $\beta$ /beta-catenin signaling pathway is involved in survival of neurons after traumatic brain injury in rats. *Neurol Res.* 34, 400-7.
- Zhao, X., Gorin, F.A., Berman, R.F. and Lyeth, B.G., 2008. Differential hippocampal protection when blocking intracellular sodium and calcium entry during traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 25, 1195-205.
- Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M.H., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G. and Lu, K.P., 2000. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell.* 6, 873-883.
- Zhou, Y., Sun, Y., Ma, Q.H. and Liu, Y., 2018. Alzheimer's disease: amyloid-based pathogenesis and potential therapies. *Cell Stress.* 2, 150-161.

- Ziak, J., Weissova, R., Jerabkova, K., Janikova, M., Maimon, R., Petrasek, T., Pukajova, B., Kleisnerova, M., Wang, M., Brill, M.S., Kasperek, P., Zhou, X., Alvarez-Bolado, G., Sedlacek, R., Misgeld, T., Stuchlik, A., Perlson, E. and Balastik, M., 2020. CRMP2 mediates Sema3F-dependent axon pruning and dendritic spine remodeling. *EMBO Rep.* 21, e48512.
- Ziemens, D., Oschmann, F., Gerkau, N.J. and Rose, C.R., 2019. Heterogeneity of Activity-Induced Sodium Transients between Astrocytes of the Mouse Hippocampus and Neocortex: Mechanisms and Consequences. *J Neurosci.* 39, 2620-2634.