

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Johanka Kučerová

Úloha prionových proteinů u diferencujících buněk

Role of prion proteins at differentiating cells

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Ing. Karel Holada, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 14. 5. 2014

Podpis

Poděkování

Především bych chtěla velice poděkovat panu Ing. Karlu Holadovi, Ph.D za odborné vedení práce a jeho cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Dále pak E. Kučerové a K. Táborské a za pomoc při opravě této práce. Díky patří také A. Táborskému a M. Filipové za jejich podporu a pomoc.

Abstrakt

Buněčný prionový protein (PrP^C) je známý především svou patologickou izoformou PrP^{Sc}, označovanou jako infekční agens prionových onemocnění, mezi které patří boviní spongiformní encefalopatie (BSE), klusavka či Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJD). Fyziologická úloha PrP^C nebyla doposud objasněna, ale byla popsána jeho účast v regulaci apoptózy, funkci adhezivní molekuly, antioxidantu, či signální molekuly. Navzdory tomu nebylo prokázáno, že by u myši tento protein byl nezbytný pro jejich správný vývoj. Ukázal se však jako esenciální pro regeneraci hematopoetických kmenových buněk po expozici letálním zátěžovým podmínkám. Exprese PrP^C může ovlivňovat proliferaci a diferenciaci tím, že pomáhá buňkám udržovat proliferační aktivitu, či zpomalovat spontánní diferenciaci. Množství proteinu pozitivně či negativně koreluje s expresí transkripční faktorů jako je např. Oct4 či Nestin, které jsou zásadní pro vývoj v embryogenezi. Exprese PrP^C také reguluje přechod buňky z G₁ fáze do S fáze buněčného cyklu. Tato bakalářská práce se zaměřuje na publikované výsledky, které zkoumají vliv PrP^C na buněčnou proliferaci a diferenciaci.

Klíčová slova:

PrP^C, proliferace, diferenciaci, self-renewal

Abstract

Cellular prion protein (PrP^C) is well known for its pathological isoform PrP^{Sc}, widely believed to be the infectious agent of the prion diseases, which include Bovine spongiform encephalopathy (BSE), scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. The physiological role of PrP^C is poorly understood, but its involvement in the regulation of apoptosis, adhesion molecules, antioxidant, or signal molecules, has been described. Despite of these findings, it hasn't been proven, that the protein is necessary for normal development of mice. However, the protein was shown to be essential for regeneration of hematopoietic stem cells after exposure to lethal stress conditions. Expression of PrP^C may have an effect on the proliferation and differentiation of cells by helping them keep the proliferative activity, or slow spontaneous differentiation. The quantity of the protein correlates positively or negatively with expression of transcription factors such as Oct4/Nestin, which are essential for development in embryogenesis. Its expression also regulates transition of cells from G₁ phase to S phase of the cell cycle. This bachelor thesis is focused on published results describing the influence of PrP^C on cellular proliferation and differentiation.

Keywords:

PrP^C, proliferation, differentiation, self-renewal

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Buněčný prionový protein.....	4
1.2	<i>Prnp</i> gen a struktura PrP ^C proteinu	5
1.3	Fyziologická funkce PrP ^C	7
2	Úloha prionového proteinu v diferencujících buňkách.....	9
2.1	PrP ^C v kmenových buňkách a jeho funkce v embryonálním vývoji.....	9
2.2	PrP ^C u tkáňově specifických buněk.....	12
2.2.1	Nervové buňky	12
2.2.2	Krevní buňky.....	15
3	Závěr	17
4	Reference	18

1 Úvod

Buněčný prionový protein PrP^C, který byl nalezen v mnoha tkáních a organismech, člověka nevyjímaje, je především známý svou alternativní patologickou izoformou PrP^{Sc}. Tato forma je označována za původce smrtelných neurodegenerativních onemocnění zvaných transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE). První onemocnění, které bylo později zařazeno mezi prionové (prion-proteinaceous infection), bylo poprvé popsáno u ovcí v 18. století pod názvy *La trem-blante* ve Francii, či *Traberkrankheit* v Německu, dnes nazývané scrapie – klusavka (McKintosh et al. 2003). W. Spielmeyer v roce 1922 popisuje CJD na základě případů publikovaných H. G. Creutzfeldtem (1920) a A. M. Jakobem (1921) (McKintosh et al. 2003). V roce 1970 C. Gajdusek na základě pozorování onemocnění kuru spojeného s obdobnou manifestací jako je např. spongiformní poškození mozku, které se vyskytuje u CJD a scrapie, tyto choroby sjednocuje a zdroj infekce označuje jako pomalý virus (McKintosh et al. 2003). V roce 1982 je PrP označeno jako infekční agens prionového onemocnění a vzniká prionová hypotéza o přenosu infekce bez kódování patogenního PrP nukleovou kyselinou (NK) (Prusiner 1982). Infekce se tak zásadně liší od onemocnění způsobených viry, viroidy či bakteriemi, pro které je NK esenciálním zdrojem informací (Prusiner 1982). Tím se vymyká jednomu ze základních dogmat biologie.

Vznik a přenos lidských TSE probíhá, oproti jiným onemocněním způsobených patogeny, v daleko větším spektru možností infekce. TSE mohou vznikat sporadicky konverzí z PrP^C na PrP^{Sc} (80%), může docházet k infekčnímu přenosu (5%) či se přenáší dědičně (15%). Prionová onemocnění jsou v populaci vzácná, například výskyt nejčastější sCJD (sporadické Creutzfeldt-Jakobovy nemoci) je celosvětově diagnostikován u jednoho či dvou případů za rok na milion obyvatel (Franková a Krausová 2008). V populaci osob starších nad 65 let se vyskytuje 5 případů ročně na milion obyvatel (Franková a Krausová 2008). V České republice bylo mezi lety 2002-2012 potvrzeno 111 případů sCJD (Rohan et al. 2013).

Onemocnění jsou neléčitelná, s dlouhou inkubační dobou a fatálním účinkem na organismus. Od klinické manifestace onemocnění dochází za méně než jeden rok (2-6 měsíců) ke smrti jedince (Franková a Krausová 2008).

Společnými znaky pro tato onemocnění jsou hromadění PrP^{Sc} v nervových buňkách spojené s tvorbou amyloidních plaků, histopatologické projevy degenerace neuronů a spongiózní změny v mozku. Objevují se záněty mozkové tkáně, které však nejsou doprovázeny imunitní odpovědí (Imran a Mahmood 2011; Franková a Krausová 2008). Lidské prionové onemocnění se vyznačuje poruchami motoriky, zhoršením zraku, řeči, postupným rozvojem demence, ataxií mozečku (Imran a Mahmood 2011). U fatální familiární insomnie (FFI) dochází také k poruchám spánku (Imran a Mahmood 2011).

TSE onemocnění je svým charakterem obdobné dalším neurodegenerativním onemocněním, jako je Alzheimerova choroba (AD) nebo Parkinsonova nemoc (PD), které mají podstatně pomalejší průběh, ale vyskytují se v populaci daleko častěji (Stanley B. Prusiner 2001). Pro tato onemocnění je charakteristická akumulace proteinů jako je β -amyloid, Tau protein či α -Synuclein, které se uspořádávají do amyloidových fibril. Při jejich usazování v tkáni dochází k jejímu poškození a odumírání (Goedert et al. 2010). Zásadní rozdíl od těchto běžných neurodegenerativních onemocnění je v možnosti přenosu. PrP^{Sc} vytváří infekční partikule schopné infikovat jiné jedince druhu i mezidruhově (např. ovce-koza) a v případě kuru, BSE či u CJD tak může existovat riziko epidemie (Goedert et al. 2010).

Při infekčním přenosu TSE dochází k primární akumulaci PrP^{Sc} v lymfatické tkáni, ve folikulárních dendritických buňkách (FDC), kam se priony dostávají prostřednictvím dendritických buněk z trávicí soustavy (Mabbott a MacPherson 2006). Přenos do centrální nervové soustavy (CNS) poté probíhá parasympatickými a sympatickými nervovými vlákny (Mabbott a MacPherson 2006).

Od začátku 20. století byla onemocnění popsána v mnoha variantách u zvířat- Tab. 1 a lidí- Tab. 2, s předpokladem PrP^{Sc} jako infekčního agens.

Zvířecí prionová onemocnění

Onemocnění	Hostitel
Scrapie (klusavka)	Ovce, kozy
BSE (bovinní spongioformní encefalopatie)	Skot
CWD (chronické chřadnutí jelenovitých)	Jeleni
TME	Norek
FSE	Kočky
NHP	Lemuři
EUE	Kudu, Nyala

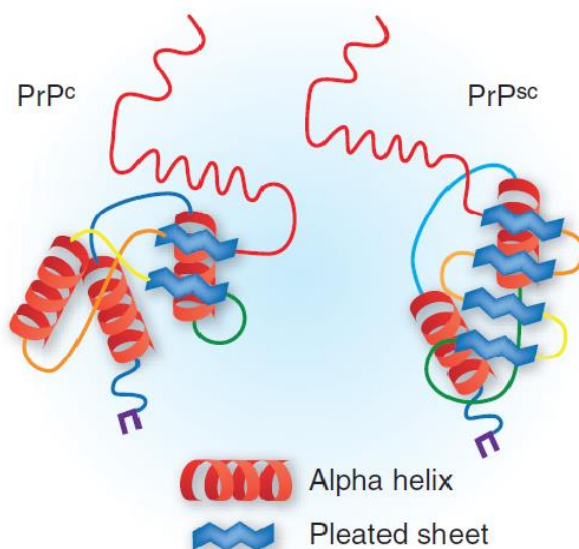
Tabulka 1; Převzato z (Imran a Mahmood 2011)

Lidská prionová onemocnění

Onemocnění	Etiologie
Kuru	Rituální kanibalismus
sCDJ (sporadická Creutzfeldt-Jakobova nemoc)	Spontánní konverze na PrP ^{Sc} či somatická mutace
iCDJ (iatrogenní CDJ)	Infekce priony lidského původu po transplantaci
f/gCDJ (familiární; genetická CDJ)	Mutace v Prnp genu; dědičné
GSS (Gertsmanův-Strausslerův-Scheinkerův syndrom)	Mutace v Prnp genu
FFI (Fatální familiární insomnie)	Autosomální onemocnění s haplotypem 178N-129M
vCJD	Infekce priony s BSE nakaženého skotu
sFI	Spontánní konverze na PrP ^{Sc} či somatická mutace
VPSP ^r	Spontánní konverze na PrP ^{Sc} či somatická mutace

Tabulka 2; Převzato z (Imran a Mahmood 2011)

Jedním ze zásadních rozdílů mezi PrP^C a jeho infekční izoformou je citlivost PrP^C k proteáze K, která běžnou formu zcela degraduje, avšak z PrP^{Sc} vzniká 27-30kDa neštěpitelný zbytek (Prusiner 1991). Odlišná je rozpustnost v neinogenních detergentech, jako je např. Triton X-100, kde se PrP^{Sc} nerozpouští (Prusiner 1991). PrP^{Sc} je také odolný vůči působení UV či ionizujícího záření, vystavení nízkým nebo vysokým teplotám, formaldehydu a sterilizaci (Franková a Krausová 2008). Obě izoformy jsou lokalizovány na stejných místech v buňce, mají shodné primární aminokyselinové (AK) složení. Rozdíl je v sekundární struktuře. U PrP^{Sc} na N-konci a centrální části molekuly dochází k vzniku konformačních změn - přeměny α -helixu na β -list, naopak C-konec zůstává většinou nezměněn - (obrázek 1) (Stahl a Prusiner 1991). Přeměna vzniká jakožto posttranslační děj na povrchu membrán či v endocytické dráze (Stahl a Prusiner 1991).



Obrázek 1

PrP^C a PrP^{Sc} sdílejí stejnou primární strukturu, sekundární je však odlišná. U PrP^{Sc} dochází v centrální části k přeměně α -helixu na β -list; obrázek převzat z: (Wilson a Nixon 2009)

1.1 Buněčný prionový protein

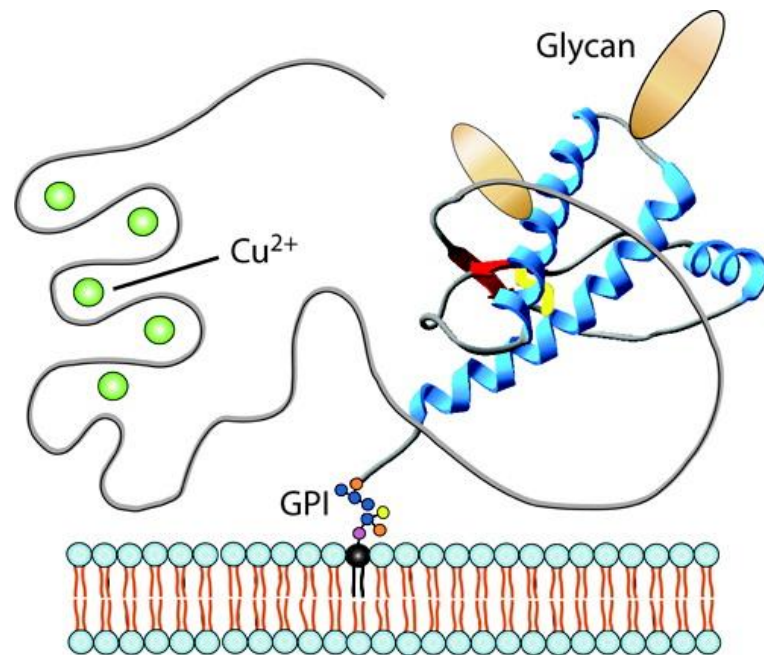
Buněčný prionový protein je známý především jako prekurzor PrP^{Sc}, který je hlavní, ne-li jedinou komponentou, tvořící infekční prionové částice. V současnosti se o PrP^C uvažuje také jako o dynamické buněčné platformě na povrchu membrán různých typů buněk, která je zapojena v mnoha procesech buněčného života, od časně embryogeneze až po programovanou smrt buňky, apoptózu. Existuje řada studií prokazujících, že PrP^C jakožto ligand ovlivňuje mnohé: funkci nervové a imunitní soustavy, včetně paměti či zánětlivých reakcí, buněčnou proliferaci, diferenciaci, a to jak v soustavě nervové, tak i v mnohých dalších (Linden et al. 2008). Aktivně se také podílí v mnohých signálních drahách, například v signální kaskádě některých proteinů Bcl-2 rodiny nebo v EGFr signalizaci, zapojené do procesu myelinizace (Linden et al. 2008; Bribián et al. 2012). Protein se vyskytuje na povrchu buněk v cholesterol-bohatých lipidických raftech, především na buňkách nervových a v menším množství na lymfocytech a dalších buněčných strukturách, a to již od časně syntézy v ER (Büeler et al. 1992; Santuccione et al. 2005). Navzdory mnoha prokázaným funkcím buněčného prionového proteinu, nebyl tento protein označen jakožto esenciální. U myši s *Prnp*^{0/0} genomem nedochází k žádným zásadním fenotypovým projevům, ať se jedná o anatomické abnormality, fertilitu či chování, vzniká pouze rezistence vůči TSE onemocnění (Büeler et al. 1992). Některé práce však naznačují, že při nepřítomnosti proteinu dochází k určitým specifickým abnormalitám. Při oxidačním stresu u myši s *Prnp*^{0/0} byla pozorována nižší aktivita super-oxid dismutázy (SOD) (Brown et al. 1997); byly pozorovány změny délky v cirkadiálních rytmech a spánku u *Prnp*^{0/0} myši (Tobler et al. 1996). Zkoumány také byly problémy s prostorovým učením a motorikou za nepřítomnosti PrP^C v závislosti na věku zkoumaných zvířat, kdy u starších jedinců došlo k zhoršení těchto schopností (Coitinho et al. 2003). Jedno z možných vysvětlení, proč nedochází u *Prnp*^{0/0} myši k fenotypovým projevům, může být kompenzace funkce pomocí exprese redundantních genů Shadoo a Doppel, které jsou přepisovány v některých tkáních či určitých vývojových fázích, a mohly by funkci PrP^C zastupovat (Miranda et al. 2011). Také některé molekuly mohou kompenzovat nepřítomnost PrP^C zvýšením svého množství. Příkladem může být zvýšení množství integrinů podporující axonální růst při nepřítomnosti PrP^C (Hajj et al. 2007).

1.2 *Prnp* gen a struktura PrP^C proteinu

Vysoce konzervovaný PrP^C membránový glykoprotein o velikosti 30-35kDa, je u lidí kódován dvěma exony, které se nacházejí na dvacátém chromozomu a o délce transkriptu 253 AK (maturovaný, po posttranslačních modifikacích 208 AK) (Horiuchi et al. 1998; Prusiner 1991). U myši je kódován třemi exony, podobně tomu je u skotu či krys, a nachází se na druhém chromozomu, délka transkriptu je 254 AK. Celková homologie PrP^C mezi křečky, lidmi a myšmi dosahuje 90%, u ovcí a skotu je pak nižší (Horiuchi et al. 1998; Prusiner 1991).

C-koncová globulární doména proteinu je vysoce konzervovaná mezi mnoha druhy během evoluce, což poukazuje na možnou podstatnou roli této části proteinu. Na povrchu buněk je vázána pomocí GPI kotvy (Stahl a Prusiner 1991). GPI kotva je připojována v endoplazmatickém retikulu (ER) na C-konec, kde se nachází příslušná signální sekvence pro připojení (Stahl a Prusiner 1991). Ve střední části proteinu se nachází hydrofobní doména (Stahl a Prusiner 1991). Blíže k C-konci doména obsahuje dva krátké β -listy a tři α -řetězce, kde mezi druhým a třetím helixem je disulfidický můstek- (obrázek 2) (Wuthrich a Riek 2001). Tato doména také obsahuje dvě potenční místa ke N-glykosylaci, protein se nachází na buňce ve všech formách: nelykosylované, či s mono/di glykosylací (Wuthrich a Riek 2001). Na NH₂-konci nacházíme cílovou sekvenci pro ER, která je následně odstraněna, kde je protein upravován (Stahl a Prusiner 1991; Prusiner 1991). Také se zde nalézají pět sérií okta-repeticí (množství sérií se mezi živočišnými druhy může lišit), které mohou sloužit jako vazebné místo pro Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ (Choi et al. 2006). Z ER je následně přes Golgiho aparát (GA) transportován na buněčný povrch.

U dospělých jedinců je *Prnp* gen přepisován specificky pro každou tkáň. Nejvíce v mozku, a to jak v proliferačních zónách nediferencovaných buněk, tak v části obsahující diferencované neuronální a gliové buňky, které vykazují expresi PrP^C (Manson et al. 1992). V nižším množství se PrP^C objevuje v srdci, v plicích a nejméně v játrech (Manson et al. 1992)



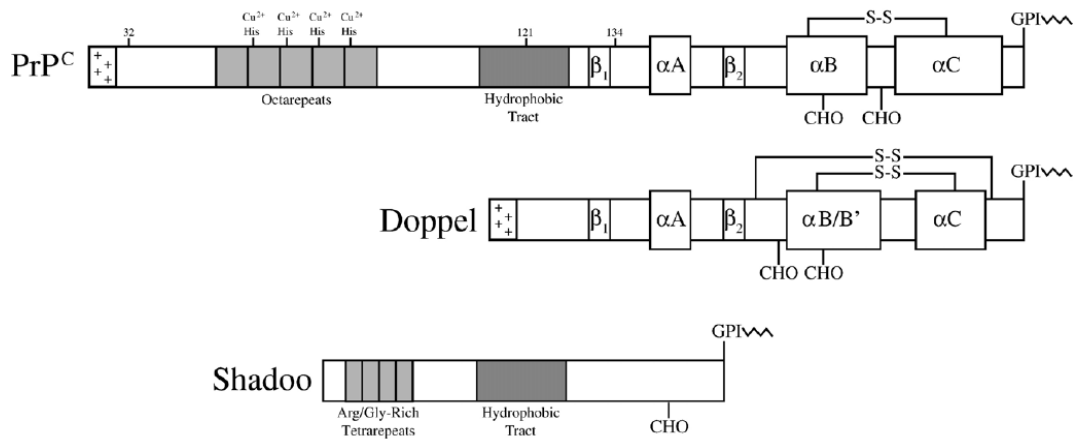
Obrázek 2

Struktura PrP^C: Na N-konci se nalézá série okta-repetic, které mohou vázat ionty jako je např. Cu²⁺ či Zn²⁺, v centrální části se nachází struktura tří α -helixů a dvou β -listů, jsou zde dvě místa pro glykosylaci. C-konec je navázán na GPI-kotvu v buněčné membráně; obrázek převzat z: (Cobb a Surewicz 2009)

Prionová genová rodina čítá tři hlavní členy, *Prnp* gen kódující PrP^C, *Prnd* gen kódující Doppel (Dpl)- protein specifický pro mužský reprodukční systém, a *Sprn* gen kódující PrP^C-like protein Shadoo (Sho), který je přepisován v CNS, ale je méně rozšířen než PrP^C (Watts a Westaway 2007). Struktura proteinu Dpl je obdobná struktuře PrP^C, myši s krysami sdílejí >90% proteinové identity, myši a lidé okolo 76% (Moore et al. 1999). Homologní části proteinu jsou především na C-terminální doméně, na N-terminální doméně chybí hydrofobní část a série okta-repetic- (obrázek 3) (Luhrs et al. 2003; Riek a Luhrs 2003). Lidé s různými druhy sdílejí přibližně 20-25% sekvenční homologie (Moore et al. 1999). Hlavní funkce tohoto proteinu je stejně jako PrP^C nejasná, avšak oproti *Prnp* je *Prnd* přepisován pouze v malé míře v CNS, jeho exprese probíhá především v testes (Moore et al. 1999). U jedinců *Prnd*^{0/0} nebyl narušen jejich embryonální či postnatální vývoj, nicméně samčí jedinci byli neplodní (Behrens et al. 2002).

Shadoo je naopak homologní s PrP^C v jeho N-terminální doméně, neobsahuje však okta-repetice, nýbrž tetra-repetice bohaté na glycin, serin, alanin, homologní je také

hydrofobní část obou proteinů, a oproti proteinům PrP^C či Dpl se zde neutváří sekundární struktury α -helixů (Premzl et al. 2003; Watts a Westaway 2007).



Obrázek 3

Schéma genů prionové genové rodiny. Doppel je homologní v C-terminální doméně, na N-terminální postrádá hydrofobní část a okta-repetice. Shadoo má obdobnou N-terminální, nachází se zde tetra-repetice; obrázek převzat z: (Watts a Westaway 2007)

1.3 Fyziologická funkce PrP^C

Fyziologická funkce PrP^C je studována jak na zvířecích modelech, tak in vitro. Přestože bylo popsáno jeho angažmá v mnohých procesech buněčného života, a to za interakce s velkým množstvím různých ligandů, tak u jedinců s *Prpn*^{0/0} genotypem nedochází k zásadním fenotypovým projevům (Westergard et al. 2007; Büeler et al. 1992). PrP^C na povrchu buněk interaguje s mnoha molekulami, jako jsou například:

STI-1- heat-shock protein; PrP^C navázáním může např. negativně ovlivnit

apoptózu (Zanata et al. 2002).

Calveolin-1- protein lipidických raftů (Mouillet-Richard et al. 2000).

LRP- lamininový receptorý prekurzor (Gauczynski et al. 2001).

N-CAM- neurální buněčná adheze (Schmitt-Ulms et al. 2001).

Bcl-2-apoptotický regulátor (Kurschner a Morgan 1995).

Do buněčného života je zapojen jakožto anti-apoptotický regulátor. Váže se např. na protein Bax, pro-apoptotický člen Bcl-2 rodiny na lidských post-mitotických neu-

ronech, a inhibuje spuštění signální kaskády, která indukuje buněčnou smrt (Roucou et al. 2003). PrP^C se také s vysokou afinitou váže na STI-1 pomocí své hydrofobní domény, kdy např. jejich vzájemná interakce v retině indukuje neuprotekci pomocí cAMP/PKA signálních drah (Zanata et al. 2002).

PrP^C pomocí N-terminální domény s okta-peptidovými repeticemi je schopen vázat Cu²⁺ do pěti až šesti vazebných míst na histidin a glycin a mohl by tak mít určitou enzymatickou funkci založenou právě na vazbě s tímto iontem (Choi et al. 2006; Brown et al. 1997). Podle studií Brown et al. 1997; D et al. 1999; Pauly a Harris 1998) by PrP^C interakcemi s membránovými proteiny vázající Cu²⁺ mohl mít majoritní roli v jejich regulaci a také v exportu iontů do intracelulárního prostoru buňky. Měď, kterou protein vychytává z extracelulárního prostředí, indukuje endocytózu proteinu z buněčného povrchu. PrP^C zprostředkováním Cu²⁺ urychluje inkorporaci mědi do Cu/Zn SOD-1 a pokud buňka neexprimuje PrP^C, dochází k poklesu aktivity Cu/Zn SOD-1. Ale i samotný protein může alternovat funkci SOD-1 (Brown et al. 1997; D et al. 1999; Pauly a Harris 1998).

Pokud se v buněčné kultuře nenachází dostatek buněčného prionového proteinu či jeho patogenní izoforma PrP^{Sc}, jsou buňky méně životaschopné a citlivé k oxidačnímu poškození Cu²⁺ či H₂O₂, proto se o proteinu uvažuje i jakožto o antioxidantu (D et al. 1999; Lehmann 2002).

Další možnou úlohou, kterou PrP^C zastává, je ovlivňování signální transdukce v buňce. Pomocí N-terminální domény s navázaným Cu²⁺ může PrP^C interagovat s PI 3-kinázou, proteinem senzitivním vůči oxidativnímu stresu a regulující signály buněčného přežití či apoptózy (Vassallo et al. 2005). Buňky s PrP^C měly signifikantně vyšší aktivitu tohoto proteinu, je tedy možné, že je PI 3-kináza pomocí Cu²⁺ aktivována (Vassallo et al. 2005).

Pravděpodobně zásadní funkci zastává PrP^C v hipokampu, kde dochází k vysoké expresi proteinu i v dospělosti. Hipokampus je část koncového mozku a hraje roli v krátkodobé paměti a prostorové orientaci (Maglio et al. 2004). V NS se protein koncentruje na synapsích, a to jak na presynaptické, tak i na postsynaptické (Maglio et al. 2004). V hipokampu se také váže na další ligand- Laminin γ -1. Ve společné interakci ovlivňují neurální plasticitu, tedy formování paměti, pravděpodobně pomocí cAMP a ERK1/2 signalizace (Coitinho et al. 2006).

Určitou úlohu zastává PrP^C také v imunitním systému, kde se tento protein hojně exprimuje. T-buňky exprimující PrP^C oproti *Prnp*^{0/0}, dosahují vyšší schopnosti proliferovat a je také modulována jejich aktivace a potencionální odpověď na antigen (Bainbridge a Walker 2005).

2 Úloha prionového proteinu v diferencujících buňkách

2.1 PrP^C v kmenových buňkách a jeho funkce v embryonálním vývoji

Postupný vývoj CNS s periferním nervstvem a jejich diferenciaci je úzce spjat s expresí PrP^C. Protein je možné v embryonálních kmenových buňkách detekovat již od časně embryogeneze, a to jak v buňkách diferencovaných, tak i v proliferujících (Manson et al. 1992).

Pomocí imunodetekce během různých fází vývoje nervové soustavy embrya skotu (27. - 39. den vývoje) bylo ukázáno, že exprese PrP^C vzrůstá v mozku a míše v místech, kde dochází k diferenciaci buněk, jako jsou intermediální a marginální vrstvy neuroepitelia (Peralta et al. 2012). Tyto oblasti jsou primárně osídleny axony a dendrity kortikálních neuronů a neuroglií (Peralta et al. 2012). Naopak v periventrikulární zóně, kde se nacházejí nediferencované, mitoticky aktivní neurální progenitorové buňky, nebyl PrP^C detekován (Peralta et al. 2012). PrP^C imunoreaktivitou byl tento protein detekován také v dorzálních kořenech ganglií a v periferních nervech asociovaných s vývojem střev (Peralta et al. 2012).

Během embryogeneze u myších embryí starých 6,5 - 9,5 dne není detekováno mRNA *Prpn*, ale během 13,5 dne je již exprese široce rozšířena u postmitotických buněk v CNS, PNS a v jiných vyvíjejících se částech embrya, jako je např. střevo či dentální lamina (Manson et al. 1992). Během 16,5 dne je určité množství proteinu exprimováno v časně fázi buněk nefronů v ledvinách (Manson et al. 1992). Zároveň na myších maternálních deciduálních buňkách byly během velmi časně embryogeneze (6,5 - 8,5 den) detekovány *Prnp* transkripty. Během 13,5. a 16,5. dne jsou *Prnp* transkripty detekovatelné v maternálních buňkách placenty, amnionu a mezodermální vrstvě žloutkového obalu (Manson et al. 1992).

Od 9. do 18. (přesné datování počátku exprese se mezi autory nepatrně liší) dne buněčného vývoje myších embryí dochází k značnému nárůstu exprese PrP^C. Jeho množství koreluje s hladinou markeru Oct4, což je jeden z nejpodstatnějších transkripčních faktorů, který udržuje pluripotenci u lidských a myších embryonálních buněk (Peralta et al. 2011). Množství Oct4, s postupnou diferenciací buněk a s vyšším množstvím PrP^C, klesají (Peralta et al. 2011). Hladina exprese PrP^C u myších embryí má také vliv i na další pluripotentní markery, jako jsou Nestin, Nanog, Oct3/4 či FoxD3, množství jejich transkriptů bylo v *Prnp*^{0/0} jedincích u Oct3/4 a Nanog nižší a FoxD3 vyšší (Miranda et al. 2011; Peralta et al. 2011).

Podobné výsledky byly také získány během spontánní diferenciaci lidských kmenových buněk (hESCs). V počátku je množství PrP^C nedetekovatelné, naopak proliferační marker oct-3/4 je přepisován ve vysoké míře. Během následné spontánní diferenciaci však dochází k poklesu oct-3/4 a naopak vzrůstu exprese PrP^C (Lee a Baskakov 2010).

PrP^C má schopnost během časně buněčné diferenciaci pozitivně regulovat množství mRNA pro Nanog protein, kdy hladina přepisované mRNA *Prnp* odpovídá mRNA Nanog genu (Miranda et al. 2011). Pokud došlo k inhibici signálních drah u *Prnp* pomocí specifických protilátek, bylo signifikantně sníženo množství mRNA pro Nanog protein (Miranda et al. 2011). Nanog protein ovlivňuje self-renewal (sebe-obnovu) kmenových buněk a reguluje pluripotenci a diferenciaci za pomoci stimulace transkripčních faktorů Stat3 a Oct4 (Chambers et al. 2003). Expres *Prnp* tak určitým způsobem koriguje množství mRNA Nanog proteinu. (Miranda et al. 2011).

Podstatná je vzájemná interakce PrP^C a Nestinu. Nestin je pozitivní marker, který se nachází u rostoucích a diferencujících buněk, a to jak u buněk nervových (především v membránách rostoucích axonů), tak i v tkáních jako jsou játra, srdce či prvoledviny (mesonephros) (Peralta et al. 2011). Pokud dojde k inhibici tvorby PrP^C, například při využití siRNA proti mRNA *Prnp*, dojde k poklesu tvorby proteinu PrP^C, což má také za následek signifikantní snížení množství Nestinu a zpoždění jeho exprese oproti kontrolním buňkám (Peralta et al. 2011).

Pro zjištění pozitivního či negativního vlivu prionového buněčného proteinu jakožto extracelulárního faktoru na interakci buněk během diferenciaci hESCs, bylo využito kultivační medium s přidaným α -rPrP (Lee a Baskakov 2010). α -rPrP je rekombinantní nezkrácený, neglykosylovaný prionový protein, který není navázaný na GPI kotvu a zaujímá α -helikální strukturu (Baskakov a Bocharova 2005). Z extracelulárního prostoru může být navazován na membrány za pomoci např. komplexu ADAM (Lee a Baskakov 2010). Buňky, které byly pěstovány za nepřítomnosti α -rPrP, nebyly schopné udržovat patřičnou růstovou morfologii, oproti buňkám, které měly α -rPrP v mediu (Lee a Baskakov 2010). Zároveň u nediferenciováných hESCs je vysoká aktivita alkalické fosfatázy (AP), ale pouze u buněk, které měly v mediu α -rPrP, u stejných buněk bez α -rPrP, byla tato aktivita zásadně redukována (Lee a Baskakov 2010). To podporuje teorii, že α -rPrP zpomaluje spontánní diferenciaci u hESC, a zároveň podporuje proliferační aktivitu a udržuje tuto fázi delší, než je tomu u buněk bez α -rPrP proteinu (Lee a Baskakov 2010).

PrP^C tedy negativně ovlivňuje spontánní diferenciaci hESCs a má také negativní efekt na jejich přechod z G₁ fáze do S fáze. Během spontánní diferenciaci hESCs, kdy měly tyto buňky umlčený PrP^C a exprese proteinu byla down-regulována pomocí lentivirových vektorů, bylo procento buněk v G₁ fázi signifikantně vyšší, než u buněk s over-expresí PrP^C (Lee a Baskakov 2013). Není zcela jasné, zda protein spouští diferenciaci sám o sobě, či zda pouze zpomaluje samotný přechod mezi G₁ a S fází, což by vedlo k následné diferenciaci (Lee a Baskakov 2013). Tímto se ukazuje, že PrP^C nemá pouze roli jako diferenciací marker ve společné interakci s jinými, ale svou expresí aktivně ovlivňuje buněčný cyklus (Lee a Baskakov 2013). Také proliferační aktivita korelovala s hladinou exprese PrP^C u hESCs a u buněk s takto down-regulovanou expresí proteinu došlo k disbalanci mezi jednotlivými zárodečnými liniemi, kdy ektodermální linie byly suprimovány (Lee a Baskakov 2013). Naopak u buněk s over-expresí PrP^C došlo během spontánní diferenciaci k udržování vysoké proliferační aktivity těchto buněk a všechny tři zárodečné linie byly potlačeny (Lee a Baskakov 2013).

2.2 PrP^C u tkáňově specifických buněk

Vliv buněčného prionového proteinu je především popisován u nervové soustavy, kde je nejvíce exprimován, a také ve snaze o následné využití těchto poznatků pro výzkum a případnou léčbu TSE. PrP^C je však exprimován i v buňkách, které nejsou neurálního původu, jako jsou buňky krevní, svalové, pohlavní či buňky imunitního systému. I zde byl popsán vliv na jejich buněčnou diferenciaci, proliferaci a self-renewal.

Možný vliv má PrP^C v zapojení do formování zubní tkáně pomocí regulace diferenciací ameloblastů a odontoblastů. Expres PrP^C se vyskytuje v různých fázích vývoje zubní tkáně, které ovlivňuje a mohl by tak mít např. efekt na pevnost zubní skloviny, jelikož dochází k její rozdílné mineralizaci u jedinců, kteří PrP^C neexprimují (Zhang et al. 2011).

U myších kardiovaskulárních ES buněk, které se diferencují do kardiomyocytů a buněk hladké svaloviny, se 8,5. den objevuje exprese *Prnp* genu. PrP^C tak může sloužit jako povrchový marker pro rozdělení ne-kardiomyogenních a kardiomyogenních buněčných frakcí (Hidaka et al. 2010). Otázkou zůstává specifický vliv PrP^C na diferenciaci kardiomyocytů či jiných myocytů. Na myších *in vivo* modelech množství PrP^C přímo neovlivňuje svalovou morfologii (a diferenciaci) za běžných podmínek, avšak má určitou úlohu při její regeneraci (Stella et al. 2010). Při poškození svalové tkáně u myší *Prnp*^{0/0}, byl pozorován delší časový úsek pro zhojení - získání původní morfologie svalů, a nepřítomnost PrP^C měla za následek delší proliferační periodu a zpoždění diferenciací (Stella et al. 2010). Během regenerace především v prvních dnech, dochází u *Prnp*^{0/0} jedinců k down-regulaci oxidativních a glykolytických fibril. Také hladina TNF- α (cytokin produkovaný makrofágy a myocyty se zásadní rolí v myogenezi pomocí aktivace p38) byla nižší u *Prnp*^{0/0} jedinců (Stella et al. 2010).

2.2.1 Nervové buňky

U savců je PrP^C nejvíce rozšířen v především v mozku, ve spinální chordě, v dorzálních kořenech ganglií, v mozečkových gangliích a v periferních nervech (Peralta et al. 2012; Kanaani et al. 2005). Koncentruje se především na synapsích, nikoliv však v mitoticky se dělících buňkách (Peralta et al. 2012; Kanaani et al. 2005). PrP^C má dů-

ležitou úlohu jak během neurogeneze, ale také v dospělé savčí CNS, kde se exprimuje vysoké množství oproti buňkám nediferenciovaným, a jeho hladina pozitivně koreluje s hladinou neuronálních prekursorů pro dospělé (maturované) neurony (Witusik et al. 2007; Steele et al. 2006).

V lidském embryonálním mozku se PrP^C začíná exprimovat 11. týden v axonálních traktech a exprese pokračuje až do konce těhotenství. Na jeho konci bylo pozorováno zvýšené množství exprese PrP^C u neuronálních buněk, a naopak nízká exprese PrP^C u časných fází mikroglálních subpopulací by mohla vést k jejich specifické diferenciaci (Adle-Biassette et al. 2006). Podobně nízká či nedetekovatelná hladina exprese PrP^C u astrocytů či oligodendroglíí, naznačuje možný vliv hladiny exprese na vývoj neuronů (Steele et al. 2006). Samotná exprese proteinu u neuronálních buněk je velmi různorodá a je možné, že hladina exprese *Prnp* ovlivňuje finální fenotyp buňky, a PrP^C se jeví jako jeden z faktorů ovlivňující buněčný typ (Mouillet-Richard et al. 1999).

Na modelu lidských kmenových buněk pozitivních na GFAP (NHA) byla pozorována nízká hladina exprese PrP^C v nediferenciovaném stádiu. Po následné diferenciaci, se hladina exprese znatelně zvýšila, ale pouze u buněk neurálních. Gliové buňky měly v porovnání s buňkami nediferenciovanými hladiny stejné (Witusik et al. 2007). Obdobné výsledky byly i u myších modelů, kdy množství PrP^C pozitivně korelovalo s diferenciací multipotentních neurálních prekursorů, a zároveň i pozitivně s množstvím Nestinu (Steele et al. 2006).

Ale i nízké množství exprese PrP^C by u astrocytů mohlo mít vliv na jejich vývoj, podobně jako u mikroglíí. U myších astrocytů, které buněčný prionový protein neexprimovaly *Prnp*^{0/0}, byl nižší stupeň vývoje, než u astrocytů, které protein exprimovaly normálně (WT). Zároveň u WT a over-expressing (OE) astrocytů byla pozorována vyšší rezistence vůči indukované buněčné smrti, pravděpodobně díky interakci s STI-1, a také došlo k redukci exprese Nestinu (Hartmann et al. 2013).

U oligodendrocytů v hipokampu absence PrP^C vedla k poklesu proliferace, zpoždění diferenciaci a k zvýšení počtu nediferenciovaných buněk (Bribián et al. 2012). U těchto *Prnp*^{0/0} oligodendrocytů došlo během diferenciaci ke zvýšení exprese markerů, jako jsou Sox10 a Olig2- TF esenciální pro vývoj oligodendrocytů (Bribián et al. 2012). A naopak došlo down-regulaci různých diferenciačních markerů jako je

Sox17, který reguluje přechod z proliferující fáze do myelinizující, což může mít za následek právě zpoždění diferenciaci těchto buněk (Bribián et al. 2012).

Rozdílná délka procesu diferenciaci při nedostatku PrP^C byla i u prekursorových multipotentních buněk *Prnp*^{0/0}, které se od myších buněk WT, lišily delší dobou nediferenciované fáze. A naopak WT buňky se projevovaly zvýšenou expresí PrP^C, a to jak u neurálních prekursorů, tak u maturovaných buněk. Ačkoliv byla nediferenciovaná fáze u *Prnp*^{0/0} buněk delší, byly tyto buňky schopny se plnohodnotně uplatnit v neurogenезi (Steele et al. 2006). Zároveň také zvýšená hladina PrP^C neovlivňuje celkové množství neuronů, které jsou produkovány a ani jejich morfologii (Steele et al. 2006).

Krom jeho možné úlohy v ovlivňování buněčných typů ve vývoji, PrP^C se angažuje ve správném formování nervové soustavy a podílí se na její funkčnosti. Imuno- značením (využity byly specifické protilátky pro maturované neurony jako GAP-43, MAP-2, Synaptophysin) byla pozorována vysoká míra exprese PrP^C během neurogenезe, především na vyvíjejících axonech, a během synaptogenезe (Adle-Biassette et al. 2006). Vysoká hladina PrP^C na povrchu synapsí je udržována také v dospělosti (Adle-Biassette et al. 2006).

Během vývoje hipokampálních nervových buněk *Prnp*^{0/0}, které byly inkubovány s rekombinantním PrP, došlo k zásadnímu vývoji celé buňky, především synapsí. Buňky se polarizovaly, došlo k prodloužení jejich neuritů, vývoji synapsí a propojení mezi nimi (Kanaani et al. 2005). PrP^C je podstatný i pro samotnou funkci synapsí. V hipokampu mozku *Prnp*^{0/0} dochází k oslabení inhibičního receptoru GABA_A a vzniká zde porucha dlouhodobého působení potenciálu (Collinge et al. 1994).

Jak již bylo v kapitole 1.3 řečeno, buněčný prionový protein interaguje se specifickými molekulami a tím ovlivňuje různé signální dráhy v nervových buňkách, včetně diferenciacních regulátorů. Interakce STI-1 s PrP^C má anti-apoptotický vliv. Ukazuje se však, že má možná i další roli v nervových kmenových buňkách (NSC) (Santos et al. 2011). Na buněčném in vitro modelu, neurosférách, byl zkoumán vliv STI-1 v interakci s buněčným prionovým proteinem. Jejich interakce se ukázala jako pozitivní pro self-renewal kapacitu, u *Prnp*^{0/0} buněk došlo k redukci těchto linií (Santos et al. 2011).

PrPC kooperuje také s integry embryonálních buněk během diferenciaci. Například u *Prnp^{0/0}* myších linií dochází k deregulaci integrinů, kdy mRNA pro některé byly down-regulované, jiné se naopak nacházely ve vyšších koncentracích (Miranda et al. 2011). K zvýšenému množství integrinů během vývoje nervové tkáně u myši *Prnp^{0/0}* dochází v interakci s vitronectinem, proteinem s důležitou úlohou během diferenciaci a proliferace především CNS, který je ligandem pro integry (Hajj et al. 2007). Společně s PrPC ovlivňují axonální růst (Hajj et al. 2007). U *Prnp^{0/0}* však nedochází k jejich interakci a naopak značně stoupá hladina integrinů $\alpha\beta3$, které pravděpodobně kompenzují tuto disbalanci (Hajj et al. 2007).

Další molekula, se kterou PrPC interaguje, je NCAM (adhezivní molekula neurálních buněk). Vyskytuje se na povrchu neuronů, kde má zásadní roli v aktivaci jejich růstu pomocí tyrozin-kinázy p59^{fyn} (Santuccione et al. 2005). Tato aktivace vede k indukovanému nervovému růstu. V kultuře myších hipokampálních neuronů bylo zjištěno, že při nepřítomnosti PrPC, je tato signalizace omezená, resp. zeslabená (Santuccione et al. 2005). PrPC také stabilizuje NCAM v lipidických raftech a zvyšuje efektivitu reakce s p59^{fyn}. U *Prnp^{0/0}* buněk dochází k zvýšení množství p59^{fyn}, jeho aktivita je však nižší. PrPC tak v interakci s NCAM podporuje růst a vývoj nervových buněk (Santuccione et al. 2005). U myších kmenových buněk je PrPC protein velmi důležitý pro NCAM indukovanou diferenciaci (Prodromidou et al. 2014). Interakce PrPC a NCAM ovlivňuje ukončení buněčného cyklu a diferenciaci, u neurálních progenitorů *Prnp^{0/0}* došlo k jejich akumulaci v proliferačním stadiu, ale již nedocházelo k následné diferenciaci (Prodromidou et al. 2014). Buňky *Prnp^{0/0}* také měly nižší hladinu β -III tubulinu, což je neuron-specifický protein exprimovaný u diferencujících buněk (Prodromidou et al. 2014). Pokud bylo do media přidáno NCAM, došlo ke zvýšení hladiny β -III tubulinu, ale pouze u buněk exprimujících PrPC (Prodromidou et al. 2014).

2.2.2 Krevní buňky

PrPC se nachází v krevní plasmě, a v různém množství se exprimuje v kostní dřeni na prekurzorech myeloidních buněk, lymfoidních buněk a na hematopoetických kmenových buňkách (HSCs), např. na HSCs CD34+ (Dodelet a Cashman 1998; Liu et al.

2001). Během diferenciaci jednotlivých linií dochází k rozrůznění množství PrP^C. U granulocytů dochází k down-regulaci exprese PrP^C, oproti lymfocytům a monocytům, kde je zachována (Dodelet a Cashman 1998). U většiny maturovaných myších T a B-lymfocytů v periferních lymfoidních orgánech, nedochází k expresi PrP^C nebo jen v malém množství (Liu et al. 2001). Naopak nejvíce PrP^C je exprimováno na thymocytech, dospívajících T-buňkách (Liu et al. 2001). Exprese probíhá i na progenitorech B-buněk (pro-B-buňky) (Liu et al. 2001). U erytroidních prekurzorů dochází během časných fází diferenciaci k zvýšení exprese PrP^C a s následnou postupnou maturací je množství down-regulované (Panigaj et al. 2011).

V přirozených podmínkách organismu nebyl pozorován rozdíl mezi *Prnp* exprimujícími jedinci a *Prnp*^{0/0}, sdílejí shodný hematokrit, množství hemoglobinu i počet červených a bílých krvinek (Zhang et al. 2006). Zásadní význam exprese PrP^C se objevuje ve stresovém stavu. PrP^C pravděpodobně interaguje s HSCs, či slouží jako koreceptor a HSCs chrání před apoptózou nebo udržuje jejich dlouhodobou sebe-obnovu (long-term self renewal) (Zhang et al. 2006). Pomocí HSCs v interakci s PrP^C je možné zrekonstruovat kostní dřeň po sériích ozáření, u jedinců *Prnp*^{0/0} k rekonstrukci nedochází a tento stav je letální (Zhang et al. 2006).

3 Závěr

PrP^C je v organismu hojně rozšířený protein s širokou škálou působností. Jednou z nich je jeho vliv na vývoj buňky, na sebe-obnovu (self-renewal) a diferenciaci do různých buněčných typů. Tato práce měla za cíl sumarizovat poznatky o vlivu PrP^C na buněčnou diferenciaci. Bylo poukázáno, že množství PrP^C kulminuje v různých fázích buněčného života a může tak mít vliv na fenotypové rozdělení buněk. Příkladem může být nízká exprese PrP^C u astrocytů oproti vysoké u oligodendrocytů nebo down-regulace PrP^C u granulocytů oproti lymfocytům a monocytům. Protein svou expresí působí na různé faktory ovlivňující diferenciaci, jako jsou Nestin, Nanog, vitronectin či Oct4. Kultivací buněk s rekombinantním PrP (α -rPrP) bylo pozorováno, že protein negativně ovlivňuje přechod z G₁ fáze do S fáze. U astrocytů se interakce PrP^C s STI-1 proteinem ukázala jako podstatná ochrana buňky před apoptózou, ale i podpora sebeobnovy a správného vývoje. PrP^C se váže i s dalšími molekulami ovlivňující růst nervové tkáně, jako je NCAM, jejichž společná interakce má vliv na ukončení buněčného cyklu a zahájení diferenciaci. PrP^C má také vliv na správný vývoj nervů a synapsí, jejich polarizaci, ale i na jejich vlastní funkci. Je také nezbytný pro rekonstrukci kostní dřeně po jejím vystavení letálním podmínkám.

Souhrnem můžeme říci, že PrP^C, který je znám především pro svou patogenní izoformu PrP^{Sc}, zasahuje aktivně svou expresí, či umělým přidáním α -rPrP do kultivačního media, k vývoji a diferenciaci buněk. Stejně tak má vliv na jejich správnou regulaci během života a má podíl na jejich funkci. Ačkoliv *Prnp*^{0/0} jedinci nevykazují žádné zásadní fenotypové odlišnosti, tato práce poukazuje na podstatnou úlohu PrP^C v jedné z nejdůležitějších fází buněčného života, tedy v buněčné diferenciaci.

4 Reference

ADLE-BIASSETTE, Homa, Catherine VERNEY, Katell PEOC'H, Marie-Christine DAUGE a et AL, 2006. Immunohistochemical Expression of Prion Protein (PrPC) in the Human Forebrain During Development. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 7., roč. 65, č. 7, s. 698–706. ISSN 00223069.

BAINBRIDGE, J. a K. B. WALKER, 2005. The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunology Letters* [online]. 15.1., roč. 96, č. 1, s. 147–150. ISSN 0165-2478. Dostupné z: doi:10.1016/j.imlet.2004.08.006

BASKAKOV, Ilia V. a Olga V. BOCHAROVA, 2005. In Vitro Conversion of Mammalian Prion Protein into Amyloid Fibrils Displays Unusual Features†. *Biochemistry* [online]. 1.2., roč. 44, č. 7, s. 2339–2348 [vid. 4. březem 2014]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi048322t

BEHRENS, Axel, Nicolas GENOUD, Heike NAUMANN, Thomas RÜLICHE, Fredi JANETT, Frank L. HEPPNER, Birgit LEDERMANN a Adriano AGUZZI, 2002. Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *The EMBO Journal* [online]. 15.7., roč. 21, č. 14, s. 3652–3658 [vid. 6. květen 2014]. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf386

BRIBIÁN, Ana, Xavier FONTANA, Franc LLORENS, Rosalina GAVÍN, Manuel REINA, José Manuel GARCÍA-VERDUGO, Juan María TORRES, Fernando DE CASTRO a José Antonio del RÍO, 2012. Role of the Cellular Prion Protein in Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Differentiation in the Developing and Adult Mouse CNS. *PLoS ONE* [online]. 18.4., roč. 7, č. 4, s. e33872 [vid. 11. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0033872

BROWN, David R., Kefeng QIN, Jochen W. HERMS, Axel MADLUNG, Jean MANSON, Robert STROME, Paul E. FRASER, Theo KRUCK, Alex VON BOHLEN, Walter SCHULZ-SCHAEFFER, Armin GIESE, David WESTAWAY a Hans KRETZSCHMAR, 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 18.12., roč. 390, č. 6661, s. 684. ISSN 00280836.

BÜELER, Hansruedi, Marek FISCHER, Yolande LANG, Horst BLUETHMANN, Hans-Peter LIPP, Stephen J. DEARMOND, Stanley B. PRUSINER, Michel AGUET a Charles WEISSMANN, 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* [online]. 16.4., roč. 356, č. 6370, s. 577–582 [vid. 29. březem 2014]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/356577a0

COBB, Nathan J. a Witold K. SUREWICZ, 2009. Prion Diseases and Their Biochemical Mechanisms†. *Biochemistry* [online]. 24.2., roč. 48, č. 12, s. 2574–2585 [vid. 19. duben 2014]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi900108v

COITINHO, Adriana S., Adriana R. O. FREITAS, Marilene H. LOPES, Glaucia N. M. HAJJ, Rafael ROESLER, Roger WALZ, Janine I. ROSSATO, Martin CAMMAROTA, Ivan IZQUIERDO, Vilma R. MARTINS a Ricardo R. BRENTANI, 2006. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *European Journal of Neuroscience* [online]. 1.12., roč. 24, č. 11, s. 3255–3264 [vid. 16. duben 2014]. ISSN 1460-9568. Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05156.x

COITINHO, Adriana S., Rafael ROESLER, Vilma R. MARTINS, Ricardo R. BRENTANI a Ivan IZQUIERDO, 2003. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport July 18, 2003* [online]. roč. 14, č. 10, s. 1375–1379 [vid. 10. duben 2014]. ISSN 0959-4965. Dostupné z: doi:10.1097/01.wnr.0000078541.07662.90

COLLINGE, J., Ma WHITTINGTON, Kcl SIDLE, Cj SMITH, Ms PALMER, Ar CLARKE a Jgr JEFFERYS, 1994. Prion Protein Is Necessary for Normal Synaptic Function. *Nature* [online]. 28.7., roč. 370, č. 6487, s. 295–297. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/370295a0

D, BROWN, WONG B, HAFIZ F, CLIVE C, HASWELL S a JONES I, 1999. *Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase* [online] [vid. 7. duben 2014]. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/344/bj3440001.htm>

DODELET, Vincent C. a Neil R. CASHMAN, 1998. Prion Protein Expression in Human Leukocyte Differentiation. *Blood*. 1.3., roč. 91, č. 5, s. 1556–1561. ISSN 0006-4971, 1528-0020.

FRANKOVÁ, Marina a Martina KRAUSOVÁ, 2008. Lidské prionové nemoci. *Psychiatrie pro praxi*. roč. 2008, č. 3, s. 121–124.

GAUCZYNSKI, Sabine, Jean-Michel PEYRIN, Stéphane HAÏK, Christoph LEUCHT, Christoph HUNDT, Roman RIEGER, Susanne KRASEMANN, Jean-Philippe DESLYS, Dominique DORMONT, Corinne Ida LASMÉZAS a Stefan WEISS, 2001. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *The EMBO Journal* [online]. 1.11., roč. 20, č. 21, s. 5863–5875 [vid. 6. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/20.21.5863

GOEDERT, Michel, Florence CLAVAGUERA a Markus TOLNAY, 2010. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences* [online]. 7., roč.

33, č. 7, s. 317–325 [vid. 8. květen 2014]. ISSN 0166-2236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2010.04.003

HAIJ, Glaucia N. M., Marilene H. LOPES, Adriana F. MERCADANTE, Silvio S. VEIGA, Rafael B. da SILVEIRA, Tiago G. SANTOS, Karina C. B. RIBEIRO, Maria A. JULIANO, Saul G. JACCHIERI, Silvio M. ZANATA a Vilma R. MARTINS, 2007. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *Journal of Cell Science* [online]. 1.6., roč. 120, č. 11, s. 1915–1926 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 0021-9533, 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.03459

HARTMANN, Camila Arantes, Vilma Regina MARTINS a Flavia Regina SOUZA LIMA, 2013. High levels of Cellular Prion Protein improve astrocyte development. *Febs Letters* [online]. 16.1., roč. 587, č. 2, s. 238–244. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2012.11.032

HIDAKA, Kyoko, Manabu SHIRAI, Jong-Kook LEE, Takanari WAKAYAMA, Itsuo KODAMA, Michael D. SCHNEIDER a Takayuki MORISAKI, 2010. The Cellular Prion Protein Identifies Bipotential Cardiomyogenic Progenitors. *Circulation Research* [online]. 8.1., roč. 106, č. 1, s. 111–119 [vid. 26. únor 2014]. ISSN 0009-7330, 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209478

HORIUCHI, M., N. ISHIGURO, H. NAGASAWA, Y. TOYODA a M. SHINAGAWA, 1998. Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Animal Genetics* [online]. 1.2., roč. 29, č. 1, s. 37–40 [vid. 29. březen 2014]. ISSN 1365-2052. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2052.1998.00250.x

CHAMBERS, I., D. COLBY, M. ROBERTSON, J. NICHOLS, S. LEE, S. TWEEDIE a A. SMITH, 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* [online]. 30.5., roč. 113, č. 5, s. 643–655. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1

CHOI, Christopher J., Arthi KANTHASAMY, Vellareddy ANANTHARAM a Anumantha G. KANTHASAMY, 2006. Interaction of metals with prion protein: Possible role of divalent cations in the pathogenesis of Prion diseases. *Neurotoxicology* [online]. 9., roč. 27, č. 5, s. 777–787. ISSN 0161-813X. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2006.06.004

IMRAN, Muhammad a Saqib MAHMOOD, 2011. An overview of human prion diseases. *Virology Journal* [online]. 24.12., roč. 8, č. 1, s. 559 [vid. 21. duben 2014]. ISSN 1743-422X. Dostupné z: doi:10.1186/1743-422X-8-559

KANAANI, Jamil, Stanley B. PRUSINER, Julia DIACOVO, Steinunn BAEKKESKOV a Giuseppe LEGNAME, 2005. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1.12., roč. 95, č. 5, s. 1373–1386 [vid. 15. duben 2014]. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03469.x

KURSCHNER, Cornelia a James I. MORGAN, 1995. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Molecular Brain Research* [online]. 5., roč. 30, č. 1, s. 165–168 [vid. 6. duben 2014]. ISSN 0169-328X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-328X(95)00013-I

LEE, Young Jin a Ilia V. BASKAKOV, 2010. Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *Journal of Neurochemistry* [online]. roč. 114, č. 2, s. 362–373 [vid. 4. březn 2014]. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06601.x

LEE, Young Jin a Ilia V. BASKAKOV, 2013. The cellular form of the prion protein is involved in controlling cell cycle dynamics, self-renewal, and the fate of human embryonic stem cell differentiation. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2., roč. 124, č. 3, s. 310–322. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07913.x

LEHMANN, S., 2002. Metal ions and prion diseases. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 4., roč. 6, č. 2, s. 187–192. ISSN 1367-5931. Dostupné z: doi:10.1016/S1367-5931(02)00295-8

LINDEN, Rafael, Vilma R. MARTINS, Marco A. M. PRADO, Martín CAMMAROTA, Iván IZQUIERDO a Ricardo R. BRENTANI, 2008. Physiology of the Prion Protein. *Physiological Reviews* [online]. 1.4., roč. 88, č. 2, s. 673–728 [vid. 26. únor 2014]. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00007.2007

LIU, Tong, Ruliang LI, Boon-Seng WONG, Dacai LIU, Tao PAN, Robert B. PETERSEN, Pierluigi GAMBETTI a Man-Sun SY, 2001. Normal Cellular Prion Protein Is Preferentially Expressed on Subpopulations of Murine Hemopoietic Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 15.3., roč. 166, č. 6, s. 3733–3742 [vid. 10. květen 2014]. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.166.6.3733

LUHRS, T., R. RIEK, P. GUNTERT a K. WUTHRICH, 2003. NMR structure of the human doppel protein. *Journal of Molecular Biology* [online]. 7.3., roč. 326, č. 5, s. 1549–1557. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(02)01471-7

MABBOTT, N. A. a G. G. MACPHERSON, 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 3., roč. 4, č. 3, s. 201–211. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1346

MAGLIO, L. E., M. F. PEREZ, V. R. MARTINS, R. R. BRENTANI a O. A. RAMIREZ, 2004. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Molecular Brain Research* [online]. 24.11., roč. 131, č. 1-2, s. 58–64. ISSN 0169-328X. Dostupné z: doi:10.1016/j.molbrainres.2004.08.004

MANSON, J., J. D. WEST, V. THOMSON, P. MCBRIDE, M. H. KAUFMAN a J. HOPE, 1992. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. 1.5., roč. 115, č. 1, s. 117–122. ISSN 0950-1991, 1477-9129.

MCKINTOSH, Edward, Sarah J. TABRIZI a John COLLINGE, 2003. Prion diseases. *Journal of NeuroVirology* [online]. 1.3., roč. 9, č. 2, s. 183–193 [vid. 11. duben 2014]. ISSN 1355-0284, 1538-2443. Dostupné z: doi:10.1080/13550280390194082

MIRANDA, Alberto, Eva PERICUESTA, Miguel Ángel RAMÍREZ a Alfonso GUTIERREZ-ADAN, 2011. Prion Protein Expression Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Differentiation. *PLoS ONE* [online]. 4.4., roč. 6, č. 4, s. e18422 [vid. 26. únor 2014]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0018422

MOORE, R. C., I. Y. LEE, G. L. SILVERMAN, P. M. HARRISON, R. STROME, C. HEINRICH, A. KARUNARATNE, S. H. PASTERNAK, M. A. CHISHTI, Y. LIANG, P. MASTRANGELO, K. WANG, A. F. A. SMIT, S. KATAMINE, G. A. CARLSON, F. E. COHEN, S. B. PRUSINER, D. W. MELTON, P. TREMBLAY, L. E. HOOD a D. WESTAWAY, 1999. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1.10., roč. 292, č. 4, s. 797–817. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1999.3108

MOUILLET-RICHARD, S., M. ERMONVAL, C. CHEBASSIER, J. L. LAPLANCHE, S. LEHMANN, J. M. LAUNAY a O. KELLERMANN, 2000. Signal Transduction Through Prion Protein. *Science* [online]. 15.9., roč. 289, č. 5486, s. 1925–1928 [vid. 6. duben 2014]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.289.5486.1925

MOUILLET-RICHARD, S., I. LAURENDEAU, M. VIDAUD, O. KELLERMANN a J. L. LAPLANCHE, 1999. Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes and Infection* [online]. 10., roč. 1, č. 12, s. 969–976. ISSN 1286-4579. Dostupné z: doi:10.1016/S1286-4579(99)80514-0

- PANIGAJ, Martin, Hana GLIER, Marcela WILDOVA a Karel HOLADA, 2011. Expression of Prion Protein in Mouse Erythroid Progenitors and Differentiating Murine Erythroleukemia Cells. *PLoS ONE* [online]. 2.9., roč. 6, č. 9, s. e24599 [vid. 11. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0024599
- PAULY, Peter C. a David A. HARRIS, 1998. Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 11.12., roč. 273, č. 50, s. 33107–33110 [vid. 10. duben 2014]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.50.33107
- PERALTA, Oscar A, William R HUCKLE a Willard H EYESTONE, 2011. Expression and knockdown of cellular prion protein (PrPC) in differentiating mouse embryonic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* [online]. 1., roč. 81, č. 1, s. 68–77. ISSN 1432-0436. Dostupné z: doi:10.1016/j.diff.2010.09.181
- PERALTA, Oscar A., William R. HUCKLE a Willard H. EYESTONE, 2012. Developmental expression of the cellular prion protein (PrPC) in bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* [online]. 7., roč. 79, č. 7, s. 488–498. ISSN 1040-452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.22057
- PREMZL, M., L. SANGIORGIO, B. STRUMBO, J. a. M. GRAVES, T. SIMONIC a J. E. GREADY, 2003. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene* [online]. 18.9., roč. 314, s. 89–102. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(03)00707-8
- PRODROMIDOU, Kanella, Florentia PAPASTEFANAKI, Theodoros SKLAVIADIS a Rebecca MATSAS, 2014. Functional cross-talk between the cellular prion protein and the neural cell adhesion molecule NCAM is critical for neuronal differentiation of neural stem/precursor cells. *STEM CELLS* [online]. 1.2., s. n/a–n/a [vid. 9. květen 2014]. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1663
- PRUSINER, Stanley B., 1982. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*. 9.4., roč. 216, č. 4542, New Series, s. 136–144. ISSN 0036-8075.
- PRUSINER, Stanley B., 1991. Molecular Biology of Prion Diseases. *Science*. 14.6., roč. 252, č. 5012, s. 1515. ISSN 00368075.
- RIEK, R. a T. LUHRS, 2003. Three-dimensional structures of the prion protein and its doppel. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 3., roč. 23, č. 1, s. 209–+. ISSN 0272-2712. Dostupné z: doi:10.1016/S0272-2712(02)00070-7

ROHAN, Z., E. PAROBKAVÁ, S. JOHANIDESOVÁ, F. KOUKOLÍK, R. MATĚJ a R. RUSINA, 2013. Lidské prionové nemoci v České republice – 10 let zkušeností s diagnostikou. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. roč. 76, č. 3, s. 300–306. ISSN 1210-7859; 1802-4041.

ROUCOU, Xavier, Qi GUO, Yan ZHANG, Cynthia G. GOODYER a Andréa C. LEBLANC, 2003. Cytosolic Prion Protein Is Not Toxic and Protects against Bax-mediated Cell Death in Human Primary Neurons. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 17.10., roč. 278, č. 42, s. 40877–40881 [vid. 6. duben 2014]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M306177200

SANTOS, Tiago G., Iara R. SILVA, Bruno COSTA-SILVA, Ana Paula LEPIQUE, Vilma R. MARTINS a Marilene H. LOPES, 2011. Enhanced Neural Progenitor/Stem Cells Self-Renewal via the Interaction of Stress-Inducible Protein 1 with the Prion Protein. *STEM CELLS* [online]. 1.7., roč. 29, č. 7, s. 1126–1136 [vid. 21. duben 2014]. ISSN 1549-4918. Dostupné z: doi:10.1002/stem.664

SANTUCCIONE, Antonella, Vladimir SYTNYK, Iryna LESHCHYNS'KA a Melitta SCHACHNER, 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology* [online]. 25.4., roč. 169, č. 2, s. 341–354 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200409127

SCHMITT-ULMS, G., G. LEGNAME, M. A. BALDWIN, H. L. BALL, N. BRADON, P. J. BOSQUE, K. L. CROSSIN, G. M. EDELMAN, S. J. DEARMOND, F. E. COHEN a S. B. PRUSINER, 2001. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *Journal of Molecular Biology* [online]. 14.12., roč. 314, č. 5, s. 1209–1225. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.2001.5183

STAHL, N. a S. B. PRUSINER, 1991. Prions and prion proteins. *The FASEB Journal*. 1.10., roč. 5, č. 13, s. 2799–2807. ISSN 0892-6638, 1530-6860.

STANLEY B. PRUSINER, 2001. Neurodegenerative Diseases and Prions. *New England Journal of Medicine* [online]. roč. 344, č. 20, s. 1516–1526 [vid. 7. květen 2014]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM200105173442006

STEELE, Andrew D., Jason G. EMSLEY, P. Hande ÖZDINLER, Susan LINDQUIST a Jeffrey D. MACKLIS, 2006. Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 28.2., roč. 103, č. 9, s. 3416–3421 [vid. 26. únor 2014]. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0511290103

STELLA, Roberto, Maria Lina MASSIMINO, Marco SANDRI, M. Catia SORGATO a Alessandro BERTOLI, 2010. Cellular Prion Protein Promotes Regeneration of Adult Muscle Tissue. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 15.10., roč. 30, č. 20, s. 4864–4876 [vid. 26. únor 2014]. ISSN 0270-7306, 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.01040-09

TOBLER, I., S. E. GAUS, T. DEBOER, P. ACHERMANN, M. FISCHER, T. RÜLICHE, M. MOSER, B. OESCH, P. A. MCBRIDE a J. C. MANSON, 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* [online]. 18.4., roč. 380, č. 6575, s. 639–642 [vid. 10. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1038/380639a0

VASSALLO, N., J. HERMS, C. BEHRENS, B. KREBS, K. SAEKI, T. ONODERA, O. WINDL a H. A. KRETZSCHMAR, 2005. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 24.6., roč. 332, č. 1, s. 75–82. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.099

WATTS, Joel C. a David WESTAWAY, 2007. The prion protein family: Diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* [online]. 6., roč. 1772, č. 6, s. 654–672. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2007.05.001

WESTERGARD, Laura, Heather M. CHRISTENSEN a David A. HARRIS, 2007. The cellular prion protein (PrP^C): Its physiological function and role in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* [online]. 6., roč. 1772, č. 6, s. 629–644. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2007.02.011

WILSON, Donald A. a Ralph A. NIXON, 2009. Sniffing out a function for prion proteins. *Nature Neuroscience* [online]. 1., roč. 12, č. 1, s. 7–8 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 10976256. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1038/nn0109-7

WITUSIK, Monika, Sylwia M GRESNER, Krystyna HULAS-BIGOSZEWSKA, Barbara KRYNSKA, S Ausim AZIZI, Pawel P LIBERSKI, Paul BROWN a Piotr RIESKE, 2007. Neuronal and astrocytic cells, obtained after differentiation of human neural GFAP-positive progenitors, present heterogeneous expression of PrP^C. *Brain research* [online]. 12., roč. 1186, s. 65–73. ISSN 0006-8993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2007.10.039

WUTHRICH, K. a R. RIEK, 2001. Three-dimensional structures of prion proteins. *Advances in Protein Chemistry, Vol 57*. roč. 57, s. 55–82. ISSN 0065-3233.

ZANATA, Silvio M., Marilene H. LOPES, Adriana F. MERCADANTE, Glaucia N. M. HAJJ, Luciana B. CHIARINI, Regina NOMIZO, Adriana R. O. FREITAS, Ana L. B. CABRAL, Kil S. LEE, Maria A. JULIA-

NO, Elizabeth DE OLIVEIRA, Saul G. JACHIERI, Alma BURLINGAME, Lan HUANG, Rafael LINDEN, Ricardo R. BRENTANI a Vilma R. MARTINS, 2002. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO Journal* [online]. 1.7., roč. 21, č. 13, s. 3307–3316 [vid. 6. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf325

ZHANG, Cheng Cheng, Andrew D. STEELE, Susan LINDQUIST a Harvey F. LODISH, 2006. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 14.2., roč. 103, č. 7, s. 2184–2189 [vid. 19. duben 2014]. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0510577103

ZHANG, Yan, Seong-Oh KIM, Sibylle OPSAHL-VITAL, Sunita P. HO, Jean-Baptiste SOURON, Charles KIM, Kurt GILES a Pamela K. DEN BESTEN, 2011. Multiple effects of the cellular prion protein on tooth development. *The International Journal of Developmental Biology* [online]. roč. 55, č. 10-11-12, s. 953–960 [vid. 11. duben 2014]. ISSN 0214-6282. Dostupné z: doi:10.1387/ijdb.113348yz