

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



Mgr. Jana Konířová

Funkce DISP3/PTCHD2 v neurálních buňkách

DISP3/PTCHD2 function in neural cells

Disertační práce

Školitel: RNDr. Petr Bartůněk, CSc.

Oddělení buněčné diferenciacce
Ústav molekulární genetiky
Akademie věd České republiky, v.v.i.

Praha, 2018

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, 16. dubna 2018

Jana Konířová

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat všem těm, kteří umožnili nebo usnadnili vznik této práce, a kteří mě po dobu mého studia podporovali.

Děkuji svému školiteli Petru Bartůňkovi za možnost pracovat na tomto zajímavém tématu a za odborné vedení mé práce. Zvláštní poděkování patří Martině Zíkové za spolupráci, pomoc, konzultaci výsledků a také za připomínkování rukopisu mé disertační práce. Děkuji všem ostatním, kteří se podíleli na výsledcích této práce, jmenovitě Janě Oltové, Michalu Kolářovi, Karolíně Ditrychové, Justyně Kopyciňské a Alicii Corlett. Rovněž upřímně děkuji za sdílení zkušeností, pomoc a velice přátelskou atmosféru všem kolegům z Oddělení buněčné diferenciacce, jmenovitě Olze Machoňové, Ondřeji Svobodovi, Davidu Sedlákovi, Antoniu Pombinhovi, Michaele Marešové, Martině Šnegoňové, Zuzaně Kotrbové a Tereze Mikulášové.

Velice děkuji celé své rodině a především rodičům za poskytnutou podporu a trpělivost po celou dobu mého studia. Dík patří také všem mým kamarádům, nejvíce pak mému příteli.

Za poskytnutí buněčných linií vděčím Dr. Dietmanu Spenglermu, prof. Austinu Smithovi a prof. Mathiasi Heikenwaelderu a za vzorky lidských nádorů Dr. André O. von Buerenovi a prof. Mathiasi Heikenwaelderu.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České Republiky (grant P301/12/1478) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (program NPU I grant LO1419).

1 Obsah

1	Obsah.....	4
2	Seznam zkratk	7
3	Abstrakt	11
4	Abstract	12
5	Úvod.....	13
6	Cíle	14
7	Literární přehled.....	15
7.1	Ontogeneze centrálního nervového systému obratlovců	15
7.1.1	Neurální indukce a vznik neurální trubice.....	15
7.1.2	Diverzifikace buněk neurální trubice	17
7.1.2.1	Dorzo-ventrální osa – SHH signální molekula	17
7.1.2.2	Antero-posteriorní osa – WNT signální dráha.....	19
7.1.3	Vývoj mozku	20
7.1.3.1	Neurální migrace a vliv thyroïdního hormonu.....	20
7.1.3.2	Vývoj mozečku	21
7.2	Neurální kmenové buňky.....	23
7.2.1	Neurální kmenové buňky v mozku dospělého jedince.....	23
7.2.2	Kultivace neurálních kmenových buněk <i>in vitro</i>	25
7.2.3	Diferenciace neurálních kmenových buněk	26
7.3	Proteiny obsahující sterol-sensing doménu	27
7.3.1	SSD proteiny zapojené do biosyntézy cholesterolu	28
7.3.2	NPC1 a NPC1L1 protein	29
7.3.3	SSD proteiny v HH signální dráze	30
7.3.4	PTCHD proteiny.....	31
7.4	Meduloblastomy	34
7.4.1	Molekulární podskupiny meduloblastomů	34

7.4.1.1	WNT subtyp.....	35
7.4.1.2	SHH subtyp.....	36
7.4.1.3	Subtyp 3	36
7.4.1.4	Subtyp 4	37
8	Materiál a metody.....	38
8.1	Buněčné kultury a kultivace buněk <i>in vitro</i>	38
8.2	Diferenciace neurálních buněk <i>in vitro</i>	39
8.3	Produkce virů, transdukce a transfekce buněk.....	40
8.4	Detekce mutací pomocí T7 endonukleázy I.....	42
8.5	Izolace RNA a qPCR	42
8.6	Čipová analýza.....	44
8.7	Imunodetekce proteinů (Western blot)	44
8.8	Regulace aktivity receptoru thyroideálních hormonů v NS-5 buňkách	45
8.9	Stanovení rychlosti růstu buněk.....	45
8.10	Analýza buněčného cyklu	46
8.11	Stanovení buněčné senescence	46
8.12	Indukce a detekce apoptózy	46
8.13	Imunofluorescenční barvení.....	47
8.14	Automatická a manuální obrazová analýza imunofluorescenčně barvených buněk ..	48
8.15	Imunohistochemické barvení a mikroskopie	51
8.16	Experimentální zvířata, příprava transgenních myší	52
8.17	Zpracování výsledků a statistická analýza	52
9	Výsledky.....	53
9.1	DISP3 v myších neurálních buňkách <i>in vitro</i>	53
9.1.1	Vliv thyroideálního hormonu na expresi genu <i>Disp3</i>	53
9.1.2	Změna exprese genu <i>Disp3</i> v důsledku diferenciace neurálních kmenových buněk	54
9.1.3	Modulace exprese genu <i>Disp3</i> v neurálních buňkách	63

9.1.4	Proliferace neurálních buněk s modulovanou expresí genu <i>Disp3</i>	69
9.1.5	Buněčný cyklus NS-5 buněk s modulovanou expresí genu <i>Disp3</i>	74
9.1.6	Vliv změn v expresi genu <i>Disp3</i> na senescenci a apoptózu	75
9.1.7	Spontánní diferenciaci neurálních buněk v důsledku modulace exprese genu <i>Disp3</i>	78
9.1.8	Diferenciaci neurálních kmenových buněk NS-5 s modulovanou expresí genu <i>Disp3</i>	84
9.1.9	Vliv nadexprese genu <i>Disp3</i> na diferenciaci neurálních progenitorových buněk C17.2.....	92
9.1.10	Změny v genové expresi NS-5 buněk způsobené modulací genu <i>Disp3</i>	96
9.1.11	Změny v genové expresi C17.2 buněk způsobené nadexpresí genu <i>Disp3</i>	100
9.2	DISP3 v lidských nádorech mozku a nádorových buňkách.....	102
9.2.1	Expresí genu <i>DISP3</i> v lidských nádorech mozku.....	102
9.2.2	Vliv exprese genu <i>DISP3</i> na lidské nádorové buňky	107
9.3	DISP3 v mozku PLP/DISP3 transgenních myši	112
9.3.1	Expresí genu <i>Disp3</i> v tkáních dospělé myši	112
9.3.2	Změna exprese genu <i>Disp3</i> v mozku dospělé transgenní myši.	113
9.3.3	Vliv nadexprese genu <i>Disp3</i> na mozeček novorozené transgenní myši.....	119
10	Diskuze.....	126
10.1	Role proteinu DISP3 v neurálních buňkách <i>in vitro</i>	126
10.2	Vliv proteinu DISP3 na mozek člověka a myši	137
11	Závěry.....	140
12	Podíl autora na výsledcích obsažených v disertační práci	142
13	Použitá literatura.....	143
14	Přílohy	175

2 Seznam zkratek

aa	aminokyselina	amino acid
ACTB	beta aktin	actin beta
APC		adenomatosis polyposis coli, WNT signaling pathway regulator
ATCC		American Type Culture Collection
AVČR	Akademie věd České republiky	
BMP	kostní morfogenetický protein	bone morfogenetic protein
bp	páry bází	base pairs
Brsk1		brain serine/threonine kinase 1
BSA	hovězí sérový albumin	bovine serum albumin
Cas9		type II CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9
CDK6	cyklin-dependentní kináza 6	cyclin dependent kinase 6
CNS	centrální nervový systém	
CRISPR		clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTNNB1		catenin beta 1
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol	4',6-diamidino-2-phenylindole
Dgka		diacylglycerol kinase alpha
DHCR7	7-Dehydrocholesterol reduktáza	7-dehydrocholesterol reductase
DHH		desert hedgehog
DISP		dispatched RND transporter family member
DMEM		Dulbecco's Modified Eagle Medium
Edg8		endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 8
EGF	epidermální růstový faktor	epidermal growth factor
EGL	externí granulární zóna	external granule layer
Epb4.113		erythrocyte protein band 4.1-like 3
ESCs	embryonální kmenové buňky	embryonic stem cells
FBS	fetální hovězí sérum	fetal bovine serum

FGF	fibroblastový růstový faktor	fibroblast growth factor
GAPDH		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCP	prekurzory granulárních buněk	granule cell precursors
GC	granulární buňky	granule cells
GFAP		glial fibrillary acidic protein
GLI		GLI (glioma-associated oncogene) family zinc finger
HH		hedgehog
HMGR	HMG-CoA reductáza	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
HOX		homeobox
HS	koňské sérum	horse serum
Igfbp7		insulin-like growth factor binding protein 7
IHH		Indian hedgehog
Lip1		lipoyltransferase 1
MAPK	protein kináza aktivovaná mitogenem	mitogen-activated protein kinase
MYC		MYC (myelocytomatosis oncogene) proto-oncogene, bHLH transcription factor
MYCN		MYCN (v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived) proto-oncogene, bHLH transcription factor
Nes		nestin
NGS	kozí sérum	normal goat serum
NPC1		NPC (Niemann-Pick disease, type C) intracellular cholesterol transporter 1
NPC1L1		NPC1 like intracellular cholesterol transporter 1

NSC	neurální kmenové buňky	neural stem cells
Obr.	obrázek	
OTX2		orthodenticle homeobox 2
PBS	fosfátový pufr	phosphate-buffered saline
PCNA		
PCR	polymerázová řetězová reakce	polymerase chain reaction
PDGF	růstový faktor z destiček	platelet-derived growth factor
PLP1		proteolipid protein 1
Prelp		proline arginine-rich and leucine-rich repeat protein
PTCH1		patched 1
PTCHD	obsahující Patched doménu	Patched domain containing
qPCR	kvantitativní PCR	quantitative polymerase chain reaction
RA	kyselina retinová	retinoic acid
RL		rhombic lip
SCAP		SREBP cleavage-activating protein
SDS-PAGE	elektroforéza proteinů na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA		single guide RNA
SGZ	subgranulární vrstva	subgranular zone
SHH		sonic hedgehog
SLOS	Smithův-Lemliův-Opitzův syndrom	Smith-Lemli-Opitz syndrome
SMAD1		SMAD family member 1
SMO		smoothened, frizzled class receptor
SOX		sex determining region Y-box
SREBP		sterol regulatory element binding protein
SSD	sterol-sensing doména	sterol-sensing domain
SUFU		SUFU (suppressor of fused homolog) negative regulator of hedgehog signaling
SVZ	subventrikulární zóna	subventricular zone

T3	trijodthyronin	triiodothyronine
T4	thyroxin	thyroxine
Tab.	tabulka	
tg	transgenní myš	transgenic mouse
TH	thyroidní hormon	thyroid hormone
tj.	to je	
THR	receptor thyroidních hormonů	thyroid hormone receptor
TRP53 (p53)		transformation related protein 53, tumor protein p53
Tubb3	beta tubulin 3	tubulin, beta 3 class III
Ubb		ubiquitin B
VZ	ventrikulární zóna	ventricular zone
WNT		wingless-type murine mammary tumor virus integration site family
wt	myš divokého typu	wild type mouse

3 Abstrakt

Protein DISP3, známý také jako PTCHD2, patří do rodiny PTCHD proteinů, které ve své struktuře obsahují sterol-sensing doménu. Expresi genu *Disp3* je vysoká v neurálních tkáních a je regulována thyroïdním hormonem. Gen *DISP3* je spojován se vznikem a progresí určitých typů nádorů a také s rozvojem některých neurálních patologií. Vysokou expresi genu *Disp3* je možné nalézt v neurálních kmenových buňkách.

Neurální kmenové buňky jsou definovány svojí schopností sebeobnovy a potenciálem diferencovat do základních typů neurálních buněk - neuronů, astrocytů a oligodendrocytů. Jak pro vznik a vývoj centrálního nervového systému, tak i pro jeho pozdější správné fungování je klíčová správná regulace rovnováhy mezi proliferací a diferenciací neurálních kmenových buněk a narušení této rovnováhy může vést ke vzniku různých patologií.

V této práci jsme se zaměřili především na popsání funkce proteinu DISP3 v neurálních buňkách a tkáních. Prokázali jsme, že v neurálních kmenových buňkách dochází v důsledku diferenciaci k významnému snížení exprese genu *Disp3*. Dále jsme zjistili, že u neurálních kmenových a progenitorových buněk podporuje zvýšená exprese genu *Disp3* jejich proliferaci. Naopak poškození exprese genu *Disp3* vedlo k potlačení „kmenovosti“ buněk a nárůstu spontánní neuronální diferenciaci. Diferenciaci buněk do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů byla ovlivněna změnou v expresi genu *Disp3*. V populaci diferencovaných buněk s mutací v genu *Disp3* se nacházelo více silně diferencovaných astrocytů, zvyšoval se počet diferencovaných neuronů a buňky také lépe diferencovaly do oligodendrocytů. Zvýšená exprese genu *Disp3* diferenciaci buněk naopak potlačovala. Tyto naše výsledky naznačují, že DISP3 v neurálních buňkách ovlivňuje rovnováhu mezi proliferací a diferenciací.

Vysokou hladinu exprese genu *DISP3* jsme dále našli také v jednom typu primárních nádorů mozku, v meduloblastomech subtypu 4. Následné *in vitro* analýzy prokázaly, že i proliferace nádorových buněk může být ovlivněna změnou v expresi genu *DISP3*. Pro další experimenty jsme připravili linie transgenních myší se zvýšenou expresí genu *Disp3*. U těchto myší docházelo k nárůstu proliferace buněk v mozečku, ze kterého se předpokládá vznik meduloblastomů. Všechny naše výsledky tak podporují hypotézu, že DISP3 v důsledku svého vlivu na proliferaci a diferenciaci neurálních buněk může být zapojen i do onkogeneze mozkových nádorů.

Klíčová slova: DISP3/PTCHD2, neurální buňky, proliferace, diferenciaci, meduloblastomy

4 Abstract

DISP3 protein, also known as PTCHD2, belongs to the PTCHD family of proteins, which contain a sterol-sensing domain in their structure. The expression of the *Disp3* gene is high in neural tissues and is regulated by thyroid hormone. The *DISP3* gene is associated with development and progression of certain types of tumors, as well as with development of some neural pathologies. Neural stem cells also display high expression of the *Disp3* gene.

Neural stem cells are defined by their capability to self-renewal and capacity to differentiate into the basic types of neural cells - neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Precise regulation of the balance between proliferation and differentiation of neural stem cells is crucial for development of the central nervous system and its subsequent proper functioning, and disruption of this balance may lead to development of various pathologies.

In this work we mainly focused on describing the function of the DISP3 protein in neural cells and tissues. We have shown that during differentiation of neural stem cells, the expression of the *Disp3* gene is significantly decreased. Furthermore, we have found that in neural stem and progenitor cells, the increased expression of the *Disp3* gene promotes their proliferation. Moreover, when *Disp3* expression was disrupted, the “stemness” of the cells was suppressed, leading to increased spontaneous neuronal differentiation. Differentiation of cells into astrocytes, neurons, and oligodendrocytes was affected by changes in the expression of the *Disp3* gene. In the population of differentiated cells with the mutated *Disp3* gene, there were more highly differentiated astrocytes, the number of differentiated neurons increased, and the cells were also able to better differentiate into oligodendrocytes. In contrast, elevated *Disp3* expression resulted in impaired cell differentiation. These results indicate that in neural cells, DISP3 affects the balance between proliferation and differentiation.

We also found high levels of the *DISP3* gene expression in some types of primary brain tumors, particularly in subtype 4 medulloblastomas. Subsequent *in vitro* analysis has shown that tumor cell proliferation can also be affected by modulated *DISP3* expression. For further experiments, we have prepared lines of transgenic mice with increased expression of the *Disp3* gene. In these mice, elevated cell proliferation was found in the cerebellum, from which medulloblastomas are expected to originate. Taken together, our results support the hypothesis that DISP3, due to its influence on the proliferation and differentiation of neural cells, may be involved in the oncogenesis of brain tumors.

Key words: DISP3/PTCHD2, neural cells, proliferation, differentiation, medulloblastomas

5 Úvod

Pro vývoj a správné fungování centrálního nervového systému (CNS) savců je důležitá přesná regulace všech procesů, které ovlivňují proliferaci a diferenciaci neurálních buněk. Jakékoliv narušení této rovnováhy může mít za následek vznik a rozvoj mnoha typů patologií, mezi které patří jak některé neurologické poruchy, tak i nádory neurálního původu. Buňky neurálních nádorů mají mnoho vlastností, které jsou ve zdravé tkáni typické pouze pro neurální kmenové nebo prekursorové buňky. Jedná se především o schopnost množit se a produkovat tím další buňky totožných vlastností a dále o schopnost diferencovat neboli měnit se v buňky jiného typu. V neposlední řadě nádorové buňky exprimují mnoho genů specifických pro nediferencované neurální kmenové a prekursorové buňky (shrnutí v Lathia et al. 2011). Neurální kmenové buňky jsou charakterizovány svou schopností sebeobnovy a potenciálem diferencovat do tří základních neurálních buněčných typů, astrocytů, neuronů a oligodendrocytů (shrnutí v Gage 2000). Během ontogeneze dávají neurální kmenové buňky vzniknout celému CNS, důležitou funkci mají ale i v mozku dospělého jedince. Zde se tyto buňky vyskytují ve specifických oblastech a kromě klíčové funkce v procesech učení a paměti se také podílí na reparaci a sebeobnově neurálních tkání. Proliferaci a diferenciaci neurálních kmenových buněk ovlivňuje velké množství faktorů a v buňce se na regulaci těchto procesů podílí mnoho různých signálních drah a proteinů (shrnutí v Bond et al. 2015).

Protein *DISP3* známý také jako *PTCHD2* patří do rodiny *PTCHD* proteinů (Zikova et al. 2009). O funkci jednotlivých členů této rodiny proteinů není zatím příliš mnoho známo, ale u několika z nich bylo popsáno jejich spojení s různými typy neurologických poruch (Marshall et al. 2008; Noor et al. 2010a; Filges et al. 2011; Chaudhry et al. 2015; Torrico et al. 2015; Wells et al. 2016; Ghahramani Seno et al. 2011). Gen *DISP3* je exprimován v organismu obratlovců především v tkáních neurálního původu, jako jsou mozek a sítnice (Zikova et al. 2009) a již dříve bylo v literatuře popsáno jeho spojení se vznikem neurálních nádorů (Johansson et al. 2004, 2005). Na základě těchto poznatků jsme se v této práci pokusili popsat roli proteinu *DISP3* v neurálních kmenových, progenitorových a nádorových buňkách *in vitro* a dále charakterizovat jeho vliv na onkogenezi nádorů mozku a na vývoj CNS myši.

6 Cíle

Cílem této práce bylo přispět k lepšímu poznání funkce proteinu DISP3 v neurálních buňkách a tkáních. Především jsme se zaměřili na roli proteinu DISP3 v regulaci rovnováhy mezi proliferací a diferenciací neurálních buněk, dále na jeho přítomnost v nádorech neurálního původu a na jeho vliv na vývoj myšího mozku.

Specifické cíle této práce byly:

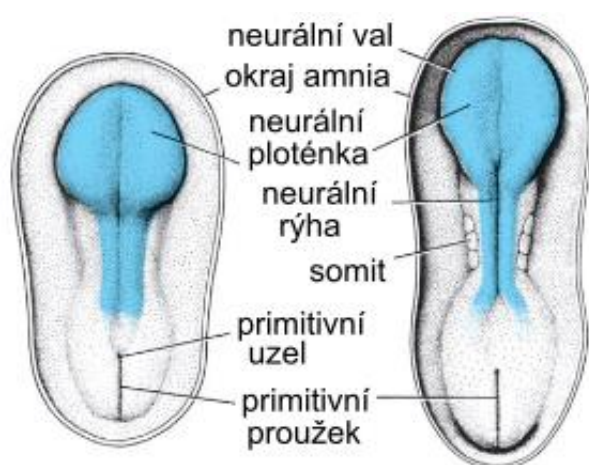
- 1) Zjistit zda a jakým způsobem ovlivňuje diferenciace neurálních kmenových buněk expresi genu *Disp3* v těchto buňkách.
- 2) Charakterizovat vliv změn v expresi genu *Disp3* na myší neurální kmenové a progenitorové buňky. Především popsat změny v rychlosti růstu a v diferenciaci těchto buněk, ale sledovat i změny v buněčném cyklu, v přežívání těchto buněk a v genové expresi. Toto vše provést za pomoci nově připravených buněčných linií se zvýšenou expresí genu *Disp3* pomocí retrovirové infekce, dále buněčných linií se sníženou expresí genu *Disp3* prostřednictvím RNAi a buněčných linií s genem *Disp3*, do kterého byly vneseny mutace metodou CRISPR/Cas9 cílené mutageneze.
- 3) Popsat expresi genu *DISP3* v lidských nádorech mozku a ověřit dopad změn v expresi genu *DISP3* na lidské nádorové buněčné linie.
- 4) Sledovat působení genu *Disp3* v mozku nově připravených transgenních myší s nadprodukcí proteinu DISP3 v neurálních buňkách zprostředkovanou PLP promotorem.

7 Literární přehled

7.1 Ontogeneze centrálního nervového systému obratlovců

7.1.1 Neurální indukce a vznik neurální trubice

Všechny typy neurálních buněk v savčím organismu jsou neuroektodermálního původu. Neuroektoderm se u lidského embrya vytváří na začátku třetího týdne vývoje. Při procesu zvaném neurální indukce, perichordový mesoderm a chorda indukují ztlustění nad nimi ležícího ektodermu a vznik neurální ploténky. Neurální ploténku ležící na dorzální straně embrya tvoří jedna vrstva vysokých neuroepitelových buněk. (shrnutí v Sadler 2012, Obr. 1).



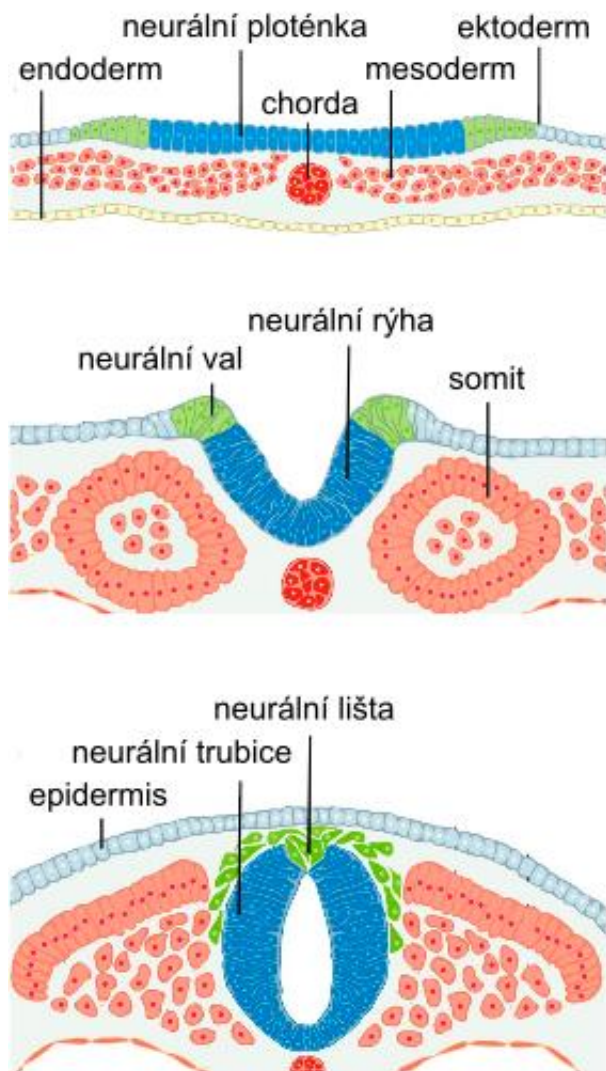
Obrázek 1. Neurální ploténka.

Schématický nákres dorzální strany lidského embrya během 18. a 20. dne neurulace. Modře znázorněn neurální ektoderm (Sadler 2012, upraveno).

Pro neurální indukci má zásadní význam inhibice BMP signální dráhy. Z více než třiceti známých BMP proteinů je do blokace neurální indukce nejvíce zapojen protein BMP4 (Wilson a Hemmati-Brivanlou 1995). BMP antagonisté chordin, noggin a follistatin jsou hlavní extracelulárně sekretované proteiny, které váží ligandy BMP signální dráhy a brání tak aktivaci receptoru (Zimmerman et al. 1996; Piccolo et al. 1996; Fainsod et al. 1997). Expres těchto faktorů na ventrální straně embrya vede k neurální indukci a ke vzniku druhé tělní osy (Hawley et al. 1995). Naopak nepřítomnost těchto tří neurálních induktorů vede u *Xenopus tropicalis* k zachování BMP signalizace na dorzální straně embrya a v důsledku k tomu, že neurální ploténka nevznikne (Khokha et al. 2005). U savců je situace složitější, protože tyto proteiny se podílí především na vývoji anteriorních částí neurální trubice. U myších embryí s mutovanými geny pro chordin a noggin proto dochází především k poškození vývoje předního a středního mozku (Bachiller et al. 2000; shrnutí v Rogers et al. 2009).

Pro studium neurální indukce u obratlovců se používá jako modelový organismus především druh *Xenopus*. Získané výsledky ale není možné bez výhrad aplikovat i na vyšší obratlovce – amniota. Například u kuřecích embryí totiž blokace BMP signalizace nevede k expresi genu typického pro neuroektoderm *SOX3* (Linker a Stern 2004). Tento a další výsledky naznačují, že pro vznik neuroektodermu u amniot jsou důležité i další signální dráhy. FGF signální dráha je do procesu neurální indukce zapojena velice významně několika způsoby. V buňkách ektodermu indukuje FGF signalizace expresi časných neurálních markerů například genu *SOX3* (Streit et al. 2000). Dále inhibuje expresi ligandů BMP signální dráhy *BMP4* a *BMP7* (Wilson et al. 2000). FGF signalizace také podporuje expresi BMP antagonistů chordinu a nogginu (Branney et al. 2009) a prostřednictvím MAPK aktivity inhibuje důležitý člen BMP signální dráhy SMAD1 (Kuroda et al. 2005). BMP a FGF signální dráhy také působí nezávisle na sobě, protože exprese anteriorních neurálních markerů je více citlivá na blokaci exprese BMP inhibitorů, zatímco exprese posteriorních markerů je závislá na FGF signalizaci (Wills et al. 2010 shrnuto v Pownall a Isaacs 2010).

Po indukci neuroektodermu se neurální ploténka postupně prodlužuje podél dlouhé osy a její vkleslá střední část se mění v neurální rýhu (brázdu). Laterální okraje neurální ploténky se zvedají a tvoří neurální valy. Zvýšené okraje se poté k sobě přibližují a spojují se ve střední čáře. Ke spojování dochází nejprve ve střední části a následně postupuje kraniálně a kaudálně. Výsledkem je vznik neurální trubice. Na konci neurulace je centrální nervový systém (CNS) tvořen uzavřenou trubicí se třemi rozšířeními, primárními mozkovými váčky, na hlavovém konci (shrnutí v Sadler 2012, Obr. 2).



Obrázek 2. Vznik neurální trubice.

Schematické znázornění morfogenetických pohybů při vzniku neurální trubice. Diagram představuje transverzální řez embryem během neurulace. Neurální ploténka (modře) klesá a vytváří neurální rýhu obklopenou neurálními valy (zeleně). Následně neurální valy splývají za vzniku neurální trubice. Ta se poté odpojuje od povrchového ektodermu, který se nad ní uzavírá (Simões-Costa a Bronner 2013, upraveno).

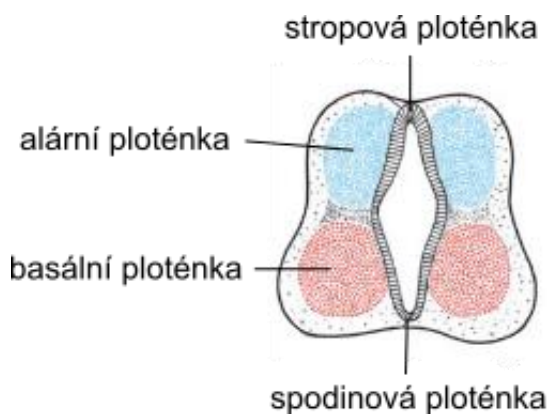
7.1.2 Diverzifikace buněk neurální trubice

7.1.2.1 Dorzo-ventrální osa – SHH signální molekula

Sonic hedgehog (SHH) představuje nejdůležitější ligand hedgehog (HH) signální dráhy. Aktivace této dráhy prostřednictvím SHH proteinu hraje u savců důležitou roli v mnoha fázích vývoje CNS. Asi nejvíce popsána je funkce SHH proteinu jako morfogenu zodpovědného za diverzifikaci buněk neurální trubice podél dorzo-ventrální osy. Sekrece SHH proteinu probíhá ze dvou hlavních ventrálních signálních center. První z nich tvoří notochord (chorda dorsalis) a druhé spodinová ploténka (floor plate) neurální trubice tvořená specializovanými neuroepitelovými buňkami (Martí et al. 1995).

Neurální trubice se brzy po uzavření skládá z několika dobře rozlišitelných oblastí. Spodní a vrchní část trubice uzavírá velice úzká vrstva neuroepitelových buněk s nízkou proliferační

aktivitou. Tyto oblasti se nazývají spodinová a stropová ploténka. Mezi nimi se nachází dvě vrstvy rychle se dělících neuroblastů, které tvoří alární (dorzální) a basální (ventrální) ploténku. Neuroblasty v alární a basální ploténce se dále diferencují, vytváří odlišné typy neuronů a exprimují různé neurální markery (Obr. 3).



Obrázek 3. Členění neurální trubice.

Čtyři hlavní domény (ploténky) buněk diverzifikovaných podél dorzo-ventrální osy. Diagram znázorňuje transverzální řez neurální trubicí (Sadler 2012, upraveno).

Obecně jsou za diverzifikaci buněk neurální trubice podél dorzo-ventrální osy zodpovědné čtyři typy signálních molekul. První skupinu tvoří FGF proteiny (především FGF8) produkované kaudálním mezodermem, jejichž inhibice je nutná pro správný průběh neurální diferenciace. Dále se na indukci neurální diferenciace podílí kyselina retinová (RA) uvolňovaná somity. SHH sekretovaný notochordem a spodinovou ploténkou je zodpovědný za diferenciaci neurálních buněk ventrálního typu, BMP proteiny produkované stropovou ploténkou a ektodermem překrývajícím neurální trubici se podílí na diferenciaci neurálních buněk dorzálního typu (shrnutí v Wilson a Maden 2005).

SHH uvolňovaný z notochordu inhibuje proliferaci buněk ve ventrální části neurální trubice, čímž podporuje vznik spodinové ploténky (Placzek et al. 1990). Buňky spodinové ploténky poté začínají exprimovat a uvolňovat SHH, čímž vzniká v neurální trubici koncentrační gradient SHH molekul. SHH podporuje proliferaci neurálních progenitorových buněk v basální ploténce a jejich diferenciaci ve ventrální typy neurálních buněk, motorických neuronů a interneuronů (Ericson et al. 1996). Ztráta genu *Shh* u myši způsobuje mimo jiné absenci neurálních buněk ventrálního typu v neurální trubici (Chiang et al. 1996). Vliv chybějícího sekretovaného SHH proteinu na neurální trubici ale může být u myši výrazně potlačen mutací dalších členů HH signální dráhy. Konkrétně delecí transkripčního represoru *Gli3* (Chiang a Litington 2000), který je aktivní v nepřítomnosti SHH ligandu, nebo mutací genu *Ptch1* (Iulianella et al. 2017), což je receptor a negativní regulátor HH signální dráhy. Protein SHH je

zodpovědný za ventralizaci neurálních buněk, není ale schopen indukovat vznik neurálních buněk z ektodermu. Ovlivňuje až další diverzifikaci a diferenciaci dříve indukovaných neuroektodermových buněk (Ekker et al. 1995).

Diferenciace buněk dorzálních části neurální trubice je determinována aktivitou BMP signálních molekul. BMP-4 a BMP-7 proteiny produkované ektodermem pokrývajícím neurální trubici indukují vznik sekundárního signálního centra – stropové ploténky. BMP-4 a další příbuzné geny jsou poté uvolňovány ze stropové ploténky a v alární ploténce vzniká jejich koncentrační gradient (Liem et al. 1995). V důsledku toho dochází v neurální trubici v dorzo-ventrální ose ke vzniku dvou proti sobě působících koncentračních gradientů signálních molekul BMP a SHH, které ovlivňují genovou expresi a další diferenciaci neurálních buněk.

7.1.2.2 Antero-posteriorní osa – WNT signální dráha

Během vývoje CNS savců regulují signální proteiny kódované *WNT* geny velké množství procesů. Je známo celkem devatenáct *WNT* proteinů u savců aktivujících různé signální dráhy. *WNT* signalizace se mimo jiné podílí na specifikaci neurální trubice podél antero-posteriorní osy, na uzavírání neurální trubice, dále *WNT* dráha reguluje morfogenezi neurální trubice, moduluje proliferaci a diferenciaci buněk a také se podílí na vývoji mnoha oblastí mozku (shrnuto v Mulligan a Cheyette 2012).

Gradient *WNT* signálních molekul je klíčový pro vznik antero-posteriorní osy v neurální trubici (Kiecker a Niehrs 2001). *WNT* proteiny způsobují posteriorizaci neurální trubice a jsou produkovány paraxiálním dorsolaterálním mesodermem (Elkouby et al. 2010). V anteriorní části neurální trubice je naopak *WNT* signalizace inhibována sekretovaným *WNT* antagonistou Dickkopf1 (Niehrs et al. 1998).

Pro členění neurální trubice podél antero-posteriorní osy je důležitá exprese homeotických genů. Expresi *HOX* genů ovlivňuje koncentrace dvou signálních molekul, FGF8 a RA. FGF8 a RA se tak nepodílí jen na diferenciaci a ventralizaci neurálních buněk, ale i na určení jejich antero-posteriorní poziční informace. Kaudální mesoderm tvoří a uvolňuje vysokou koncentraci FGF8, což vede v neurální trubici k expresi kaudálních genů *HOXC9* a *HOXB9*. Rostrální mesoderm naopak produkcí RA podporuje expresi rostrálních *HOX* genů *HOXC5* a *HOXB4* (Liu et al. 2001; Bel-Vialar et al. 2002).

Expresi *WNT* genů se objevuje v různých fázích i v anteriorních oblastech vyvíjejícího se CNS. V myším embryu starém 8,5 dne je možné detekovat aktivní *WNT*/β-cateninovou dráhu ve vznikajícím telencephalu, diencephalu, mesencephalu, metencephalu, myelencephalu a také

v hřbetní míše (Maretto et al. 2003). Pokud není u myši exprimován gen *Wnt1*, pak u nich nedochází ke vzniku středního mozku (McMahon a Bradley 1990), pokud není exprimován gen *Wnt3* tak nevzniká hippocampus (Lee et al. 2000). Všechna tato zjištění tak potvrzují důležitou roli WNT signalizace nejen v raných fázích vývoje CNS, ale i později při vzniku různých částí mozku.

7.1.3 Vývoj mozku

Během embryonálního vývoje savců se na hlavovém konci neurální trubice tvoří tři rozšíření, primární mozkové váčky, které se stávají primárními anatomickými částmi mozku: přední mozek (*prosencephalon*), střední mozek (*mesencephalon*) a zadní mozek (*rhombencephalon*). Při dalším vývoji se *prosencephalon* dělí na *telencephalon* (budoucí mozkové hemisféry) a *diencephalon* (základ thalamu a hypothalamu). *Rhombencephalon* se také dělí na dvě části a to na *metencephalon* (pozdější Varolův most a mozeček) a *myelencephalon* (budoucí prodloužená mícha, shrnuto v Sadler 2012). Během vývoje mozku dochází ve stěnách neurální trubice k masivní proliferaci neurálních kmenových buněk. Tyto buňky dále pak diferencují do neuronů a gliových buněk. Nově vzniklé neurony migrují do různých částí vyvíjejícího se mozku a dávají tak vzniknout různým mozkovým strukturám.

7.1.3.1 Neurální migrace a vliv thyroidního hormonu

Thyroidní hormon (TH) reguluje *in vivo* vývoj CNS od rané embryogeneze až po neurogenezi v dospělém jedinci. Tento hormon ovlivňuje v mozku mnoho klíčových procesů: proliferaci, diferenciaci, migraci, synaptogenezi a myelinizaci. TH je v organismu vytvářen a uvolňován štítnou žlázou převážně ve formě méně aktivního pro-hormonu thyroxinu (T4). V cílových tkáních dochází deiodací k přeměně T4 na trijodtyronin (T3). Pro správný *in utero* vývoj CNS je důležitý jak TH od matky, tak TH vytvářený v pozdějších fázích vývoje štítnou žlázou plodu (shrnuto v Chan a Kilby 2000).

TH ovlivňuje genovou expresi prostřednictvím vazby na receptory thyroidních hormonů (THR). THR patří do rodiny jaderných receptorů a u savců je kódován dvěma geny (*THRA* a *THRB*). V buňkách mohou vznikat dva izotypy THR, $THR\alpha$ a $THR\beta$, které se dále vyskytují v několika izoformách. Na vývoj mozku má THR vliv jak s navázaným T3, kdy funguje jako aktivátor genové exprese, tak i bez ligandu jako represor. Již velmi dlouho je známo, že

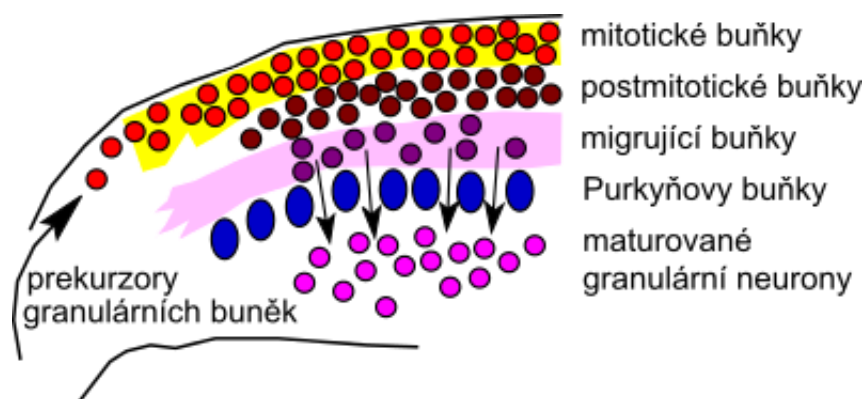
nedostatek TH během vývoje CNS vede ke vzniku mnoha neurologických defektů a nevratným změnám ve struktuře a fungování mozku. (shrnutí v Bernal 2000; Préau et al. 2015).

Ve vyvíjejícím se mozku TH mimo jiné významně ovlivňuje migraci buněk při vzniku kůry mozkové, hipokampu a mozečku. Neurální buňky proliferují ve ventrikulární zóně a nově vzniklé neurony migrují do dalších vrstev podél vláken specializovaných buněk nazývaných radiální glie. Buňky radiálních glií vznikají na začátku neurogeneze z neuroepitelových buněk. Dlouhé výběžky těchto bipolárních buněk slouží poté pro migraci neuronů. Radiální glie ale nemají pouze strukturální a podpůrnou funkci. Jedná se o neurální kmenové buňky, které dělením a následnou diferenciací vytváří nové neurony a gliové buňky (shrnutí v Malatesta et al. 2008).

TH ovlivňuje neurální migraci dvěma způsoby. Zprv bylo zjištěno, že TH je potřebný pro maturaci radiálních glií. Nedostatek TH u potkanů během vývoje způsobuje pokles počtu maturovaných (GFAP pozitivních) radiálních glií, přestože množství nematurovaných radiálních glií zůstává stejné (Martínez-Galán et al. 1997). Zadruhé TH ovlivňuje expresi genu *Reln*, který kóduje extracelulární protein reelin nezbytný pro správnou migraci neuronů (Alvarez-Dolado et al. 1999). Kromě důležité role TH v neurální migraci se TH podílí i na mnoha dalších procesech během vývoje mozku. Ovlivňuje například genovou expresi v Purkyňových a Bergmannových buňkách při vývoji mozečku (Fauquier et al. 2014).

7.1.3.2 Vývoj mozečku

Mozeček (*cerebellum*) vzniká na rozhraní středního a zadního mozku. Vznik mozečku je řízen oblastí nazývanou isthmus organizer pomocí sekretovaných proteinů FGF8 a WNT1 (Martinez et al. 1999). Samotná histogeneze mozečku začíná u myši devátý den embryonálního vývoje (u lidí 8 týden vývoje) tím, že se dorsolaterální části alárních plotének ohýbají a vytvářejí valy. Valy se dále stáčí, a tím vzniká mozečková ploténka skládající se ze dvou hemisfér a malé střední části nazývané vermis. Pro další vývoj jsou určující dvě germinální oblasti: rhombic lip (RL) a ventrikulární zóna (VZ). Neuroblasty z VZ migrují do bílé hmoty mozečku a dále diferencují. Prekursorové buňky z RL vytváří na povrchu mozečku vrstvu nazývanou externí granulární zóna (external granule layer, EGL). V EGL dochází k další proliferaci buněk následované jejich migrací a diferenciací (Obr. 4). Ke vzniku finálního uspořádání mozečku dochází u myši i u lidí až po narození (shrnutí v Sadler 2012; Sotelo 2004).



Obrázek 4. Produkce granulárních neuronů v mozečku.

Nákres znázorňuje prekurzory granulárních buněk (GCP, červeně) proliferující v oblasti EGL. Neuroblasty poté migrují skrz vrstvu Purkyňových buněk (modře) a diferencují do maturovaných granulárních neuronů (růžově, Martí a Bovolenta 2002, upraveno).

Granulární buňky (Granule cells, GC) představují v mozku i mozečku nejčastěji se vyskytující typ neuronů. Přesná regulace produkce GC je proto klíčová pro normální vývoj mozečku, jeho velikost a vznik mozečkových struktur. Abnormálně zvýšená proliferace prekurzorů GC způsobuje vznik patologií, například agresivních dětských nádorů meduloblastomů (Schuller et al. 2008; Gibson et al. 2010). Prekurzory GC (Granule cell precursors, GCP) vznikají v RL a u myši od třináctého dne embryonálního vývoje migrují do EGL kde masivně proliferují. Proliferace GCP končí u myši až přibližně na konci druhého týdne postnatálního vývoje (Fujita et al. 1966). Dělení GCP v EGL řídí mitogenní faktor SHH sekretovaný z Purkyňových buněk. SHH brání diferenciaci GCP a prodlužuje dobu jejich proliferace. Kromě toho, že SHH ovlivňuje celkový počet GC tím, že podporuje expanzi jejich prekurzorů, tak SHH také podporuje diferenciaci Bergmanových buněk, které jsou nezbytné pro migraci diferencujících se GC z EGL do dalších vrstev mozečku (Dahmane a Ruiz i Altaba 1999).

Na regulaci vývoje mozečku se podílí i další, v této kapitole zmíněné faktory, jako jsou TH a WNT. TH ovlivňuje diferenciaci Purkyňových a Bergmanových buněk (Fauquier et al. 2014) a podporuje produkci SHH (Desouza et al. 2011). WNT signalizace podporuje proliferaci a potlačuje diferenciaci kmenových buněk ve VZ mozečku (Pei et al. 2012a).

Vývoj CNS u savců je složitý a přísně regulovaný proces, který nekončí narozením, ale pokračuje i u dospělých jedinců. Hlavní roli zde hrají neurální kmenové buňky a jejich proliferace a diferenciaci.

7.2 Neurální kmenové buňky

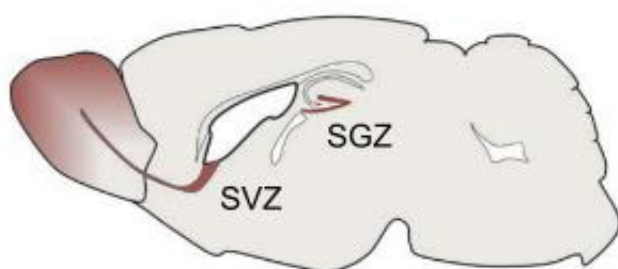
Za neurální kmenové buňky (neural stem cells, NSC) je možné označit buňky se schopností sebeobnovy, které mají zároveň potenciál diferencovat do tří základních neurálních buněčných typů, astrocytů, neuronů a oligodendrocytů.

Kmenové buňky obecně, je možné podle jejich vlastností dělit do různých skupin. Totipotentní kmenové buňky (zygota, u myši dvou-buněčné blastomery, u lidí až osmi-buněčné blastomery) mají schopnost dát po implantaci do dělohy vznik celému organismu. Pluripotentní kmenové buňky, označované také jako embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESCs), jsou schopné diferencovat do všech buněčných typů savčího organismu. Po implantaci do dělohy ale z ESCs nemůže vzniknout nový jedinec, protože tyto buňky nejsou schopny dát vznik buňkám trofoblastu, a tím i placentě. ESCs je možné získat z vnitřní buněčné masy (inner cell mass) blastocysty. Většina kmenových buněk ale patří do skupiny multipotentních kmenových buněk. Tyto buňky jsou více omezené ve schopnosti růstu a diferenciaci, přesto jsou stále schopny dát vznik více než jednomu buněčnému typu. Různé typy multipotentních kmenových buněk nesou názvy podle orgánů, ve kterých je možné je *in vivo* nalézt, nebo podle buněčných typů, do kterých jsou schopné diferencovat. NSC patří do multipotentních kmenových buněk a dávají v savčím mozku vzniknout více diferencovaným progenitorovým buňkám, které se později mění v plně diferencované funkční buňky CNS (shrnutí v Gage 2000).

7.2.1 Neurální kmenové buňky v mozku dospělého jedince

Během vývoje *in utero* vzniká v důsledku dělení, expanze, migrace, diverzifikace a diferenciaci NSC celý CNS savčího organismu. Vývoj mozku ale nekončí narozením a i v dospělosti si mozek zachovává určitý potenciál pro sebeobnovu a reparaci. Také v něm stále díky NSC vznikají nové nervové buňky, což je klíčové pro takové procesy, jako je učení a paměť. V dospělém mozku savců je možné NSC nalézt především ve dvou oblastech. Jednou je subventrikulární zóna (subventricular zone, SVZ) lemující postranní mozkové komory, od kterých je SVZ oddělena vrstvou ependymálních buněk. Další místo výskytu NSC v mozku dospělého jedince tvoří subgranulární vrstva (subgranular zone, SGZ), která se nachází v hipokampu v oblasti nazývané gyrus dentatus (Obr. 5, shrnutí v Bond et al. 2015). Po aktivaci vznikají z NSC v SVZ prekurzorové buňky, které se po opakovaném dělení mění na neuroblasty migrující směrem k *bulbus olfactorius* a diferencující se posléze v různé typy neuronů (Doetsch

et al. 1999). NSC typu radiálních glií v SGZ dávají vzniknout progenitorovým buňkám (Seri et al. 2001), které se několikrát rozdělí, než se změní v neuroblasty (Berg et al. 2015). Neuroblasty poté migrují a postupně se diferencují v granulární buňky, neurony dentálního gyru (Sun et al. 2015).



Obrázek 5. Neurální kmenové buňky v mozku dospělé myši.

Schématický obrázek znázorňuje sagitální řez mozku dospělé myši. Neurální kmenové buňky se nachází v oblasti SVZ a SGZ, (Ma et al. 2009, upraveno).

I v současné době existují určité pochybnosti o tom, zda *in vivo* se vyskytující NSC v SVZ a SGZ mozku dospělého jedince jsou skutečné NSC. Schopnost sebeobnovy těchto buněk je zpochybněna tím, že tyto buňky se vyskytují *in vivo* většinou v neaktivním, quiescentním, stavu a po aktivaci se množí a diferencují. Jednou aktivovaná buňka je tak odstraněna diferenciací a nevrací se zpět do neaktivního stádia (Encinas et al. 2011). Jiná studie ale statut buněk v SGZ jako skutečných NSC potvrdila *in vivo* pozorováním určitých cyklů aktivace, quiescence a reaktive těchto buněk (Bonaguidi et al. 2011). Také schopnost buněk SGZ diferencovat do všech tří typů neurálních buněk není zcela zřejmá. Tyto buňky diferencují *in vivo* do neuronů a astrocytů, ale ne do oligodendrocytů (Venere et al. 2012; Bonaguidi et al. 2011). Po izolaci a kultivaci *in vitro* je ale možné buňky z SGZ diferencovat do všech tří typů neurálních buněk (Palmer et al. 1997). Omezená schopnost diferenciacie *in vivo* je tak spíše důsledkem působení okolí než důkazem omezeného diferenciačního potenciálu těchto buněk.

Jak bylo popsáno v první kapitole úvodu tak morfogeny BMP, WNT, SHH a hormon T3 hrají klíčovou roli v regulaci vývoje CNS savců. Jejich úloha ale nekončí narozením a tyto faktory ovlivňují neurogenezi i v dospělém jedinci. BMP signalizace negativně reguluje produkci neuronů v SVZ prostřednictvím podpory terminální astrocytové diferenciacie NSC (Lim et al. 2000). V SGZ udržuje BMP NSC v klidovém, quiescentním stavu a jeho blokáce prostřednictvím nogginu způsobí nejprve masivní aktivaci NSC a jejich výraznou proliferaci, později ale dochází k výraznému úbytku NSC a v důsledku tak k potlačení neurogeneze (Mira et al. 2010). WNT signalizace podporuje proliferaci NSC a neurogenezi v SGZ, naopak exprese

negativních regulátorů této dráhy, proteinů sFRP3 a Dickkopf-1, podporuje setrvávání NSC v quiescentním stavu (Jang et al. 2013; Seib et al. 2013). Podobně jako WNT v SGZ působí i HH signalizace v SVZ, kde SHH podporuje proliferaci NSC (Feret et al. 2014). V oblasti SVZ ovlivňuje nedostatek TH negativně proliferaci NSC a migraci nově vzniklých neuroblastů (Lemkine et al. 2005). V SGZ působí TH srovnatelným způsobem, podporuje proliferaci NSC (Montero-Pedrazuela et al. 2006), přežití nově vzniklých buněk a jejich neuronální diferenciaci (Ambrogini et al. 2005; Desouza et al. 2005). U *in vitro* kultivovaných NSC izolovaných z oblasti SGZ podporuje T3 proliferaci, přežití a gliální diferenciaci (Desouza et al. 2005).

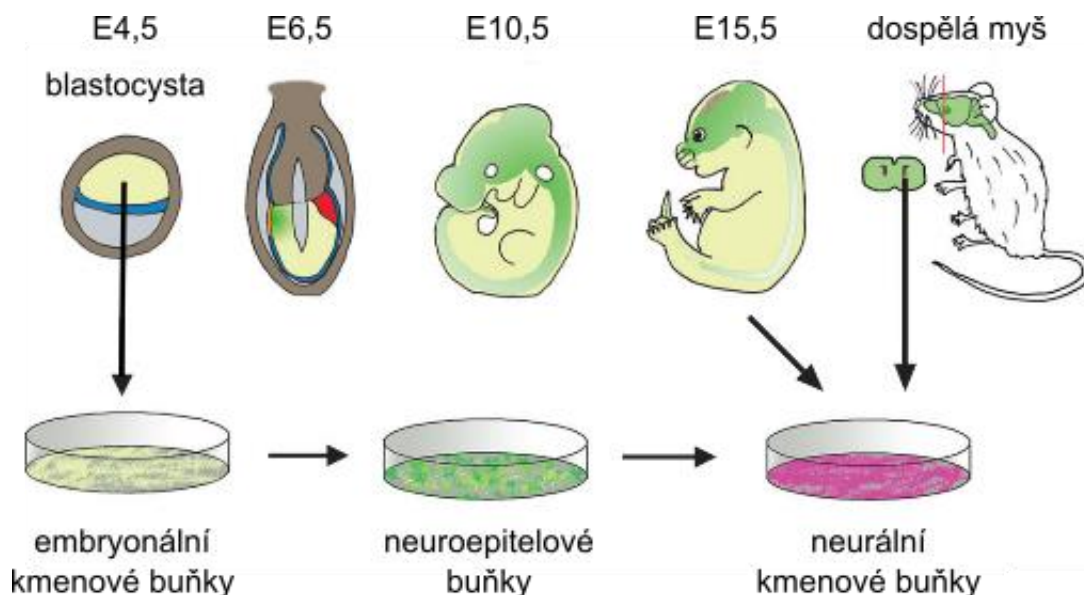
Studium NSC u savců je komplikováno především velkou rozmanitostí struktur a funkcí jednotlivých částí CNS a také heterogenitou všech neurálních buněčných typů. Je proto zřejmé, že i NSC z různých částí mozku se výrazně liší. Není ani zcela jasné, zda se NSC izolované z určité oblasti embryonálního mozku shodují ve svých vlastnostech s NSC získanými ze struktury v dospělém mozku, která z dané embryonální oblasti vznikla (Gage 2000). Určitá heterogenita se projevuje i v rámci jednotlivých oblastí. Dorzální a ventrální NSC SVZ produkují různé typy neuronů, a to i po *in vitro* kultivaci (Merkle et al. 2007).

7.2.2 Kultivace neurálních kmenových buněk *in vitro*

Za účelem podrobného studia vlastností NSC je možné tyto buňky kultivovat *in vitro*. Standardní metoda spočívá v izolaci NSC z různých oblastí mozku fetálního (Davis a Temple 1994) nebo dospělého (Reynolds a Weiss 1992) jedince a v následné kultivaci buněk za přítomnosti epidermálního růstového faktoru (EGF, Reynolds a Weiss 1992) a fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF-2, Gensburger et al. 1987). NSC je možné udržovat a množit *in vitro* dvěma způsoby. Jeden zahrnuje vznik mnohobuněčných agregátů neurosfér (Reynolds a Weiss 1992), zatímco druhý způsob spočívá v propagaci přisedlých buněk v jedné vrstvě jako tzv. monolayer na upraveném povrchu misky (Pollard et al. 2006).

Kromě zmíněné izolace buněk ze specifických oblastí mozku je možné NSC získat také alternativním způsobem, a to diferenciací z ESCs (Obr. 6). Existuje několik různých metod pro diferenciaci neurálních buněk z ESCs. Jedna z nich umožňuje vznik neurálních buněk v důsledku působení kyseliny retinové na mnohobuněčné agregáty ESCs (Bain et al. 1995). Další způsob zahrnuje kokultivaci ESCs s PA-6 buňkami (Kawasaki et al. 2000). Později ale bylo zjištěno, že ani vznik mnohobuněčných agregátů ani kokultivace s jinou buněčnou linií není nutná pro vznik NSC. Tyto buňky je možné získat kultivací ESCs v monolayer na miskách

s povrchem upraveným pomocí gelatinu a za přítomnosti růstových faktorů EGF a FGF-2 (Ying et al. 2003).



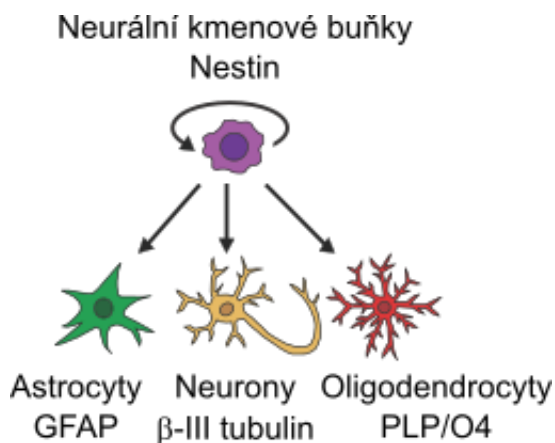
Obrázek 6. Tři zdroje neurálních kmenových buněk.

Diagram ukazuje tři způsoby získání NSC. Tyto buňky je možné získat buď diferenciací z embryonálních kmenových buněk, nebo izolací z frontální oblasti mozku myšního plodu starého 15,5 dne, případně izolací buněk z SVZ mozku dospělé myši (Pollard et al. 2006, upraveno).

7.2.3 Diferenciace neurálních kmenových buněk

NSC jsou definovány svou schopností diferencovat do všech tří základních typů neurálních buněk: do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů. Stav buněk a míru jejich diferenciace je možné sledovat pomocí detekce exprese specifických genů, tzv. markerů. Pro nediferencované NSC je například typická exprese nestinu. Tento protein patří do rodiny intermediálních filament typu IV (Lendahl et al. 1990) a jeho exprese během diferenciace NSC klesá (Frederiksen a McKay 1988). Diferencované astrocyty exprimují gliální fibrilární kyselý protein (Glial fibrillary acidic protein, GFAP, Jacque et al. 1978), který je ale také typický pro určité typy *in vivo* se vyskytující NSC, jako jsou například buňky radiálních glií u vyvíjejícího se plodu (Choi a Lapham 1978) nebo NSC v oblasti SVZ (Doetsch et al. 1999) a SGZ (Seri et al. 2001) v mozku dospělého jedince. Neurony exprimují neuronálně specifickou podjednotku mikrotubulárního komplexu β III-tubulin (Lee et al. 1990) a oligodendrocyty je možné nalézt

na základě exprese genu *PLP1*, který kóduje transmembránový proteolipid (Naismith et al. 1985). Přítomnost oligodendrocytů je také možné sledovat pomocí detekce povrchového O4 antigenu (Sommer a Schachner 1981).



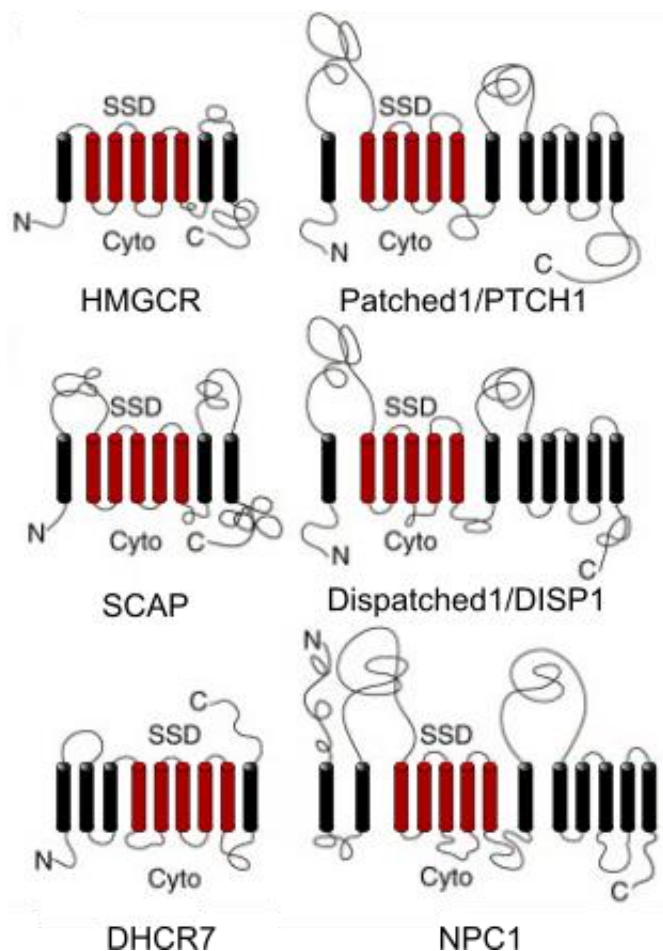
Obrázek 7. Diferenciace neurálních kmenových buněk.

Schématické znázornění diferenciace NSC do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů. Buněčně-specifické markery: nestin (nediferencované buňky), GFAP (astrocyty), βIII-tubulin (neurony), gen *Plp1* a O4 antigen (oligodendrocyty).

Diferenciace, proliferace, quiscence a aktivace NSC jsou komplexní procesy, na kterých se podílí mnoho různých signálních drah. Přesná regulace všech zúčastněných faktorů je proto pro vývoj a správné fungování celého CNS savčího organismu klíčová.

7.3 Proteiny obsahující sterol-sensing doménu

Sterol-sensing doména (SSD) je v evoluci konzervovaná struktura tvořená přibližně 180 aminokyselinami (amino acids, aa) uspořádanými do pěti transmembránových helixů. Tuto doménu je možné nalézt u proteinů, které se podílí na biosyntéze a metabolismu cholesterolu v buňkách, dále u proteinů zapojených do transportu cholesterolu a lipidů, u proteinů zapojených do HH signalizace a také u proteinů spojených s neuropatologickými změnami (Obr. 8, shrnuto v Kuwabara a Labouesse 2002).



Obrázek 8. Proteiny obsahující sterol-sensing doménu.

Nákresy představují topologii šesti nejznámějších proteinů, které ve své struktuře obsahují sterol-sensing doménu (SSD) tvořenou pěti transmembránovými helixy (červeně, Kuwabara a Labouesse 2002), upraveno).

7.3.1 SSD proteiny zapojené do biosyntézy cholesterolu

Cholesterol je steroidní látka přítomná v buněčných membránách eukaryotických organismů. V savčím organismu slouží jako výchozí sloučenina pro syntézu steroidních hormonů, kalciferolů (prekurzorů vitamínu D), lipoproteinů a žlučových kyselin. První protein, u kterého byla identifikována SSD je HMG-CoA reductáza (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR, Gil et al. 1985). Tento enzym se v buňkách v rámci tzv. mevalonátové biosyntetické dráhy podílí na syntéze cholesterolu. Protein HMGCR je u lidí tvořen 888 aa a obsahuje osm transmembránových úseků (Roitelman et al. 1992). Ve struktuře proteinu je možné rozpoznat dvě hlavní domény, N-koncovou 339 aa dlouhou doménu vázanou na membránu endoplazmatického retikula a C-koncovou 548 aa dlouhou cytoplazmatickou katalytickou doménu (Liscum et al. 1985). N-koncová doména v sobě obsahuje SSD tvořenou druhým až šestým helixem proteinu (88-218 aa, Gil et al. 1985).

HMGCR představuje také hlavní regulátor mevalonátové biosyntetické dráhy. V přítomnosti vysoké hladiny cholesterolu dochází v buňkách k poklesu exprese mRNA *HMGCR* genu (Chin

et al. 1982) a k výraznému zrychlení proteolytické degradace samotného enzymu. Za degradaci HMGCR v přítomnosti cholesterolu je zodpovědná N-koncová regulační doména obsahující SSD (Gil et al. 1985). V důsledku klíčové role, kterou hraje HMGCR v regulaci biosyntézy cholesterolu je tento protein také cílem léků pro pacienty s hypercholesterolemií. Látky nazývané statiny se totiž dokáží vázat do aktivního centra HMGCR a blokovat tak jeho funkci (Istvan a Deisenhofer 2001).

Druhý identifikovaný protein, ve kterém se nachází SSD je SREBP cleavage-activating protein (SCAP). 1023 aa dlouhý protein SCAP obsahuje osm transmembránových helixů a je důležitý pro udržení cholesterolové homeostáze v buňkách prostřednictvím regulace transkripce genů cholesterolové biosyntézy. V případě, že je v buňkách nízká hladina cholesterolu se SCAP váže na sterol regulatory element binding proteiny (SREBPs) a zprostředkovává jejich transport z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu, kde jsou SREBPs proteolyticky štěpeny. N-terminální fragment SREBP se poté přesouvá do jádra, kde působí jako transkripční faktor prostřednictvím vazby na specifický 10 bp dlouhý element DNA nazývaný SRE (sterol regulatory element). Tím dochází k aktivaci exprese genů spojených s biosyntézou cholesterolu například genu *HMGCR* (shrnutí v Brown a Goldstein 1999).

7-Dehydrocholesterol reductáza (DHCR7) představuje enzym katalyzující poslední krok v syntéze cholesterolu. Pomocí NADPH konvertuje 7-dehydrocholesterol na cholesterol. Exprese genu *DHCR7* je tkáňově specifická (Waterham a Wanders 2000) a jeho mutace způsobuje tzv. Smithův-Lemliův-Opitzův syndrom (SLOS, Waterham et al. 1998) spojený s řadou malformací. Protein DHCR7 dlouhý 475 aa obsahuje devět transmembránových helixů, z nichž čtvrtý až osmý tvoří SSD (Moebius et al. 1998).

SSD byla identifikována ve struktuře tří výše popsanych proteinů, které hrají klíčovou roli v biosyntéze cholesterolu. SSD se ale vyskytuje i v dalších proteinech, které jsou zapojeny do transportu cholesterolu a lipidů v buňce.

7.3.2 NPC1 a NPC1L1 protein

Niemann-Pickova choroba typu C (Niemann-Pick disease type C) je vzácné geneticky podmíněné onemocnění spojené s poškozením transportu cholesterolu. V buňkách pacientů neprobíhá efektivní relokace cholesterolu z lysozomů, a v důsledku toho dochází k akumulaci neesterifikovaného cholesterolu v pozdních endozomech a lysozomech (Neufeld et al. 1999). Toto onemocnění je v 95 % případů způsobené mutací v genu *NPC1*. Třináct transmembránových úseků obsahující protein NPC1 je tvořen 1278 aa z nichž aa 615 až 797

tvoří SSD (Ioannou 2000). Klinické studie potvrzují důležitost SSD pro správnou funkci proteinu NPC1 zjištěním, že právě mutace v oblasti kódující SSD jsou asociované s nejméně závažnými projevy této nemoci (Millat et al. 2001). Protein NPC1 se v buňkách vyskytuje v organelách, které se rychle pohybují podél mikrotubulů mezi endoplazmatickým retikulem a plazmatickou membránou buňky. Rychlý pohyb těchto váčků regulovaný přítomností cholesterolu je závislý na přítomnosti nepoškozené SSD v proteinu NPC1 a je narušen u pacientů trpících Niemann-Pick onemocněním (Zhang et al. 2001; Ko et al. 2001).

Protein NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1 protein) je další člen rodiny NPC1 proteinů. NPC1L1 je vysoce homologní k proteinu NPC1 a také obsahuje třináct transmembránových helixů, z nichž pět tvoří SSD (Davies et al. 2000). Tento protein nacházející se v enterocytech tenkého střeva se podílí především na vstřebávání cholesterolu (Altmann et al. 2004) a jeho lokalizace v buňce závisí na koncentraci cholesterolu. NPC1L1 na cytoplazmatické membráně váže cholesterol a poté dochází k endocytóze proteinu i s cholesterolem prostřednictvím klatrinového komplexu. Endozomy jsou transportovány podél mikrofilament dále do cytosolu a cholesterol je přesouván do dalších buněčných organel (Ge et al. 2008).

Kromě proteinů přímo spojených se syntézou a transportem cholesterolu v buňkách byla SSD identifikována i u dalších proteinů. Jedná se především o proteiny zapojené do jedné z nejdůležitějších signálních drah savčího organismu, do HH signální dráhy.

7.3.3 SSD proteiny v HH signální dráze

Jak bylo popsáno v první kapitole úvodu, HH signální dráha je klíčová především v embryogenezi a její působení se výrazně podílí na vzniku CNS savců. Aktivita a správná regulace této dráhy je však důležitá i u dospělých jedinců. Nejdůležitější a nejvíce studovaný ligand HH dráhy u savců představuje protein SHH. Další, minoritní ligandy jsou desert hedgehog (DHH) a Indian hedgehog (IHH). SHH vzniká jako 45 kDa velký prekurzor u kterého dochází k autokatalytickému štěpení, čímž vzniká 20 kDa velký N-koncový fragment mající signalizační funkci. Během štěpení prekurzoru dochází k navázání molekuly cholesterolu na karboxylový konec signálního fragmentu a k palmitoilaci jeho N-konce. SHH může ovlivňovat buňky lokálně, autokrinním způsobem, nebo může být z buněk sekretován. Na uvolňování SHH z buněk se klíčovým způsobem podílí protein Dispatched 1 (DISP1), který také patří do rodiny proteinů obsahujících SSD. 1524 aa dlouhý protein DISP1 obsahuje dvanáct transmembránových helixů. DISP1 translokuje SHH přes plazmatickou membránu buněk. Pro transport je důležitá modifikace SSH cholesterolem. SHH fragment bez asociované molekuly

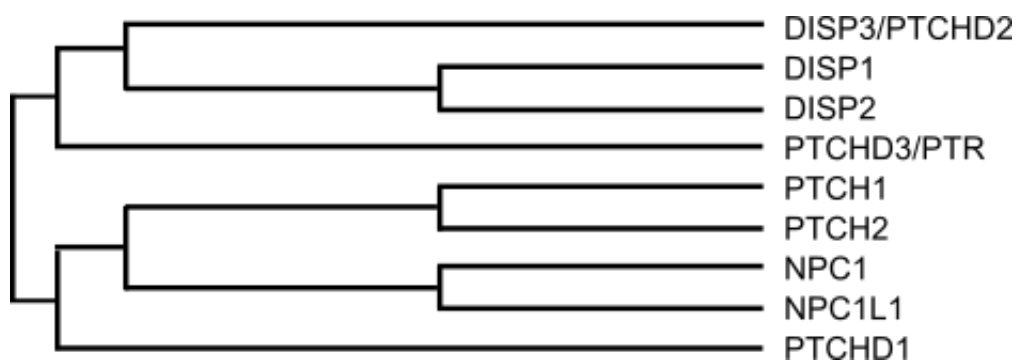
cholesterolu na svém C-konci není schopen vazby na DISP1 a tudíž není z buněk uvolňován (Burke et al. 1999). Klíčová je také přítomnost nepoškozené SSD v proteinu DISP1, protože mutace v této doméně způsobují poškození transportu SHH z buněk (Ma et al. 2002).

Na membráně cílových buněk se SHH váže na receptor Patched 1 (PTCH1 nebo PTC). Protein PTCH1 je tvořen 1447 aa a včetně SSD obsahuje ve své struktuře dvanáct transmembránových helixů. Pokud není SHH přítomen tak PTCH1 prostřednictvím své SSD (Strutt et al. 2001) inhibuje aktivitu s G-proteiny spřaženého receptoru Smoothened (SMO). Není-li SMO v důsledku vazby SHH na PTCH1 inaktivován, dochází v buňkách k aktivaci transkripčních faktorů GLI, které se přesouvají do jádra, kde ovlivňují genovou expresi (shrnutí v Ingham a McMahon 2001).

Přesná regulace HH signální dráhy během celého vývoje organismu je klíčová pro jeho správné fungování. Mutace v genech účastnících se HH signalizace mohou totiž vést k poruše regulace buněčné proliferace a diferenciaci, a tím ke vzniku nádorů. Známé jsou například dětské, vysoce agresivní nádory meduloblastomy podskupiny SHH (Yang et al. 2008; Schroeder a Gururangan 2014).

7.3.4 PTCHD proteiny

Proteiny obsahující Patched doménu (Patched domain containing proteins, PTCHD proteiny) jsou transmembránové proteiny obsahující SSD. Strukturně jsou příbuzné proteinům PTCH1 a NPC1 (Obr. 9) a je možné je nalézt nejen u savců, ale i u mnoha dalších organismů jako jsou například *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* (Zhong et al. 2014). U savců jsou známy čtyři proteiny patřící do této skupiny, a to: PTCHD1, PTCHD2 známý také jako DISP3, PTCHD3 známý také jako PTR a PTCHD4 známý také jako PTCH53. V současné době se ví jen velice málo o molekulární funkci těchto proteinů a o jejich zapojení do různých buněčných procesů. Na základě jejich strukturní podobnosti s proteinem PTCH1 se dříve předpokládala jejich možná účast v HH signalizaci. Tento předpoklad ale nemusí být správný, protože bylo například zjištěno, že PTCHD1 není schopen ovlivnit HH signalizaci v buňkách bez PTCH1. Toto zjištění tak naznačuje, že oba tyto proteiny se navzdory své strukturní podobnosti v buňkách účastní odlišných procesů (Ung et al. 2017).



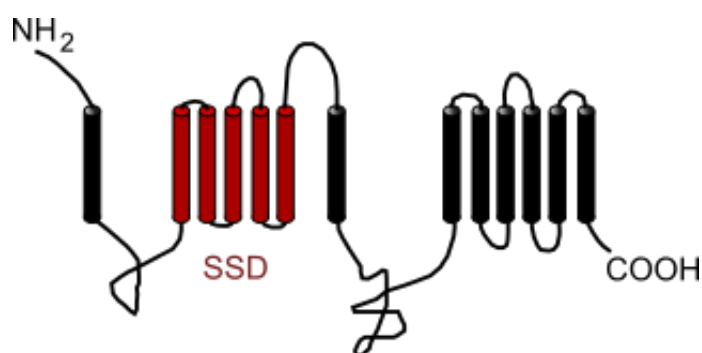
Obrázek 9. Fylogenetický strom proteinů PTCHD, PTCH a NPC.

Diagram znázorňuje evoluční příbuznost aminokyselinových sekvencí lidských PTCHD proteinů a dalších strukturně blízkých SSD proteinů (Zikova et al. 2009).

Na X chromozomu se u lidí i myši (*Homo sapiens*: Xp22.11, *Mus musculus*: X F3) nachází gen *PTCHD1*, který kóduje 888 aa dlouhý transmembránový protein obsahující SSD. Tento gen byl nejprve popsán ve spojení s poruchami autistického spektra. U pacientů s mentálním postižením a s autistickou poruchou bylo postupně nalezeno a popsáno množství různých mutací a delecí jak v genu *PTCHD1* tak i v jeho promotoru (Marshall et al. 2008; Noor et al. 2010b; Filges et al. 2011; Chaudhry et al. 2015; Torrico et al. 2015). U myši je možné detekovat expresi genu *Ptchd1* především v mozku. V okamžiku po narození je exprese tohoto genu nejvíce patrná v oblasti retikulárního jádra thalamu, které reguluje spánkový rytmus a pozornost. Později je exprese genu *Ptchd1* nejvyšší v oblasti mozkové kůry, ve striatu a především v mozečku (Wells et al. 2016). Protein PTCHD1 byl nalezen v synapsích neuronů, ve kterých je schopen prostřednictvím své C-terminální domény interagovat s postsynaptickými proteiny PSD95 a SAP102. U myši s delecí genu *Ptchd1* (hemizygotní myši samci *Ptchd1Y/-*) se objevovaly poruchy učení, určité motorické defekty a hyperagresivita (Wells et al. 2016). Myši s delecí dále vykazovaly strukturní a funkční změny excitačních synapsí v hipokampu a změny v expresi mnoha synaptických genů (Ung et al. 2017). Všechny tyto výsledky tak ukazují na důležitou roli proteinu PTCHD1 při postnatálním vývoji mozku a při regulaci jeho fungování.

Gen Dispatched 3 (*DISP3*), známý také jako *PTCHD2* a *KIAA1337*, byl v naší laboratoři nalezen během studie, která se zabývala geny regulovanými thyroïdním hormonem T3. V literatuře byl tento gen poprvé popsán v projektu zabývajícím se bioinformatickou analýzou sekvenčních dat lidské cDNA z mozku (Katoh a Katoh 2005). Gen *DISP3*, u lidí lokalizovaný na chromozomu 1 (p36.22) a u myši na chromozomu 4 (E2) kóduje protein o velikosti 1392 aa

u lidí a 1347 aa u myši. Protein DISP3 obsahuje 13 transmembránových úseků, z nichž pět tvoří SSD (Obr. 10). Gen *DISP3* je exprimován především v tkáních neurálního původu jako jsou mozek a sítnice a jeho exprese může být jak *in vitro*, tak i *in vivo*, regulována thyroïdním hormonem. DISP3 dále také ovlivňuje metabolismus a lokalizaci cholesterolu v buňkách (Zikova et al. 2009). Mutace v genu *DISP3* mají onkogení účinek a mohou ovlivňovat progresi určitých typů mozkových nádorů (Johansson et al. 2004, 2005). Gen *DISP3* je také spojován například se závislostí na UV světle tj. na opalování (Cartmel et al. 2014) a se vznikem očních vad jako je krátkozrakost (Chen et al. 2016).



Obrázek 10. Protein DISP3.

Schématický náčrt předpokládané topologie proteinu DISP3. Sterol-sensing doména (SSD) je znázorněna červeně (Zikova et al. 2009).

Gen *PTCHD3* se nachází u lidí na chromozomu 10 (p12.1), u myši na chromozomu 11 (E2). Expresi tohoto genu je možné detekovat především ve varlatech, a to v zárodečných buňkách. U myši je možné rozpoznat dvě izoformy tohoto proteinu PTCHD3a a PTCHD3b. První z nich obsahuje 410 aa, druhá 906 aa přičemž prvních 409 aa je schodných u obou izoform (Fan et al. 2007). Navzdory tomu, že je gen *PTCHD3* exprimován především ve varlatech, tak u dospělých jedinců je možné sledovat přítomnost jeho mRNA i v mnoha dalších typech tkání (Ghahramani Seno et al. 2011). Funkce tohoto genu není zatím známá, ale je spojován například s poruchami autistického spektra (Ghahramani Seno et al. 2011), se vznikem astmatu u dětí (White et al. 2016) a s nádory střev (Smith et al. 2013).

U lidí na chromozomu 6 (p12.3) a u myši na chromozomu 17 (B3) se nachází gen *PTCHD4* známý také jako *PTCH53*. Exprese tohoto genu je regulována proteinem p53 který hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a v odpovědi buněk na poškození. Protein p53 představuje jeden z nejdůležitějších tumor supresorových genů, který funguje především jako sensor poškození jaderné DNA. Vzhledem k tomu, že zvýšená exprese genu *PTCHD4* inhibuje v buňkách HH signální dráhu, tak je možné předpokládat, že protein PTCHD4 představuje spojovací článek mezi signalizací pomocí p53 proteinu a HH dráhou (Chung et al. 2014).

Proteiny obsahující ve své struktuře SSD se v buňkách účastní mnoha procesů a jejich poškození může mít vážný dopad na fungování celého organismu. Nezanedbatelná je také úloha těchto proteinů při vzniku a progresi různých druhů nádorů, včetně nádorů mozku.

7.4 Meduloblastomy

Tumor mozku představuje u dětí jeden z nejčastěji se vyskytujících typů nádorů. Meduloblastomy pak tvoří přibližně 13 % všech mozkových nádorů. Jedná se o především pediatrické, vysoce maligní, často metastazující nádory CNS vznikající z oblasti mozečku. V České republice je ročně diagnostikováno přibližně 10-12 meduloblastomů a úspěšnost léčby dosahuje pětiletého bezpříznakového přežití u 70 – 80 % u pacientů standardního rizika a 30 – 70 % u pacientů vysokého rizika (Zitterbart et al. 2010).

Meduloblastomy je možné klasifikovat na základě jejich histopatologických rysů do několika skupin. Jedná se o klasický meduloblastom, desmoplastický/nodulární meduloblastom (D/N), meduloblastom s extenzivní nodularitou (MBDEN), anaplastický meduloblastom (A) a velkobuněčný meduloblastom (large cell, LC). Histologický nález LC meduloblastomu bývá často spojen s anaplastickou histologií, tudíž se tyto dvě varianty často uvádí jako jeden typ LC/A meduloblastom (Ellison 2010). Klasifikace meduloblastomů podle histologického nálezu je sice standardně používaná metoda, ale neodráží současný stav poznání, ani neodpovídá zcela patogenezi nádoru a prognóze pro pacienty. Proto došlo na základě expresních profilů k rozdělení meduloblastomů do tzv. molekulárních podskupin, které lépe vypovídají o obecných charakteristikách jednotlivých subtypů (shrnuje Taylor et al. 2012; Schroeder a Gururangan 2014).

7.4.1 Molekulární podskupiny meduloblastomů

První studie zabývající se rozdělením meduloblastomů do skupin na základě genové exprese zavedla pět subtypů meduloblastomů (Kool et al. 2008). Později došlo na základě dalších výsledků k přehodnocení tohoto rozdělení a meduloblastomy se dělí do čtyřech základních podskupin: sonic hedgehog (SHH) subtyp, WNT subtyp, subtyp 3 a subtyp 4 (Northcott et al. 2011b). Nejnovější výsledky dále rozšířily toto rozdělení a bylo navrženo členění meduloblastomů celkem do dvanácti tříd: WNT α , WNT β , SHH α , SHH β , SHH γ , SHH δ , subtyp 3 α , subtyp 3 β , subtyp 3 γ , subtyp 4 α , subtyp 4 β a subtyp 4 γ (Obr. 11, Cavalli et al. 2017).

Subgroup	WNT		SHH				Group 3			Group 4			
	WNT α	WNT β	SHH α	SHH β	SHH γ	SHH δ	Group 3α	Group 3β	Group 3γ	Group 4α	Group 4β	Group 4γ	
Subtype proportion													
Subtype relationship													
Clinical data	Age												
	Histology		LCA Desmoplastic	Desmoplastic	MBEN Desmoplastic	Desmoplastic							
	Metastases	8.6%	21.4%	20%	33%	8.9%	9.4%	43.4%	20%	39.4%	40%	40.7%	38.7%
	Survival at 5 years	97%	100%	89.8%	87.3%	88%	88.5%	68.2%	55.8%	41.8%	86.6%	75.4%	82.6%
Copy number	Broad	6 ⁻	9q ⁺ 10q ⁻ 17p ⁻		Balanced genome		7 ⁺ , 8 ⁻ , 10 ⁻ , 11 ⁻ , i17q		8 ⁺ , i17q	7q ⁺ , 8p ⁻ , i17q	i17q	7q ⁺ , 8p ⁻ , i17q (less)	
	Focal		MYCN amp, GLI2 amp, YAP1 amp	PTEN loss		10q22 ⁻ 11q23.3		OTX2 gain, DDX31 loss	MYC amp	MYCN amp, CDK6 amp	SNCAIP dup	CDK6 amp	
Other events			TP53 mutations			TERT promoter mutations		High GF1/1B expression					

Age (years): 0-3 >3-10 >10-17 >17

Obrázek 11. Molekulární podskupiny meduloblastomů.

Diagram znázorňuje rozdělení meduloblastomů do čtyřech základních skupin a jejich další členění do celkem dvanácti podskupin. Je uvedeno zastoupení jednotlivých podskupin, jejich příbuznost, vybrané klinické údaje a nejčastější změny v DNA (Cavalli et al. 2017).

7.4.1.1 WNT subtyp

Asi nejvíc prostudovanou skupinou meduloblastomů je skupina WNT. Do této podskupiny patří přibližně 15 % meduloblastomů. Prognóza pacientů je velice dobrá (více než 90 % přežití), poměr zastoupení pacientů obou pohlaví vyrovnaný a nádor se nejčastěji objevuje u dětí starších tří let.

Tako podskupina byla pojmenována podle WNT signální dráhy. Kanonická WNT signální dráha zahrnuje přenos signálu na β-catenin (gen *CTNNB1*). Pokud není WNT přítomen pak v buňkách dochází k fosforylaci a následné degradaci β-cateninu. Navázání WNT ligandu na receptor Frizzled (FZ) spojený s koreceptorem LRP (LDL receptor related protein) blokuje prostřednictvím dalších proteinů fosforylaci β-cateninu GSK-3 kinázou a umožňuje tak jeho transport do jádra, kde aktivuje expresi cílových genů.

U více než 75 % meduloblastomů patřících do skupiny WNT je možné nalézt mutaci ve třetím exonu genu pro β-catenin (*CTNNB1*, Zurawel et al. 1998) Také mutace v dalších genech, které způsobí nadměrnou aktivaci WNT signální dráhy, podporují progresi tohoto typu nádoru (Northcott et al. 2012). Mutace v genu *APC*, který kóduje inhibitor WNT dráhy vede ke vzniku

Turcotova syndromu, jehož klinický obraz zahrnuje častý výskyt meduloblastomů (Hamilton et al. 1995). Byl vytvořen i myší model tohoto typu meduloblastomů. Myši deficientní v genu *Trp53* (p53) exprimují stabilizovanou alelu genu *CTNGB1* v progenitorových buňkách rhobio lip vyvíjejícího se mozku, což u nich vede ke vzniku meduloblastomů WNT subtypu v oblasti dorzálního mozkového kmene (Robinson et al. 2012)

7.4.1.2 SHH subtyp

Meduloblastom patřící do podskupiny SHH je diagnostikován u přibližně 25 % pacientů. Věková distribuce tohoto tumoru je bimodální, s vysokým výskytem ve skupině pacientů ve věku 0-3 roky a ve skupině pacientů nad 16 let. Ve věkové skupině 4-16 let se tento subtyp nádoru vyskytuje jen velice vzácně. Prognóza pacientů s SHH subtypem meduloblastomu je středně dobrá a srovnatelná s prognózou pacientů s nádorem subtypu 4.

SHH subtyp meduloblastomů byl pojmenován podle SHH proteinu, ligandu v této práci několikrát zmíněné HH signální dráhy. Deregulace HH signální dráhy v důsledku mutací totiž vede ke vzniku tohoto typu nádoru. Konkrétně mutace v receptoru HH dráhy *PTCH1*, mutace v genech *SMO* a *SUFU* a také amplifikace genů *GLI1* a *GLI2* dokáží iniciovat onkogenezi vedoucí k meduloblastomu subtypu SHH (Pastorino et al. 2009; Brugières et al. 2010; Slade et al. 2011; Northcott et al. 2011a). Pacienti s dědičnou mutací způsobující konstitutivní aktivaci HH signální dráhy trpí tzv. Gorlinovým syndromem, který je charakterizován rozvojem bazálních karcinomů a vyšším výskytem meduloblastomů (Bale et al. 1998). Vznik meduloblastomů subtypu SHH byl pozorován i u myší heterozygotních pro gen *Ptch1* (*Ptch1*^{+/-} Goodrich et al. 1997; Zurawel et al. 2000), stejně jako u myší deficientní v genu *Trp53* a heterozygotních pro gen *Sufu* (*Sufu*^{+/-}, Lee et al. 2007). Za vznik meduloblastomů SHH subtypu je zřejmě zodpovědná především špatná regulace proliferace a diferenciaci již dříve zmíněných prekurzorů granulárních buněk, které se výrazně podílí na vzniku mozečku a jeho struktur (Schuller et al. 2008; Gibson et al. 2010).

7.4.1.3 Subtyp 3

Do skupiny nádorů subtypu 3 (nazývané také subtyp C) je možné zařadit přibližně 25 % meduloblastomů. Tento subtyp se vyskytuje častěji u mužů než u žen (poměr přibližně 2:1) a je častý u novorozenců a dětí, ale téměř se nevyskytuje u dospělých pacientů. Meduloblastomy subtypu 3 tvoří ve většině případů metastázy a prognóza pro pacienty je velice špatná (jen přibližně 50 % přežití) v porovnání s prognózou pro ostatní subtypy.

Pro meduloblastomy subtypu 3 je typická především vysoká exprese genů *MYC* a *OTX2* (Northcott et al. 2011b; Di et al. 2005). Genom buněk tohoto nádoru je dále velice nestabilní a vyskytují se v něm chromozomové aberace. Tetraploidie se nachází v nádorech až u 54 % pacientů (Jones et al. 2012).

U myší deficientních v genu *Trp53* docházelo ke vzniku nádorů s charakteristikou meduloblastomů subtypu 3 v důsledku transplantace upravených neurálních progenitorových buněk. Buňky byly izolované z postnatálního mozečku myši a virovou infekcí do nich byla vnesena stabilní forma *Myc* genu (Pei et al. 2012b)

7.4.1.4 Subtyp 4

Nejčastěji se vyskytující, ale nejméně prozkoumaný subtyp meduloblastomu je subtyp 4 (nazývaný také subtyp D). Až více než 35 % meduloblastomů je možné zařadit do této skupiny. Výrazný rozdíl je v incidenci u mužů a žen (poměr až 3:1). U většiny pacientek (až 80 %) se pak v nádorových buňkách nachází pouze jedna kopie X chromozomu. To spolu s vyšším výskytem meduloblastomů subtypu 4 u mužů naznačuje existenci jednoho nebo více tumor supresorových genů na chromozomu X (Northcott et al. 2012).

Podobně jako u nádorů subtypu 3, tak i u subtypu 4 se často vyskytují tetraploidie. Častá je také přítomnost izochromozomu 17q a delece 17p. Navíc je možné u meduloblastomů subtypu 4 často pozorovat overexpresi genů *MYCN* a *CDK6* (Northcott et al. 2011b). Dosud nebyl popsán žádný myší model pro tento typ meduloblastomů.

Pro studium meduloblastomů je možné kromě myších modelů použít i buněčné linie pěstované *in vitro*. Jedná se o linie buněk, které vznikly izolací z konkrétního pacienta. V současné době je známo více než čtyřicet linií meduloblastomových buněk, z nichž u většiny je možné určit, do jaké podskupiny patří. Nejvíce je zastoupena skupina meduloblastomů subtypu 3 s overexpresí *MYC* genu (Ivanov et al. 2016).

Nádorové buňky ve svých charakteristikách často mohou připomínat buňky kmenové. Jedná se především o expresi specifických markerů a o schopnost sebeobnovy a diferenciaci (shrnutí v Lathia et al. 2011). Proto, když jsme se zaměřili na studium vlivu proteinu DISP3 na proliferaci, přežití a diferenciaci neurálních buněk bylo to nejen kvůli jeho možné roli ve vývoji CNS, ale i z důvodu jeho případné účasti v onkogenezi.

8 Materiál a metody

8.1 Buněčné kultury a kultivace buněk *in vitro*

Buněčné linie NS-5, C17.2 a O4ANS nám poskytl Dr. Dietman Spengler (Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany) s laskavým svolením prof. Austina Smithe (Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom). Buněčné linie DAOY, D341 a D425 poskytl prof. Mathias Heikenwaelder (Helmholtz Zentrum Muenchen, GmbH, Munich, Germany). Od společnosti American Type Culture Collection (ATCC) jsme získali buněčné linie HEK Phoenix-Eco (CRL-3214), Y79 (HTB-18) a MCF7 (HTB-22), od společnosti Thermo Fisher Scientific jsme získali buněčnou linii HEK 293 FT (R70007). Seznam všech použitých buněčných linií je uveden v tabulce 1.

NS-5	mouse neural stem cells	(Conti et al. 2005)
C17.2	mouse neural progenitor cells	(Snyder et al. 1992)
O4ANS	mouse adult neural stem cells	(Pollard et al. 2006)
HEK 293 FT	human embryonic kidney cells	
HEK Phoenix-Eco	human helper-free retrovirus producer lines	(Swift et al. 2001)
DAOY	human desmoplastic medulloblastoma cell line	(Jacobsen et al. 1985)
D341	human medulloblastoma cell line	(Friedman et al. 1988)
D425	human medulloblastoma cell line	(Bigner et al. 1990)
Y79	human retinoblastoma cell line	(Reid et al. 1974)
MCF7	human breast cancer cell line	(Soule et al. 1973)

Tabulka 1. Seznam použitých buněčných linií.

Buňky NS-5 a O4ANS byly kultivovány v růstovém médiu připraveném kombinací DMEM/F12 média (Sigma), které obsahovalo 1× N2 supplement (Gibco) a Neurobasal média (Gibco), které obsahovalo 1× B27 supplement (Gibco) a L-glutamin (2 mM, Gibco). Růstové médium bylo dále doplněno insulinem (12,5 µg/ml, Sigma), apo-transferrinem (50 µg/ml, Sigma), BSA (25 µg/ml, Gibco) a růstovými faktory FGF-2 (10 ng/ml, R&D Systems) a EGF (10 ng/ml, R&D Systems). Buňky byly pasážovány každý druhý den za použití 0,025% trypsinu/EDTA (Gibco) a byly vysévány na misky s povrchem upraveným pomocí želatiny (Gelatin from porcine skin, Sigma) v koncentraci přibližně $1,5 \times 10^4$ buněk/cm².

Buňky C17.2 byly kultivovány v růstovém médiu DMEM (Sigma) doplněném 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 5% HS (Horse Serum, Gibco), L-glutaminem (2 mM, Gibco)

a penicilinem/streptomycinem (Gibco). Buňky byly pasážovány každý třetí den za použití 0,05% trypsinu/EDTA (Gibco) a byly vysévány na misky v koncentraci přibližně 1×10^4 buněk/cm².

Buňky HEK 293 FT a HEK Phoenix-Eco byly kultivovány v médiu DMEM (Sigma) doplněném 10% FBS (Gibco), L-glutaminem (4 mM, Gibco) a penicilinem/streptomycinem (Gibco).

Buňky DAOY, D341 a D425 byly kultivovány v médiu IMEM (Gibco) doplněném 10% FBS (Gibco) a penicilinem/streptomycinem (Gibco).

Buňky Y79 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 (Gibco) doplněném 10% FBS (Gibco) a penicilinem/streptomycinem (Gibco).

Buňky MCF7 byly kultivovány v médiu DMEM (Sigma) doplněném 10% FBS (Gibco), penicilinem/streptomycinem (Gibco) a insulinem (12,5 µg/ml, Sigma).

8.2 Diferenciace neurálních buněk *in vitro*

Neurální kmenové buňky NS-5 a O4ANS byly před diferenciací vysety na misky s povrchem upraveným pomocí poly-ornithinu/lamininu (Sigma, Invitrogen) v koncentraci $0,5 \times 10^4$ buněk/cm² ve standardním růstovém médiu. Po jednom dni kultivace buněk bylo růstové médium vyměněno za médium podporující diferenciaci. Neurální kmenové buňky diferencovaly do astrocytů po čtyřech dnech kultivace v diferenciačním médiu, které bylo připraveno ze standardního růstového média bez růstových faktorů FGF-2 a EGF s navíc přidáním 1% FBS (Gibco). Pro diferenciaci do neuronů a oligodendrocytů byly buňky kultivovány v DMEM/F12 médiu (Sigma), které obsahovalo 1× N2 supplement (Gibco) a bylo doplněno forskolinem (10 µM, Sigma), PDGF-AA (10 ng/ml, R&D Systems) a FGF-2 (10 ng/ml, R&D Systems). Po čtyřech dnech kultivace bylo médium vyměněno za DMEM/F12 médium, (Sigma), které obsahovalo 1× N2 supplement (Gibco) a bylo doplněno thyroidním hormonem (T3, 30 ng/ml, Sigma), kyselinou askorbovou (200 µM, Sigma) a FGF-2 (7.5 ng/ml, R&D Systems). Od pátého dne byla koncentrace FGF-2 v diferenciačním médiu postupně snižována pomocí každodenní výměny poloviny média za médium bez FGF-2, a to po dobu následujících čtyř dnů.

Neurální progenitorové buňky C17.2 byly před diferenciací vysety na kulturní misky v koncentraci $0,26 \times 10^3$ buněk/cm² ve standardním růstovém médiu. Po jednom dni kultivace bylo růstové médium vyměněno za diferenciační médium složené z DMEM/F12 média

(Sigma), které obsahovalo 1× N2 supplement (Gibco) a bylo doplněno neurotrofními faktory NGF (10 ng/ml R&D Systems) a BDNF (10 ng/ml R&D Systems). Buňky C17.2 diferencovali do směsné populace astrocytů a neuronů v průběhu sedmi dní.

8.3 Produkce virů, transdukce a transfekce buněk

Pomocí metody CRISPR/Cas9 byly vytvořeny buněčné linie buněk NS-5 a D341 s mutacemi v genu *Disp3* (*DISP3*). Vhodné sekvence pro cílenou mutagenezi byly nalezeny programem E-CRISP tool (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>). Navržena byla dvě vhodná místa CRISPR/Cas9 cílené mutageneze pro gen *Disp3* v myších buňkách NS-5, která se nacházela ve druhém a sedmém exonu a dvě vhodná místa mutageneze pro gen *DISP3* v lidských buňkách D341, která se nacházela v exonu dva a tři. Pro produkci sgRNA byly do vektoru lentiCRISPRv1 (Addgene # 49535) po štěpení enzymem BsmBI vloženy hybridizované oligonukleotidy (Sigma-Aldrich), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 2 (Shalem et al. 2014). Za účelem produkce lentivirů obsahujících sekvenci pro sgRNA, protein Cas9 a rezistenci k antibiotiku puromycinu, byly do buněk HEK 293 FT transfekovány činidlem Lipofectamine 2000 (Invitrogen) současně tři plazmidy, a to pLentiCRISPRv1 s vloženou sekvencí pro sgRNA, psPAX2 (Addgene # 12260) a pVSV-G (Addgene # 8454). 24 hodin po transfekci byl supernatant z buněk odebrán a viriony byly precipitovány pomocí PEG/it (SBI). Precipitát byl rozpuštěn v PBS a přidán do média k buňkám NS-5 nebo D341. Kontrolní buňky byly infikovány lentiviry, které neobsahovaly sekvenci pro cílenou mutagenezi. Po 24 hodinové inkubaci s lentiviry bylo médium vyměněno za čerstvé a po dalších 24 hodinách byl buňkám přidán puromycin (1 µg/ml). Buňky byly v přítomnosti antibiotika selektovány po dobu sedmi dní.

MuDisp3 E2 sgRNA#1	5'-CACCGGTTCTGCTGGAAGCCCCATG-3'
	5'-AAACCATGGGGCTTCCAGCAGAACC-3'
MuDisp3 E7 sgRNA#2	5'-CACCGGTAGAGGCTCCAGAGGCCCA-3'
	5'-AAACTGGGCCTCTGGAGCCTTACC-3'
HuDISP3 E2 sgRNA#3	5'-CACCGAAGCGTCTCGGAGGTGAAGT-3'
	5'-AAACACTTCACCTCCGAGACGCTTC-3'
HuDISP3 E3 sgRNA#4	5'-CACCGGGTAGACTGCTTGGCCAGCA-3'
	5'-AAACTGCTGGCCAAGCAGTCTACCC-3'

Tabulka 2. Seznam oligonukleotidů vkládaných pro produkci sgRNA do vektoru lentiCRISPRv1.

NS-5 buňky se sníženou expresí genu *Disp3* byly vytvořeny pomocí krátkých vlásenkových RNA (shRNA). Dvě vhodné cílové sekvence byly navrženy v programu The pSilencer Expression Vector Insert Design Tool (5'-AUCGAGCUCAUCUUUCUGG-3' a 5'-GUUCUCUCAUGACUUACUU-3', Ambion). Oligonukleotidy obsahující navržené sekvence (Ambion) byly po hybridizaci vloženy do vektoru pSilencer 2.1-U6 puro (Ambion) a vzniklé plazmidy byly transfekovány do buněk NS-5 transfekčním činidlem Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Kontrolní buňky byly transfekovány plazmidem pSilencer 2.1-U6 puro-NC (Ambion). Puromycin (1 µg/ml) byl přidán do média 24 hodin po výměně transfekční směsi za standardní médium a buňky byly v přítomnosti antibiotika selektovány po dobu sedmi dní.

Buněčné linie NS-5 a C17.2 s nadexpresí genu *DISP3* byly připraveny pomocí retrovirové transdukce. Lidská sekvence genu *DISP3* (GenBank AB037758.1) byla vložena do expresního vektoru pBABE-Hygro (Sigma) po předchozím štěpení vektoru enzymy BamHI a EcoRI. Vzniklý plazmid byl transfekován za účelem produkce retrovirů do buněk Phoenix-ECO transfekčním činidlem Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Supernatant obsahující viriony byl z buněk odebrán 36 hodin po transfekci a buňky NS-5 nebo C17.2 byly inkubovány ve směsi standardního růstového média, virového supernatantu a polybrenu (4 µg/ml) po dobu 8 hodin. Kontrolní buňky byly infikovány retroviry, které neobsahovaly sekvenci genu *DISP3*. Hygromycin (200 µg/ml) byl přidán do média 24 hodin po výměně média za čerstvé a buňky byly v přítomnosti antibiotika selektovány po dobu sedmi dní.

Pro vznik buněk DAOY s nadexpresí genu *DISP3* byl pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 2000 (Invitrogen) do buněk transfekován expresní plazmid pCDNA3-DISP3. Tento plazmid vznikl vložení lidské sekvence genu *DISP3* (GenBank AB037758.1) do restrikčního místa EcoRV a XbaI vektoru pCDNA3 (Invitrogen). Kontrolní buňky byly

transfekovány plazmidem pCDNA3, který neobsahoval sekvenci genu *DISP3*. Antibiotikum G418 (500 µg/ml) bylo přidáno do média 24 hodin po výměně transfekční směsi za standardní médium a buňky byly v jeho přítomnosti selektovány po dobu sedmi dní.

8.4 Detekce mutací pomocí T7 endonukleázy I

Genomová DNA byla z buněk NS-5 izolována použitím QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) podle návodu výrobce. 524 bp (exon 2) nebo 551 bp (exon 7) dlouhý úsek DNA obklopující místo cílené mutagenese byl amplifikován metodou PCR za použití Q5 High-Fidelity DNA polymerázy (New England BioLabs) a primerů T7EI-Disp3 sgRNA#1 a T7EI-Disp3 sgRNA#2 (Tab. 3). 200 ng purifikovaného PCR produktu bylo poté denurováno (95°C, 10 minut) a pomalu znovu hybridizováno (95-85°C rychlost poklesu teploty 2°C/s, 85-25°C rychlost poklesu teploty 0.1°C/s a poté 25°C 5 minut) za účelem tvorby heteroduplexů. Hybridizované PCR produkty byly štěpeny T7 endonukleázou I (37°C, 20 minut, New England BioLabs), která rozpoznává místa, kde se v důsledku přítomnosti různých mutací v heteroduplexech nachází nespárované nukleotidy. Fragmenty heteroduplexů vzniklé endonukleázovým štěpením byly detekovány na 2% agarosovém gelu a výsledky byly vyhodnoceny v počítačovém programu ImageJ (Schneider et al. 2012) pomocí aplikace Gel analyzer.

T7EI-Disp3 sgRNA#1	F: 5'-GCGAATCGAGCTCATCTTTCTGG-3'
	R: 5'-GGAGGATGGAATAAACCCCTTT-3'
T7EI-Disp3 sgRNA#2	F: 5'-TGTGTGATGTGTTCGTCGGTA-3'
	R: 5'-TCACATGCGACTACTGCT-3'

Tabulka 3. Primery použité pro PCR při T7 endonuclease I assay.

8.5 Izolace RNA a qPCR

Celková RNA byla z buněk nebo tkání izolována použitím PureLink RNA Mini Kit (Ambion) podle návodu výrobce. RNA pro stanovení hladiny *DISP3* mRNA v lidských nádorech jsme získali díky Dr. André O. von Buerenovi (Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany) a prof. Mathiasi Heikenwaelderovi (Helmholtz Zentrum Muenchen, GmbH, Munich, Germany). Pro přípravu cDNA bylo použito 200 ng celkové RNA, M-MLV reverzní transkriptáza (Promega) a random

hexamer primery (Invitrogen). Kvantitativní PCR (qPCR) byla provedena v technických triplikátech za použití reakční směsi SYBR Green I Master mix (Roche) a přístroje LightCycler® 480 system (Roche). Seznam všech primerů použitých pro qPCR je uveden v tabulce 4. Data byla vyhodnocena za použití LightCycler® 480 Software (Roche) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft). Relativní hodnoty exprese byly vypočítány z hodnot C_q a normalizovány na hodnoty referenčního genu (*Ubb*, *GAPDH*, nebo *Actb*) příslušného vzorku.

Ubb	F: 5'-ATGTGAAGGCCAAGATCCAG-3'
	R: 5'-TAATAGCCACCCCTCAGACG-3'
Disp3 (DISP3)	F: 5'-CAGCAGCTTTGACCTCTTCA-3'
	R: 5'-GCAACATCTGCAGGAAGGA-3'
Nes	F: 5'-AGGCTGAGAACTCTCGCTTGC-3'
	R: 5'-GGTGCTGGTCCTCTGGTATCC-3'
Gfap	F: 5'-TGAGGCAGAAGCTCCAAGA-3'
	R: 5'-CCAGGGTGGCTTCATCTGC-3'
Tubb3	F: 5'-TGGACAGTGTTCGGTCTGG-3'
	R: 5'-CCCTCCGTATAGTGCCCTTTG-3'
Plp1	F: 5'-GTTCCAGAGGCCAACATCAAGC-3'
	R: 5'-AGCCATACAACAGTCAGGGCATAG-3'
Igfbp7	F: 5'-TGGTGACCGGGAAAATCTGG-3'
	R: 5'-TGCGTGGCACTCATACTCTC-3'
Lipt1	F: 5'-TCCACGTGGGTTGATTGAGT-3'
	R: 5'-GCTGCTGGGACCTTGTGCTG-3'
Dgka	F: 5'-GCTCTGTGTCTCTAGACGAG-3'
	R: 5'-TGGTGAATCTCTTGGGTCTCC-3'
Brsk1	F: 5'-CCCGAGAAAAGGCTCAGTC-3'
	R: 5'-GGCTACGCATGGCTACTCTG-3'
Edg8	F: 5'-GGACCGCTGTTTCTCTTGC-3'
	R: 5'-GATGGGATTCAGCAGCGAGT-3'
Epb4.113	F: 5'-GCCCAGCTATCAGAAGATATCAC-3'
	R: 5'-AGCTCTGACTGCACCGTG TAGGA-3'
Prelp	F: 5'-GAACTTCTAGCTGGCTCTCT-3'
	R: 5'-GGATGCC CTCATGATCCAGG-3'
GAPDH	F: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	R: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Actb (ACTB)	F: 5'-GATCTGGCACCACACCTTCT-3'
	R: 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAA-3'

Tabulka 4. Seznam primerů použitých pro qPCR.

8.6 Čipová analýza

Koncentrace celkové RNA izolované z buněk byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), kvalita RNA byla elektroforeticky ověřena pomocí přístroje Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent). Pro mikročipovou analýzu NS-5 buněk byly použity DNA čipy typu Illumina MouseRef-WG-6 v2 Expression BeadChips (Illumina), pro C17.2 buňky jsme použili čipy typu Illumina MouseRef-8 v2 Expression BeadChips (Illumina). 250 ng RNA bylo amplifikováno a značeno užitím Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion) a poté bylo 1500 ng značené cRNA hybridizováno na čipu podle návodu výrobce. Analyzovány byly tři nebo čtyři nezávislé biologické replikáty pro každou skupinu vzorků. Získaná data byla zpracována v programu GenomeStudio (verze 1.9.0.24624; Illumina) a vyhodnocena v balíčku limma (Smyth 2004) projektu Bioconductor (Gentleman et al. 2004; Huber et al. 2015) způsobem popsáným v literatuře (Valach et al. 2012): Za účelem odstranění pozadí byl použit normální-exponenciální model, ke standardizaci dat byla použita kvantilová normalizace a log-2 transformace byla použita pro stabilizaci variance dat. Porovnání intenzitních hodnot za účelem nalezení odlišně exprimovaných genů bylo provedeno pomocí moderovaného t-testu. Kritéria pro určení vybraných genů byla: $P < 0,001$, což odpovídá Storeyho $q < 0,933$ a $|\log_2FC| > 0,4$ pro NS-5 buňky a $P < 0,05$, což odpovídá Storeyho $q < 0,9$ a $|\log_2FC| > 0,6$ pro C17.2 buňky. Data z čipové analýzy (MIAME, Minimum Information About a Microarray Experiment) byla uložena do databáze ArrayExpress (Kolesnikov et al. 2015) jako záznamy E-MTAB-4485 (NS-5 buňky) a E-MTAB-2975 (C17.2 buňky).

Pro analýzu exprese genu *DISP3* v lidských mozkových nádorech byla hrubá data (soubory CEL) získána z databáze ArrayExpress (Kolesnikov et al. 2015) záznamy E-GEOD-42658 (Henriquez et al. 2013a) a E-GEOD-21140 (Northcott et al. 2011b). K normalizaci a standardizaci dat jsme použili algoritmus RMA (Irizarry et al. 2003) implementovaný v balíčku oligo (Carvalho a Irizarry 2010) projektu Bioconductor (Gentleman et al. 2004; Huber et al. 2015) ve statistickém prostředí R. Porovnání intenzitních hodnot bylo uděláno pomocí t-testu a Wilcoxonova testu (Mann-Whitney U).

8.7 Imunodetekce proteinů (Western blot)

Buňky na 60 mm miskách, středně konfluentně narostlé, byly lyzovány ve 400 μ l lyzačního roztoku (60 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% glycerol a 5% 2-merkapt ethanol), inkubovány 5 minut při teplotě 95°C a sonikovány. Proteiny byly rozděleny metodou SDS-PAGE s použitím

4-15% předpřipravených gradientních polyakrylamidových gelů (Biorad) a přeneseny na nitrocelulózové membrány (Whatman). Membrány byly následně po dobu 1 hodiny blokovány v roztoku TBST (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), který obsahoval 5% odtučněné mléko. Poté byly membrány inkubovány přes noc při teplotě 4°C v primární protilátce (anti-DISP3 1:500 (Zíková et al. 2014); anti-aktin 1:500, Sigma; anti-GAPDH 1:2000, GeneTex) naředěné v roztoku 1% mléka v TBST. Po promytí byly membrány inkubovány s HRP-konjugovanou sekundární protilátkou (Anti-Rabbit IgG, GE Life Sciences; Anti-Mouse IgG, Cell Signaling). Pozitivní signál byl detekován pomocí ECL kitu (GE Life Sciences) a zobrazen pomocí rentgenových filmů (Agfa).

8.8 Regulace aktivity receptoru thyroideálních hormonů v NS-5 buňkách

Za účelem aktivace receptoru thyroideálních hormonů (THR) byly buňky NS-5 kultivovány 12 hodin v normálním růstovém médiu s různou koncentrací thyroideálního hormonu (T3 – Trijodthyronin, Sigma). Tato kultivace následovala po předchozí, 24 hodinové inkubaci buněk v médiu s kompetitivním inhibítoem THR (5×10^{-4} M, KB044146, poskytl M. R. Witt - KaroBio AB). Pro inhibici aktivity THR byly NS-5 buňky kultivovány 24 hodin v normálním růstovém médiu obsahujícím T3 (10^{-7} M) a doplněném o kompetitivní inhibitor THR KB044146 v různých koncentracích.

8.9 Stanovení rychlosti růstu buněk

Rychlost proliferace buněk byla stanovena metodou založenou na detekci množství radioaktivně značeného thymidinu inkorporovaného do nově vzniklé DNA („thymidine incorporation assay“). Buňky byly vysety do 96 jamkové destičky v koncentraci 4×10^3 (NS-5) nebo 3×10^3 (C17.2, D341 a DAOY) buněk na jamku. Po dvanácti hodinách byl k buňkám na dobu 8 hodin (NS-5) nebo 6 hodin (C17.2, D341 a DAOY) přidán [methyl- 3 H] thymidin (UJV Řež). Buňky byly následně přeneseny pomocí přístroje FilterMate Harvester (PerkinElmer) na Filtermat membránu (PerkinElmer). Množství inkorporovaného radioaktivně značeného thymidinu bylo kvantifikováno pomocí přístroje MicroBeta2 Microplate scintillation counter (PerkinElmer).

Kumulativní růstová křivka byla vytvořena na základě opětovného vysévání buněk na kultivační misky každý druhý den v koncentraci $1,5 \times 10^4$ buněk na cm^2 . Počet buněk byl vždy stanoven pomocí přístroje CASY Cell Counter and Analyzer System (Roche).

8.10 Analýza buněčného cyklu

Středně konfluentní NS-5 buňky kultivované ve standardním růstovém médiu byly sklizeny pomocí 0,025% trypsinu (trypsin/EDTA, Gibco) a fixovány v 70% etanolu. Po inkubaci buněk přes noc v -20°C a následném promytí v PBS byly buňky barveny po dobu 15 minut v roztoku obsahujícím 0,1% Triton X-100 v PBS, propidiumjodid ($20 \mu\text{g/ml}$, Sigma) a RNázu A ($200 \mu\text{g/ml}$, Thermo Scientific). Vzorky obarvených buněk byly analyzovány pomocí průtokového cytometru BD LSRII a výsledky byly vyhodnoceny v počítačovém programu FlowJo (FlowJo LLC) pomocí aplikace Watson pragmatic univariate analysis tool.

8.11 Stanovení buněčné senescence

NS-5 buňky byly kultivovány po dobu přibližně 30 dní, pasážovány každý druhý den a vysévány na misky v koncentraci přibližně $1,5 \times 10^4$ buněk/ cm^2 . Poté byly vysety na misky s krycím sklíčkem a po dvoudenní kultivaci byly buňky po promytí PBS fixovány pomocí 0,5% glutaraldehydu (Sigma). Po omytí buněk roztokem 1mM MgCl_2 v PBS byla krycí sklíčka s fixovanými buňkami inkubována 30 hodin při 37°C v barvicím roztoku (PBS, 1mM MgCl_2 , $5\text{mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5\text{mM K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ a X-Gal 1 mg/ml). Preparáty byly po obarvení zamontovány na podložní sklíčko v roztoku ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen). Reprezentativní obrázky byly snímány na mikroskopu Leica DM 6000B, pomocí kamery DFC490, s použitím počítačového programu LAS AF (Leica Microsystems). Získané snímky byly zpracovány v počítačovém programu ImageJ (Schneider et al. 2012).

8.12 Indukce a detekce apoptózy

Apoptóza byla indukována pomocí poškození buněk γ zářením. Jeden den před ozařováním byly buňky vysety v koncentraci $1,5 \times 10^4$ buněk/ cm^2 do T25 kultivačních lahvíček ve standardním růstovém médiu. Buňky byly ozářeny dávkou 0 Gy nebo 5 Gy na kobaltovém

ozářovači ^{60}Co (dávkový příkon 3,75 Gy/min), lahvičky byly umístěny ve vodním fantomu v 5 cm vody. Apoptóza byla měřena 24 hodin po ozáření pomocí průtokového cytometru Muse® Cell Analyzer (Merk Millipore) a za použití Muse® Caspase-3/7 Assay Kit (Merk Millipore) podle návodu výrobce.

8.13 Imunofluorescenční barvení

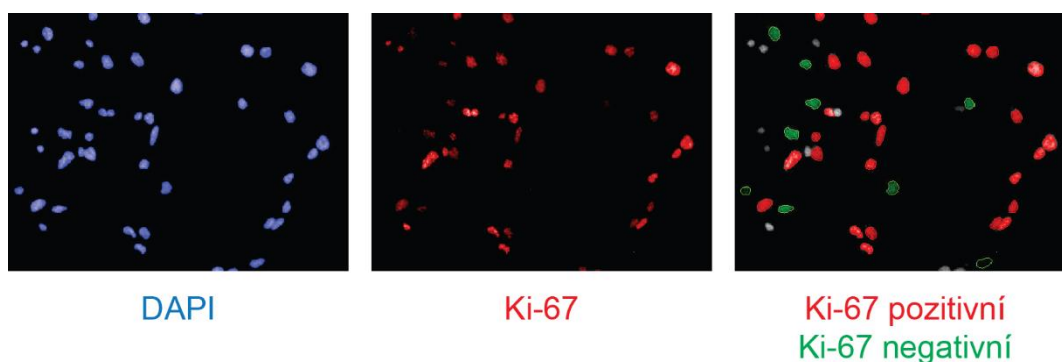
Buňky kultivované v misce na krycím sklíčku byly fixovány pomocí 4% paraformaldehydu, permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100 a 2 hodiny blokovány směsí 10% NGS (Normal Goat Serum, Jackson ImmunoResearch) a 5% BSA (Sigma). Poté byly buňky přes noc při teplotě 4°C inkubovány s primární protilátkou naředěnou v PBS s 1% BSA. Použité primární protilátky byly: rabbit polyclonal anti-DISP3 protilátka (1: 500, (Zikova et al. 2014), mouse monoclonal anti-GFAP protilátka (1:400, Sigma), mouse monoclonal anti- β III-tubulin protilátka (1: 1000, R & D Systems), mouse monoclonal anti-oligodendrocyte marker O4 protilátka (1:500, R&D Systems), mouse monoclonal Ki-67 protilátka (1:400, Diagnostic BioSystems) a mouse monoclonal anti-nestin protilátka (1:400, Millipore). Pro vizualizaci barvení byly inkubovány 1,5 hodiny při pokojové teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční značkou, která byla naředěná 1:1000 v PBS s 1% BSA. Použité sekundární protilátky byly: goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 sekundární protilátka (Invitrogen), goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 568 sekundární protilátka (Invitrogen), goat anti-Mouse IgM Alexa Fluor 555 sekundární protilátka (Invitrogen) a goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488 sekundární protilátka (Invitrogen). Pro vizualizaci proteinů nestin, GFAP a β III-tubulin v buňkách C17.2 byla použita goat anti-Mouse IgG Biotin sekundární protilátka (Invitrogen) a následně streptavidin konjugovaný s fluorescenční značkou Alexa Fluor 555 (Invitrogen). Jádra buněk byla obarvena pomocí DAPI (1:5000, Sigma). Preparáty byly zamontovány na podložní sklíčko v roztoku ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen). Reprezentativní obrázky byly snímány na mikroskopu Leica DM 6000B, pomocí kamery DFC350FX, s použitím počítačového programu LAS AF (Leica Microsystems). Získané snímky byly zpracovány v počítačovém programu ImageJ (Schneider et al. 2012).

8.14 Automatická a manuální obrazová analýza

imunofluorescenčně barvených buněk

Snímky sklíček s imunofluorescenčně obarvenými buňkami pro automatickou i manuální obrazovou analýzu byly pořízeny automatickým mikroskopem Operetta High Content Imaging System (PerkinElmer) při 20 násobném zvětšení za použití počítačového programu Harmony software (PerkinElmer). Automatická analýza obrazu byla provedena v počítačovém programu Columbus image analysis software (PerkinElmer).

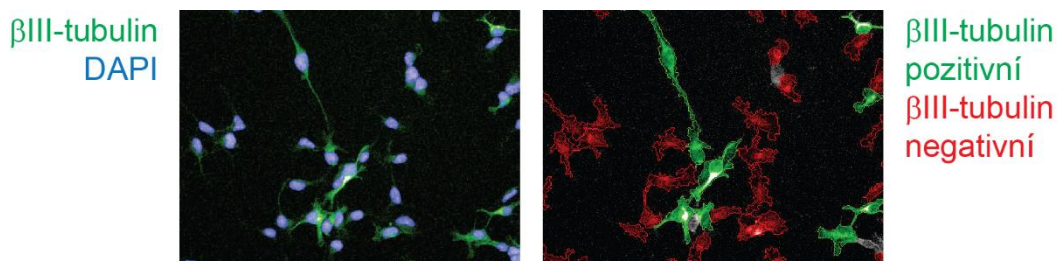
Relativní počet proliferujících NS-5 buněk byl určen na základě barvení jader buněk protilátkou proti Ki-67 antigenu. Analyzováno bylo minimálně 100 polí (přibližně 12600 buněk) pro každý nezávislý biologický replikát. Nejprve byla na základě barvení DAPI v programu Columbus nalezena jádra buněk (Obr. 12 vlevo), a tím byl i určen celkový počet buněk ve vzorku. Poté byla určena hranice intenzity barvení buněk protilátkou Ki-67, podle které program automaticky rozděloval buňky do dvou skupin, na Ki-67 pozitivní buňky (Obr. 12 vpravo, červená) a na Ki-67 negativní buňky (Obr. 12 vpravo, zelená). Následně byly buňky automaticky spočítány.



Obrázek 12. Vlevo a uprostřed: Mikroskopie buněk obarvených DAPI a protilátkou proti Ki-67 antigenu. Vpravo: Kvantifikace proliferujících, Ki-67 pozitivních, NS-5 buněk v počítačovém programu Columbus.

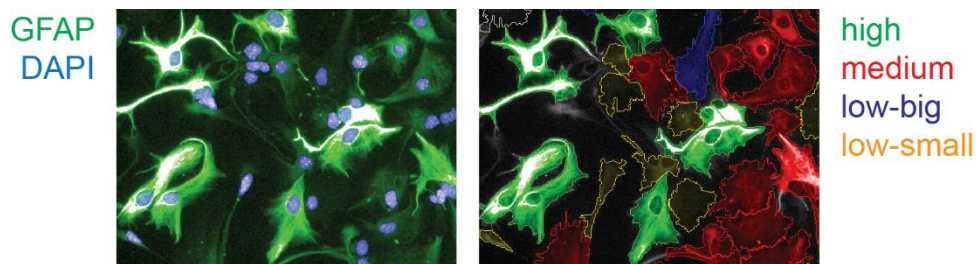
Relativní počet β III-tubulin pozitivních buněk byl stanoven na základě analýzy minimálně 50 polí (přibližně 8800 buněk) pro každý nezávislý biologický replikát. Nejprve byla na základě barvení DAPI v programu Columbus nalezena jádra buněk (Obr. 13 vlevo, modrá), a tím byl i určen celkový počet buněk ve vzorku. Poté byla programem Columbus u buněk na základě barvení protilátkou proti β III-tubulinu definována oblast cytoplazmy pomocí nástroje Find

Cytoplasm Tool. Buňky byly podle stanovené bazální intenzity barvení rozděleny do dvou skupin, na β III-tubulin pozitivní buňky (Obr. 13 vpravo, zelená) a na β III-tubulin negativní buňky (Obr. 13 vpravo, červená) a následně byly programem automaticky spočítány.



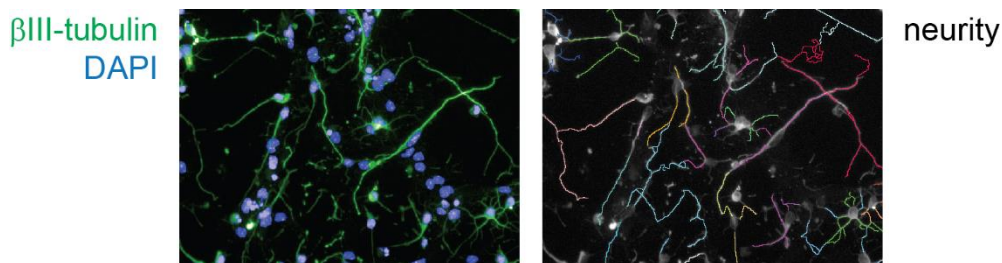
Obrázek 13. Vlevo: Mikroskopie buněk obarvených protilátkou proti β III-tubulinu a DAPI. Vpravo: Kvantifikace β III-tubulin pozitivních buněk v počítačovém programu Columbus.

Relativní počet vysoce diferencovaných astrocytů byl určen na základě analýzy minimálně 100 polí (přibližně 7500 buněk) pro každý nezávislý biologický replikát. Jádra buněk byla nalezena v programu Columbus na základě barvení DAPI (Obr. 14 vlevo, modrá), a tím byl i určen celkový počet buněk ve vzorku. Oblast cytoplazmy byla v programu Columbus u buněk automaticky definována pomocí nástroje Find Cytoplasm Tool, na základě barvení protilátkou proti GFAP proteinu (Obr. 14 vlevo, zelená). U buněk byly následně kvantifikovány vybrané parametry: intenzita fluorescence GFAP barvení v cytoplazmě, velikost cytoplazmy, kulatost buněk, poměr délky a šířky buněk, rozložení intenzity barvení v cytoplazmě, velikost jádra a maximum a minimum intenzity barvení. Po tréninku klasifikátoru program automaticky rozděloval a počítal buňky. Buňky byly rozděleny do čtyř skupin: „high“, „medium“, „low-big“ a „low-small“ (Obr. 14 vpravo). Ve skupině buněk pojmenované jako high se nacházely vysoce diferencované astrocyty s intenzivně barvenou cytoplazmou a hvězdovitým tvarem. Ve skupině medium se nacházely méně diferencované astrocyty s nižší intenzitou barvení a více kompaktním tvarem. Ve třetí skupině low-big byly buňky, u kterých došlo k diferenciaci a tudíž ke změně jejich velikosti a tvaru, ale barvení protilátkou proti GFAP bylo velice slabé. Ve skupině low-small se nacházely jen velice málo diferencované buňky, nebo buňky u kterých k diferenciaci do astrocytů nedošlo.



Obrázek 14. Vlevo: Mikroskopie buněk obarvených protilátkou proti GFAP a DAPI. Vpravo: Kvantifikace diferenciacce buněk do astrocytů v počítačovém programu Columbus.

Relativní počet neuritů na buňku byl stanoven na základě analýzy minimálně 50 polí (přibližně 8000 buněk) pro každý nezávislý biologický replikát. Jádra buněk byla definována v programu Columbus na základě barvení DAPI (Obr. 15 vlevo, modrá), a tím byl i určen celkový počet buněk ve vzorku. Neurity byly nalezeny v programu Columbus na základě barvení protilátkou proti β III-tubulinu (Obr. 15 vlevo, zelená) pomocí Neurite Finding Tool (CSIRO Neurite Analysis method, (Wang et al. 2010), Obr. 15 vpravo) a následně byly automaticky programem spočítány.



Obrázek 15. Mikroskopie buněk obarvených protilátkou proti β III-tubulinu a DAPI. Vpravo: Kvantifikace počtu neuritů na buňku v počítačovém programu Columbus.

Procenta neuronů v diferencované buněčné kultuře a počty primárních neuritů na neuron byly stanoveny v programu ImageJ manuální analýzou dvou polí (přibližně 300 buněk) pro každý nezávislý biologický replikát. Buňky s alespoň jedním výběžkem (neuritem) a s denzní cytoplazmou, která se intenzivně barvila protilátkou proti β III-tubulinu, byly označeny za diferencované neurony. Ostatní buňky nalezené pomocí barvení jader DAPI byly počítány jako nediferencované buňky. Primární neurity, výběžky odstupující přímo z těla neuronu bez ohledu

na další následné větvení, byly určeny na základě barvení protilátkou proti β III-tubulinu a následně byly v programu ImageJ pomocí aplikace Cell Counter manuálně spočítány.

8.15 Imunohistochemické barvení a mikroskopie

Mozky novorozených myši byly po disekci a promytí vychlazeným PBS fixovány přes noc ve 4% formaldehydu (Penta). Pro imunohistochemické barvení byly z myších mozků po zamontování do parafinu připraveny mikrotomem sagitální řezy silné 6 μ m, které byly přeneseny na podložní sklíčka SuperFrost Plus. Parafinové řezy meduloblastomů jsme získali od Dr. André O. von Buerena (Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany). Vzorky na sklíčkách byly deparafinovány, rehydratovány a následně povařeny 20 minut v 10mM citrátovém pufru, pH 6 za účelem optimalizace prezentace antigenu. Po promytí v PBS byla sklíčka 15 minut inkubována v 1% roztoku H_2O_2 v metanolu (blokace aktivity endogenních peroxidáz) a blokována 1 hodinu v roztoku 5% NGS (Jackson ImmunoResearch) v PBS. Poté byla sklíčka přes noc při teplotě 4°C inkubována s primární protilátkou. Použité primární protilátky byly: rabbit polyclonal anti-DISP3 protilátka (1: 500, Zikova et al. 2014), rabbit monoclonal Ki-67 (SP6) protilátka (1:100, Diagnostic BioSystems) a rabbit polyclonal Anti-PCNA protilátka (1:1000, abcam). Barvení bylo následně vizualizováno metodou avidin-biotin za použití ABC kitu (Vectastain) a diaminobenzidinu (DAB) jako chromogenu. Vzorky byly dobarveny hematoxylinem, reprezentativní obrázky byly snímány na mikroskopu Leica DM2000, s použitím počítačového programu LAS EZ (Leica Microsystems). Získané snímky byly zpracovány v počítačovém programu ImageJ (Schneider et al. 2012).

Proliferující buňky v mozečku novorozené myši obarvené protilátkou proti Ki-67 antigenu byly manuálně počítány v programu ImageJ s použitím aplikace Cell Counter. Analyzovány byly zpravidla dvě až tři myši ze dvou až tří nezávislých vrhů mláďat pro každou linii i věk. U každé myši byla hodnocena vybraná oblast (přibližně 300 buněk) ze tří řezů. Procenta Ki-67 pozitivních buněk byla stanovena na základě poměru mezi buňkami obarvenými protilátkou proti Ki-67 antigenu a buňkami Ki-67 negativními, které byly detekovány pomocí hematoxylinového barvení.

8.16 Experimentální zvířata, příprava transgenních myší

Chov myší, příprava transgenních jedinců i veškeré *in vivo* experimenty byly provedeny v souladu se směrnicí 2010/63/EU o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat a podle projektu pokusu schváleného rezortní komisí Ústavu molekulární genetiky AVČR (Ref. 24/2008 a 8/2016).

Za účelem vytvoření transgenních myší byla lidská varianta genu *DISP3* z plazmidu pF1KSDA1337 (Kazusa, FXC00806) vložena do PacI-PmeI místa PLP promotorové kazety, kterou nám laskavě poskytla prof. W. B. Macklin (School of Medicine Cell and Developmental biology, University of Colorado). Tato kazeta obsahuje první exon a první intron genu *Plp* (Fuss et al. 2000). Vzniklý konstrukt byl mikroinjektován do pronuklea oplodněného vajíčka myši kmene B6D2F1. Tato procedura byla provedena transgenní a reprodukční jednotkou v Curychu (Universitäts Spital Zürich). Transgenní myši byly po ověření přítomnosti vložené kazety pomocí PCR dále kříženy s myšmi kmene B6D2F1 a množeny. Popsaným způsobem byly připraveny dvě nezávislé PLP/DISP3 pozitivní linie transgenních myší tg#10 a tg#39. Genotypování myší probíhalo na vzorku genomové DNA izolované z konečku ocasu pomocí PCR a qPCR za použití primerů specificky rozpoznávajících lidskou variantu genu *DISP3* (Tab. 5).

HuDISP3_1	F: 5'-GAAGGAGATAGAACCATG-3'
	R: 5'-GCAGCCCAGGAAGAGCACC-3'
HuDISP3_2	F: 5'-CAAAAGCCCACAGCCAATCG-3'
	R: 5'-TACCGCCATTCTTGCTCAG-3'

Tabulka 5. Primery použité pro genotypování myší.

8.17 Zpracování výsledků a statistická analýza

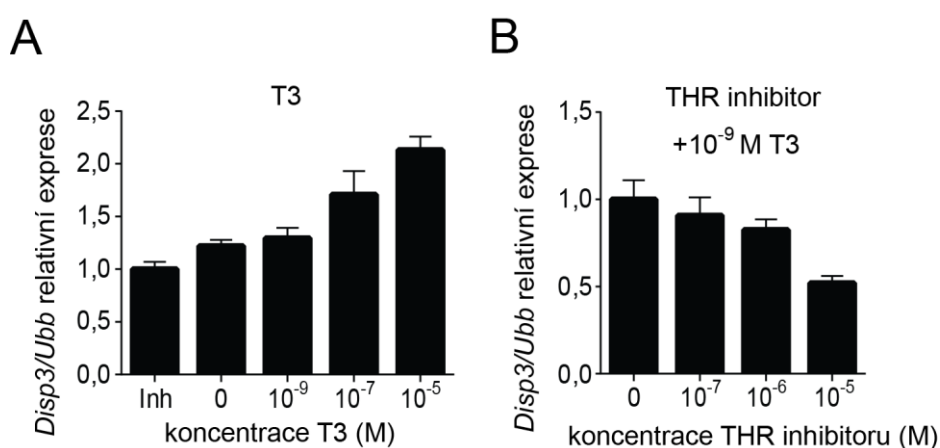
Získaná data byla zpracována pomocí počítačového programu Microsoft Excel 2013 (Microsoft) a následně pomocí programu GraphPad Prism (verze 6, GraphPad). V bodových grafech každý bod představuje nezávislý biologický replikát a středová úsečka značí aritmetický průměr. Ve sloupcových grafech je znázorněna hodnota aritmetického průměru analyzovaných vzorků. Chybové úsečky ukazují velikost směrodatné odchylky. Statistická signifikance výsledků určená v programu GraphPad Prism pomocí nepárového t-testu s Welchovou korekcí je v grafech znázorněna hvězdičkami *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, a ****P < 0,0001.

9 Výsledky

9.1 DISP3 v myších neurálních buňkách *in vitro*

9.1.1 Vliv thyroidního hormonu na expresi genu *Disp3*

Expresí genu *Disp3* je *in vitro* a také *in vivo* regulována pomocí receptoru thyroidních hormonů (THRA, Zikova et al. 2009). Z toho důvodu jsme se rozhodli sledovat vliv TH (trijodthyroninu, T3) na hladinu *Disp3* mRNA také v myších neurálních kmenových buňkách NS-5. Zjistili jsme, že přidání T3 do média vede k nárůstu exprese genu *Disp3* v buňkách NS-5 (Obr. 16A, Tab. 6) a naopak přítomnost kompetitivního THR inhibitoru KB044146 v médiu způsobuje pokles hladiny *Disp3* mRNA v NS-5 buňkách (Obr. 16B, Tab. 7).



Obrázek 16. Změna exprese genu *Disp3* v důsledku aktivace/inhibice THR v NS-5 buňkách.

Hladina *Disp3* mRNA byla stanovena metodou qPCR v NS-5 buňkách po přidání různých koncentrací T3 (A) nebo THR inhibitoru (B) do média. *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměry tří nezávislých vzorků a směrodatné odchylky.

	Inh	koncentrace T3 (M)			
		0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,070	1,22 ± 0,060	1,30 ± 0,096	1,71 ± 0,224	2,13 ± 0,127

Tabulka 6. Relativní hladina *Disp3* mRNA v NS-5 buňkách po přidání různých koncentrací T3 do média.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

	koncentrace THR inhibitoru (M)			
	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,110	0,91 ± 0,105	0,83 ± 0,060	0,52 ± 0,040

Tabulka 7. Relativní hladina *Disp3* mRNA v NS-5 buňkách po přidání různých koncentrací THR inhibitoru do média.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce je uveden průměr tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

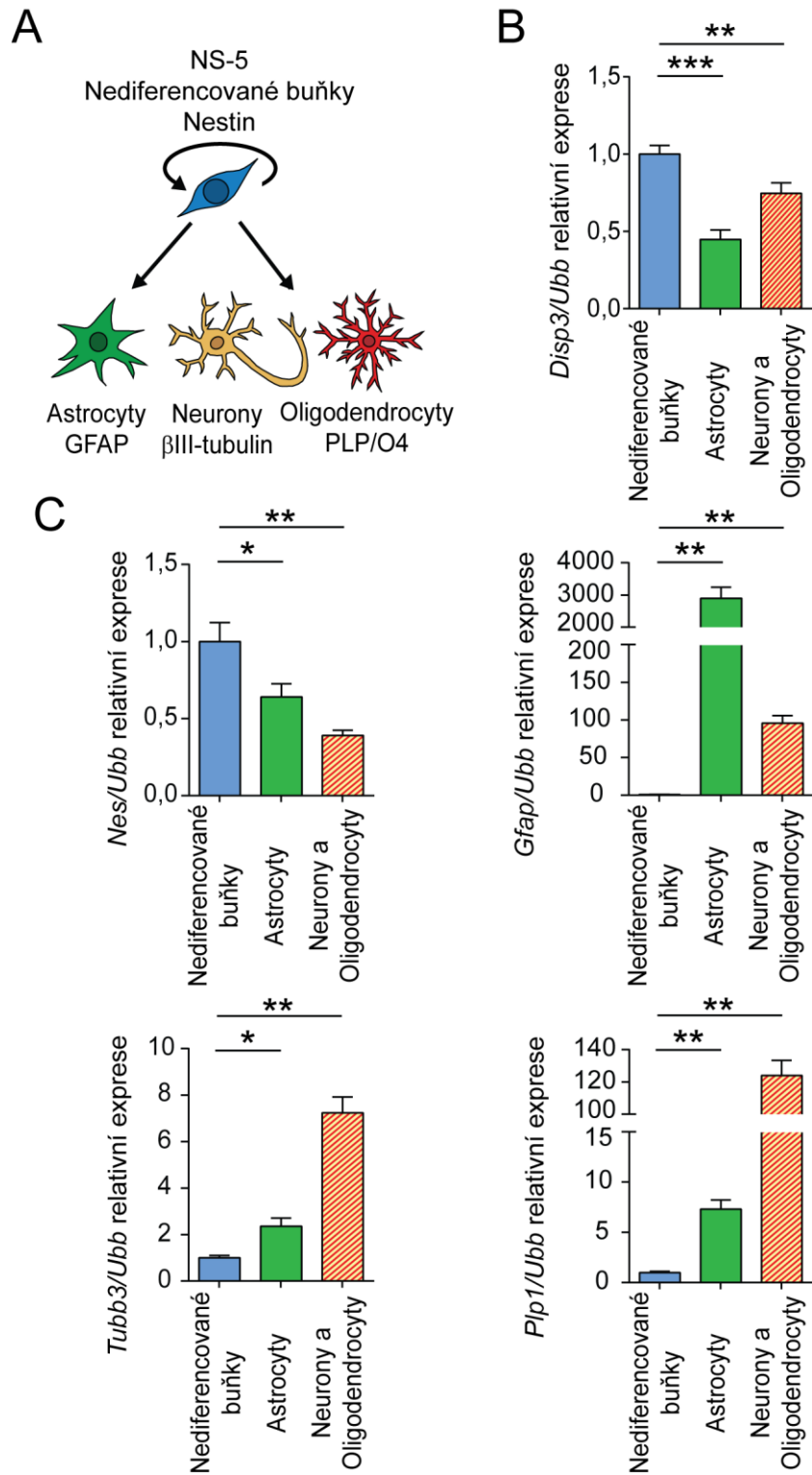
9.1.2 Změna exprese genu *Disp3* v důsledku diferenciaci neurálních kmenových buněk

NSC mají schopnost se měnit - diferencovat do tří základních neurálních buněčných typů: do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů. Diferenciaci buněk je možné hodnotit pomocí detekce exprese specifických genů, tzv. markerů. Nediferencované buňky exprimují nestin (gen *Nes*), jehož exprese v průběhu diferenciaci neurálních kmenových buněk klesá (Frederiksen a McKay 1988) a naopak dochází k nárůstu exprese markerů diferencovaných buněk. Za marker astrocytů je považován gen *Gfap* (Jacque et al. 1978), neurony exprimují neuronálně specifický βIII-tubulin (gen *Tubb3*, Lee et al. 1990) a oligodendrocyty je možné rozpoznat pomocí detekce exprese genu *Plp1* (Naismith et al. 1985), nebo pomocí O4 antigenu (Sommer a Schachner 1981, Obr. 17A).

Pro *in vitro* diferenciaci myších neurálních kmenových buněk NS-5 byly použity dva typy protokolů. Při použití prvního diferenciačního protokolu dochází k diferenciaci buněk do astrocytů, druhý postup podporuje vznik směsné kultury neuronů a oligodendrocytů. Vliv diferenciaci na expresi genu *Disp3* jsme sledovali pomocí qPCR. Porovnáním hladin mRNA *Disp3* v jednotlivých buněčných typech jsme zjistili, že v nediferencovaných buňkách je

hladina exprese *Disp3* v porovnání s diferencovanými buňkami výrazně vyšší. V astrocytech docházelo k poklesu hladiny mRNA *Disp3* až na přibližně polovinu oproti nediferencovaným buňkám. Ve směsné kultuře oligodendrocytů a neuronů nebyl zjištěný pokles hladiny mRNA tak silný, *Disp3* mRNA byla pouze na 75 procentech původní hladiny mRNA nediferencovaných buněk (Obr. 17B, Tab. 8). Diferenciaci buněk jsme ověřili pomocí qPCR detekce mRNA genů *Nes*, *Gfap*, *Tubb3* a *Plp1*. Množství mRNA genu *Nes*, typického především pro nediferencované buňky bylo u obou diferencovaných buněčných kultur nižší v porovnání s výchozí hladinou a naopak exprese genů *Gfap* typického pro astrocyty, *Tubb3* markeru neuronů a *Plp1* specifického pro oligodendrocyty byla v důsledku diferenciace buněk do příslušných buněčných typů výrazně zvýšena (Obr. 17C, Tab. 8).

Výsledky jsme dále potvrdili pomocí imunofluorescenčního barvení buněk polyklonální protilátkou proti DISP3 proteinu. Přítomnost proteinu DISP3 bylo možné pozorovat v cytoplazmě nediferencovaných buněk. Naopak po diferenciaci byla hladina, imunofluorescenčně barveného proteinu DISP3 v buňkách velice nízká a tento efekt byl nejvýraznější u astrocytů (Obr. 18). Diferenciaci buněk jsme ověřili pomocí imunofluorescenčního barvení buněčně-specifických markerů GFAP (astrocyty), β III-tubulin (neurony) a O4 (Oligodendrocyty, Obr. 18 vlevo).



Obrázek 17. Diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5.

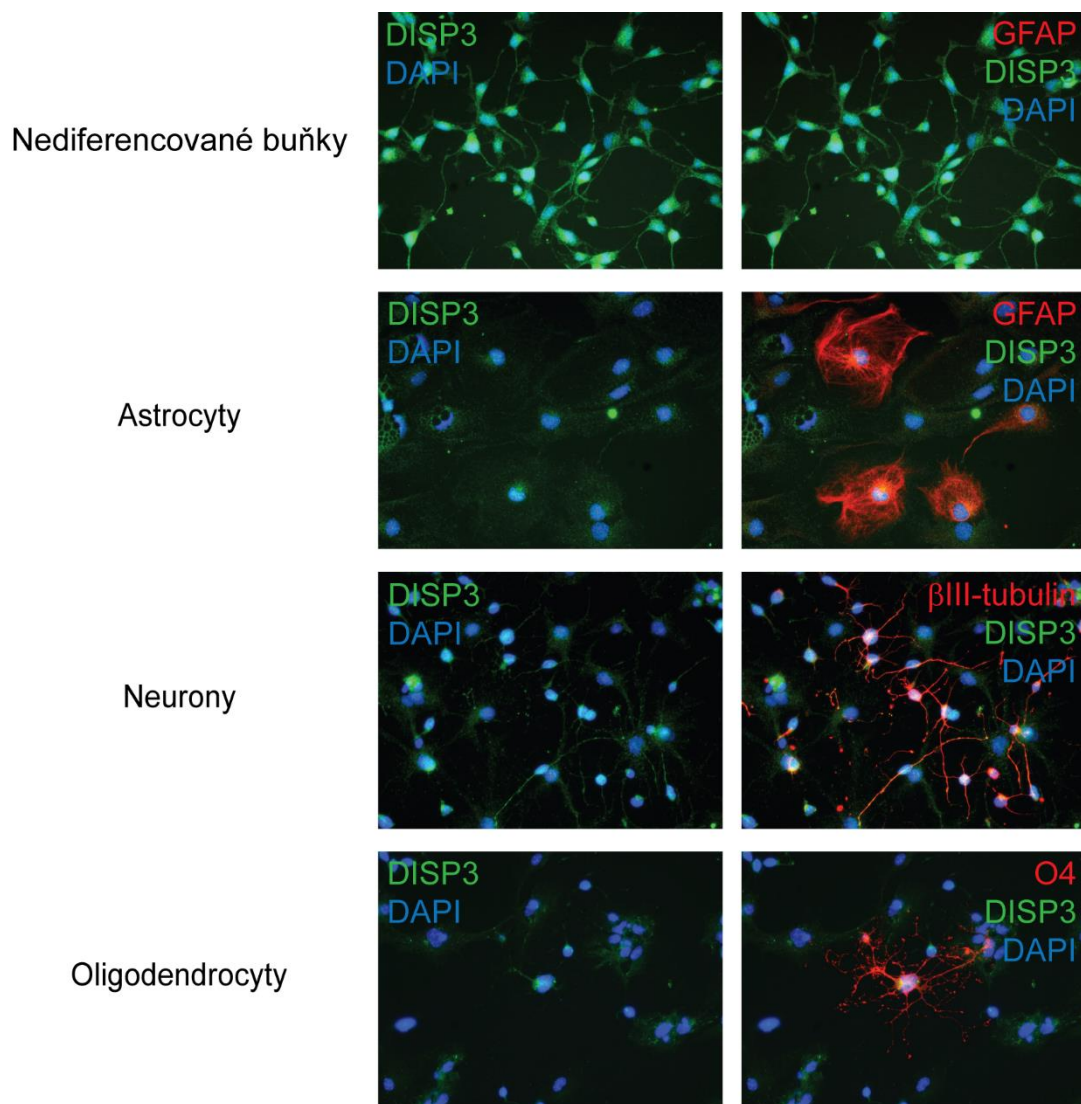
(A) Schématické znázornění diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 (buněčně-specifický marker nestin) do astrocytů (buněčně-specifický marker GFAP), neuronů (buněčně-specifický marker βIII-tubulin) a oligodendrocytů (buněčně-specifické markery gen *Plp1* a O4 antigen).

Disp3 mRNA (B) a *Nes*, *Gfap* *Tubb3* a *Plp1* mRNA (C) stanovená metodou qPCR v diferencovaných a nediferencovaných NS-5 buňkách. *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměry tří nezávislých vzorků, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (** P <0,01, *** P <0,001).

	Nediferencované buňky	Astrocyty	Neurony a Oligodendrocyty
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,056	0,45 ± 0,062	0,75 ± 0,068
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,123	0,64 ± 0,085	0,39 ± 0,033
<i>Gfap/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,223	2900 ± 337	95,7 ± 10,04
<i>Tubb3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,104	2,36 ± 0,357	7,23 ± 0,689
<i>Plp1/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,132	7,30 ± 0,914	123 ± 9,42

Tabulka 8. Relativní hladina mRNA genů *Disp3*, *Nes*, *Gfap* *Tubb3* a *Plp1* v diferencovaných a nediferencovaných NS-5 buňkách.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

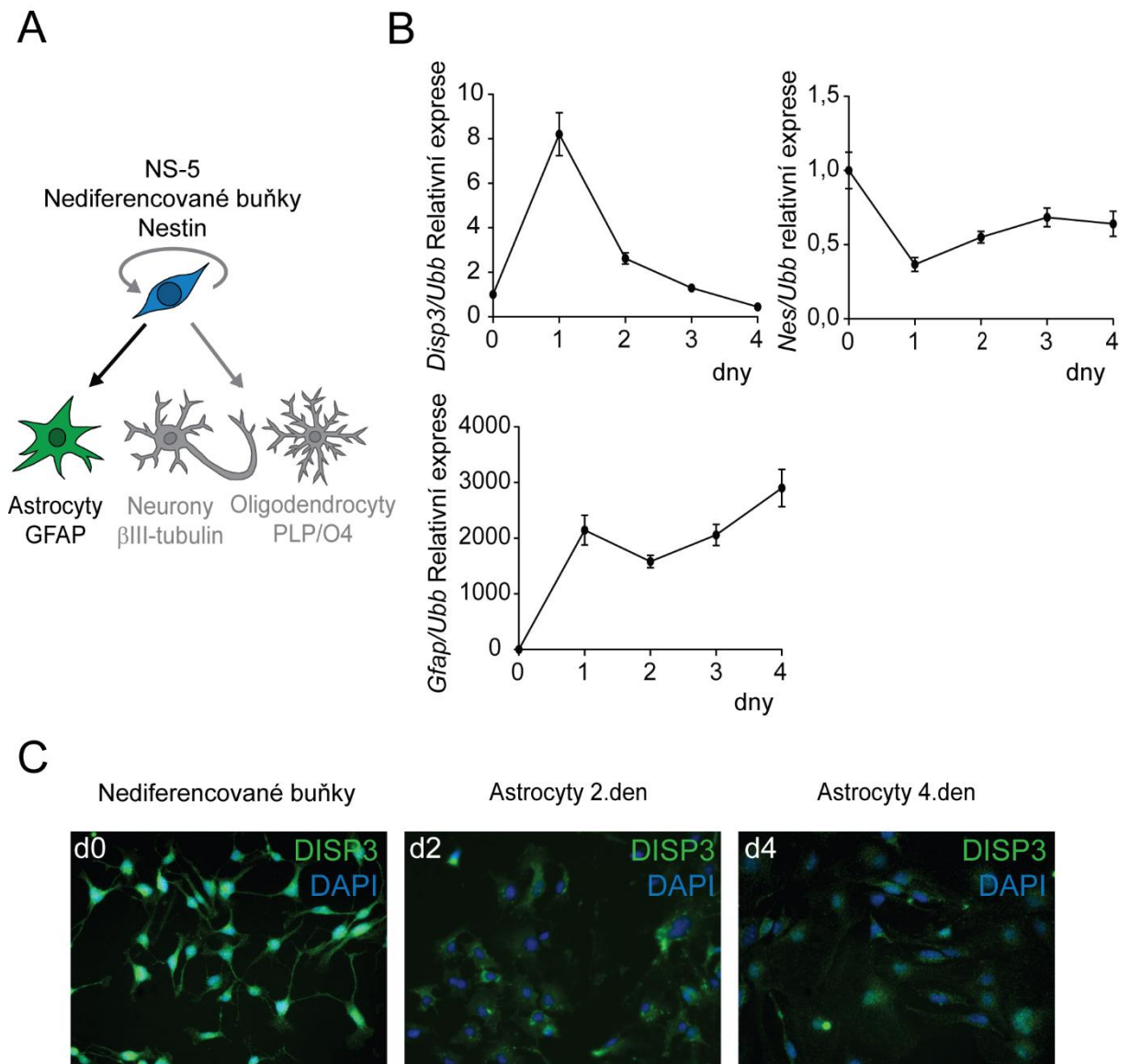


Obrázek 18. Protein DISP3 v diferencovaných a nediferencovaných NS-5 buňkách.

Imunofluorescenční barvení nediferencovaných a diferencovaných NS-5 buněk. Zeleně protein DISP3, červeně buněčně-specifické markery GFAP (astrocyty), β III-tubulin (neurony) a O4 (oligodendrocyty). DAPI (modrá) bylo použito pro obarvení buněčných jader.

Pro detailnější popsání změn exprese *Disp3* v myších neurálních kmenových buňkách NS-5 během diferenciaci jsme stanovili hladinu *Disp3* mRNA v různých časech během diferenciaci. NS-5 buňky byly diferencovány do astrocytů (Obr. 19A). Pomocí qPCR jsme pozorovali náhlý nárůst hladiny *Disp3* mRNA v buňkách první den po výměně média za diferenciaci, což už bylo v okamžiku kdy exprese markeru nediferencovaných buněk nestinu poklesla a naopak exprese markeru diferencovaných astrocytů *Gfap* začala stoupat. V dalších dnech *Disp3* mRNA už pouze klesala, a to až na přibližně polovinu původní exprese v nediferencovaných buňkách (Obr. 19B, Tab. 9). Zvýšení hladiny *Disp3* mRNA první den diferenciaci ale nebylo provázeno změnou na proteinové úrovni. Hladina proteinu vizualizovaného imunofluorescenčním značením byla vysoká v nediferencovaných buňkách a během diferenciaci pouze klesala (Obr. 19C). Velice podobný výsledek jsme získali i při použití druhého typu diferenciaci. Při diferenciaci NS-5 buněk do neuronů a oligodendrocytů (Obr. 20A) došlo nejprve k nárůstu hladiny *Disp3* mRNA a teprve poté k jejímu poklesu na přibližně 75 procent původní hladiny v nediferencovaných buňkách (Obr. 20B, Tab. 10). Množství proteinu DISP3 sledované pomocí imunofluorescenčního barvení v průběhu diferenciaci pouze klesalo (Obr. 20C).

Získané výsledky by se daly shrnout tak, že v porovnání s diferencovanými astrocyty, neurony nebo oligodendrocyty je exprese genu *Disp3* v nediferencovaných buňkách vyšší. Dále jsme zjistili, že ačkoliv množství *Disp3* mRNA v průběhu diferenciaci kolísá, hladina proteinu DISP3 během diferenciaci neurálních kmenových buněk NS-5 do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů pouze klesá.

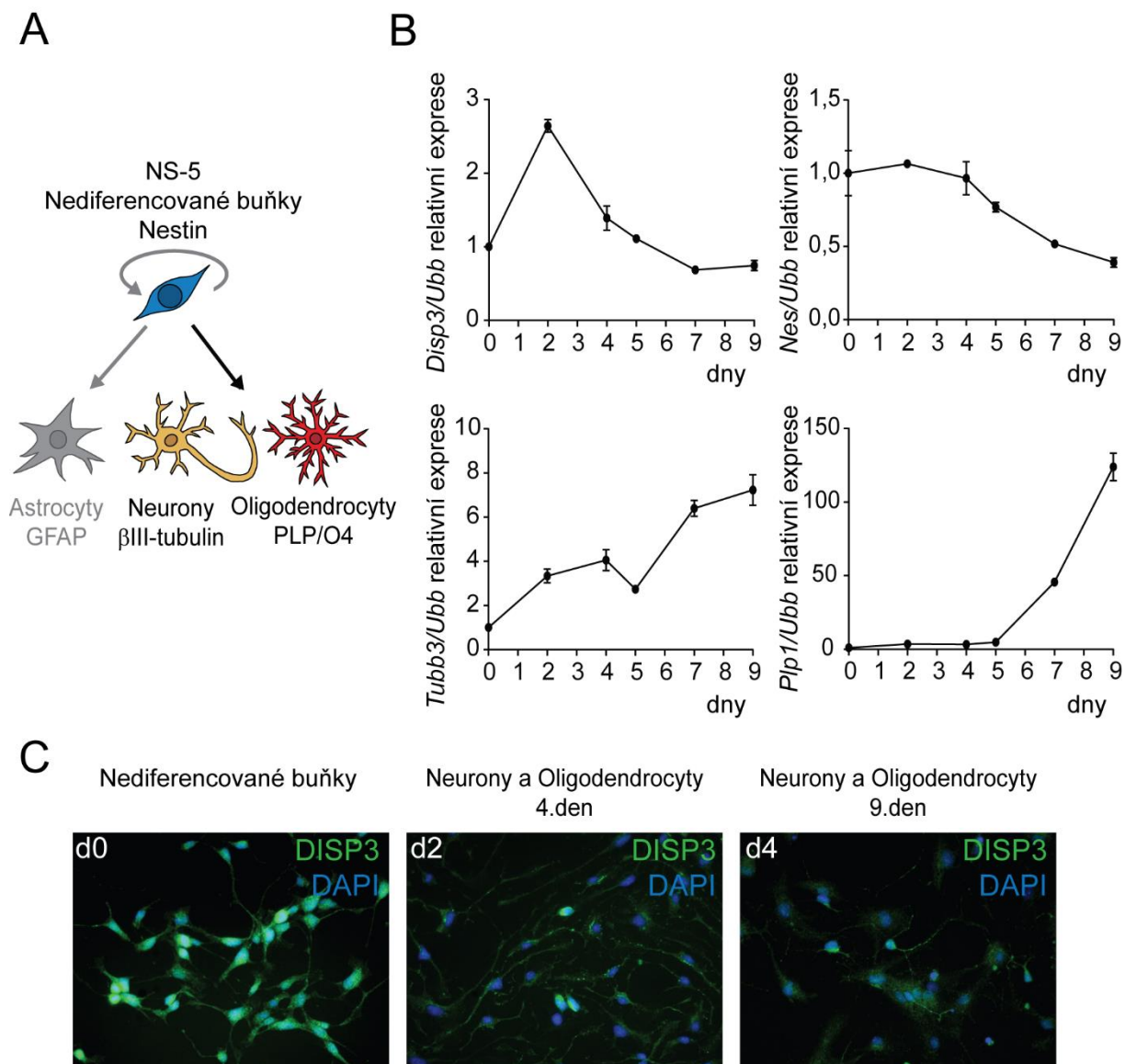


Obrázek 19. Změna exprese genu *Disp3* během diferenciace NS-5 buněk do astrocytů.

(A) Schématické znázornění diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 do astrocytů.

(B) Hladina *Disp3*, *Nes* a *Gfap* mRNA stanovená v průběhu diferenciace buněk do astrocytů metodou qPCR. *Ubb* byl použit jako referenční gen. V každém bodě je znázorněn průměr tří nezávislých vzorků a směrodatná odchylka.

(C) Imunofluorescenční barvení nediferencovaných NS-5 buněk a buněk během diferenciace do astrocytů. Zeleně protein DISP3, modře DAPI.



Obrázek 20. Změna exprese genu *Disp3* během diferenciaci NS-5 buněk do neuronů a oligodendrocytů.

(A) Schématické znázornění diferenciaci neurálních kmenových buněk NS-5 do neuronů a oligodendrocytů.

(B) Hladina *Disp3*, *Nes*, *Tubb3* a *Plp1* mRNA stanovená v průběhu diferenciaci buněk do neuronů a oligodendrocytů metodou qPCR. *Ubb* byl použit jako referenční gen. V každém bodě je znázorněn průměr tří nezávislých vzorků a směrodatná odchylka.

(C) Imunofluorescenční barvení nediferencovaných NS-5 buněk a buněk během diferenciaci do neuronů a oligodendrocytů. Zeleně protein DISP3, modře DAPI.

	Diferenciace do astrocytů (dny)				
	0	1	2	3	4
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,056	8,20 ± 0,972	2,62 ± 0,256	1,29 ± 0,106	0,45 ± 0,062
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,123	0,37 ± 0,046	0,55 ± 0,039	0,68 ± 0,063	0,64 ± 0,085
<i>Gfap/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,223	2144 ± 266	1581 ± 113	2059 ± 189	2900 ± 337

Tabulka 9. Relativní hladina mRNA genů *Disp3*, *Nes* a *Gfap* během diferenciace NS-5 buněk do astrocytů.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

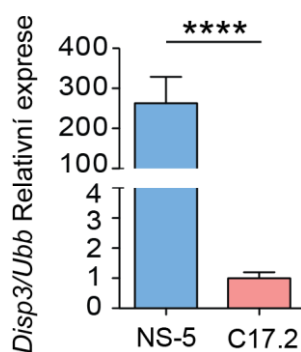
	Diferenciace do neuronů a oligodendrocytů (dny)					
	0	2	4	5	7	9
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,056	2,64 ± 0,084	1,39 ± 0,166	1,11 ± 0,049	0,69 ± 0,020	0,75 ± 0,068
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,155	1,06 ± 0,008	0,97 ± 0,112	0,77 ± 0,033	0,52 ± 0,013	0,39 ± 0,033
<i>Tubb3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,104	3,34 ± 0,313	4,05 ± 0,480	2,74 ± 0,182	6,39 ± 0,357	7,23 ± 0,689
<i>Plp1/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,132	3,61 ± 0,616	3,36 ± 0,451	4,82 ± 0,692	45,7 ± 1,95	123 ± 9,42

Tabulka 10. Relativní hladina mRNA genů *Disp3*, *Nes*, *Tubb3* a *Plp1* během diferenciace NS-5 buněk do neuronů a oligodendrocytů.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

9.1.3 Modulace exprese genu *Disp3* v neurálních buňkách

Za účelem studia role proteinu DISP3 v neurálních buňkách jsme připravili experimenty, ve kterých byla exprese genu *Disp3* v buňkách *in vitro* snížena nebo zvýšena. Pro tyto pokusy jsme zvolili dvě myší neurální buněčné linie. První z nich byla linie myších neurálních kmenových buněk NS-5, která má přirozeně relativně vysokou míru exprese genu *Disp3* a druhou zvolenou linií byla linie myších progenitorových buněk C17.2, ve které je naopak exprese genu *Disp3* velice nízká (Obr. 21, Tab. 11).



Obrázek 21. Expresse genu *Disp3* v neurálních buňkách NS-5 a C17.2.

Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znáznorněny jsou průměry tří nezávislých vzorků, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (**** P <0,0001).

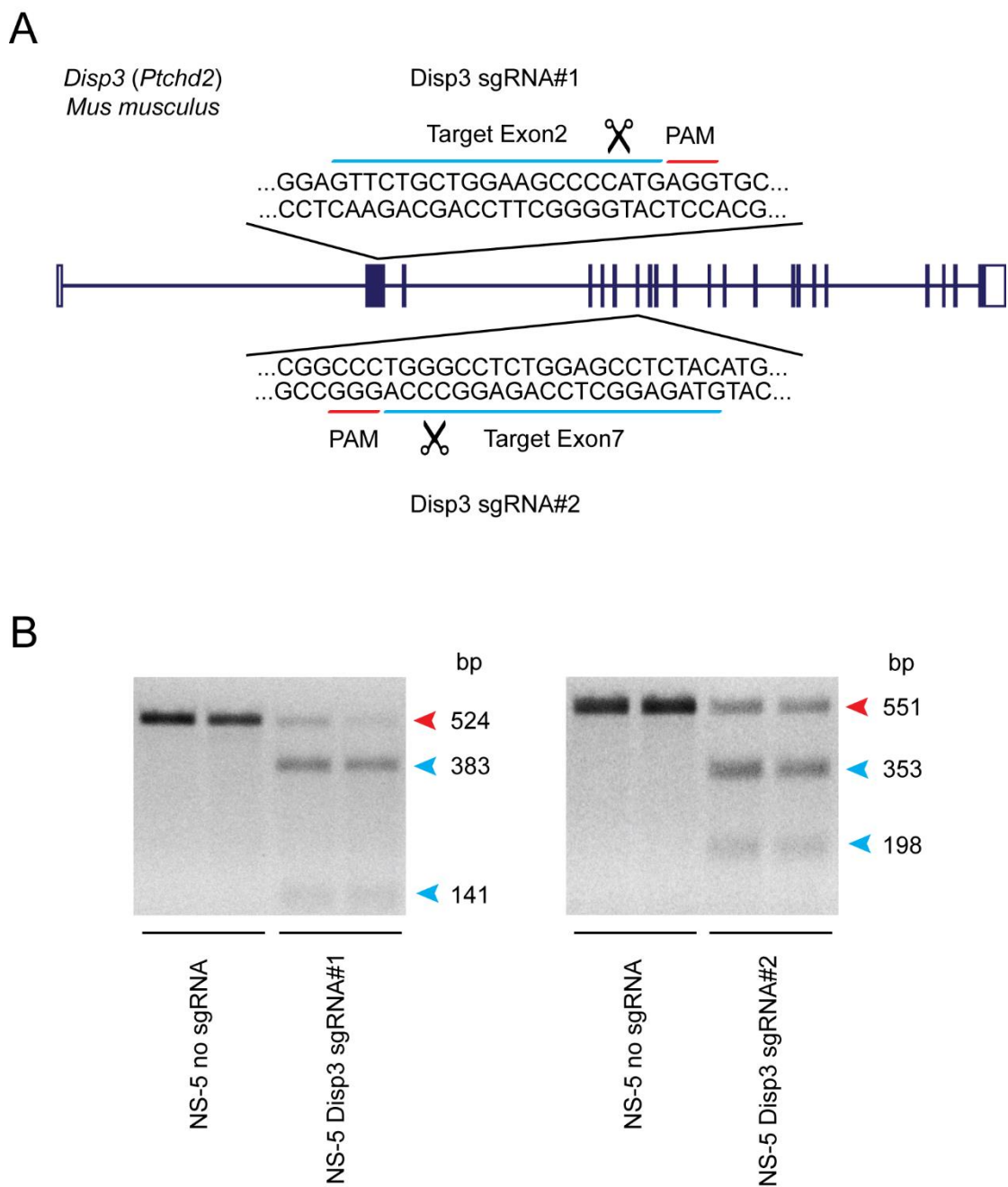
	<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD
NS-5	263 ± 65,6
C17.2	1,00 ± 0,203

Tabulka 11. Relativní hladina *Disp3* mRNA v NS-5 a C17.2 buňkách.

Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

V myších neurálních kmenových buňkách NS-5 byla exprese genu *Disp3* snížena pomocí CRISPR/Cas9 technologie. Pro vnášení mutací do genu *Disp3* byly navrženy dvě guide RNA (sgRNA). První z nich, *Disp3* sgRNA#1 cílí komplex Cas9 nukleázy s RNA do druhého exonu genu *Disp3*, druhá, *Disp3* sgRNA#2, je komplementární se sekvencí v sedmém exonu (Obr. 22A). NS-5 buňky byly infikovány lentiviry, které kódovaly Cas9 nukleázu a dále buď *Disp3* sgRNA#1 nebo *Disp3* sgRNA#2 nebo neobsahovaly žádnou sekvenci pro guide RNA. Po selekci buněk pomocí antibiotika puromycinu jsme získali tři typy buněčných linií. Buněčnou linii s mutacemi v druhém exonu genu *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1), buněčnou linii s mutacemi v sedmém exonu genu *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a kontrolní buněčnou linii (NS-5 no sgRNA), která měla gen *Disp3* bez mutací.

Přítomnost mutovaných alel genu *Disp3* v buněčné kultuře byla potvrzena metodou T7 endonuclease I assay, při které dochází ke štěpení PCR fragmentů s mutací pomocí endonukleázy T7 za vzniku dvou fragmentů menší velikosti (Obr. 22B). Softwarovou analýzou gelu jsme poté určili přibližné procentuální zastoupení mutovaných alel ve vzorku. Z výsledků vyplývá, že buňky NS-5 *Disp3* sgRNA#1 obsahovaly 86 až 89 procent mutovaných alel genu *Disp3* a buňky NS-5 *Disp3* sgRNA#2 obsahovali 76 procent mutovaných alel genu *Disp3* (Tab. 12). PCR fragment z buněk kontrolních (NS-5 no sgRNA) nebyl T7 endonukleázou štěpen (Obr. 22B).



Obrázek 22. Mutageneze genu *Disp3* CRISPR/Cas9 technologií v NS-5 buňkách.

(A) Schéma myšního genu *Disp3* se znázorněnými místy cílené mutageneze pomocí *Disp3* sgRNA vedené CRISPR/Cas9 endonukleázy. Rozpoznávaná sekvence 20 nukleotidů je označena modře a sousedící PAM sekvence je označena červeně.

(B) Potvrzení vzniku inzerčně-delečních mutací v genu *Disp3* metodou T7 endonuclease I assays v nezávislých buněčných kulturách infikovaných buď lentiviry s guide RNA (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) nebo bez guide RNA (NS-5 no sgRNA). Červená šipka znázorňuje pozici nemutovaného, neštěpeného fragmentu, modré šipky označují pozice fragmentů vzniklých štěpením mutované DNA.

	NS-5 Disp3 sgRNA#1		NS-5 Disp3 sgRNA#2	
Účinnost mutagenese	86 %	89 %	76 %	76 %

Tabulka 12. Účinnost mutagenese genu *Disp3* CRISPR/Cas9 technologií v NS-5 buňkách.

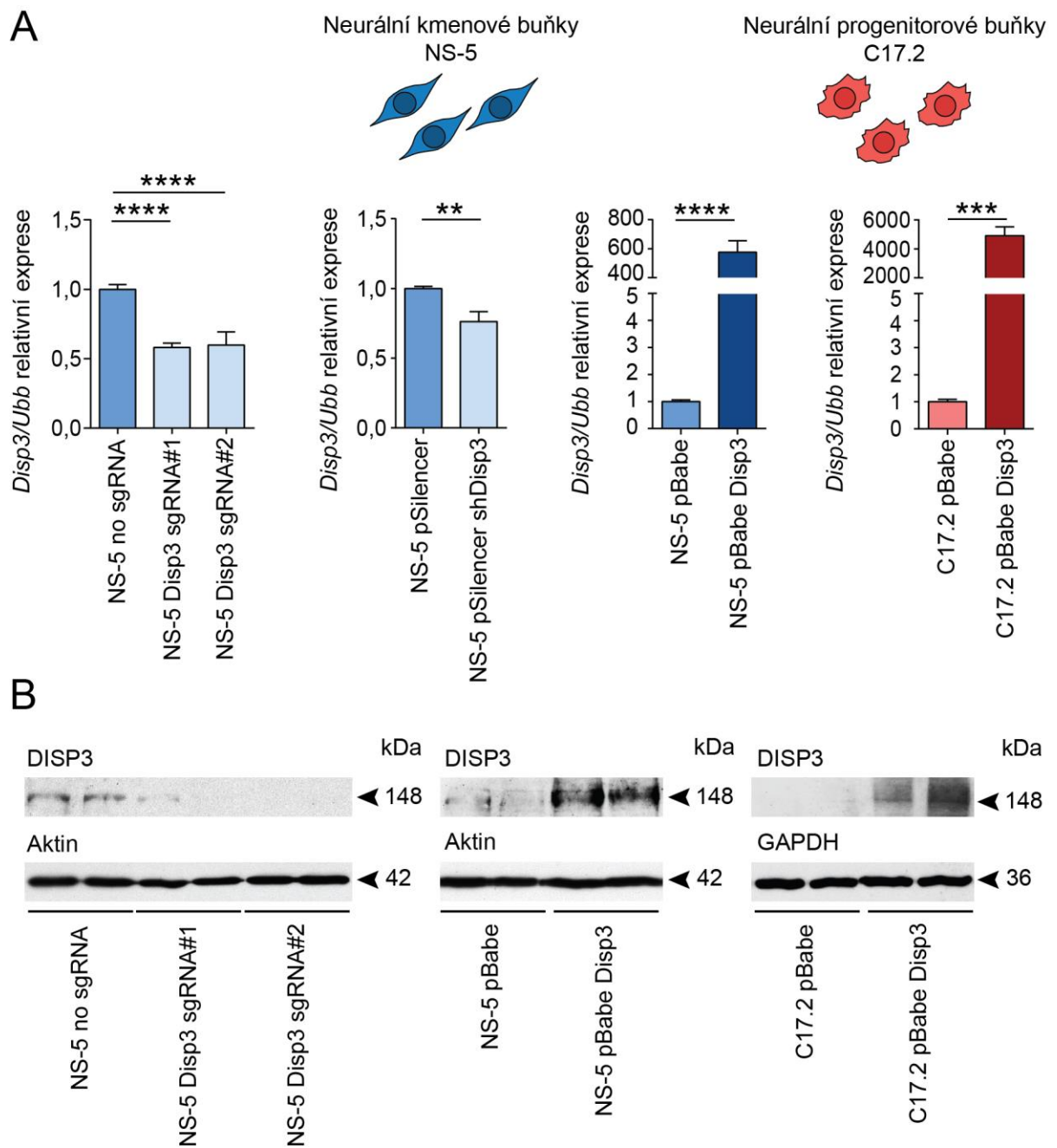
Procento mutovaných alel v nezávislých buněčných kulturách infikovaných lentiviry s guide RNA (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) bylo stanoveno programem ImageJ. Analyzovány byly fragmenty v gelu vzniklé štěpením PCR produktů T7 endonukleázou.

Kromě buněk NS-5 s CRISPR/Cas9 vnesenými mutacemi do genu *Disp3* jsme připravili také buňky NS-5 s expresí *Disp3* sníženou pomocí shRNA. Buňky byly transfekovány plazmidy pSilencer obsahujícími buď nekomplementární sekvenci (negativní kontrola: pSilencer) nebo jednu ze dvou sekvencí pro vznik shRNA modulující *Disp3* expresi (pSilencer shDisp3). Dále jsme také vytvořili buňky s nadexpresí genu *Disp3*. Jak neurální kmenové buňky NS-5 tak neurální progenitorové buňky C17.2 byly infikovány retroviry, které obsahovaly buď lidskou variantu genu *DISP3* exprimovanou pod konstitutivně aktivním promotorem (pBabe Disp3) nebo prázdný plazmid (pBabe) jako kontrolu.

Hladiny mRNA *Disp3* ve všech nově připravených liniích byly stanoveny pomocí qPCR (Obr. 23A, Tab. 13). První graf vlevo ukazuje, že NS-5 buňky s *Disp3* genem mutovaným pomocí CRISPR/Cas9 technologie (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) obsahovaly jen přibližně poloviční množství *Disp3* mRNA proti buňkám s nemutovanou variantou *Disp3* genu (NS-5 no sgRNA, Obr. 23A, Tab. 13). Tento efekt nastává pravděpodobně v důsledku degradace mRNA z mutovaného genu prostřednictvím NMD (nonsense-mediated decay) dráhy. Tato dráha je v buňkách aktivována přítomností mutované mRNA obsahující předčasný stop kodon (Baker a Parker 2004). V NS-5 buňkách, kde byla hladina *Disp3* mRNA snížena pomocí shRNA (druhý graf, NS-5 pSilencer shDisp3) nedocházelo k příliš významnému poklesu množství *Disp3* mRNA, jen přibližně na 76 procent hladiny mRNA v kontrolních buňkách (NS-5 pSilencer, Obr. 23A, Tab. 13). Třetí graf ukazuje zřetelné zvýšení *Disp3* mRNA v buňkách NS-5 po infekci retroviry nesoucími gen *DISP3* (NS-5 pBabe Disp3) proti buňkám kontrolním (NS-5 pBabe, Obr. 23A, Tab. 13). Na čtvrtém grafu je možné vidět, že v neurálních progenitorových buňkách C17.2 je efekt nadexprese *Disp3* ještě mnohem výraznější (C17.2 pBabe Disp3 oproti kontrolním C17.2 pBabe) než u NS-5 buněk (Obr. 23A, Tab. 13). To je ale především způsobeno rozdílem hladin *Disp3* mRNA v původních, neovlivněných, buňkách (Obr. 21, Tab. 11).

Množství proteinu DISP3 ve sledovaných buněčných liniích bylo určenou metodou Western blot (Obr. 23B) za použití králičí polyklonální protilátky generované proti vysoce konzervované C-terminální doméně proteinu DISP3 (Zikova et al. 2014). Tato analýza potvrdila, že došlo k ovlivnění exprese *Disp3* nejen na úrovni mRNA, ale také především na úrovni proteinu.

Provedené analýzy nás přesvědčily, že jsme schopni pomocí technologií CRISPR/Cas9, shRNA a retrovirální transdukce účinně modulovat expresi genu *Disp3* jak v neurálních kmenových buňkách NS-5 tak v neurálních progenitorových buňkách C17.2.



Obrázek 23. Změna exprese genu *Disp3* v modifikovaných buňkách NS-5 a C17.2.

(A) Množství *Disp3* mRNA stanovené metodou qPCR. NS-5 buňky infikované lentiviry s guide RNA (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) nebo bez guide RNA (NS-5 no sgRNA). NS-5 buňky transfekované plazmidem pSilencer obsahujícím buď nekomplementární, kontrolní sekvenci (NS-5 pSilencer) nebo sekvenci pro expresi shRNA cílenou na *Disp3* mRNA (NS-5 pSilencer sh*Disp3*). NS-5 buňky infikované retroviry nesoucími buď prázdný plazmid pBabe (NS-5 pBabe) nebo plazmid pBabe s genem *DISP3* (NS-5 pBabe *Disp3*). C17.2 buňky infikované retroviry nesoucími buď prázdný plazmid pBabe (C17.2 pBabe) nebo plazmid pBabe s genem *DISP3* (C17.2 pBabe *Disp3*). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměry nezávislých biologických replikátů, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (** P <0,01, *** P <0,001, **** P <0,0001).

(B) Změna hladiny proteinu DISP3 byla potvrzena metodou Wester blot. Aktin sloužil jako kontrola pro NS-5 buňky, GAPDH pro C17.2 buňky.

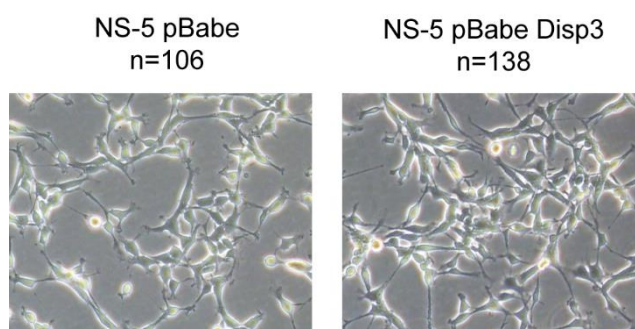
	NS-5 no sgRNA	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#1	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#2	NS-5 pSilencer	NS-5 pSilencer sh <i>Disp3</i>
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,035 (9)	0,58 ± 0,031 (8)	0,60 ± 0,096 (8)	1,00 ± 0,015 (2)	0,76 ± 0,071 (4)
	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>	C17.2 pBabe	C17.2 pBabe <i>Disp3</i>	
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,065 (7)	576 ± 78,9 (7)	1,00 ± 0,094 (4)	4915 ± 606 (4)	

Tabulka 13. Relativní hladina *Disp3* mRNA v buňkách se změněnou expresí genu *Disp3*.

Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD) a počet biologických replikátů (N).

9.1.4 Proliferace neurálních buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*

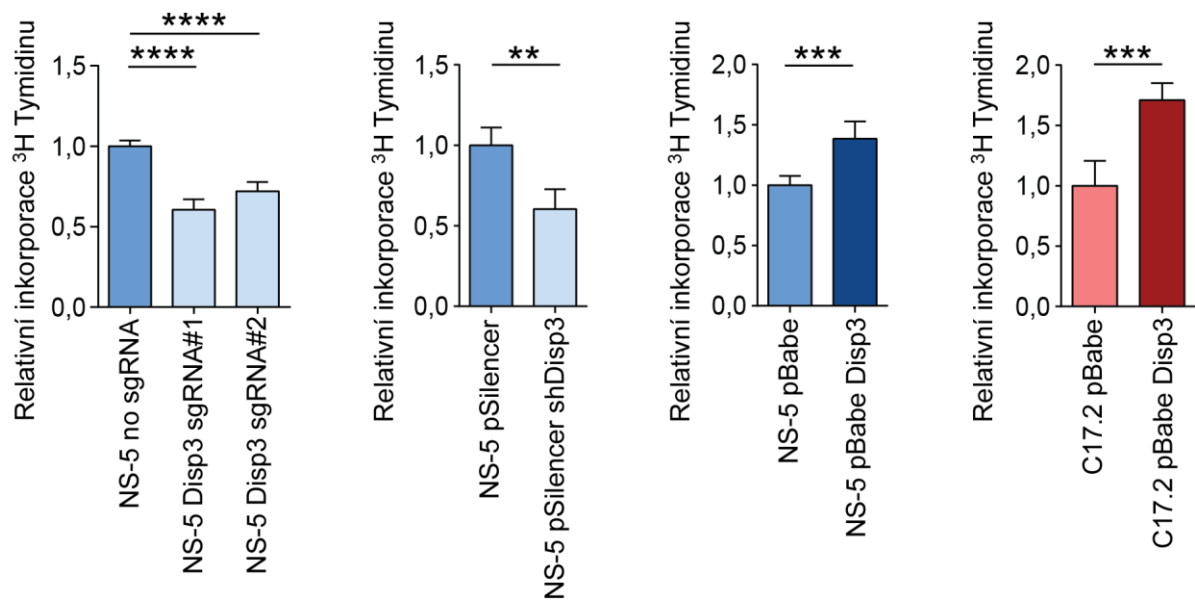
Při běžné kultivaci buněk jsme pozorovali, že NS-5 buňky s nadprodukcí DISP3 (NS-5 pBabe Disp3) rostou zřetelně rychleji než buňky kontrolní (NS-5 pBabe). Toto je možné také vidět na ilustračním obrázku č. 9. Zde byla na misky vyseta stejná množství kontrolních buněk a buněk s nadexpresí genu *Disp3*. Po následné kultivaci bylo možné ve vybraných, stejně velkých oblastech pozorovat 106 buněk kontrolních (NS-5 pBabe) a 138 buněk s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3, Obr. 24).



Obrázek 24. Růst NS-5 buněk s nadexpresí genu *Disp3*.

Reprezentativní obrázky ve fázovém kontrastu ukazující rozdíl v rychlosti růstu kontrolních buněk NS-5 (NS-5 pBabe, počet buněk v zobrazené oblasti je 106) a buněk s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3, počet buněk v zobrazené oblasti je 138).

Buněčnou proliferaci jsme se rozhodli kvantifikovat pomocí metody nazývané „thymidine incorporation assay“. Při této analýze je rychlost růstu buněk stanovena na základě množství radioaktivně značeného thymidinu inkorporovaného do nově vzniklé DNA. Rychlost proliferace buněk se měnila v závislosti na expresi genu *Disp3*. Jak u NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), tak i u NS-5 buněk se sníženou hladinou *Disp3* mRNA pomocí shRNA (NS-5 pSilencer sh*Disp3*) je možné pozorovat zpomalení proliferace na přibližně 60 procent ve srovnání s kontrolními buňkami (NS-5 no sgRNA, NS-5 pSilencer). Naopak buňky s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3* a C17.2 pBabe *Disp3*) rostou 1,4krát (NS-5) nebo 1,7krát (C17.2) rychleji než buňky kontrolní (NS-5 pBabe a C17.2 pBabe, Obr. 25, Tab. 14).



Obrázek 25. Proliferace buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*.

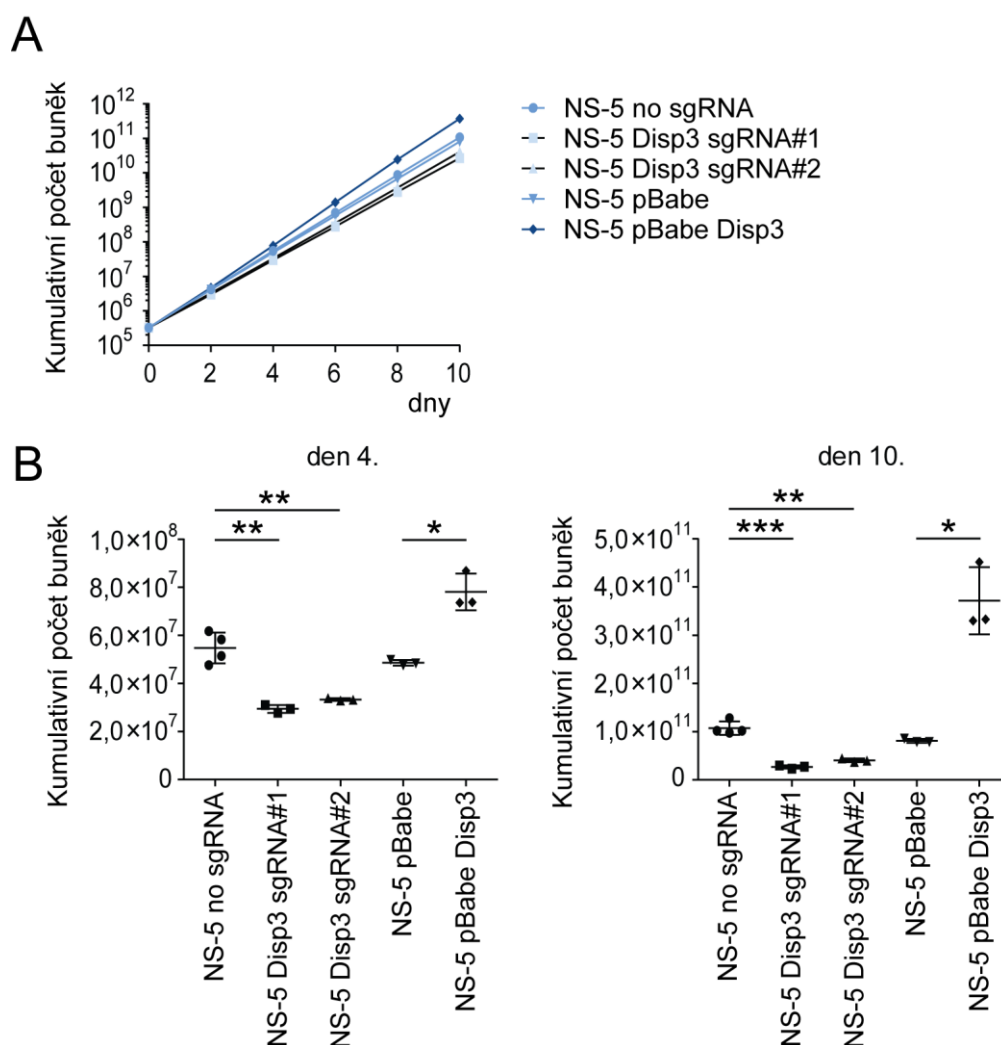
Rychlost proliferace NS-5 buněk a C17.2 buněk s mutací v genu *Disp3* (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2), se sníženou expresí genu *Disp3* (NS-5 pSilencer shDisp3) a se zvýšenou expresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3 a C17.2 pBabe Disp3) byla stanovena na základě měření inkorporace ³H Thymidinu do DNA. Znázorněny jsou průměry nezávislých biologických replikátů, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (** P <0,01, *** P <0,001, **** P <0,0001).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 Disp3 sgRNA#1	NS-5 Disp3 sgRNA#2	NS-5 pSilencer	NS-5 pSilencer shDisp3
Relativní inkorporace ³ H Thymidinu Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,036 (6)	0,60 ± 0,066 (5)	0,72 ± 0,057 (5)	1,00 ± 0,111 (3)	0,60 ± 0,124 (4)
	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe Disp3	C17.2 pBabe	C17.2 pBabe Disp3	
Relativní inkorporace ³ H Thymidinu Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,077 (7)	1,39 ± 0,142 (7)	1,00 ± 0,207 (6)	1,71 ± 0,143 (6)	

Tabulka 14. Relativní inkorporace ³H Thymidinu do DNA buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*.

V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD) a počet biologických replikátů (N).

Dále jsme se rozhodli sledovat rychlost růstu NS-5 buněk s *Disp3* sgRNA a NS-5 buněk s pBabe *Disp3* v delším časovém úseku. Buňky byly počítány každý druhý den a výsledky jsou uvedeny jako kumulativní počet buněk (Obr. 26A). Obrázek 26B a tabulka 15 ukazují názorněji výsledky pro dva vybrané dny, den čtvrtý a den desátý. Také tyto výsledky potvrzují, že buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) rostou pomaleji než buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA) a naopak buňky s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) rostou rychleji než buňky kontrolní (NS-5 pBabe).



Obrázek 26. Růst NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*.

(A) NS-5 buňky s mutací v genu *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) byly počítány každý druhý den a získané hodnoty jsou zde uvedeny jako kumulativní počet buněk. Znázorněny jsou průměry tří nezávislých biologických replikátů.

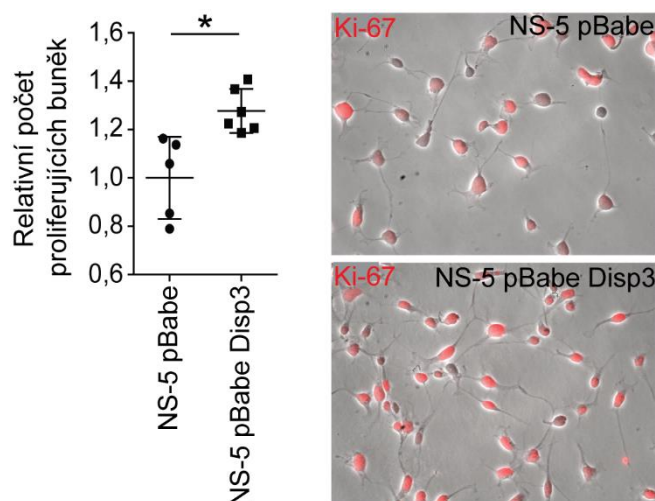
(B) Kumulativní počet buněk den 4. a den 10. Znázorněny jsou tři nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 Disp3 sgRNA#1	NS-5 Disp3 sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe Disp3
Kumulativní počet buněk den 4. Mean ± SD	$5,48 \times 10^7 \pm 6,41 \times 10^6$	$2,94 \times 10^7 \pm 1,61 \times 10^6$	$3,33 \times 10^7 \pm 0,52 \times 10^6$	$4,86 \times 10^7 \pm 1,15 \times 10^6$	$7,81 \times 10^7 \pm 7,60 \times 10^6$
Kumulativní počet buněk den 10. Mean ± SD	$1,07 \times 10^{11} \pm 1,39 \times 10^{10}$	$0,27 \times 10^{11} \pm 0,34 \times 10^{10}$	$0,41 \times 10^{11} \pm 0,36 \times 10^{10}$	$0,81 \times 10^{11} \pm 0,41 \times 10^{10}$	$3,72 \times 10^{11} \pm 6,96 \times 10^{10}$

Tabulka 15. Kumulativní počet NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* 4. a 10. den. V tabulce je uveden kumulativní počet buněk což je průměr hodnot tří nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

Předchozí výsledky jsme také potvrdili pomocí imunofluorescenční barvení buněk, při kterém jsme detekovali přítomnost antigenu Ki-67. Jaderný antigen Ki-67 se vyskytuje pouze v proliferujících buňkách (Gerdes et al. 1983). Ve srovnání s kontrolními buňkami (NS-5 pBabe Disp3), NS-5 buňky s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3) vykazovaly podstatně vyšší množství Ki-67 pozitivních buněk (Obr. 27 vpravo). Přesný počet Ki-67 pozitivních buněk byl určen pomocí automatické obrazové analýzy. Pro nasnímání vzorků a vyhodnocení dat jsme použili automatický mikroskop Operetta a program Columbus. Jako Ki-67 pozitivní byly počítány buňky s mírou intenzity fluorescence vyšší než byla stanovená bazální hladina. Také automatická obrazová analýza prokázala vliv *Disp3* exprese na buněčnou proliferaci, protože vzorek s nadexpresí *Disp3* obsahoval přibližně 1,3krát více Ki-67 pozitivních buněk než vzorek kontrolní (Obr. 27 vlevo, Tab. 16).

Celkově tyto výsledky ukazují, že zvýšená exprese genu *Disp3* podporuje růst buněk a naopak snížení exprese genu *Disp3* vede k poklesu proliferační aktivity buněk.



Obrázek 27. Relativní rychlost proliferace NS-5 buněk s nadexpresí genu *Disp3*.

Počet proliferujících buněk (Ki-67 obarvených) s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a buněk kontrolních (NS-5 pBabe) byl stanoven pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (* $P < 0,05$). Vpravo jsou reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení buněk NS-5 s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a buněk kontrolních (NS-5 pBabe) protilátkou Ki-67 (červeně).

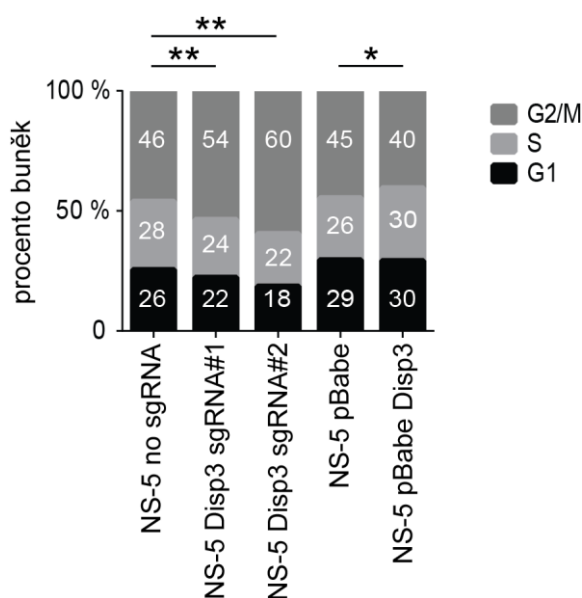
	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>
Relativní počet proliferujících buněk Mean \pm SD	1,00 \pm 0,169	1,28 \pm 0,091

Tabulka 16. Relativní počet proliferujících buněk s nadexpresí genu *Disp3*.

Pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus byly počítány Ki-67 pozitivní buňky. V tabulce jsou uvedeny průměry pěti nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.1.5 Buněčný cyklus NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*

Pro stanovení účinku *Disp3* exprese na průchod buněk buněčným cyklem jsme se rozhodli použít metodu průtokové cytometrie. Analýza buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu nám ukázala, že jak v důsledku mutace genu *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) tak i v důsledku jeho nadexprese (NS-5 pBabe *Disp3*) dochází u NS-5 buněk ke změně v distribuci buněk v rámci jednotlivých fází buněčného cyklu. Pro buňky s mutovaným genem *Disp3* platí, že proti kontrole (NS-5 no sgRNA) se zvyšuje jejich podíl v G2/M fázi. Naopak buněk s nadexpresí genu *Disp3* bylo v G2/M fázi proti kontrole (NS-5 pBabe) méně a jejich akumulaci můžeme pozorovat spíše v S fázi buněčného cyklu (Obr. 28, Tab. 17). Tyto výsledky tak ukazují, že modulace exprese genu *Disp3* zřejmě také může ovlivňovat buněčný cyklus.



Obrázek 28. Průchod NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* buněčným cyklem.

Distribuce NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), NS-5 buněk s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a NS-5 buněk kontrolních (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe) v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Buňky byly sledovány pomocí průtokové cytometrie. Každá hodnota je průměrem tří nezávislých biologických replikátů, znázorněna je úroveň statistické významnosti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 Disp3 sgRNA#1	NS-5 Disp3 sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe Disp3
Procento buněk v G2/M fázi Mean \pm SD	46,1 \pm 1,70	53,6 \pm 1,80	59,5 \pm 0,23	44,7 \pm 1,90	40,5 \pm 1,68
Procento buněk v S fázi Mean \pm SD	28,5 \pm 0,81	24,2 \pm 0,91	22,0 \pm 0,69	25,8 \pm 1,10	30,4 \pm 0,21
Procento buněk v G1 fázi Mean \pm SD	25,5 \pm 1,22	22,2 \pm 1,17	18,5 \pm 0,65	29,6 \pm 0,82	29,2 \pm 1,48

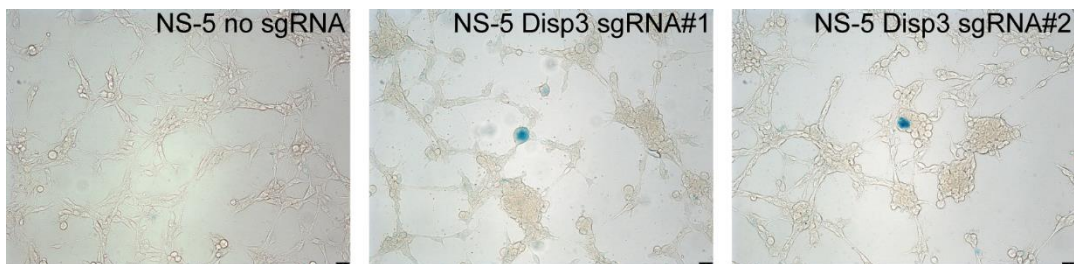
Tabulka 17. Procenta NS-S buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Procenta buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu byla stanovena pomocí průtokové cytometrie. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.1.6 Vliv změn v expresi genu *Disp3* na senescenci a apoptózu

Z předchozích výsledků je patrné, že gen *Disp3* má vliv na růst buněk a buněčný cyklus. Rozhodli jsme se proto stanovit zda tento gen ovlivňuje také buněčné stárnutí a smrt. Za tímto účelem jsme sledovali senescenci a apoptózu NS-5 buněk se změněnou expresí genu *Disp3*.

Senescentní buňky se od proliferujících buněk odlišují jak morfoloogicky tak i funkčně. Senescentní buňky jsou větší a produkují SA- β -galaktosidázu (senescence-associated β -galaktosidase), kterou lze detekovat histochemickým barvením. Přítomnost senescentních buněk byla stanovena v buněčné kultuře po dlouhé kultivaci. U buněk s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) je možné sporadicky pozorovat výskyt senescentních buněk (modrá), naopak u buněk kontrolních (NS-5 Disp3 no sgRNA) se takovéto buňky prakticky vůbec nevyskytují (Obr. 29).

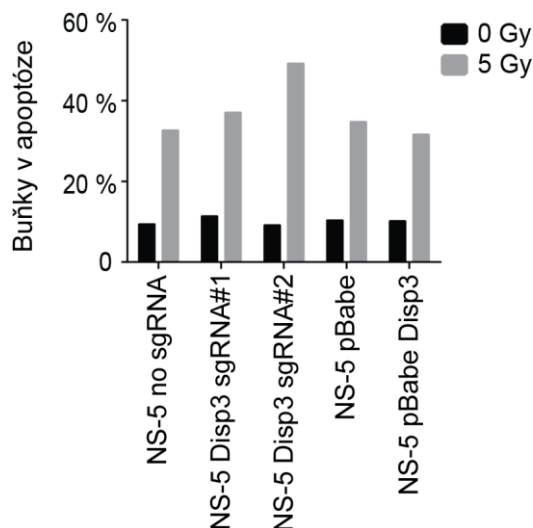


Obrázek 29. Přítomnost senescence v buněčné kultuře s mutovaným genem *Disp3*

NS-5 buňky s mutací v genu *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA) byly po prodloužené kultivaci testovány na přítomnost SA- β -galaktosidázy. Senescentní buňky byly vizualizovány pomocí X-Gal barvení (modrá).

V dalším experimentu jsme se rozhodli sledovat u NS-5 buněk buněčnou smrt - apoptózu. Apoptózu jsme indukovali pomocí poškození buněk γ zářením. NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) byly stejně jako buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe) ozářeny dávkou 0 Gy nebo 5 Gy na kobaltovém ozařovači (^{60}Co). Apoptóza byla stanovena po jednom dni od ozáření na základě aktivace kaspáz 3 a 7 pomocí průtokové cytometrie. Ze získaných výsledků vyplývá, že u neozařených buněk je procento apoptotických buněk velice nízké a u všech linií srovnatelné (Obr. 30 černá, Tab. 18 horní řádek). Ozářené buňky s mutovaným genem *Disp3* ale mají v apoptóze více procent buněk (37 % a 49 %) než buňky kontrolní (33 %). Naopak u buněk s nadexpresí genu *Disp3* je možné pozorovat lehké snížení procenta apoptotických buněk v kultuře po ozáření (32 %) v porovnání s kontrolou (35 %, Obr. 30 šedá, Tab. 18 spodní řádek).

Tyto výsledky jsou pouze předběžné a budou na ně navazovat další pokusy, které už nejsou součástí předkládané práce. Z toho důvodu byl tento experiment proveden pouze jednou bez biologických replikátů a tudíž u těchto výsledků není uvedena směrodatná odchylka ani úroveň statistické významnosti.



Obrázek 30. Apoptóza NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*.

Po ozáření NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2), buněk s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3) a buněk kontrolních (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe) dávkou 0 nebo 5 Gy byl počet apoptotických buněk stanoven pomocí průtokové cytometrie. Pro každou hodnotu byl měřen jeden biologický replikát.

	NS-5 no sgRNA	NS-5 Disp3 sgRNA#1	NS-5 Disp3 sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe Disp3
Procento apoptotických buněk, 0 Gy	9,45	11,35	9,20	10,40	10,20
Procento apoptotických buněk, 5 Gy	32,65	37,10	49,20	34,80	31,60

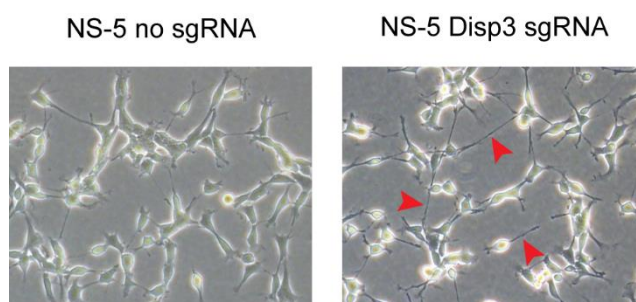
Tabulka 18. Procenta apoptotických NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* po ozáření.

Procenta apoptotických buněk byla stanovena pomocí průtokové cytometrie na základě barvení kaspáz 3 a 7. V tabulce je uvedena vždy hodnota jednoho měřeného biologického replikátu.

9.1.7 Spontánní diferenciacie neurálních buněk v důsledku modulace exprese genu

Disp3

U nediferencovaných neurálních buněk prokázaly předchozí výsledky vliv exprese genu *Disp3* na růst buněk, buněčný cyklus a buněčnou smrt. Dále jsme se u těchto buněk zaměřili na schopnost udržet si za normálních růstových podmínek kmenovost, tj. schopnost sebeobnovy bez známek spontánní diferenciacie. Při porovnání kontrolních buněk NS-5 (NS-5 no sgRNA) a buněk s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA) bylo možné pozorovat u buněk s modifikovaným genem *Disp3* morfologické změny (Obr. 31). Tyto buňky měly jiný tvar a prodloužené výběžky (Obr. 31 červené šipky). To naznačovalo, že u buněk mutovaným genem *Disp3* dochází během kultivace k postupné spontánní diferenciaci do neuronů.

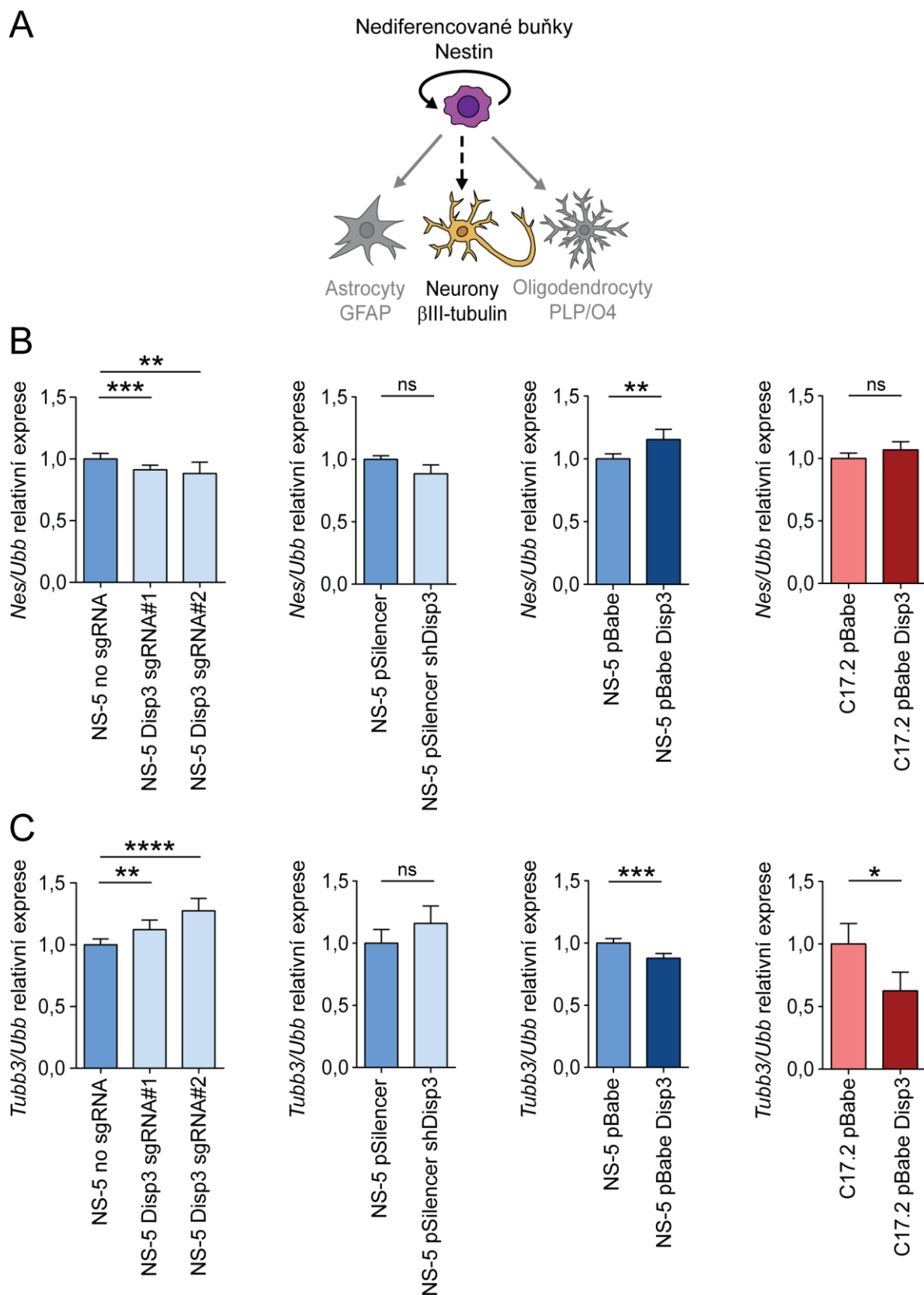


Obrázek 31. Morfologie NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3*.

Změna tvaru nediferencovaných NS-5 buněk v důsledku mutace v genu *Disp3*. Reprezentativní obrázky (fázový kontrast) buněk kontrolních (NS-5 no sgRNA) a buněk s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA), u kterých je možné pozorovat přítomnost prodloužených výběžků (červené šipky).

U nediferencovaných neurálních kmenových a progenitorových buněk může docházet k tomu, že některé z nich i za běžných kultivačních podmínek v médiu podporujícím jejich růst ztrácí svou schopnost symetrického dělení a sebeobnovy. Tyto buňky spontánně, bez vlivu vnějších faktorů, diferencují a to především do neuronů (Obr. 32A). Toto se projeví nejen na změně morfologie buněk, ale také na expresi specifických buněčných markerů. U buněk v kultuře tak dochází k poklesu exprese nestinu (*Nes*, marker nediferencovaných buněk, Frederiksen a McKay 1988) a naopak se zvyšuje hladina neuron specifického genu *Tubb3* (β III-tubulin, marker neuronů, Lee et al. 1990).

Výsledky qPCR analýzy exprese nestinu a β III-tubulinu ukázaly, že změna v expresi genu *Disp3* má vliv na hladinu mRNA těchto genů. NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a NS-5 buňky se sníženou hladinou *Disp3* mRNA pomocí shRNA (NS-5 pSilencer sh*Disp3*) obsahují méně *Nes* mRNA (Obr. 32B vlevo, Tab. 19 horní řádek), a to přibližně 90 procent množství detekovaného v buňkách kontrolních (NS-5 *Disp3* no sgRNA a NS-5 pSilencer) a naopak přibližně 1,2krát více *Tubb3* mRNA (Obr. 32C vlevo, Tab. 20 horní řádek). Opačný trend je možné pozorovat u buněk s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3* a C17.2 pBabe *Disp3*). Tyto buňky mají proti kontrolám (NS-5 pBabe a C17.2 pBabe) hladinu nestinu slabě zvýšenou (Obr. 32B vpravo, Tab. 19 dolní řádek) a hladinu β III-tubulinu sníženou přibližně na 90 procent (NS-5) nebo 60 procent (C17.2, Obr. 32C vpravo, Tab. 20 dolní řádek).



Obrázek 32. Spontánní diferenciace buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*.

(A) Schématické znázornění spontánní diferenciace neurálních buněk (buněčně-specifický marker nediferencovaných buněk nestin) do neuronů (buněčně-specifický marker βIII-tubulin).

Hladiny *Nes* mRNA, (B) a *Tubb3* mRNA (C) byly stanoveny metodou qPCR v NS-5 a C17.2 buňkách s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), se sníženou expresí genu *Disp3* (NS-5 pSilencer sh*Disp3*) a se zvýšenou expresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3* a C17.2 pBabe *Disp3*). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměry nezávislých biologických replikátů, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, **** P <0,0001).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#1	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#2	NS-5 pSilencer	NS-5 pSilencer sh <i>Disp3</i>
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,044 (8)	0,91 ± 0,038 (8)	0,88 ± 0,091 (8)	1,00 ± 0,029 (2)	0,88 ± 0,071 (3)
	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>	C17.2 pBabe	C17.2 pBabe <i>Disp3</i>	
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,040 (7)	1,15 ± 0,080 (7)	1,00 ± 0,042 (4)	1,07 ± 0,065 (4)	

Tabulka 19. Relativní hladina *Nes* mRNA v nediferencovaných buňkách.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD) a počet biologických replikátů (N).

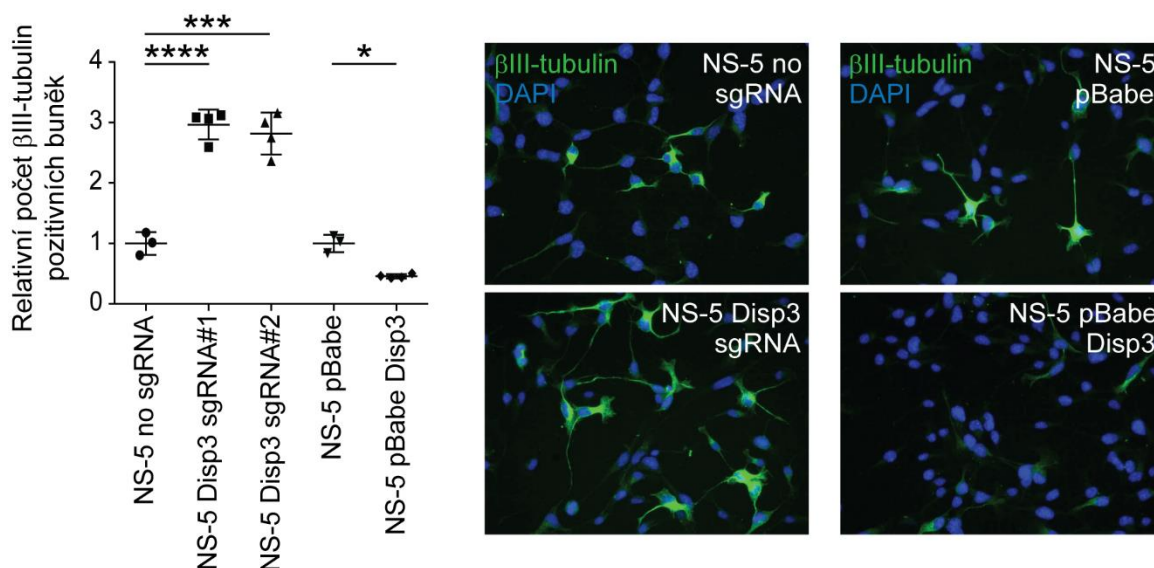
	NS-5 no sgRNA	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#1	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#2	NS-5 pSilencer	NS-5 pSilencer sh <i>Disp3</i>
<i>Tubb3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,048 (8)	1,12 ± 0,078 (8)	1,27 ± 0,10 (8)	1,00 ± 0,110 (2)	1,16 ± 0,140 (4)
	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>	C17.2 pBabe	C17.2 pBabe <i>Disp3</i>	
<i>Tubb3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD (N)	1,00 ± 0,036 (5)	0,88 ± 0,038 (6)	1,00 ± 0,163 (4)	0,62 ± 0,151 (4)	

Tabulka 20. Relativní hladina *Tubb3* mRNA v nediferencovaných buňkách.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD) a počet biologických replikátů (N).

Výsledky získané metodou qPCR jsme se rozhodli potvrdit pomocí mikroskopie. NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), NS-5 buňky s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe) byly imunofluorescenčně obarveny protilátkou proti β III-tubulinu a nasnímány automatickým mikroskopem Operetta. Pro analýzu získaných dat byl použit program Columbus, pomocí kterého jsme určili relativní zastoupení β III-tubulin pozitivních buněk v populaci. Počítány byly buňky, u kterých intenzita fluorescence překročila zvolenou bazální hladinu a jejich množství bylo normalizováno na celkový počet buněk stanovený pomocí barvení jader DAPI. Tímto způsobem jsme zjistili, že v populaci buněk s mutovaným genem *Disp3* je možné pozorovat až třikrát více β III-tubulin pozitivních buněk než v populaci buněk kontrolních. Opačný efekt má nadexprese genu *Disp3*. Počet β III-tubulin pozitivních buněk u této populace totiž klesá na přibližně polovinu v porovnání s kontrolou (Obr. 33, Tab. 21). Vliv modulace exprese genu *Disp3* na NS-5 buňky je možné vidět také na ilustračním obrázku (Obr. 33 vpravo).

Výsledky získané jak pomocí qPCR tak pomocí automatické obrazové analýzy nám ukazují, že pokles *Disp3* exprese u neurálních buněk vede k poklesu hladiny markeru nediferencovaných buněk nestinu a naopak k nárůstu množství β III-tubulinu v buňkách, a to jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu. Zcela opačný efekt je pak možné pozorovat při nadexpresi *Disp3*. Tato zjištění potvrzují, že DISP3 podporuje u neurálních buněk udržení jejich kmenovosti a naopak při jeho poklesu dochází ke zvýšení spontánní diferenciaci buněk do neuronů.



Obrázek 33. Spontánní diferenciacie NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do neuronů. Relativní počet β III-tubulin pozitivních buněk s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), buněk s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a buněk kontrolních (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe) byl stanoven pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus na základě barvení nediferencovaných NS-5 buněk β III-tubulin protilátkou a DAPI. Znáznorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (* P < 0,05, *** P < 0,001, **** P < 0,0001). Vpravo jsou reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení NS-5 buněk β III-tubulin protilátkou (zeleně) a DAPI (modře).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#1	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>
Relativní počet β III-tubulin pozitivních buněk Mean \pm SD	1,00 \pm 0,187	2,97 \pm 0,248	2,82 \pm 0,346	1,00 \pm 0,144	0,46 \pm 0,034

Tabulka 21. Relativní počet β III-tubulin pozitivních buněk.

Pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus byly počítány β III-tubulin imunofluorescenčně značené buňky. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.1.8 Diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 s modulovanou expresí genu

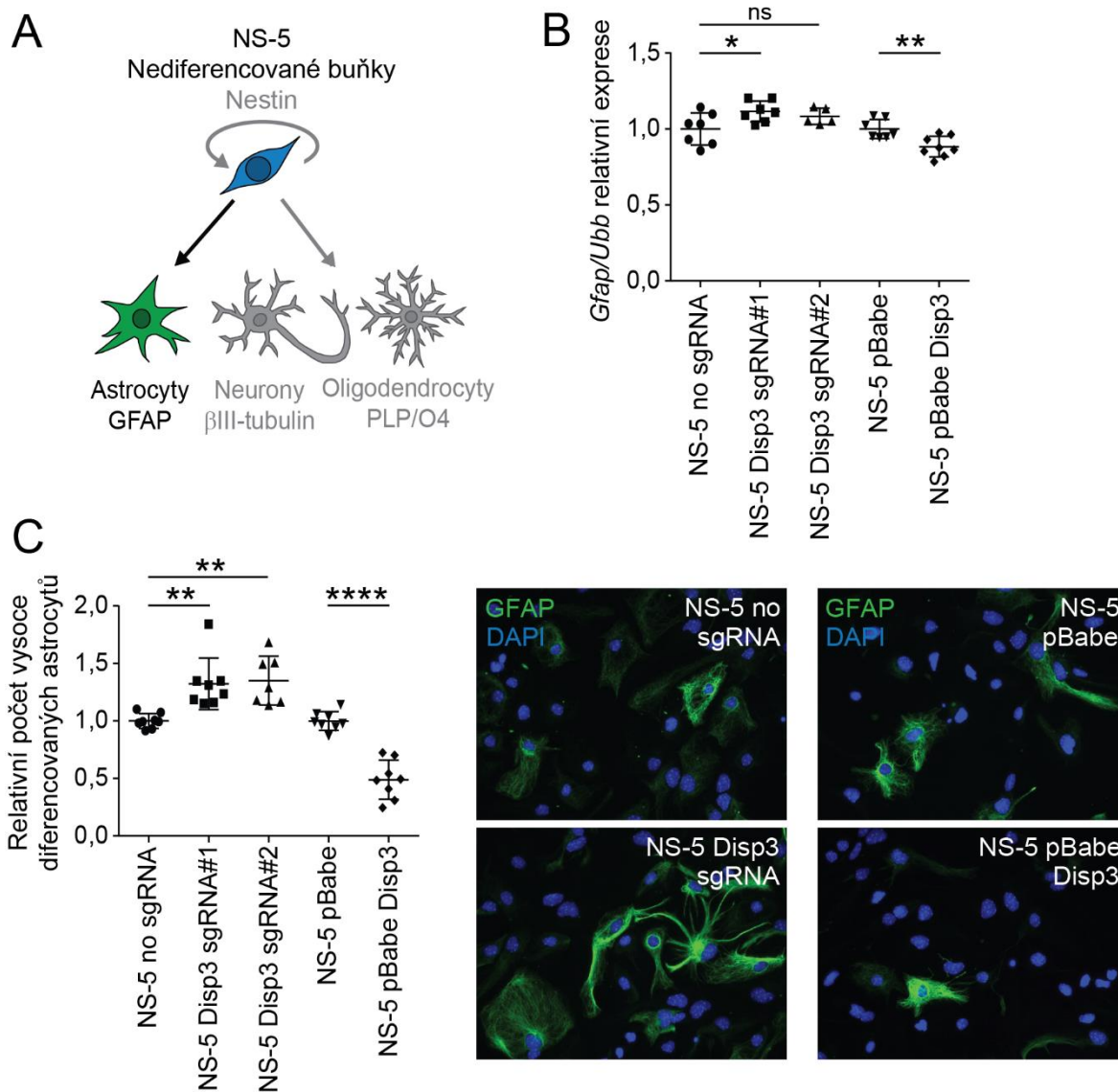
Disp3

Ve druhé kapitole výsledků týkajících se neurálních buněk jsme se zabývali změnami v expresi genu *Disp3*, ke kterým dochází v důsledku diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů. V následující kapitole jsme se naopak zaměřili na to, jak změna v expresi genu *Disp3* ovlivňuje diferenciační potenciál NS-5 buněk. Kultivace NS-5 buněk ve dvou různých médiích podporujících diferenciaci vede ke změně nediferencovaných buněk buď na astrocyty, nebo na neurony a oligodendrocyty. Rozdíly v *in vitro* diferenciaci NS-5 buněk s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3* a NS-5 buněk s nadexprimovaným genem *Disp3* byly stanoveny pomocí buněčně specifických markerů: GFAP (astrocyty), β III-tubulin (neurony) a *Plp1* nebo O4 (oligodendrocyty).

Neurální kmenové buňky NS-5 s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), s nadexpresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe) byly inkubovány v diferenciačním médiu podporujícím vznik astrocytů (Obr. 34A). Tento typ diferenciace byl vysoce efektivní, protože téměř všechny buňky v kultuře se změnilly na astrocyty. Přesto je ale možné u plně diferencovaných populací buněk pozorovat určité rozdíly. Pomocí metody qPCR jsme zjistili, že buňky s mutovaným genem *Disp3* exprimují po diferenciaci gen *Gfap* více než diferencované buňky kontrolní a naopak u populace diferencovaných buněk s nadexpresí genu *Disp3* je možné nalézt méně *Gfap* mRNA než u populace buněk kontrolních (Obr. 34B, Tab. 22 horní řádek).

Popsané rozdíly pozorované na úrovni mRNA byly ale velice malé. To mohlo být způsobeno zmíněnou vysokou efektivitou tohoto typu diferenciace. Astrocyty se ale i v rámci jedné kultury od sebe lišily velikostí, tvarem a hladinou GFAP proteinu. Proto jsme se rozhodli stanovit míru diferenciace jednotlivých buněčných linií pomocí imunofluorescenčního barvení. Cytoplazma astrocytů byla obarvena pomocí protilátky proti GFAP proteinu a jádra buněk byla vizualizována pomocí DAPI. Obrázky nasnímané automatickým mikroskopem Operetta jsme analyzovali v programu Columbus. Všechny buňky byly na základě velikosti, tvaru a intenzity fluorescence barveného GFAP proteinu rozděleny do čtyř skupin. Vyhodnocení výsledků ukázalo, že rozdíly mezi jednotlivými buněčnými liniemi je možné pozorovat ve skupině „vysoce diferencovaných astrocytů“. U buněk s mutací v genu *Disp3* byl relativní počet vysoce diferencovaných astrocytů přibližně 1,3krát vyšší než u buněk kontrolních, naopak u astrocytů z buněk nadexprimujících *Disp3* bylo možné pozorovat pokles na přibližně 50 procent proti kontrole (Obr. 34C vlevo, Tab. 22 dolní řádek). Zvýšení nebo naopak snížení počtu vysoce

diferencovaných astrocytů v důsledku manipulace *Disp3* exprese je možné pozorovat i na ilustračním obrázku 34C vpravo.



Obrázek 34. Diferenciace NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do astrocytů.

(A) Schématické znázornění diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 do astrocytů (buněčně-specifický marker GFAP).

(B) Hladina *Gfap* mRNA byla stanovena metodou qPCR v NS-5 buňkách po diferenciaci do astrocytů. NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) a buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA), dále NS-5 buňky s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3) a buňky kontrolní (NS-5 pBabe). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

(C) Relativní počet „vysoce diferencovaných astrocytů“ byl stanoven pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus na základě barvení buněk GFAP protilátkou a DAPI. Znázorněny jsou průměry nezávislých biologických replikátů, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (** P <0,01, **** P <0,0001). Vpravo jsou reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení NS-5 buněk GFAP protilátkou (zeleně) a DAPI (modře).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 Disp3 sgRNA#1	NS-5 Disp3 sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe Disp3
<i>Gfap/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,106	1,12 ± 0,069	1,08 ± 0,053	1,00 ± 0,063	0,88 ± 0,068
Relativní počet vysoce diferencovaných astrocytů Mean ± SD	1,00 ± 0,063	1,32 ± 0,224	1,35 ± 0,212	1,00 ± 0,082	0,49 ± 0,170

Tabulka 22. Relativní kvantifikace diferenciaci NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do astrocytů.

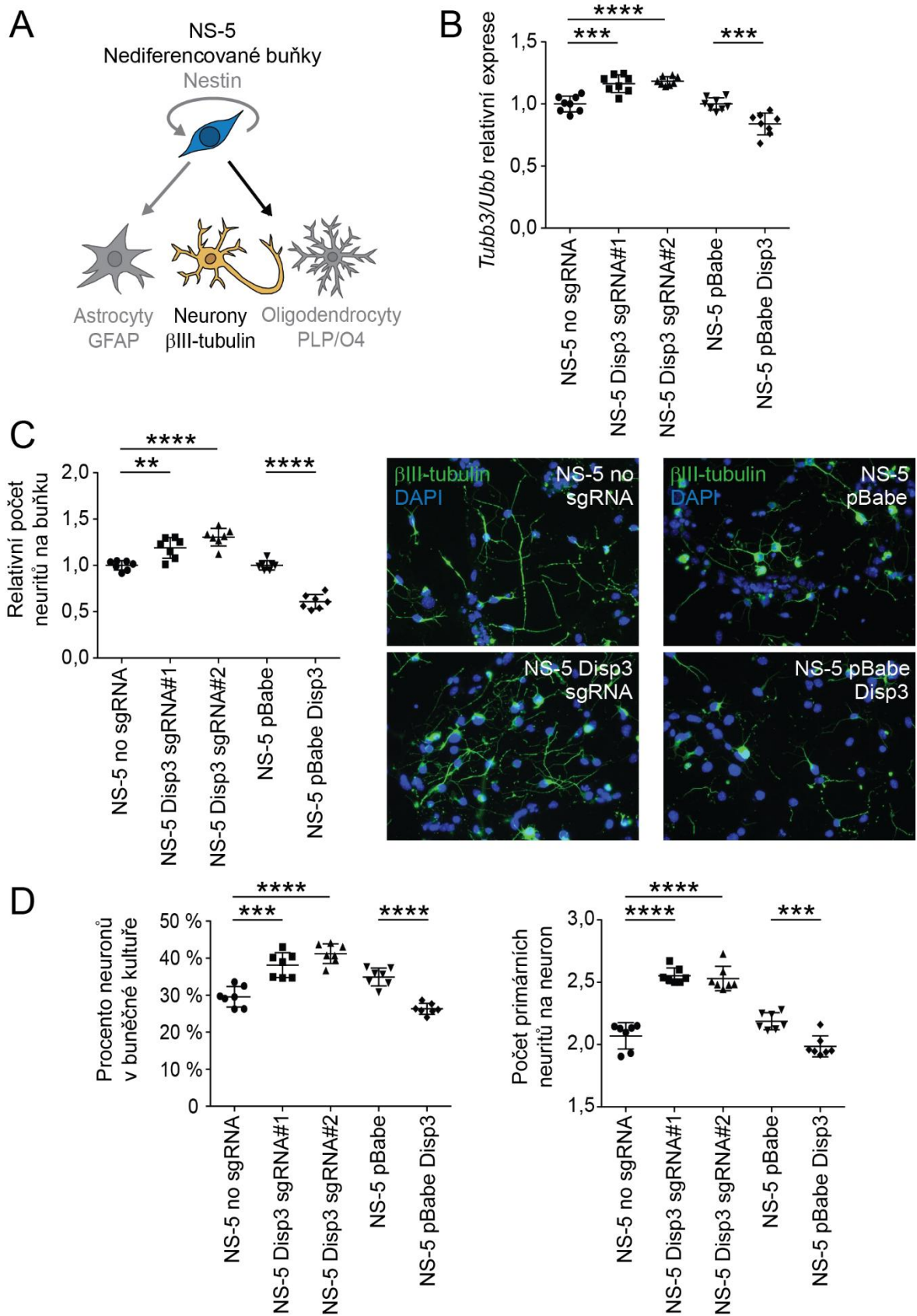
První řádek: Relativní hladina *Gfap* mRNA v NS-5 buňkách po diferenciaci do astrocytů stanovená metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. Druhý řádek: Relativní počet vysoce diferencovaných astrocytů stanovený pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus. Buňky pro analýzu byly obarveny GFAP protilátkou a DAPI. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

Pro stanovení vlivu modulované exprese genu *Disp3* na diferenciaci neurálních kmenových buněk NS-5 do neuronů jsme sledovali expresi markeru neuronů β III-tubulinu (*Tubb3*, Obr. 20A). Hladina *Tubb3* mRNA byla měřena metodou qPCR v buňkách po *in vitro* diferenciaci do neuronů (Obr 20A). U všech buněčných linií došlo v důsledku diferenciaci do neuronů ke zvýšení množství *Tubb3* mRNA proti nediferencovaným buňkám. Také je ale možné pozorovat rozdíly mezi jednotlivými buněčnými liniemi. Buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) obsahují přibližně 1,2krát více *Tubb3* mRNA v porovnání s kontrolou (NS-5 no sgRNA), naopak buňky s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3) mají hladinu *Tubb3* mRNA sniženou na přibližně 80 procent hladiny nalezené v buňkách kontrolních (NS-5 pBabe, Obr. 35B, Tab. 23 první řádek).

U buněk diferencovaných do neuronů jsme pozorovali přítomnost dlouhých výběžků – neuritů (Obr. 35C vpravo). Neurity je možné sledovat pomocí mikroskopie díky jejich

schopnosti výrazně se imunofluorescenčně barvit protilátkou proti β III-tubulinu. Do neuronů diferencované NS-5 buňky s mutací v genu *Disp3* a s nadexpresí genu *Disp3* jsme stejně jako buňky kontrolní obarvili protilátkou proti β III-tubulinu a DAPI. Takto barvené buňky jsme nasníмали na automatickém mikroskopu Operetta a pomocí programu Columbus jsme stanovili relativní počet neuritů na buňku. Jak je možné vidět i na ilustračním obrázku (Obr. 35C vpravo) počet neuritů na buňku se měnil v důsledku modulace exprese genu *Disp3*. Buňky s mutací v genu *Disp3* měly 1,2 až 1,3krát vyšší relativní počet neuritů na buňku ve srovnání s kontrolami a naopak buňky s nadexpresí genu *Disp3* měly relativní počet neuritů na buňku nižší, přibližně 61 procent v porovnání s kontrolami (Obr. 35C vlevo, Tab. 23 druhý řádek).

Kvantifikovat diferenciaci buněk do neuronů pomocí automatické obrazové analýzy je ale problematické z důvodu morfologie neuronů. Tyto buňky mají velice kondenzovanou cytoplazmu a tenké dlouhé výběžky, které se větví. Přiřazení výběžků ke konkrétní buňce je tak pro systém automatické analýzy velice obtížné až nemožné. Proto jsme se rozhodli analyzovat dále neurony manuálně pomocí programu ImageJ. Tímto způsobem jsme nejprve určili procentuální zastoupení neuronů v diferencované buněčné kultuře. Jako neurony byly počítány buňky s kondenzovanou cytoplazmou, která se intenzivně barvila protilátkou proti β III-tubulinu, a zároveň z jejich cytoplazmy zřetelně odstupoval alespoň jeden neurit také barvený β III-tubulinem. Touto analýzou jsme zjistili, že po diferenciaci do neuronů je možné u buněk s mutací v genu *Disp3* pozorovat přibližně 40 procent neuronů v kultuře což je více než kolik jich je v buňkách kontrolních, 30 procent. Zároveň je možné stanovit zastoupení neuronů v buněčné kultuře s nadexprimovaným genem *Disp3* na 26 procent což je méně než zjištěných 35 procent u buněk kontrolních (Obr. 35D vlevo, Tab. 23 třetí řádek). Dále jsme pomocí manuálního počítání v programu ImageJ stanovili průměrný počet primárních neuritů na neuron. Jednalo se o počet výběžků, které přímo odstupují od cytoplazmy neuronu bez ohledu na jejich další větvení. Také tyto výsledky prokázaly rozdíly mezi buněčnými liniemi po neuronální diferenciaci. Buňky s mutací v genu *Disp3* měly průměrně 2,5 primárních neuritů na neuron což je více než 2 primární neurity na neuron u buněk kontrolních. Naopak buňky s nadexpresí *Disp3* měly v průměru necelé 2 primární neurity na neuron což je méně než 2,2 primárních neuritů na neuron u buněk kontrolních (Obr. 35D vpravo, Tab. 23 čtvrtý řádek).



Obrázek 35. Diferenciace NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do neuronů.

(A) Schematické znázornění diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 do neuronů (buněčně-specifický βIII-tubulin).

(B) Hladina *Tubb3* mRNA byla stanovena metodou qPCR v NS-5 buňkách po diferenciaci do neuronů. NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA), dále NS-5 buňky s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a buňky kontrolní (NS-5 pBabe). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (***) $P < 0,001$, ****) $P < 0,0001$).

(C) Relativní počet neuritů na buňku byl stanoven pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus na základě barvení neuronů β III-tubulin protilátkou a DAPI. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (** $P < 0,01$, ****) $P < 0,0001$). Vpravo jsou reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení NS-5 buněk β III-tubulin protilátkou (zeleně) a DAPI (modře).

(D) Procenta neuronů v diferencované buněčné kultuře a počty primárních neuritů na neuron byly stanoveny pomocí manuální analýzy v programu ImageJ na základě barvení neuronů β III-tubulin protilátkou a DAPI. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (***) $P < 0,001$, ****) $P < 0,0001$).

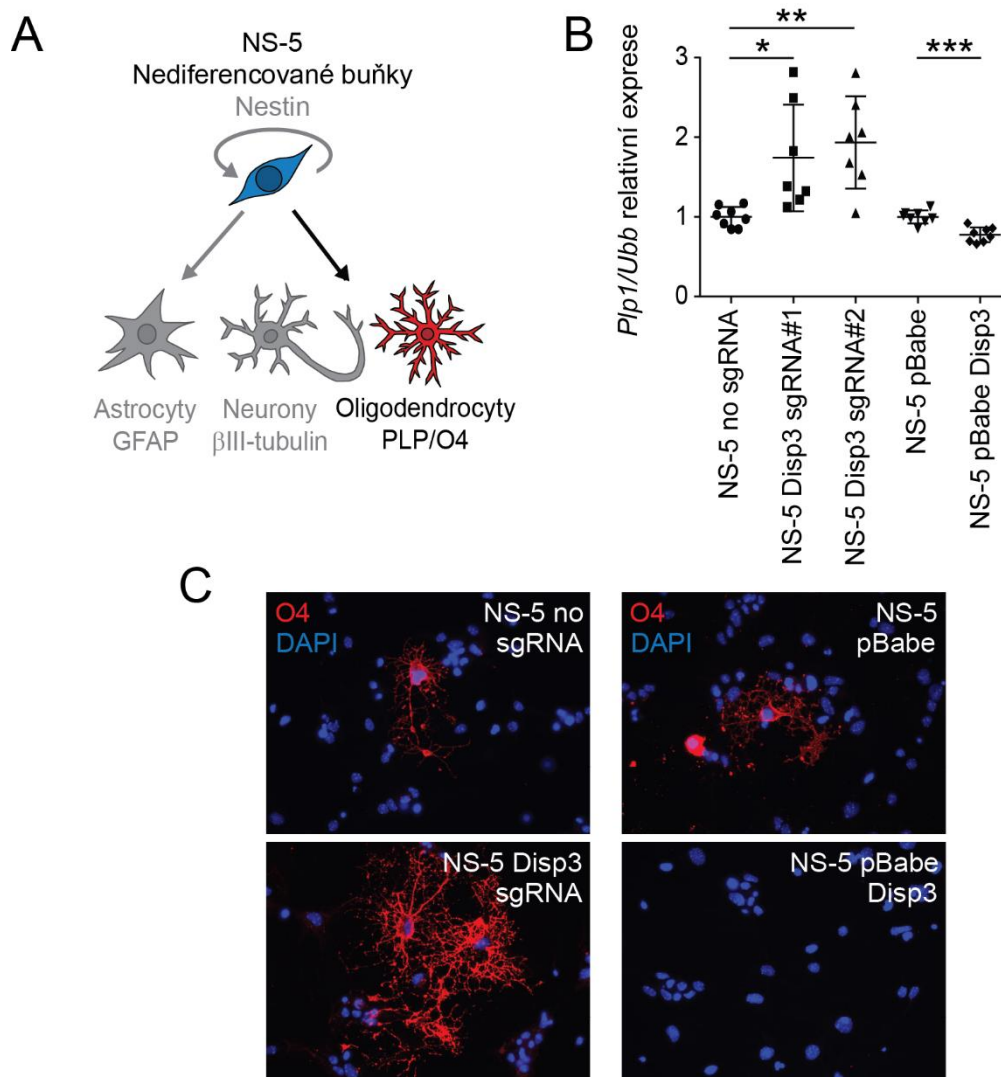
	NS-5 no sgRNA	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#1	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>
<i>Tubb3/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD	1,00 \pm 0,064	1,16 \pm 0,071	1,19 \pm 0,035	1,00 \pm 0,050	0,84 \pm 0,087
Relativní počet neuritů na buňku Mean \pm SD	1,00 \pm 0,051	1,19 \pm 0,112	1,31 \pm 0,096	1,00 \pm 0,051	0,61 \pm 0,077
Procento neuronů v buněčné kultuře Mean \pm SD	29,6 \pm 2,77	38,1 \pm 3,35	41,2 \pm 2,65	34,9 \pm 2,40	26,3 \pm 1,49
Počet primárních neuritů na neuron Mean \pm SD	2,07 \pm 0,106	2,55 \pm 0,063	2,53 \pm 0,098	2,19 \pm 0,068	1,99 \pm 0,084

Tabulka 23. Relativní kvantifikace diferenciaci NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do neuronů.

První řádek: Relativní hladina *Tubb3* mRNA v NS-5 buňkách po diferenciaci do neuronů stanovená metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. Druhý řádek: Relativní počet neuritů na buňku stanovený pomocí automatického mikroskopu Operetta a programu Columbus. Třetí řádek: Procento neuronů v diferencované buněčné kultuře stanovené manuální analýzou v programu ImageJ. Čtvrtý řádek: Počet primárních neuritů na neuron stanovený manuální analýzou v programu ImageJ. Vzorky pro automatickou i manuální analýzu byly obarveny β III-tubulin protilátkou a DAPI. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

Kromě diferenciaci do astrocytů a neuronů mají neurální kmenové buňky ještě možnost diferencovat do třetího typu neurálních buněk, a to do oligodendrocytů (Obr. 36A). Vliv genu *Disp3* na tento typ diferenciaci jsme se rozhodli sledovat pomocí kvantifikace množství mRNA *Plp1* genu, jehož exprese je pro oligodendrocyty specifická. Metodou qPCR jsme zjistili, že buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) exprimují *Plp1* gen přibližně 1,8krát více v porovnání s kontrolou (NS-5 no sgRNA) a naopak buňky s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) obsahují v porovnání s kontrolou (NS-5 pBabe) méně *Plp1* mRNA, a to přibližně 78 procent (Obr. 36B, Tab. 24 první řádek). Vliv genu *Disp3* na diferenciaci NS-5 buněk do oligodendrocytů jsme také potvrdili pomocí imunofluorescenčního barvení proteinu O4. Bohužel jsme ale nebyli schopni získaný výsledek nijak kvantifikovat, a to především vzhledem k nízkému počtu buněk plně diferencovaných do oligodendrocytů v buněčné kultuře. Z toho důvodu ukazujeme pouze reprezentativní fotografie buněk barvených O4 protilátkou a DAPI (Obr. 36C).

V souhrnu lze tedy konstatovat, že změna v expresi *Disp3* genu má vliv na diferenciaci neurálních kmenových buněk NS-5. Buňky s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3* vytvářely větší počet vysoce diferencovaných astrocytů, produkovaly větší procento neuronů s vyšším počtem neuritů a nakonec také diferencovaly lépe do oligodendrocytů. Zcela opačný efekt pak měla nadexprese genu *Disp3*. Diferenciační potenciál NS-5 pBabe *Disp3* buněk byl totiž výrazně nižší.



Obrázek 36. Diferenciace NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do oligodendrocytů.

(A) Schématické znázornění diferenciace neurálních kmenových buněk NS-5 do oligodendrocytů (buněčně-specifické markery gen *Plp1* a O4 protein).

(B) Hladina *Plp1* mRNA byla stanovena metodou qPCR v NS-5 buňkách po diferenciaci do oligodendrocytů. NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) a buňky kontrolní (NS-5 no sgRNA), dále NS-5 buňky s nadexpresí *Disp3* (NS-5 pBabe Disp3) a buňky kontrolní (NS-5 pBabe). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

(C) Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení NS-5 buněk O4 protilátkou (červeně) a DAPI (modře).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 Disp3 sgRNA#1	NS-5 Disp3 sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe Disp3
<i>Plp1/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD	1,00 \pm 0,127	1,74 \pm 0,669	1,93 \pm 0,579	1,00 \pm 0,081	0,78 \pm 0,093

Tabulka 24. Relativní kvantifikace diferenciaci NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* do oligodendrocytů.

Relativní hladina *Plp1* mRNA v NS-5 buňkách po diferenciaci do oligodendrocytů stanovena metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.1.9 Vliv nadexpresí genu *Disp3* na diferenciaci neurálních progenitorových buněk C17.2

Neurální progenitorové buňky C17.2 mají, stejně jako neurální kmenové buňky NS-5, schopnost diferencovat *in vitro*. Při kultivaci C17.2 buněk v diferenciacních podmínkách dochází ke změně morfologie některých buněk, což je provázáno nárůstem exprese genů typických pro neurony (β III-tubulin) a astrocyty (GFAP). Zároveň dochází k poklesu exprese nestinu, který je typický pro nediferencované buňky (Obr. 37A).

Množství nestinu v C17.2 buňkách s nadexpresí genu *Disp3* (C17.2 pBabe Disp3) a v buňkách kontrolních (C17.2 pBabe) bylo v průběhu diferenciac stanoveno pomocí qPCR a imunofluorescenčního barvení. Po prvním dni diferenciac hladina *Nes* mRNA klesala, a to u obou buněčných linií. První dny diferenciac ale přesto bylo možné mezi buněčnými liniemi pozorovat určité rozdíly. Buňky s nadexpresí *Disp3* měly hladinu *Nes* mRNA v diferenciacních dnech 1 a 2 v porovnání s kontrolou trochu vyšší (Obr. 37B, Tab. 25). Přestože na úrovni mRNA nebyl mezi buňkami příliš velký rozdíl, bylo možné pomocí barvení protilátkou proti nestinu pozorovat, že druhý den diferenciac došlo u kontrolních buněk v porovnání s nediferencovanými buňkami k výraznému poklesu hladiny nestinu na proteinové úrovni. To se ale nestalo u buněk s nadexpresí *Disp3*, kde vyšší hladina nestinu přetrvávala i druhý den diferenciac (Obr. 37B).

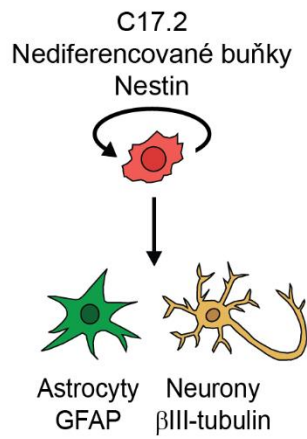
Expresí genu *Gfap* je určující pro astrocyty. V průběhu diferenciac C17.2 buněk došlo k výraznému nárůstu exprese tohoto genu z prakticky nedetekovatelné hladiny v nediferencovaných buňkách, a to jak u buněk kontrolních, tak i u buněk s nadexpresí *Disp3*. Zároveň jsme ale také zaznamenali, že hladina *Gfap* mRNA byla u buněk s nadexpresí *Disp3*

nižší než u buněk kontrolních. Tento rozdíl je patrný především od třetího dne diferenciaci (Obr. 37C, Tab. 25). Výsledky získané pomocí qPCR jsme se rozhodli ještě potvrdit pomocí imunofluorescenčního barvení protilátkou proti GFAP proteinu. Zjistili jsme, že sedmý den diferenciaci obsahovaly kontrolní buňky C17.2 poměrně vysoké množství GFAP proteinu, na rozdíl od C17.2 buněk s nadexpresí *Disp3* (Obr. 37C).

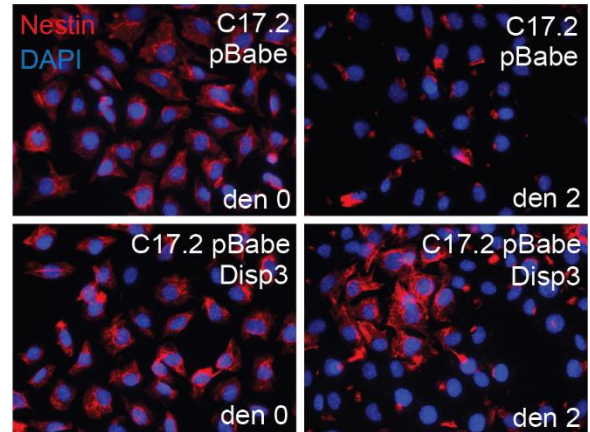
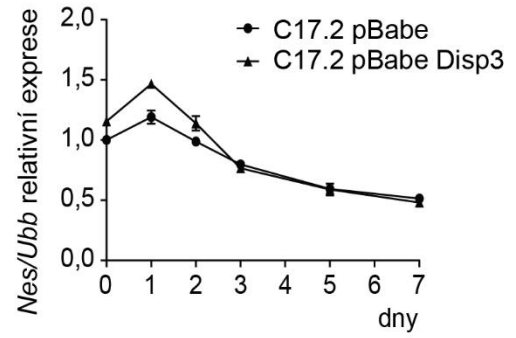
Pro sledování neuronální diferenciaci jsme se rozhodli sledovat v diferencujících se C17.2 buňkách hladinu β III-tubulinu. Množství *Tubb3* mRNA v buňkách během diferenciaci kolísalo s výrazným nárůstem exprese kolem třetího dne. Přestože je možné pozorovat, že změny v hladině *Tubb3* mRNA mají stejný průběh v buňkách kontrolních i v buňkách s nadexpresí *Disp3*, tak ve všech časových bodech je hladina *Tubb3* mRNA v buňkách s nadexpresí *Disp3* nižší než v buňkách kontrolních. Také tyto výsledky jsme se rozhodli doplnit o mikroskopická pozorování. Po diferenciaci vykazovaly kontrolní buňky C17.2 barvené protilátkou proti β III-tubulinu jasné morfologické změny. V kultuře bylo možné pozorovat intenzivně barvené buňky protáhlého tvaru s výběžky. Ve vzorku s nadexpresí *Disp3* se takovéto buňky téměř nevyskytovaly, což dále potvrzuje rozdíl v neuronové diferenciaci mezi buňkami C17.2 s nadexpresí genu *Disp3* a buňkami kontrolními.

Ze všech získaných výsledků vyplývá, že schopnost buněk C17.2 diferencovat je negativně ovlivněna nadexpresí genu *Disp3* v těchto buňkách. Nadexprese genu *Disp3* způsobuje, že buňky C17.2 během diferenciaci déle udržují expresi markeru nediferencovaných buněk nestinu a zároveň mají nižší hladinu exprese markeru astrocytů GFAP proteinu a neuronů β III-tubulinu. Také morfologie buněk po diferenciaci se liší.

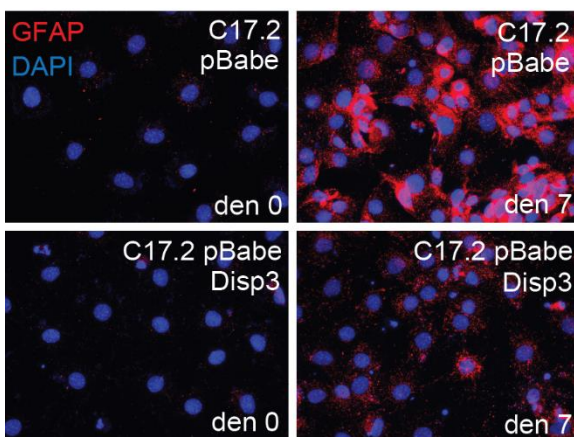
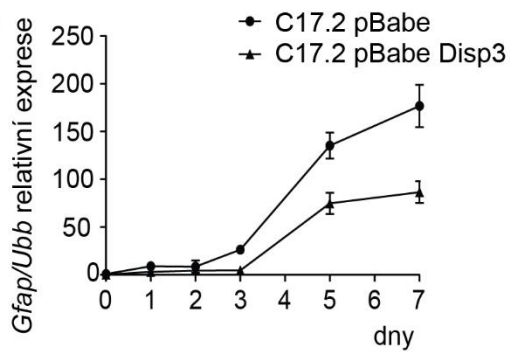
A



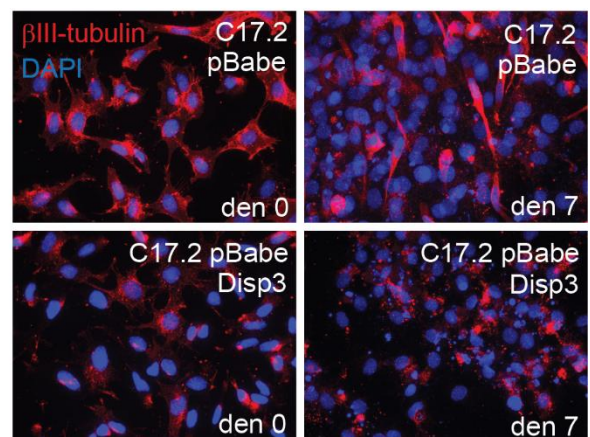
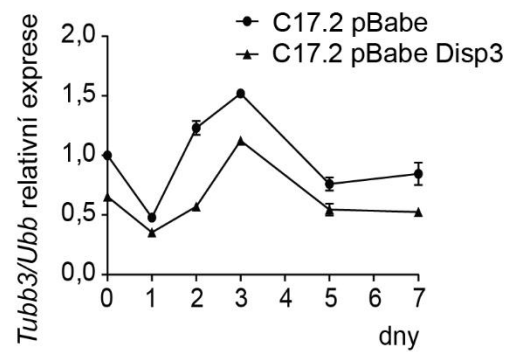
B



C



D



Obrázek 37. Diferenciace C17.2 buněk s nadexpresí genu *Disp3*.

(A) Schématické znázornění diferenciace neurálních progenitorových buněk C17.2 (nestin) do astrocytů (GFAP) a neuronů (β III-tubulin).

(B) Hladina *Nes* mRNA byla stanovena metodou qPCR během diferenciaci C17.2 buněk s nadexpresí genu *Disp3* (C17.2 pBabe *Disp3*) a buněk kontrolních (C17.2 pBabe). *Ubb* byl použit jako referenční gen. V každém bodě je znázorněn průměr tří nezávislých vzorků a směrodatná odchylka. Imunofluorescenční barvení C17.2 buněk během diferenciaci (den 0 a den 2) protilátkou proti nestinu (červeně) a DAPI (modře).

(C) Hladina *Gfap* mRNA byla stanovena metodou qPCR během diferenciaci C17.2 buněk s nadexpresí genu *Disp3* a buněk kontrolních. *Ubb* byl použit jako referenční gen. V každém bodě je znázorněn průměr tří nezávislých vzorků a směrodatná odchylka. Imunofluorescenční barvení C17.2 buněk během diferenciaci (den 0 a den 7) GFAP protilátkou (červeně) a DAPI (modře).

(D) Hladina *Tubb3* mRNA byla stanovena metodou qPCR během diferenciaci C17.2 buněk s nadexpresí genu *Disp3* a buněk kontrolních. *Ubb* byl použit jako referenční gen. V každém bodě je znázorněn průměr tří nezávislých vzorků a směrodatná odchylka. Imunofluorescenční barvení C17.2 buněk během diferenciaci (den 0 a den 7) protilátkou proti β III-tubulinu (červeně) a DAPI (modře).

		Diferenciaci (dny)					
		0	1	2	3	5	7
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD	C17.2 pBabe	1,00 \pm 0,038	1,19 \pm 0,055	0,99 \pm 0,032	0,080 \pm 0,028	0,59 \pm 0,038	0,51 \pm 0,013
	C17.2 pBabe <i>Disp3</i>	1,16 \pm 0,036	1,47 \pm 0,030	1,14 \pm 0,060	0,77 \pm 0,017	0,59 \pm 0,049	0,48 \pm 0,008
<i>Gfap/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD	C17.2 pBabe	1,00 \pm 0,672	9,13 \pm 2,295	8,68 \pm 6,481	26,32 \pm 4,253	135,38 \pm 13,588	176,76 \pm 22,120
	C17.2 pBabe <i>Disp3</i>	0,24 \pm 0,088	3,23 \pm 2,241	4,43 \pm 2,438	4,63 \pm 2,919	74,90 \pm 11,091	86,52 \pm 11,555
<i>Tubb3/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD	C17.2 pBabe	1,00 \pm 0,023	0,48 \pm 0,008	1,23 \pm 0,058	1,52 \pm 0,030	0,76 \pm 0,055	0,85 \pm 0,093
	C17.2 pBabe <i>Disp3</i>	0,65 \pm 0,027	0,35 \pm 0,004	0,57 \pm 0,031	1,12 \pm 0,024	0,55 \pm 0,050	0,53 \pm 0,011

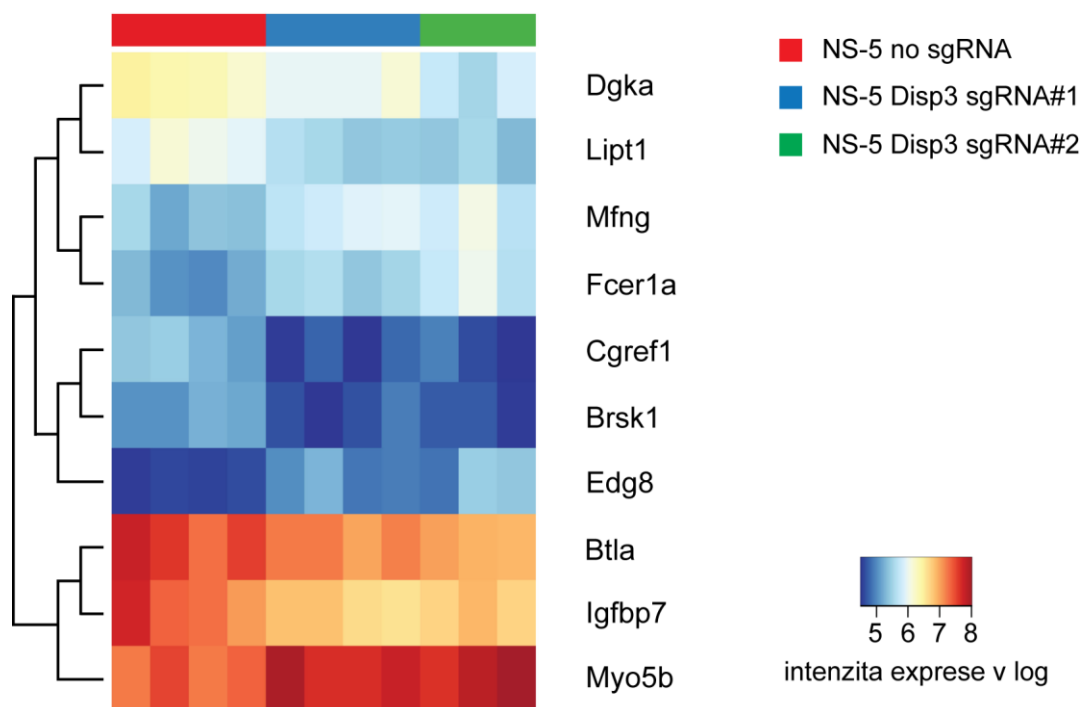
Tabulka 25. Relativní hladina mRNA genů *Nes*, *Gfap* a *Tubb3* během diferenciaci C17.2 buněk. Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.1.10 Změny v genové expresi NS-5 buněk způsobené modifikací genu *Disp3*

V předchozích kapitolách jsme se zabývali konkrétními vlastnostmi neurálních buněk, u kterých jsme očekávali změny v důsledku modulace exprese genu *Disp3*. Při výběru vlastností, které budeme sledovat, jsme vycházeli především z pozorování ovlivněných buněk při běžné kultivaci. V následující kapitole jsme se dále pokusili stanovit vliv modifikace genu *Disp3* na neurální buňky na úrovni genové exprese. Za účelem identifikace genů, jejichž exprese je ovlivněna mutací v genu *Disp3*, jsme se rozhodli provést mikročipovou analýzu. Pro analýzu pomocí čipů Illumina Mouse Expression BeadChips jsme izolovali RNA z NS-5 buněk s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) a z NS-5 buněk kontrolních (NS-5 no sgRNA). Na základě získaných profilů jsme vytvořili seznam deseti genů, jejichž exprese se významně lišila v buňkách s mutací (Obr. 38, Tab. 26, data z mikročipové analýzy jsou přístupná v databázi ArrayExpress pod kódem E-MTAB-4485).

Výsledky z mikročipové analýzy jsme ověřili pomocí qPCR. Hladiny mRNA všech deseti nalezených genů byly stanoveny ve vzorcích z nezávislého experimentu. Sledovali jsme nejen změnu exprese v buňkách s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2) proti kontrole (NS-5 no sgRNA), ale navíc jsme stanovili i změnu hladiny mRNA vybraných genů v NS-5 buňkách v důsledku nadexprese genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) v porovnání s kontrolou (NS-5 pBabe). Získané výsledky potvrdily, že v důsledku mutace genu *Disp3* v NS-5 buňkách dochází ke snížení exprese genů: *Igfbp7* (insulin-like growth factor binding protein 7), *Lipt1* (lipoyltransferase 1), *Dgka* (diacylglycerol kinase alpha) a *Brsk1* (brain serine/threonine kinase 1). Exprese těchto genů je naopak zvýšená v buňkách s nadexpresí *Disp3*. U genu *Edg8* (endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 8) jsme pak potvrdili zvýšení jeho exprese v NS-5 buňkách s mutovaným genem *Disp3* (Obr. 39, Tab. 27).

Geny, které jsme našli pomocí mikročipové analýzy a ověřili pomocí qPCR, jsou v literatuře popsány jako geny zapojené do vývoje neurálních buněk a tkání, a také jsou to geny důležité pro vznik a růst mnoha typů nádorů včetně nádorů mozku. Z našich výsledků tak vyplývá, že DISP3 může v neurálních kmenových buňkách ovlivňovat expresi určitých genů, a tím i některé jejich další vlastnosti.



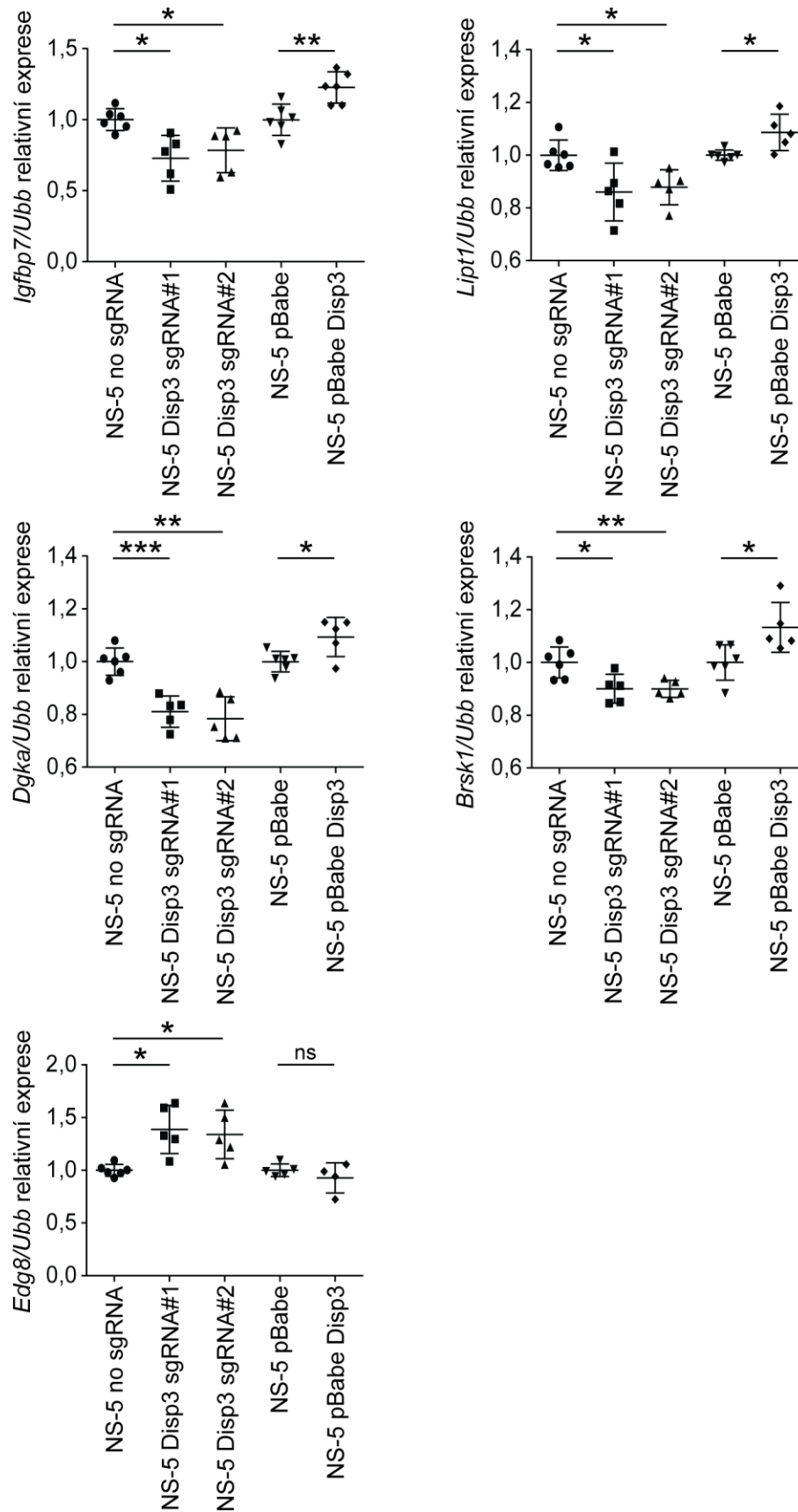
Obrázek 38. Profily genové exprese NS-5 buněk s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3*.

Znázorněny jsou geny, u kterých se exprese v buňkách s mutací (NS-5 Disp3 sgRNA#1 a NS-5 Disp3 sgRNA#2) lišila od exprese v buňkách kontrolních (NS-5 no sgRNA). Barvy představují hladiny genové exprese stanovené mikročipovou analýzou.

Symbol	Fold change	P-Value	RefSeq
Cgref1	0,64	0,000024	XM_181420.1
Igfbp7	0,65	0,00018	NM_008048.2
Lipt1	0,70	0,000015	NM_001037918.1
Dgka	0,71	0,000047	NM_016811.2
Btla	0,71	0,00012	NM_177584.3
Brsk1	0,73	0,000034	NM_001003920.2
Mfng	1,38	0,000094	NM_008595.2
Myo5b	1,39	0,000099	NM_201600.2
Fcer1a	1,43	0,000056	NM_010184.1
Edg8	1,46	0,00031	NM_053190.1

Tabulka 26. Seznam odlišně exprimovaných genů v NS-5 buňkách s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3*.

Výsledky mikročipové analýzy RNA z NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3* a z buněk kontrolních.



Obrázek 39. Ověření výsledků z mikročipové analýzy pomocí qPCR.

Hladina *Igfbp7* mRNA, *Lipt1* mRNA, *Dgka* mRNA, *Brsk1* mRNA a *Edg8* mRNA stanovená metodou

qPCR v NS-5 buňkách s mutovaným genem *Disp3* (NS-5 *Disp3* sgRNA#1 a NS-5 *Disp3* sgRNA#2), v buňkách se zvýšenou expresí genu *Disp3* (NS-5 pBabe *Disp3*) a v buňkách kontrolních (NS-5 no sgRNA a NS-5 pBabe). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001).

	NS-5 no sgRNA	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#1	NS-5 <i>Disp3</i> sgRNA#2	NS-5 pBabe	NS-5 pBabe <i>Disp3</i>
<i>Igfbp7/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,077	0,73 ± 0,161	0,78 ± 0,157	1,00 ± 0,111	1,23 ± 0,110
<i>Lipt1/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,057	0,86 ± 0,109	0,87 ± 0,067	1,00 ± 0,020	1,09 ± 0,069
<i>Dgka/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,0519	0,81 ± 0,059	0,78 ± 0,083	1,00 ± 0,039	1,09 ± 0,074
<i>Brsk1/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,059	0,90 ± 0,055	0,90 ± 0,032	1,00 ± 0,067	1,13 ± 0,095
<i>Edg8/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,056	1,39 ± 0,228	1,34 ± 0,231	1,00 ± 0,060	0,93 ± 0,143

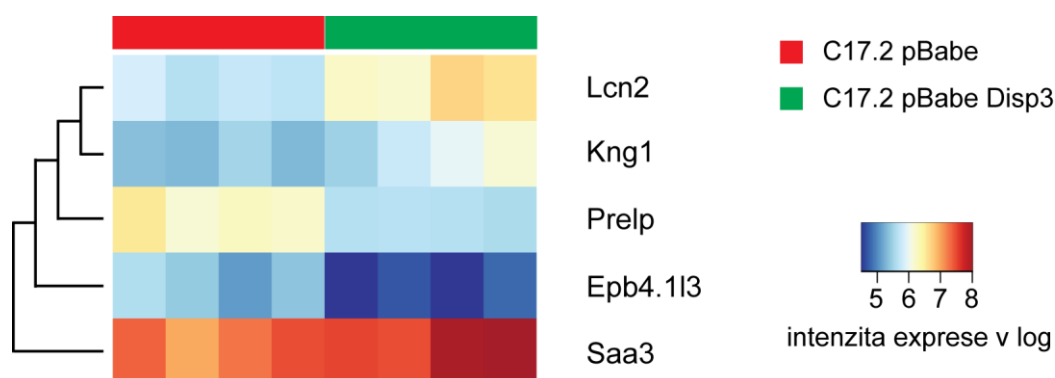
Tabulka 27. Relativní hladina mRNA genů *Igfbp7*, *Lipt1*, *Dgka*, *Brsk1* a *Edg8* v NS-5 buňkách.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

9.1.11 Změny v genové expresi C17.2 buněk způsobené nadexpresí genu *Disp3*

Myší neurální progenitorové buňky C17.2 exprimují gen *Disp3* na velice nízké úrovni v porovnání s myšími neurálními kmenovými buňkami NS-5. Buněčná linie C17.2 se od buněčné linie NS-5 odlišuje i v mnoha dalších vlastnostech. V předchozí kapitole jsme popsali, k jakým změnám v genové expresi dochází v důsledku modulace exprese genu *Disp3* u buněk NS-5. V této kapitole jsou popsány změny v genové expresi, ke kterým dochází u buněk C17.2 s nadexpresí genu *Disp3*. Pro nalezení těchto genů s odlišnou expresí jsme se rozhodli použít mikročipovou analýzu. Z buněk C17.2 s nadexpresí *Disp3* (C17.2 p Babe *Disp3*) a z buněk kontrolních (C17.2 pBabe) jsme izolovali RNA, kterou jsme následně použili pro analýzu pomocí čipů Illumina Mouse Expression BeadChips. Porovnáním expresních profilů buněk s nadexpresí *Disp3* a buněk kontrolních jsme našli pět genů, u kterých došlo k významné změně exprese (Obr. 40, Tab. 28, data z mikročipové analýzy jsou přístupná v databázi ArrayExpress pod kódem E-MTAB-2975).

Pomocí metody qPCR jsme na vzorcích z nezávislého experimentu potvrdili, že u buněk C17.2 dochází v důsledku nadexprese *Disp3* k poklesu hladiny mRNA genů *Epb4.113* (erythrocyte protein band 4.1-like 3) a *Prelp* (proline arginine-rich and leucine-rich repeat protein, Obr. 41, Tab. 29). Jak *Epb4.113* tak *Prelp* jsou geny odlišně exprimované v různých typech nádorů mozku. Tyto výsledky tak ukazují, že *DISP3* může ovlivňovat genovou expresi nejen v neurálních kmenových buňkách NS-5, ale i v neurálních progenitorových buňkách C17.2.



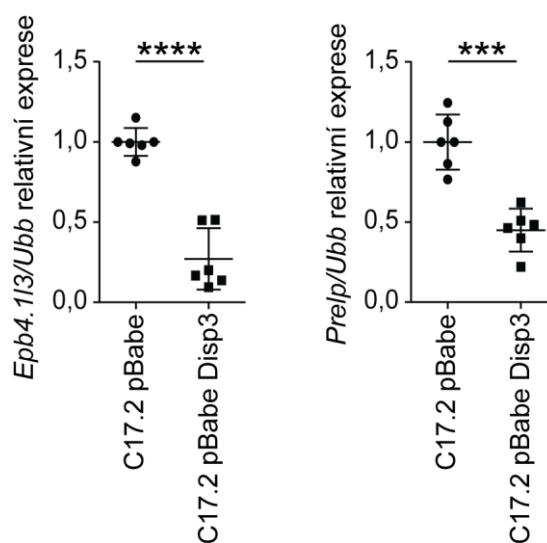
Obrázek 40. Profily genové exprese buněk C17.2 s nadexpresí *Disp3* genu.

Znázorněny jsou geny, u kterých se exprese v buňkách s nadexpresí *Disp3* (C17.2 pBabe *Disp3*) lišila od exprese v buňkách kontrolních (C17.2 pBabe). Barvy představují hladiny genové exprese stanovené mikročipovou analýzou.

Symbol	Fold change	P-Value	RefSeq
Epb4.113	0,52	0,000066	NM_013813.1
Prelp	0,56	0,000017	NM_054077.3
Kng1	1,51	0,0054	NM_023125.2
Saa3	1,51	0,012	NM_011315.3
Lcn2	1,86	0,00031	NM_008491.1

Tabulka 28. Seznam odlišně exprimovaných genů v buňkách C17.2 s nadexpresí *Disp3*.

Výsledky mikročipové analýzy RNA z C17.2 buněk s nadexpresí *Disp3* a z buněk kontrolních.



Obrázek 41. Ověření výsledků z mikročipové analýzy pomocí qPCR.

Hladina *Epb4.113* a *Prelp* mRNA stanovená metodou qPCR v buňkách s nadexpresí *Disp3* (C17.2 pBabe Disp3) a v buňkách kontrolních (C17.2 pBabe). *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znáznorněny jsou nezávislé biologické replikáty, jejich průměr, směrodatná odchylka a úroveň statistické významnosti (***) $P < 0,001$, ****) $P < 0,0001$).

	C17.2 pBabe	C17.2 pBabe Disp3
<i>Epb4.113/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD (N)	1,00 \pm 0,088	0,27 \pm 0,191
<i>Prelp/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD (N)	1,00 \pm 0,173	0,45 \pm 0,134

Tabulka 29. Relativní hladina mRNA genů *Epb4.113* a *Prelp* v C17.2 buňkách.

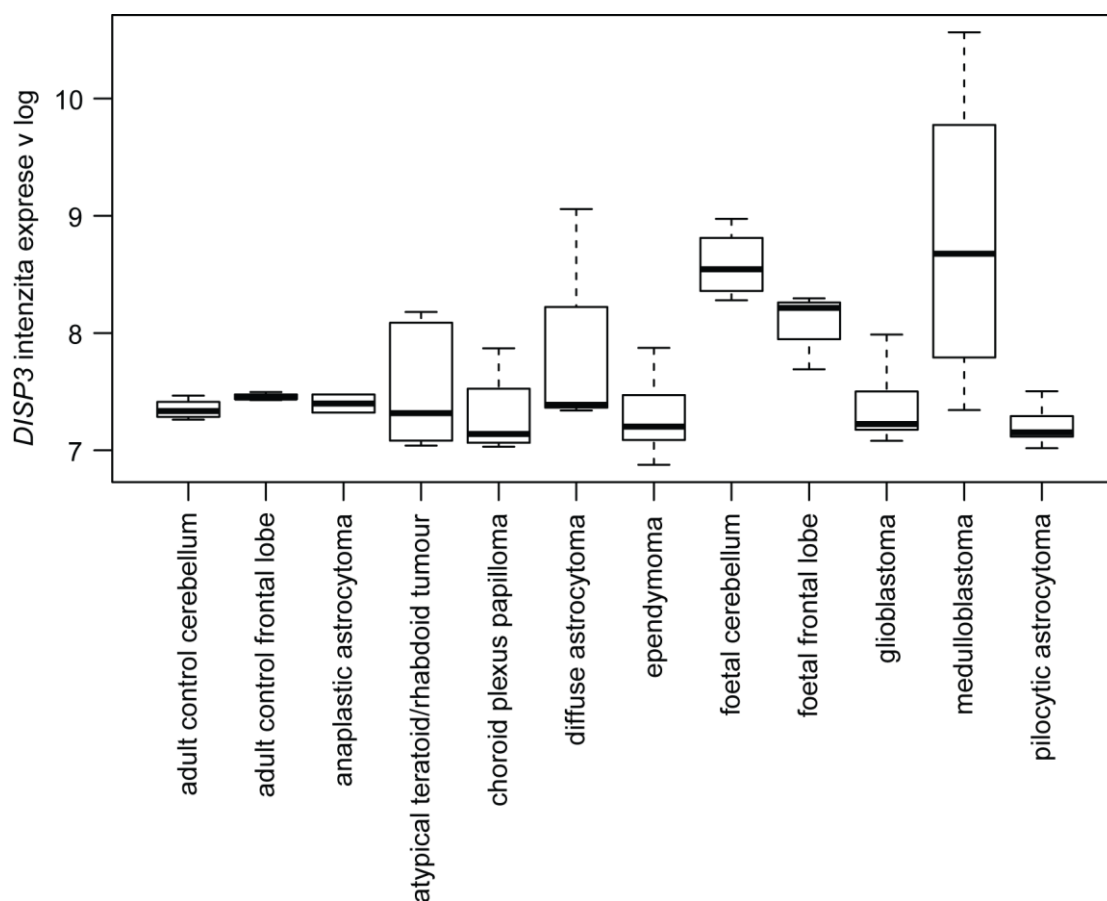
Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.2 DISP3 v lidských nádorech mozku a nádorových buňkách

9.2.1 Exprese genu *DISP3* v lidských nádorech mozku

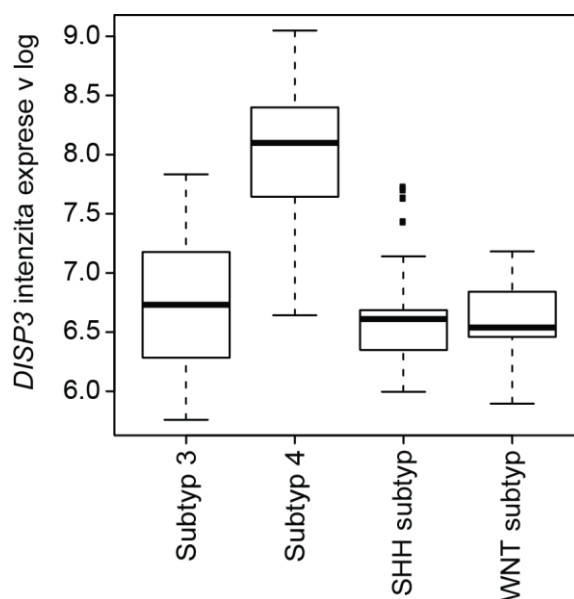
Ze získaných výsledků vyplývá, že *DISP3* ovlivňuje proliferaci a diferenciaci myších neurálních kmenových a progenitorových buněk. Dále jsme také zjistili, že změna exprese genu *Disp3* v těchto buňkách ovlivňuje expresi genů, o kterých je známo, že jsou důležité pro vznik a růst nádorů. Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli stanovit změny v expresi genu *DISP3* v určitých typech lidských nádorů mozku.

Z databáze ArrayExpress (Kolesnikov et al. 2015) jsme získali data, uložená pod kódem E-GEOD-42658 (Henriquez et al. 2013b), jejichž analýzou jsme zjistili, že v porovnání s ostatními typy nádorů mozku je exprese genu *DISP3* nejvyšší v meduloblastomech (Obr. 42). Meduloblastomy jsou pediatrické vysoce maligní nádory centrálního nervového systému, které vznikají z oblasti mozku nazývané mozeček (*cerebellum*). Na základě exprese určitých specifických genů a na základě přítomnosti některých typických DNA aberací je možné rozdělit meduloblastomy do čtyřech podskupin: sonic hedgehog (SHH) subtyp, WNT subtyp, subtyp 3 a subtyp 4. Tyto jednotlivé podskupiny se dále liší i histologicky a prognózou pro pacienty (Northcott et al. 2011b). Analýzou expresních profilů meduloblastomů (data z databáze ArrayExpress, uložená pod kódem E-GEOD-21140, Northcott et al. 2011b), jsme dále stanovili, že exprese *DISP3* genu je nejvyšší, v meduloblastomech, které patří do podskupiny subtyp 4 (Obr. 43).



Obrázek 42. Expresse genu *DISP3* v nádorech mozku.

Expresní hodnoty pro gen *DISP3*. Znázorněna je střední hodnota, kvartilové hodnoty a rozsah expresních hodnot pro jednotlivé skupiny vzorků. Dataset obsahoval celkem 73 vzorků (adult control cerebellum: 4, adult control frontal lobe: 4, anaplastic astrocytoma: 2, atypical teratoid/rhabdoid tumour: 5, choroid plexus papilloma: 4, diffuse astrocytoma: 3, ependymoma: 14, foetal cerebellum: 4, foetal frontal lobe: 4, glioblastoma: 5, medulloblastoma: 9, pilocytic astrocytoma: 15).



Obrázek 43. Expresse genu *DISP3* v různých podskupinách meduloblastomů.

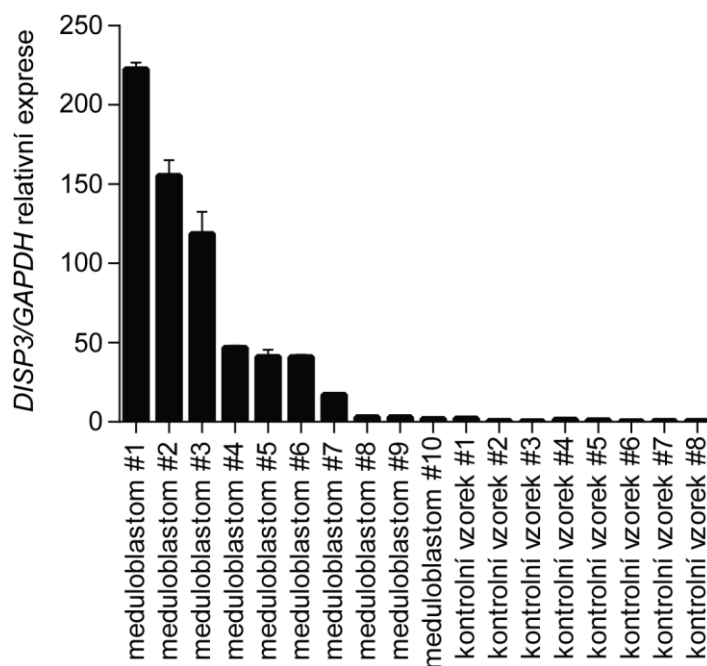
Expresní hodnoty pro gen *DISP3*. Znázorněna je střední hodnota a kvartilové hodnoty, rozsah expresních hodnot a odlehle hodnoty pro jednotlivé skupiny nádorů. Dataset obsahoval celkem 103 vzorků (Subtyp 3: 27, Subtyp 4: 35, SHH subtyp: 33, WNT subtyp: 8).

Výsledky získané analýzou dat z databáze ArrayExpress jsme se rozhodli ověřit pomocí metody qPCR a imunohistologického barvení na limitované sadě deseti vzorků, které jsme měli k dispozici. Hladinu *DISP3* mRNA jsme stanovili v deseti vzorcích meduloblastomů a v osmi vzorcích kontrolních. Jako kontroly byly použity vzorky tkání z mozečku odebrané při chirurgické operaci spolu s nádorem. Metodou qPCR se nám podařilo stanovit, že hladina exprese genu *DISP3* je v určitých vzorcích meduloblastomů výrazně zvýšená, a to v jednom případě až na více než dvěstě násobek hladiny *DISP3* mRNA v kontrolních vzorcích (Obr. 44, Tab. 30). Porovnáním našich dat s informacemi, které jsme k použitým vzorkům meduloblastomů dostali, jsme dále zjistili, že vysoká hladina *DISP3* mRNA byla detekována především ve vzorcích, které patří do molekulární podskupiny subtyp 4 (Tab. 30).

Informace získané pomocí qPCR jsme se rozhodli doplnit ještě o analýzu hladiny proteinu *DISP3* v použitých vzorcích meduloblastomů. Meduloblastomy byly barveny imunohistochemicky protilátkou proti *DISP3*. Výsledky barevní odpovídají výsledkům qPCR analýzy. Vzorek č. 2, u kterého byla hladina *DISP3* mRNA zvýšená asi 155krát, obsahuje velké množství intenzivně barvených buněk. Naopak vzorek č. 9, který měl hladinu exprese genu

DISP3 zvýšenou jen přibližně 3krát proti hladině v kontrolních vzorcích byl protilátkou proti *DISP3* obarven jen velice málo (Obr. 45).

Jak výsledky analýzy expresních profilů z databáze, tak i naše výsledky získané pomocí qPCR a barvení dokazují, že exprese genu *DISP3* je zvýšená v určitých typech lidských nádorů mozku, konkrétně především v meduloblastomech patřících do podskupiny subtyp 4.



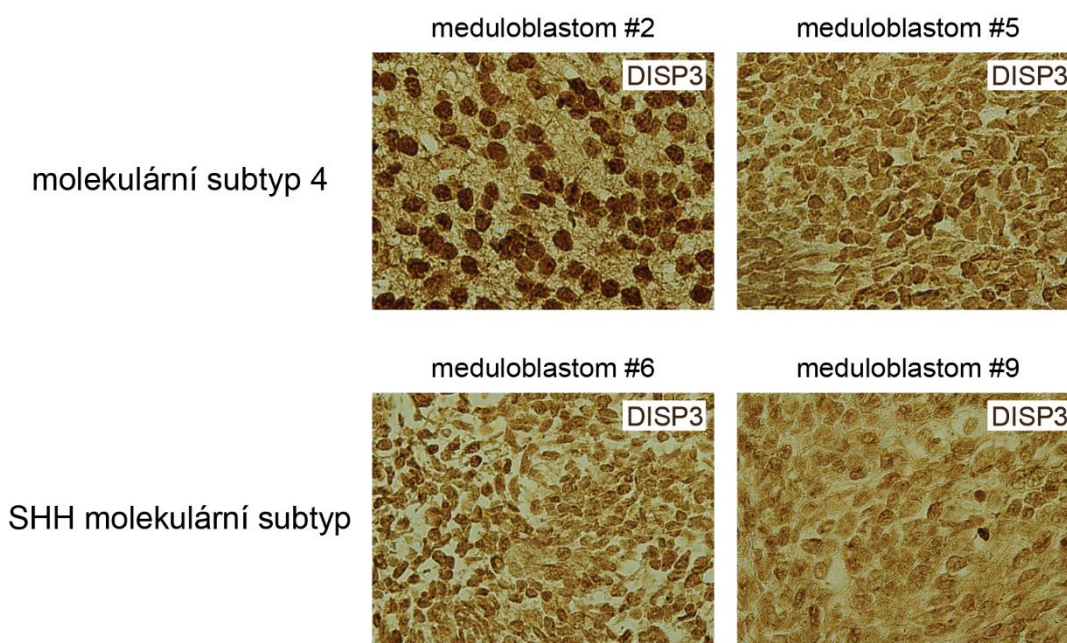
Obrázek 44. Expres genů *DISP3* ve vzorcích meduloblastomů.

Hladiny *DISP3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *GAPDH* byl použit jako referenční gen. Pro každý vzorek je znázorněn průměr a směrodatná odchylka triplikátu.

vzorek	histologický subtyp	molekulární subtyp	<i>DISP3/GAPDH</i> relativní exprese Mean ± SD
meduloblastom #1	classic	4	222,64 ± 4,158
meduloblastom #2	classic	4	155,27 ± 9,910
meduloblastom #3			118,67 ± 13,938
meduloblastom #4	classic	4	46,83 ± 1,487
meduloblastom #5	classic	4	41,16 ± 4,412
meduloblastom #6	Extensivly nodular	SHH	40,97 ± 1,354
meduloblastom #7	Desmoplastic		17,27 ± 1,113
meduloblastom #8	classic		3,02 ± 0,122
meduloblastom #9	Desmoplastic	SHH	2,96 ± 0,050
meduloblastom #10	Desmoplastic		1,90 ± 0,122

Tabulka 30. Relativní hladina *DISP3* mRNA v různých vzorcích meduloblastomů.

Informace o histologickém a molekulárním subtypu konkrétního nádoru jsme získali spolu se vzorky. Hladiny *DISP3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *GAPDH* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry triplikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD) pro každý vzorek meduloblastomu.

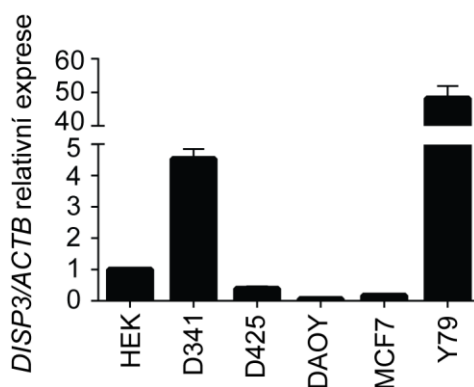


Obrázek 45. Protein *DISP3* ve vzorcích meduloblastomů.

Imunohistochemické barvení vzorků meduloblastomů pomocí polyklonální protilátky proti *DISP3* proteinu.

9.2.2 Vliv exprese genu *DISP3* na lidské nádorové buňky

Z výsledků uvedených v předchozí kapitole vyplývá, že úroveň exprese genu *DISP3* je velice variabilní v různých typech lidských nádorů. Rozhodli jsme se proto stanovit také míru exprese genu *DISP3* v různých lidských nádorových buněčných liniích. Pomocí metody qPCR jsme zjistili, že velice vysokou hladinu *DISP3* mRNA mají buňky Y79. Jedná se o buněčnou linii vytvořenou z primárního nádoru oka – retinoblastomu (Reid et al. 1974). Ze tří meduloblastomových linií, které jsme měli k dispozici, měly nejvyšší míru exprese genu *DISP3* buňky D341, které patří do meduloblastomové podskupiny subtyp 3 (Weeraratne et al. 2012). Naopak nejnižší hladinu *DISP3* mRNA bylo možné detekovat u meduloblastomových buněk DAOY (SHH subtyp, Triscott et al. 2013). Další buněčné linie: meduloblastomová linie D425 subtyp 3 (Weeraratne et al. 2012), linie lidských embryonálních buněk HEK a linie buněk MCF7 z nádoru prsu, exprimovaly gen *DISP3* velice málo (Obr. 46, Tab. 31).



Obrázek 46. Exprese genu *DISP3* v lidských nádorových buňkách.

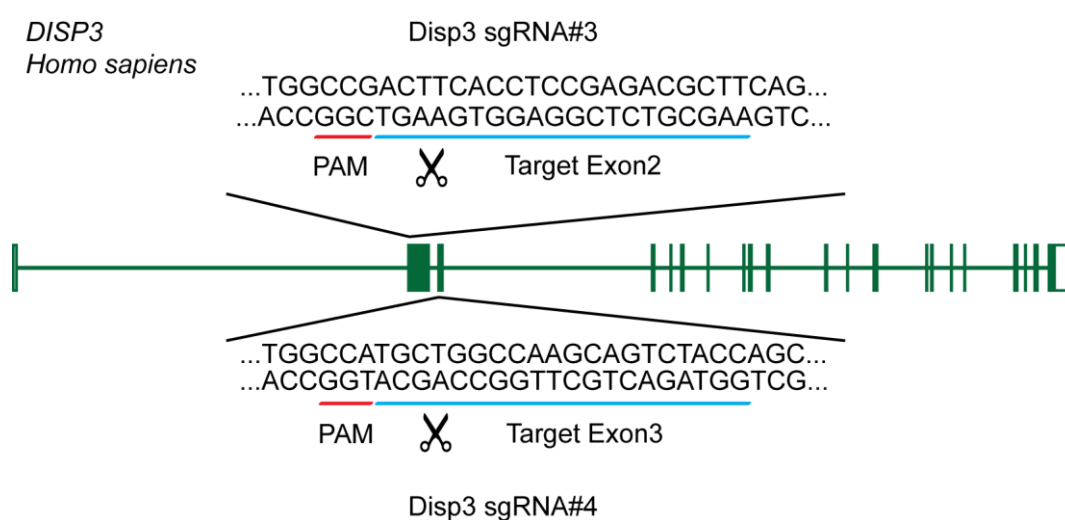
Hladiny *DISP3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, beta aktin (*ACTB*) byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměry tří nezávislých vzorků a směrodatné odchylky.

	HEK	D341	D425	DAOY	MCF7	Y79
<i>DISP3/ACTB</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,040	4,53 ± 0,313	0,39 ± 0,072	0,06 ± 0,040	0,17 ± 0,024	48,22 ± 3,689

Tabulka 31. Relativní hladina *DISP3* mRNA v lidských nádorových buňkách.

Hladiny *DISP3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, beta aktin (*ACTB*) byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

Pro další poznání role proteinu DISP3 v lidských nádorových, konkrétně meduloblastomových buňkách jsme se rozhodli vytvořit buněčné linie, ve kterých by exprese genu *DISP3* byla *in vitro* buď snižená, nebo naopak zvýšená. Pomocí CRISPR/Cas9 technologie jsme připravili buňky D341 s mutovaným genem *DISP3*. Mutace jsme pomocí guide RNA vnášeli do druhého (Disp3 sgRNA#3) nebo třetího (Disp3 sgRNA#4) exonu genu *DISP3* (Obr. 47). Buňky D341 s mutací v genu *DISP3* (D341 Disp3 sgRNA#3 a D341 Disp3 sgRNA#4) a buňky kontrolní (D341 no sgRNA) byly připraveny, podobně jako linie myších neurálních kmenových buněk NS-5 s mutací v genu *Disp3*, pomocí lentivirové infekce.



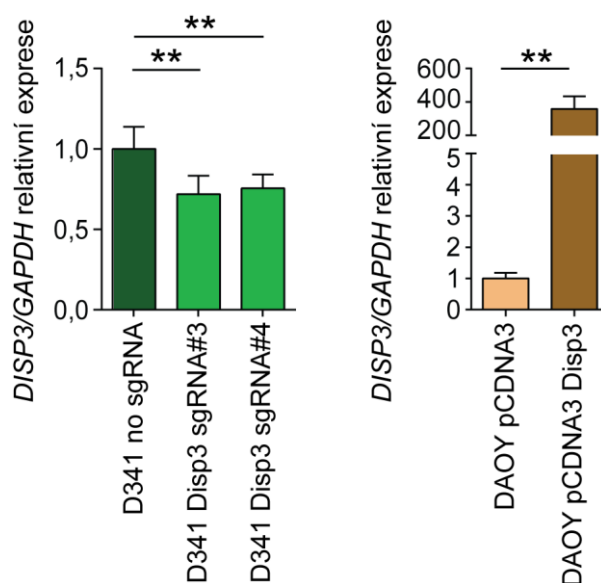
Obrázek 47. Mutagenese genu *DISP3* CRISPR/Cas9 technologií v D341 buňkách.

Schéma lidského genu *DISP3* se znázorněnými místy cílené mutagenese pomocí Disp3 sgRNA vedené CRISPR/Cas9 endonukleázy. Rozpoznávaná sekvence 20 nukleotidů je označena modře a sousedící PAM sekvence je označena červeně.

Kromě meduloblastomových buněk D341 s CRISPR/Cas9 vnesenými mutacemi do *DISP3* genu jsme se také rozhodli vytvořit linii meduloblastomových buněk se zvýšenou expresí tohoto genu. Jako výchozí buněčnou linii jsme zvolili DAOY buňky, protože tyto buňky exprimují gen *DISP3* jen velice málo (Obr. 46, Tab. 31). DAOY buňky jsme transfekovali buď prázdným plazmidem pcDNA3 nebo plazmidem s genem *DISP3* exprimovaným pod konstitutivně aktivním promotorem.

Pomocí qPCR jsme v nově připravených buněčných liniích určili hladinu *DISP3* mRNA. V buňkách D341 s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *DISP3* (D341 Disp3 sgRNA#3 a D341

Disp3 sgRNA#4) došlo, pravděpodobně v důsledku aktivace NMD dráhy, k poklesu množství *DISP3* mRNA na přibližně 74 procent v porovnání s hladinou v buňkách kontrolních (D341 no sgRNA, Obr. 48, Tab. 32). V buňkách DAOY došlo v důsledku nadexprese genu *DISP3* k velice výraznému zvýšení množství *DISP3* mRNA. DAOY buňky s nadexpresí *DISP3* genu (DAOY pcDNA3 Disp3) obsahovaly přibližně 360krát více *DISP3* mRNA než buňky kontrolní (DAOY pcDNA3, Obr. 48, Tab. 32).



Obrázek 48. Změna exprese genu *DISP3* v modifikovaných buňkách D341 a DAOY.

Množství *DISP3* mRNA stanovené metodou qPCR. D341 buňky infikované lentiviry s guide RNA (D341 Disp3 sgRNA#3 a D341 Disp3 sgRNA#4) a buňky kontrolní (D341 no sgRNA). DAOY buňky transfekované buď prázdným plazmidem (DAOY pcDNA3) nebo plazmidem s genem *DISP3* (DAOY pcDNA3 Disp3). *GAPDH* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměry nezávislých biologických replikátů, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (** P < 0,01).

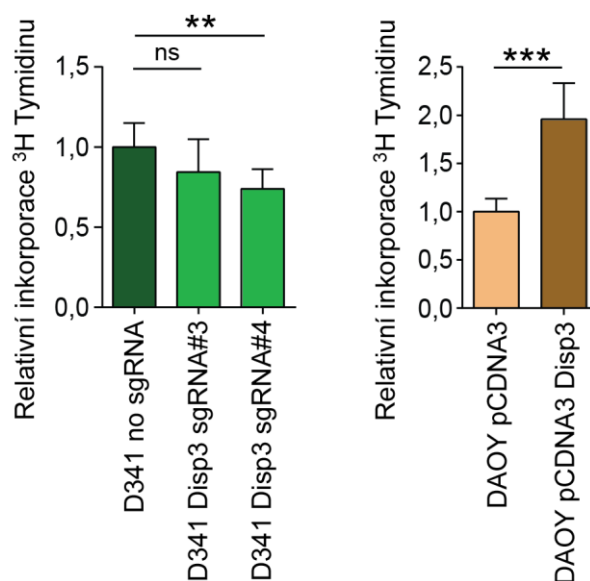
	D341 no sgRNA	D341 Disp3 sgRNA#1	D341 Disp3 sgRNA#2	DAOY pCDNA3	DAOY pCDNA3 Disp3
<i>DISP3/GAPDH</i> relativní exprese Mean \pm SD	1,00 \pm 0,138	0,72 \pm 0,115	0,75 \pm 0,087	1,00 \pm 0,181	357.6 \pm 75,62

Tabulka 32. Relativní hladina *DISP3* mRNA v buňkách se změnou exprese *DISP3* genu.

Hladiny *DISP3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *GAPDH* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

Vzhledem k tomu, že modulace exprese genu *Disp3* způsobuje změnu v proliferaci myších neurálních buněk NS-5 a C17.2, rozhodli jsme se stanovit, jaký vliv má modulace exprese genu *DISP3* na lidské meduloblastomové buňky. Rychlost růstu jsme u buněk s mutovaným genem *DISP3* (D341 Disp3 sgRNA#3 a D341 Disp3 sgRNA#4), u buněk s nadexpresí *DISP3* (DAOY pcDNA3 Disp3) a u buněk kontrolních (D341 no sgRNA a DAOY pcDNA3) kvantifikovali na základě inkorporace radioaktivně značeného thymidinu do nově vzniklé DNA. Ze získaných výsledků vyplývá, že buňky s mutací v genu *DISP3* proliferují mírně pomaleji než buňky kontrolní a naopak buňky s nadexpresí *DISP3* rostou výrazně, až dvakrát rychleji než buňky kontrolní (Obr. 49, Tab. 33).

Výsledky v této kapitole by se daly shrnout tak, že exprese genu *DISP3* je v různých lidských nádorových buněčných liniích odlišná a je možné připravit meduloblastomové buněčné linie D341 a DAOY s modulovanou expresí genu *DISP3*. Změna v expresi genu *DISP3* dále ovlivňuje rychlost růstu meduloblastomových buněk D341 a DAOY, a to stejným způsobem jako v myších neurálních kmenových a progenitorových buňkách NS-5 a C17.2.



Obrázek 49. Proliferace buněk s modulovanou expresí genu *DISP3*.

Rychlost proliferace D341 buněk s mutací v genu *DISP3* (D341 Disp3 sgRNA#2 a D341 Disp3 sgRNA#4), DAOY buněk se zvýšenou expresí genu *DISP3* (DAOY pcDNA3 Disp3) a buněk kontrolních (D341 no sgRNA a DAOY pcDNA3) byla stanovena na základě měření inkorporace ³H Thymidinu do DNA. Znáznorněny jsou průměry nezávislých biologických replikátů, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (** P <0,01, *** P <0,001).

	D341 no sgRNA	D341 Disp3 sgRNA#1	D341 Disp3 sgRNA#2	DAOY pcDNA3	DAOY pcDNA3 Disp3
Relativní inkorporace ³ H Thymidinu Mean ± SD	1,00 ± 0,149	0,84 ± 0,205	0,74 ± 0,124	1,00 ± 0,135	1,96 ± 0,375

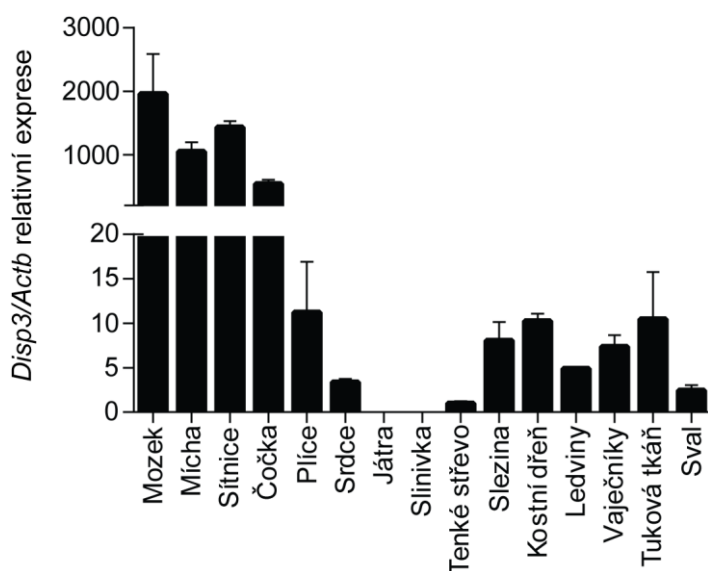
Tabulka 33. Relativní inkorporace ³H Thymidinu do DNA meduloblastomových buněk.

V tabulce jsou uvedeny průměry nezávislých biologických replikátů (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

9.3 DISP3 v mozku PLP/DISP3 transgenních myší

9.3.1 Exprese genu *Disp3* v tkáních dospělé myši

Za účelem stanovení míry exprese genu *Disp3* v jednotlivých typech tkání dospělé myši jsme použili metodu qPCR. Přestože gen *Disp3* je celkově u dospělé myši exprimován velice málo (při qPCR analýze je Cq v mozku 25,3; v kostní dřeni 31,9), je možné určit, že nejvyšší hladina *Disp3* mRNA je přítomná v mozku. Slabou expresi genu *Disp3* jsme ale našli i v dalších tkáních, například v kostní dřeni. Naopak prakticky vůbec není gen *Disp3* exprimován v játrech (Obr. 50, Tab. 34). Tyto výsledky potvrzují naše dřívější zjištění, že exprese genu *Disp3* je převážně omezena na tkáně neurálního původu, na mozek, míchu a sítnici (Zikova et al. 2009).



Obrázek 50. Exprese genu *Disp3* v různých myších tkáních.

Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, beta aktin (*Actb*) byl použit jako referenční gen. Znáznorněny jsou průměry tří nezávislých vzorků a směrodatné odchylky.

	<i>Disp3/Actb</i> relativní exprese Mean \pm SD
Mozek	1957,9 \pm 631,88
Mícha	1051,8 \pm 145,08
Sítnice	1436,0 \pm 92,99
Čočka	542,2 \pm 61,82
Plíce	11,22 \pm 5,698
Srdce	3,38 \pm 0,351
Játra	ND
Slinivka	ND
Tenké střevo	1,00 \pm 0,248
Slezina	8,04 \pm 2,089
Kostní dřev	10,26 \pm 0,820
Ledviny	4,87
Vaječníky	7,38 \pm 1,297
Tuková tkáň	10,47 \pm 5,301
Sval	2,45 \pm 0,582

Tabulka 34. Relativní hladina *Disp3* mRNA v různých myších tkáních.

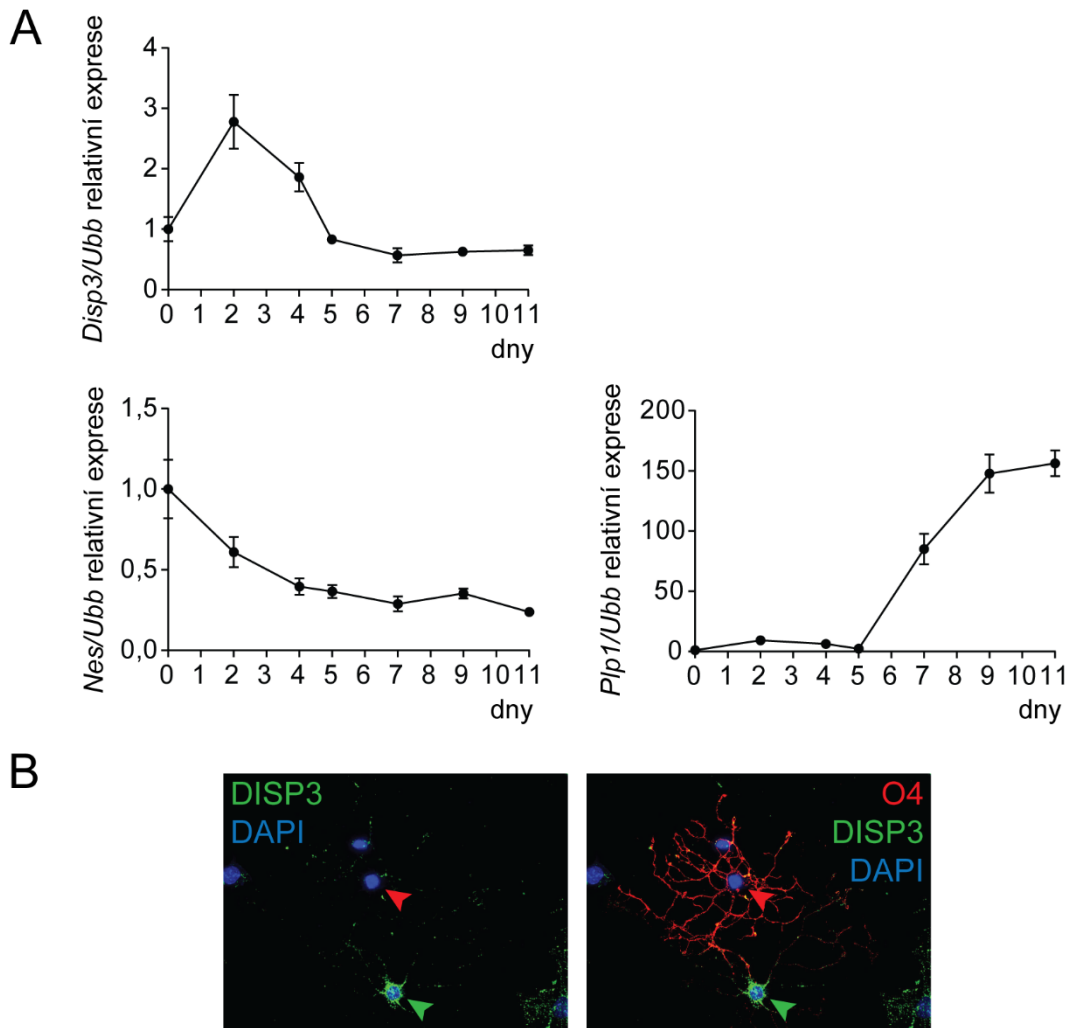
Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, beta aktin (*Actb*) byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

9.3.2 Změna exprese genu *Disp3* v mozku dospělé transgenní myši.

Ve druhé kapitole výsledků jsme popsali změny v expresi genu *Disp3*, ke kterým dochází v buňkách NS-5 v důsledku diferenciaci těchto buněk do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů. Zjistili jsme, že v porovnání s nediferencovanými buňkami je exprese genu *Disp3* v diferencovaných buňkách nižší, a to jak na úrovni proteinu tak na úrovni mRNA. Tyto výsledky jsme získali při použití embryonálních neurálních kmenových buněk NS-5. Buňky NS-5 byly odvozeny z myších embryonálních buněk (Conti et al. 2005) a jejich vlastnosti se tak mohou lišit od vlastností adultních neurálních kmenových buněk O4ANS, které byly izolované z mozku dospělé myši (Pollard et al. 2006). Z těchto důvodů jsme se rozhodli zopakovat experiment stanovující změnu exprese genu *Disp3* u neurálních buněk po diferenciaci do oligodendrocytů také s použitím adultních buněk O4ANS. Tyto buňky totiž mohou mít k *in vivo* situaci v živé myši blíž než buňky NS-5.

Pro *in vitro* diferenciaci neurálních kmenových buněk O4ANS do oligodendrocytů jsme použili stejný postup jako u buněk NS-5. V několika různých časových bodech během kultivace O4ANS buněk v diferenciacních podmínkách jsme stanovili hladinu *Disp3* mRNA pomocí qPCR. Expres genu *Disp3* v buňkách O4ANS během diferenciacce po počátečním nárůstu klesala, a to přibližně na 65 procent hladiny v buňkách nediferencovaných (Obr. 51A nahoře, Tab. 35 první řádek). Tento výsledek je velice podobný tomu, který jsme získali v buňkách NS-5. Diferenciaci buněk jsme ověřili pomocí stanovení hladin mRNA nestinu (*Nes*) a *Plp1* genu. Během diferenciacce exprese nestinu, typického pro nediferencované buňky klesala a naopak exprese *Plp1* genu, specifického pro oligodendrocyty stoupala (Obr. 51A, Tab. 35).

Výsledky získané pomocí qPCR jsme se rozhodli ještě doplnit o imunofluorescenční barvení buněk O4ANS po diferenciaci. Zjistili jsme, že v diferencovaných oligodendrocytech, které se intenzivně imunofluorescenčně barvily protilátkou proti buněčně specifickému proteinu O4, byla hladina DISP3 proteinu velice nízká až nedetekovatelná (Obr. 51B červená šipka). Naopak v cytoplazmě buněk, které zůstaly v nediferencovaném stavu a nebylo je tudíž možné obarvit O4 protilátkou bylo možné protein DISP3 dobře detekovat (Obr. 51B zelená šipka).



Obrázek 51. Změna exprese *Disp3* genu během diferenciace O4ANS buněk do oligodendrocytů.
 (A) Hladina *Disp3*, *Nes* a *Plp1* mRNA byla stanovena v průběhu diferenciace buněk do oligodendrocytů metodou qPCR. *Ubb* byl použit jako referenční gen. V každém bodě je znázorněn průměr tří nezávislých vzorků a směrodatná odchylka.
 (B) Imunofluorescenční barvení buněk O4ANS po diferenciaci do oligodendrocytů. Zeleně je znázorněn protein DISP3, červeně buněčně-specifický marker oligodendrocytů O4 a modře DAPI.

	Diferenciace do oligodendrocytů (dny)						
	0	2	4	5	7	9	11
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,201	2,78 ± 0,443	1,86 ± 0,239	0,83 ± 0,075	0,57 ± 0,119	0,63 ± 0,067	0,65 ± 0,082
<i>Nes/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,181	0,61 ± 0,094	0,40 ± 0,051	0,37 ± 0,040	0,29 ± 0,046	0,35 ± 0,030	0,24 ± 0,013
<i>Plp1/Ubb</i> relativní exprese Mean ± SD	1,00 ± 0,641	9,23 ± 1,205	6,20 ± 1,322	2,23 ± 0,346	85,02 ± 12,725	147,76 ± 15,922	156,28 ± 10,712

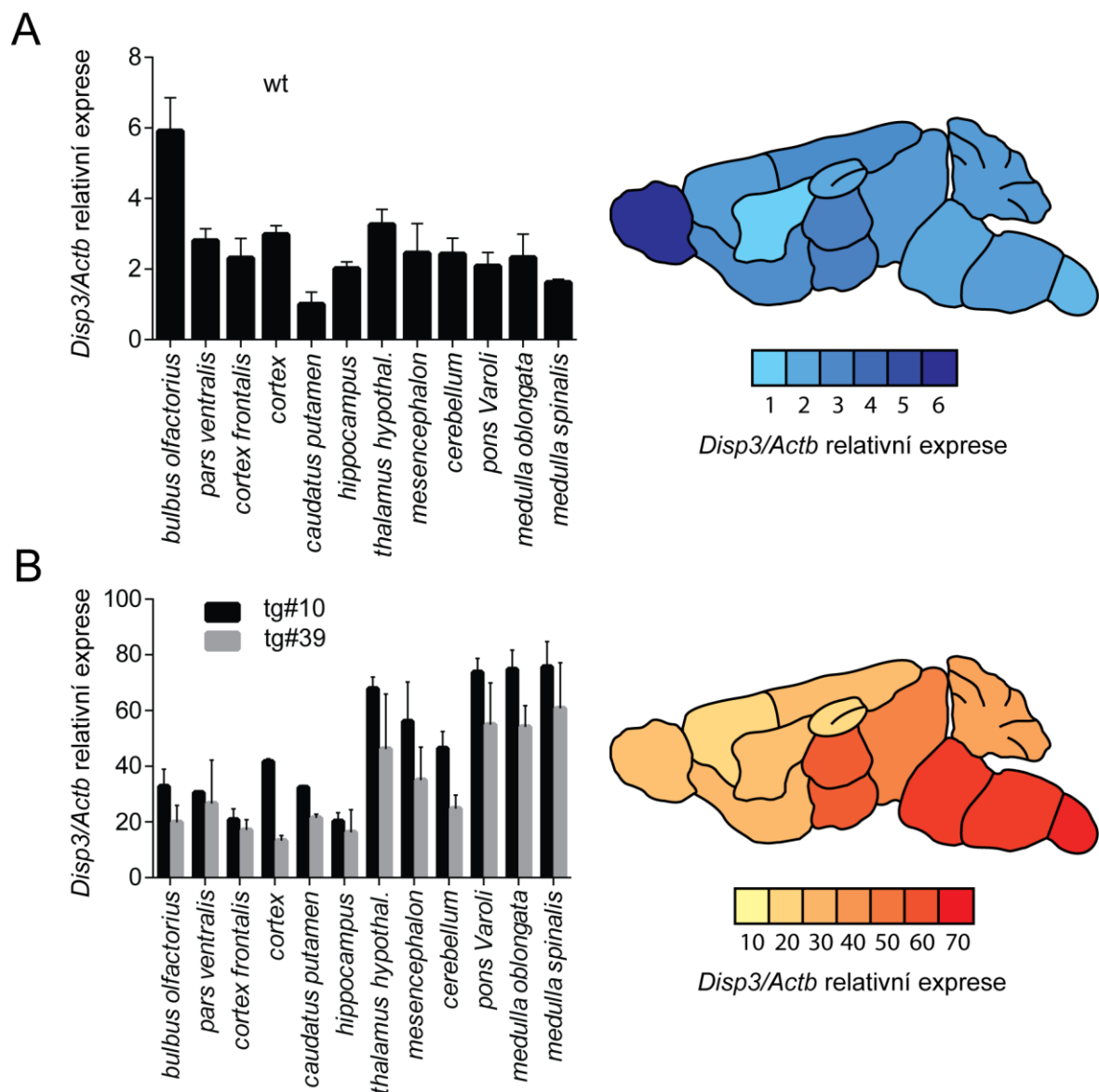
Tabulka 35. Relativní hladina mRNA genů *Disp3*, *Nes* a *Plp1* během diferenciace O4ANS buněk do oligodendrocytů.

Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD).

Diferenciace adultních neurálních kmenových buněk O4ANS do oligodendrocytů způsobuje pokles exprese genu *Disp3* v těchto buňkách. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli vytvořit transgenní myši se zvýšenou expresí genu *Disp3* v oligodendrocytech. Do myši DNA jsme vložili expresní kazetu s PLP1 promotorem a s lidskou variantou genu *DISP3*. Tímto způsobem jsme získali dvě nezávislé PLP/DISP3 pozitivní linie transgenních myši (tg#10 a tg#39).

U dospělé myši divokého typu (wt) jsme nejvyšší hladinu mRNA genu *Disp3* našli v mozku (Obr. 50, Tab. 34). Nejprve jsme se proto rozhodli určit, jak se exprese genu *Disp3* liší v jednotlivých oblastech mozku wt myši. Poté jsme zjišťovali, v jakých částech mozku došlo u PLP/DISP3 transgenních (tg) myši k nejvýraznějšímu nárůstu exprese genu *Disp3*.

Mozky wt i tg myši byly podle myšního anatomického atlasu mozku (Allen Brain Atlas <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>) rozděleny na jednotlivé části, ze kterých byla izolována RNA. Pomocí metody qPCR jsme určili, že u dospělé wt myši je možné nejvyšší hladinu *Disp3* mRNA nalézt v přední části mozku zvané *bulbus olfactorius*. V dalších oblastech mozku je exprese genu *Disp3* nižší (Obr. 52A, Tab. 36). U obou linií transgenních myši došlo ke zvýšení hladiny *Disp3* mRNA. K nejvýraznější změně došlo v posteriorních oblastech mozku, na které navazuje páteřní mícha. Nejvyšší úroveň exprese genu *Disp3* je možné detekovat v části mozku nazývané Varolův most (*pons Varoli*), v prodloužené míše (*medulla oblongata*) a v míše páteřní (*medulla spinalis*, Obr. 52B, Tab. 36).



Obrázek 52. Expresse genu *Disp3* v mozku dospělé wt a tg myši.

(A) Relativní hladina *Disp3* mRNA v mozku myši divokého typu (wt).

(B) Relativní hladina *Disp3* mRNA v mozku PLP/DISP3 transgenní myši (tg#10 a tg#39).

Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, beta aktin (*Actb*) byl použit jako referenční gen. Úroveň exprese byla normalizována k nejnižší hladině, tj. k expresi v *caudatus putamen* wt myši. Grafy vlevo ukazují průměry tří nezávislých vzorků a směrodatné odchylky. Vpravo jsou schématické obrázky myších mozků, u kterých intenzita barvy reprezentuje hladinu *Disp3* exprese. U tg myši je barvou znázorněn průměr hladin mRNA tg#10 a tg#39.

	<i>Disp3/Actb</i> relativní exprese Mean \pm SD		
	wt	tg#10	tg#39
<i>bulbus olfactorius</i>	5,91 \pm 0,945	32,78 \pm 6,145	19,91 \pm 6,014
<i>pars ventralis</i>	2,81 \pm 0,336	30,54 \pm 0,434	26,58 \pm 15,650
<i>cortex frontalis</i>	2,31 \pm 0,562	20,83 \pm 3,843	17,16 \pm 3,643
<i>cortex</i>	2,98 \pm 0,256	41,68 \pm 1,006	13,33 \pm 1,834
<i>caudatus putamen</i>	1,00 \pm 0,349	32,39 \pm 0,772	21,42 \pm 1,350
<i>hippocampus</i>	2,01 \pm 0,194	20,27 \pm 2,989	16,28 \pm 8,095
<i>thalamus hypothal.</i>	3,26 \pm 0,433	67,86 \pm 4,212	46,21 \pm 19,750
<i>mesencephalon</i>	2,45 \pm 0,838	56,13 \pm 14,130	35,02 \pm 11,840
<i>cerebellum</i>	2,42 \pm 0,453	46,46 \pm 6,025	24,81 \pm 4,789
<i>pons Varoli</i>	2,08 \pm 0,389	73,77 \pm 4,919	54,98 \pm 14,970
<i>medulla oblongata</i>	2,32 \pm 0,668	74,76 \pm 6,986	54,10 \pm 7,680
<i>medulla spinalis</i>	1,62 \pm 0,096	75,74 \pm 9,053	60,78 \pm 16,440

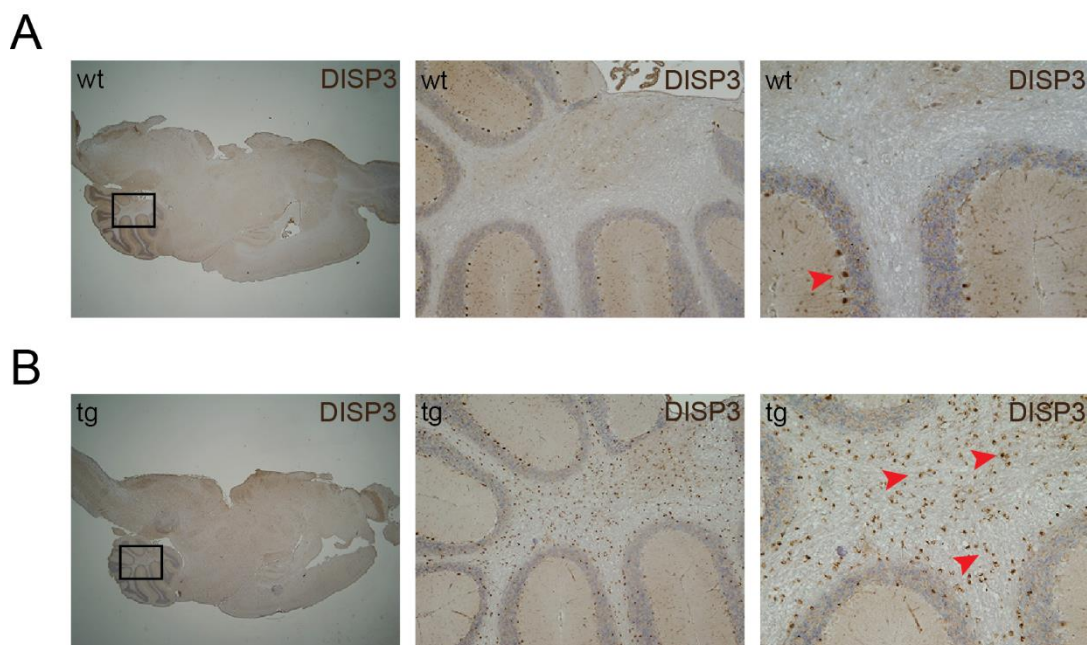
Tabulka 36. Relativní hladina *Disp3* mRNA v mozku dospělé wt a tg myši.

Hladiny *Disp3* mRNA v mozku dospělé myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenní myši (tg#10 a tg#39) byly stanoveny metodou qPCR, beta aktin (*Actb*) byl použit jako referenční gen. Úroveň exprese byla normalizována k nejnižší hladině, tj. k expresi v *caudatus putamen* wt myši. V tabulce jsou uvedeny průměry tří nezávislých vzorků (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD).

Stanovené hladiny *Disp3* mRNA získané metodou qPCR jsme se ještě rozhodli doplnit o imunohistochemické barvení DISP3 proteinu pomocí polyklonální protilátky. Expese genu *Disp3* není v těle ani v mozku dospělé wt myši vysoká (při qPCR analýze je Cq v mozku jen kolem 25,3). Proto je malé i množství imunohistochemicky barveného proteinu, který jsme v mozku dospělé wt myši byli schopni pozorovat. Přesto jsme ale v různých oblastech mozku například v mozečku našli buňky s proteinem DISP3 (Obr. 53A, červená šipka). V mozku transgenní myši je expese genu *Disp3* zvýšená. To potvrzují i výsledky imunohistochemického barvení, protože v mozečku tg myši výrazně narostl počet buněk pozitivně barvených na přítomnost DISP3 proteinu (Obr. 53B, červené šipky).

Získané výsledky ukazují, že u buněk O4ANS dochází v důsledku diferenciaci do oligodendrocytů k poklesu exprese genu *Disp3*, a to jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu. Proto jsme pomocí expresní kazety s PLP promotorem vytvořili dvě nezávislé linie PLP/DISP3 transgenních myši. Tyto myši mají v dospělosti zvýšenou hladinu *Disp3* mRNA především v posteriorních oblastech mozku. Dále je u těchto myši také možné nalézt, v oblasti

mozku zvané mozeček, výrazně vyšší počet buněk obsahujících DISP3 protein v porovnání s wt myši.



Obrázek 53. DISP3 protein v mozku wt a tg myši.

Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení sagitálního řezu mozku dospělé myši divokého typu (wild type = wt, A) a dospělé PLP/DISP3 transgenní myši (tg, B). Ukázán je výsledek barvení mozku myši linie tg#39, barvení mozku myši linie tg#10 je srovnatelné. Pro barvení vzorků byla použita polyklonální protilátka proti DISP3 proteinu. Šipka označuje DISP3 pozitivní buňky.

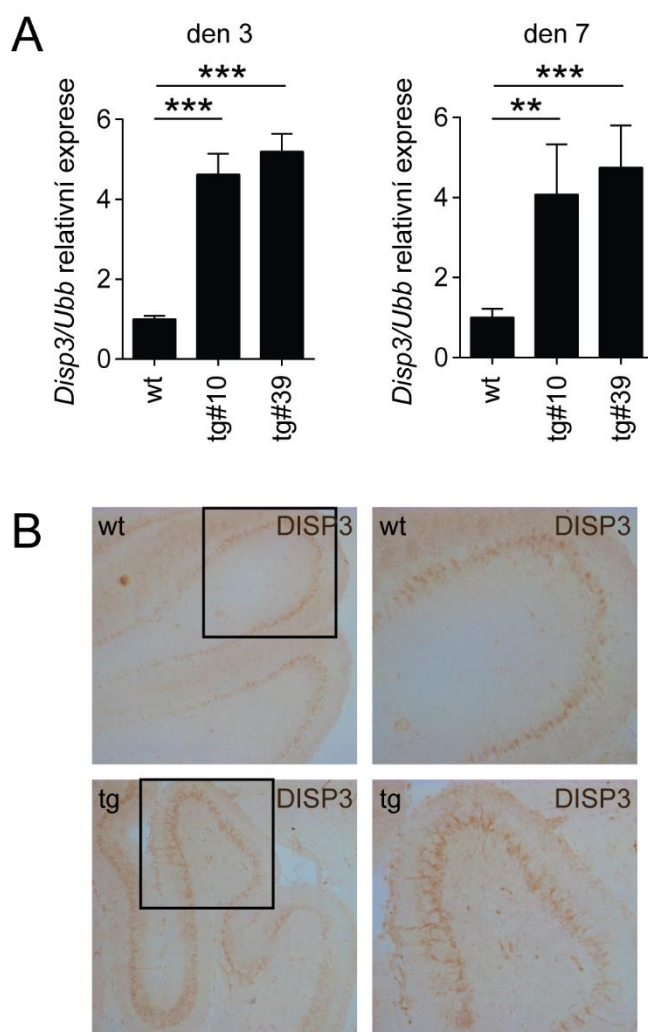
9.3.3 Vliv nadexprese genu *Disp3* na mozeček novorozené transgenní myši

Aktivita PLP promotoru je u myši během embryonálního a časného postnatálního vývoje odlišná od aktivity u dospělých jedinců. Expresi genů vedenou PLP promotorem tak můžeme pozorovat i v jiných buněčných typech než v oligodendrocytech. U novorozených myši byl čtvrtý den po narození nalezen aktivní PLP promotor například v granulózní vrstvě mozečku v buňkách pozitivních na marker neuronů NeuN (Michalski et al. 2011). Rozhodli jsme se proto zjistit, zda u novorozených PLP/DISP3 transgenních myši způsobuje nadexprese genu *Disp3* nějaké pozorovatelné změny.

Nejprve jsme stanovili hladinu *Disp3* mRNA v mozečku wt a tg myši pomocí metody qPCR. Expresi genu *Disp3* jsme sledovali u myši třetí a sedmý den po narození. Obě dvě linie tg myši

(tg#10 a tg#39) měly v obou časových bodech (den 3 a den 7) zvýšenou hladinu *Disp3* mRNA přibližně pětkrát v porovnání s wt myšmi ze stejného vrhu (Obr. 54A, Tab. 37).

Výsledek získaný metodou qPCR jsme se rozhodli potvrdit pomocí imunohistochemického barvení. Navzdory velice slabé expresi *Disp3* genu (při qPCR analýze je Cq v mozečku 7 dnů staré wt myši kolem 25,1) jsme byli schopni pozorovat pozitivně obarvené buňky. Zjistili jsme, že tg myši sedmý den po narození mají ve svém mozečku více buněk s DISP3 proteinem než wt myši a že vrstva DISP3 pozitivních buněk je u tg myši mnohem širší než u wt myši ze stejného vrhu (Obr. 54B).



Obrázek 54. Expresie genu *Disp3* v mozečku novorozené wt a tg myši.

(A) Relativní hladiny *Disp3* mRNA v mozečku myši divokého typu (wt) a v mozečku PLP/DISP3 transgenických myši (tg#10 a tg#39) třetí a sedmý den po narození. Hladiny *Disp3* mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměrné hodnoty hladiny mRNA stanovené pro dva až čtyři jedince, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (** P <0,01*** P <0,001).

(B) Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení sagitálního řezu mozečku myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenní myši (tg) sedmý den po narození. Pro barvení vzorků byla použita polyklonální protilátka proti DISP3 proteinu. Ukázán je výsledek barvení mozečku myši linie tg#39, barvení mozečku myši linie tg#10 je srovnatelné.

	mozeček den 3		
	wt	tg#10	tg#39
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD (N)	1,00 \pm 0,079 (4)	4,62 \pm 0,523 (3)	5,20 \pm 0,441 (3)

	mozeček den 7		
	wt	tg#10	tg#39
<i>Disp3/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD (N)	1,00 \pm 0,217 (4)	4,08 \pm 1,249 (2)	4,751 \pm 1,046 (4)

Tabulka 37. Relativní hladina *Disp3* mRNA v mozečku novorozené wt a tg myši.

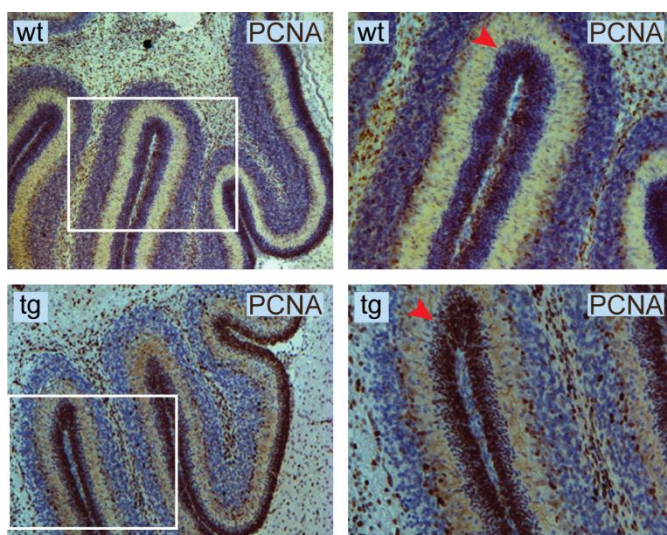
Hladiny *Disp3* mRNA v mozečku myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenních myši (tg#10 a tg#39) třetí a sedmý den po narození byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry hodnot stanovených pro jednotlivé myši (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD) a počet sledovaných jedinců (N).

Jak již bylo podrobněji popsáno v kapitole úvodu, EGL je oblast mozečku novorozené myši ve které dochází do konce druhého postnatálního týdne k proliferaci buněk nazývaných prekurzory granulárních buněk. GCP vznikají v oblasti zvané rhombic lip a po masivní proliferaci v EGL migrují dál a mění se v diferencované granulární buňky - neurony (Fujita et al. 1966). Ve čtvrté kapitole výsledků jsme popsali výrazný vliv exprese genu *Disp3* na proliferaci neurálních kmenových a progenitorových buněk. Proto jsme se rozhodli porovnat pomocí imunohistochemického barvení proliferaci GCP u novorozených PLP/DISP3 transgenních a wt myši.

Proliferaci GCP jsme pozorovali v mozečku tg a wt myši třetí a sedmý den po narození, což je doba, kdy se GPCs v EGL masivně množí. Na parafinových řezech postnatálního myšního mozku jsme sledovali přítomnost buněčných proliferačních antigenů PCNA (Steiner et al. 1975) a Ki-67 (Gerdes et al. 1983). Oba dva typy barvení prokázaly vliv exprese genu *Disp3*

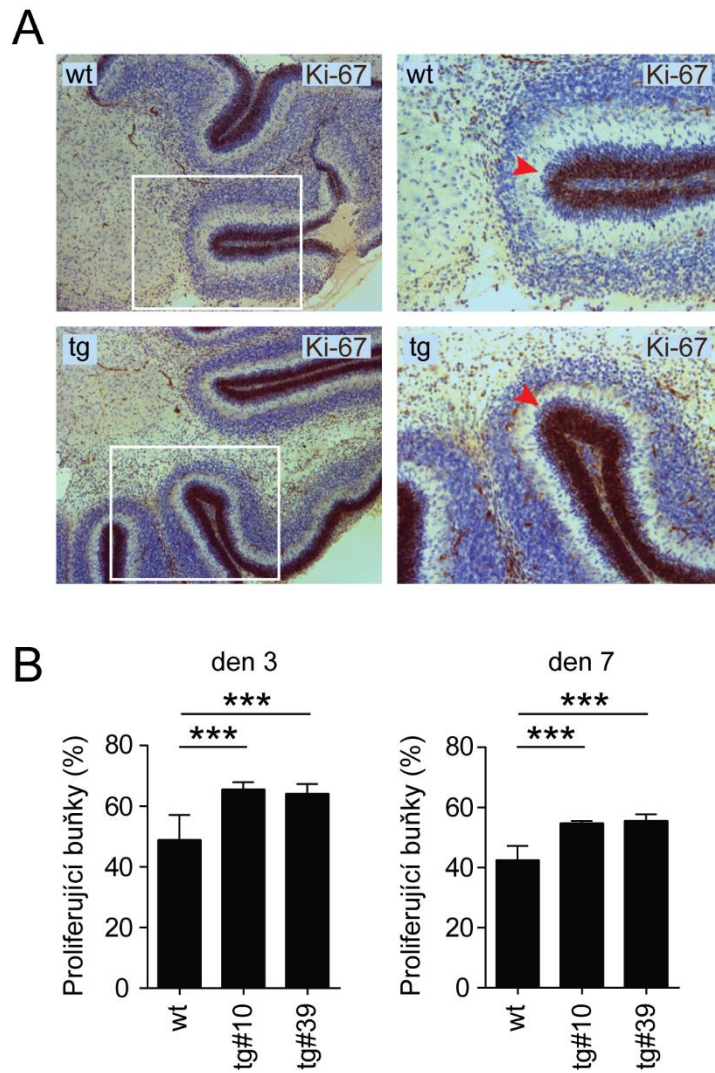
na proliferaci GCP. U tg myši je více buněk pozitivně barvených na proliferační antigen, jejich vrstva je širší a pokrývá, na rozdíl od wt myši, skoro celou oblast EGL (Obr. 55 a 56A).

Procenta proliferujících buněk u tg a wt myši jsme poté určili jako počet Ki-67 pozitivních buněk dělený počtem všech buněk barvených hematoxylinem. Tímto způsobem jsme potvrdili, že v obou dvou sledovaných časových bodech (den 3 a den7) bylo u obou dvou kmenů tg myši (tg#10 a tg#39) možné nalézt více proliferujících buněk než u wt myši ze stejného vrhu. Den třetí se procenta Ki-67 pozitivních buněk zvýšila na 66 % u tg#10 a na 64 % u tg#39 myši v porovnání s 49 % pro wt myši, sedmý den se procenta zvýšila na 55 % u tg#10 i tg#39 myši v porovnání s 42 % pro wt myši (Obr. 56B, Tab. 38).



Obrázek 55. PCNA: Proliferace GCP v EGL mozečku novorozené wt a tg myši.

Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení sagitálního řezu mozečku myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenní myši (tg) sedmý den po narození. Pro barvení vzorků byla použita protilátka proti PCNA (hnědá) a hematoxylin (modrá). Ukázán je výsledek barvení mozečku myši linie tg#39, barvení mozečku myši linie tg#10 je srovnatelné. Šipka ukazuje silnější vrstvu proliferujících buněk (PCNA pozitivní, hnědá) u tg myši v porovnání s wt myši.



Obrázek 56. Ki-67: Proliferace GCP v EGL mozečku novorozené wt a tg myši.

(A) Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení sagitálního řezu mozečku myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenní myši (tg) sedmý den po narození. Pro barvení vzorků byla použita protilátka proti Ki-67 (hnědá) a hematoxylin (modrá). Ukázán je výsledek barvení mozečku myši linie tg#39, barvení mozečku myši linie tg#10 je srovnatelné. Šipka ukazuje silnější vrstvu proliferujících buněk (Ki-67 pozitivní, hnědá) u tg myši v porovnání s wt myši.

(B) Procenta proliferujících buněk v EGL vrstvě mozečku novorozené wt a tg myši třetí a sedmý den po narození stanovená jako počet Ki-67 pozitivních buněk dělený celkovým počtem buněk barvených hematoxylinem. Znázorněny jsou průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a úroveň statistické významnosti (***) $P < 0,001$.

	mozeček den 3		
	wt	tg#10	tg#39
Procento proliferujících buněk Mean ± SD (N)	48,87 ± 8,219 (16)	65,53 ± 2,396 (9)	64,14 ± 3,176 (7)

	mozeček den 7		
	wt	tg#10	tg#39
Procento proliferujících buněk Mean ± SD (N)	42,49 ± 4,681 (14)	54,69 ± 0,752 (3)	55,49 ± 2,212 (13)

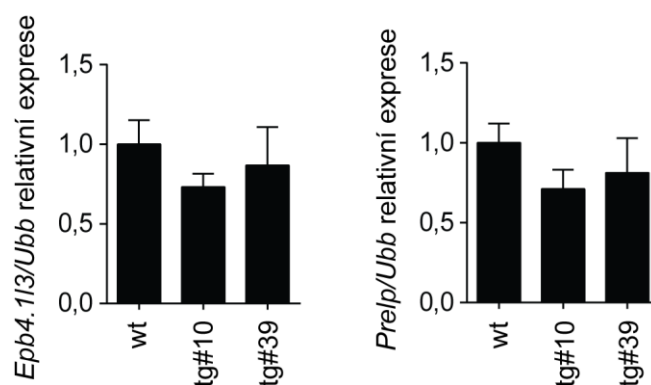
Tabulka 38. Procenta proliferujících GPC v EGL mozečku novorozené wt a tg myši.

Procenta proliferujících (Ki-67 pozitivních buněk) v EGL vrstvě mozečku myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenních myši (tg#10 a tg#39) třetí a sedmý den po narození. Uvedena jsou procenta Ki-67 pozitivních buněk z celkového počtu buněk barveného hematoxylinem. Imunohistochemicky barvené sagitální řezy mozečku byly vyhodnoceny v programu ImageJ. V tabulce jsou uvedeny průměry hodnot jednotlivých vzorků (Mean) ± směrodatná odchylka (SD) a počet vzorků (N).

V několika předchozích kapitolách byly prezentovány výsledky získané s použitím myších neurálních progenitorových buněk C17.2. Buňky C17.2 byly původně izolované z mozečku novorozené myši, z oblasti EGL (Snyder et al. 1992). V jedenácté kapitole výsledků jsme ukázali, že nadexprese genu *Disp3* v buňkách C17.2 snižuje expresi genů *Epb4.113* a *Prelp*. Vzhledem ke zvýšené expresi genu *Disp3* v dané oblasti mozečku u PLP/DISP3 transgenních myši jsme se rozhodli zjistit, zda nedochází také u těchto myši k nějakým změnám v expresi genů *Epb4.113* a *Prelp*.

Pomocí metody qPCR jsme zjistili, že v obou liniích tg myši (tg#10 a tg#39) je možné v mozečku třetí den po narození pozorovat slabý pokles exprese u obou genů, jak u genu *Epb4.113*, tak i u genu *Prelp*. Exprese genu *Epb4.113* se u tg#10 a tg#39 myši snížila na 73 a 87 procent v porovnání s wt myšmi, exprese genu *Prelp* klesla u tg#10 a tg#39 myši na 71 a 81 procent v porovnání s wt myšmi (Obr. 57, Tab. 39). Tyto výsledky tak ukázaly, že nadexprese genu *Disp3* způsobuje u buněk mozečku pokles exprese genů *Epb4.113* a *Prelp*, a to jak *in vitro* u buněk C17.2, tak i *in vivo* v mozečku novorozené tg myši.

Výsledky v této kapitole ukazují, že u novorozených PLP/DISP3 transgenních myši dochází třetí i sedmý den po narození v mozečku, v důsledku nadexprese genu *Disp3* ke zvýšené proliferaci GPC buněk v EGL vrstvě. Dále také u transgenních myši došlo k poklesu exprese genů *Epb4.113* a *Prelp*, což jsou geny spojené se vznikem a progresí několika typů nádorů.



Obrázek 57. Expresse genů *Epb4.113* a *Prelp* v mozečku novorozené wt a tg myši.

Relativní hladiny *Epb4.113* a *Prelp* mRNA v mozečku myši divokého typu (wt) a v mozečku PLP/DISP3 transgenních myši (tg#10 a tg#39) třetí den po narození. Hladiny mRNA byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. Znázorněny jsou průměrné hodnoty hladiny mRNA stanovené pro dva až čtyři jedince a směrodatné odchylky.

	mozeček den 3		
	wt	tg#10	tg#39
<i>Epb4.113/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD (N)	1,00 \pm 0,151 (4)	0,73 \pm 0,083 (3)	0,87 \pm 0,241 (3)
<i>Prelp/Ubb</i> relativní exprese Mean \pm SD (N)	1,00 \pm 0,121 (3)	0,71 \pm 0,121 (3)	0,81 \pm 0,218 (2)

Tabulka 39. Relativní hladina *Epb4.113* a *Prelp* mRNA v mozečku novorozené wt a tg myši.

Hladiny *Epb4.113* a *Prelp* mRNA v mozečku myši divokého typu (wt) a PLP/DISP3 transgenních myši (tg#10 a tg#39) třetí den po narození byly stanoveny metodou qPCR, *Ubb* byl použit jako referenční gen. V tabulce jsou uvedeny průměry hodnot stanovené pro jednotlivé myši (Mean) \pm směrodatná odchylka (SD) a počet sledovaných jedinců (N).

10 Diskuze

Výsledky uvedené v této práci se především týkají důležitého tématu regulace rovnováhy mezi proliferací a diferenciací neurálních buněk. Pro vývoj a správné fungování CNS u savců je právě přesná regulace všech procesů ovlivňujících proliferaci a diferenciaci neurálních buněk klíčová a jakékoliv narušení může mít za následek vznik a rozvoj mnoha typů neurologických poruch včetně nádorových onemocnění. Proto jsme se rozhodli věnovat studiu proteinu DISP3 a jeho funkci v neurálních buňkách. Gen *DISP3*, známý také jako *PTCHD2* je totiž exprimován především v tkáních neurálního původu, jako jsou mozek a sítnice. Protein DISP3 patří do rodiny PTCHD proteinů (Zikova et al. 2009). Specifická funkce jednotlivých členů této rodiny v buňkách savčího organismu zatím není příliš známá, ale minimálně u dvou členů této rodiny, u proteinů PTCHD1 a PTCHD3, bylo prokázáno jejich spojení s různými typy neurologických poruch (Marshall et al. 2008; Noor et al. 2010a; Filges et al. 2011; Chaudhry et al. 2015; Torrico et al. 2015; Wells et al. 2016; Ghahramani Seno et al. 2011)

V této práci jsme se nejprve pokusili popsat vliv změn v expresi genu *Disp3* na myší neurální kmenové a progenitorové buňky. Zaměřili jsme se především na proliferaci a diferenciaci těchto buněk, ale pozorovali jsme i změny v buněčném cyklu, senescenci, apoptóze a genové expresi. Dále jsme stanovili změny v expresi genu *DISP3* v lidských neurálních nádorech, především v meduloblastomech. Také jsme popsali vliv tohoto genu na proliferaci nádorových buněk. Nakonec jsme se zaměřili na popis DISP3 transgenních myší. U těch jsme pozorovali změny v proliferaci neurálních buněk v oblasti mozku, která je klíčová právě pro vznik meduloblastomů.

10.1 Role proteinu DISP3 v neurálních buňkách *in vitro*

V první části této dizertační práce jsme se pokusili popsat roli proteinu DISP3 v myších neurálních kmenových a progenitorových buňkách NS-5 a C17.2 *in vitro*. Popsali jsme pozitivní vliv thyroidního hormonu trijodthyroninu (T3) na expresi genu *Disp3* v NS-5 buňkách a pokles *Disp3* exprese v důsledku diferenciaci těchto buněk do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů. Pro další experimenty jsme připravili NS-5 a C17.2 buňky s modulovanou expresí genu *Disp3*. Buňky s nadexpresí genu *Disp3* rychleji proliferovaly, měly jiné rozložení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a také měly méně apoptotických buněk v populaci po poškození. Tyto buňky také byly méně náchylné ke spontánní diferenciaci a obecně vykazovaly nižší diferenciační potenciál, a to nejen v porovnání s buňkami

kontrolními, ale především v porovnání s buňkami, ve kterých byl gen *Disp3* mutován metodou CRISPR/Cas9. Pomocí mikročipové analýzy jsme pak také sledovali změny v genové expresi, ke kterým docházelo v buňkách v důsledku modulace exprese *Disp3* genu. Identifikovali jsme tak celkem sedm genů (*Igfbp7*, *Lipt1*, *Dgka*, *Brsk1*, *Edg8*, *Epb4.1l3* a *Prelp*), jejichž exprese je změněná buď v buňkách NS-5 s mutovaným genem *Disp3* nebo v buňkách C17.2 s nadexpresí *Disp3* genu.

Na vývoj a funkci CNS a na proliferaci a diferenciaci neurálních buněk má od rané embryogeneze až po neurogenezi v dospělém jedinci vliv velké množství faktorů. Jedním z klíčových hráčů je thyroïdní hormon. TH je totiž schopen ovlivňovat jak proliferaci, tak i diferenciaci, migraci, synaptogenezi a myelinizaci neurálních buněk (shrnuto v Bernal 2000; Remaud et al. 2014; Préau et al. 2015). Prenatálně působí TH na diferenciaci buněk radiálních glií (Martínez-Galán et al. 1997) a jeho nedostatek mimo jiné způsobuje snížení proliferace buněk v mozkové kůře (Mohan et al. 2012). TH také ovlivňuje diferenciaci astrocytů (Manzano et al. 2007) a Purkyňových a Bergmanových buněk (Fauquier et al. 2014) v mozečku. V raně postnatálním mozku myši pak dochází v důsledku nedostatku TH k prodloužení fáze proliferace neurálních prekurzorů (Hadj-Sahraoui et al. 2000). TH ale ovlivňuje také proliferaci a diferenciaci neurálních buněk v dospělém jedinci, protože jak v oblasti SVZ tak i v oblasti SGZ je proliferace, přežití, diferenciace i migrace neurálních buněk negativně ovlivněná nedostatkem TH (Lemkine et al. 2005; Montero-Pedrazuela et al. 2006; Ambrogini et al. 2005; Desouza et al. 2005). Působení TH na NSC je možné prokázat nejen *in vivo*, ale i *in vitro*, protože například u buněk izolovaných z SGZ podporuje thyroïdní hormon T3 jejich proliferaci, přežití a gliální diferenciaci (Desouza et al. 2005).

DISP3 byl identifikován během studie, která se zabývala geny regulovanými thyroïdním hormonem T3. U kuřat bylo zjištěno, že v důsledku nedostatku TH během embryonálního vývoje dochází k poklesu exprese genu *DISP3* v retině. *In vitro* je exprese genu *DISP3* regulována prostřednictvím T3, a to jak pozitivně tak i negativně v závislosti na buněčném typu (Zikova et al. 2009). Na základě těchto našich předchozích výsledků jsme se rozhodli zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňuje TH expresi genu *Disp3* v myších neurálních kmenových buňkách. Přidání T3 do média způsobilo zvýšení exprese genu *Disp3* v NSC, naopak kompetitivní THR inhibitor exprese genu *Disp3* snižoval. Z tohoto výsledku tak vyplývá, že exprese námi studovaného genu *Disp3* je v NS-5 buňkách pozitivně regulována hormonem, jehož vliv na proliferaci a diferenciaci NSC byl mnohokrát popsán a prokázán.

Savčí NSC patří do multipotentních kmenových buněk, které mají schopnost sebeobnovy a zároveň potenciál diferencovat do tří základních neurálních buněčných typů, astrocytů,

neuronů a oligodendrocytů. Během diferenciaci buněk se výrazně mění jejich vzhled, tvar, velikost a funkční vlastnosti. Tyto změny jsou provázány i změnami v expresním profilu. Expres některých genů je pro určité typy buněk tak charakteristická, že je možné využít tyto geny jako markery jednotlivých buněčných typů. Za marker nediferencovaných NSC je považován protein nestin, který patří do intermediálních filament typu IV (Lendahl et al. 1990). Zatímco exprese nestinu v průběhu diferenciaci buněk klesá (Frederiksen a McKay 1988), dochází naopak k nárůstu exprese genů typických pro diferencované buňky. Astrocyty je možné odlišit od dalších buněčných typů pomocí gliálního fibrilárního kyselého proteinu GFAP (Jacque et al. 1978). Pro neurony je typická exprese neuronálně specifické součásti mikrotubulárního komplexu buněk β III-tubulinu (Lee et al. 1990) a gen *Plp1*, který kóduje transmembránový proteolipid je možné použít jako marker oligodendrocytů (Naismith et al. 1985). Oligodendrocyty je ale také možné sledovat pomocí O4 antigenu, který se vyskytuje na jejich povrchu (Sommer a Schachner 1981).

Vzhledem k tomu, jak výrazné jsou rozdíly v expresních profilech nediferencovaných a diferencovaných buněk, sledovali jsme, zda se také mění exprese genu *Disp3* během diferenciaci NSC *in vitro*. Výsledky ukázaly kolísání hladiny *Disp3* mRNA během diferenciaci NS-5 buněk a sníženou hladinu exprese genu *Disp3* v astrocytech, neuronech i oligodendrocytech v porovnání s nediferencovanými buňkami, a to jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu. K nejvýraznějšímu poklesu exprese genu *Disp3* docházelo u buněk diferencovaných do astrocytů. Tyto naše výsledky ukazují, že během diferenciaci NSC dochází k regulaci exprese genu *Disp3*, což by mohlo znamenat, že úroveň exprese genu *Disp3* je pro správný průběh diferenciaci důležitá.

V této práci byla použita linie myších neurálních kmenových buněk pojmenovaná NS-5. NSC pro *in vitro* kultivaci je možné izolovat buď z mozku myšího plodu (Davis a Temple 1994), nebo ze specifických oblastí mozku dospělého jedince (Reynolds a Weiss 1992). Alternativně je možné NSC získat diferenciací ESCs (Ying et al. 2003). Buněčná linie NS-5 byla připravena diferenciací adherentních ESCs do neurálních prekurzorů na miskách s upraveným povrchem. Selekcí buněk exprimujících gen *Sox1* typický pro neurální buňky došlo k odstranění nediferencovaných ESCs a buněk diferencovaných do jiných než neurálních buněčných typů. Následnou kultivací v přítomnosti růstových faktorů EGF a FGF-2 byla získána homogenní populace adherentních bipolárních buněk, která se může množit symetrickým dělením, ale která je zároveň schopná diferencovat do astrocytů, neuronů i oligodendrocytů (Conti et al. 2005; Glaser et al. 2007).

Další buněčnou linií použitou v této práci byla linie myších progenitorových buněk C17.2. Tato buněčná linie byla připravena v-myc imortalizací buněk izolovaných z oblasti EGL mozečku novorozené myši (Snyder et al. 1992). V oblasti EGL dochází u myši po narození k masivní proliferaci buněk zvaných GCP (Fujita et al. 1966) a přesná regulace tohoto procesu je klíčová pro normální vývoj mozečku. Naopak abnormální zvýšení proliferace GCP může vést ke vzniku patologií, například agresivních dětských nádorů meduloblastomů (Schuller et al. 2008; Gibson et al. 2010).

Zjistili jsme, že buňky NS-5 mají přirozeně relativně vysokou míru exprese genu *Disp3*, naopak v buňkách C17.2 je exprese genu *Disp3* velice nízká. Pro další experimenty jsme se tak rozhodli připravit buňky NS-5 a C17.2 s modulovanou expresí genu *Disp3*. Pomocí technologie CRISPR/Cas9 jsme vytvořili NS-5 buňky s mutovaným genem *Disp3* a tudíž s jeho sníženou expresí. Dále jsme připravili buňky NS-5 s expresí *Disp3* sníženou pomocí shRNA a buňky NS-5 s nadexpresí genu *Disp3*. Vzhledem k velmi nízké hladině exprese genu *Disp3* v C17.2 buňkách bylo možné vytvořit pouze C17.2 buňky s nadexpresí genu *Disp3*. Všechny tyto nové buněčné linie nám v dalších pokusech sloužily jako vhodný nástroj pro studium vlivu změn exprese genu *Disp3* na neurální buňky *in vitro*.

Regulace proliferace a diferenciaci neurálních buněk je klíčová pro vývoj a správné fungování CNS. Jakékoliv poškození rovnováhy, například abnormální proliferace buněk, může vést ke vzniku patologií, jako jsou například mozkové nádory (Schuller et al. 2008; Gibson et al. 2010). Proto jsme se rozhodli kvantifikovat rychlost proliferace všech nových buněčných linií. Zjistili jsme, že nadexprese genu *Disp3* zvyšuje rychlost růstu jak neurálních kmenových buněk NS-5, tak i progenitorových buněk C17.2 a naopak mutace a snížená exprese genu *Disp3* má negativní vliv na růst NS-5 buněk. Také růstová křivka a imunofluorescenční barvení potvrdily pozitivní vliv nadprodukce mRNA genu *Disp3* na rychlost proliferace neurálních kmenových buněk.

Pro přechod NSC z proliferační fáze k diferenciaci je nutné, aby došlo k zastavení buněčného cyklu těchto buněk. Tento proces řídí především dvě cyklin-dependentní kinázy, proteiny p21 a p27 (Seoane et al. 2004; Fero et al. 1996). Správná regulace průchodu buněčným cyklem je pro normální rychlost proliferace, udržení kmenovosti a pro zahájení diferenciaci NSC buněk velmi důležitá. Z tohoto důvodu jsme sledovali buněčný cyklus NS-5 buněk s modulovanou expresí genu *Disp3*. V důsledku modulace exprese genu *Disp3* došlo ke změně v distribuci buněk v rámci jednotlivých fází buněčného cyklu. U NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3* se zvyšoval jejich podíl v G2/M fázi. Naopak NS-5 buňky s nadexpresí genu *Disp3* měly v G2/M fázi menší procento buněk a zvýšení jejich počtu můžeme pozorovat spíše

v S fázi buněčného cyklu. NSC, na rozdíl od migrujících postmitotických neurálních prekursorových buněk, nejsou schopné během vývoje mozku aktivovat prostřednictvím p21 proteinu G1/S kontrolní bod (G1/S checkpoint) buněčného cyklu a místo toho využívají G2/M kontrolní bod (G2/M checkpoint, Roque et al. 2012). Vzhledem k nižší proliferační aktivitě buněk s mutovaným genem *Disp3* a tudíž k pomalejšímu průchodu těchto buněk buněčným cyklem je možné, že k akumulaci těchto buněk v G2/M fázi buněčného cyklu dochází v důsledku aktivace G2/M kontrolního bodu.

Expresí proteinu p16 (INK4a) se v živém organismu během stárnutí v mnoha tkáních postupně zvyšuje (Tsygankov et al. 2009). Protein p16 působí jako tumor supresor, snižuje proliferační kapacitu buněk, podporuje ukončení buněčného cyklu a přechod buněk do stádia tzv. senescence (Hara et al. 1996). Senescence je ireversibilní stav, buňky ale neumírají a mohou v tomto stádiu setrvat i několik let (Campisi 1997). Při studiu genů, jejichž snížená exprese je schopná ovlivňovat funkci proteinu p16 a zástavu buněčného cyklu byl nalezen i gen *DISP3* (Bishop et al. 2010). Sledovali jsme proto výskyt senescentních buněk v populaci NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3*. Po dlouhodobé kultivaci jsme zaznamenali sporadický výskyt senescentních buněk. Tento výsledek ale nebyl příliš výrazný, což souhlasí s obecně přijímaným názorem, že kmenové buňky odvozené z embryonálních buněk nebo tkání nejsou na rozdíl od somatických buněk příliš vhodné pro studium senescence.

Programovaná buněčná smrt apoptóza představuje hlavní způsob eliminace buněk z populace NSC po poškození jejich DNA (Limoli et al. 2004; Acharya et al. 2010). Protože exprese genu *Disp3* ovlivňovala proliferaci, buněčný cyklus a senescenci, rozhodli jsme se jako další parametr pro charakterizaci fenotypu buněk s mutovaným nebo nadexprimovaným genem *Disp3* sledovat apoptózu NS-5 buněk. Ze získaných výsledků vyplynulo, že exprese genu *Disp3* může ovlivňovat apoptózu buněk s DNA poškozenou γ zářením. V populaci buněk po ozáření bylo více apoptotických buněk v NS-5 buňkách s mutovaným genem *Disp3* a méně apoptotických buněk u NS-5 buněk s *DISP3* nadprodukcí.

Rovnováha mezi sebeobnovou - proliferací a diferenciací je pro NSC v organismu klíčová. Schopnost udržet si kmenovost, tj. za růstových podmínek se symetricky dělit bez známek spontánní diferenciaci, je tak jednou z nejdůležitějších a nejsledovanějších vlastností neurálních kmenových i progenitorových buněk *in vitro*. U NS-5 buněk s mutovaným genem *Disp3* jsme pozorovali zřetelné morfologické změny. Buňky měly jiný tvar a prodloužené výběžky. Tyto buňky dále měly nižší hladinu exprese markeru nediferencovaných buněk nestinu a naopak zvýšenou expresi neuronového markeru β III-tubulinu. Expresí β III-tubulinu je v nediferencovaných buňkách výrazně nižší než v buňkách po diferenciaci do neuronů, ale

zároveň není tak nízká, aby jí nebylo možné spolehlivě detekovat. Rozdíly v expresi nebyly na úrovni mRNA velké, ale pomocí imunoflorescenčního barvení proteinu β III-tubulinu a automatické obrazové analýzy jsme zaznamenali zřetelné navýšení počtu β III-tubulin pozitivních buněk v populaci s mutací v genu *Disp3*. Opačné výsledky jsme získali u buněk s nadexpresí genu *Disp3*. Z našich zjištění tak vyplývá, že DISP3 pomáhá neurálním kmenovým a progenitorovým buňkám udržet si kmenovost a naopak pokles jeho exprese podporuje spontánní neuronální diferenciaci buněk.

Protein DISP3 obsahuje ve své struktuře evolučně konzervovanou doménu SSD a je fylogeneticky příbuzný dalším proteinům s touto doménou (Zikova et al. 2009). V mnoha studiích byly identifikovány genetické mutace a vzácné alely genů kódujících proteiny obsahující SSD ve spojitosti s neuropatologickými změnami, neurologickými poruchami a obecně s defekty v proliferaci, přežití, migraci a diferenciaci NSC.

Například mutace v genu *NPC1* způsobují u lidí vzácné autozomálně recesivní onemocnění Niemann-Pickovu chorobu typu C. Tato nemoc je spojená s poškozením transportu cholesterolu v buňce a s jeho akumulací v lysozomech. Součástí projevů této nemoci mohou být progresivní neurodegenerativní změny, kdy dochází k demyelinizaci axonů neuronů a k jejich odumírání (Ikonen a Holtta-Vuori 2004). Transport cholesterolu je v NPC1 deficientních neuronech poškozen (Karten et al. 2002) a neurony nedokáží správně interpretovat signály zprostředkované neurotrofními faktory (Henderson et al. 2000). Delece genu *Npc1* ovlivňuje nejen neurony, ale i myši NSC, protože potlačuje jejich sebeobnovu, potenciál formovat neurosféry a také diferenciaci do astrocytů (Yang et al. 2006). Lidské NSC, vytvořené z indukovaných pluripotentních buněk pacientů homozygotních pro nejčastěji se vyskytující mutaci v genu *NPC1*, byly také defektní. Neurony diferencované z těchto NSC vykazovaly fenotyp předčasné buněčné smrti a jejich expresní profil potvrdil poškození důležitých signálních drah, například WNT signalizace (Efthymiou et al. 2015).

Další lidské autozomálně recesivní onemocnění spojené s mutací SSD proteinu a metabolismem cholesterolu, které ve svých projevech zahrnuje i neuropatologické změny je Smithův-Lemliův-Opitzův syndrom (SLOS). Jedná se o poruchu syntézy cholesterolu způsobenou mutací genu *DHCR7* (Waterham et al. 1998). Indukované pluripotentní buňky získané ze SLOS pacientů vykazovaly výraznou tendenci diferencovat do neuronů a spontánně ztrácely svou kmenovost (Francis et al. 2016).

Také další SSD proteiny PTCHD1 a PTCHD3, které jsou proteinu DISP3 (známému také jako PTCHD2) příbuzné je možné spojit s neurologickými defekty. Bylo popsáno mnoho mutací a delecí přítomných v genu *PTCHD1* nebo v jeho promotoru, které je možné nalézt

u pacientů s mentálním postižením a s autistickou poruchou (Marshall et al. 2008; Noor et al. 2010b; Filges et al. 2011; Chaudhry et al. 2015; Torrico et al. 2015). Myši s delecí tohoto genu vykazovaly poruchy učení, měly motorické defekty a byly hyperagresivní (Wells et al. 2016). Synapse neuronů v hipokampu těchto myši byly poškozené a měnil se i jejich expresní profil (Ung et al. 2017). Také delece genu *PTCHD3* se vyskytují častěji u pacientu s poruchou autistického spektra (Ghahramani Seno et al. 2011).

Ve velmi nedávné době bylo navíc zjištěno, že i protein DISP3 by mohl ovlivňovat rozvoj neurologických patologií. Mutace v genu *DISP3* byly totiž nalezeny u pacientů s mentálním postižením, a to v populaci se zvýšeným výskytem příbuzenských sňatků (Froukh 2017).

Většina mutací v genu *PTCHD1* podporující rozvoj mentálních poruch byla identifikována u mužských pacientů, a to zřejmě v důsledku toho, že se gen *PTCHD1* nachází na X chromozomu. Gen *DISP3* je u lidí lokalizovaný na chromozomu 1 a jeho spojitost s mentálními poruchami tak byla identifikována až celoexomovým sekvenováním imbredních rodin.

Na možnou roli proteinu DISP3 v diferenciaci neurálních buněk může také ukazovat další studie. Gen *DISP3* byl totiž nalezen jako jeden z odlišně exprimovaných genů v buňkách s delecí genu *TSC2*. Mutace v tomto genu způsobuje u lidí onemocnění zvané tuberózní skleróza, kterou provází i neuropatologické symptomy jako jsou autismus, mentální retardace a epilepsie. Buňky s delecí genu *TSC2* měly, kromě změněného expresního profilu zahrnujícího i gen *DISP3*, sníženou schopnost diferencovat do neuronů a poškozenou synaptogenezi (Costa et al. 2016).

Všechny uvedené studie poukazují na výrazný vliv SSD proteinů na neurální buňky, především na jejich diferenciaci. Rozhodli jsme se proto *in vitro* sledovat dopad modulované exprese genu *Disp3* na diferenciaci myších kmenových a progenitorových buněk.

Neurální kmenové buňky NS-5 kultivované v diferenciacním médiu se mohou měnit v astrocyty, neurony a oligodendrocyty. Diferenciaci buněk je možné hodnotit pomocí detekce dříve zmíněných markerů nestinu, genu *Gfap*, β III-tubulinu, genu *Plp1* a O4 antigenu. NS-5 buňky se *in vitro* mění za diferenciacních podmínek v astrocyty s vysokou efektivitou. To znesnadňuje možnost hodnotit vliv genu *Disp3* na tento typ diferenciaci. Na úrovni *Gfap* mRNA jsme proto zaznamenali jen velmi malé rozdíly mezi jednotlivými populacemi buněk. Pomocí automatického vyhodnocení vzorků s imunofluorescenčně obarveným proteinem GFAP jsme ale pozorovali rozdíly ve výskytu vysoce diferencovaných astrocytů. Buňky s mutovaným genem *Disp3* měly těchto buněk v populaci více a naopak buňky s nadexpresí genu *Disp3* jich měly méně. Podobný efekt měla modulovaná exprese genu *Disp3* na diferenciaci NS-5 buněk do neuronů. Populace diferencovaných buněk s mutovaným genem

Disp3 vykazovaly vyšší expresi mRNA β III-tubulinu, měly vyšší poměr výběžků – neuritů na buňku, více procent neuronů v populaci a také více primárních neuritů na neuron. Oligodendrocytová diferenciaci byla také mutací v genu *Disp3* pozitivně modulovaná, protože v diferencované populaci bylo možné v porovnání s buňkami kontrolními nalézt více oligodendrocytů, které byly větší a lépe diferencované. Nadprodukce DISP3 měla na diferenciaci NS-5 buněk opačný vliv. Buňky s nadexpresí vytvářely menší počet vysoce diferencovaných astrocytů, produkovaly méně neuronů s nižším počtem neuritů a také mnohem hůř diferencovaly do oligodendrocytů.

Tyto výsledky velice dobře souhlasily s tím, co jsme zjistili při *in vitro* diferenciaci neurálních progenitorových buněk C17.2 s nadexprimovaným genem *Disp3*. U těchto buněk byl během začátku diferenciaci zpožděn pokles exprese markeru nediferencovaných buněk nestinu. Naopak byla především v pozdějších dnech diferenciaci nižší exprese jak proteinu GFAP tak β III-tubulinu. Také morfologie buněk po diferenciaci se lišila a ukazovala na narušenou schopnost diferenciaci buněk s *Disp3* nadexpresí. V souhrnu všechny tyto výsledky potvrzují, že exprese genu *Disp3* negativně ovlivňuje *in vitro* diferenciaci jak neurálních kmenových, tak i neurálních progenitorových buněk. Mutace v genu *Disp3* diferenciacní potenciál buněk zvyšují, naopak nadprodukce DISP3 efektivní diferenciaci brání.

Abychom doplnili zjištění týkající se fenotypu buněk s modulovanou expresí genu *Disp3* rozhodli jsme se sledovat změny v profilu genové exprese těchto buněk. Identifikovali jsme pět genu, jejichž exprese byla v NS-5 buňkách s mutovaným genem *Disp3* snižená nebo zvýšená. Jednalo se o geny *Igfbp7*, *Lipt1*, *Dgka*, *Brsk1* a *Edg8*. Dále jsme našli dva geny, *Epb4.113* a *Prelp*, jejichž exprese byla v buňkách C17.2 s nadprodukcí mRNA genu *Disp3* snižená. Malý počet identifikovaných genů lze vysvětlit mimo jiné tím, že protein DISP3 není transkripční faktor a tudíž pravděpodobnost, že bude přímo ovlivňovat expresi mnoha genů, je malá. Zároveň ale geny, které byly při této analýze nalezeny, jsou v literatuře známé pro své spojení s vývojem CNS, diferenciací neurálních buněk a vznikem a progresí různých typů nádorů.

Expresí genu *Igfbp7* byla v NS-5 buňkách s mutovaným genem *Disp3* snižená. IGFBP7 (insulin-like growth factor binding protein 7) patří do rodiny proteinů vázajících IGF (insulin-like growth factor) a stejně jako další členové zmíněné rodiny, může v organismu ovlivňovat vznik a růst nádorů. IGFBP7 působí jako tumor supresor v nádorech prostaty (Sprenger et al. 1999) a střeva (Ruan et al. 2007). Zároveň ale jeho exprese podporuje růst kolorektálních nádorových buněk *in vitro* (Rupp et al. 2015). Zvýšená exprese genu *IGFBP7* je pak spojována s rozvojem a rychlým růstem nádorů jícnu (Smith et al. 2014), žaludku (Sato et al. 2015) a s určitými typy sarkomů a liposarkomů (Benassi et al. 2015). V nádorech mozku zvaných

glioblastomy je exprese genu *IGFBP7* zvýšená a její míra koreluje s histologickým nálezem a s prognózou pro pacienty. Protein IGFBP7 dokáže také stimulovat růst glioblastomových buněk *in vitro* (Jiang et al. 2008). Obecně funkce proteinu IGFBP7 ve zdravém mozku nebyla zatím příliš popsána, je ale známo, že IGF2/IGFBP7 signalizace podporuje přežívání neuronů v hipokampu (Agis-Balboa et al. 2011) a zvýšená exprese genu *IGFBP7* byla nalezena i u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (Agbemenyah et al. 2014).

O vlivu proteinu LIPT1 (lipoyltransferase 1), jehož exprese byla v NS-5 buňkách s mutovaným genem *Disp3* také snižena, na CNS savců není mnoho známo. Bylo pouze zjištěno, že mutace v tomto genu způsobuje onemocnění, které se projevuje mimo jiné i poškozením mozku (Soreze et al. 2013).

Další gen, jehož exprese byla v myších neurálních buňkách s mutovaným genem *Disp3* nižší, je *Dgka*. DGKA (diacylglycerol kinase alpha) patří do rodiny diacylglycerolových kináz a je exprimován v oligodendrocytech, kde se podílí na vytváření myelinové pochvy (Goto et al. 1992). I tento gen je spojován s onkogenezí, jelikož ovlivňuje růst melanomů, nádorů slinivky a jater (Yanagisawa et al. 2007; Carter et al. 2010; Takeishi et al. 2012). Dále také bylo zjištěno, že potlačení jeho exprese v glioblastomových buňkách indukuje apoptózu (Kefas et al. 2013; Dominguez et al. 2013).

BRSK1, jehož exprese byla ve sledovaných buňkách snižena, je AMP-aktivovaná serin/treonin kináza specificky exprimovaná v mozku. Tento protein je klíčový pro diferenciaci a především správnou polarizaci neuronů. Neurony postrádající jak gen *Brsk1*, tak i příbuzný gen *Brsk2* mají odlišnou morfologii s poškozeným axonem, který je skoro nemožné rozlišit od dendritů. Myši s mutacemi v těchto genech měly poškozený mozek se špatnou segregací jednotlivých subtypů neuronů (Muller et al. 2010). BRSK1 také hraje roli v regulaci buněčného cyklu (Lu et al. 2004; Alvarado-Kristensson et al. 2009).

Jediný gen, jehož exprese byla v buňkách s mutovaným genem *Disp3* zvýšená, je gen *Edg8* (endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 8). Tento gen kóduje receptor exprimovaný především v oligodendrocytech a astrocytech. Během vývoje mozku je gen *Edg8* exprimován v buňkách radiálních glií a ovlivňuje jejich diferenciaci do astrocytů (Ulfig a Briese 2004). *Edg8* je exprimován také v nematurovaných a maturovaných oligodendrocytech a ovlivňuje jejich přežívání (Jaillard et al. 2005). Vysoká exprese tohoto genu byla nalezena i v určitých typech glioblastomů (Quint et al. 2014).

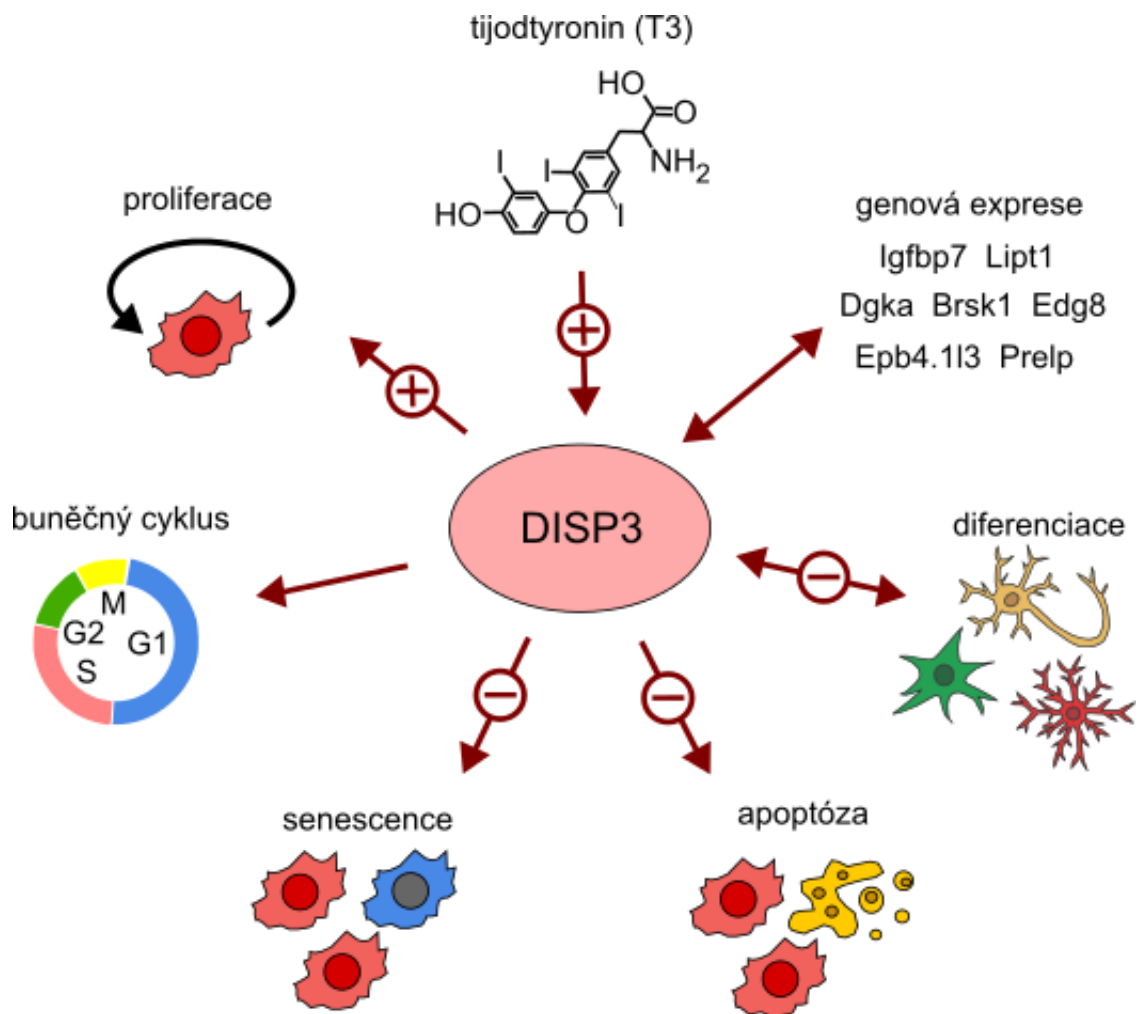
V buňkách C17.2 s nadexpresí genu *Disp3* byla snižena exprese genu *Epb4.1l3*. EPB4.1L3 (erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3) patří do rodiny proteinů, které spojují

transmembránové proteiny s aktinovým cytoskeletem a jeho delece je často spojována s nádory mozku, žaludku, prsou a prostaty (Tran et al. 1998).

Poslední nalezený gen *Prelp* byl v C17.2 buňkách s nadexpresí genu *Disp3* také exprimován méně. PRELP (proline and arginine rich end leucine rich repeat protein) je jako předchozí zmíněné proteiny spojován s onkogenezí, konkrétně jeho odlišná exprese byla nalezena v glioblastomech a meningiomech (Behin et al. 2003; Lamszus 2004). Tento gen se ale zřejmě může podílet i na regulaci senescence (Tarunina et al. 2004) a jeho poškození se výrazně podílí na rozvoji syndromu předčasného stárnutí (Hutchinson-Gilford syndrom, Lewis 2003).

Nalezené geny, jejichž exprese byla snižena nebo zvýšená v důsledku manipulace s expresí genu *Disp3* v myších neurálních a progenitorových buňkách, ovlivňují diferenciaci a proliferaci neurálních buněk, buněčný cyklus a senescenci, většina z nich se také podílí na vzniku a progresi různých typů nádorů. Tato zjištění podporují naše tvrzení, že míra exprese genu *Disp3* je důležitá pro proliferaci, přežití a diferenciaci neurálních buněk. Výsledky dále naznačují také možné zapojení genu *Disp3* do procesu onkogeneze.

In vitro experimenty, při kterých jsme použili myši neurální kmenové a progenitorové buňky NS-5 a C17.2 nám pomohly lépe pochopit roli, jakou hraje protein DISP3 v neurálních buňkách. Pozitivní vliv thyroïdního hormonu na expresi genu *Disp3* naznačuje, že TH může ovlivňovat diferenciaci a proliferaci neurálních buněk mimo jiné i prostřednictvím regulace exprese genu *Disp3*. Pokles exprese genu *Disp3* v diferencovaných buňkách zase ukazuje na jeho regulaci během tohoto procesu. Změny v expresi genu *Disp3* ovlivňovaly proliferaci buněk, buněčný cyklus, senescenci, apoptózu, diferenciaci buněk a expresi několika genů (Obr. 58). V souhrnu je tak zřejmé, že protein DISP3 je jedním z faktorů, které regulují přechod neurálních buněk z proliferační fáze k diferenciaci. Dále protein DISP3 může stejně jako příbuzné SSD proteiny ovlivňovat rozvoj různých neuropatologií a také by se mohl podílet na vzniku a progresi nádorů.



Obrázek 58. Zapojení proteinu DISP3 do různých buněčných procesů.

Schématický náčrt znázorňující působení proteinu DISP3 v neurálních buňkách. TH pozitivně reguluje expresi *DISP3* genu. DISP3 dále podporuje proliferaci neurálních buněk a ovlivňuje jejich průchod buněčným cyklem. Vysoká hladina DISP3 chrání buňky před senescencí a před apoptózou. Při diferenciaci neurálních buněk klesá úroveň exprese genu *DISP3*. Zvýšená hladina DISP3 dále brání neurálním buňkám v efektivní diferenciaci a množství DISP3 přítomné v buňkách ovlivňuje expresi několika dalších genů.

10.2 Vliv proteinu DISP3 na mozek člověka a myši

V dalších částech této dizertační práce jsme se zaměřili na funkci proteinu DISP3 *in vivo*. Nejprve jsme se zabývali expresí genu *DISP3* v lidských neurálních nádorech a nádorových buňkách a poté jsme sledovali vliv abnormální exprese genu *Disp3* na mozek transgenních myši. V porovnání s několika dalšími typy nádorů mozku byla úroveň exprese genu *DISP3* nejvyšší v meduloblastomech subtypu 4. Nadexprese genu *DISP3* v linii meduloblastomových buněk DAOY zvyšovala rychlost jejich proliferace a naopak poškození genu *DISP3* cílenou mutagenézou vedlo ke zpomalení rychlosti růstu meduloblastomové linie D341. Transgenní myši, které nadexprimovaly gen *DISP3* pomocí *PLP* promotoru měly zvýšenou hladinu exprese tohoto genu především v posteriorních oblastech mozku. V mozečku novorozených transgenních myši docházelo ke zvýšení proliferační aktivity buněk a měnila se i exprese genů *Epb4.1l3* a *Prelp*, které jsme identifikovali při *in vitro* pokusech s C17.2 buňkami.

Již dříve bylo prokázáno, že mutace v genu *DISP3* mohou podporovat vznik určitých typů nádorů mozku (Johansson et al. 2004). Později bylo dále zjištěno, že v neoplastických prekurzorech pancreatických adenokarcinomů je gen *DISP3* výrazně více metylován (Hong et al. 2012). Až ale teprve v nedávné době se objevily další studie dokládající vztah genu *DISP3* a onkogeneze. Zvýšená exprese genu *DISP3* byla nalezena v osteosarkomových buňkách s vysokým metastatickým potenciálem (Morrow et al. 2016). Dále bylo zjištěno, že metylace genu *DISP3* souvisí s rizikem při progresi nádorů slinivky břišní (Hata et al. 2017) a že mutace v genu *DISP3* se velice často vyskytují v DNA vzorků vzácných melanomů ústní sliznice (oral mucosal melanoma, Lyu et al. 2018). Gen *DISP3* je také jedním z nejčastěji mutovaných genů v nádorech střev, které se vyskytují u pacientů s familiární adenomatózní polypózou (Thomas et al. 2017). Výsledky uvedené ve všech těchto studiích tak silně potvrzují vliv proteinu DISP3 na vznik a růst mnoha typů nádorů.

V oblasti mozečku v mozku novorozené myši je exprese genu *Disp3* řízená transkripčním faktorem ATOH1. Tento protein hraje klíčovou roli především v proliferaci, migraci a iniciaci diferenciace neurálních buněk mozečku (Klisch et al. 2011). Důležité je, že ATOH1 se spolu s dalšími faktory podílí na inicializaci vzniku mozkových nádorů, meduloblastomů (Ayrault et al. 2010). Meduloblastomy představují jeden z nejčastějších, vysoce maligních pediatrických nádorů mozku vznikajících v oblasti mozečku. Na základě exprese určitých markerových genů je možné meduloblastomy rozdělit do čtyřech základních molekulárních podskupin: SHH subtyp, WNT subtyp, subtyp 3 a subtyp 4 (shrnuto v Taylor et al. 2012; Schroeder a Gururangan 2014). Na základě imunohistochemických poznatků se předpokládá, že různé podskupiny

meduloblastomů vznikají z odlišných typů buněk. WNT subtyp vzniká v oblasti mozkového kmene, zatímco SHH subtyp vzniká z progenitorových buněk externí granulární zóny (EGL) mozečku (Gibson et al. 2010). Typ buněk, ze kterých vznikají meduloblastomy subtypu 3 a 4, je zatím nejasný. Je ale známo, že transkripční faktory LMX1A, EOMES a LHX2, které působí jako hlavní regulátory exprese v nádorových buňkách meduloblastomů subtypu 4, jsou exprimovány ve specifických neuronech, které vznikají z časných progenitorů v oblasti rhombic lip (RL, Lin et al. 2016). Myší progenitorové buňky C17.2, použité v předchozí části této práce, u kterých jsme prokázali vliv exprese genu *Disp3* na jejich proliferaci a diferenciaci, byly původně izolovány z EGL oblasti mozečku. To tudíž spojuje naše výsledky s meduloblastomy. Většina typů mozkových nádorů exprimuje geny, které je jinak možné nalézt především v neurálních kmenových buňkách. Tak vznikla hypotéza nádorových kmenových buněk (cancer stem cells, CSCs), které jsou ve svých vlastnostech výrazně podobné NSC a které jsou především zodpovědné za růst samotného nádoru (Lathia et al. 2011). Proto jsou výsledky získané studiem NSC důležité nejen pro další poznání faktorů podílejících se na vývoji mozku, ale přímo se dotýkají i lepšího pochopení procesů vzniku a progresu nádorů.

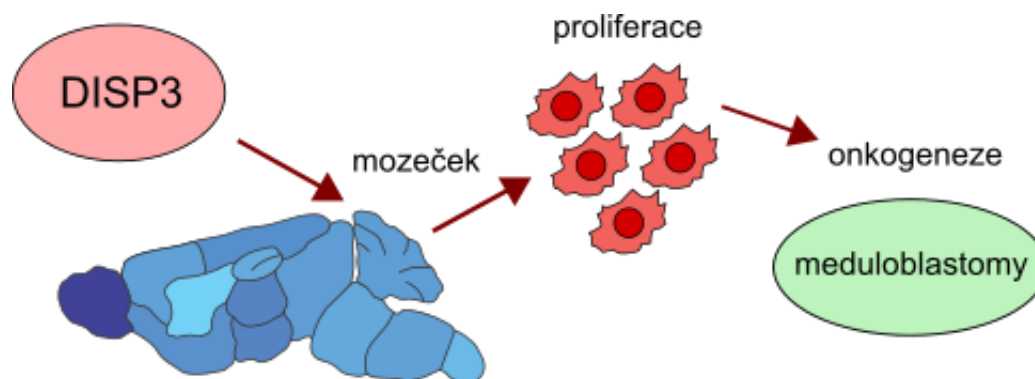
V další části naší práce jsme se tudíž zaměřili na expresi genu *DISP3* v různých lidských mozkových nádorech a na jeho vliv na nádorové buňky. Získané výsledky prokázaly zvýšení exprese genu *DISP3* především v meduloblastomech subtypu 4. Z různých linií lidských nádorových buněk jsme poté nejvyšší expresi genu *DISP3* našli v retinoblastomových buňkách Y79. Z meduloblastomových linií měla vyšší expresi genu *DISP3* linie D341 patřící do subtypu 3 (Weeraratne et al. 2012) a naopak velice nízká byla exprese genu *DISP3* v linii DAOY buněk patřící do SHH subtypu (Triscott et al. 2013). Následně jsme potvrdili, že exprese genu *DISP3* ovlivňuje proliferaci meduloblastomových buněk D341 a DAOY stejným způsobem jako ovlivňuje rychlost růstu buněk NS-5 a C17.2.

Za účelem dalšího pochopení funkce proteinu *DISP3 in vivo* jsme se rozhodli vytvořit transgenní myši s abnormální expresí genu *DISP3* řízenou *PLP1* promotorem. *PLP1* promotor byl zvolen z toho důvodu, že exprese genu *Disp3* klesala v buňkách po diferenciaci, a to včetně diferenciaci buněk do oligodendrocytů, ve kterých je gen *Plp1* především exprimován. Transgenní myši byly zdravé a ani v dospělosti nevykazovaly žádné odchylky od normálu. Nejvyšší exprese genu *Disp3* jsme u myší divokého typu detekovali v mozku v oblasti zvané *bulbus olfactorius*. U transgenních myší jsme stanovili zvýšenou expresi genu *Disp3* v celém mozku, s maximem v posteriorních oblastech, na které navazuje páteřní mícha.

Expresí genu *PLP1* je typická především pro oligodendrocyty. Později ale bylo zjištěno, že aktivita *PLP1* promotoru je během embryonálního a časného postnatálního vývoje jedince

odlišná od aktivity tohoto promotoru v dospělém organismu a můžeme ji proto detekovat i v jiných typech buněk než jen v oligodendrocytech. U čtyři dny starých myší byla aktivita PLP promotoru popsána v určitých vrstvách mozečku včetně EGL v buňkách pozitivních na marker neuronů NeuN (Michalski et al. 2011). V buňkách C17.2, které byly původně izolované z EGL novorozené myši, způsobovala nadexprese genu *Disp3* změny v rychlosti proliferace a v diferenciálním potenciálu těchto buněk. Dále jsme také pozorovali sníženou expresi genů *Epb4.113* a *Prelp* v těchto buňkách. Rozhodli jsme se proto v mozečku novorozené PLP/DISP3 transgenní myši sledovat proliferaci buněk v EGL a expresi zmíněných genů. Získané výsledky potvrdily naše předpoklady, jelikož proliferace buněk v EGL byla u transgenních myší zvýšená a exprese genů *Epb4.113* a *Prelp* se v mozečku tři dny staré transgenní myši zdála být snižená.

V souhrnu je tak možné říct, že DISP3 ovlivňuje v mozečku myší expresi genů, které jsou spojené se vznikem a progresí mnoha typů nádorů. Dále je možné tvrdit, že aberantní exprese genu *Disp3* ovlivňuje proliferaci buněk v oblasti mozku, ze které vznikají dětské agresivní nádory meduloblastomy (Obr. 59). Jedná se o typ nádorů, ve kterých jsme, především v subtypu 4, našli vysokou míru exprese genu *DISP3*. Exprese genu *DISP3* nakonec také *in vitro* ovlivňovala proliferaci meduloblastomových buněk, což bylo v souladu s výsledky získanými s použitím myších neurálních kmenových a progenitorových buněk.



Obrázek 59. Hypotetický model vlivu proteinu DISP3 na vznik nádorů.

Diagram znázorňuje, že při zvýšené expresi genu *DISP3* je v oblasti mozku nazývané mozeček podporována abnormální proliferace buněk, která posléze vede ke vzniku nádorů CNS patřících do skupiny meduloblastomů.

11 Závěry

Tato práce se zabývá rolí, jakou hraje protein DISP3 a jeho exprese v neurálních buňkách a tkáních. Pokusili jsme se především charakterizovat vliv tohoto proteinu na regulaci rovnováhy mezi proliferací a diferenciací, která je klíčová pro správný vývoj a fungování CNS a jejíž narušení může mít v organismu za následek vznik různých patologií.

Shrnutím všech našich výsledků je možné dospět k těmto závěrům:

- Thyroidní hormon T3 pozitivně ovlivňuje v myších neurálních kmenových buňkách NS-5 expresi genu *Disp3*.
- V důsledku diferenciaci neurálních kmenových buněk NS-5 do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů dochází v těchto buňkách ke snížení exprese genu *Disp3*, a to jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu.
- Zvýšení exprese genu *Disp3 in vitro* podporuje proliferaci myších neurálních buněk, a to jak buněk kmenových (NS-5), tak i progenitorových (C17.2). Naopak snížení hladiny *Disp3* exprese pomocí RNAi nebo prostřednictvím mutagenese metodou CRISPR/Cas9 způsobuje zpomalení proliferační aktivity NS-5 buněk.
- Změna v expresi genu *Disp3* dále ovlivňuje rozložení neurálních kmenových buněk NS-5 v jednotlivých fázích buněčného cyklu. U buněk s nadexpresí genu *Disp3* je možné pozorovat více buněk především v S fázi a naopak u buněk s mutovaným genem *Disp3* je vyšší procento buněk v G2/M fázi buněčného cyklu.
- Zvýšená exprese genu *Disp3* také podporuje přežívání neurálních kmenových buněk NS-5, jelikož negativně ovlivňuje vstup těchto buněk do senescence a apoptózy. Mutace v genu *Disp3* působí opačně, výskyt senescence a apoptózy v populaci buněk zvyšuje.
- Exprese genu *Disp3* také podporuje u buněk NS-5 i C17.2 udržení kmenovosti, to znamená schopnosti buněk se množit a tím sebeobnovovat. Pokles *Disp3* exprese naopak podporuje spontánní diferenciaci buněk.
- Hladina DISP3 neovlivňuje pouze spontánní diferenciaci myších neurálních kmenových a progenitorových buněk NS-5 a C17.2, ale i jejich cílenou *in vitro* diferenciaci. Buňky NS-5 s CRISPR/Cas9 mutovaným genem *Disp3* vytváří za diferenciacních podmínek větší počet vysoce diferencovaných astrocytů, více neuronů s vyšším počtem neuritů a také lépe diferencují do oligodendrocytů. Opačný efekt má nadexprese genu *Disp3*, která diferenciacní potenciál kmenových i progenitorových buněk snižuje.

- DISP3 také ovlivňuje genovou expresi v neurálních buňkách. V NS-5 buňkách s genem *Disp3* poškozeným cílenou mutagenezí dochází k poklesu exprese genů *Igfbp7*, *Lipt1*, *Dgka* a *Brsk1* a ke zvýšení exprese genu *Edg8*. V C17.2 buňkách s nadprodukcí DISP3 dochází k poklesu hladiny mRNA genů *Epb4.113* a *Prelp*.
- U lidských neurálních nádorů je možné nejvyšší míru exprese genu *DISP3* nalézt v agresivních dětských nádorech mozku nazývaných meduloblastomy, a to především v meduloblastomech subtypu 4.
- Také v lidských meduloblastomových buněčných liniích ovlivňuje úroveň exprese genu *DISP3* proliferaci. Nadexprese genu *DISP3* v buňkách DAOY zvyšuje rychlost růstu buněk a naopak mutace v genu *DISP3* proliferaci buněk D341 zpomaluje.
- Nově vytvořené linie transgenních myší, s nadexpresí genu *DISP3* v mozku pomocí *PLP* promotoru, mají zvýšenou hladinu exprese *Disp3* genu především v posteriorních oblastech mozku. V mozečku novorozeneých transgenních myší je snižená exprese genů *Epb4.113* a *Prelp*, které jsme identifikovali při *in vitro* experimentech s C17.2 buňkami se zvýšenou expresí genu *Disp3*. Dále se také v mozečku těchto myší v oblasti nazývané externí granulární zóna (EGL) nachází více proliferujících buněk.

12 Podíl autora na výsledcích obsažených v disertační práci

Výsledky obsažené v této práci byly publikovány v následujících článcích:

ZÍKOVÁ, M*, KONÍŘOVÁ, J*, DITRYCHOVÁ, K, CORLETT, A, KOLÁŘ, M
a BARTŮNĚK, P

DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. (2014)
FEBS Lett. **588**(21), 4071–4077. ISSN 18733468. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.036

* These authors contributed equally to this work

KONÍŘOVÁ, J, OLTOVÁ, J, CORLETT, A, KOPYCIŇSKA, J, KOLÁŘ, M, BARTŮNĚK,
P a ZÍKOVÁ, M

Modulated DISP3/PTCHD2 expression influences neural stem cell fate decisions. (2017)
Sci. Rep. **7**. ISSN 20452322. doi: 10.1038/srep41597

Jana Konířová se podílela na získání většiny publikovaných výsledků.

Autoři výsledků prezentovaných v této práci prohlašují, že Jana Konířová se na výsledcích podílela následující částí vyjádřenou v procentech:

DISP3 v myších neurálních buňkách in vitro – 80 %

DISP3 v lidských nádorech mozku a nádorových buňkách – 40 %

DISP3 v mozku PLP/DISP3 transgenních myši – 50 %

Jménem autorů: RNDr. Petr Bartůněk, CSc.

13 Použitá literatúra

AGBEMENYAH, HY, AGIS-BALBOA, RC, BURKHARDT, S, DELALLE, I a FISCHER, A, 2014. Insulin growth factor binding protein 7 is a novel target to treat dementia. *Neurobiol. Dis.* **62**, 135–143. doi: 10.1016/j.nbd.2013.09.011

AGIS-BALBOA, RC, ARCOS-DIAZ, D, WITTNAM, J, GOVINDARAJAN, N, BLOM, K, BURKHARDT, S, HALADYNYIAK, U, AGBEMENYAH, HY, ZOVOILIS, A, SALINAS-RIESTER, G, OPITZ, L, SANANBENESI, F a FISCHER, A, 2011. A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories. *Embo J.* **30**(19), 4071–4083. doi: 10.1038/emboj.2011.293

ACHARYA, MM, LAN, ML, KAN, VH, PATEL, NH, GIEDZINSKI, E, TSENG, BP a LIMOLI, CL, 2010. Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* **49**(12), 1846–1855. ISSN 08915849. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.021

ALTMANN, SW, DAVIS, HR, ZHU, L-J, YAO, X, HOOS, LM, TETZLOFF, G, IYER, SPN, MAGUIRE, M, GOLOVKO, A, ZENG, M, WANG, L, MURGOLO, N a GRAZIANO, MP, 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science (80-.).* **303**(5661), 1201–1204. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1093131

ALVARADO-KRISTENSSON, M, RODRIGUEZ, MJ, SILIO, V, VALPUESTA, JM a CARRERA, AC, 2009. SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* **11**(9), 1081-U86. doi: 10.1038/Ncb1921

ALVAREZ-DOLADO, M, RUIZ, M, DEL RÍO, JA, ALCÁNTARA, S, BURGAYA, F, SHELDON, M, NAKAJIMA, K, BERNAL, J, HOWELL, BW, CURRAN, T, SORIANO, E a MUÑOZ, A, 1999. Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. *J. Neurosci.* B.m.: Society for Neuroscience, **19**(16), 6979–93. ISSN 1529-2401. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436054>

AMBROGINI, P, CUPPINI, R, FERRI, P, MANCINI, C, CIARONI, S, VOCI, A, GERDONI, E a GALLO, G, 2005. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology.* B.m.: Karger Publishers, **81**(4), 244–53. ISSN 0028-3835. doi: 10.1159/000087648

- AYRAULT, O, ZHAO, H, ZINDY, F, QU, C, SHERR, CJ a ROUSSEL, MF, 2010. Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Res.* **70**(13), 5618–5627. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3740
- BACHILLER, D, KLINGENSMITH, J, KEMP, C, BELO, JA, ANDERSON, RM, MAY, SR, MCMAHON, JA, MCMAHON, AP, HARLAND, RM, ROSSANT, J a DE ROBERTIS, EM, 2000. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature.* **403**(6770), 658–661. ISSN 00280836. doi: 10.1038/35001072
- BAIN, G, KITCHENS, D, YAO, M, HUETTNER, JE a GOTTLIEB, DI, 1995. Embryonic Stem-Cells Express Neuronal Properties in-Vitro. *Dev. Biol.* **168**(2), 342–357. doi: 10.1006/dbio.1995.1085
- BAKER, KE a PARKER, R, 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(3), 293–299. ISSN 09550674. doi: 10.1016/j.ceb.2004.03.003
- BALE, SJ, FALK, RT a ROGERS, GR, 1998. Patching together the genetics of Gorlin syndrome. *J. Cutan. Med. Surg.* **3**(1), 31–4. ISSN 1203-4754. doi: 10.1177/120347549800300109
- BEHIN, A, HOANG-XUAN, K, CARPENTIER, AF a DELATTRE, JY, 2003. Primary brain tumours in adults. *Lancet.* **361**(9354), 323–331. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12328-8
- BEL-VIALAR, S, ITASAKI, N a KRUMLAUF, R, 2002. Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development.* **129**(22), 5103–15. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399303>
- BENASSI, MS, PAZZAGLIA, L, NOVELLO, C, QUATTRINI, I, POLLINO, S, MAGAGNOLI, G, PICCI, P a CONTI, A, 2015. Tissue and serum IGFBP7 protein as biomarker in high-grade soft tissue sarcoma. *Am. J. Cancer Res.* **5**(11), 3446–3454.

BERG, DA, YOON, K-J, WILL, B, XIAO, AY, KIM, N-S, CHRISTIAN, KM, SONG, H a MING, G, 2015. Tbr2-expressing intermediate progenitor cells in the adult mouse hippocampus are unipotent neuronal precursors with limited amplification capacity under homeostasis. *Front. Biol. (Beijing)*. B.m.: Higher Education Press, **10**(3), 262–271. ISSN 1674-7984. doi: 10.1007/s11515-015-1364-0

BERNAL, J, 2000. *Thyroid Hormones in Brain Development and Function*. B.m.: MDText.com, Inc. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905404>

BIGNER, SH, FRIEDMAN, HS, VOGELSTEIN, B, OAKES, WJ a BIGNER, DD, 1990. Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res.* **50**(8), 2347–50. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2180567>

BISHOP, CL, BERGIN, AM, FESSART, D, BORGDORFF, V, HATZIMASOURA, E, GARBE, JC, STAMPFER, MR, KOH, J a BEACH, DH, 2010. Primary cilium-dependent and -independent Hedgehog signaling inhibits p16(INK4A). *Mol Cell.* **40**(4), 533–547. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.027

BONAGUIDI, MA, WHEELER, MA, SHAPIRO, JS, STADEL, RP, SUN, GJ, MING, GL a SONG, H, 2011. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell.* **145**(7), 1142–1155. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.024

BOND, AM, MING, G-L a SONG, H, 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*. B.m.: NIH Public Access, **17**(4), 385–95. ISSN 1875-9777. doi: 10.1016/j.stem.2015.09.003

BRANNEY, PA, FAAS, L, STEANE, SE, POWNALL, ME a ISAACS, H V., 2009. Characterisation of the Fibroblast Growth Factor Dependent Transcriptome in Early Development. *PLoS One*. B.m.: North-Holland, **4**(3), e4951. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0004951

BROWN, MS a GOLDSTEIN, JL, 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**(20), 11041–8. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.96.20.11041

BRUGIÈRES, L, PIERRON, G, CHOMPRET, A, PAILLERETS, BB, DI ROCCO, F, VARLET, P, PIERRE-KAHN, A, CARON, O, GRILL, J a DELATTRE, O, 2010. Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *J. Med. Genet.* **47**(2), 142–4. ISSN 1468-6244. doi: 10.1136/jmg.2009.067751

BURKE, R, NELLEN, D, BELLOTTO, M, HAFEN, E, SENTI, KA, DICKSON, BJ a BASLER, K, 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell.* **99**(7), 803–15. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81677-3

CAMPISI, J, 1997. The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer.* **33**(5), 703–709. ISSN 09598049. doi: 10.1016/S0959-8049(96)00058-5

CARTER, H, SAMAYOA, J, HRUBAN, RH a KARCHIN, R, 2010. Prioritization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM). *Cancer Biol. Ther.* **10**(6), 582–587. doi: 10.4161/cbt.10.6.12537

CARTMEL, B, DEWAN, A, FERRUCCI, LM, GELERNTER, J, STAPLETON, J, LEFFELL, DJ, MAYNE, ST a BALE, AE, 2014. Novel gene identified in an exome-wide association study of tanning dependence. *Exp. Dermatol.* **23**(10), 757–759. ISSN 16000625. doi: 10.1111/exd.12503

CARVALHO, BS a IRIZARRY, RA, 2010. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics.* **26**(19), 2363–2367. ISSN 1460-2059. doi: 10.1093/bioinformatics/btq431

CAVALLI, FMG, REMKE, M, RAMPASEK, L, PEACOCK, J, SHIH, DJH, LUU, B, GARZIA, L, TORCHIA, J, NOR, C, MORRISSY, AS, AGNIHOTRI, S, TAYLOR, MD, et al., 2017. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell.* **31**(6), 737–754.e6. ISSN 15356108. doi: 10.1016/j.ccell.2017.05.005

CONTI, L, POLLARD, SM, GORBA, T, REITANO, E, TOSELLI, M, BIELLA, G, SUN, YR, SANZONE, S, YING, QL, CATTANEO, E a SMITH, A, 2005. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *Plos Biol.* **3**(9), 1594–1606. doi: ARTN e283 10.1371/journal.pbio.0030283

COSTA, V, AIGNER, S, VUKCEVIC, M, SAUTER, E, BEHR, K, EBELING, M, DUNKLEY, T, FRIEDLEIN, A, ZOFFMANN, S, MEYER, CA, KNOFLACH, F, LUGERT, S, et al., 2016. mTORC1 Inhibition Corrects Neurodevelopmental and Synaptic Alterations in a Human Stem Cell Model of Tuberous Sclerosis. *Cell Rep.* **15**(1), 86–95. ISSN 22111247. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.090

DAHMANE, N a RUIZ I ALTABA, A, 1999. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development.* **126**(14), 3089–100. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375501>

DAVIES, JP, LEVY, B a IOANNOU, YA, 2000. Evidence for a Niemann–Pick C (NPC) Gene Family: Identification and Characterization of NPC1L1. *Genomics.* **65**(2), 137–145. ISSN 08887543. doi: 10.1006/geno.2000.6151

DAVIS, AA a TEMPLE, S, 1994. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature.* **372**(6503), 263–266. doi: 10.1038/372263a0

DESOUZA, LA, LADIWALA, U, DANIEL, SM, AGASHE, S, VAIDYA, RA a VAIDYA, VA, 2005. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**(3), 414–426. ISSN 10447431. doi: 10.1016/j.mcn.2005.03.010

DESOUZA, LA, SATHANOORI, M, KAPOOR, R, RAJADHYAKSHA, N, GONZALEZ, LE, KOTTMANN, AH, TOLE, S a VAIDYA, VA, 2011. Thyroid Hormone Regulates the Expression of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in the Embryonic and Adult Mammalian Brain. *Endocrinology.* **152**(5), 1989–2000. ISSN 0013-7227. doi: 10.1210/en.2010-1396

DI, C, LIAO, S, ADAMSON, DC, PARRETT, TJ, BRODERICK, DK, SHI, Q, LENGAUER, C, CUMMINS, JM, VELCULESCU, VE, FULTS, DW, MCLENDON, RE, BIGNER, DD a YAN, H, 2005. Identification of OTX2 as a medulloblastoma oncogene whose product can be targeted by all-trans retinoic acid. *Cancer Res.* **65**(3), 919–24. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705891>

DOETSCH, F, CAILLÉ, I, LIM, DA, GARCÍA-VERDUGO, JM a ALVAREZ-BUYLLA, A, 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* **97**(6), 703–16. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80783-7

DOMINGUEZ, CL, FLOYD, DH, XIAO, AZ, MULLINS, GR, KEFAS, BA, XIN, WJ, YACUR, MN, ABOUNADER, R, LEE, JK, WILSON, GM, HARRIS, TE a PUROW, BW, 2013. Diacylglycerol Kinase α Is a Critical Signaling Node and Novel Therapeutic Target in Glioblastoma and Other Cancers. *Cancer Discov.* **3**(7), 782–797. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0215

EFTHYMIU, AG, STEINER, J, PAVAN, WJ, WINCOVITCH, S, LARSON, DM, PORTER, FD, RAO, MS a MALIK, N, 2015. Rescue of an in vitro neuron phenotype identified in Niemann-Pick disease, type C1 induced pluripotent stem cell-derived neurons by modulating the WNT pathway and calcium signaling. *Stem Cells Transl. Med.* **4**(3), 230–238. ISSN 2157-6564 (Print). doi: 10.5966/sctm.2014-0127

EKKER, SC, MCGREW, LL, LAI, CJ, LEE, JJ, VON KESSLER, DP, MOON, RT a BEACHY, PA, 1995. Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of *Xenopus laevis*. *Development.* **121**(8), 2337–47. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7671800>

ELKOUBY, YM, ELIAS, S, CASEY, ES, BLYTHE, SA, TSABAR, N, KLEIN, PS, ROOT, H, LIU, KJ a FRANK, D, 2010. Mesodermal Wnt signaling organizes the neural plate via Meis3. *Development.* B.m.: Company of Biologists, **137**(9), 1531–41. ISSN 1477-9129. doi: 10.1242/dev.044750

ELLISON, DW, 2010. Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol.* **120**(3), 305–316. ISSN 0001-6322. doi: 10.1007/s00401-010-0726-6

ENCINAS, JM, MICHURINA, T V, PEUNOVA, N, PARK, J-H, TORDO, J, PETERSON, DA, FISHELL, G, KOULAKOV, A a ENIKOLOPOV, G, 2011. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell.* B.m.: NIH Public Access, **8**(5), 566–79. ISSN 1875-9777. doi: 10.1016/j.stem.2011.03.010

ERICSON, J, MORTON, S, KAWAKAMI, A, ROELINK, H a JESSELL, TM, 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell.* **87**(4), 661–73. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81386-0

FAINSOD, A, DEISLER, K, YELIN, R, MAROM, K, EPSTEIN, M, PILLEMER, G, STEINBEISSER, H a BLUM, M, 1997. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech. Dev.* **63**(1), 39–50. ISSN 0925-4773. doi: 10.1016/S0925-4773(97)00673-4

FAN, J, AKABANE, H, ZHENG, X, ZHOU, X, ZHANG, L, LIU, Q, ZHANG, YL, YANG, J a ZHU, GZ, 2007. Male germ cell-specific expression of a novel Patched-domain containing gene Ptchd3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**(3), 757–761. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.047

FAUQUIER, T, CHATONNET, F, PICOU, F, RICHARD, S, FOSSAT, N, AGUILERA, N, LAMONERIE, T a FLAMANT, F, 2014. Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR α 1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. *Development*. B.m.: Oxford University Press for The Company of Biologists Limited, **141**(1), 166–75. ISSN 1477-9129. doi: 10.1242/dev.103226

FERENT, J, COCHARD, L, FAURE, H, TADDEI, M, HAHN, H, RUAT, M a TRAIFFORT, E, 2014. Genetic Activation of Hedgehog Signaling Unbalances the Rate of Neural Stem Cell Renewal by Increasing Symmetric Divisions. *Stem Cell Reports*. **3**(2), 312–323. ISSN 22136711. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.05.016

FERO, ML, RIVKIN, M, TASCH, M, PORTER, P, CAROW, CE, FIRPO, E, POLYAK, K, TSAI, L-H, BROUDY, V, PERLMUTTER, RM, KAUSHANSKY, K a ROBERTS, JM, 1996. A Syndrome of Multiorgan Hyperplasia with Features of Gigantism, Tumorigenesis, and Female Sterility in p27Kip1-Deficient Mice. *Cell*. B.m.: Cell Press, **85**(5), 733–744. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81239-8

FILGES, I, RÖTHLISBERGER, B, BLATTNER, A, BOESCH, N, DEMOUGIN, P, WENZEL, F, HUBER, AR, HEINIMANN, K, WEBER, P a MINY, P, 2011. Deletion in Xp22.11: PTCHD1 is a candidate gene for X-linked intellectual disability with or without autism. *Clin. Genet.* **79**(1), 79–85. ISSN 1399-0004. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01590.x

FRANCIS, KR, TON, AN, XIN, Y, O'HALLORAN, PE, WASSIF, CA, MALIK, N, WILLIAMS, IM, CLUZEAU, C V, TRIVEDI, NS, PAVAN, WJ, CHO, W, WESTPHAL, H a PORTER, FD, 2016. Modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome with induced pluripotent stem cells reveals a causal role for Wnt/beta-catenin defects in neuronal cholesterol synthesis phenotypes. *Nat Med.* **22**(4), 388–396. doi: 10.1038/nm.4067

FREDERIKSEN, K a MCKAY, RD, 1988. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci.* **8**(4), 1144–1151. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3357014>

FRIEDMAN, HS, BURGER, PC, BIGNER, SH, TROJANOWSKI, JQ, BRODEUR, GM, HE, XM, WIKSTRAND, CJ, KURTZBERG, J, BERENS, ME a HALPERIN, EC, 1988. Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of c-myc. *Am. J. Pathol.* **130**(3), 472–84. ISSN 0002-9440. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3279793>

FROUKH, TJ, 2017. Next Generation Sequencing and Genome-Wide Genotyping Identify the Genetic Causes of Intellectual Disability in Ten Consanguineous Families from Jordan. *Tohoku J. Exp. Med.* **243**(4), 297–309. ISSN 0040-8727. doi: 10.1620/tjem.243.297

FUJITA, S, SHIMADA, M a NAKAMURA, T, 1966. H3-Thymidine autoradiographic studies on the cell proliferation and differentiation in the external and the internal granular layers of the mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.* B.m.: The Wistar Institute of Anatomy and Biology, **128**(2), 191–207. ISSN 0021-9967. doi: 10.1002/cne.901280206

FUSS, B, MALLON, B, PHAN, T, OHLEMEYER, C, KIRCHHOFF, F, NISHIYAMA, A a MACKLIN, WB, 2000. Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev. Biol.* **218**(2), 259–74. ISSN 0012-1606. doi: 10.1006/dbio.1999.9574

GAGE, FH, 2000. Mammalian neural stem cells. *Science (80-.).* **287**(5457), 1433–1438. doi: 10.1126/science.287.5457.1433

GE, L, WANG, J, QI, W, MIAO, H-H, CAO, J, QU, Y-X, LI, B-L a SONG, B-L, 2008. The Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe Acts by Blocking the Sterol-Induced Internalization of NPC1L1. *Cell Metab.* **7**(6), 508–519. ISSN 15504131. doi: 10.1016/j.cmet.2008.04.001

- GENSBURGER, C, LABOURDETTE, G a SENSENBRENNER, M, 1987. Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett.* **217**(1), 1–5. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/0014-5793(87)81230-9
- GENTLEMAN, RC, CAREY, VJ, BATES, DM, BOLSTAD, B, DETTLING, M, DUDOIT, S, ELLIS, B, GAUTIER, L, GE, Y, GENTRY, J, HORNIK, K, HOTHORN, T, HUBER, et al., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**(10), R80. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r80
- GERDES, J, SCHWAB, U, LEMKE, H a STEIN, H, 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. cancer.* **31**(1), 13–20. ISSN 0020-7136. doi: 10.1002/ijc.2910310104
- GHAHRAMANI SENO, MM, KWAN, BY, LEE-NG, KKM, MOESSNER, R, LIONEL, AC, MARSHALL, CR a SCHERER, SW, 2011. Human PTCHD3 nulls: rare copy number and sequence variants suggest a non-essential gene. *BMC Med. Genet.* B.m.: BioMed Central Ltd, **12**(1), 45. ISSN 1471-2350. doi: 10.1186/1471-2350-12-45
- GIBSON, P, TONG, Y, ROBINSON, G, THOMPSON, MC, CURRLE, DS, EDEN, C, KRANENBURG, TA, HOGG, T, POPPLETON, H, MARTIN, J, FINKELSTEIN, D, POUNDS, S, et al., 2010. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature.* **468**(7327), 1095–1099. doi: 10.1038/nature09587
- GIL, G, FAUST, JR, CHIN, DJ, GOLDSTEIN, JL a BROWN, MS, 1985. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell.* **41**(1), 249–58. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/0092-8674(85)90078-9
- GLASER, T, POLLARD, SM, SMITH, A a BRUSTLE, O, 2007. Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells. *PLoS One.* **2**(3). doi: ARTN e298 10.1371/journal.pone.0000298
- GOODRICH, L V., MILENKOVIĆ, L, HIGGINS, KM a SCOTT, MP, 1997. Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants. *Science (80-.).* **277**(5329), 1109–1113. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.277.5329.1109

- GOTO, K, WATANABE, M, KONDO, H, YUASA, H, SAKANE, F a KANO, H, 1992. Gene Cloning, Sequence, Expression and Insitu Localization of 80-Kda Diacylglycerol Kinase Specific to Oligodendrocyte of Rat-Brain. *Mol. Brain Res.* **16**(1–2), 75–87. doi: 10.1016/0169-328x(92)90196-I
- HADJ-SAHRAOUI, N, SEUGNET, I, GHORBEL, MT a DEMENEIX, B, 2000. Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci. Lett.* **280**(2), 79–82. ISSN 0304-3940. doi: 10.1016/S0304-3940(00)00768-0
- HAMILTON, SR, LIU, B, PARSONS, RE, PAPADOPOULOS, N, JEN, J, POWELL, SM, KRUSH, AJ, BERK, T, COHEN, Z, TETU, B, BURGER, PC, WOOD, PA, et al., 1995. The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **332**(13), 839–847. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM199503303321302
- HARA, E, SMITH, R, PARRY, D, TAHARA, H, STONE, S a PETERS, G, 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* B.m.: American Society for Microbiology (ASM), **16**(3), 859–67. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622687>
- HATA, T, DAL MOLIN, M, HONG, S-M, TAMURA, K, SUENAGA, M, YU, J, SEDOGAWA, H, WEISS, MJ, WOLFGANG, CL, LENNON, AM, HRUBAN, RH a GOGGINS, MG, 2017. Predicting the Grade of Dysplasia of Pancreatic Cystic Neoplasms Using Cyst Fluid DNA Methylation Markers. *Clin. Cancer Res.* **23**(14), 3935–3944. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2244
- HAWLEY, SH, WÜNNENBERG-STAPLETON, K, HASHIMOTO, C, LAURENT, MN, WATABE, T, BLUMBERG, BW a CHO, KW, 1995. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev.* **9**(23), 2923–35. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.9.23.2923
- HENDERSON, LP, LIN, L, PRASAD, A, PAUL, CA, CHANG, TY a MAUE, RA, 2000. Embryonic striatal neurons from niemann-pick type C mice exhibit defects in cholesterol metabolism and neurotrophin responsiveness. *J. Biol. Chem.* B.m.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, **275**(26), 20179–87. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M001793200

HENRIQUEZ, N V., FORSHEW, T, TATEVOSSIAN, R, ELLIS, M, RICHARD-LOENDT, A, ROGERS, H, JACQUES, TS, REITBOECK, PG, PEARCE, K, SHEER, D, GRUNDY, RG a BRANDNER, S, 2013a. Comparative Expression Analysis Reveals Lineage Relationships between Human and Murine Gliomas and a Dominance of Glial Signatures during Tumor Propagation In Vitro. *Cancer Res.* **73**(18), 5834–5844. ISSN 0008-5472. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1299

HENRIQUEZ, N V, FORSHEW, T, TATEVOSSIAN, R, ELLIS, M, RICHARD-LOENDT, A, ROGERS, H, JACQUES, TS, REITBOECK, PG, PEARCE, K, SHEER, D, GRUNDY, RG a BRANDNER, S, 2013b. Comparative expression analysis reveals lineage relationships between human and murine gliomas and a dominance of glial signatures during tumor propagation in vitro. *Cancer Res.* **73**(18), 5834–44. ISSN 1538-7445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1299

HONG, S-M, OMURA, N, VINCENT, A, LI, A, KNIGHT, S, YU, J, HRUBAN, RH a GOGGINS, M, 2012. Genome-Wide CpG Island Profiling of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Clin. Cancer Res.* **18**(3), 700–712. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1718

HUBER, W, CAREY, VJ, GENTLEMAN, R, ANDERS, S, CARLSON, M, CARVALHO, BS, BRAVO, HC, DAVIS, S, GATTO, L, GIRKE, T, GOTTARDO, R, HAHNE, F, et al., 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods.* **12**(2), 115–121. ISSN 1548-7091. doi: 10.1038/nmeth.3252

CHAN, S a KILBY, MD, 2000. Thyroid hormone and central nervous system development. *J. Endocrinol.* **165**(1), 1–8. ISSN 00220795. doi: 10.1677/joe.0.1650001

CHAUDHRY, A, NOOR, A, DEGAGNE, B, BAKER, K, BOK, LA, BRADY, AF, CHITAYAT, D, CHUNG, BH, CYTRYNBAUM, C, DYMENT, D, FILGES, I, HELM, B, , et al., 2015. Phenotypic spectrum associated with PTCHD1 deletions and truncating mutations includes intellectual disability and autism spectrum disorder. *Clin. Genet.* **88**(3), 224–33. ISSN 1399-0004. doi: 10.1111/cge.12482

- CHEN, F, DUGGAL, P, KLEIN, BEK, LEE, KE, TRUITT, B, KLEIN, R, IYENGAR, SK a KLEIN, AP, 2016. Variation in PTCHD2, CRISP3, NAP1L4, FSCB, and AP3B2 associated with spherical equivalent. *Mol. Vis.* B.m.: Emory University, **22**, 783–96. ISSN 1090-0535. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27440996>
- CHIANG, C a LITINGTUNG, Y, 2000. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat. Neurosci.* B.m.: Nature Publishing Group, **3**(10), 979–985. ISSN 10976256. doi: 10.1038/79916
- CHIANG, C, LITINGTUNG, Y, LEE, E, YOUNG, KE, CORDEN, JL, WESTPHAL, H a BEACHY, PA, 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* **383**(6599), 407–413. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/383407a0
- CHIN, DJ, LUSKEY, KL, FAUST, JR, MACDONALD, RJ, BROWN, MS a GOLDSTEIN, JL, 1982. Molecular cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and evidence for regulation of its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**(24), 7704–8. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.79.24.7704
- CHOI, BH a LAPHAM, LW, 1978. Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res.* **148**(2), 295–311. ISSN 0006-8993. doi: 10.1016/0006-8993(78)90721-7
- CHUNG, JH, LARSEN, AR, CHEN, E a BUNZ, F, 2014. A PTCH1 homolog transcriptionally activated by p53 suppresses hedgehog signaling. *J. Biol. Chem.* **289**(47), 33020–33031. ISSN 1083351X. doi: 10.1074/jbc.M114.597203
- IKONEN, E a HOLTTA-VUORI, M, 2004. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol.* **15**(4), 445–454. doi: 10.1016/j.semcdb.2004.03.001
- INGHAM, PW a MCMAHON, AP, 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **15**(23), 3059–87. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.938601
- IOANNOU, YA, 2000. The Structure and Function of the Niemann–Pick C1 Protein. *Mol. Genet. Metab.* **71**(1–2), 175–181. ISSN 10967192. doi: 10.1006/mgme.2000.3061

- IRIZARRY, RA, BOLSTAD, BM, COLLIN, F, COPE, LM, HOBBS, B a SPEED, TP, 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* B.m.: Oxford University Press, **31**(4), e15. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gng015
- ISTVAN, ES a DEISENHOFER, J, 2001. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science (80-.)*. **292**(5519), 1160–1164. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.1059344
- IULIANELLA, A, SAKAI, D, KUROSAKA, H a TRAINOR, P, 2017. Ventral neural patterning in the absence of a Shh activity gradient from the floorplate. *Dev. Dyn.* 1097–177. ISSN 10588388. doi: 10.1002/dvdy.24590
- IVANOV, DP, COYLE, B, WALKER, DA a GRABOWSKA, AM, 2016. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J. Biotechnol.* **236**, 10–25. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.028
- JACOBSEN, PF, JENKYN, DJ a PAPADIMITRIOU, JM, 1985. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**(5), 472–85. ISSN 0022-3069. doi: 10.1097/00005072-198509000-00003
- JACQUE, CM, VINNER, C, KUJAS, M, RAOUL, M, RACADOT, J a BAUMANN, NA, 1978. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J. Neurol. Sci.* **35**(1), 147–55. ISSN 0022-510X. doi: 10.1016/0022-510X(78)90107-7
- JAILLARD, C, HARRISON, S, STANKOFF, B, AIGROT, MS, CALVER, AR, DUDDY, G, WALSH, FS, PANGALOS, MN, ARIMURA, N, KAIBUCHI, K, ZALC, B a LUBETZKI, C, 2005. Edg8/S1P5: An oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J. Neurosci.* **25**(6), 1459–1469. doi: 10.1523/Jneurosci.4645-04.2005
- JANG, M-H, BONAGUIDI, MA, KITABATAKE, Y, SUN, J, SONG, J, KANG, E, JUN, H, ZHONG, C, SU, Y, GUO, JU, WANG, MX, SAILOR, KA, KIM, J-Y, GAO, Y, CHRISTIAN, KM, MING, G a SONG, H, 2013. Secreted Frizzled-Related Protein 3 Regulates Activity-Dependent Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Stem Cell.* **12**(2), 215–223. ISSN 19345909. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.021

- JIANG, W, XIANG, CL, CAZACU, S, BRODIE, C a MIKKELSEN, T, 2008. Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7 Mediates Glioma Cell Growth and Migration. *Neoplasia*. **10**(12), 1335–1342. doi: 10.1593/Neo.08694
- JOHANSSON, FK, BRODD, J, EKLOF, C, FERLETTA, M, HESSELAGER, G, TIGER, CF, UHRBOM, L a WESTERMARK, B, 2004. Identification of candidate cancer-causing genes in mouse brain tumors by retroviral tagging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(31), 11334–11337. doi: 10.1073/pnas.0402716101
- JOHANSSON, FK, GORANSSON, H a WESTERMARK, B, 2005. Expression analysis of genes involved in brain tumor progression driven by retroviral insertional mutagenesis in mice. *Oncogene*. **24**(24), 3896–3905. doi: 10.1038/sj.onc.1208553
- JONES, DTW, JÄGER, N, KOOL, M, ZICHNER, T, HUTTER, B, SULTAN, M, CHO, Y-J, PUGH, TJ, HOVESTADT, V, STÜTZ, AM, RAUSCH, T, LICHTER, P, et al., 2012. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*. **488**(7409), 100–105. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature11284
- KARTEN, B, VANCE, DE, CAMPENOT, RB a VANCE, JE, 2002. Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J. Neurochem.* B.m.: Blackwell Science Ltd, **83**(5), 1154–1163. ISSN 00223042. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01220.x
- KATOH, Y a KATOH, M, 2005. Identification and characterization of DISP3 gene in silico. *Int. J. Oncol.* ISSN 1019-6439. doi: 10.3892/ijo.26.2.551
- KAWASAKI, H, MIZUSEKI, K, NISHIKAWA, S, KANEKO, S, KUWANA, Y, NAKANISHI, S, NISHIKAWA, S a SASAI, Y, 2000. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. **28**(1), 31–40. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00083-0
- KEFAS, B, FLOYD, DH, COMEAU, L, FRISBEE, A, DOMINGUEZ, C, DIPIERRO, CG, GUESSOUS, F, ABOUNADER, R a PUROW, B, 2013. A miR-297/hypoxia/DGK- axis regulating glioblastoma survival. *Neuro. Oncol.* **15**(12), 1652–1663. doi: 10.1093/neuonc/not118

- KHOKHA, MK, YEH, J, GRAMMER, TC a HARLAND, RM, 2005. Depletion of Three BMP Antagonists from Spemann's Organizer Leads to a Catastrophic Loss of Dorsal Structures. *Dev. Cell.* **8**(3), 401–411. ISSN 15345807. doi: 10.1016/j.devcel.2005.01.013
- KIECKER, C a NIEHRS, C, 2001. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development.* **128**(21), 4189–201. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684656>
- KLISCH, TJ, XI, Y, FLORA, A, WANG, L, LI, W a ZOGHBI, HY, 2011. In vivo Atoh1 targetome reveals how a proneural transcription factor regulates cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(8), 3288–3293. doi: 10.1073/pnas.1100230108
- KO, DC, GORDON, MD, JIN, JY a SCOTT, MP, 2001. Dynamic movements of organelles containing Niemann-Pick C1 protein: NPC1 involvement in late endocytic events. *Mol. Biol. Cell.* **12**(3), 601–14. ISSN 1059-1524. doi: 10.1091/mbc.12.3.601
- KOLESNIKOV, N, HASTINGS, E, KEAYS, M, MELNICHUK, O, TANG, YA, WILLIAMS, E, DYLAG, M, KURBATOVA, N, BRANDIZI, M, BURDETT, T, MEGY, K, PILICHEVA, E, et al., 2015. ArrayExpress update--simplifying data submissions. *Nucleic Acids Res.* **43**(D1), D1113–D1116. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/gku1057
- KOOL, M, KOSTER, J, BUNT, J, HASSELT, NE, LAKEMAN, A, VAN SLUIS, P, TROOST, D, MEETEREN, NS, CARON, HN, CLOOS, J, MRSIC, A, YLSTRA, B, et al., 2008. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One.* **3**(8), e3088. doi: 10.1371/journal.pone.0003088
- KURODA, H, FUENTEALBA, L, IKEDA, A, REVERSADE, B a DE ROBERTIS, EM, 2005. Default neural induction: neuralization of dissociated *Xenopus* cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev.* B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **19**(9), 1022–7. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.1306605
- KUWABARA, PE a LABOUESSE, M, 2002. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* 2002/04/05. **18**(4), 193–201. doi: S0168952502026409 [pii]
- LAMSZUS, K, 2004. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol.* **63**(4), 275–286. doi: 10.1093/jnen/63.4.275

- LATHIA, JD, HEDDLESTON, JM, VENERE, M a RICH, JN, 2011. Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell*. **8**(5), 482–485. doi: 10.1016/j.stem.2011.04.013
- LEE, MK, TUTTLE, JB, REBHUN, LI, CLEVELAND, DW a FRANKFURTER, A, 1990. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskelet*. **17**(2), 118–132. doi: 10.1002/cm.970170207
- LEE, SM, TOLE, S, GROVE, E a MCMAHON, AP, 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development*. **127**(3), 457–67. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10631167>
- LEE, Y, KAWAGOE, R, SASAI, K, LI, Y, RUSSELL, HR, CURRAN, T a MCKINNON, PJ, 2007. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene*. **26**(44), 6442–6447. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1210467
- LEMKINE, GF, RAJ, A, ALFAMA, G, TURQUE, N, HASSANI, Z, ALEGRIA-PRÉVOT, O, SAMARUT, J, LEVI, G a DEMENEIX, BA, 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J*. **19**(7), 863–5. ISSN 0892-6638. doi: 10.1096/fj.04-2916fje
- LEND AHL, U, ZIMMERMAN, LB a MCKAY, RDG, 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. **60**(4), 585–595. ISSN 00928674. doi: 10.1016/0092-8674(90)90662-X
- LEWIS, M, 2003. PRELP, collagen, and a theory of Hutchinson-Gilford progeria. *Ageing Res Rev*. **2**(1), 95–105. doi: 10.1016/S1568-1637(02)00044-2
- LIEM, KF, TREMML, G, ROELINK, H a JESSELL, TM, 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*. **82**(6), 969–79. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/0092-8674(95)90276-7
- LIM, DA, TRAMONTIN, AD, TREVEJO, JM, HERRERA, DG, GARCÍA-VERDUGO, JM a ALVAREZ-BUYLLA, A, 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. **28**(3), 713–26. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00148-3

- LIMOLI, CL, GIEDZINSKI, E, ROLA, R, OTSUKA, S, PALMER, TD a FIKE, JR, 2004. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress. *Radiat. Res.* **161**(1), 17–27. ISSN 0033-7587. doi: 10.1667/RR3112
- LIN, CY, ERKEK, S, TONG, Y, YIN, L, FEDERATION, AJ, ZAPATKA, M, HALDIPUR, P, KAWAUCHI, D, RISCH, T, WARNATZ, HJ, WORST, BC, JU, B, et al., 2016. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature.* **530**(7588), 57–62. doi: 10.1038/nature16546
- LINKER, C a STERN, CD, 2004. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development.* **131**(22). doi: 10.1242/dev.01445
- LISCUM, L, FINER-MOORE, J, STROUD, RM, LUSKEY, KL, BROWN, MS a GOLDSTEIN, JL, 1985. Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **260**(1), 522–30. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3965461>
- LIU, JP, LAUFER, E a JESSELL, TM, 2001. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron.* **32**(6), 997–1012. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00544-X
- LU, R, NIIDA, H a NAKANISHI, M, 2004. Human SAD1 kinase is involved in UV-induced DNA damage checkpoint function. *J. Biol. Chem.* **279**(30), 31164–31170. doi: 10.1074/jbc.M404728200
- LYU, J, SONG, Z, CHEN, J, SHEPARD, MJ, SONG, H, REN, G, LI, Z, GUO, W, ZHUANG, Z a SHI, Y, 2018. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. *J. Pathol.* **244**(3), 358-366. ISSN 00223417. doi: 10.1002/path.5017
- MA, DK, BONAGUIDI, MA, MING, G a SONG, H, 2009. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* **19**(6), 672–682. ISSN 1001-0602. doi: 10.1038/cr.2009.56

- MA, Y, ERKNER, A, GONG, R, YAO, S, TAIPALE, J, BASLER, K a BEACHY, PA, 2002. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell*. **111**(1), 63–75. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00977-7
- MALATESTA, P, APPOLLONI, I a CALZOLARI, F, 2008. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res*. B.m.: Springer-Verlag, **331**(1), 165–178. ISSN 0302-766X. doi: 10.1007/s00441-007-0481-8
- MANZANO, J, BERNAL, J a MORTE, B, 2007. Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* **25**(3), 171–179. ISSN 07365748. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.01.003
- MARETTO, S, CORDENONSI, M, DUPONT, S, BRAGHETTA, P, BROCCOLI, V, HASSAN, AB, VOLPIN, D, BRESSAN, GM a PICCOLO, S, 2003. Mapping Wnt/ -catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**(6), 3299–3304. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0434590100
- MARSHALL, CR, NOOR, A, VINCENT, JB, LIONEL, AC, FEUK, L, SKAUG, J, SHAGO, M, MOESSNER, R, PINTO, D, REN, Y, THIRUVAHINDRAPDURAM, B, FIEBIG, A, et al., 2008. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **82**(2), 477–88. ISSN 1537-6605. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.009
- MARTÍ, E a BOVOLENTA, P, 2002. Sonic hedgehog in CNS development: One signal, multiple outputs. *Trends Neurosci.* **25**(2), 89–96. ISSN 01662236. doi: 10.1016/S0166-2236(02)02062-3
- MARTÍ, E, TAKADA, R, BUMCROT, DA, SASAKI, H a MCMAHON, AP, 1995. Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development*. **121**(8), 2537–47. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7671817>
- MARTÍNEZ-GALÁN, JR, PEDRAZA, P, SANTACANA, M, ESCOBAR DEL RAY, F, MORREALE DE ESCOBAR, G a RUIZ-MARCOS, A, 1997. Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J. Clin. Invest.* B.m.: American Society for Clinical Investigation, **99**(11), 2701–9. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCII19459

- MARTINEZ, S, CROSSLEY, PH, COBOS, I, RUBENSTEIN, JL a MARTIN, GR, 1999. FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development*. **126**(6), 1189–200. Dostupné z: <http://dev.biologists.org/content/develop/126/6/1189.full.pdf>
- MCMAHON, AP a BRADLEY, A, 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*. **62**(6), 1073–85. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/0092-8674(90)90385-R
- MERKLE, FT, MIRZADEH, Z a ALVAREZ-BUYLLA, A, 2007. Mosaic Organization of Neural Stem Cells in the Adult Brain. *Science (80-.)*. **317**(5836), 381–384. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1144914
- MICHALSKI, JP, ANDERSON, C, BEAUVAIS, A, DE REPENTIGNY, Y a KOTHARY, R, 2011. The proteolipid protein promoter drives expression outside of the oligodendrocyte lineage during embryonic and early postnatal development. *PLoS One*. **6**(5). ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0019772
- MILLAT, G, MARÇAIS, C, TOMASETTO, C, CHIKH, K, FENSOM, AH, HARZER, K, WENGER, DA, OHNO, K a VANIER, MT, 2001. Niemann-Pick C1 Disease: Correlations between NPC1 Mutations, Levels of NPC1 Protein, and Phenotypes Emphasize the Functional Significance of the Putative Sterol-Sensing Domain and of the Cysteine-Rich Luminal Loop. *Am. J. Hum. Genet.* **68**(6), 1373–1385. ISSN 00029297. doi: 10.1086/320606
- MIRA, H, ANDREU, Z, SUH, H, LIE, DC, JESSBERGER, S, CONSIGLIO, A, SAN EMETERIO, J, HORTIGÜELA, R, MARQUÉS-TORREJÓN, MÁ, NAKASHIMA, K, COLAK, D, GÖTZ, M, FARIÑAS, I a GAGE, FH, 2010. Signaling through BMPRII Regulates Quiescence and Long-Term Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*. **7**(1), 78–89. ISSN 19345909. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.016
- MOEBIUS, FF, FITZKY, BU, LEE, JN, PAIK, YK a GLOSSMANN, H, 1998. Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(4), 1899–902. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465114>

- MOHAN, V, SINHA, RA, PATHAK, A, RASTOGI, L, KUMAR, P, PAL, A a GODBOLE, MM, 2012. Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico-genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis. *Exp. Neurol.* B.m.: Elsevier Inc., **237**(2), 477–488. ISSN 00144886. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.07.019
- MONTERO-PEDRAZUELA, A, VENERO, C, LAVADO-AUTRIC, R, FERNÁNDEZ-LAMO, I, GARCÍA-VERDUGO, JM, BERNAL, J a GUADAÑO-FERRAZ, A, 2006. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol. Psychiatry.* **11**(4), 361–371. ISSN 1359-4184. doi: 10.1038/sj.mp.4001802
- MORROW, JJ, MENDOZA, A, KOYEN, A, LIZARDO, MM, REN, L, WAYBRIGHT, TJ, HANSEN, RJ, GUSTAFSON, DL, ZHOU, M, FAN, TM, SCACHERI, PC a KHANNA, C, 2016. mTOR inhibition mitigates enhanced mRNA translation associated with the metastatic phenotype of osteosarcoma cells in vivo. *Clin. Cancer Res.* **22**(24), 6129–6141. ISSN 15573265. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0326
- MULLER, M, LUTTER, D a PUSCHEL, AW, 2010. Persistence of the cell-cycle checkpoint kinase Wee1 in SadA- and SadB-deficient neurons disrupts neuronal polarity. *J. Cell Sci.* **123**(2), 286–294. doi: 10.1242/jcs.058230
- MULLIGAN, KA a CHEYETTE, BNR, 2012. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *J. Neuroimmune Pharmacol.* B.m.: NIH Public Access, **7**(4), 774–87. ISSN 1557-1904. doi: 10.1007/s11481-012-9404-x
- NAISMITH, AL, HOFFMAN-CHUDZIK, E, TSUI, LC a RIORDAN, JR, 1985. Study of the expression of myelin proteolipid protein (lipophilin) using a cloned complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* **13**(20), 7413–25. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/13.20.7413
- NEUFELD, EB, WASTNEY, M, PATEL, S, SURESH, S, COONEY, AM, DWYER, NK, ROFF, CF, OHNO, K, MORRIS, JA, CARSTEAD, ED, INCARDONA, JP, STRAUSS, JF, et al., 1999. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J. Biol. Chem.* **274**(14), 9627–35. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.274.14.9627

NIEHRS, C, GLINKA, A, WU, W, DELIUS, H, MONAGHAN, AP a BLUMENSTOCK, C, 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*. **391**(6665), 357–362. ISSN 00280836. doi: 10.1038/34848

NOOR, A, WHIBLEY, A, MARSHALL, CR, GIANAKOPOULOS, PJ, CARSON, AR, ORLIC-MILACIC, M, LIONEL, A, SATO, D, DRMIC, I, NOAKES, C, SENMAN, L, ZHANG, X, et al., 2010a. Disruption at the PTCHD1 locus on Xp22.11 in autism spectrum disorder and intellectual disability. **2**(49), 1–16. doi: 10.1126/scitranslmed.3001267. Disruption

NOOR, A, WHIBLEY, A, MARSHALL, CR, GIANAKOPOULOS, PJ, PITON, A, CARSON, AR, ORLIC-MILACIC, M, LIONEL, AC, SATO, D, PINTO, D, DRMIC, I, VINCENT, JB, et al., 2010b. Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism spectrum disorder and intellectual disability. *Sci. Transl. Med.* **2**(49), 49ra68. ISSN 1946-6242. doi: 10.1126/scitranslmed.3001267

NORTHCOTT, PA, HIELSCHER, T, DUBUC, A, MACK, S, SHIH, D, REMKE, M, AL-HALABI, H, ALBRECHT, S, JABADO, N, EBERHART, CG, GRAJKOWSKA, W, WEISS, WA, et al., 2011a. Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol.* **122**(2), 231–240. ISSN 00016322. doi: 10.1007/s00401-011-0846-7

NORTHCOTT, PA, KORSHUNOV, A, WITT, H, HIELSCHER, T, EBERHART, CG, MACK, S, BOUFFET, E, CLIFFORD, SC, HAWKINS, CE, FRENCH, P, RUTKA, JT, PFISTER, S a TAYLOR, MD, 2011b. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol.* **29**(11), 1408–1414. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4324

NORTHCOTT, PA, SHIH, DJ, PEACOCK, J, GARZIA, L, MORRISSY, AS, ZICHNER, T, STUTZ, AM, KORSHUNOV, A, REIMAND, J, SCHUMACHER, SE, BEROUKHIM, R, TAYLOR, MD, et al., 2012. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature*. **488**(7409), 49–56. doi: 10.1038/nature11327

PALMER, TD, TAKAHASHI, J a GAGE, FH, 1997. The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**(6), 389–404. ISSN 10447431. doi: 10.1006/mcne.1996.0595

- PASTORINO, L, GHIORZO, P, NASTI, S, BATTISTUZZI, L, CUSANO, R, MARZOCCHI, C, GARRÈ, ML, CLEMENTI, M a SCARRÀ, GB, 2009. Identification of a *SUFU* germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A*. **149A**(7), 1539–1543. ISSN 15524825. doi: 10.1002/ajmg.a.32944
- PEI, Y, BRUN, SN, MARKANT, SL, LENTO, W, GIBSON, P, TAKETO, MM, GIOVANNINI, M, GILBERTSON, RJ a WECHSLER-REYA, RJ, 2012a. WNT signaling increases proliferation and impairs differentiation of stem cells in the developing cerebellum. *Development*. **139**(10), 1724–1733. ISSN 0950-1991. doi: 10.1242/dev.050104
- PEI, Y, MOORE, CE, WANG, J, TEWARI, AK, EROSHKIN, A, CHO, Y-J, WITT, H, KORSHUNOV, A, READ, T-A, SUN, JL, SCHMITT, EM, MILLER, CR, et al., 2012b. An Animal Model of MYC-Driven Medulloblastoma. *Cancer Cell*. **21**(2), 155–167. ISSN 15356108. doi: 10.1016/j.ccr.2011.12.021
- PICCOLO, S, SASAI, Y, LU, B a DE ROBERTIS, EM, 1996. Dorsoventral Patterning in *Xenopus*: Inhibition of Ventral Signals by Direct Binding of Chordin to BMP-4. *Cell*. B.m.: Cell Press, **86**(4), 589–598. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80132-4
- PLACZEK, M, TESSIER-LAVIGNE, M, YAMADA, T, JESSELL, T a DODD, J, 1990. Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science*. **250**(4983), 985–8. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.2237443
- POLLARD, SM, CONTI, L, SUN, Y, GOFFREDO, D a SMITH, A, 2006. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex*. **16 Suppl 1**, i112-20. doi: 10.1093/cercor/bhj167
- POWNALL, ME a ISAACS, H V., 2010. *FGF Signalling in Vertebrate Development*. B.m.: Morgan & Claypool Life Sciences. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452439>
- PRÉAU, L, FINI, JB, MORVAN-DUBOIS, G a DEMENEIX, B, 2015. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech*. B.m.: Elsevier B.V., **1849**(2), 112–121. ISSN 18764320. doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.06.015

- QUINT, K, STIEL, N, NEUREITER, D, SCHLICKER, HU, NIMSKY, C, OCKER, M, STRIK, H a KOLODZIEJ, MA, 2014. The role of sphingosine kinase isoforms and receptors S1P1, S1P2, S1P3, and S1P5 in primary, secondary, and recurrent glioblastomas. *Tumor Biol.* **35**(9), 8979–8989. doi: 10.1007/s13277-014-2172-x
- REID, TW, ALBERT, DM, RABSON, AS, RUSSELL, P, CRAFT, J, CHU, EW, TRALKA, TS a WILCOX, JL, 1974. Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**(2), 347–60. ISSN 0027-8874. doi: 10.1093/jnci/53.2.347
- REMAUD, S, GOTHÍÉ, J-D, MORVAN-DUBOIS, G a DEMENEIX, BA, 2014. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 62. doi: 10.3389/fendo.2014.00062
- REYNOLDS, BA a WEISS, S, 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (80-.)*. **255**(5052), 1707–1710. doi: 10.1126/science.1553558
- ROBINSON, G, PARKER, M, KRANENBURG, TA, LU, C, CHEN, X, DING, L, PHOENIX, TN, HEDLUND, E, WEI, L, ZHU, X, CHALHOUB, N, BAKER, SJ, et al., 2012. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature*. **488**(7409), 43–48. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature11213
- ROGERS, CD, MOODY, SA a CASEY, ES, 2009. Neural induction and factors that stabilize a neural fate. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*. B.m.: NIH Public Access, **87**(3), 249–62. ISSN 1542-9768. doi: 10.1002/bdrc.20157
- ROITELMAN, J, OLENDER, EH, BAR-NUN, S, DUNN, WA a SIMONI, RD, 1992. Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **117**(5), 959–73. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.117.5.959
- ROQUE, T, HATON, C, ETIENNE, O, CHICHEPORTICHE, A, ROUSSEAU, L, MARTIN, L, MOUTHON, M-A a BOUSSIN, FD, 2012. Lack of a p21waf1/cip -dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. *Stem Cells*. B.m.: Wiley-Blackwell, **30**(3), 537–47. ISSN 1549-4918. doi: 10.1002/stem.1010

RUAN, WJ, XU, EP, XU, FY, MA, Y, DENG, H, HUANG, Q, LV, BJ, HU, H, LIN, J, CUI, J, DI, MJ, DONG, JK a LAI, MD, 2007. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis. *Cancer Biol. Ther.* **6**(3), 354–359. doi: 10.4161/cbt.6.3.3702

RUPP, C, SCHERZER, M, RUDISCH, A, UNGER, C, HASLINGER, C, SCHWEIFER, N, ARTAKER, M, NIVARTHI, H, MORIGGL, R, HENGSTSCHLAGER, M, KERJASCHKI, D, SOMMERGRUBER, W, DOLZNIG, H a GARIN-CHESA, P, 2015. IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction. *Oncogene.* **34**(7), 815–825. doi: 10.1038/onc.2014.18

SADLER, TW, 2012. *Langman's medical embryology*. B.m.: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 1451113420.

SATO, Y, INOKUCHI, M, TAKAGI, Y, OTSUKI, S, FUJIMORI, Y, YANAKA, Y, KOBAYASHI, K, HIGUCHI, K, KOJIMA, K a KAWANO, T, 2015. Relationship between expression of IGFBP7 and clinicopathological variables in gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* **68**(10), 795–801. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202987

SEIB, DRM, CORSINI, NS, ELLWANGER, K, PLAAS, C, MATEOS, A, PITZER, C, NIEHRS, C, CELIKEL, T a MARTIN-VILLALBA, A, 2013. Loss of Dickkopf-1 Restores Neurogenesis in Old Age and Counteracts Cognitive Decline. *Cell Stem Cell.* **12**(2), 204–214. ISSN 19345909. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.010

SEOANE, J, LE, H-V, SHEN, L, ANDERSON, SA a MASSAGUÉ, J, 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell.* **117**(2), 211–23. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00298-3

SERI, B, GARCÍA-VERDUGO, JM, MCEWEN, BS a ALVAREZ-BUYLLA, A, 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* **21**(18), 7153–60. ISSN 1529-2401. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549726>

SHALEM, O, SANJANA, NE, HARTENIAN, E, SHI, X, SCOTT, DA, MIKKELSEN, TS, HECKL, D, EBERT, BL, ROOT, DE, DOENCH, JG a ZHANG, F, 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science (80-.).* **343**(6166), 84–87. doi: 10.1126/science.1247005

SCHNEIDER, CA, RASBAND, WS a ELICEIRI, KW, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* **9**(7), 671–5. ISSN 1548-7105. doi: 10.1038/nmeth.2089

SCHROEDER, K a GURURANGAN, S, 2014. Molecular variants and mutations in medulloblastoma. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **7**(1), 43–51. ISSN 11787066. doi: 10.2147/PGPM.S38698

SCHULLER, U, HEINE, VM, MAO, J, KHO, AT, DILLON, AK, HAN, YG, HUILLARD, E, SUN, T, LIGON, AH, QIAN, Y, MA, Q, ALVAREZ-BUYLLA, A, MCMAHON, AP, ROWITCH, DH a LIGON, KL, 2008. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell.* **14**(2), 123–134. doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.005

SIMÕES-COSTA, M a BRONNER, ME, 2013. Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res.* B.m.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **23**(7), 1069–80. ISSN 1549-5469. doi: 10.1101/gr.157586.113

SLADE, I, MURRAY, A, HANKS, S, KUMAR, A, WALKER, L, HARGRAVE, D, DOUGLAS, J, STILLER, C, IZATT, L a RAHMAN, N, 2011. Heterogeneity of familial medulloblastoma and contribution of germline PTCH1 and SUFU mutations to sporadic medulloblastoma. *Fam. Cancer.* **10**(2), 337–342. ISSN 1389-9600. doi: 10.1007/s10689-010-9411-0

SMITH, CG, NAVEN, M, HARRIS, R, COLLEY, J, WEST, H, LI, N, LIU, Y, ADAMS, R, MAUGHAN, TS, NICHOLS, L, KAPLAN, R, WAGNER, MJ, MCLEOD, HL a CHEADLE, JP, 2013. Exome Resequencing Identifies Potential Tumor-Suppressor Genes that Predispose to Colorectal Cancer. *Hum. Mutat.* **34**(7), 1026–1034. ISSN 10597794. doi: 10.1002/humu.22333

SMITH, E, RUSZKIEWICZ, a R, JAMIESON, GG a DREW, P a, 2014. IGFBP7 is associated with poor prognosis in oesophageal adenocarcinoma and is regulated by promoter DNA methylation. *Br. J. Cancer.* B.m.: Nature Publishing Group, **110**(3), 775–82. ISSN 1532-1827. doi: 10.1038/bjc.2013.783

SMYTH, GK, 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* **3**, Article3. doi: 10.2202/1544-6115.1027

SNYDER, EY, DEITCHER, DL, WALSH, C, ARNOLD-ALDEA, S, HARTWIEG, EA a CEPKO, CL, 1992. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*. **68**(1), 33–51. doi: 10.1016/0092-8674(92)90204-P

SOMMER, I a SCHACHNER, M, 1981. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytological study in the central nervous system. *Dev. Biol.* **83**(2), 311–327. ISSN 00121606. doi: 10.1016/0012-1606(81)90477-2

SOREZE, Y, BOUTRON, A, HABAROU, F, BARNERIAS, C, NONNENMACHER, L, DELPECH, H, MAMOUNE, A, CHRETIEN, D, HUBERT, L, BOLE-FEYSOT, C, NITSCHKE, P, CORREIA, I, et al., 2013. Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**. doi: Artn 19210.1186/1750-1172-8-192

SOTELO, C, 2004. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog. Neurobiol.* **72**(5), 295–339. doi: 10.1016/J.PNEUROBIO.2004.03.004

SOULE, HD, VAZGUEZ, J, LONG, A, ALBERT, S a BRENNAN, M, 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**(5), 1409–16. ISSN 0027-8874. doi: 10.1093/jnci/51.5.1409

SPRENGER, CC, DAMON, SE, HWA, V, ROSENFELD, RG a PLYMATE, SR, 1999. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) is a potential tumor suppressor protein for prostate cancer. *Cancer Res.* **59**(10), 2370–5. ISSN 0008-5472.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10344746>

STEINER, M, KLEIN, E a KLEIN, G, 1975. Antinuclear reactivity of sera in patients with leukemia and other neoplastic diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **4**(3), 374–81. ISSN 0090-1229. doi: 10.1016/0090-1229(75)90006-9

STREIT, A, BERLINER, AJ, PAPANAYOTOU, C, SIRULNIK, A a STERN, CD, 2000. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature.* **406**(6791), 74–8. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/35017617

STRUTT, H, THOMAS, C, NAKANO, Y, STARK, D, NEAVE, B, TAYLOR, AM a INGHAM, PW, 2001. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr. Biol.* B.m.: Cell Press, **11**(8), 608–613. ISSN 0960-9822. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00179-8

SUN, GJ, ZHOU, Y, STADEL, RP, MOSS, J, YONG, JHA, ITO, S, KAWASAKI, NK, PHAN, AT, OH, JH, MODAK, N, REED, RR, TONI, N, SONG, H a MING, G, 2015. Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**(30), 9484–9489. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.1508545112

SWIFT, S, LORENS, J, ACHACOSO, P a NOLAN, GP, 2001. Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr. Protoc. Immunol.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., **Chapter 10**, Unit 10.17C. ISSN 1934-368X. doi: 10.1002/0471142735.im1017cs31

TAKEISHI, K, TAKETOMI, A, SHIRABE, K, TOSHIMA, T, MOTOMURA, T, IKEGAMI, T, YOSHIZUMI, T, SAKANE, F a MAEHARA, Y, 2012. Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J. Hepatol.* **57**(1), 77–83. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.026

TARUNINA, M, ALGER, L, CHU, G, MUNGER, K, GUDKOV, A a JAT, PS, 2004. Functional genetic screen for genes involved in senescence: role of Tid1, a homologue of the *Drosophila* tumor suppressor l(2)tid, in senescence and cell survival. *Mol Cell Biol.* **24**(24), 10792–10801. doi: 10.1128/MCB.24.24.10792-10801.2004

TAYLOR, MD, NORTHCOTT, PA, KORSHUNOV, A, REMKE, M, CHO, YJ, CLIFFORD, SC, EBERHART, CG, PARSONS, DW, RUTKOWSKI, S, GAJJAR, A, ELLISON, DW, LICHTER, P, GILBERTSON, RJ, POMEROY, SL, KOOL, M a PFISTER, SM, 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathol.* **123**(4), 465–472. ISSN 00016322. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z

THOMAS, LE, HURLEY, JJ, MEUSER, E, JOSE, S, ASHELFORD, KE, MORT, M, IDZIASZCZYK, S, MAYNARD, J, BRITO, HL, HARRY, M, WALTERS, A, RAJA, M, et al., 2017. Burden and profile of somatic mutation in duodenal adenomas from patients with familial adenomatous- and MUTYH-associated polyposis. *Clin. Cancer Res.* **23**(21), 6721–6732. ISSN 15573265. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1269

TORRICO, B, FERNÁNDEZ-CASTILLO, N, HERVÁS, A, MILÀ, M, SALGADO, M, RUEDA, I, BUITELAAR, JK, ROMMELSE, N, OERLEMANS, AM, BRALTEN, J, FREITAG, CM, REIF, A, et al., 2015. Contribution of common and rare variants of the PTCHD1 gene to autism spectrum disorders and intellectual disability. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**(12), 1694–701. ISSN 1476-5438. doi: 10.1038/ejhg.2015.37

TRAN, Y, BENBATOUL, K, GORSE, K, REMPEL, S, FUTREAL, A, GREEN, M a NEWSHAM, I, 1998. Novel regions of allelic deletion on chromosome 18p in tumors of the lung, brain and breast. *Oncogene.* **17**(26), 3499–3505. doi: 10.1038/sj.onc.1202258

TRISCOTT, J, LEE, C, FOSTER, C, MANORANJAN, B, PAMBID, MR, BERNS, R, FOTOVATI, A, VENUGOPAL, C, O'HALLORAN, K, NARENDRAN, A, HAWKINS, C, RAMASWAMY, V, et al., 2013. Personalizing the Treatment of Pediatric Medulloblastoma: Polo-like Kinase 1 as a Molecular Target in High-Risk Children. *Cancer Res.* **73**(22). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4331

TSYGANKOV, D, LIU, Y, SANOFF, HK, SHARPLESS, NE a ELSTON, TC, 2009. A quantitative model for age-dependent expression of the p16INK4a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**(39), 16562–16567. doi: 10.1073/pnas.0904405106

ULFIG, N a BRIESE, M, 2004. Evidence for the presence of the sphingosine-1-phosphate receptor Edg-8 in human radial glial fibers. *Acta Histochem.* **106**(5), 373–378. ISSN 00651281. doi: 10.1016/j.acthis.2004.08.002

UNG, DC, IACONO, G, MÉZIANE, H, BLANCHARD, E, PAPON, M-A, SELTEN, M, VAN RHIJN, J-R, MONTJEAN, R, RUCCI, J, MARTIN, S, FLEET, A, BIRLING, M-C, et al., 2017. Ptchd1 deficiency induces excitatory synaptic and cognitive dysfunctions in mouse. *Mol. Psychiatry.* B.m.: Nature Publishing Group, (October 2016), 1–12. ISSN 1359-4184. doi: 10.1038/mp.2017.39

VALACH, J, FIK, Z, STRNAD, H, CHOVANEC, M, PLZAK, J, CADA, Z, SZABO, P, SACHOVA, J, HROUDOVA, M, URBANOVA, M, STEFFL, M, PACES, J, MAZANEK, J, VLCEK, C, BETKA, J, KALTNER, H, ANDRE, S, GABIUS, HJ, KODET, R, SMETANA JR., K, GAL, P a KOLAR, M, 2012. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer*. **131**(11), 2499–2508. doi: 10.1002/ijc.27550

VENERE, M, HAN, Y-G, BELL, R, SONG, JS, ALVAREZ-BUYLLA, A, BLELLOCH, R, STEVANOVIC, M, GOODFELLOW, PN a LOVELL-BADGE, R, 2012. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development*. B.m.: Oxford University Press for The Company of Biologists Limited, **139**(21), 3938–49. ISSN 1477-9129. doi: 10.1242/dev.081133

WANG, D, LAGERSTROM, R, SUN, C, BISHOF, L, VALOTTON, P a GÖTTE, M, 2010. HCA-Vision: Automated Neurite Outgrowth Analysis. *J. Biomol. Screen*. **15**(9), 1165–1170. doi: 10.1177/1087057110382894

WATERHAM, HR a WANDERS, RJ, 2000. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochim. Biophys. Acta*. **1529**(1–3), 340–56. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00159-1

WATERHAM, HR, WIJBURG, FA, HENNEKAM, RC, VREKEN, P, POLL-THE, BT, DORLAND, L, DURAN, M, JIRA, PE, SMEITINK, JA, WEVERS, RA a WANDERS, RJ, 1998. Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am. J. Hum. Genet*. B.m.: Elsevier, **63**(2), 329–38. ISSN 0002-9297. doi: 10.1086/301982

WEERARATNE, SD, AMANI, V, TEIDER, N, PIERRE-FRANCOIS, J, WINTER, D, KYE, MJ, SENGUPTA, S, ARCHER, T, REMKE, M, BAI, AHC, WARREN, P, PFISTER, SM, STEEN, JAJ, POMEROY, SL a CHO, Y-J, 2012. Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. **123**(4), 539–552. ISSN 0001-6322. doi: 10.1007/s00401-012-0969-5

WELLS, MF, WIMMER, RD, SCHMITT, LI, FENG, G a HALASSA, MM, 2016. Thalamic reticular impairment underlies attention deficit in Ptchd1Y^{-/-} mice. *Nature*. **532**(7597), 58–63. doi: 10.1038/nature17427

WHITE, MJ, RISSE-ADAMS, O, GODDARD, P, CONTRERAS, MG, ADAMS, J, HU, D, ENG, C, OH, SS, DAVIS, A, MEADE, K, BRIGINO-BUENAVENTURA, E, LENOIR, MA, BIBBINS-DOMINGO, K, PINO-YANES, M a BURCHARD, EG, 2016. Novel genetic risk factors for asthma in African American children: Precision Medicine and the SAGE II Study. *Immunogenetics*. **68**(6–7), 391–400. ISSN 0093-7711. doi: 10.1007/s00251-016-0914-1

WILLS, AE, CHOI, VM, BENNETT, MJ, KHOKHA, MK a HARLAND, RM, 2010. BMP antagonists and FGF signaling contribute to different domains of the neural plate in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **337**(2), 335–50. ISSN 1095-564X. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.008

WILSON, L a MADEN, M, 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.* **282**(1), 1–13. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.027

WILSON, PA a HEMMATI-BRIVANLOU, A, 1995. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*. **376**(6538), 331–333. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/376331a0

WILSON, SI, GRAZIANO, E, HARLAND, R, JESSELL, TM a EDLUND, T, 2000. An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr. Biol.* B.m.: Cell Press, **10**(8), 421–429. ISSN 0960-9822. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00431-0

YANAGISAWA, K, YASUDA, S, KAI, M, IMAI, SI, YAMADA, K, YAMASHITA, T, JIMBOW, K, KANO, H a SAKANE, F, 2007. Diacylglycerol kinase α suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human melanoma cells through NF- κ B activation. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Biol. Lipids*. **1771**(4), 462–474. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.12.008

YANG, SR, KIM, SJ, BYUN, KH, HUTCHINSON, B, LEE, BH, MICHIKAWA, M, LEE, YS a KANG, KS, 2006. NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Stem Cells*. **24**(2), 292–298. doi: 10.1634/stemcells.2005-0221

YANG, Z-J, ELLIS, T, MARKANT, SL, READ, T-A, KESSLER, JD, BOURBOULAS, M, SCHÜLLER, U, MACHOLD, R, FISHELL, G, ROWITCH, DH, WAINWRIGHT, BJ a WECHSLER-REYA, RJ, 2008. Medulloblastoma Can Be Initiated by Deletion of Patched in Lineage-Restricted Progenitors or Stem Cells. *Cancer Cell*. **14**(2), 135–145. ISSN 15356108. doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.003

YING, QL, STAVRIDIS, M, GRIFFITHS, D, LI, M a SMITH, A, 2003. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* **21**(2), 183–186. doi: 10.1038/nbt780

ZHANG, M, DWYER, NK, LOVE, DC, COONEY, A, COMLY, M, NEUFELD, E, PENTCHEV, PG, BLANCHETTE-MACKIE, EJ a HANOVER, JA, 2001. Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann-Pick type C1 disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**(8), 4466–4471. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.081070898

ZHONG, Y, GU, LJ, SUN, XG, YANG, SH a ZHANG, XH, 2014. Comprehensive analysis of patched domain-containing genes reveals a unique evolutionary pattern. *Genet. Mol. Res.* **13**(3), 7318–31. ISSN 1676-5680. doi: 10.4238/2014.February.13.11

ZIKOVA, M, CORLETT, A, BENDOVA, Z, PAJER, P a BARTUNEK, P, 2009. DISP3, a sterol-sensing domain-containing protein that links thyroid hormone action and cholesterol metabolism. *Mol Endocrinol.* **23**(4), 520–528. doi: 10.1210/me.2008-0271

ZIKOVA, M, KONIROVA, J, DITRYCHOVA, K, CORLETT, A, KOLAR, M a BARTUNEK, P, 2014. DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. *FEBS Lett.* **588**(21), 4071–4077. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.036

ZÍKOVÁ, M, KONÍŘOVÁ, J, DITRYCHOVÁ, K, CORLETT, A, KOLÁŘ, M a BARTŮŇEK, P, 2014. DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. *FEBS Lett.* **588**(21), 4071–4077. ISSN 18733468. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.036

ZIMMERMAN, LB, DE JESÚS-ESCOBAR, JM a HARLAND, RM, 1996. The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell.* **86**(4), 599–606. ISSN 00928674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80133-6

ZITTERBART, K, PAVELKA, Z a ZITTERBARTOVÁ, J, 2010. Meduloblastom: nejčastější zhoubný nádor mozku u dětí. *Onkol. /.* **4**(4), 256–259. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/04/11.pdf>

ZURAWEL, RH, ALLEN, C, WECHSLER-REYA, R, SCOTT, MP a RAFFEL, C, 2000. Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes. Chromosomes Cancer.* **28**(1), 77–81. ISSN 1045-2257. doi: 10.1002/(SICI)1098-2264(200005)28:1<77::AID-GCC9>3.3.CO;2-P

ZURAWEL, RH, CHIAPPA, SA, ALLEN, C a RAFFEL, C, 1998. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res.* **58**(5), 896–9. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500446>



DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells



Martina Zíková¹, Jana Konířová¹, Karolína Ditrychová, Alicia Corlett, Michal Kolář, Petr Bartůněk*

Institute of Molecular Genetics AS CR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2014

Revised 4 September 2014

Accepted 25 September 2014

Available online 2 October 2014

Edited by Jesus Avila

Keywords:

Cancer

Proliferation

Neural cells

Differentiation

Lipids

ABSTRACT

DISP3 (PTCHD2), a sterol-sensing domain-containing protein, is highly expressed in neural tissue but its role in neural differentiation is unknown. In the present study we used a multipotent cerebellar progenitor cell line, C17.2, to investigate the impact of DISP3 on the proliferation and differentiation of neural precursors. We found that ectopically expressed DISP3 promotes cell proliferation and alters expression of genes that are involved in tumorigenesis. Finally, the differentiation profile of DISP3-expressing cells was altered, as evidenced by delayed expression of neural specific markers and a reduced capacity to undergo neural differentiation.

© 2014 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Dispatched 3 gene (*Disp3*), also known as *Ptchd2* and KIAA1337, was first reported in a human cDNA sequencing project that was focused on identifying genes encoding large proteins in the human brain [1].

Subsequent cloning and characterization of *Disp3* revealed that it encodes a 13-transmembrane domain-containing protein that is related to the Dispatched family of proteins. Further, its expression is regulated both *in vivo* and *in vitro* by thyroid hormone [2]. In adult neural tissue, *Disp3* is expressed predominantly in the hippocampus and cerebellum, with scattered expression in the cortex. In fibroblasts, ectopic expression of *DISP3* leads to increased cellular cholesterol levels that exhibit an altered distribution pattern. Based on these findings it was proposed that *DISP3* might represent a new molecular link between thyroid hormone and cholesterol metabolism [2].

Previous studies in mice have demonstrated that retroviral insertional mutagenesis induced by a recombinant M-MLV encoding PDGF-B results in a high incidence of glioblastomas.

One of the genes identified in this study was *Disp3* [3]. Interestingly, a subsequent study further demonstrated a link between *Disp3* and oncogenesis, showing that *Disp3* expression was amplified in long latency tumors [4].

To identify the pattern and level of *Disp3* expression in human brain cancer we investigated datasets from the publicly available Oncomine database (www.oncomine.org) [5]. Analysis of the Northcott 3 [6], Kool et al. [7] and Fattet et al. [8] brain datasets revealed that *Disp3* mRNA was significantly elevated in human medulloblastoma.

Medulloblastoma, the most common cause of oncological death in children, accounts for over 20% of all central nervous system tumors. According to the WHO classification, medulloblastoma is defined as a grade IV malignant embryonal neoplasm that arises from the cerebellum with five histological varieties [9]. Several research groups have performed gene-expressing profiling of medulloblastoma and have identified four molecular subtypes: WNT, Sonic Hedgehog (SHH), Group 3, and Group 4. These molecular subtypes exhibit distinct gene expression, mutational profiles, and prognosis and indicate that medulloblastoma is not just one disease (reviewed in [10]).

Given that *Disp3* expression is elevated in medulloblastoma, we wished to investigate what role this gene may play in neural progenitor commitment and differentiation. To this end we used the multipotent neural progenitor cell line C17.2 originally established from cerebellar neural cells isolated from the external germinal layer (EGL) of neonatal mice that were subsequently immortalized

Abbreviations: EGL, external germinal layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GNP, granule neuron precursors; M-MLV, Moloney Murine Leukemia Virus; PDGF, plate-derived growth factor; SSD, sterol-sensing domain

* Corresponding author.

E-mail address: bartunek@img.cas.cz (P. Bartůněk).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.036>

0014-5793/© 2014 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

by v-myc transduction [11]. These progenitor cells have the potential to differentiate into neurons or glia depending on micro-environmental signals, and can thus be used as an alternative to primary brain tissue culture [12].

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures and reagents

C17.2 cells, a generous gift from Dietmar Spengler (Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany), were grown in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FCS, 5% horse serum, 2 mM L-glutamine, 100 U penicillin/ml and 100 µg streptomycin/ml (Gibco). The cells were passaged every 3rd day using 0.05% trypsin/EDTA and reseeded at a density of $1 \times 10^4/\text{cm}^2$. For differentiation experiments cells were seeded at a density of $0.26 \times 10^3/\text{cm}^2$ in standard growth medium. One day later the cells were washed and incubated in differentiation medium DMEM:F12 (Sigma) containing N2 supplements (Gibco), NGF and BDNF (10 ng/ml of each neurotrophic factor, R&D Systems).

The human DAOY cell line was obtained from Mathias Heikenwaelder (Institute of Virology, TU Munich, Germany) and cultured in IMEM (Gibco) with 10% FBS and 100 U penicillin/ml and 100 µg streptomycin/ml.

2.2. Viral production, transduction of C17.2 cells and transfection of DAOY cells

To generate Disp3-expressing C17.2 cells, the full-length human Disp3 was cloned into the retroviral vector pBABE-Hygro. Retroviruses were prepared by transfecting the expression vector into Phoenix cells using Lipofectamine reagent (Invitrogen). Viral supernatant was harvested at 48 and 72 h post transfection. C17.2 cells were incubated with virus supernatant and polybrene (4 µg/ml) for 6 h before adding the fresh medium and hygromycin was added 48 h later. To generate Disp3-expressing DAOY cells, the full-length human Disp3 was cloned into the pCDNA3 vector. DAOY cells were transfected using Lipofectamine and neomycin was added two days after transfection. The control cells were generating by transducing C17.2 and DAOY cells by empty vectors pBABE-Hygro and pCDNA3, respectively.

2.3. RT-PCR and real-time qPCR

Total RNA was isolated using PureLink RNA Mini Kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. For RT-PCR, 2 µg of total RNA was reverse transcribed using random hexamer primers (Invitrogen) and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). All qPCR reactions were performed in triplicate using the SYBR Green I Master mix and the LightCycler[®] 480 system (Roche).

2.4. Microarray analysis

The quality and concentration of RNA were measured and RNA integrity was analyzed using Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent). Microarray analysis was conducted using Illumina MouseRef-8 v2 Expression BeadChips according to their standard protocol. The analysis was performed in four biological replicates per group. The raw data were preprocessed using GenomeStudio software and analyzed within the limma package [13] of Bioconductor [14] as described elsewhere [15]. A moderated *t*-test was used to detect transcripts differentially expressed between the treated samples and controls. As the analysis was considered exploratory, we used weak criteria to select differentially transcribed genes ($P < 0.05$, which corresponds to Storey's $q < 0.9$ [16], and $|\log_2\text{FC}| > 0.6$). The microarray data were deposited in the ArrayExpress database under accession number E-MTAB-2975.

2.5. Primers

The following primer sequences were used: gapdh 5'-CCATGAC AACTTTGGCATTG-3' and 5'-TCCCCACAGCCTTAGCAG-3', ubb 5'-AT GTGAAGGCCAAGATCCAG-3' and 5'-TAATAGCCACCCCTCAGACG-3', disp3 5'-CAGCAGCTTTGACCTTCTCA-3' and 5'-GCAACATCTGCAG-GAAGGA-3', βIII-tubulin 5'-TGGACAGTGTTCGGTCTGG-3' and 5'-C CCTCCGTATAGTGCCTTTG-3', gfap 5'-TGAGGCAGAAGCTCCAAGA-3' and 5'-CCAGGGTGGCTTCATCTGC-3', nestin 5'-AGGCTGAGAATC TCGCTTGC-3' and 5'-GGTGTGGTCTCTGGTATCC-3', epb4.113 5'-GCCAGCTATCAGAAGATACAC-3' and 5'-AGCTCTGACTGCACCGTG TAGGA-3', prelp 5'-GAACTTCTAGCTGGCTCTCT-3' and 5'-GGATGCC CTCATGATCCAGG-3'.

2.6. Proliferation assay

Cell proliferation was measured using a thymidine incorporation assay. Cells were plated at a density of 3×10^3 cells/well in 96-well plates. After 12 h, cells were pulsed with [methyl-³H] thymidine (UJV Rez) and cultured for an additional 6 h. Cells were harvested onto Filtermat using a FilterMate Harvester. Incorporated radioactivity was quantified using MicroBeta2 Microplate scintillation counter (PerkinElmer).

2.7. Expression of recombinant DISP3 protein and production of antibody

The expression vector encoding amino acids 692–1115 of DISP3 (NP_001186105.1) was transformed into BL21(DE3) *Escherichia coli* cells. The recombinant His-DISP3 protein was expressed, purified and used to immunize New Zealand rabbits as described earlier [2]. Immune sera were collected three weeks after the final immunization and purified using a Melon gel purification kit (Thermo Scientific).

2.8. Immunoblotting and immunofluorescence

Protein samples were separated by SDS-PAGE using 4–15% pre-cast gradient polyacrylamide gels (Biorad). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, which were subsequently blocked in a solution containing 5% non-fat milk dissolved in TBS and 0.05% Tween-20 (TBST). Filters were incubated in primary antibody diluted in 1% milk/TBST overnight before being washed and incubated with secondary antibody (ECL kit, GE Life Sciences).

For the detection of proteins via immunofluorescence, cells were grown on glass coverslips, fixed in 3% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100 before incubation with primary antibodies: polyclonal anti-DISP3 antibody (see above) or mouse anti-nestin (1:400, Millipore), mouse anti-βIII tubulin (1:1000, R&D systems), mouse anti-GFAP (1:400, Sigma), mouse anti-GAPDH (1:2000, GeneTex). Staining was visualized by the biotin-streptavidin method using streptavidin conjugated to Alexa Fluor 555 (Invitrogen).

2.9. Neutral lipid staining

Neutral lipid staining was carried out in fixed C17.2 cells using Nile Red (final concentration 1 µg/ml) and analyzed using the Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer). Results were evaluated using Columbus software (PerkinElmer).

3. Results

3.1. Ectopic expression of DISP3 in C17.2 neural stem cells

C17.2 cells overexpressing DISP3 were generated by retroviral transduction. To confirm increased Disp3 expression, RT-PCR was

used to analyze the mRNA isolated from infected C17.2 cultures (Fig. 1A). DISP3 protein levels were examined using a rabbit polyclonal antibody generated against a highly conserved C-terminal region of DISP3. As a control, a previously utilized DISP3 antibody generated against the N-terminal region was also used [2]. Immunoblotting of protein extracts from both control and DISP3-expressing cells showed a significant increase in the level of a protein of approximately 150 kDa in DISP3-expressing cells (Fig. 1B). The same staining pattern was obtained using the antibody against the DISP3 N-terminal region (data not shown). Immunofluorescence staining of fixed cells similarly demonstrated an increase in the expression of DISP3 in overexpressing cells and its localization predominantly restricted to the cytoplasm (Fig. 1C).

3.2. DISP3 overexpression promotes proliferation of neural cells

During routine cultivation of C17.2 cells we observed that cells ectopically expressing DISP3 seemed to proliferate faster than control cells. To quantitate cell proliferation, a thymidine incorporation assay was performed. The proliferation rate of C17.2 cells ectopically expressing DISP3 was increased approximately 1.7-fold compared to control cells (Fig. 2A). Furthermore, when a human medulloblastoma cell line (DAOY) that normally expresses very low levels of endogenous DISP3 was transfected with a Disp3 expression vector, its proliferation rate increased even further (1.9-fold, Fig. 2B). Taken together, these results suggest that DISP3 overexpression may provide a growth advantage by increasing cell proliferation.

3.3. DISP3 overexpression leads to altered gene expression in C17.2 cells

Microarray analysis was used to identify genes whose expression was altered by the ectopic expression of DISP3. Total RNAs from control and DISP3 C17.2 cell lines were isolated and hybridized to the Illumina Mouse Expression Chips. Comparison of the resultant expression profiles established a list of genes whose expression was significantly modified by increased DISP3 expression (Fig. 3A). QPCR was used to confirm the reduction in mRNA

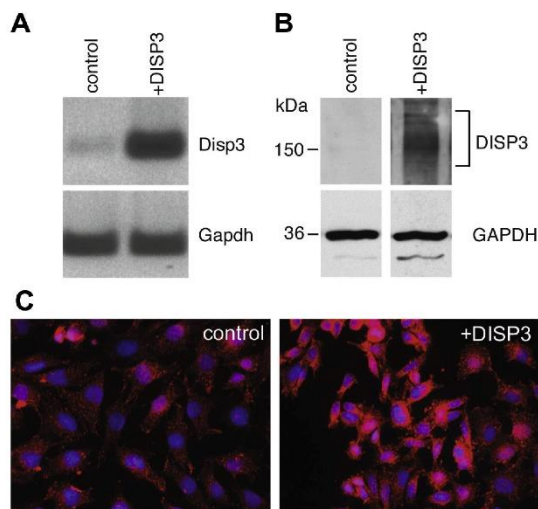


Fig. 1. C17.2 cells ectopically express DISP3. C17.2 cells were infected with a retrovirus encoding human DISP3 and empty retroviral vector (control). Expression was confirmed by RT-PCR (A), western blot (B) and immunofluorescence (C). Gapdh served as a loading control (A,B). Cells were stained with a polyclonal DISP3 antibody (red), and DAPI (blue) was used to stain nuclei (C).

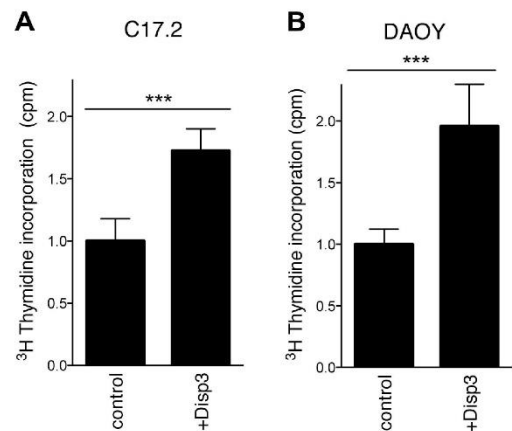


Fig. 2. Ectopically expressed DISP3 promotes cell proliferation in neural cells. Cell proliferation of control and DISP3 cells was measured by a thymidine incorporation assay in C17.2 (A) and DAOY (B) cell lines. Bars represent the average of at least three independent experiments, with error bars representing standard deviation and the level of statistical significance (***) $P < 0.001$. Control (empty vector).

expression of erythrocyte protein band 4.1-like 3 (Epb4.113, 4.1B) and proline arginine-rich and leucine-rich repeat protein (Prelp). Compared to control cells, the relative expression of Epb4.113 and Prelp in C17.2 DISP3 cells was decreased by 27% and 45%, respectively (Fig. 3B). *In situ* hybridization data obtained from the Allen Brain Atlas demonstrate that both genes are expressed within the mouse brain (Fig. 3C, <http://www.brain-map.org>). Specifically, Epb4.113 exhibits prominent expression in the hippocampus, olfactory bulb and Purkinje cells of the cerebellum. Prelp is expressed similarly, albeit at much lower levels. Interestingly, Epb4.113 is frequently lost in a variety of human tumors including meningioma and is thought to act as a negative regulator of tumor progression [17]. Prelp is a member of the small leucine-rich proteoglycan family that is involved in the biology of meningioma and was found to be differentially expressed in glioblastoma multiforme and meningioma brain tumors [18].

3.4. Disp3 overexpression affects the differentiation of neural cells

Neural progenitor C17.2 cells have the capacity to differentiate into neurons or glial cells and when cultured in the standard growth medium show typical morphology of undifferentiated cells. Cells cultured under differentiation conditions change their morphology with a fraction of cells generating dense cell bodies – prospective neurons and astrocytes (Fig. 4A) growing on top of the progenitor cells.

In undifferentiated C17.2 cells the type-IV intermediate filament nestin, which is used to characterize progenitor cells [19], was detected by qPCR and immunofluorescence staining in both control and DISP3-expressing cells. Upon neural differentiation into both cell types, nestin mRNA levels significantly decreased over time. Compared to control cells, nestin expression levels were only higher in DISP3-expressing cells during the initial phases of differentiation with no difference seen after day 3 (Fig. 4B line graph, day 0 of differentiation is highlighted in the bar graph). Whilst nestin mRNA differences between control and DISP3 cells were not statistically significant, there was an obvious difference detected at the protein level. Compared to day 0, control cells showed a significant decrease in nestin staining by day 2, which was not observed in DISP3-expressing cells (Fig. 4B).

To identify neurons during neuronal differentiation, we analyzed β III-tubulin (part of the microtubular complex, [20])

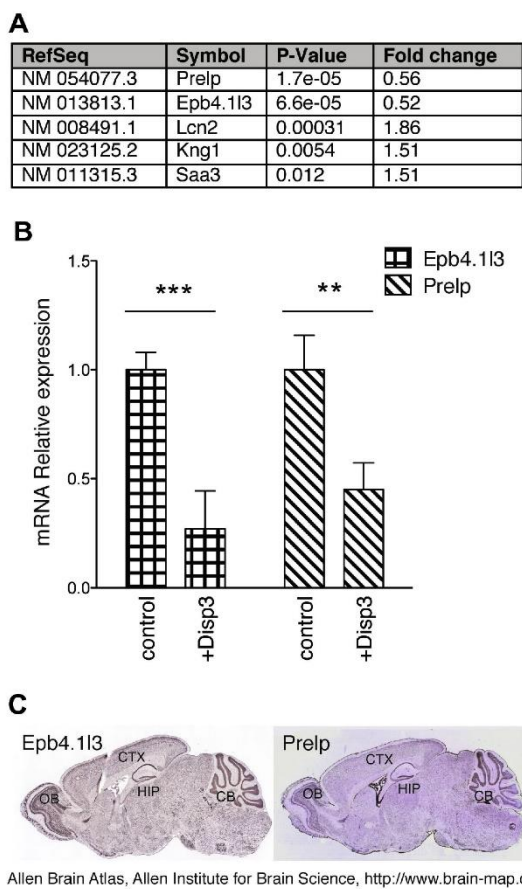


Fig. 3. DISP3 expression alters gene expression in C17.2 cells. (A) List of genes with altered gene expression in DISP3-overexpressing cells over control cells obtained by microarray expression profiling. (B) Relative expression of Epb4.113 and Prelp in control and DISP3 cells was confirmed by quantitative RT-PCR. Results are an average of at least three independent experiments with error bars representing standard deviation (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Control (empty vector). (C) Representative sagittal section of an adult mouse brain hybridized with antisense Epb4.113 and Prelp probes. Images were obtained from the Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>).

expression. As expected, the level of β III-tubulin mRNA varied in the course of the 7-day differentiation, with a sharp increase in β III-tubulin expression between days 2–5 (Fig. 4C). Interestingly, whilst both cell types followed the same β III-tubulin expression trend, DISP3-expressing cells consistently exhibited a reduced β III-tubulin level compared to the control cells (Fig. 4C line graph, differentiation day 0 is highlighted in bar graph). These data obtained at the mRNA level were also confirmed morphologically, when DISP3 cells were unable to form proper neurites and showed reduced β III-tubulin immunofluorescence staining after seven days of culture (note differences in appearance of neurons in control and DISP3 cells on differentiation day 7 in Fig. 4C).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a type-III intermediate filament that has previously been used to distinguish astrocytes [21]. During astrocyte differentiation, GFAP mRNA levels significantly increased from undetectable levels at day 0 to relatively high levels in control cells by day 7 (Fig. 4D). GFAP expression in DISP3-expressing cells followed a similar pattern to control cells;

however, the levels were already reduced by day 3 (Fig. 4D). These results were corroborated by morphological and immunofluorescence studies, which revealed significantly reduced GFAP staining in DISP3-expressing cells at differentiation day 7 (Fig. 4D).

3.5. Disp3 overexpression leads to accumulation of lipids in neural cells

It has previously been shown in fibroblasts that ectopic expression of DISP3 leads to an increase in the number and size of lipid droplets and an accumulation of neutral lipids [2]. To evaluate the lipid content in control and DISP3 C17.2 cells we stained them with Nile Red, a dye that specifically associates with neutral lipids. Fluorescent images show that relative to control cells, DISP3 cells stain more intensively (Fig. 5A). To quantify these results we analyzed cells using the high-content analysis. The results shown in Fig. 5B demonstrate that in comparison to control cells there was a significant increase in Nile Red staining intensity in DISP3 cells, suggesting these cells contain a higher neutral lipid content (Fig. 5B).

4. Discussion

In this study we examined the role of DISP3 in the proliferation and differentiation of the multipotent neural progenitor cell line, C17.2. These cells were originally established from cerebellar neural cells isolated from the EGL of neonatal mice [11] and are often used as an alternative to primary brain tissue cultures, which are a heterogeneous mixture of cell types [22]. Within the EGL of the cerebellum there is a transient zone containing granule neuron precursors (GNPs), which differentiate into granule neurons. It is widely thought that GNPs whose growth/proliferation is altered during cerebellar development are at the cellular origin of medulloblastoma tumors [23,24].

Ectopic expression of DISP3 in C17.2 cells resulted in proliferation rates that were 1.7-fold higher than those of control cells. These results were further confirmed using the human medulloblastoma cell line DAOY, suggesting that increased DISP3 expression promotes cellular proliferation.

Gene expression profiling of DISP3 C17.2 cells revealed that the expression of Epb4.113 and Prelp mRNA was significantly reduced. Epb4.113 is a member of the 4.1 superfamily of proteins that link transmembrane proteins to the actin cytoskeleton and are frequently lost in brain, lung, breast and prostate cancers [25]. In a screen for genes involved in prostate cancer metastasis, it was shown that Epb4.113 expression is reduced in highly metastatic tumors [26]. Moreover, other members of this family have been shown to enhance the metastatic potential of bone and soft tissue sarcomas [27], [28]. Prelp was found as a gene that is differentially expressed in glioblastoma multiforme and meningioma. These two primary brain tumors are histologically and pathologically distinct with different prognoses [29], [30]. Prelp is overexpressed in meningioma together with other members of the small leucine-rich proteoglycan family [18]. This family of proteins are known to function in tumor progression; however, their precise role varies according to the tumor type. Prelp was also identified in a functional genetic screen initiated to identify genes that allow cells to bypass cellular senescence [31] and later was additionally proposed to be involved in the development of accelerated aging syndrome, Hutchinson-Gilford progeria, [32].

Thus, the downregulation of Epb4.113 and Prelp, two genes directly involved in tumorigenesis, by increased DISP3 expression in neural cells correlates well with the ability of DISP3 to promote cell proliferation.

A genome-wide siRNA analysis of p16 modulators in normal finite human mammary epithelial cells revealed that Disp3 siRNA

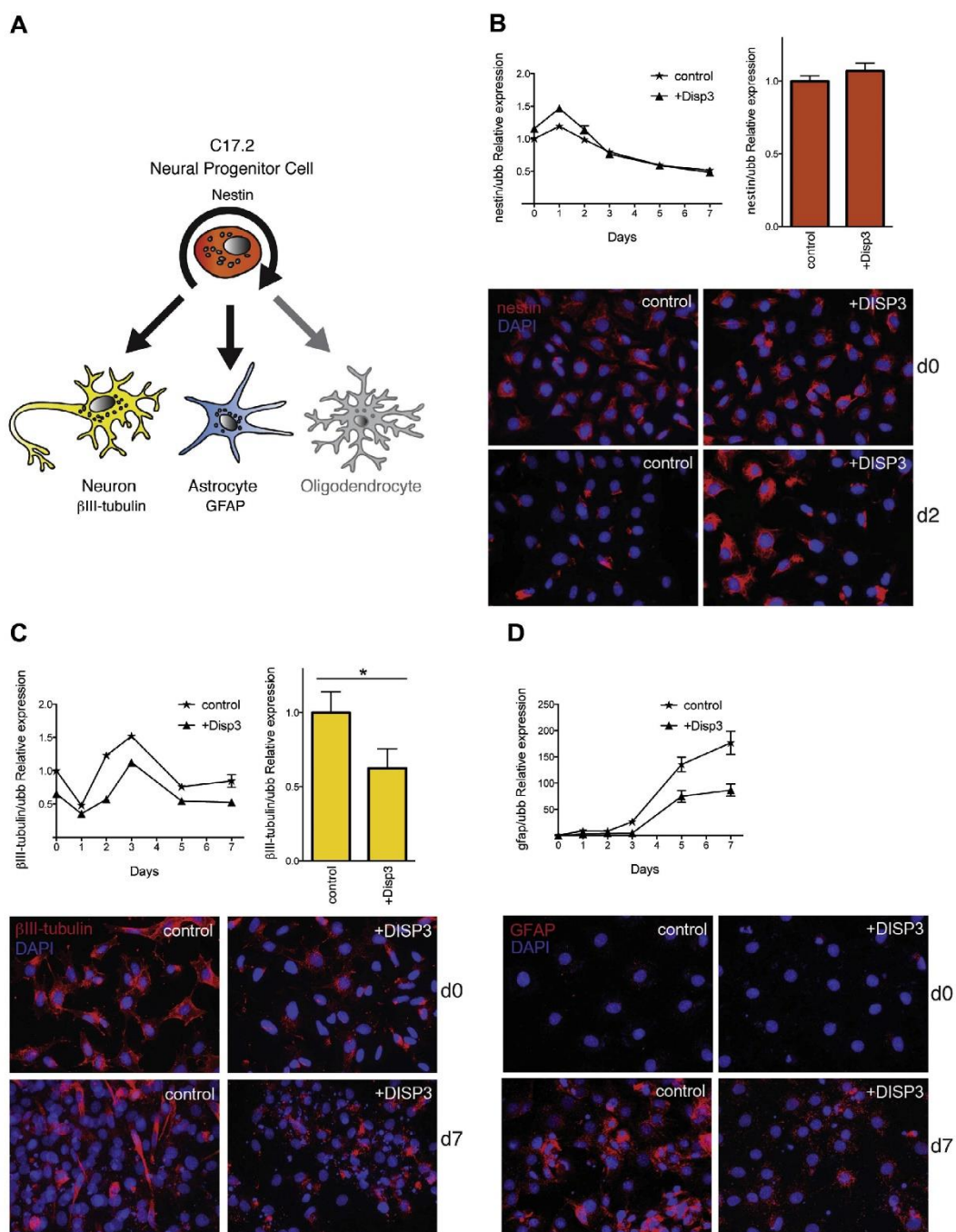


Fig. 4. Ectopic expression of DISP3 in C17.2 cells alters the expression of cell type specific markers. (A) Multipotent C17.2 neural stem cells give rise to neurons and astrocytes (oligodendrocytes were not detectable). Cell type specific markers analyzed were nestin, β III-tubulin and GFAP. (B) Quantitative RT-PCR analysis of nestin mRNA in control and DISP3 cells during differentiation days 0–7; Ubb was used as a reference gene. Nestin mRNA levels at day 0 is shown. Immunofluorescent images of cells stained with nestin (red) and DAPI (blue; to stain nuclei) during differentiation day 0 and 2. (C) Quantitative RT-PCR analysis of β III-tubulin mRNA in control and DISP3-expressing cells during differentiation days 0–7; Ubb was used as a reference gene. β III-tubulin mRNA levels at differentiation day 0 are shown. Bars represent the average of at least three independent experiments, with error bars representing standard deviation ($P < 0.05$). Immunofluorescent images of cells stained with β III-tubulin (red) at differentiation days 0 and 7. (D) Quantitative RT-PCR analysis of GFAP mRNA in control and DISP3 cells during differentiation days 0–7; Ubb was used as a reference gene. Immunofluorescent images of cells stained with GFAP (red) at differentiation days 0 and 7. Control (empty vector).

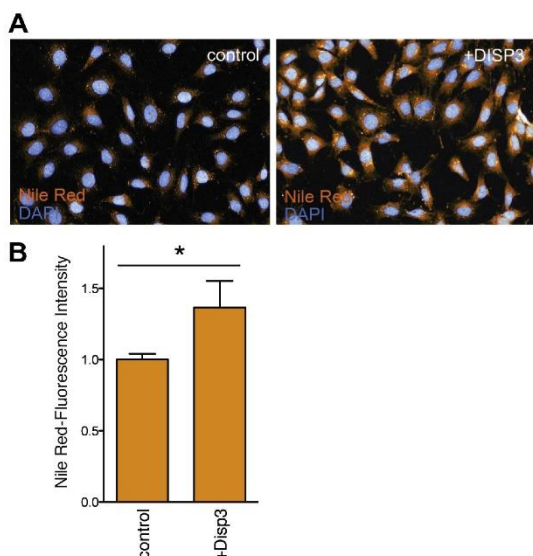


Fig. 5. Neutral lipid content is enhanced in DISP3-expressing cells. (A) Nile Red staining (orange) in control and DISP3-expressing cells at differentiation day 0. DAPI (blue) was used to stain nuclei. (B) The Operetta High-Content Imaging System was used to quantify the neutral lipid content of control and DISP3-expressing cells. Bars represent the average of at least three independent experiments with error bars representing standard deviation ($*P < 0.05$, Control (empty vector)).

expression is capable of inducing cell-cycle arrest [33]. Whilst p16 expression is low during development, it progressively increases in a wide variety of tissues during animal aging [34]. p16 acts as a tumor suppressor by reducing the proliferative capacity of cells, allowing them to enter senescence. Evidence of the p16 tumor suppressor activity is observed when it is inactivated, leading to the genesis of a wide spectrum of human cancers [35].

We have demonstrated that ectopic expression of DISP3 alters the fate of C17.2 neural progenitor cells by promoting cell growth and inhibiting neural differentiation. Undifferentiated C17.2 cells express the stem cell marker nestin and the neuronal marker β III-tubulin, but little to no expression of the glial marker GFAP has been detected. In contrast, undifferentiated DISP3-expressing cells exhibited reduced β III-tubulin expression, which remained lower than control cells even after incubation in differentiation medium. These results suggest that DISP3 overexpression reduces the ability of C17.2 cells to efficiently differentiate. Interestingly, β III-tubulin mRNA was significantly attenuated not only during the initial stages of differentiation, but remained consistently lower than in control cells throughout the 7-day time course. Whilst GFAP mRNA levels were negligible in both cell types initially, incubation in differentiation medium resulted in a large increase in expression. However, GFAP expression was significantly attenuated in DISP3-expressing C17.2 cells. Immunofluorescence and morphological analysis of these cells during differentiation confirmed the mRNA expression findings showing that DISP3-expressing cells were unable to form neurite outgrowths and exhibited a flat cell shape consistent with undifferentiated cells.

There is a growing body of evidence suggesting the existence of a link between an altered lipid metabolism and oncogenesis [36]. The increased cellular lipid content may influence tumor growth by increasing the pool of building blocks available for membrane biosynthesis, altering the number of lipid soluble signaling molecules and enabling the post-translational modification of

proteins. Recently it was shown that during cell division the lipidome changes [37]. Nile Red analysis of the lipid content of C17.2 cells revealed that ectopic expression of DISP3-expressing cells results in increased cell staining, suggesting that these cells have a higher neutral lipid content relative to control cells. DISP3 belongs to a class of sterol-sensing domain (SSD) containing proteins. It is known that SSDs bind sterols and that a mutation within this domain results in abnormal cholesterol and other lipid accumulation [38]. Although there is no evidence demonstrating that DISP3 binds lipids directly, it is known that its overexpression does increase the cellular lipid content [2]. Our findings clearly demonstrate that DISP3 expression alters cell proliferation; however, we are unable to determine whether this is due to the altered lipid content or whether the altered lipid content is a consequence of the increased cell proliferation. Nevertheless, our study demonstrates that ectopic expression of DISP3 elicits multiple effects on neural cells, promoting proliferation and preventing differentiation.

Acknowledgement

We thank S. Takacova for proofreading the manuscript. This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic project P301-12-1478 and Ministry of Education, Youth and Sports project LO1220.

References

- [1] Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K.I., Hirose, M. and Ohara, O. (2000) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 7, 65–73.
- [2] Žíková, M., Corlett, A., Bendova, Z., Pajer, P. and Bartunek, P. (2009) DISP3, a sterol-sensing domain-containing protein that links thyroid hormone action and cholesterol metabolism. *Mol. Endocrinol.* 23, 520–528.
- [3] Johansson, F.K., Brodd, J., Eklof, C., Ferletta, M., Hesselager, G., Tiger, C.F., et al. (2004) Identification of candidate cancer-causing genes in mouse brain tumors by retroviral tagging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11334–11337.
- [4] Johansson, F.K., Goransson, H. and Westermark, B. (2005) Expression analysis of genes involved in brain tumor progression driven by retroviral insertional mutagenesis in mice. *Oncogene* 24, 3896–3905.
- [5] Rhodes, D.R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B.B., et al. (2007) OncoPrint 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* 9, 166–180.
- [6] Northcott, P.A., Shih, D.J., Peacock, J., Garzia, L., Morrissy, A.S., Zichner, T., et al. (2012) Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488, 49–56.
- [7] Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N.E., Lakeman, A., van Sluis, P., et al. (2008) Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* 3, e3088.
- [8] Fattet, S., Haberler, C., Legoix, P., Varlet, P., Lellouch-Tubiana, A., Lair, S., et al. (2009) Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J. Pathol.* 218, 86–94.
- [9] Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97–109.
- [10] Schroeder, K. and Gururangan, S. (2014) Molecular variants and mutations in medulloblastoma. *Pharmacogenomics Pers. Med.* 7, 43–51.
- [11] Snyder, E.Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartwig, E.A. and Cepko, C.L. (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68, 33–51.
- [12] Lundqvist, J., El Andaloussi-Lilja, J., Svensson, C., Gustafsson Dorff, H. and Forsby, A. (2013) Optimisation of culture conditions for differentiation of C17.2 neural stem cells to be used for in vitro toxicity tests. *Toxicol. In Vitro* 27, 1565–1569.
- [13] Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3 (Article 3).
- [14] Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- [15] Valach, J., Fik, Z., Strnad, H., Chovanec, M., Plzak, J., Cada, Z., et al. (2012) Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int. J. Cancer* 131, 2499–2508.

- [16] Storey, J.D. and Tibshirani, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9440–9445.
- [17] Gutmann, D.H., Donahoe, J., Perry, A., Lemke, N., Gorse, K., Kittiniyom, K., et al. (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1495–1500.
- [18] Castells, X., Garcia-Gomez, J.M., Navarro, A., Acebes, J.J., Godino, O., Boluda, S., et al. (2009) Automated brain tumor biopsy prediction using single-labeling cDNA microarrays-based gene expression profiling. *Diagn. Mol. Pathol.* 18, 206–218.
- [19] Frederiksen, K. and McKay, R.D. (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J. Neurosci.* 8, 1144–1151.
- [20] Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W. and Frankfurter, A. (1990) The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 17, 118–132.
- [21] Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A. and Gerstl, B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28, 351–354.
- [22] Forsby, A., Bal-Price, A.K., Camins, A., Coecke, S., Fabre, N., Gustafsson, H., et al. (2009) Neuronal in vitro models for the estimation of acute systemic toxicity. *Toxicol. In Vitro* 23, 1564–1569.
- [23] Yang, Z.J., Ellis, T., Markant, S.L., Read, T.A., Kessler, J.D., Bourboulas, M., et al. (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14, 135–145.
- [24] Schuller, U., Heine, V.M., Mao, J., Kho, A.T., Dillon, A.K., Han, Y.G., et al. (2008) Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14, 123–134.
- [25] Tran, Y., Benbatoul, K., Gorse, K., Rempel, S., Futreal, A., Green, M., et al. (1998) Novel regions of allelic deletion on chromosome 18p in tumors of the lung, brain and breast. *Oncogene* 17, 3499–3505.
- [26] Wong, S.Y., Haack, H., Kissil, J.L., Barry, M., Bronson, R.T., Shen, S.S., et al. (2007) Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12784–12789.
- [27] Khanna, C., Wan, X., Bose, S., Cassaday, R., Olomu, O., Mendoza, A., et al. (2004) The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat. Med.* 10, 182–186.
- [28] Yu, Y., Khan, J., Khanna, C., Helman, L., Meltzer, P.S. and Merlino, G. (2004) Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat. Med.* 10, 175–181.
- [29] Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F. and Delattre, J.Y. (2003) Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361, 323–331.
- [30] Lamszus, K. (2004) Meningioma pathology, genetics, and biology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 275–286.
- [31] Tarunina, M., Alger, L., Chu, G., Munger, K., Gudkov, A. and Jat, P.S. (2004) Functional genetic screen for genes involved in senescence: role of Tid1, a homologue of the *Drosophila* tumor suppressor I(2)tid, in senescence and cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10792–10801.
- [32] Lewis, M. (2003) PRELP, collagen, and a theory of Hutchinson-Gilford progeria. *Ageing Res. Rev.* 2, 95–105.
- [33] Bishop, C.L., Bergin, A.M., Fessard, D., Borgdorff, V., Hatzimasoura, E., Garbe, J.C., et al. (2010) Primary cilium-dependent and -independent Hedgehog signaling inhibits p16(INK4A). *Mol. Cell* 40, 533–547.
- [34] Tsygankov, D., Liu, Y., Sanoff, H.K., Sharpless, N.E. and Elston, T.C. (2009) A quantitative model for age-dependent expression of the p16INK4a tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16562–16567.
- [35] Kim, W.Y. and Sharpless, N.E. (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265–275.
- [36] Srivastava, N.K., Pradhan, S., Mittal, B. and Gowda, G.A. (2010) High resolution NMR based analysis of serum lipids in Duchenne muscular dystrophy patients and its possible diagnostic significance. *NMR Biomed.* 23, 13–22.
- [37] Atilla-Gökçumen, G.E., Muro, E., Relat-Goberna, J., Sasse, S., Bedigian, A., Coughlin, M.L., et al. (2014) Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell* 156, 428–439.
- [38] Ohgami, N., Ko, D.C., Thomas, M., Scott, M.P., Chang, C.C. and Chang, T.Y. (2004) Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12473–12478.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Modulated DISP3/PTCHD2 expression influences neural stem cell fate decisions

Jana Koniřová, Jana Oltová, Alicia Corlett, Justyna Kopycińska, Michal Kolář, Petr Bartůněk & Martina Ziková

Received: 03 June 2016
Accepted: 21 December 2016
Published: 30 January 2017

Neural stem cells (NSCs) are defined by their dual ability to self-renew through mitotic cell division or differentiate into the varied neural cell types of the CNS. DISP3/PTCHD2 is a sterol-sensing domain-containing protein, highly expressed in neural tissues, whose expression is regulated by thyroid hormone. In the present study, we used a mouse NSC line to investigate what effect DISP3 may have on the self-renewal and/or differentiation potential of the cells. We demonstrated that NSC differentiation triggered significant reduction in DISP3 expression in the resulting astrocytes, neurons and oligodendrocytes. Moreover, when DISP3 expression was disrupted, the NSC "stemness" was suppressed, leading to a larger population of cells undergoing spontaneous neuronal differentiation. Conversely, overexpression of DISP3 resulted in increased NSC proliferation. When NSCs were cultured under differentiation conditions, we observed that the lack of DISP3 augmented the number of NSCs differentiating into each of the neural cell lineages and that neuronal morphology was altered. In contrast, DISP3 overexpression resulted in impaired cell differentiation. Taken together, our findings imply that DISP3 may help dictate the NSC cell fate to either undergo self-renewal or switch to the terminal differentiation cell program.

Neural stem cells (NSCs) are defined by their ability to self-renew through mitotic cell division and to differentiate into the various neural cell types: neurons, astrocytes and oligodendrocytes^{1,2}. In the developing brain, NSCs first undergo symmetric self-renewal to expand the stem cell pool, which is followed by asymmetric neurogenic and gliogenic cell division to generate neurons and glia, respectively³. In the adult brain, NSCs reside in niches with specific molecular and cellular characteristics and whose specification is regulated by a large number of factors in each niche. Transduction of extracellular niche signals triggers a signaling cascade that activates intracellular regulatory mechanisms, including transcription factors, epigenetics and metabolism that control cell proliferation and differentiation (reviewed in ref. 4).

NSCs isolated from fetal^{5–7} and adult^{8–11} mammalian central nervous systems have previously been propagated *in vitro* in the presence of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF-2) to generate multicellular aggregates called neurospheres^{6,11,12}. An alternative method of producing NSCs *in vitro* is via embryonic stem (ES) cells^{13–15}. To date, neural differentiation of ES cells has been achieved using several published protocols that include treating ES cell aggregates with retinoic acid¹⁶ or co-culturing ES cells on monolayers of bone marrow-derived stromal PA-6 cells¹⁷. Interestingly, recent studies have revealed that neither multicellular aggregation nor co-culture is necessary for ES cell neural commitment. Instead, eliminating signals that trigger alternative cell fates and the presence of EGF and FGF-2 are sufficient for ES cells to develop into neural precursors¹⁵.

The NS-5 cell line represents NSCs derived from mouse ES cells. Differentiation of ES cells into neural precursors was induced in monolayer; lineage selection for cells expressing pan-neural gene *Sox1* was used to eliminate NSCs from undifferentiated ES cells and from non-neural differentiated cells. Subsequent cultivation of cells in the presence of EGF and FGF-2 resulted in a homogenous population of adherent bipolar cells that can be continuously symmetrically expanded in adherent monoculture without any spontaneous differentiation. Moreover, NS-5 cells represent tripotent NSCs, so even after prolonged expansion, they are still capable of generating neurons, astrocytes and oligodendrocytes under particular conditions *in vitro*^{18,19}.

The Dispatched 3 gene (*Disp3*), also known as *Ptchd2* or *KIAA1337*, encodes a 13-transmembrane domain-containing protein, highly expressed in neural tissue and regulated both *in vivo* and *in vitro* by thyroid

Institute of Molecular Genetics AS CR v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.B. (email: bartunek@img.cas.cz) or M.Z. (email: mzikova@img.cas.cz)

hormone²⁰. Previously, ectopic expression of DISP3 in multipotent cerebellar progenitor cells was shown to promote cell proliferation and modulate expression of the genes involved in tumorigenesis. Further investigation revealed that *DISP3* mRNA levels are significantly elevated in the human brain cancer medulloblastoma²¹.

Sequence alignments with structurally related proteins (HMGCR, SCAR, NPC1, NPC1L1, 7DHCR, PTCH1, PTCH2, DISP1 and DISP2) have shown that DISP3 contains a putative sterol-sensing domain (SSD). Functional analysis of these SSD-containing proteins revealed a link between the SSD and cholesterol homeostasis or cholesterol-linked signaling²².

Lipid metabolism is fundamental for the brain development, but deciphering its role under normal and pathological conditions is difficult due to the brain lipid content complexity. Under normal conditions, neurogenesis requires brain fatty acid synthesis²³ and moreover, the proliferation capacity of NSCs depends on fatty acid oxidation²⁴. In the pathological conditions, the accumulation of lipids is often a hallmark of affected neurogenesis. It was found that triple-transgenic Alzheimer's disease mice accumulate neutral lipids within the subventricular zone niche, which is sufficient to inhibit NSC proliferation²⁵.

In the current study we have investigated whether the levels of DISP3 expression could affect the self-renewal and/or differentiation potential of NSCs. Given that DISP3 expression is elevated in medulloblastoma and that distinct molecular subtypes of medulloblastoma can be characterized by specific neural stem cell molecular signatures²⁶, we wished to elucidate what role DISP3 may play in the neural stem cell development.

Materials and Methods

Cell culture and differentiation. NS-5 cells were a generous gift from Dietman Spengler (Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany) with the permission of Austin Smith (Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom). Cells were cultured in a growth medium prepared by combining DMEM/F12 medium (Sigma) containing N2 supplement (Gibco) and Neurobasal medium (Gibco) containing B27 supplement (Gibco) and 2 mM L-glutamine (Gibco). The final medium was supplemented with BSA (25 µg/ml, Gibco), insulin (12.5 µg/ml, Sigma), apo-transferrin (50 µg/ml, Sigma), FGF-2 (10 ng/ml, R&D Systems) and EGF (10 ng/ml, R&D Systems). Cells were passaged every other day using 0.025% trypsin/EDTA and reseeded onto gelatine-coated dishes at a density of $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$. For NSC differentiation experiments, cells were seeded onto poly-ornithine/laminin-coated dishes at a density of $0.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ and grown in standard growth medium. After 24 h in culture, the growth medium was changed to allow differentiation. To induce astrocyte differentiation, cells were incubated for four days in the standard growth medium supplemented with 1% FCS without EGF and FGF-2. For neuronal and oligodendrocyte differentiation, cells were cultured in DMEM/F12 medium (Sigma) supplemented with N2 (Gibco), FGF-2 (10 ng/ml, R&D Systems), PDGF-AA (10 ng/ml, R&D Systems) and forskolin (10 µM, Sigma). After four days, the medium was changed to DMEM/F12 medium (Sigma) supplemented with N2 (Gibco), FGF-2 (7.5 ng/ml, R&D Systems), ascorbic acid (200 µM, Sigma) and T3 (30 ng/ml, Sigma). Starting from day 5, the amount of FGF-2 in the medium was gradually reduced by removing half of the medium and replacing it with fresh medium lacking FGF-2.

RNA preparation and real-time qRT-PCR. Total RNA was extracted from the cultured cells using a PureLink RNA Mini Kit (Ambion) according to the manufacturer's protocol. For real-time RT-PCR, 200 ng of total RNA was reverse transcribed using random hexamer primers (Invitrogen) and M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). cDNAs were amplified by the LightCycler[®] 480 system (Roche) using the SYBR Green I Master mix (Roche). All reactions were run in triplicates; all mRNAs levels were normalized to *Ubb* mRNA.

Primers. The following primers were used: *Ubb* 5'-ATGTGAAGGCCAAGATCCAG-3' and 5'-TAATAGCCACCCCTCAGACG-3', *Disp3* 5'-CAGCAGCTTGGACCTCTCA-3' and 5'-GCAACATCTGCAGGAAGGA-3', *T7EI-Disp3 sgRNA#1* 5'-GCGAATCGAGCTCATCTTTCTGG-3' and 5'-GGAGGATGGAATAAACCCCTT-3', *T7EI-Disp3 sgRNA#2* 5'-TGTGTGATGTGTGTCGTCGTA-3' and 5'-TCACATGCGACTACACTGCT-3', β III-tubulin 5'-TGGACAGTGTTCGGTCTGG-3' and 5'-CCCTCCGTATAGTGCCCTTTG-3', *GFAP* 5'-TGAGGCAGAAGCTCCAAGA-3' and 5'-CCAGGGTGGCTTCATCTGC-3', *Plp* 5'-GTTCCAGAGGCCAACATCAAGC-3' and 5'-AGCCATACAACAGTCAGGGCATAG-3', *nestin* 5'-AGGCTGAGAAGCTCTCGCTTGC-3' and 5'-GGTGTGGTCTCTGGTATCC-3', *Igfbp7* 5'-TGGTGACCGGGAAAATCTGG-3' and 5'-TGCGTGGCACTCATACTCTC-3', *Lipt1* 5'-TCCACGTGGGTTGATTGAGT-3' and 5'-GCTGCTGGGACCTTGTGCTG-3', *Dgka* 5'-GCTCTGTGTCTAGACGAG-3' and 5'-TGGTGAATCTCTTGGGTCTCC-3', *Brsk1* 5'-CCCAGAAAAGGCTCAGTC-3' and 5'-GGCTACGCATGGCTACTCTG-3', *Edg8* 5'-GGACCCTGTTTCTCTTGC-3' and 5'-GATGGGATTCAGCAGCGAGT-3'.

Immunofluorescence and imaging. To detect proteins via immunofluorescence, cells were grown on glass coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked in a mixture of 10% NGS (Jackson ImmunoResearch) and 5% BSA (Sigma) before incubation with a primary antibody. Antibodies used included polyclonal anti-DISP3 antibody²¹ (1:500), mouse anti- β III-tubulin (1:1000, R&D Systems), mouse anti-GFAP (1:400, Sigma), mouse anti-oligodendrocyte marker O4 (1:500, R&D Systems). DISP3 staining was visualized by the biotin-streptavidin method using streptavidin conjugated to Alexa Fluor 555 (Invitrogen), β III-tubulin and GFAP staining by goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 secondary antibody (Invitrogen) and O4 staining by goat anti-mouse IgM Alexa Fluor 555 secondary antibody (Invitrogen). To visualize nuclei, cells were stained with DAPI (Sigma). Images for automated image analysis were taken with an Operetta HTS imaging system (PerkinElmer) at 20x magnification using Harmony software. A minimum of 50 fields per slide were analyzed using the Columbus image analysis software (PerkinElmer). The number of β III-tubulin-stained neurites was

evaluated using the neurite finding tool (CSIRO Neurite Analysis method)²⁷ in the Columbus software and plotted as the number of neurites in the field divided by the total number of cells in the same field. In differentiated neuronal culture, highly β III-tubulin-positive cells with extending neurites and dense cytoplasm were considered as neurons. Neurons and primary neurites were tagged and counted manually using the ImageJ software (Cell Counter plugin). Multiple fields (20x magnification, approximately about 300 cells) per each of the cell culture types in each of the seven independent experiments were counted. Representative pictures were acquired using a Leica DMI4000B microscope.

Virus production, transduction and transfection of NS-5 cells. The CRISPR/Cas9 method was utilized to knock-out the *Disp3* gene in NS-5 cells. The E-CRISP tool (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>) was used to find suitable targets for mutagenesis within the *Disp3* gene. Two sites were chosen and oligonucleotides were ordered. These were then annealed and cloned into the lentiCRISPRv1 vector (Addgene # 49535) as previously described by Shalem *et al.*²⁸

Lentiviruses were prepared by co-transfecting HEK293FT cells (Thermo Fisher Scientific, R70007) with the pLentiCRISPRv1 expression vector, psPAX2 and pVSV-G plasmids using the Lipofectamine reagent (Invitrogen). Twenty-four hours post transfection viral supernatant was harvested and the virions precipitated using PEG/it (SBI). Precipitated virions were resuspended in PBS and then incubated for 24 h with NS-5 cells. Cell medium was then changed and puromycin was added 24 h later.

To generate DISP3-overexpressing NS-5 cells, the full-length human *DISP3* (GenBank AB037758.1) was cloned into the retroviral vector pBABE-Hygro. Retroviruses were prepared by transfecting the expression vector into Phoenix-ECO cells (ATCC CRL-3214) using the Lipofectamine reagent. Viral supernatant was harvested at 36 h post transfection. NS-5 cells were incubated with virus supernatant and polybrene (4 μ g/ml) for 8 h before changing the medium. Hygromycin was added 48 h later.

To generate short hairpin RNAs (shRNAs) against the *Disp3* gene (exon 2, target sequences: 5'-AUCGAGCUCAUCUUUCUGG-3', 5'-GUUCUCUACUACUUACUU-3'), we utilized the pSilencer Expression Vector Insert Design Tool (Ambion). The oligonucleotides for shRNA expression were manufactured by Ambion, annealed and ligated into the pSilencer 2.1-U6 puro vector (Ambion). A negative control plasmid, pSilencer 2.1-U6 puro-NC, was supplied by Ambion. NS-5 cells were transfected using the Lipofectamine reagent (Invitrogen) and puromycin was added 24 h later.

T7 endonuclease assays. Genomic DNA was isolated using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). The genomic regions surrounding the target sites #1 (Exon 2) and target sites #2 (Exon 7) were PCR amplified using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) and primers T7EI-Disp3 sgRNA#1 and T7EI-Disp3 sgRNA#2. A total of 200 ng of the purified PCR product was denatured and slowly reannealed to facilitate heteroduplex formation: 95 °C for 10 min, 95–85 °C temperature ramping –2 °C/s, 85–25 °C temperature ramping –0.1 °C/s and 25 °C for 5 min. The reannealed amplicon was digested with T7 endonuclease I (New England BioLabs) at 37 °C for 20 min and analyzed in 2% agarose gel.

Immunoblotting. Protein samples were separated by SDS-PAGE using 4–15% precast gradient polyacrylamide gels (Biorad). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes which were subsequently blocked in a solution containing 5% non-fat milk dissolved in TBS and 0.05% Tween-20 (TBST). Filters were incubated in primary antibody (anti-DISP3 antibody, 1:500; anti-actin, 1:500, Sigma) diluted in 1% milk/TBST overnight and then washed and incubated with secondary antibody (ECL kit, GE Life Sciences).

Proliferation assays. Cell proliferation was measured using thymidine incorporation assays. Cells were plated at a density of 4×10^3 cells/well in 96-well plates. After 12 hours, cells were pulsed with [methyl-³H] thymidine (UJV Rez) and cultured for an additional 8 hours. Cells were harvested onto a Filtermat using a FilterMate Harvester. Incorporated radioactivity was quantified using a MicroBeta2 Microplate scintillation counter (PerkinElmer). A cumulative growth curve was established by reseeding cells at a density of 1.5×10^4 /cm² every other day and counting cell numbers using a CASY Cell Counter and Analyzer System (Roche).

Cell cycle analysis. For cell cycle analysis, cells were trypsinized (0.025% trypsin/EDTA), collected and fixed in a solution of 70% ethanol. After incubation at –20 °C overnight the cells were placed in a staining solution containing 0.1% Triton X-100 in PBS, propidium iodide (20 μ g/ml, Sigma) and RNase A (200 μ g/ml) for 15 min. Samples were analyzed using a BD LSRII flow cytometer and Watson pragmatic univariate analysis²⁹ tool in software FlowJo (FlowJo LLC).

Microarray analysis. RNA quality and concentration was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and RNA integrity was analyzed by Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent). Illumina MouseRef-WG-6 v2 Expression BeadChips (Illumina) were used for microarray analysis according to the manufacturer's protocol. In brief, 250 ng of RNA was amplified using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion). The labeled RNA (1500 ng) was then hybridized onto the chip according to the manufacturer's instructions. The analysis was performed in three to four biological replicates per group. The raw data was preprocessed using GenomeStudio software (version 1.9.0.24624; Illumina) and analyzed within the limma package³⁰ of Bioconductor³¹ as described elsewhere³². In short, we used the normal-exponential model to remove the background noise, quantile normalization to standardize the data and log₂ transform to stabilize variance of the data. A moderated t-test of limma was used to detect transcripts differentially expressed between the *Disp3* sgRNA-treated samples and controls. As the analysis was considered exploratory, we used weak criteria to select candidate genes that were differentially transcribed (Storey's $q < 0.9^{33}$), which corresponds to $p < 0.001$,

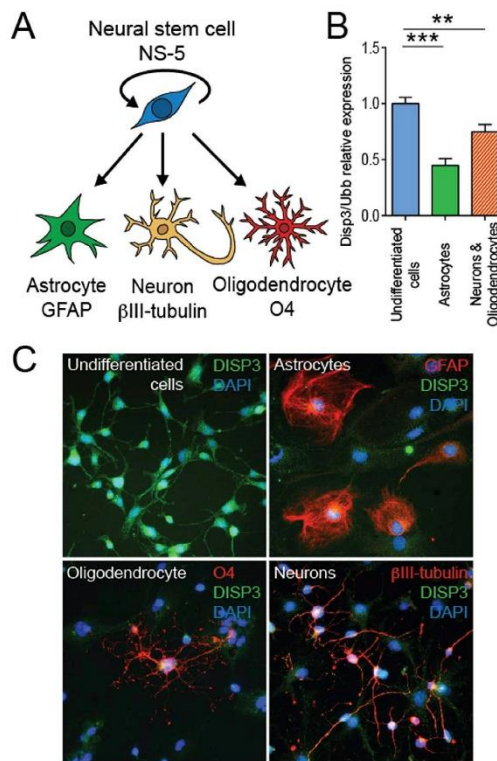


Figure 1. DISP3 expression alters during neural differentiation in NS-5 cells. (A) Multipotent neural stem cells NS-5 give rise to astrocytes, neurons and oligodendrocytes. Cell type-specific markers GFAP (astrocytes), β III-tubulin (neurons) and O4 (oligodendrocytes) were analyzed. (B) Quantitative RT-PCR analysis of *Disp3* mRNA in undifferentiated and differentiated cells. *Ubb* was used as a reference gene. Bars represent the mean of three independent samples with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Mean values: undifferentiated cells = 1.00, astrocytes = 0.45, neurons and oligodendrocytes = 0.75. (C) Immunofluorescence images of undifferentiated and differentiated cells stained with a polyclonal DISP3 antibody (green) and cell type-specific markers (red). DAPI (blue) was used to stain the nuclei.

and $|\log_2FC| > 0.4$. The MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) compliant transcription data was deposited in the ArrayExpress database (E-MTAB-4485).

Statistical analysis. The results obtained in the qRT-PCR analysis, proliferation measurement and automated microscopy image analysis were processed using GraphPad Prism software version 6. In the plots generated, each data point represents a biological replicate and the mean value is shown. Error bars specify standard deviation of the data. To determine the statistical significance of the results, an unpaired t-test with Welch's correction was used. Statistical significance is denoted by asterisks, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$.

Results

DISP3 expression is reduced in differentiated neural stem cells. NS-5 mouse neural stem cells are capable of differentiating *in vitro* into the three neural cell types: astrocytes, neurons and oligodendrocytes. To identify each of these differentiated cell types, cell-specific markers can be used. These include GFAP (glial fibrillary acidic protein) for astrocytes, β III-tubulin (part of the microtubular complex) for neurons, and O4 (oligodendrocyte surface antigen) and PLP (oligodendrocyte-specific transmembrane proteolipid) for oligodendrocytes (Fig. 1A).

To promote NS-5 cell differentiation we employed two strategies using two different types of differentiation media. Cells cultured in the first medium changed their morphology, finally generating astrocytes; the second medium promoted differentiation into a mixed culture of neurons and oligodendrocytes. To assess whether cell differentiation has an effect on *Disp3* expression, qRT-PCR was used to quantify and compare the levels of *Disp3* in each of the cell populations. This analysis revealed that *Disp3* levels are highest in undifferentiated cells and

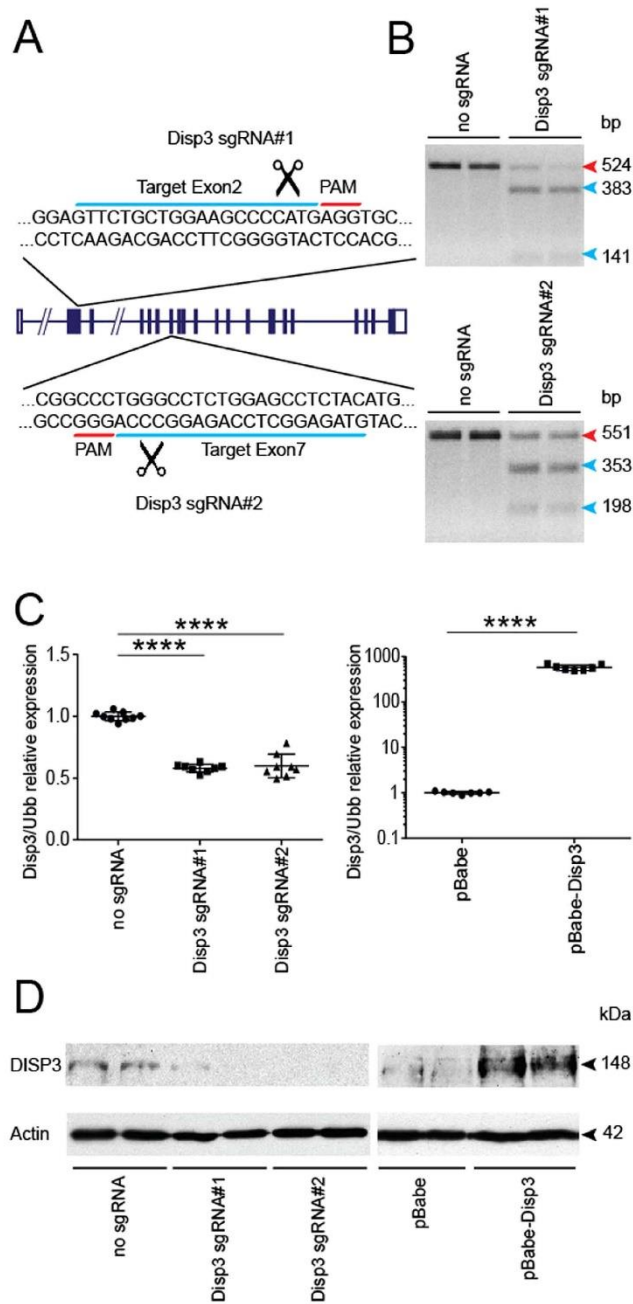


Figure 2. Modulation of DISP3 levels in NS-5 cells. (A) A scheme of the *Disp3* gene showing two sgRNA target sites for *Disp3* targeting via RNA-guided CRISPR/Cas9 endonuclease. The 20 nt target sequence (blue) is represented along with the neighboring PAM motif (red). (B) T7 endonuclease I assays confirm indels induced by Disp3 sgRNA#1 and Disp3 sgRNA#2 in two independent cell batches. The red arrow indicates the wild-type DNA fragment, blue arrows indicate mutant DNA fragments. (C) Quantitative RT-PCR analysis of *Disp3* mRNA. Cells infected with a lentivirus encoding Cas9 and Disp3 sgRNA#1 or Disp3 sgRNA#2 and control without sgRNA (left scatter plot); cells infected with a retrovirus encoding human *DISP3* (pBabe-Disp3) and control empty vector (pBabe) (right scatter plot). *Ubb* was used as a reference gene. Data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (**** $P < 0.0001$). Mean values: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 0.58, Disp3 sgRNA#2 = 0.60, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 576. (D) Level of DISP3 protein confirmed by western blot. Actin served as a loading control.

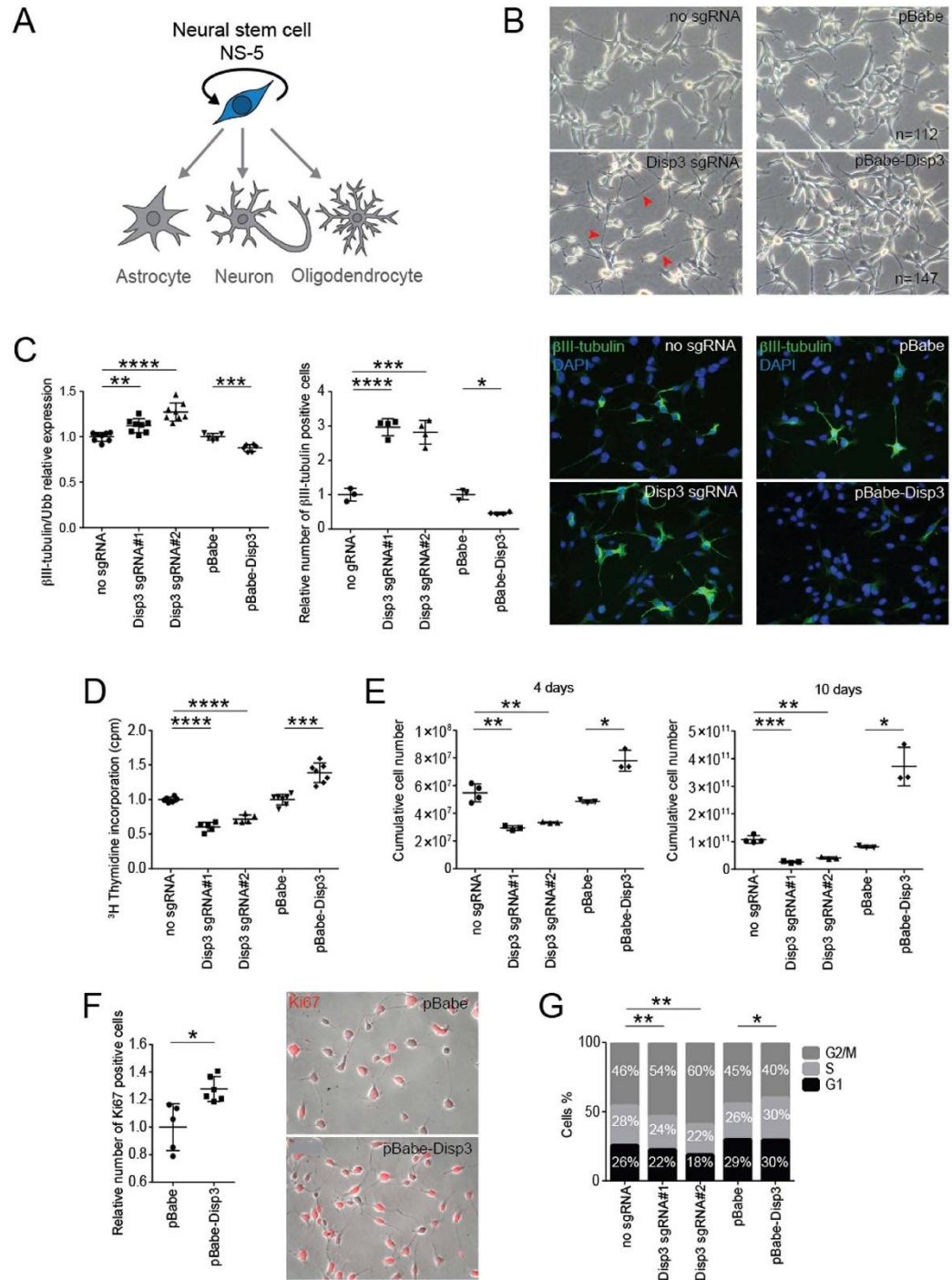


Figure 3. Modulation of DISP3 expression results in changes to undifferentiated NS-5 cells. (A) Under particular conditions, NS-5 cells are capable of self-renewal. (B) Modulation DISP3 expression leads to morphological changes in undifferentiated NS-5 cells. Representative phase-contrast images of Disp3 sgRNA, pBabe-Disp3 and relevant control cells are shown. Note the prolonged processes observed in Disp3 sgRNA cells (red arrows). (C) β III-tubulin expression in Disp3 sgRNA, pBabe-Disp3 and control cells was quantified by qRT-PCR analysis (left scatter plot, *Ubb* was used as a reference gene) and by the Operetta High-Content

Imaging System followed by Columbus software analysis (right scatter plot). According to the intensity of staining, cells were divided into three groups: cells with basal, medium and high intensity of β III-tubulin staining. This analysis shows the fraction of β III-tubulin-positive cells with the staining intensity exceeding the basal level and normalized to the number of total cells (nuclei). Representative immunofluorescent images of cells stained with β III-tubulin (green) and DAPI (blue) are also shown. All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Mean values - left scatter plot: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 1.12, Disp3 sgRNA#2 = 1.27, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.88; - right scatter plot: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 2.97, Disp3 sgRNA#2 = 2.82, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.46. (D) Proliferation of Disp3 sgRNA, pBabe-Disp3 and control cells was measured by ^3H -thymidine incorporation assays. All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Mean values: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 0.60, Disp3 sgRNA#2 = 0.72, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 1.39. (E) Disp3 sgRNA, pBabe-Disp3 and control cells were counted every other day. The growth rate was plotted as cumulative cell numbers. All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Mean values - left scatter plot (4 days): no sgRNA = 5.48×10^7 , Disp3 sgRNA#1 = 2.94×10^7 , Disp3 sgRNA#2 = 3.33×10^7 , pBabe = 4.86×10^7 , pBabe-Disp3 = 7.81×10^7 ; - right scatter plot (10 days): no sgRNA = 1.07×10^{11} , Disp3 sgRNA#1 = 0.27×10^{11} , Disp3 sgRNA#2 = 0.41×10^{11} , pBabe = 0.81×10^{11} , pBabe-Disp3 = 3.72×10^{11} . (F) Operetta High-Content Imaging System quantification of Ki-67 staining (left) and representative immunofluorescence images of pBabe-Disp3 and control cells stained with Ki-67 (red, right). All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (* $P < 0.05$). Mean values: pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 1.28. (G) The effect of modified DISP3 expression on cell cycle progression was determined by flow cytometry analysis. The percentage of cells in the G1, S and G2/M phases of the cell cycle was counted and plotted. All data represent the mean of biological replicates, the level of statistical significance shows changes in the percentage of cells in the G2/M phase (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

significantly decrease upon differentiation (Fig. 1B). The differentiation status of cells was verified by qRT-PCR using previously mentioned cell-type specific markers (Fig. S1). These results were further confirmed by immunofluorescence studies, which demonstrated reduced DISP3 protein expression when NS-5 cells differentiate (Fig. 1C). The status of cells in the various conditions was confirmed by immunofluorescence staining with specific markers. Staining of undifferentiated cells revealed either very low (β III-tubulin) or undetectable (GFAP, O4) levels of neural cell-specific markers (not shown). To conclude, differentiation of NS-5 cells into astrocytes, neurons or oligodendrocytes results in reduced levels of both DISP3 mRNA and protein.

Modulation of DISP3 expression in NS-5 cells. To elucidate the effect of DISP3 expression on neural stem cell fate, the levels of *Disp3* expression were diminished using the CRISPR/Cas9 technology. Two custom designed single guide RNAs targeting exon 2 (Disp3 sgRNA#1) and exon 7 (Disp3 sgRNA#2) were used to impair expression of the *Disp3* gene (Fig. 2A). NS-5 cells were infected with a lentivirus containing Cas9 nuclease and either Disp3 sgRNA#1 or Disp3 sgRNA#2. After antibiotic selection, the presence of mutated alleles was confirmed using a batch T7 endonuclease I assay (Fig. 2B).

Additionally, NS-5 cells overexpressing DISP3 were generated by retroviral transduction with a DISP3-overexpression vector (pBabe-Disp3). The levels of *Disp3* mRNA in both novel NS-5 cell cultures (Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3) were determined by qRT-PCR (Fig. 2C) and later confirmed by Western blotting (Fig. 2D). Thus, using the CRISPR-Cas9 and retroviral transduction systems, we were able to efficiently modulate DISP3 expression in NS-5 cells.

Modulated DISP3 expression in NS-5 cells modifies the phenotype of undifferentiated NSCs. Previously, we have demonstrated that the process of NSC differentiation resulted in altered DISP3 expression. We next evaluated the possible effect of modulated DISP3 expression on undifferentiated cells maintained under self-renewal conditions (Fig. 3A).

Compared to control cells, both Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3 cell lines exhibited morphological changes upon cultivation in standard growth medium. The most evident change observed in Disp3 sgRNAs cells was formation of elongated cell processes, which indicated the onset of neuronal differentiation (Fig. 3B, left panels). Interestingly, cells overexpressing DISP3 (pBabe-Disp3) seemed to proliferate faster than the control cells. This phenomenon is illustrated in Fig. 3B, right panels, when after seeding a constant number of cells per dish and subsequent cultivation under the same conditions, there were more cells present in the pBabe-Disp3 culture compared to the pBabe control culture.

Moreover, the results of qRT-PCR and protein analysis demonstrated that in both Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3 cells, β III-tubulin expression levels were altered (Fig. 3C). The same effect was observed using shRNA-induced knock-down in NS-5 cells (Fig. S2). Quantification of mRNA changes (Fig. 3C, left scatter plot) clearly illustrates that a decrease in DISP3 expression results in an increase in β III-tubulin expression, whilst an increase in DISP3 levels causes the reverse effect. These results were confirmed by microscopy followed by automated image analysis of cells stained with a β III-tubulin antibody. The analysis shows that compared to control cells, the number of β III-tubulin-positive cells is higher in Disp3 sgRNA NS-5 cells and reduced in pBabe-Disp3 cells (Fig. 3C, right scatter plot). Representative images of this staining are shown in Fig. 3C, right panels. Moreover, in Disp3 sgRNA NS-5 cells, the fraction of highly and medium β III-tubulin-stained cells is increased,

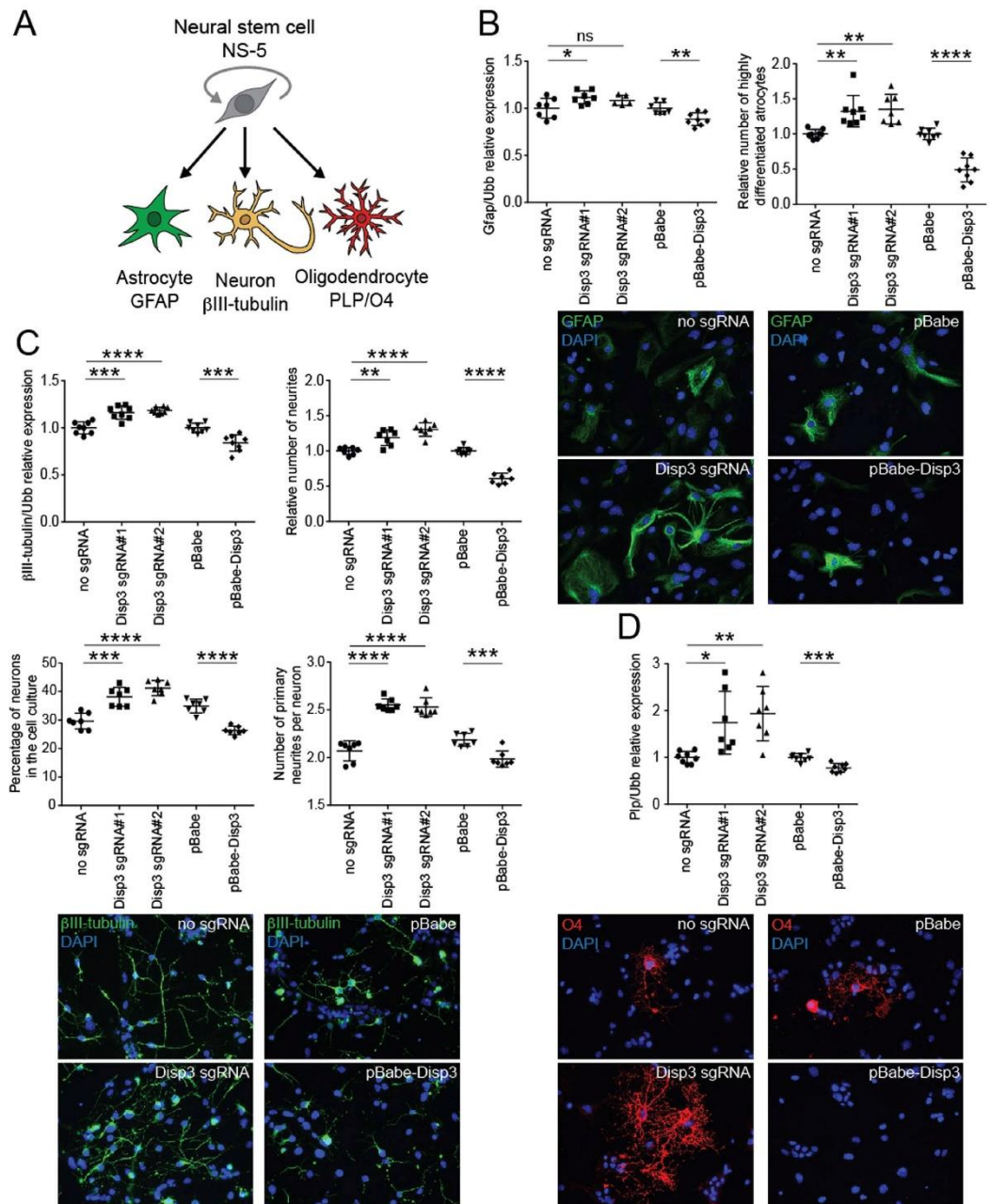


Figure 4. Changes in DISP3 expression levels affect NS-5 differentiation patterns. (A) Multipotent neural stem cells NS-5 give rise to astrocytes, neurons and oligodendrocytes. Cell type-specific markers GFAP (astrocytes), β III-tubulin (neurons) and O4 (oligodendrocytes) were analyzed. (B) qRT-PCR analysis of *Gfap* mRNA expression (left scatter plot, *Ubb* was used as a reference gene) and GFAP staining of cells after astrocyte differentiation analyzed by the Operetta High-Content Imaging System followed by Columbus software analysis (right scatter plot). This analysis shows the fraction of highly differentiated astrocytes, which were recognized and quantified based on their shape, size, and intensity of staining and normalized to the number of total cells (nuclei). Representative immunofluorescent images of cells stained with GFAP (green) are shown. All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$). Mean values - left scatter plot: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 1.12, Disp3 sgRNA#2 = 1.08, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.88; - right scatter plot: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 1.32, Disp3 sgRNA#2 = 1.35, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.49. (C) qRT-

PCR analysis of β III-tubulin mRNA expression (upper left scatter plot, *Ubb* was used as a reference gene) and the numbers of β III-tubulin-stained neurites (upper right scatter plot) after neuronal differentiation counted by the Operetta High-Content Imaging System followed by Columbus software analysis using the neurite finding tool. The analysis shows the relative number of neurites normalized to the number of total cells (nuclei). The lower left scatter plot displays the percentage of neurons in each cell culture analyzed manually with ImageJ. The lower right scatter plot shows the number of primary neurites recalculated per neuron. All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Representative immunofluorescent images of cells stained with β III-tubulin (green) are shown at the bottom. Mean values - upper left scatter plot: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 1.16, Disp3 sgRNA#2 = 1.19, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.84; - upper right scatter plot: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 1.19, Disp3 sgRNA#2 = 1.31, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.61; - lower left scatter plot: no sgRNA = 29.56, Disp3 sgRNA#1 = 38.13, Disp3 sgRNA#2 = 41.19, pBabe = 34.91, pBabe-Disp3 = 26.33; - lower right scatter plot: no sgRNA = 2.07, Disp3 sgRNA#1 = 2.55, Disp3 sgRNA#2 = 2.53, pBabe = 2.18, pBabe-Disp3 = 1.99. (D) qRT-PCR analysis of *Plp* mRNA expression after oligodendrocyte differentiation. *Ubb* was used as a reference gene. Representative immunofluorescent images of cells stained with O4 (red) are shown. All data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Mean values: no sgRNA = 1.00, Disp3 sgRNA#1 = 1.74, Disp3 sgRNA#2 = 1.93, pBabe = 1.00, pBabe-Disp3 = 0.78.

whereas the percentage of cells with basal expression decreased (Fig. S3), which indicates that overall more cells have increased β III-tubulin expression.

To elucidate the effect of DISP3 expression on maintaining the undifferentiated state of NS-5 cells, nestin (type-IV intermediate filament protein) mRNA levels were characterized by qRT-PCR. Analysis of both cell lines revealed changes in the nestin expression, which confirmed our previous data suggesting that reduction of DISP3 expression promotes spontaneous differentiation of NS-5 cells, whilst its overexpression helps to maintain the cell stemness (Fig. S4).

To quantify cell proliferation in Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3 cells, a thymidine incorporation assay was performed. The proliferation rate of NS-5 cells overexpressing DISP3 was increased compared to control cells, whilst the proliferation rate of Disp3 sgRNAs was reduced (Fig. 3D, Fig. S5). The growth rate of Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3 cells was quantified every other day and plotted as cumulative cell numbers. Figure 3E shows two selected days from the growth curve (Fig. S6) and corroborates that DISP3 overexpression provides a growth advantage. These results were confirmed using Ki-67 staining (marker of cell proliferation). Compared to control cells, pBabe-Disp3 cells displayed a significantly higher number of Ki-67-positive stained cells (Fig. 3F). Finally, to determine the effect of DISP3 expression on the cell cycle, flow cytometry analysis was performed. This analysis revealed that compared to control cells, both disruption and overexpression of the *Disp3* gene leads to an altered distribution of cells in distinct phases of the cell cycle (Fig. 3G).

Changes in DISP3 expression affect NS-5 cell fate decisions. Given that NS-5 cells can be driven to differentiate into neural cell types *in vitro*, we wondered whether modifying DISP3 expression would affect the NSC differentiation fates. Cells either under- or over-expressing DISP3 were analyzed to determine whether the expression levels of neural-specific markers were altered in NS-5 cells incubated under specific conditions to promote differentiation into either astrocytes, neurons or oligodendrocytes (Fig. 4A).

GFAP is a type-III intermediate filament protein that has previously been used to identify astrocytes. During astrocyte differentiation, the level of *Gfap* mRNA was significantly increased from undetectable on day 0 to relatively high in fully differentiated control NS-5 cells (Fig. S1). GFAP expression in Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3 astrocytes followed a similar pattern to control cells; however, at the end of differentiation the increased *Gfap* mRNA levels in Disp3 sgRNAs and the reduced *Gfap* mRNA levels in pBabe-Disp3 cells indicate an impact of DISP3 on the astrocyte differentiation (Fig. 4B left scatter plot, Fig. S7). Whilst *Gfap* mRNA expression did not differ greatly among the various cell types, there was a definite impact at the protein level. Cells stained with antibodies against GFAP were recognized and quantified based on their shape, size, and intensity of staining and the results revealed that compared to control cells, Disp3 sgRNAs cells in culture had an increased number of highly differentiated astrocytes. The reverse effect was observed in pBabe-Disp3 cells (Fig. 4B right scatter plot, representative images).

To examine neuronal differentiation in NS-5 cells, β III-tubulin mRNA levels were quantified. Increased β III-tubulin mRNA levels were observed in Disp3 sgRNA cells whilst pBabe-Disp3 cells showed a reduction (Fig. 4C upper left scatter plot, Fig. S7). This result demonstrates that modulation of DISP3 expression affects β III-tubulin mRNA levels under neuronal differentiation conditions in the same direction as under the growth/proliferation conditions (Fig. S8). Analysis of the morphology of control NS-5-derived neurons revealed long prototypical neuronal projections (neurites), which expressed high levels of β III-tubulin protein. The number of neurites normalized to the total cell number has been selected as an initial readout for neuronal differentiation.

The numbers of neurites derived from each NS-5 cell culture were automatically quantified and revealed that, compared to the control culture, there were more neurites per cell in Disp3 sgRNAs and less neurites in pBabe-Disp3 cell culture (Fig. 4C upper right scatter plot). Evaluation of the number of neurons in differentiated neuronal culture is difficult using the automated image analysis because of their dense cytoplasm and thin processes. Nevertheless, we were able to analyze the number of neurons manually using the ImageJ software. In differentiated culture, only β III-tubulin-positive cells with extending neurites and dense cytoplasm were considered as neurons. The analysis shows that compared to control cells, the percentage of fully differentiated neurons is higher in Disp3 sgRNA NS-5 cell culture and reduced in pBabe-Disp3 cells (Fig. 4C lower left scatter plot).

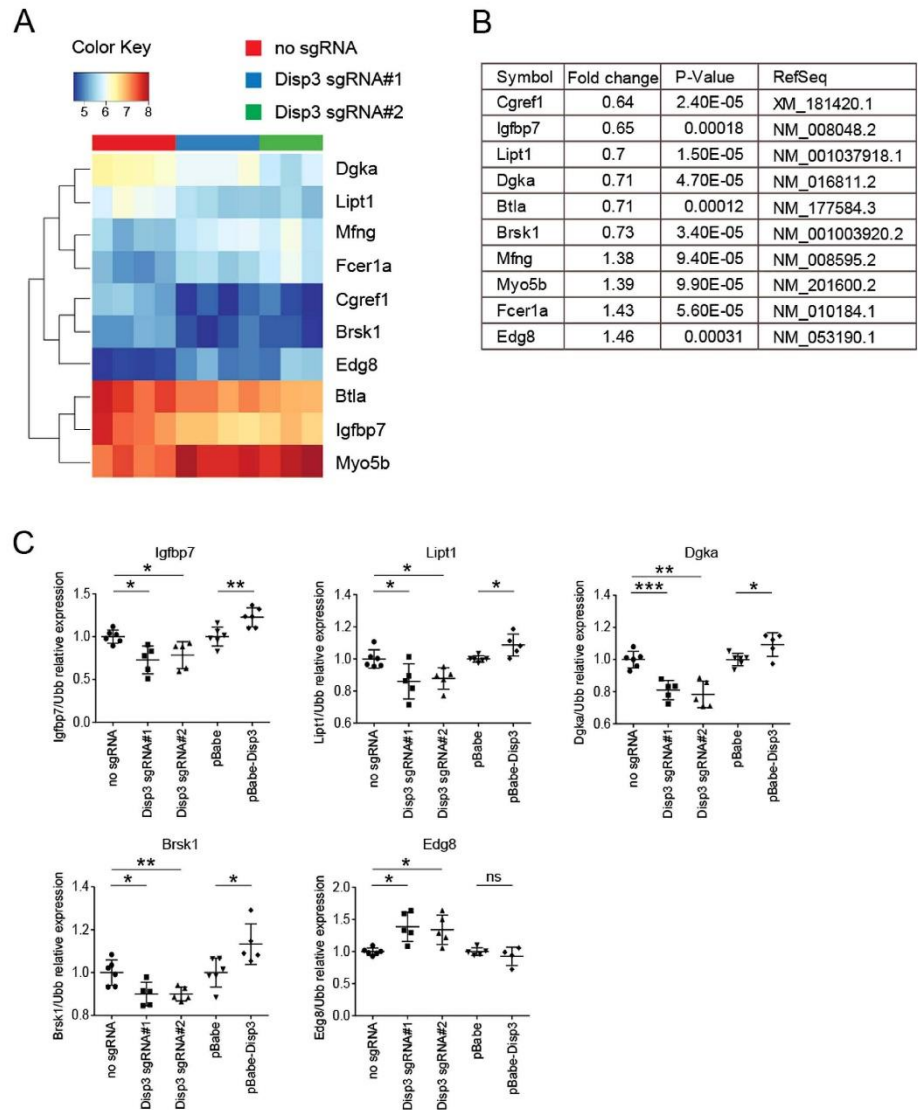


Figure 5. *Disp3* gene expression modulation alters gene expression in NS-5 cells. A heatmap (A) and a list of genes (B) with altered expression in *Disp3* sgRNA cells relative to control cells was obtained by microarray expression profiling. (C) Relative expression of identified genes in *Disp3* sgRNA, pBabe-*Disp3* and control cells was confirmed by an independent qRT-PCR experiment. *Ubb* was used as a reference gene. Data represent the mean of biological replicates with error bars indicating standard deviation and the level of statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Mean values - *Igfbp7*: no sgRNA = 1.00, *Disp3* sgRNA#1 = 0.73, *Disp3* sgRNA#2 = 0.78, pBabe = 1.00, pBabe-*Disp3* = 1.23; - *Lipt1*: no sgRNA = 1.00, *Disp3* sgRNA#1 = 0.86, *Disp3* sgRNA#2 = 0.87, pBabe = 1.00, pBabe-*Disp3* = 1.09; - *Dgka*: no sgRNA = 1.00, *Disp3* sgRNA#1 = 0.81, *Disp3* sgRNA#2 = 0.78, pBabe = 1.00, pBabe-*Disp3* = 1.09; - *Brsk1*: no sgRNA = 1.00, *Disp3* sgRNA#1 = 0.90, *Disp3* sgRNA#2 = 0.90, pBabe = 1.00, pBabe-*Disp3* = 1.13; - *Edg8*: no sgRNA = 1.00, *Disp3* sgRNA#1 = 1.39, *Disp3* sgRNA#2 = 1.34, pBabe = 1.00, pBabe-*Disp3* = 0.93.

Moreover, ImageJ analysis of the absolute number of primary neurites recalculated per neuron in each NS-5 cell culture showed that, compared to the control culture, there were more primary neurites in *Disp3* sgRNAs and less primary neurites in pBabe-*Disp3* neurons (Fig. 4C lower right scatter plot, bottom representative images).

Finally, the effect of *DISP3* expression on oligodendrocyte differentiation was determined by quantitating the level of *Plp* mRNA and O4 protein expression in NS-5 cell cultures after differentiation. *PLP* is an oligodendrocyte-specific transmembrane proteolipid protein that is required for neuronal myelination. O4 is

an antigen located on the surface of oligodendrocytes. *Plp* mRNA levels increased in Disp3 sgRNAs cells while decreased in pBabe-Disp3 cells. Similar findings were obtained when cells were stained with the O4 antibody (Fig. 4D, Fig. S7). Unfortunately, due to the small fraction of cells positive for oligodendrocyte markers (especially in pBabe-Disp3 cells), we were unable to quantify this staining and therefore, show only a representative picture.

In summary, modulation of DISP3 expression affects NS-5 differentiation. Compared to control cell cultures, Disp3 sgRNAs cells generated more highly differentiated astrocytes and showed increased expression of *Plp* mRNA, which is specific for oligodendrocytes. Similarly, the expression of neuron-specific β III-tubulin mRNA was increased, and as such, these cells exhibited increased numbers of neurites. Furthermore, compared to control cells, the number of fully differentiated neurons was higher in Disp3 sgRNA NS-5 cell culture and these neurons had increased numbers of primary neurites. In pBabe-Disp3 cells, the differentiation potential was much lower regardless of the differentiation strategy used.

Modified levels of DISP3 lead to altered gene expression in NS-5 cells. To identify genes in NS-5 cells affected by altered DISP3 expression, we performed microarray analysis. Total RNAs isolated from Disp3 sgRNA#1, Disp3 sgRNA#2 and control cells were hybridized to the Illumina Mouse Expression BeadChips. On the basis of the obtained expression profiles we established a heatmap (Fig. 5A) and a compiled list of common genes (Fig. 5B) with significantly altered expression in both Disp3 sgRNA cultures. The expression levels of the identified genes were confirmed by qRT-PCR in independent Disp3 sgRNA, pBabe-Disp3 and control cell cultures. Our results show that modified expression levels of DISP3 lead to altered mRNA levels of insulin-like growth factor binding protein 7 (*Igfbp7*), lipoyltransferase 1 (*Lipt1*), diacylglycerol kinase alpha (*Dgka*), brain serine/threonine kinase 1 (*Brsk1*) and endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 8 (*Edg8*) (Fig. 5C). Interestingly, all of these identified genes were described to function either in neurodevelopment and/or have been implicated in various tumors.

Discussion

In this study we examined the role of DISP3 in NSC proliferation and differentiation. We have demonstrated in NS-5 cells that the levels of DISP3 expression significantly decrease upon differentiation. We performed both loss-of-function and gain-of-function experiments to determine the effect of DISP3 on the NSC phenotype and differentiation potential. When NSCs were maintained under growth/proliferation conditions, both Disp3 sgRNAs and pBabe-Disp3 cells underwent significant morphological changes. The most obvious alteration was observed in Disp3 sgRNAs cells. Even though the mRNA expression of β III-tubulin did not much differ from control cells, the number of β III-tubulin-positive cells detected by immunofluorescence staining and automated counting was increased nearly three times. The analysis also revealed that not only the fraction of β III-tubulin-positive cells was higher in Disp3 sgRNA NS-5 cell culture, but also that the number of highly stained cells was significantly increased. The observed high expression levels of NSC marker nestin in Disp3 sgRNA NS-5 cells under the growth/proliferation conditions, which were only slightly lower than in control cells, demonstrate the undifferentiated character of these cells. Nevertheless, the increased proportion of β III-tubulin-positive cells indicates the onset of neuronal differentiation. Interestingly, cells overexpressing DISP3 demonstrated a significantly faster proliferation rate than control cells.

In the postnatal cerebellum, the expression of DISP3 is controlled by ATOH1, a transcription factor that plays a major role in cell proliferation, cell migration and initiation of the cell differentiation program³⁴. Interestingly, ATOH1 is also implicated in promoting medulloblastoma formation³⁵. Analysis of Oncomine datasets revealed that *DISP3* expression is significantly elevated in human medulloblastoma²¹. Medulloblastoma is the most common malignant pediatric brain tumor and can be classified into at least four distinct molecular subgroups that vary according to clinical signs and molecular markers. The most aggressive forms of the disease are the non-SHH/WNT subtypes³⁶. Each of these subtypes is characterized by expression of markers that are found in embryonic or adult stem cells, as well as in neural “cancer stem cells” (CSC). It has been hypothesized that sustained tumor growth is restricted to CSCs, which display many similarities to NSCs in their capacity to self-renew and differentiate³⁷. Neural CSCs are able to grow in serum-free media containing EGF and FGF, the two growth factors that promote its “dedifferentiated” status^{8,38,39}.

Immunohistochemical evidence suggests that particular medulloblastoma molecular subgroups arise from distinct cellular origins. WNT-subtype tumors infiltrate the dorsal brainstem, whereas SHH medulloblastomas originate from external germinal layer progenitor (EGL) cells⁴⁰. The origins of non-SHH/WNT subtypes 3 and 4 remain to be defined; nevertheless, it has been demonstrated that the master regulator transcription factors of subgroup 4 are active in neurons that originate from early progenitors of the upper rhombic lip⁴¹. In our previous paper, we used the multipotent cerebellar progenitor cell line C17.2, which was generated from isolated cerebellar neural cells from the EGL layer. The study demonstrated that ectopic overexpression of DISP3 promotes cell proliferation, alters tumorigenic gene expression and modifies the differentiation profile of DISP3-expressing C17.2 cells²¹.

To elucidate whether modulation of DISP3 expression has any effect on the NSC differentiation potential, we determined the expression levels of neural-specific markers in differentiated Disp3 sgRNA cells, pBabe-Disp3 and control cells using both manual and automated microscopy methods. Compared to control cell cultures, differentiated Disp3 sgRNAs cells yielded a greater proportion of neurons and highly differentiated astrocytes. Analysis of Disp3 sgRNA cell culture also showed a higher number of fully differentiated neurons with more primary neurites compared to control cells. In contrast, pBabe-Disp3 cells demonstrated impaired differentiation.

DISP3 is an SSD-containing protein with a phylogenetic relationship to other members of this family. Previously identified genetic mutations within SSD-containing protein family members have revealed NSC self-renewal and differentiation defects. Mutations in the *NPC1* gene cause the Niemann-Pick type C1 lysosomal lipid storage disorder that is characterized by multisystem defects including demyelination and progressive neurodegeneration⁴².

7. Vescovi, A. L. *et al.* Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* **156**, 71–83, doi: 10.1006/exnr.1998.6998 (1999).
8. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707–1710, doi: 10.1126/science.1553558 (1992).
9. Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2074–2077, doi: 10.1073/pnas.90.5.2074 (1993).
10. Gritti, A. *et al.* Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* **16**, 1091–1100 (1996).
11. Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F. & Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* **19**, 8487–8497 (1999).
12. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**, 1–13, doi: 10.1006/dbio.1996.0090 (1996).
13. Keller, G. M. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 862–869, doi: 10.1016/0955-0674(95)80071-9 (1995).
14. Tropepe, V. *et al.* Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* **30**, 65–78, doi: 10.1016/S0896-6273(01)00263-X (2001).
15. Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. & Smith, A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* **21**, 183–186, doi: 10.1038/nbt780 (2003).
16. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. & Gottlieb, D. I. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol* **168**, 342–357, doi: 10.1006/dbio.1995.1085 (1995).
17. Kawasaki, H. *et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**, 31–40, doi: 10.1016/S0896-6273(00)00083-0 (2000).
18. Conti, L. *et al.* Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* **3**, e283, doi: 10.1371/journal.pbio.0030283 (2005).
19. Glaser, T., Pollard, S. M., Smith, A. & Brustle, O. Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS One* **2**, e298, doi: 10.1371/journal.pone.0000298 (2007).
20. Zikova, M., Corlett, A., Bendova, Z., Pajer, P. & Bartunek, P. DISP3, a sterol-sensing domain-containing protein that links thyroid hormone action and cholesterol metabolism. *Mol Endocrinol* **23**, 520–528, doi: 10.1210/me.2008-0271 (2009).
21. Zikova, M. *et al.* DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. *FEBS Lett* **588**, 4071–4077, doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.036 (2014).
22. Kuwabara, P. E. & Labouesse, M. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* **18**, 193–201, doi: 10.1016/S0168-9525(02)02640-9 (2002).
23. Knobloch, M. *et al.* Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature* **493**, 226–230, doi: 10.1038/nature11689 (2013).
24. Stoll, E. A. *et al.* Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids to Produce Energy and Support Neurogenic Activity. *Stem Cells* **33**, 2306–2319, doi: 10.1002/stem.2042 (2015).
25. Hamilton, L. K. *et al.* Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* **17**, 397–411, doi: 10.1016/j.stem.2015.08.001 (2015).
26. Manoranjan, B. *et al.* Medulloblastoma stem cells: where development and cancer cross pathways. *Pediatr Res* **71**, 516–522, doi: 10.1038/pr.2011.62 (2012).
27. Wang, D. *et al.* HCA-vision: Automated neurite outgrowth analysis. *J Biomol Screen* **15**, 1165–1170, doi: 10.1177/1087057110382894 (2010).
28. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84–87, doi: 10.1126/science.1247005 (2014).
29. Watson, J. V., Chambers, S. H. & Smith, P. J. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* **8**, 1–8, doi: 10.1002/cyto.990080101 (1987).
30. Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3, doi: 10.2202/1544-6115.1027 (2004).
31. Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80, doi: 10.1186/gb-2004-5-11-r80 (2004).
32. Valach, J. *et al.* Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer* **131**, 2499–2508, doi: 10.1002/ijc.27550 (2012).
33. Storey, J. D. & Tibshirani, R. Statistical significance for genome-wide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9440–9445, doi: 10.1073/pnas.1530509100 (2003).
34. Klisch, T. J. *et al.* *In vivo* Atoh1 targetome reveals how a proneural transcription factor regulates cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 3288–3293, doi: 10.1073/pnas.1100230108 (2011).
35. Ayrault, O. *et al.* Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Res* **70**, 5618–5627, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3740 (2010).
36. Northcott, P. A. *et al.* Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* **29**, 1408–1414, doi: 10.1200/JCO.2009.27.4324 (2011).
37. Lathia, J. D., Heddleston, J. M., Venere, M. & Rich, J. N. Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell* **8**, 482–485, doi: 10.1016/j.stem.2011.04.013 (2011).
38. Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**, 7011–7021, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364 (2004).
39. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 15178–15183, doi: 10.1073/pnas.2036535100 (2003).
40. Gibson, P. *et al.* Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* **468**, 1095–1099, doi: 10.1038/nature09587 (2010).
41. Lin, C. Y. *et al.* Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature* **530**, 57–62, doi: 10.1038/nature16546 (2016).
42. Ikonen, E. & Holttä-Vuori, M. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 445–454, doi: 10.1016/j.semcdb.2004.03.001 (2004).
43. Yang, S. R. *et al.* NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Stem Cells* **24**, 292–298, doi: 10.1634/stemcells.2005-0221 (2006).
44. Ernst, C. Proliferation and Differentiation Deficits are a Major Convergence Point for Neurodevelopmental Disorders. *Trends Neurosci*, doi: 10.1016/j.tins.2016.03.001 (2016).
45. Efthymiou, A. G. *et al.* Rescue of an *in vitro* neuron phenotype identified in Niemann-Pick disease, type C1 induced pluripotent stem cell-derived neurons by modulating the WNT pathway and calcium signaling. *Stem Cells Transl Med* **4**, 230–238, doi: 10.5966/sctm.2014-0127 (2015).
46. Wassif, C. A. *et al.* Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet* **63**, 55–62, doi: 10.1086/301936 (1998).

47. Lee, R. W., Conley, S. K., Gropman, A., Porter, F. D. & Baker, E. H. Brain magnetic resonance imaging findings in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A* **161A**, 2407–2419, doi: 10.1002/ajmg.a.36096 (2013).
48. Tierney, E. *et al.* Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* **98**, 191–200, doi: 10.1002/1096-8628(20010115)98:2%3C191::AID-AJMG1030%3E3.0.CO;2-M (2001).
49. Francis, K. R. *et al.* Modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome with induced pluripotent stem cells reveals a causal role for Wnt/beta-catenin defects in neuronal cholesterol synthesis phenotypes. *Nat Med* **22**, 388–396, doi: 10.1038/nm.4067 (2016).
50. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis. C. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* **75**, 1305–1315, doi: 10.1016/0092-8674(93)90618-Z (1993).
51. Costa, V. *et al.* mTORC1 Inhibition Corrects Neurodevelopmental and Synaptic Alterations in a Human Stem Cell Model of Tuberous Sclerosis. *Cell Rep* **15**, 86–95, doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.090 (2016).
52. Frazier, T. W. *et al.* Molecular and phenotypic abnormalities in individuals with germline heterozygous PTEN mutations and autism. *Mol Psychiatry* **20**, 1132–1138, doi: 10.1038/mp.2014.125 (2015).
53. Sugathan, A. *et al.* CHD8 regulates neurodevelopmental pathways associated with autism spectrum disorder in neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E4468–4477, doi: 10.1073/pnas.1405266111 (2014).
54. Sprenger, C. C., Damon, S. E., Hwa, V., Rosenfeld, R. G. & Plymate, S. R. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) is a potential tumor suppressor protein for prostate cancer. *Cancer Research* **59**, 2370–2375 (1999).
55. Ruan, W. J. *et al.* IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy* **6**, 354–359, doi: 10.4161/cbt.6.3.3702 (2007).
56. Rupp, C. *et al.* IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction. *Oncogene* **34**, 815–825, doi: 10.1038/onc.2014.18 (2015).
57. Smith, E., Ruszkiewicz, A. R., Jamieson, G. G. & Drew, P. A. IGFBP7 is associated with poor prognosis in oesophageal adenocarcinoma and is regulated by promoter DNA methylation. *British Journal of Cancer* **110**, 775–782, doi: 10.1038/bjc.2013.783 (2014).
58. Sato, Y. *et al.* Relationship between expression of IGFBP7 and clinicopathological variables in gastric cancer. *Journal of Clinical Pathology* **68**, 795–801, doi: 10.1136/jclinpath-2015-202987 (2015).
59. Benassi, M. S. *et al.* Tissue and serum IGFBP7 protein as biomarker in high-grade soft tissue sarcoma. *American Journal of Cancer Research* **5**, 3446–3454 (2015).
60. Jiang, W., Xiang, C. L., Cazacu, S., Brodie, C. & Mikkelsen, T. Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7 Mediates Glioma Cell Growth and Migration. *Neoplasia* **10**, 1335–1342, doi: 10.1593/Neo.08694 (2008).
61. Agis-Balboa, R. C. *et al.* A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories. *Embo Journal* **30**, 4071–4083, doi: 10.1038/emboj.2011.293 (2011).
62. Agbemenyah, H. Y., Agis-Balboa, R. C., Burkhardt, S., Delalle, I. & Fischer, A. Insulin growth factor binding protein 7 is a novel target to treat dementia. *Neurobiology of Disease* **62**, 135–143, doi: 10.1016/j.nbd.2013.09.011 (2014).
63. Goto, K. *et al.* Gene Cloning, Sequence, Expression and Insitu Localization of 80-Kda Diacylglycerol Kinase Specific to Oligodendrocyte of Rat-Brain. *Molecular Brain Research* **16**, 75–87, doi: 10.1016/0169-328x(92)90196-1 (1992).
64. Redei, E. E. *et al.* Blood transcriptomic biomarkers in adult primary care patients with major depressive disorder undergoing cognitive behavioral therapy. *Transl Psychiatry* **4**, e442, doi: 10.1038/tp.2014.66 (2014).
65. Yanagisawa, K. *et al.* Diacylglycerol kinase alpha suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of human melanoma cells through NF-kappa B activation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**, 462–474, doi: 10.1016/j.bbalip.2006.12.008 (2007).
66. Carter, H., Samayoa, J., Hruban, R. H. & Karchin, R. Prioritization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM). *Cancer Biology & Therapy* **10**, 582–587, doi: 10.4161/cbt.10.6.12537 (2010).
67. Takeishi, K. *et al.* Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *Journal of Hepatology* **57**, 77–83, doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.026 (2012).
68. Kefas, B. *et al.* A miR-297/hypoxia/DGK- axis regulating glioblastoma survival. *Neuro-Oncology* **15**, 1652–1663, doi: 10.1093/neuonc/not118 (2013).
69. Dominguez, C. L. *et al.* Diacylglycerol Kinase 1 is a Critical Signaling Node and Novel Therapeutic Target in Glioblastoma and Other Cancers. *Cancer Discovery* **3**, 782–797, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0215 (2013).
70. Kishi, M., Pan, Y. A., Crump, J. G. & Sanes, J. R. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* **307**, 929–932, doi: 10.1126/science.1107403 (2005).
71. Alvarado-Kristensson, M., Rodriguez, M. J., Sillio, V., Valpuesta, J. M. & Carrera, A. C. SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nature Cell Biology* **11**, 1081–U1086, doi: 10.1038/Ncb1921 (2009).
72. Im, D. S. *et al.* Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 14281–14286, doi: 10.1074/jbc.275.19.14281 (2000).
73. Ulfing, N. & Briese, M. Evidence for the presence of the sphingosine-1-phosphate receptor Edg-8 in human radial glial fibers. *Acta Histochemica* **106**, 373–378, doi: 10.1016/j.acthis.2004.08.002 (2004).
74. Jaillard, C. *et al.* Edg8/S1P5: An oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *Journal of Neuroscience* **25**, 1459–1469, doi: 10.1523/jneurosci.4645-04.2005 (2005).

Acknowledgements

We thank S. Takacova for proofreading the manuscript and Ondrej Horvath for cell cycle analysis. This work was supported by Czech Science Foundation project P301-12-1478, MEYS project LO1419, CUGA project 1272214 and IMG institutional support RVO 6878050.

Author Contributions

P.B. and M.Z. proposed the experiments and supervised the work. Ja.K. performed the experiments and analyzed the data. J.O., A.C. and Ju.K. performed the experiments. M.K. analyzed the microarray data. M.Z., J.K., J.O., A.C. and P.B. prepared the manuscript. All authors discussed the results and reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Konířová, J. *et al.* Modulated DISP3/PTCHD2 expression influences neural stem cell fate decisions. *Sci. Rep.* **7**, 41597; doi: 10.1038/srep41597 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017